

# БІОСЕНСОРИ

---

# BIOSENSORS

---

---

УДК 543.06:577.15:543.553

DOI: 10.18524/1815-7459.2022.1/2.239789

## БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛТ

*Д. О. Мруга, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін*

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150,  
03680, м. Київ, Україна, 044 526 1169  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64,  
01003, м. Київ, Україна, 044 239 3333  
darynamruga@gmail.com  
dzyad@yahoo.com  
alex\_sold@yahoo.com

## БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛТ

*Д. О. Мруга, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін*

**Анотація.** В роботі розроблено амперометричний біосенсор для визначення АЛТ. Як електрохімічний перетворювач було використано платиновий дисковий електрод. Для формування біоселективного елементу на поверхню перетворювача наносилась суміш на основі глутаматоксидази. Запропоновано та описано універсальну методику вимірювання активності АЛТ з використанням розробленого біосенсора. В ході дослідження було підібрано оптимальні концентрації субстратів ( $\alpha$ -кетоглутарат – 50 мкМ, аланін – 4 мМ) та кофермента (50 мкМ піридоксафосфату). Також досліджено аналітичні характеристики розробленого біосенсора, а саме, чутливість, лінійний діапазон, мінімальна границя визначення, селективність, стабільність, тощо. Показано принципову можливість використання даного біосенсора для вимірювання вмісту АЛТ в реальних зразках.

**Ключові слова:** амперометрія, біосенсор, іммобілізований фермент, глутаматоксидаза, аланінамінотрансфераза, вимірювання активності аланінамінотрансферази

## BIOSENSOR FOR ALT MEASUREMENT

*D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin*

**Abstract.** In this work, an amperometric biosensor for ALT detection, which will be part of a biosensor system for simultaneous measurements of AST and ALT and their ratios, has been developed. A platinum disk electrode was used as the electrochemical transducer. To form a bioselective element, a mixture based on glutamate oxidase was applied to the surface of transducer. A universal method for

measuring ALT activity using the developed biosensor was proposed and described. During the study, the optimal concentrations of ALT substrates ( $\alpha$ -ketoglutarate – 50  $\mu$ M, alanine – 4 mM) and coenzyme (50  $\mu$ M of pyridoxal phosphate) were selected. The analytical characteristics of the developed biosensor were also investigated, namely, sensitivity, linear range, minimum limit of determination, selectivity, stability, etc. It was shown the fundamental possibility of using this biosensor to measure the content of ALT in real samples.

**Keywords:** amperometry, biosensor, immobilized enzyme, glutamate oxidase, alanine aminotransferase, measurement of alanine aminotransferase activity

## ВСТУП

АЛТ і АСТ – це органоспецифічні внутрішньоклітинні цитоплазматичні ферменти, що беруть участь в процесі ацетилювання, суть якого полягає в перенесенні  $\alpha$ -аміногрупи з амінокислоти (аланін, аспартат, глутамат) на  $\alpha$ -карбон  $\alpha$ -кетокислоти (піруват,  $\alpha$ -КГ, оксалоацетат). Обумовлені роботою АЛТ і АСТ реакції трансамінування є суттєвими ланками в ході метаболізму. Ці ферменти беруть участь в катаболізмі та синтезі амінокислот і  $\alpha$ -кетокислот [1] та орнітиновому циклі печінки [2–3]. Субстрати і продукти, що беруть участь в реакції, мають регуляторні функції (аспартат – стимуляція NMDA-рецепторів [4], контроль проліферації клітин [5] та росту лейкоцитів [6], лімітуючий агент росту ракових утворень [7]; глутамат – збуджуючий нейротрансмітер, попередник  $\gamma$ -аміномасляної кислоти, бере участь в регуляції вмісту катіонів [8–9], локальній регуляції кісткових клітин [10], впливає на ріст ракових клітин [11–13]). Також вони беруть участь в циклі трикарбонових кислот і в транспорті гліколітичного водню із цитозолу в мітохондрії за допомогою малат-аспартатної човникової системи [14]. Сама АСТ також має протипухлинне значення – пригнічує ріст аденокарциноми в клітинах підшлункової залози [15].

АСТ міститься в основному в печінці та клітинах серця, проте наявні також в еритроцитах, скелетній мускулатурі, підшлунковій та нирках; АЛТ майже виключно наявна лише в печінці. Вміст в сироватці крові дорослої людини в нормі не сягає більше 40 Од/л АСТ та 35 Од/л АЛТ [16], але при пошкодженні органів, в яких депонуються ці ферменти, цей

параметр суттєво зростає. Така залежність дозволяє використовувати цей параметр для діагностики деяких захворювань. В клінічній медицині абсолютне значення активності, співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітіса), зміни їх концентрацій протягом певного часу та їх порівняння з концентрацією інших речовин в крові дає змогу лікарям встановити які органи, як сильно та, інколи, навіть з якої причини пошкоджені. Наприклад, при розвитку інфаркту міокарда в крові пацієнта спостерігається підвищення активності АСТ у 6–8 разів [1] та АЛТ у 1,5–2 рази. При гепатиті В вміст АСТ в сироватці крові підвищений більше ніж в 2 рази (40,88 Од/л) порівняно з нормою (18,86 Од/л), а АЛТ – 59,24 Од/л / 22,34 Од/л, відповідно, співвідношення АЛТ/АСТ (обернений коефіцієнт де Рітіса) становило 1,56 (в нормі – 1,13). При гепатиті С вміст АСТ становив 45,80 Од/л, АЛТ – 89,60 Од/л, обернений коефіцієнт де Рітіса – 1,94 [17]. Ішемічний інсульт [18], ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, гепатит, цироз, жирова інфільтрація [19] та рак [20] печінки, жовтяниця, серцева та печінкова недостатність, діабет, дерматоміозит, м'язова дистрофія Дюшенна [21], рак легенів [22], прекампусія [23], отруєння хлорорганічними сполуками – ці та деякі інші хвороби також супроводжуються підвищенням активності АСТ і АЛТ в крові. Відповідно, вміст цих ферментів в сироватці слугує одним з біомаркерів для клінічного діагностування. Перелічені хвороби можуть мати фатальні наслідки, тому зрозуміло, що наявність швидкого і точного тесту для визначення вмісту цих ферментів у крові на сьогодні є доволі злобо-

денним питанням. Це спонукає дослідників на розроблення простого, безпечного, дешевого, чутливого та продуктивного методу визначення АСТ та АЛТ.

Традиційно активність АСТ і АЛТ визначається або безпосередньо детектуванням наявності молекул цих ферментів (хроматографія [24–25], радіохімічні методи [26–27], або за допомогою підрахунку вмісту продуктів ензиматичної реакції (хроматографія [28–29], спектрофотометрія [30–31] хемілюмінесценція [32–34], флуоресценція [35–47], колориметрія [38–39], біосенсиори [40–46]). Однак кожен із зазначених підходів до кількісної оцінки сироваткових АСТ і АЛТ характеризується деякими недоліками: потреба у складному і дорогому обладнанні, необхідність висококваліфікованих спеціалістів, довготривалий аналіз, складна попередня обробка зразку, подекуди, недостатня точність аналізу або низька стабільність, що ускладнює процес вимірювання в клінічних лабораторіях. Нині найбільш перспективними в цьому контексті приладами вважаються біосенсорні системи через їх портативність, простоту конструкції та використання, можливість автоматизованого вимірювання, потребу невеликого об'єму зразку та невисоку вартість аналізу.

Саме тому головною метою роботи є розробка біосенсорної системи для одночасного визначення АСТ і АЛТ та їх співвідношень. Дане дослідження присвячено розробці першого елемента системи, а саме біосенсора для визначення вмісту АЛТ в сироватці крові.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### *Матеріали*

Для створення біосенсора використана рекомбінантна глутаматоксидаза (ГлОкс), отримана з *Streptomyces sp.* з активністю 7 од. акт. мг<sup>-1</sup> (Yamasa Corporation, Японія). БСА (фракція V), АЛТ, піридоксальфосфат (ПФ), L-аланін, α-кетоглутарат (α-КГ), 25% водний розчин глутарового альдегіду (ГА), гліцерин, NEPES, аскорбінова кислота, цистеїн, мета-фенілендіамін, L-глутамат натрію були ви-

робництва фірми Sigma-Aldrich, США. Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, зокрема пероксид водню, етиловий спирт, порошок оксиду алюмінію та ін. були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч. д. а.“.

### *Конструкція амперометричного перетворювача та схема експериментальної установки*

В даній роботі як амперометричний перетворювач використали платиновий дисковий електрод. Його детальна конструкція описана в попередній роботі [48].

В ході експерименту використовувалася триелектродна схема амперометричного аналізу. До потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди) підключались робочі електроди, допоміжний платиновий електрод та хлорсрібний електрод порівняння. Також було підключено 8-канальний PulmSens multiplexer, що дозволяв отримувати сигнали з декількох робочих електродів одночасно. Відстань між всіма електродами була однаковою і складала близько 5 мм.

### *Методика нанесення біоселективної мембрани*

Для створення чутливого до глутамату елемента біосенсора взяли за основу метод ковалентної іммобілізації ферменту на поверхні електроду з використанням зшиваючого агента – глутарового альдегіду. Готувався ферментний гель, що містив 8% ГлОкс, 4% БСА та 10% гліцерину у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Гліцерин необхідний для стабілізації ферменту і покращення адгезії мембрани. Наступним кроком цей гель змішувався з водним розчином ГА (концентрацією 0,05%) в пропорції (1:2). Суміш одразу наносили на чутливу зону електроду і висувували на повітрі за кімнатної температури протягом 35 хвилин. Готовий біосенсор відмивали від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани в робочому буферному розчині (25 мМ NEPES, рН 7,4) протягом 10 хвилин.

### Методика вимірювання вмісту АЛТ

В даній роботі вміст АЛТ в робочій коміріці розраховувався в залежності від швидкості зміни сили струму при зміні концентрації глутамату, що продукувався в ході ферментативних реакцій.

Вимірювання проводилися за кімнатної температури у відкритій коміріці, об'ємом 2,5 мл, при постійному перемішуванні та постійному потенціалі (який був попередньо підібраний експериментальним шляхом) +0,6 В відносно хлорсрібного електрода порівняння, що відповідає потенціалу окиснення пероксиду водню  $H_2O_2$  на аноді. Робочим буфером слугував 25 мМ НЕРЕС з рН 7,4, а концентрації субстратів в коміріці задавалися додаванням певних аліквот концентрованих розчинів.

Всі дослідження проводилися щонайменше 3 рази, а дані, наведені в роботі, є середнім значенням. Розрахунки проводилися в програмі OriginLab OriginPro 8.5.

## РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

### Принцип роботи біосенсора

Принцип роботи даного біосенсора базується на реакції ферментативної трансaminaції амінокислот (схема 1–1).

АЛТ каталізує біомолекулярну реакцію типу «пінг-понг», тобто трансaminaування проходить в 2 етапи. Перший –  $\alpha$ -аміногрупа з амінокислоти переноситься на кофермент і аланін перетворюється  $\alpha$ -кетокислоти (піруват). На другому етапі процес іде в зворотну

сторону: кофермент дезамінується, а зв'язаний з активним центром ферменту  $\alpha$ -КГ приєднує аміногрупу, перетворюючись на амінокислоту (глутамат).

Відповідно, при наявності в розчині АЛТ, його субстратів та коферменту продукується глутамат, концентрація якого, в деяких межах, буде прямо пропорційна кількості ферменту в розчині.

Для визначення концентрації глутамату, а, відповідно, і активності АЛТ, застосовується біосенсор на основі ГлОкс. В ході ферментативної реакції в біоселективній мембрані окиснюється глутамат та утворюється електрохімічно-активний пероксид водню (схема 1–2).

Якщо прикласти потенціал в 600 мВ на електроді з платини відбувається анодне розкладання пероксиду водню (схема 1–3), з утворенням електронів, які реєструє амперометричний перетворювач.

Типовий аналіз для визначення активності АЛТ приведено на рисунку 1. Як видно на рисунку, спочатку отримується базова лінія біосенсора, далі у вимірювальну комірку з сенсором вносяться субстрати та кофактор АЛТ – аланін,  $\alpha$ -КГ та ПФ, що не призводить до відгуку біосенсора. Далі в реакційний розчин вноситься АЛТ, внаслідок чого починає продукуватися глутамат, відповідно, ми бачимо реакцію біосенсора. Чим вища активність ферменту, тим стрімкіше зростає концентрація продукту, тобто тим швидше змінюється сила струму і зростає величина відгуку.

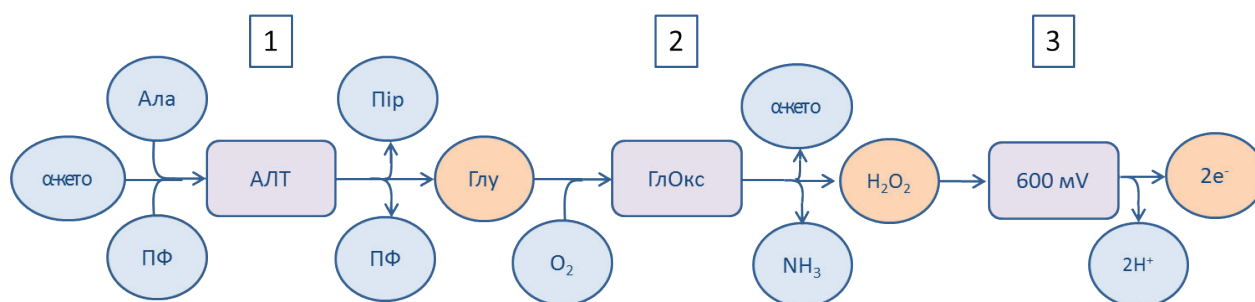
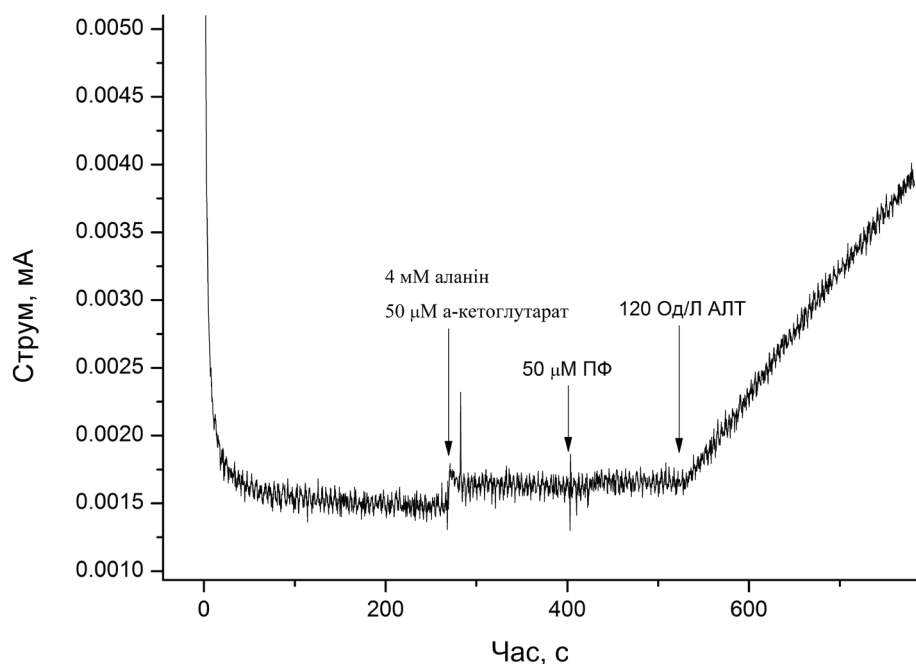


Схема 1



**Рис. 1. Типовий відгук біосенсора на внесення 120 Од/л АЛТ в присутності субстратів та коферменту (аланін 4 мМ, а-КГ 50 мкМ, ПФ 50 мкМ).**

### *Підбір оптимальних концентрацій субстратів*

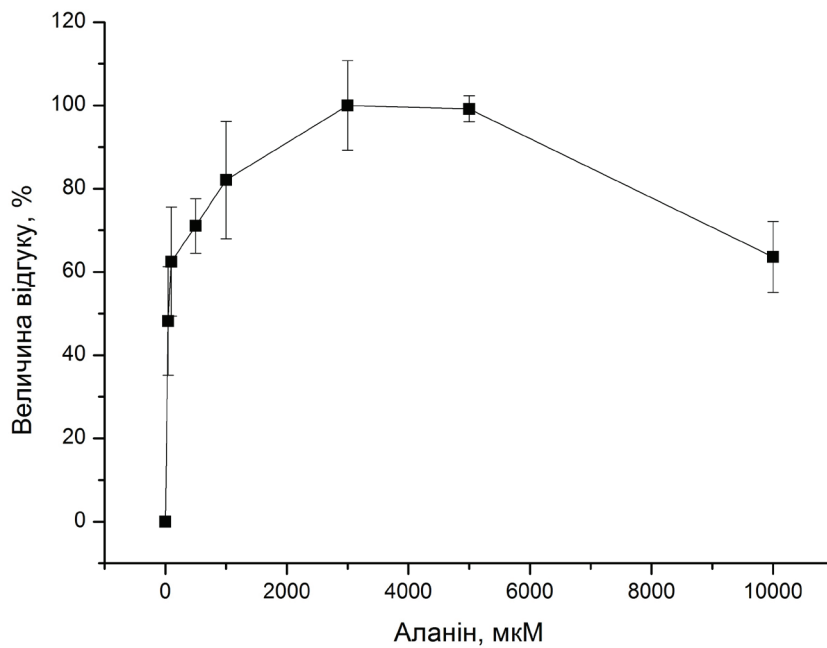
Зрозуміло, що для роботи ензиму необхідні субстрати, які будуть брати участь в хімічній реакції, також зрозуміло, що для досягнення максимальної продуктивності необхідно, щоб ензиматична реакція не спинялась, тобто кожна наявна молекула ферменту в кожний момент часу брала участь в перетворенні субстрату в продукт. За оптимальних умов будь-який фермент має деяку максимальну швидкість протікання реакції, тобто за 1 хвилину він зможе утворити максимальну кількість продукту.

Таким чином, логічно припустити, що для досягнення цього максимуму необхідно взяти субстрат у надлишку відносно ферменту, 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. АЛТ має один активний центр та 2 субстрати, що приєднуються за

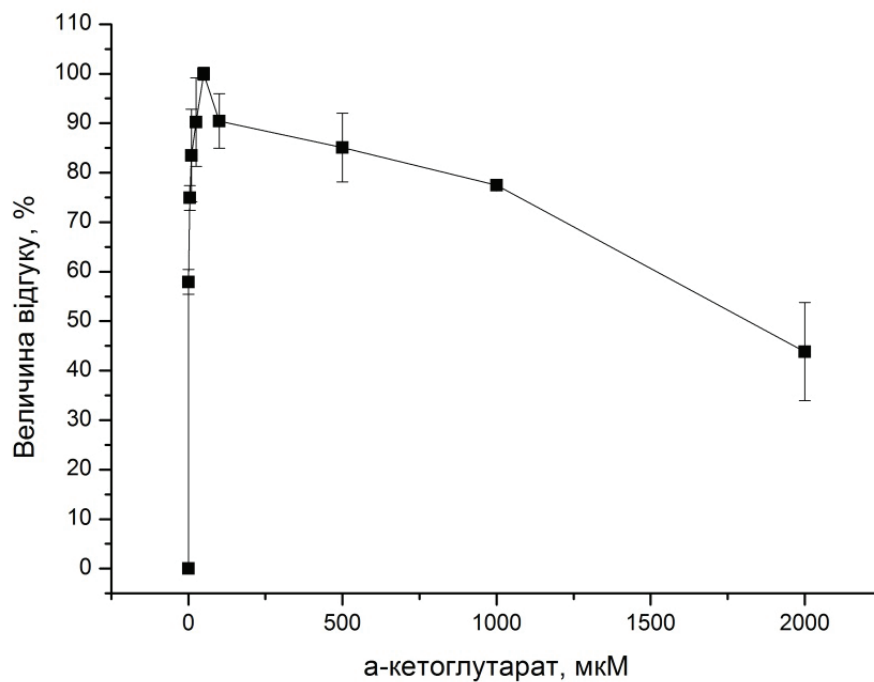
принципом “пінг-понг” (механізм подвійного заміщення) [49], тобто почергово. Відповідно, існує загроза інгібування ферменту субстратами, через що було вирішено підібрати оптимальні концентрації субстратів ферментативної реакції.

В ході досліджень було виявлено, що присутність аланіну у надвисоких концентраціях (3–15 мМ) не мало суттєвого впливу на швидкість протікання реакції (рис. 2), тому було вирішено проводити вимірювання в присутності 4 мМ аланіну.

Також експериментальні дані показали різкий спад активності АЛТ при підвищенні вмісту  $\alpha$ -КГ більше 50 мкМ (рис. 3), що свідчить про його високу спорідненість до ферменту, в результаті чого висока енергія зв'язку не дозволяє вільного розриву системи АЛТ- $\alpha$ -КГ. Це призводить до того, що ензим не може дезамінувати кофермент і перенести аміногрупу на  $\alpha$ -КГ, що, в свою чергу, сповільнює протікання реакції. Крім того,  $\alpha$ -КГ також утворюється в якості продукту окиснення глутамату, що поновлює його кількість в робочому розчині.



**Рис. 2.** Залежність відгуку біосенсора від концентрації аланіну у вимірювальній комірці. Концентрація  $\alpha$ -КГ – 4 мМ, АЛТ – 100 Од/л. За 100% взято максимальний відгук біосенсора на 100 Од/л АЛТ (в присутності 3мМ аланіну).



**Рис. 3.** Залежність відгуку біосенсора від концентрації  $\alpha$ -КГ в робочій комірці. Концентрація аланіну – 4 мМ, АЛТ – 100 Од/л. За 100% взято максимальний відгук біосенсора на 100 Од/л АЛТ (в присутності 50мкМ  $\alpha$ -КГ).

**Підбір оптимальної концентрації коферменту**

Всі амінотрансферази мають спільний механізм реакції (схема 2) 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 амінотрансфераз [50–51]. Він зазнає оборотні перетворення між своєю альдегідною формою (піридоксальфосфат (ПФ), який може приймати аміногрупу) і амінованою формою (піри-

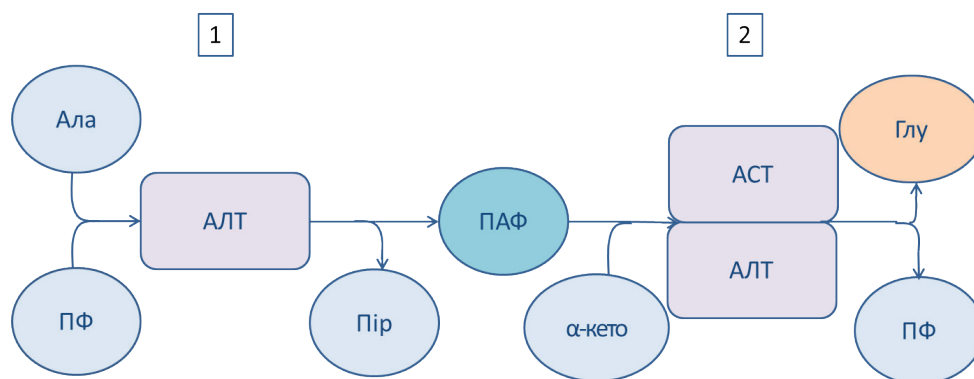


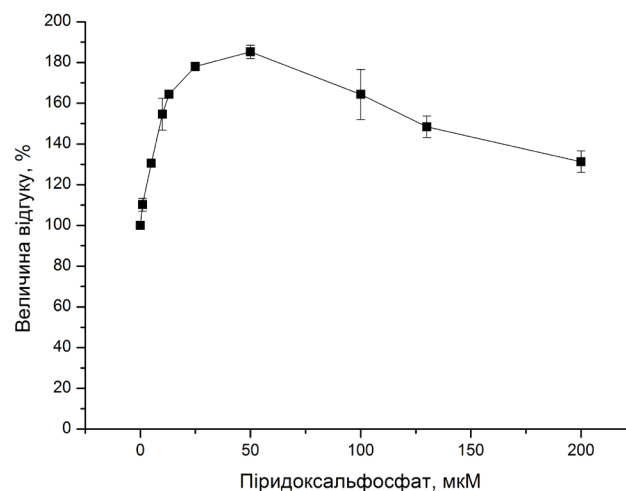
Схема 2

доксамінфосфат (ПАФ), який може віддавати свою аміногрупу α-кетокислотам). ПФ ковалентно зв'язаний з активним сайтом ферменту через альдимінний зв'язок (основа Шиффа) з ε-аміногрупою на залишку лізину.

Хімічна роль ПФ полягає в наступному: в ході трансамінування альдимінний зв'язок ПФ з ферментом 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 ПАФ.

Наступний етап трансамінування починається з приєднання другого субстрату до комплексу АЛТ-ПАФ, а саме α-кетокислоти α-КГ, і процес йде в обернену сторону з утворенням нової амінокислоти (глутамату) та ПФ.

Експериментальним шляхом було встановлено, що оптимальна концентрація ПФ в робочій комірці становить 50 мкМ (рис. 4).



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

### **Вплив присутності АСТ на роботу АТЛ-чутливого біосенсора**

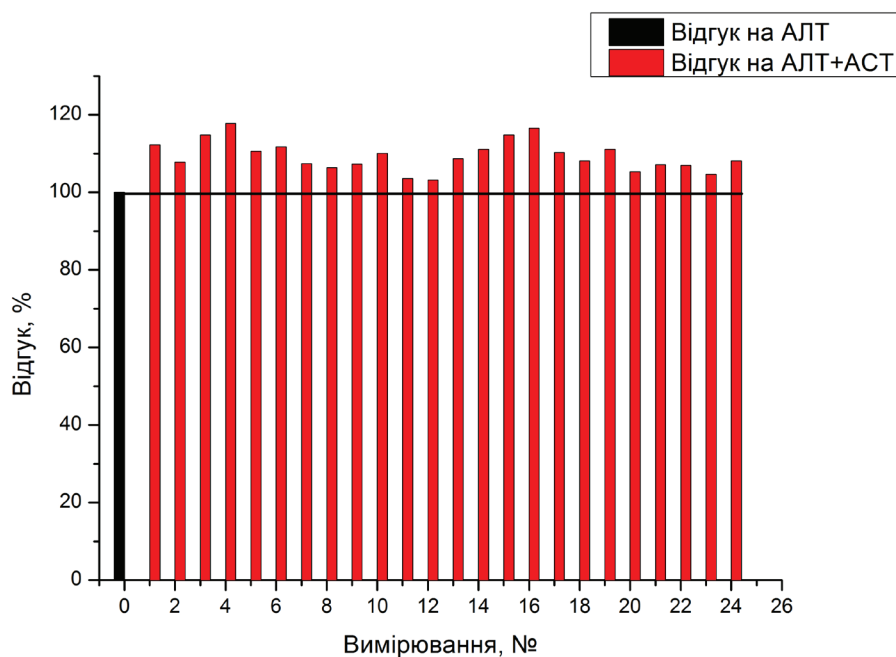
Оскільки АСТ має однаковий принцип роботи з АЛТ, існує велика імовірність його впливу на функціонування розробленого біосенсора. Тому було вирішено перевірити даний аспект. Перевірка здійснювалась двома способами: послідовним внесенням в робочий розчин субстратів, АЛТ, а потім АСТ, та навпаки – субстрати, АСТ та АЛТ. В першому варіанті після додавання АСТ в робочу комірку з біосенсором чутливим до АЛТ спостерігалось явне збільшення кута нахилу прямої, що відповідає 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 чистим АЛТ. В ході експерименту ми спостерігали зростання відгуків біосенсора чутливого до АЛТ на 10% в присутності АСТ та АЛТ в рівній кількості, порівняно АЛТ без АСТ. Оскільки цей показник лежав в межах похибки вимірювання, відповідно, вплив на роботу біосенсора, спричинений присутністю в роз-

чині АСТ, було вирішено вважати допустимим для нормального функціонування біосенсора в складних біологічних розчинах.

Зростання відгуків можна пояснити спільним другим етапом роботи цих ферментів та наявністю в робочому розчині мобільного коферменту (схема 2). По завершенню першого етапу (схема 2–1) ПАФ може від'єднатися від АЛТ. Якщо після цього ПАФ приєднується до АСТ, то остання починає другий етап трансамінування – перенесення аміногрупи з коферменту на  $\alpha$ -КГ (схема 2–2). При цьому, звільнена від коферменту АЛТ повторює перший етап. Таким чином, загальна швидкість трансамінації зростає. Але, вірогідність приєднання ПАФ до АСТ досить низька, оскільки в розчині в надлишку знаходяться субстрати реакції, тобто  $\alpha$ -КГ приєднується до АЛТ швидше, ніж від'єднується ПАФ.

### **Вивчення селективності біосенсора**

Даний біосенсор розробляється з метою подальшого вимірювання АСТ і АЛТ в зразках біологічного походження. Крім субстратів та продуктів реакції в даних зразках можуть



**Рис. 5.** Вплив присутності 100 Од/л АСТ на величину відгуків біосенсора на 100 Од/л АЛТ. За 100% взято величину відгуку біосенсора на 100 Од/л АЛТ.



бути присутні інші електроактивні речовини, що окиснюються при докладенні потенціалу і дають хибний позитивний відгук (аскорбінова кислота, цистеїн, сечова кислота та ін.). Їх вплив на перетворювач було усунуто нанесенням на поверхню амперометричного електроду додаткової ПФД мембрани [47].

Також необхідно було перевірити вплив інших, неелектроактивних речовин, присутніх в біологічних розчинах, зокрема сечовини, ЕДТА, глюкози, лимонної та бензойної кислоти, азиду натрію, NaCl, KCl та CaCl<sub>2</sub>. Було встановлено, що за концентрації 1 мМ ці речовини не викликали відгуку біосенсора і їх присутність не впливала на величину відгуку на глутамат.

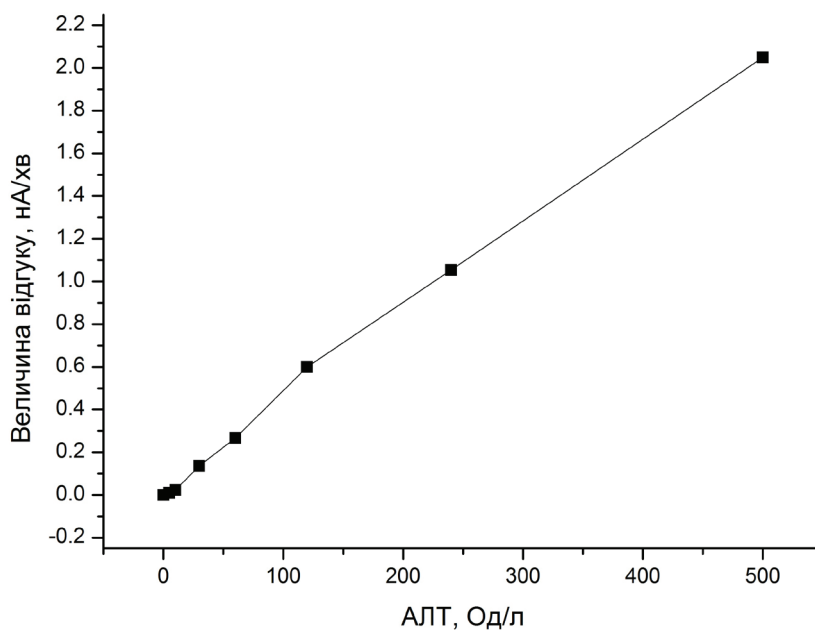
Селективність будь-якого біосенсора залежить як від селективності перетворювача, так і від селективності біоселективного елементу. Відповідно, було перевірено селективність біосенсора відносно різних амінокислот. Виявлено невисоку чутливість до аспарагіну, глутаміну, аспарагінової кислоти та гістидину, що була меншою в 50–100 разів, за чутливість біосенсора до глутамату, тому

зрозуміло, що присутність цих амінокислот в зразку не призводить до суттєвої похибки у вимірюваннях, а інші амінокислоти не спричиняли відгуку біосенсора. Чутливість до деяких амінокислот можна пояснити неідеальною селективністю ГлОкс до глутамату, а також наявністю у препараті ГлОкс слідових кількостей інших ферментів (наприклад, оксидази L-амінокислот).

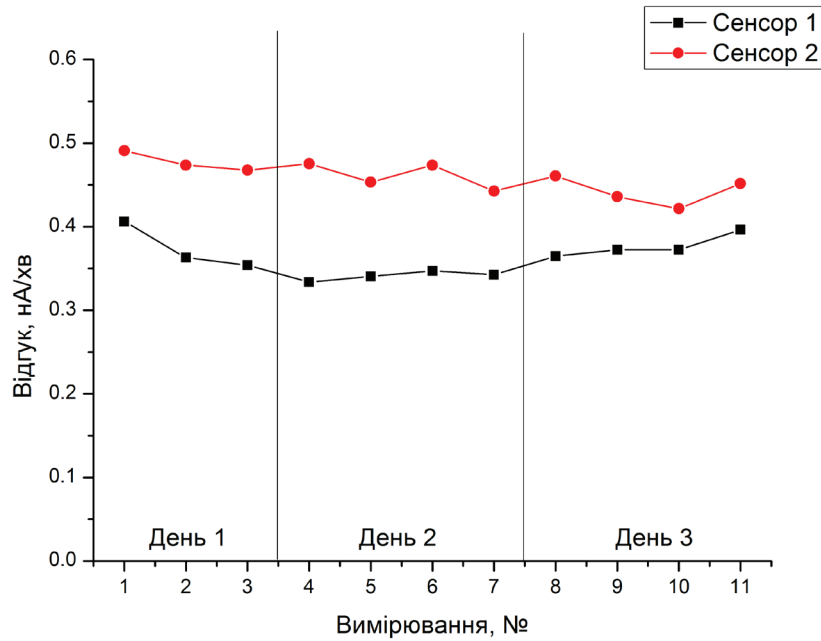
#### *Аналітичні характеристики біосенсора для визначення АЛТ*

Розроблений біосенсор характеризувався широким лінійним діапазоном визначення вмісту АЛТ (10–500 Од/л). На рис. 6 приведено калібрувальну криву біосенсора для визначення АЛТ, з яких видно, що чутливість становила 0.6 нА/хв на 100 Од/л АЛТ. Мінімальна границя визначення – 10 Од/л.

Також було досліджено операційну стабільність розробленого біосенсора протягом 3 днів (рис. 7). Для цього було проведено 11 вимірювань, які продемонстрували, що падіння величини відгуку на різних сенсорах становило 6–14% від початкової чутливості.



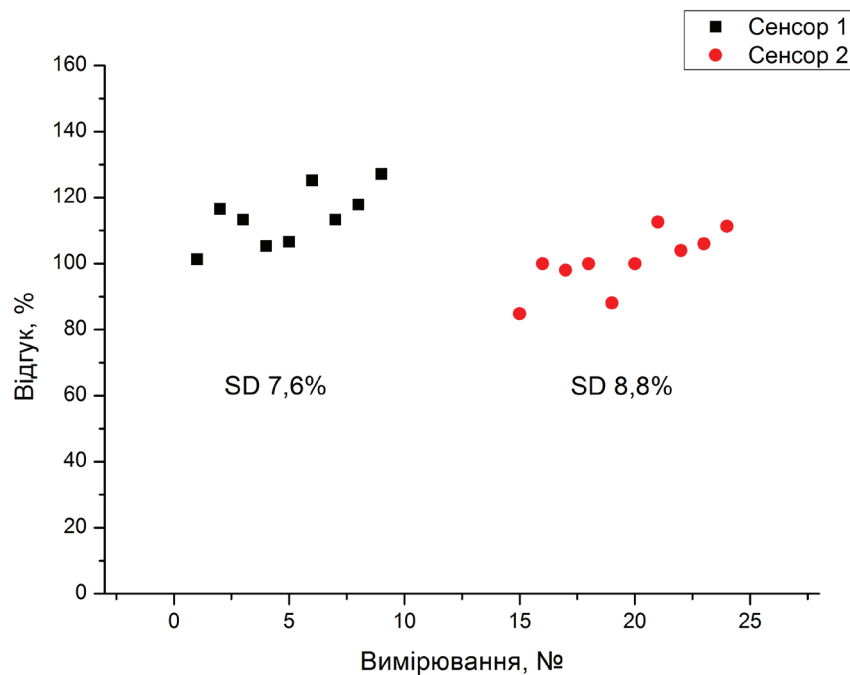
**Рис. 6.** Калібрувальні криві різних біосенсорів для вимірювання активності АЛТ в робочій комірці. Концентрація аланіну 4 мМ, α-КГ – 50 мкМ, ПФ – 50 мкМ.



**Рис. 7. Операційна стабільність розробленого біосенсора протягом 3 днів. Концентрація аланіну 4 мМ,  $\alpha$ -КГ – 50 мкМ, ПФ – 50 мкМ, АЛТ – 100 Од/л.**

Крім того в роботі було досліджено відтворюваність сигналів біосенсорів протягом одного дня безперервних вимірювань, для цьо-

го було отримано низку відгуків на концентрацію АЛТ 100 Од/л та встановлено похибку вимірювання (RSD = 8%) (рис. 8).



**Рис. 8. Відтворюваність відгуків розробленого біосенсора протягом дня. Концентрація аланіну 4 мМ,  $\alpha$ -КГ – 50 мкМ, ПФ – 50 мкМ, АЛТ – 100 Од/л.**

Подальші дослідження будуть направлені на перевірку роботи розробленого біосенсора в реальних зразках сироватки крові, розробці біосенсора для визначення АСТ та створенню біосенсорної системи для аналізу співвідношення АСТ/АЛТ.

### ВИСНОВКИ

В роботі описано розробку нового амперометричного ферментного біосенсора на основі глутаматоксидази для вимірювання вмісту АЛТ в розчині.

Проаналізовано селективність запропонованого в роботі біосенсора, а саме, селективність біоселективного елемента відносно різних компонентів біологічних рідин. Селективність амперометричного перетворювача відносно електроактивних речовин було покращено за допомогою застосування напівпроникної ПФД-мембрани.

В роботі, задля досягнення найбільшої чутливості біосенсора, було підібрано оптимальні концентрації субстратів АЛТ (аланін – 4 мМ та  $\alpha$ -КГ – 50 мкМ) та його коферменту (50 мкМ ПФ).

Дослідження аналітичних характеристик біосенсора для визначення глутамату виявило, що його лінійний діапазон роботи становив 5–600 мкМ глутамату, а чутливість – 150–200 нА/мМ. Лінійний діапазон для визначення АЛТ лежав в межах 10–500 Од/л, що цілком задовольняє потреби клінічної діагностики. Чутливість становила близько 0.6 нА/хв 100 Од/л АЛТ. Мінімальна границя визначення – 10 Од/л. Падіння величини відгуків за 3 дні функціонування сягало 6–14%, а похибка відтворюваності сигналу біосенсора протягом одного дня безперервної роботи – 8%.

Таким чином, було показано потенціальну можливість використання розробленого біосенсора для моніторингу рівня активності АЛТ в сироватці крові та перспективу розробки біосенсорної системи для визначення співвідношення АСТ/АЛТ.

### ПОДЯКА

Робота виконана за рахунок коштів гранту НАН України дослідницьким лабораторі-

ям/групам молодих учених НАН України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки у 2022 р. та 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]. Severin E (2004) *Biochemistry* 2<sup>nd</sup> edition: 470.
- [2]. Severin E, Nikolaeva A (2002) *Biochemistry. Brief course with exercises and tasks* 2<sup>nd</sup> edition: 139.
- [3]. Severin E, Nikolaeva A (2002) *Biochemistry. Brief course with exercises and tasks* 2<sup>nd</sup> edition: 240.
- [4]. Dingle R, McBain C (1999) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Glutamate and Aspartate Are the Major Excitatory Transmitters in the Brain.
- [5]. Coloff J, Murphy J, Braun C, Harris I, Shelton L, Kami K, Gygi S, Selfors L, Brugge J (2016) Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells. *Cell Metab* 23(5):867–80.
- [6]. Lomelino C, Andring J, McKenna R, Kilberg M (2017) Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *J Biol Chem*. 292(49):19952–19958.
- [7]. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu X, Fidelin J, Sviderskiy V, Papagiannakopoulos T, Molina H, Snuderl M, Lewis C, Possemato R, Birsoy K (2018) Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumors. *Nat Cell Biol*. 20(7):775–781.
- [8]. Han M, Kopec W, Solov'yov I, Khandelia H (2017) Glutamate Water Gates in the Ion Binding Pocket of Na<sup>+</sup> Bound Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Sci Rep* 7:39829.
- [9]. Mattson M (2008) Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. *Ann N Y Acad Sci* 144:97–112.
- [10]. Chenu C (2002) Glutamatergic regulation of bone remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2(3):282–4.

- [11]. Trister A, Scott J, Rockne R, Yagle K, Johnston S, Hawkins-Daarud A, Baldock A, Swanson K (2014) Response to “Tumor cells in search for glutamate: an Alternative explanation for increased invasiveness of IDH1 mutant gliomas”. *Neuro Oncol* 16(12):1670–1.
- [12]. van Lith S, Molenaar R, Noorden C, Leenders W (2014) Tumor cells in search for glutamate: an Alternative explanation for increased invasiveness of IDH1 mutant gliomas. *Neuro Oncol* 16(12):1669–70.
- [13]. Jin L, Li D, Alesi N, Fan J, Kang H, Lu Z, Boggon T, Jin P, Yi H, Wright E, Duong D, Seyfried N, Egnatchik R, DeBerardinis R, Magliocca K, He C, Arellano M, Khoury H, Shin D, Khuri F, Kang S (2015) Glutamate Dehydrogenase 1 Signals Through Antioxidant Glutathione Peroxidase 1 to Regulate Redox Homeostasis and Tumor Growth. *Cancer Cell* 27(2):257–70.
- [14]. Gubskiy Y (2000) Biological chemistry:153.
- [15]. Son J, Lyssiotis S, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera R, Ferrone C, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang, Fleming Y, Bardeesy N, Asara J, Haigis M, DePinho R, Cantley L, Kimmelman A (2013) Glutamine supports pancreatic cancer growth through a Kras-regulated metabolic pathway. *Nature* 496(7443):101–105.
- [16]. Teng J, Wei Y, Su F, Guo Z, Zhong J (2015) Evaluating of Physiological Chemical Levels in Blood to Assess the Risk of Morbidity and Mortality of Ischemic Cardiovascular Disease. *Int J Environ Res Public Health* 12(9):11549–11559.
- [17]. Mastoi A, Devrajani B, Shah S, Rohopoto Q, Memon S, Baloch M, Qureshi G, Sami W (2010) Metabolic investigations in patients with hepatitis B and C. *World J Gastroenterol* 16(5): 603.
- [18]. Muscari A, Collini A, Fabbri E, Giovagnoli M, Napoli C, Rossi V, Vizioli L, Bonfiglioli A, Magalotti D, Puddu G, Zoli M (2014) Changes of Liver Enzymes and Bilirubin During Ischemic Stroke: Mechanisms and Possible Significance. *BMC Neurol* 14:122.
- [19]. Mahale A, Prabhu S, Nachiappan M, Fernandes M, Ullal S (2018) Clinical Relevance of Reporting Fatty Liver on Ultrasound in Asymptomatic Patients During Routine Health Checkups. *J Int Med Res* 46(11):4447–4454.
- [20]. Yang J, He X, Huang B, Zhang H, He Y (2018) Rule of Changes in Serum GGT Levels and GGT/ALT and AST/ALT Ratios in Primary Hepatic Carcinoma Patients With Different AFP Levels. *Cancer Biomark* 21(4):743–746.
- [21]. Lehmann-Werman R, Magenheimer J, Moss J, Neiman D, Abraham O, Piyanzin S, Zemmour H, Fox I, Dor T, Grompe M, Landesberg G, Loza B, Shaked A, Olthoff K, Glaser B, Shemer R, Dor Y (2018) Monitoring Liver Damage Using Hepatocyte-Specific Methylation Markers in Cell-Free Circulating DNA. *JCI Insight* 3(12): e120687.
- [22]. Li J, Yuan Z, Wang Q, Fan W, Zhang G (2019) Meta-analysis of Overall Incidence and Risk of ALK Inhibitors-Induced Liver Toxicities in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *98(1): e13726.*
- [23]. Kasraeian M, Asadi N, Vafaei H, Zamanpour T, Shahraki H, Bazrafshan K (2018) Evaluation of Serum Biomarkers for Detection of Preeclampsia Severity in Pregnant Women. *Pak J Med Sci* 34(4):869–873.
- [24]. Canepari S, Carunchio V, Girelli A, Messina A (1994) Determination of aspartate aminotransferase activity by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B: Biomed Sci and App* 656.1:191–195.
- [25]. Carunchio V, Castellano P, Girelli A, Messina A (1997) Simultaneous assay for aspartate aminotransferase and guanase in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B: Biomed Sci and App* 689.2:305–311.
- [26]. An L (2015) Detection of glutamate, glutamine, and glutathione by radiofrequency suppression and echo time optimization at 7 tesla. *Magn Reson Med* 73(2):451–8
- [27]. Perales M, Sener A, Malaisse W (1992) Radioisotopic Assay of Aspartate and Alanine Aminotransferase. *Clin Biochem* 25(2):105–7.
- [28]. Kondrat R (2002) In vivo microdialysis and gas-chromatography/mass-spectrometry for  $^{13}\text{C}$ -enrichment measurement

of extracellular glutamate in rat brain. *J Neurosci Methods* 120(2):179–92.

[29]. Shin H (2017) Metabolic profiling of tyrosine, tryptophan, and glutamate in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry combined with single SPE cleanup. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1051:97–107.

[30]. Mater D, Spielman D (2005) Detection of glutamate in the human brain at 3 T using optimized constant time point resolved spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 54.2.

[31]. Chang K, Hsu W, Chen H, Chang C, Chen C (2003) 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* 481.2:199–208.

[32]. Catz S, Carreras M, Poderoso J (1995) Nitric Oxide Synthase Inhibitors Decrease Human Polymorphonuclear Leukocyte Luminol-Dependent Chemiluminescence. *Free Radic Biol Med* 19(6):741–8.

[33]. Janasek D, Spohn U (1999) Chemiluminometric Flow Injection Analysis procedures for the enzymatic determination of L-alanine,  $\alpha$ -ketoglutarate and L-glutamate. *Biosensors and Bioelectronics* 14.2:123–129.

[34]. Marquette C, Dequili A, Blum L (2003) Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate. *Biosensors and Bioelectronics* 19.5:433–439.

[35]. Khampha W, Yakovleva J, Isarangkul D, Wiyakrutta S, Meevootisom V, Emneus J (2004) Specific detection of L-glutamate in food using flow-injection analysis and enzymatic recycling of substrate. *Analytica Chimica Acta* 518.1–2:127–135.

[36]. Bonizzoni M, Fabbrizzi L, Piovani G, Taglietti A (2004) Fluorescent detection of glutamate with a dicopper(II) polyamine cage. *Tetrahedron* 60.49:11159–11162.

[37]. Okumoto S, Looger L, Micheva R, Reimer K, Smith S, Frommer W (2005) Detection of Glutamate Release From Neurons

by Genetically Encoded Surface-Displayed FRET Nanosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24):8740–5.

[38]. Lippi U, Guidi G (1970) A New Colorimetric Ultramicromethod for Serum Glutamic-Oxalacetic and Glutamic-Pyruvic Transaminase Determination. *Clin Chim Acta* 28(3):431–7.

[39]. Bailey W, DeRouen T, Ziskind M, Greenberg H, (1975) Autoanalytic (Colorimetric) Determinations of SGOT in Isoniazid Recipients Are Reliable. *Am Rev Respir Dis* 111(2):237–8.

[40]. Xuan G, Oh S, Choi E (2003) Development of an Electrochemical Immunosensor for Alanine Aminotransferase. *Biosens Bioelectron* 19(4):365–71.

[41]. Suman S, Singhal R, Sharma A, Malthotra B, Pundir (2004) Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical* 107.2:768–772.

[42]. Kwan R, Hon P, Mak K, Renneberg R (2004) Amperometric Determination of Lactate With Novel Trienzyme/Poly(carbamoyl) Sulfonate Hydrogel-Based Sensor. *Biosens Bioelectron* 19(12):1745–52.

[43]. Pan S, Arnold M (1996) Selectivity Enhancement for Glutamate With a Nafion/glutamate Oxidase Biosensor. *Talanta* 43(7):1157–62.

[44]. Ye B, Li Q, Li Y, Li X, Yu J (1995) L-Glutamate biosensor using a novel L-glutamate oxidase and its application to flow injection analysis system. *Journal of Biotechnology* 42.1:45–52.

[45]. Oldenzel W, Westerink B (2005) Improving Glutamate Microsensors by Optimizing the Composition of the Redox Hydrogel. *Anal Chem* 77(17):5520–8.

[46]. Rahman A, Kwon N, Won M, Choe E, Shim Y (2015) Functionalized Conducting Polymer as an Enzyme-Immobilizing Substrate: An Amperometric Glutamate Microbiosensor for in Vivo Measurements. *Anal Chem* 7(15):4854–60.

[47]. Soldatkina O, Kucherenko I, Pyeshkova V, Alekseev S, Soldatkin O, Dzyadevych S (2017) Improvement of amperometric transducer selectivity using

nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Research Letters* 12(1):594.

[48]. Pyeshkova V, Kucherenko I, Soldatkin O, Dzyadevych S (2010) Sensor's degradation, methodology and certification. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 1(7).

[49]. Lehninger A, Nelson D, Cox M (1982) *Principles of biochemistry* 1nd edition: 175.

[50]. Lehninger A, Nelson D, Cox M (1993) *Principles of biochemistry* 2nd edition // Amino Acid Oxidation and the Production of Urea.

[51]. Toney M D (2013) *Encyclopedia of Biological Chemistry* // Pyridoxal Phosphate:708–711.

Стаття надійшла до редакції 16.12.2021 р.

UDC543.06:577.15:543.553

DOI: 10.18524/1815-7459.2022.1/2.239789

## BIOSENSOR FOR ALT MEASUREMENT

*D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin*

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Zabolotnogo street 150, 03680, Kyiv, Ukraine, 044 526 1169

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska street 64, 01003, Kyiv, Ukraine, 044 239 3333

darynamruga@gmail.com

dzyad@yahoo.com

alex\_sold@yahoo.com

### Summary

ALT and AST are organ-specific enzymes that provide substrate's transamination, which is an essential part of amino acid metabolism, ornithine cycle and other processes. Plasma concentrations of these enzymes do not normally exceed 40 U / L, but increase significantly with damage to the heart muscle and liver. Therefore, the content of ALT and AST in the blood is an important diagnostic marker. Traditional methods for measuring the level of ALT and AST in the blood are spectrophotometry and fluorescence, but they have a number of disadvantages, including the high cost and complexity of the equipment and the impossibility of rapid analysis.

**The aim** of this work was to develop novel amperometric biosensor for ALT determination.

**Research methods:** The amperometric method of analysis was used in the work. A platinum disk electrode was used as the electrochemical transducer. The method of glutaraldehyde crosslinking between the components of the enzyme gel (Glox and BSA) was used to form a bioselective element on the surface of the transducer.

**The results of the study:** A universal method for measuring ALT activity using a developed biosensor (determination of the change in current per minute) was proposed and described. During the study, the optimal concentrations of substrates ( $\alpha$ -ketoglutarate – 50  $\mu$ m, alanine – 4 mm) and coenzyme (50  $\mu$ m pyridoxadophosphate) were selected. The analytical characteristics of the developed biosensor were also investigated, namely, sensitivity (per 100 IU / 1 ALT sensitivity was 0.6 nA / min), linear range (10–500 IU / 1 ALT), minimum limit of determination (10 U / 1 ALT), stability (6–14% in 3 days), reproducibility of responses (8%), selectivity. A calibration response curve of the developed biosensor for ALT application was obtained.

**Conclusions:** Thus, it was shown the fundamental possibility of using this biosensor to measure the content of ALT in real samples. In the future it is planned to develop a biosensor system for simultaneous measurement of AST and ALT.

**Keywords:** amperometry, biosensor, immobilized enzyme, glutamate oxidase, alanine aminotransferase, measurement of alanine aminotransferase activity

УДК 543.06:577.15:543.553

DOI: 10.18524/1815-7459.2022.1/2.239789

## БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛТ

*Д. О. Мруга, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін*

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150,  
03680, м. Київ, Україна, 044 526 1169  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64,  
01003, м. Київ, Україна, 044 239 3333  
darynamruga@gmail.com  
dzyad@yahoo.com  
alex\_sold@yahoo.com

### Реферат

АЛТ і АСТ – це органоспецифічні ферменти, які забезпечують трансамінування субстратів, що є суттєвою ланкою метаболізму амінокислот, орнітинового циклу та інших процесів. Концентрація цих ферментів в плазмі крові в нормі не перевищує 40 Од/л, але суттєво зростає при пошкодженні серцевих м'язів та печінки. Тому вміст АЛТ та АСТ в крові є важливим діагностичним маркером. Традиційними методами для вимірювання рівня АЛТ та АСТ в крові є спектрофотометрія та флуоресценція, але вони мають ряд недоліків, зокрема висока вартість і складність обладнання та неможливість проведення експрес-аналізу.

**Мета** даної роботи полягала в розробці нового амперометричного біосенсора для визначення АЛТ.

**Методи дослідження:** В роботі використовували амперометричний метод аналізу. Як амперометричні перетворювачі використовували платинові дискові електроди. Для формування біоселективного елементу на поверхні перетворювача застосовувався метод глутаральдегідної зшивки між компонентами ферментного гелю (ГлОкс та БСА).

**Результати дослідження:** Запропоновано та описано універсальну методику вимірювання активності АЛТ з використанням розробленого біосенсора (визначення зміни сили струму за хвилину). В ході дослідження було підбрано оптимальні концентрації субстратів ( $\alpha$ -кетоглутарат – 50 мкМ, аланін – 4 мМ) та кофермента (50 мкМ піридоксадфосфату). Також було досліджено аналітичні характеристики розробленого біосенсора, а саме, чутливість (на 100 Од/л АЛТ чутливість становила 0,6 нА/хв), лінійний діапазон (10–500 Од/л АЛТ), мінімальна границя визначення (10 Од/л АЛТ), стабільність (6–14% за 3 дні), відтворюваність відгуків (8%), селективність. Було отримано калібрувальну криву відгуків розробленого біосенсора на внесення АЛТ.

**Висновки:** Показано принципову можливість використання даного біосенсора для вимірювання вмісту АЛТ в реальних зразках. В подальшому планується розробка біосенсорної системи для одночасного вимірювання АСТ та АЛТ.

**Ключові слова:** амперометрія, біосенсор, іммобілізований фермент, глутаматоксидаза, аланінамінотрансфераза, вимірювання активності аланінамінотрансферази