

РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ МУЛЬТИФУНКЦІОНАЛЬНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПІРУВАТУ ТА/АБО АКТИВНОСТІ АЛТ У ВОДНИХ ЗРАЗКАХ

Д. О. Мруга¹, Є. Р. Ваховський^{1,2}, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,3}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150,
м. Київ, 03680, Україна

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

³ Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського, Берестейський проспект, 37,
м. Київ, 03056, Україна

E-mail: darynamruga@gmail.com; genyrud93@gmail.com;
dzyad@yahoo.com; alex_sold@yahoo.com

Анотація. В роботі розроблено та оптимізовано амперометричний біосенсор для високочутливого та селективного визначення концентрації пірувату та показано принципову можливість його використання для аналізу активності аланін амінотрансферази (АЛТ). Як перетворювач було використано платиновий дисковий електрод, біоселективний елемент створено на основі ензиму піруватоксидаза та фотополімеру PVA-SBQ. В роботі проаналізовано вплив параметрів розчину (буферна ємність, рН, йонна сила), вивчено селективність біосенсора відносно інтерферуючих речовин та відтворюваність відгуків ($RSD = 12,66\%$). Також було проаналізовано основні аналітичні характеристики біосенсора (лінійний діапазон 10–500 мкМ пірувату, чутливість 66 нА/мМ, межа визначення 1,57 мкМ). Отримані дані свідчать про перспективність застосування розробленого біосенсора для визначення пірувату у біологічних зразках. Зрештою було побудовано калібрувальну криву величини відгуку розробленого піруват-чутливого біосенсора від вмісту АЛТ.

Ключові слова: аналітична хімія, біосенсор, піруват оксидаза, аланін амінотрансфераза, ензим, амперометрія

ВСТУП

Піруват ($C_3H_4O_3$) – ключовий метаболіт, що залучений в провідні енергетичні шляхи (метаболізм глюкози, включно з гліколізом і глікогенезом) [1]. Піруват бере участь у клітинному диханні (як в аеробному, так і в анаеробному середовищі) [2], біосинтезі жирних кислот і циклі лимонної кислоти [3], та підтримуванні балансу (гомеостазу) амінокислот [4]. Крім того, піруват необхідний для підтримки клітинного окисно-відновного балансу [5], слугуючи попередником ацетил-СоА, який входить у цикл Кребса [6]. Нормальні концентрації пірувату в біологічних рідинах становлять 40–100 мкМ [7]. Аномальні концентрації пірувату пов'язують

із рядом захворювань, зокрема, зростання вмісту може спричинятись енцефалокардіоміопатією, лейкоенцефалопатією, спиноцеребелярною атаксією [8]. В якості монобіомаркера він майже не застосовується, однак доволі великою діагностичною вагою володіє співвідношення концентрацій лактату до пірувату, оскільки вони асоційовані з гострою печінковою недостатністю [9], розладом аутичного спектру [10], лактоацидозом [11], порушенням тканинної перфузії [12], тканинною гіпоксією при циркулярному та септичному шоці [13], мігренню [14] тощо.

Піруват також є продуктом роботи діагностично важливого ферменту аланінамінотранс-

ферази (АЛТ), що означає, що рівень пірувату в крові може корелювати із концентраціями АЛТ в організмі людини. АЛТ головним чином міститься в печінці, проте також в невеликих концентраціях присутня в скелетних м'язах, м'язах серця та нирках. Підвищені концентрації цього ферменту здебільшого пов'язані із дисфункцією печінки (гепатит, цироз, жирова хвороба печінки) [15]. Це підкреслює важливість точного та надійного моніторингу концентрації пірувату та АЛТ для діагностичних і дослідницьких цілей.

Традиційні методи вимірювання пірувату та АЛТ, такі як спектрофотометричні або флюорометричні аналізи [16, 17, 18], високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) і мас-спектрометрія (МС) [19, 20], забезпечують високу чутливість і специфічність. Однак ці методи часто передбачають складну підготовку зразків, високі експлуатаційні витрати та тривалий час аналізу, що робить їх непрактичними для швидкого моніторингу в режимі реального часу, особливо в місцях надання першої медичної допомоги.

Амперометричні біосенсиори пропонують багатообіцяючу альтернативу традиційним методам виявлення пірувату через їхню простоту, низьку вартість, швидкий час аналізу та здатність забезпечувати моніторинг в реальному часі. При розробці біосенсорів для виявлення пірувату найчастіше застосовується піруватоксидаза (ПОкс), яка каталізує окисне декарбоксілювання пірувату з утворенням перекису водню (H_2O_2) і вуглекислого газу (CO_2). Інколи також використовується лактатдегідрогеназа (яка каталізує реакцію окиснення лактату до пірувату з використанням NADH [22] та неензиматичне декарбоксілювання пірувату в поєднанні з пероксидазою хрону (HRP) [23]. Для визначення АЛТ зазвичай застосовуються різноманітні амперометричні біосенсиори на основі глутамат оксидази [24, 25], або піруватоксидази [26].

Поточні розробки піруват- та/або АЛТ-чутливих біосенсорів зосереджені на підвищенні чутливості, селективності та стабільності. Прогрес у використанні наноматеріалів, таких

як графен [27, 28], вуглецеві нанотрубки [29, 30] та наночастинки різних металів [31, 32, 33], значно покращив ефективність перенесення електронів та іммобілізації ферментів, що призвело до покращення продуктивності сенсорів. Також для покращення селективності біосенсорів використовують додаткові полімерні мембрани [34, 35]. Найбільш ефективною є напівпроникна мембрана на основі полі-мета-фенілендіаміну, що дозволяє майже повністю прибрати вплив електроактивних інтерферентів на роботу біосенсора [36]. Однак, незважаючи на ці досягнення, багато параметрів (особливо довгострокова стабільність, відтворюваність роботи з біологічними рідинами, мінімізація впливу матриці реального зразку, тощо) вимагають подальшої оптимізації, що обмежує широке застосування біосенсорів для визначення як пірувату, так і АЛТ у клінічній практиці.

Таким чином, дана робота спрямована на вирішення зазначених проблем шляхом створення та оптимізації нового біосенсора для виявлення концентрації пірувату та/або активності АЛТ, що зможе використовуватись в клінічній діагностиці.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріали

Для створення біосенсора було використано фермент піруватоксидазу (ПОкс), отриманий з *Aerococcus viridans*, (Sigma-Aldrich, Японія), полівініловий спирт із стерил піридинієвими групами (PVA-SBQ), HEPES (Sigma-Aldrich, США), мета-фенілендіамін (Sigma-Aldrich, Китай). Як субстрат було використано піруват натрію (Sigma-Aldrich, Японія). Розчин нітрату магнію (Sigma-Aldrich) був використаний в якості кофактора ПОкс, тіамін пірофосфат (ТПФ) (Sigma-Aldrich, США) як кофермент та калій дигідрофосфат («ХІМЛАБОРРЕАКТИВ», Україна) як додатковий субстрат ферментативної реакції. Нанесення напівпроникної мембрани відбувалось з використанням мета-фенілендіаміну (Sigma-Aldrich, Китай). Для перевірки селективності було використано електроактивні речовини: аскорбінова кислота (Sigma-Aldrich), дофамін гідрохлорид (Sigma-Aldrich, Германия),

лимонна кислота (Sigma-Aldrich, Австрія), сечовина (Sigma-Aldrich, США) та деякі амінокислоти: L-метіонін (Sigma-Aldrich, Японія), L-аргінін (Sigma-Aldrich, Японія), L-лізин (Sigma-Aldrich, Китай) та L-цистеїн (Sigma-Aldrich, Японія).

Для вимірювання активності АЛТ використали фермент глутамат-піруват трансаміназу, 129,87 од.акт./мл, отриманий із серця свині (Sigma-Aldrich, США). Біосенсорне визначення активності АЛТ також потребувало піридоксальфосфату (П5Ф) (Sigma-Aldrich, Італія), α -кетоглутарату (Sigma-Aldrich, Китай) та L-аланіну (Sigma-Aldrich, Китай) в якості коферментів.

Інші неорганічні сполуки, що використовувалися протягом експерименту (зокрема пероксид водню, етиловий спирт) були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.» та «ч.д.а.».

Конструкція амперометричного перетворювача

В якості перетворювача було використано платиновий дисковий електрод. Для виготовлення даного електроду в скляний капіляр було запаяно платиновий дріт ($d = 0,4\text{mm}$), переріз якого в подальшому слугував робочою поверхнею електрода. Використовуючи легкоплавкий сплав на основі вісмуту (сплав Вуда) платиновий дріт був поєднаний із внутрішнім срібним провідником ($d = 0,2\text{mm}$). З протилежного кінця капіляра до внутрішнього провідника було припаяно контакт для підключення вимірювальної системи та герметизовано внутрішній простір капіляру за допомогою епоксидної смоли. Перед безпосереднім використанням амперометричного перетворювача його робоча ділянка була відшліфована за допомогою шліфувального паперу та пасти з оксиду алюмінію різної фракції (0,3 та 0,05 мкм). Перед нанесенням біоселективного елементу поверхню обов'язково знежирували спиртовим розчином і промивали дистильованою водою.

Схема установки для амперометричних вимірювань

Для проведення вимірювань використовувалась триелектродна система амперометрич-

ного аналізу, яка включала робочі електроди, додатковий платиновий електрод та електрод порівняння. Робочі електроди виступали в якості анода, на якому розкладався виділений в ході реакції H_2O_2 . Додатковий платиновий електрод (катод) за рахунок більшої площі поверхні, яка взаємодіє з розчином, замикав електричне коло та забезпечував ефективні процеси відновлення складових робочого розчину. Електрод порівняння (Ag/AgCl) слугував умовною точкою відліку при прикладанні потенціалу, за рахунок поверхні, яка постійно оновлюється і, відповідно, має постійний заряд. Всі електроди підключались до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди) через 8-канальний PalmSens multiplexer, котрий дозволяв отримувати сигнал з кількох робочих електродів одночасно. Більш детально з схемою амперометричного методу можна ознайомитись в попередніх роботах [37].

Методика нанесення поліфенілендіамінової мембрани

Для формування ПФД мембрани попередньо відшліфований амперометричний електрод занурювали в закриту від світла комірку з 4мМ розчином мономерів мета-фенілендіаміну у 25мМ HEPES буфері, pH 7,4, де методом циклічної вольтамперометрії мета-фенілендіамін електрополімеризувався на поверхні платинового електроду. Процес відбувався протягом 20–30 циклів, в ході яких потенціал змінювався від 0 до 1000 мВ, зі швидкістю зміни потенціалу 50 мВ/с та кроком 5 мВ. Процес продовжувався доки вольтамперограми майже не відрізнялися одна від одної, що свідчило про повне покриття поверхні електрода шаром полі-мета-фенілендіаміну. Далі перевірялась цілісність мембрани, шляхом внесення в комірку електроактивної речовини. Відсутність відгуку на інтерференти свідчила про якісне нанесення ПФД мембрани.

Методика нанесення біоселективного елементу

При виготовленні біоселективного елементу біосенсора за основу брався метод заключення ферменту в полімері (PVA-SBQ) шляхом фото-

полімеризації. Перед іммобілізацією, готувався ферментний гель, що містив ПОкс (4,86 од. акт./мкл), 5% БСА та 10% гліцерин. Гліцерин додавали задля забезпечення стабільності фермента, пластичності мембрани і попередження передчасного її висихання. БСА стабілізував фермент та збільшував щільність мембрани, забезпечуючи менше вимивання ферменту протягом використання біосенсора. Всі компоненти гелю були розчинені у 25мМ HEPES буфері, рН 7,4 через його стабільність та інертність по відношенню до піруват оксидази. Наступним кроком було змішування даного гелю із водним розчином PVA-SBQ (19,8%) в співвідношенні 1:2. Отриману суміш одразу наносили на чутливу поверхню електрода і полімеризували за допомогою УФ лампи ($\lambda = 365$ нм) (Vilber, Китай) з прикладеною потужністю 2,4 Дж. Перед використанням біосенсори промивались 2–3 рази по 3 хвилини в робочому буферному розчині. Після завершення описаної процедури біосенсор вважався готовим до використання.

Методика вимірювання пірувату

Вимірювання проводились за кімнатної температури у відкритій комірці об'ємом 4,5 мл, при постійному перемішуванні та постійному прикладеному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, що відповідає оптимальному потенціалу окиснення пероксиду водню на платиновому аноді. В якості робочого буфера використовувався 25мМ HEPES з рН 7,4, а концентрації субстратів, кофакторів та коферментів забезпечувались внесенням аліквот відповідних концентрованих розчинів. Речовини вносились у вимірювальну комірку в однаковому порядку з метою стандартизації процесу: калій фосфат, тіамін пірофосфат та магній нітрат. Після додавання всіх необхідних для перебігу реакції речовин, обов'язковим було очікування стабілізації базової лінії для зниження похибки вимірювання. Результати зареєстровані за допомогою потенціостата інтерпретувались наступним чином: відгук біосенсора на внесення пірувату – це різниця між базовим струмом та стабілізованим значенням струму після внесення пірувату у вимірювальну комірку.

Вимірювання проводились в однакових умовах, якщо не було зазначено іншого: концентрація фосфат іонів – 5 мМ, тіамін пірофосфату – 2 мМ, магнію – 0,5мМ; у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Усі дослідження проводились по 4–5 разів, і представлені результати є їх середнім значенням. Всі розрахунки проводились в програмі OriginLab OriginPro 8.5.

Методика вимірювання АЛТ

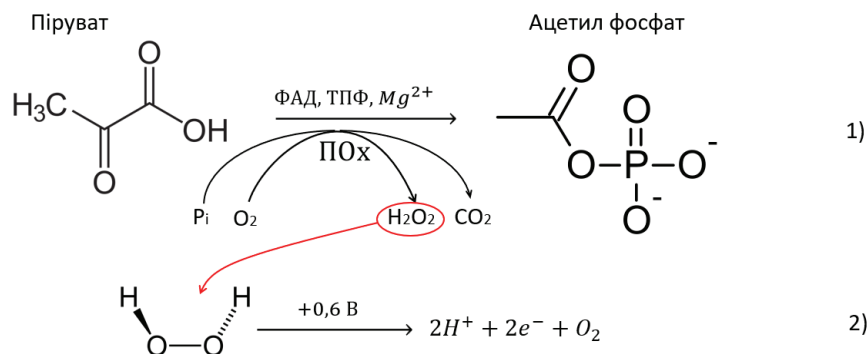
Вимірювання проводились за умов, описаних в пункті «Методика вимірювання пірувату». Речовини вносились в комірку в однаковому порядку: калій фосфат, тіамін пірофосфат, магній нітрат, піридоксальфосфат (П5Ф), α -кетоглутарат та аланін. Після додавання речовин необхідних для протікання реакції необхідним було очікування стабілізації базової лінії для зниження похибки вимірювання. Результати фіксувались за допомогою потенціостата та інтерпретувались наступним чином: було взято лінійні відрізки відгуку біосенсора за однаковий час (1хв) та порівняна різниця сили струму для кожного із відрізків.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Принцип роботи біосенсора

Принцип роботи біосенсора заснований на ферментативній реакції декарбоксилювання в біоселективній мембрані за участю ПОх (1), в результаті якої утворюється електрохімічно активна речовина пероксид водню. Субстратом для даної ензиматичної реакції слугував піруват та неорганічні фосфати, що в присутності кисню перетворювались на ацетилфосфат, CO_2 та пероксид водню. Окрім субстратів для нормального протікання даної реакції необхідна присутність тіамін пірофосфату в якості коферменту, та іонів магнію як кофактору реакції.

Прикладення потенціалу 0,6 В до електрода спричиняло руйнування молекул пероксиду водню, згідно схеми реакції (2). Окиснення пероксиду водню супроводжувалось вивільненням вільних електронів, які залучались в електричне коло системи і спричиняли зростання сили стру-



му в системі, яке в подальшому реєструвалось за допомогою потенціостату і візуалізувалось за допомогою спеціального програмного забезпечення. На рис. 1 приведено типовий відгук біосенсора на послідовне внесення різних концентрацій пірувату в робочу комірку.

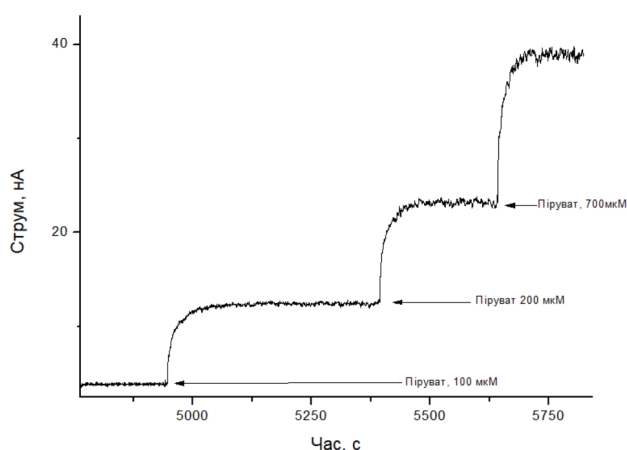


Рис. 1. Реальні приклади відгуків біосенсора на різні концентрації пірувату. Вимірювання проводили в 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Стрілками позначено концентрацію пірувату в комірці.

Дослідження впливу параметрів розчину на роботу біосенсора

Для оптимальної роботи біосенсора важливим фактором є параметри робочого буферу, оскільки саме в ньому протікають біохімічні реакції та забезпечуються необхідні конформації молекул та процеси пасивної дифузії. До параметрів робочого буфера можна віднести тип буферу, буферну ємність, рН, іонну силу, температуру та насиченість киснем.

Одним із найважливіших параметрів буферної системи, що впливає на роботу ферментних біосенсорів, є її рН, оскільки через іонізацію функціональних груп третинна форма і активність ферментів змінюється при різних рН. Розроблений біосенсор планується застосовувати для вимірювання концентрації пірувату в зразках сироватки крові, відповідно, в якості робочого рН було обрано 7,4 (рН сироватки крові становить 7,35–7,45). Однак для підтвердження ефективності роботи біосенсора на основі ПОх за такого рН, було перевірено вплив рН на його функціонування (рис. 2). Показано, що відгуки біосенсора при роботі в буферному розчині з рН 7,4 майже максимальні за величиною і дозволяють в подальшому застосовувати біосенсор для визначення пірувату в крові.

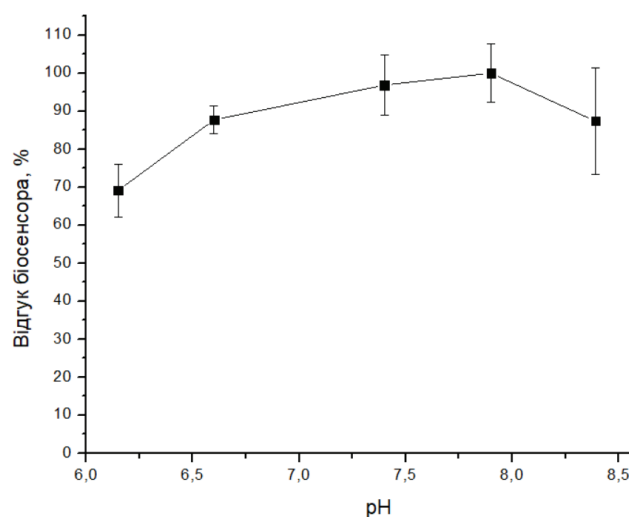


Рис. 2. Залежність величини відгуку біосенсора на додавання 1 мМ пірувату від рН 25 мМ HEPES робочого буферу. За 100% прийнятий максимальний відгук біосенсора.

Для підтримання сталого рН необхідна наявність правильної буферної системи. В якості робочого буфера ми вибрали HEPES, оскільки цей буфер має мінімальний вплив на зміну йонної сили розчину за рахунок нейтрального заряду молекули HEPES і, відповідно, не впливає на активність ферменту. HEPES відзначається високою стабільністю за різних температур, не розкладається та не взаємодіє з киснем, що важливо для ферментів, що каталізують окиснення. Також, на відміну від фосфатного буферу, HEPES не зв'язує бівалентні іони металів (Mg^{2+} , Mn^{2+}), що необхідні для роботи ПОкс, та стабілізує кофермент ТПФ [38].

Окрім вибору типу буферної системи необхідно було підібрати концентрацію HEPES для

забезпечення оптимальної буферної ємності. Експериментальні дані (рис. 3) показали, що найбільший відгук піруват-чутливого біосенсора спостерігається при концентрації HEPES 100 мМ. Такі результати пов'язані зі здатністю висококонцентрованого буферу підтримувати сталий рН в ході ферментативної реакції. Однак, така висока концентрація буферу спричиняє надмірну регуляцію рН в зоні активного центру ферменту, що ускладнює його доступ до вільних протонів, залучених у ферментативну реакцію. Це було підтверджено експериментально (рис. 3) і показано що найвища швидкість реакції спостерігається при 25 мМ HEPES (31 секунда в 25 мМ буферному розчині порівняно з 169 секундами в 100 мМ буферному розчині).

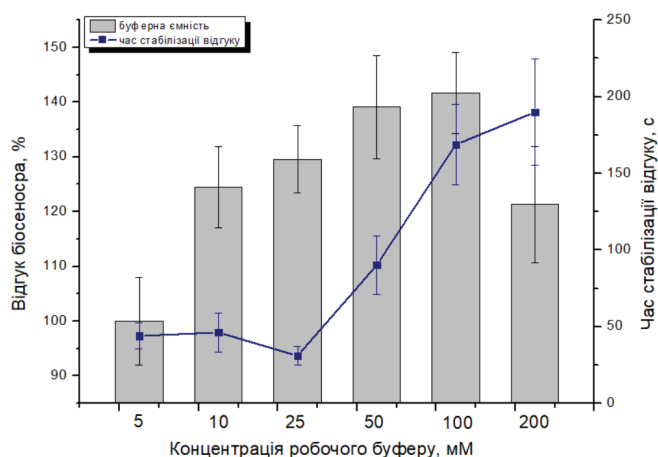


Рис. 3. Залежність величини та часу стабілізації відгуку біосенсора на додавання 300 мкМ пірувату від концентрації робочого буферного розчину. За 100% прийнятий відгук біосенсора в 5 мМ буферному розчині.

При цьому величина відгуку біосенсора при 25 мМ становить 91,5% від максимальної величини відгуку, що є достатньо високим показником. Крім того використання менш концентрованого буферу економічно вигідніше для практичного застосування. Відповідно, для подальшої роботи було вирішено використовувати 25 мМ HEPES в якості буферного розчину.

Відомо, що в крові наявна велика кількість вільних іонів (282,5 ммоль/л) [39], які можуть впливати на рН, стабільність конформації ферменту, константи зв'язування учасників фермен-

тативної реакції та інше, тому було вирішено перевірити вплив іонної сили на роботу біосенсора (рис. 4). Для цього було проаналізовано величину відгуків біосенсора в присутності різних концентрацій NaCl (10–200 мМ) (враховуючи майже цілковиту дисоціацію солі [40] можна вважати, що $[NaCl] = [Na^+] = [Cl^-]$ і при дисоціації n ммоль солі NaCl в розчині утворилось $2n$ іонів). Було встановлено, що, присутність заряджених іонів у великій концентрації спричиняла значне падіння відгуку біосенсора (порядка 40,7% від початкового при додаванні

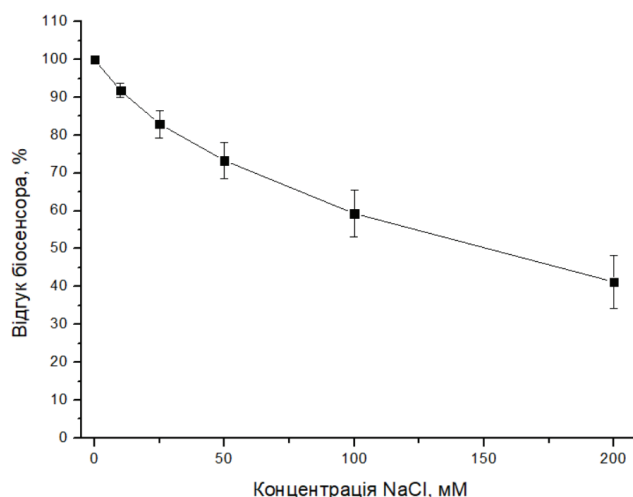


Рис. 4. Залежність величини відгуку біосенсора на додавання 1 мМ пірувату від концентрації йонів солі в 25 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4. За 100% прийнятий максимальний відгук біосенсора.

у вимірювальну комірку 100 мМ NaCl). Однак, враховуючи 10-кратне розведення реальних зразків очікувана концентрація солей в комірці становитиме 10 мМ, відповідно падіння відгуків біосенсора може становитиме до 12,6%, що можна вважати незначним впливом.

Вивчення селективності біосенсора

При застосуванні біосенсора для вимірювання концентрацій пірувату у біологічних рідинах, наприклад сироватці крові, необхідно забезпечити його максимальну селективність, оскільки на поверхні платинового робочого сенсора може окиснюватись не лише перекис водню (що утворюється в рамках ферментативної реакції), а й інші молекули, що містяться в крові, наприклад, аскорбінова кислота. Щоб попередити потрапляння сторонніх речовин на поверхню біосенсора та запобігти виникненню неспецифічного відгуку було вирішено застосувати напівпроникну полімерну мембрану з поліфенілендіаміну (ПФД мембрану). Дана мембрана утворює пори достатні для проникнення перекису водню, проте затримує молекули більшого розміру. Формування ПФД мембрани відбувалось за рахунок циклічного прикладання потенціалу до поверхні електроду (Рис. 5). Однакові характеристики вольтамперограм свідчать про повне покриття поверхні

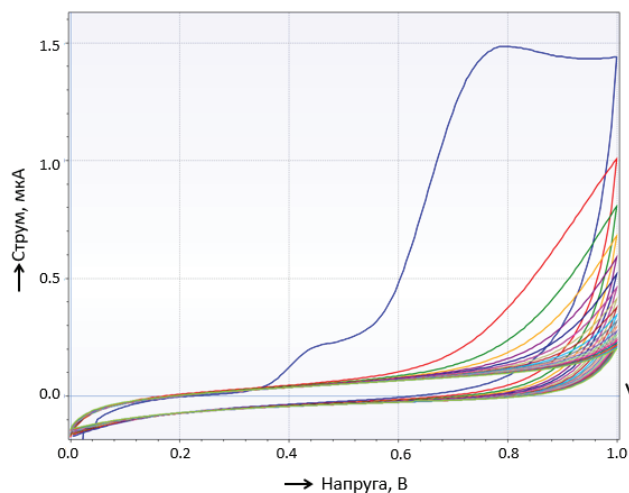


Рис. 5. Циклічні вольтамперограми, отримані при формуванні ПФД-мембрани на платиновому дисковому електроді, впродовж 30 циклів. Стрілка вниз вказує на напрям вольтамперограм. Потенціал змінювався в межах від 0 до 1000 мВ, швидкість – 50 мВ/с, крок – 5 мВ.

амперометричного сенсора шаром полі-мета-фенілендіаміну.

Після нанесення додаткової полімерної мембрани необхідно було дослідити селективність біосенсора з метою оцінити перспективність його подальшого застосування при роботі з реальними біологічними рідинами. Проведено дослідження впливу ряду речовин, таких як сечовина, аскорбінова та лимонна кислоти, дофамін й деякі амінокислоти (аланін, аргінін, метіонін, лізин, цистеїн) на роботу біосенсора (рис. 6).

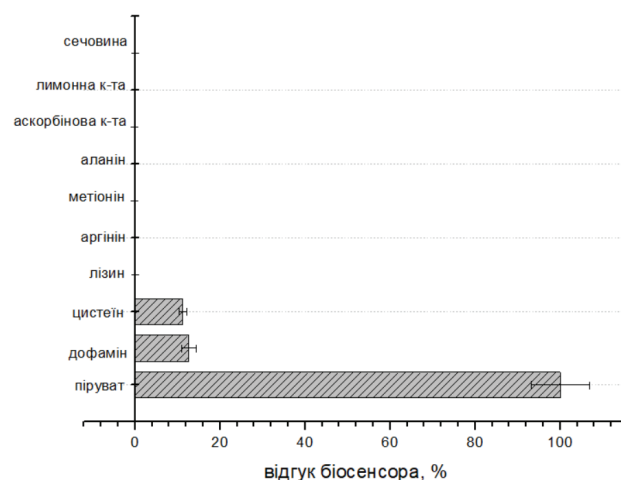


Рис. 6. Відгуки біосенсора на додавання у аналізований розчин різних інтерферуєчих речовин в концентрації 100 мкМ. За 100% прийнятий відгук біосенсора на піруват.

Показано, що згадані речовини не спричиняють відгуку біосенсора, або відгук значно нижчий за відгук на основний аналіт (піруват).

Дослідження відтворюваності відгуків біосенсора при безперервній роботі

Оскільки для будь якого аналітичного приладу, зокрема і біосенсора, ключовим аналітичним параметром є точність і повторюваність результатів, було вирішено дослідити відтворюваність величини відгуків розробленого біосенсора при безперервній роботі. Відповідно, протягом одного робочого дня отримувались відгуки розробленого біосенсора на додавання в аналізований розчин 100 мкМ пірувату. В рамках експерименту було зареєстровано 26 вимірів концентрації пірувату з використанням одного біосенсора (рис. 7.). Середнє квадратичне відхилення склало 12,66%

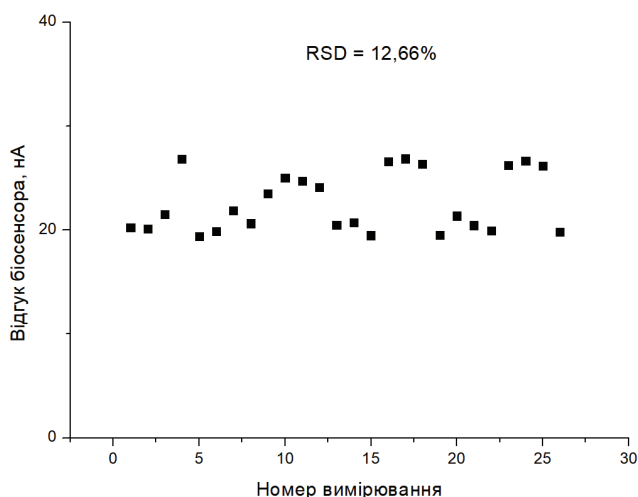


Рис. 7. Відтворюваність величини відгуків біосенсора. Концентрація пірувату – 100 мкМ.

Перевірка аналітичних характеристик оптимізованого біосенсора

Аналітичні характеристики біосенсора були визначені та проаналізовані. Мінімальна межа визначення пірувату склала 1,57 мкМ, що дозволяє визначати концентрації пірувату в розведених зразках біологічних рідин. Лінійний діапазон роботи розробленого біосенсора був від 10 до 500 мкМ пірувату, чутливість – 66 нА/мМ (рис. 8). Лінійна ділянка калібрувальної кривої описується рівнянням прямої $I = 0,09 \cdot C + 8,87$ ($R^2 = 0,9806$), де I величина

відгуку (нА), а C – концентрація аналіту (мМ). Такий лінійний діапазон потенційно дозволяє проводити вимірювання в біологічних зразках із нормальним рівнем пірувату (40–100 мкМ) [7], так і патологічним рівнем (>100 мкМ) [41]. Час стабілізації відгуку після внесення аналіту склав 90 ± 16 с. Прогнозована тривалість аналізу, від моменту отримання досліджуваної речовини до визначення концентрації пірувату, складає приблизно 25 хвилин, однак при автоматизації системи даний параметр теоретично можна зменшити до кількох хвилин.

Отримані аналітичні характеристики біосенсора свідчать про потенційну можливість подальшого його застосування при аналізі концентрацій пірувату у складних багатокомпонентних біологічних зразках.

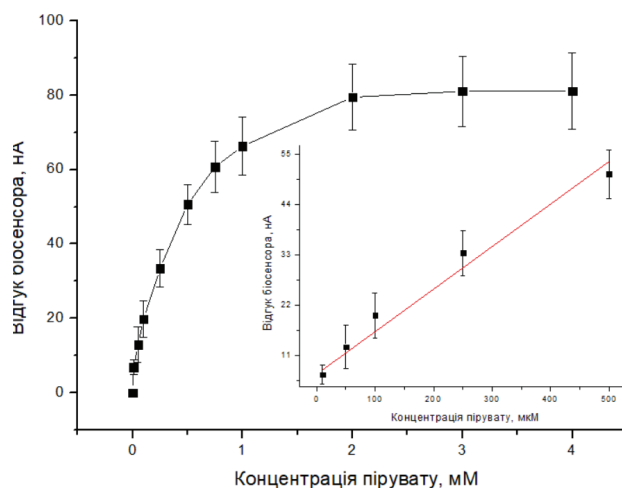
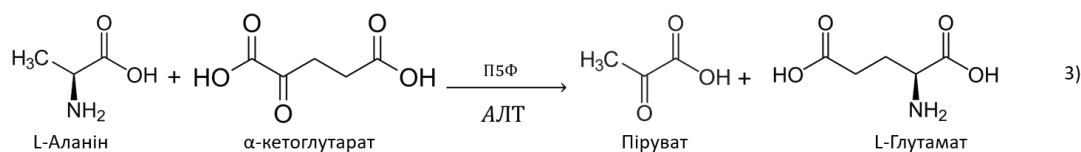


Рис. 8. Калібрувальна крива розробленого біосенсора для визначення концентрації пірувату на основі ПОкс. Вимірювання проводили в HEPES буфері, pH 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Вимірювання активності АЛТ за допомогою розробленого біосенсора

Відомо, що в результаті дії ферменту аланін амінотрансферази (АЛТ) виділяється піруват (3), що теоретично дозволяє використовувати розроблений піруват-чутливий біосенсор для аналізу вмісту цього ферменту. Відповідно необхідно було підтвердити можливість застосування розробленого біосенсора для визначення активності АЛТ в розчині.



Субстратами даної ензиматичної реакції є L-аланін та α -кетоглутарат, що в ході реакції перетворюються на піруват та L-глутамат. Окрім субстратів для коректної роботи АЛТ необхідний піридоксальфосфат (П5Ф) в якості коферменту. Було отримано первинні відгуки біосенсора на додавання у вимірювальну комірку АЛТ, її субстратів та коферменту (рис. 9 А). Також було показано, що при додаванні різних концентрацій АЛТ змінюється швидкість зміни струму, зареєстрованої розробленим біосенсором. На основі отриманих даних було побудова-

но калібрувальну криву біосенсора для аналізу активності АЛТ (рис. 9 Б). Як можна бачити з рис. 9 Б, навіть без додаткової оптимізації даного біосенсора та без вибору оптимальних концентрацій субстратів АЛТ, лінійний діапазон біосенсора дозволяв визначати активність АЛТ від 5 до 500 од.акт./л.

Отримана лінійна залежність величини відгуку біосенсора від концентрації АЛТ в розчині свідчить, що даний біосенсор в подальшому можна адаптувати та оптимізувати для вимірювання активності АЛТ в біологічних зразках.

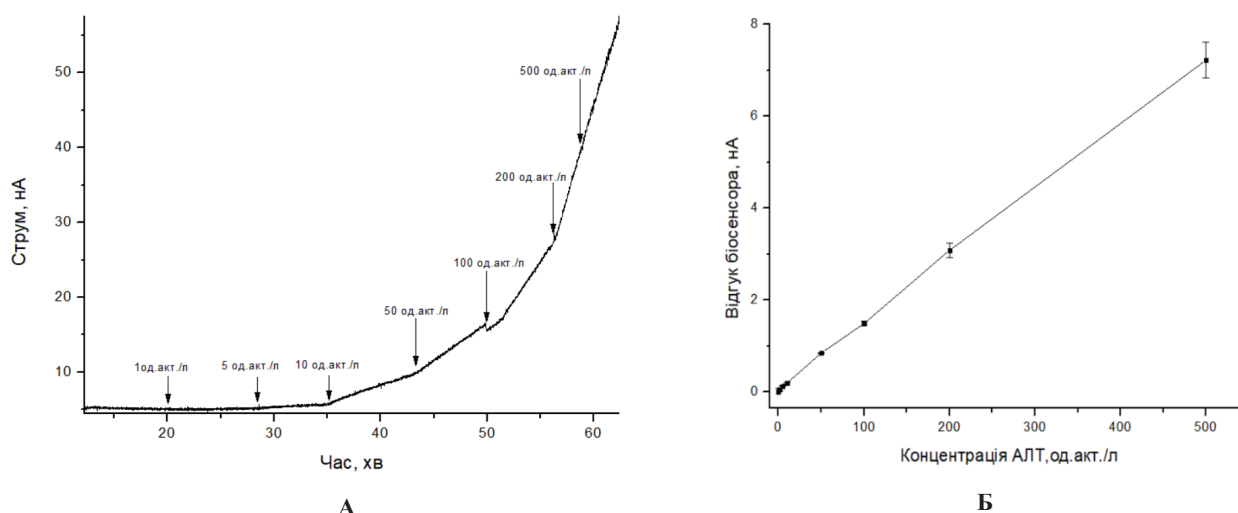


Рис. 9. Реальний вигляд відгуків біосенсора на АЛТ (а) та калібрувальна крива (б) біосенсора для визначення концентрації АЛТ на основі ПОкс. Вимірювання проводили в НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, концентрація аланіну – 6 мМ, піридоксаль фосфату – 50 мкМ, α -кетоглутарату – 50 мкМ. Стрілками позначено концентрацію АЛТ в комірці.

ВИСНОВКИ

В роботі розроблено біосенсор для селективного визначення пірувату у складних біологічних рідинах. Як електрохімічний перетворювач використано платиновий дисковий електрод, біоселективний елемент базувався на ферменті піруват оксидаза, іммобілізованому шляхом включення в фотополімер PVA-SBQ. Додаткова ПФД мембрана була використана для покращення селективності біосенсора.

В ході адаптації розробленого біосенсора для роботи зі складними біологічними рідинами, було проаналізовано вплив рН на роботу біоселективного елементу, найвищі результати показано при рН 7,9, однак в якості робочого рН було взято 7,4, оскільки таке значення більш фізіологічне і дозволить знизити коливання характеристик робочого буферу при роботі з реальними зразками. Також було підібрано оптимальну концентрацію буферного розчину

(25 mM HEPES), проаналізовано вплив вільних іонів на роботу біосенсора. Дослідження селективності продемонструвало, що величина відгуку біосенсора на аналіт значно перевищувала відгуки на низку інтерферентів різної природи.

Дослідження аналітичних характеристик розробленого піруват-чутливого біосенсора показало, що лінійний діапазон складає 10–500 мкМ пірувату, а мінімальна межа детекції – 1,57 мкМ, що дозволяє детектувати як нормальні, так і патологічні рівні пірувату в сироватці.

Продемонстровано потенційну можливість застосування розробленого біосенсора для визначення активності аланін амінотрансферази, що підтверджено калібрувальною кривою величини відгуків біосенсора в залежності від її рівня активності в робочому розчині (в межах 5–500 од.акт./л).

Розроблений біосенсор характеризується аналітичними характеристиками, достатніми для його подальшого застосування для роботи з реальними зразками як для визначення пірувату, так і активності аланін амінотрансферази.

ПОДЯКИ

Роботу виконано в рамках проєкту № 225067 програми «Ukrainian-Swiss Joint Research Projects: Call for Proposals 2023».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

[1]. L. R. Gray, S. C. Tompkins, E. B. Taylor. Regulation of pyruvate metabolism and human disease // *Cell. Mol. Life Sci.*, 71, pp. 2577–2604 (2014).

[2]. Q. Jin. Energy conservation of anaerobic respiration // *Am. J. Sci.*, 312(6), pp. 573–628 (2012).

[3]. J. R. Williamson, R. H. Cooper. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems // *FEBS Lett.*, 117, pp. K73-K85 (1980).

[4]. K. Hayamizu. Amino acids and energy metabolism: an overview // *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity*, pp. 339–349 (2017).

[5]. D. A. Cappel, S. Deja, J. A. Duarte, et al. Pyruvate-carboxylase-mediated anaplerosis promotes antioxidant capacity by sustaining TCA

cycle and redox metabolism in liver // *Cell Metab.*, 29(6), pp. 1291–1305 (2019).

[6]. I. Gout. Coenzyme A, protein CoAlation and redox regulation in mammalian cells // *Biochem. Soc. Trans.*, 46(3), pp. 721–728 (2018).

[7]. C. A. Burtis, E. R. Ashwood, D. E. Bruns. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5th ed. Saunders, Elsevier Medicine (2011).

[8]. MedGen – Increased serum pyruvate (Concept Id: C1849488). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/376596>.

[9]. A. G. Feldman, R. J. Sokol, R. M. Hardison, et al. Lactate and lactate: pyruvate ratio in the diagnosis and outcomes of pediatric acute liver failure // *J. Pediatr.*, 182, pp. 217–222 (2017).

[10]. M. Oh, S. A. Kim, H. J. Yoo. Higher lactate level and lactate-to-pyruvate ratio in autism spectrum disorder // *Exp. Neurobiol.*, 29(4), pp. 314 (2020).

[11]. F. G. Debray, G. A. Mitchell, P. Allard, et al. Diagnostic accuracy of blood lactate-to-pyruvate molar ratio in the differential diagnosis of congenital lactic acidosis // *Clin. Chem.*, 53(5), pp. 916–921 (2007).

[12]. M. Suistomaa, E. Ruokonen, A. Kari, J. Takala. Time-pattern of lactate and lactate to pyruvate ratio in the first 24 hours of intensive care emergency admissions // *Shock*, 14(1), pp. 8–12 (2000).

[13]. R. Rimachi, F. B. De Carvahlo, C. Orellano-Jimenez, et al. Lactate/pyruvate ratio as a marker of tissue hypoxia in circulatory and septic shock // *Anaesth. Intensive Care*, 40(3), pp. 427–432 (2012).

[14]. Y. Altunkaynak, M. Ozturk, D. H. Ertem, et al. Serum lactic acid and pyruvic acid levels in patients with migraine and tension-type headache // *Dusunen Adam J. Psychiatry Neurol. Sci.*, 26(3), pp. 276 (2013).

[15]. K. Moriles, M. Zubair, S. Azer. Alanine Aminotransferase (ALT) Test // *StatPearls* (2024).

[16]. R. J. Henry, N. Chiamori, O. J. Golub, S. Berkman. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase // *Am. J. Clin. Pathol.*, 34(4_ts), pp. 381–398 (1960).

- [17]. T. Laursen, P.F. Hansen. A fluorimetric method for measuring the activity in serum of the enzyme glutamic pyruvic transaminase // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10(1), pp. 53–58 (1958).
- [18]. A. Zhu, R. Romero, H. R. Petty. A sensitive fluorimetric assay for pyruvate // *Anal. Biochem.*, 396(1), pp. 146–151 (2010).
- [19]. G. Wu, L. Jiang, J. Guo, et al. The study of alanine transaminase activity in tissues of silkworm (*Bombyx mori*) via direct analysis in real-time (DART) mass spectrometry // *Molecules*, 28(10), 4131 (2023).
- [20]. F. Wolff, C. El Khattabi, F. Bourdon, D. Willems. Comparison of high-performance liquid chromatography with fluorescence detection versus enzymatic assay to measure blood pyruvate in clinical practice // *Clin. Biochem.*, 42(10–11), pp. 1099–1103 (2009).
- [21]. C. S. Pundir, M. Malik, R. Chaudhary. Quantification of pyruvate with special emphasis on biosensors: A review. *Microchem. J.*, 146, pp. 1102–1112 (2019).
- [22]. B.F. Howell, S. McCune, R. Schaffer. Lactate-to-pyruvate or pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: a re-examination. *Clin. Chem.*, 25(2), pp. 269–272 (1979).
- [23]. L. Yang, N. Wu, R. Bai, et al. A novel strategy for the detection of pyruvate in fermentation processes based on well-distributed enzyme-inorganic hybrid nanoflowers on thiol graphene modified gold electrodes. *Electrochim. Acta*, 427, p. 140855 (2022).
- [24]. M. Jamal, O. Worsfold, T. McCormac, E. Dempsey. A stable and selective electrochemical biosensor for the liver enzyme alanine aminotransferase (ALT). *Biosens. Bioelectron.*, 24(9), pp. 2926–2930 (2009).
- [25]. J. B. la Cour, S. Generelli, L. Barbe, O. T. Guenat. Low-cost disposable ALT electrochemical microsenors for in-vitro hepatotoxic assessment. *Sens. Actuators B: Chem.*, 228, pp. 360–365 (2016).
- [26]. C. J. Hsueh, J. H. Wang, L. Dai, C. C. Liu. Determination of alanine aminotransferase with an electrochemical nano Ir-C biosensor for the screening of liver diseases. *Biosensors*, 1(3), pp. 107–117 (2011).
- [27]. Y. Zhao, X. Geng, X. Zhou, et al. A novel high-stability bioelectrochemical sensor based on sol-gel immobilization of lactate dehydrogenase and AuNPs-rGO signal enhancement for serum pyruvate detection. *Anal. Chim. Acta*, 1265, p. 341335 (2023).
- [28]. D. Jiang, C. Li, T. Liu, et al. A regular nanostructured dithiolene metal complex film for ultrasensitive biosensing of liver enzyme. *Sens. Actuators B: Chem.*, 241, pp. 860–867 (2017).
- [29]. R. J. Leote, M. E. Ghica, C. M. Brett. Pyruvate oxidase biosensors based on glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and poly (neutral red) synthesized in ethaline deep eutectic solvent. *Electroanalysis*, 34(4), pp. 724–734 (2022).
- [30]. J. Wang. Carbon nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis*, 17(1), pp. 7–14 (2005).
- [31]. M. S. Kilic, İ. Dikkulak, S. K. Uru. A novel polycaprolactone film-coated electrode incorporating aluminum nanoparticles for pyruvate biosensing in clinical diagnosis. *Microchem. J.*, 204, p. 111083 (2024).
- [32]. M. Malik, R. Chaudhary, C. S. Pundir. An improved enzyme nanoparticles based amperometric pyruvate biosensor for detection of pyruvate in serum. *Enzyme Microb. Technol.*, 123, pp. 30–38 (2019).
- [33]. C. J. Hsueh, J. H. Wang, L. Dai, C. C. Liu. Determination of alanine aminotransferase with an electrochemical nano Ir-C biosensor for the screening of liver diseases. *Biosensors*, 1(3), pp. 107–117 (2011).
- [34]. C. A. Cordeiro, M. G. De Vries, T. I. Cremers, B. H. Westerink. The role of surface availability in membrane-induced selectivity for amperometric enzyme-based biosensors. *Sens. Actuators B: Chem.*, 223, pp. 679–688 (2016).
- [35]. T. N. T. Thuy, T. T. C. Tseng. A micro-platinum wire biosensor for fast and selective detection of alanine aminotransferase. *Sensors*, 16(6), p. 767 (2016).
- [36]. O. V. Soldatkina, I. S. Kucherenko, V. M. Pyeshkova, et al. Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Res. Lett.*, 12, pp. 1–8 (2017).

[37]. D. O. Mruha, D. Yu. Kucherenko, T. O. Borisova, et al. Rozrobka ta optymizatsiia konstruktsii amperometrychnoho biosensora na osnovi hlutamatoksydazy dlia analizu hlutamaty v syrovatsi krovi. *Sens. Electron. Microsyst. Technol.*, 17(2), pp. 35–49 (2020).

[38]. C. M. Ferreira, I. S. Pinto, E. V. Soares, H. M. Soares. (Un) suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—a review. *RSC Adv.*, 5(39), pp. 30989–31003 (2015).

[39]. N. Nezafati, F. Moztaezadeh, S. Hesarak. Surface reactivity and in vitro biological evaluation

of sol gel derived silver/calcium silicophosphate bioactive glass. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 17, pp. 746–754 (2012).

[40]. R. Heyrovská. Equations for Densities and Dissociation Constant of NaCl(aq) at 25 °C from ‘Zero to Saturation’ Based on Partial Dissociation. *J. Electrochem. Soc.*, 144(7), pp. 2380–2384 (1997). <https://doi.org/10.1149/1.1837822>

[41]. Increased serum pyruvate (Concept Id: C1849488) – MedGen – NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/376596>

Стаття надійшла до редакції 11.03.2025 р.

PACS: 543.553, 577.15, 543.06

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.1.325653>

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A MULTIFUNCTIONAL BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF PYRUVATE CONCENTRATION AND/OR ALT ACTIVITY IN AQUEOUS SAMPLES

D. O. Mruga¹, Y. R. Vakhovskiy^{1,2}, S. V. Dzyadevych^{1,2}, O. O. Soldatkin^{1,3}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 150 Akademika Zabolotnoho St, Kyiv, 03680, Ukraine

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Volodymyrska St, Kyiv, 01601, Ukraine

³ National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”, 37 Beresteyskyi Ave, Kyiv, 03056, Ukraine

E-mail: darynamruga@gmail.com; genyru93@gmail.com; dzyad@yahoo.com; alex_sold@yahoo.com

Abstract. In this work, an amperometric biosensor for highly sensitive and selective determination of pyruvate concentration was developed and optimized and the feasibility of its use for the analysis of alanine aminotransferase (ALT) activity was demonstrated. A platinum disk electrode was used as a transducer, and the bioselective element was based on pyruvate oxidase and PVA-SBQ photopolymer. The influence of solution parameters (buffer capacity, pH, ionic strength) was analyzed, the selectivity of the biosensor towards interferents and the reproducibility of responses (RSD = 12.66%) were studied. The main analytical characteristics of the biosensor were also analyzed (linear range of 10–500 μM pyruvate, sensitivity 66 nA/mM, limit of detection 1.57 μM). The obtained data indicate the prospects of using the developed biosensor for the determination of pyruvate in biological samples. Finally, a calibration curve of the response of the developed pyruvate-sensitive biosensor on the ALT content was created.

Keywords: analytical chemistry, biosensor, pyruvate oxidase, alanine aminotransferase, enzyme