
BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК 543.553+577.15+543.06

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ЛАКТАТОКСИДАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ

*Я. В. Топольнікова¹, І. С. Кучеренко², Л. В. Шкотова¹, І. І. Хоменко^{1,3}, С. В. Дзядевич^{1,2},
О. О. Солдаткін^{1,2}*

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна, e-mail: topolnyk.ua@gmail.com

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

³ Центр інтелектуальної власності та передачі технологій НАН України, вул. Володимирська, 54, 01601, м. Київ, Україна

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ЛАКТАТОКСИДАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ

*Я. В. Топольнікова, І. С. Кучеренко, Л. В. Шкотова, І. І. Хоменко, С. В. Дзядевич,
О. О. Солдаткін*

Анотація. Було розроблено амперометричний біосенсор для визначення концентрації лактату. Як біоселективний елемент біосенсора виступав фермент лактатоксидаза, коїмобілізована з бичачим сироватковим альбуміном за допомогою ковалентної зшивки глутаральдегідом на поверхні амперометричного перетворювача. Як перетворювачі виступали платинові дискові електроди ($d = 500$ мкм). Розроблений біосенсор демонстрував високу чутливість до лактату, з мінімальною межею визначення - 3 мкМ. Лінійний діапазон роботи біосенсора становив від 5 мкМ до 300-350 мкМ лактату. Показано, що запропонований біосенсор характеризувався високою відтворюваністю відгуків протягом кількох годин безперервного вимірювання, з похибкою вимірювання $RSD = 3.4\%$, та доброю операційною стабільністю протягом кількох днів. Проаналізовано та підібрано оптимальні умови зберігання лактатного біосенсора. Так, при зберіганні в буферному розчині при $+4^{\circ}\text{C}$ протягом місяця біосенсор втрачав менше 50% активності. Перевірено вплив характеристик буферного розчину (буферна ємність та іонна сила) на роботу розробленого біосенсора.

Показано, що розроблений біосенсор на основі лактатоксидази можна з успіхом використовувати для аналізу лактату в реальних біологічних рідинах.

Ключові слова: лактат, амперометричний електрод, біосенсор, іммобілізовані ферменти, лактатоксидаза

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED ON LACTATE OXIDASE FOR LACTATE DETERMINATION

Ya. V. Topolnikova, I. S. Kucherenko, L. V. Shkotova, I. I. Khomenko, S. V. Dzyadevych, O. O. Soldatkin

Abstract. The amperometric biosensor was developed for determination of lactate concentration. As a bioselective element we used the enzyme lactate oxidase, coimmobilized with bovine serum albumin on the surface of amperometric transducer by glutaraldehyde covalent crosslinking. The platinum disc electrodes ($\varnothing = 500 \mu\text{m}$) served as transducers. The developed biosensor was highly sensitive to lactate, with a minimum limit of determination of lactate concentrations $3 \mu\text{M}$ and linear range $5 \mu\text{M}$ to $300\text{-}350 \text{ mM}$. It was shown that the proposed biosensor was characterized by high response replicability during several hours of non-stop measurement (the accuracy of measurement $\text{RSD} = 3.4\%$) and satisfactory operational stability for several days. Optimal conditions for biosensor storage were analyzed and defined. One-month storage in the buffer solution at $+4^\circ\text{C}$ resulted in less than 50% loss of the biosensor activity. The impact of parameters of buffer solution (capacity and ionic strength) on the biosensor operation was analyzed. It was shown that the developed biosensor based on lactateoxidase used can successfully be used for lactate analysis in real biological liquids.

Keywords: lactate, amperometric electrode, biosensor, immobilized enzymes, lactate oxidase

РАЗРАБОТКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА НА ОСНОВАНИИ ЛАКТАТОКСИДАЗЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТАТА

Я. В. Топольникова, И. С. Кучеренко, Л. В. Шкотова, И. И. Хоменко, С. В. Дзядевич, А. А. Солдаткин

Аннотация. Был разработан амперометрический биосенсор для определения концентрации лактата. В качестве биоселективного элемента использовался фермент лактатоксидаза, коиммобилизованная с бычьим сывороточным альбумином с помощью ковалентного сшивания глутаральдегидом на поверхности амперометрического преобразователя. В качестве преобразователей выступали платиновые дисковые электроды ($d = 500 \text{ мкм}$). Разработанный биосенсор демонстрировал высокую чувствительность к лактату с минимальной границей определения – 3 мкМ . Линейный диапазон работы биосенсора составлял от 5 мкМ до $300\text{-}350 \text{ мкМ}$ лактата. Показано, что предложенный биосенсор характеризовался высокой воспроизводимостью откликов на протяжении нескольких часов непрерывного измерения, с погрешностью измерения $\text{RSD} = 3.4\%$, и хорошей операционной стабильностью на протяжении нескольких дней. Проанализированы и подобраны оптимальные условия хранения лактатного биосенсора. При

хранении в буферном растворе при +4°C на протяжении месяца биосенсор терял менее 50% активности. Изучено также влияние характеристик буферного раствора (буферная емкость и ионная сила) на работу данного биосенсора. Показано, что разработанный биосенсор на основе лактатоксидазы можно с успехом использовать для анализа лактата в реальных биологических жидкостях.

Ключевые слова: лактат, амперометрический электрод, биосенсор, иммобилизованные ферменты, лактатоксидаза

1. Вступ

Лактат є важливим метаболітом перетворення глюкози, продуктом анаеробного гліколізу, та маркером гіпоксії в клітинах, тканинах та біологічних рідинах. Тривала гіпоксія спричиняє патологічні процеси на всіх рівнях функціонування біологічного організму, а гіпоксія мозку є остаточною причиною смерті.

Концентрація лактату в крові відображає баланс між його продукцією та виведенням. Продукція лактату зростає при станах, за яких збільшується інтенсивність анаеробного метаболізму внаслідок гіпоксії – наприклад геморагічному шоку, емболії, дихальних розладах. Лактатацидоз виникає також при порушенні роботи системи кліренсу лактату – розладів печінки, нирок, цукровому діабеті [1, 2].

Тому визначення концентрації лактату в крові є важливою ознакою для діагностики та своєчасності оперативного втручання в клінічних умовах. Так, за даними реаніматології, рівень лактату в крові пацієнтів з політравмою корелює з імовірністю летального наслідку, а деякі дослідження демонструють дозозалежний взаємозв'язок між відсотком смертності та концентрацією лактату в крові [3-5]. Також лактатацидоз спостерігається в пухлинних клітинах і може слугувати індикатором їх виявлення [6]. Порівняно з вимірюванням рН, який також застосовується як маркер лактатацидозу, для аналізу лактату потрібен менший об'єм крові (0,7-4 мкл порівняно з 35-95 мкл), що особливо важливо для повторюваних вимірювань в клінічній практиці.

Іншою сферою, де є важливим вимірювання лактату, є спортивна медицина, де критичний рівень лактату в м'язах (так званий «лактатний поріг») визначає межу ефективності

тренування [7]. Також контроль рівня лактату важливий для харчової промисловості, зокрема виробництва молочних продуктів та контролю якості молока, фруктів, вина [8]. Також лактат натрію використовується як харчова добавка стабілізатор та регулятор кислотності.

Сьогодні є багато методик аналізу концентрації лактату, але найбільшу точність забезпечують сенсорні технології. Наприклад, є сенсори для визначення лактату на основі амперометрії, флюорометрії, хемільюмінесценції спектрофотометрії та ін. Однак для клінічної діагностики необхідна висока селективність, швидкість, простота вимірювання та мінімальний час на підготовку проби. Цим умовам краще відповідають електрохімічні біосенсори. Під час патентно-інформаційного пошуку було встановлено, що запропонований в даній роботі біосенсор на дату проведення патентних досліджень був новим, мав винахідницький рівень і був промислово придатним, тобто відповідав критеріям правової охорони винаходів в Україні.

У амперметричному методі вимірюється зміна сили струму при прикладенні потенціалу між робочим та допоміжним електродами, яка залежить від концентрації електроактивних речовин на поверхні електрода. Безпосередньо на поверхні робочого електрода розташовується фермент, специфічний до досліджуваної речовини. В ході ферментативної реакції змінюється сила струму, яку ми і визначаємо за допомогою вимірювальних перетворень: струм – напруга – цифровий код і порівняння зі зразковим сигналом. Найпоширенішими ферментами, що використовуються в біосенсорних технологіях для розпізнавання лактату є лактатоксидаза та лактатдегідрогеназа. Також наявні дані про використання ферментів цитохрому b_2 та лактатмонооксигенази [8,9]. Для ефективної роботи біосенсора важливим

є збереження активності фермента тривалий час за умови його розташування в безпосередній близькості до поверхні електрода. Для іммобілізації ферментів часто використовують методи на основі ковалентного зшивання ферментів між собою, або з білковою основою, фізичне включення ферментів в провідні чи непровідні полімери або гідрогель, а також комбінацію цих методів. Також є повідомлення, що для підвищення стабільності ферменту використовували золоті наночастинки, які спільно з лактатоксидазою іммобілізували в тривимірному гелі [10]. Тіольні зв'язки забезпечили фіксацію ферменту на наночастинках золота, а збільшення площі поверхні призвело до збільшення кількості іммобілізованих молекул ферменту. Як правило, для збільшення поверхні електрода у біосенсоріці використовуються карбонові нанотрубки [11], наночастинки золота [12], платини та оксидів металів [13].

Все частіше зустрічаються повідомлення про використання біосенсорів для визначення лактату в біологічних рідинах. Проводяться дослідження неінвазивних способів забору проби для вимірювання лактату, а саме вимірювання лактату в слині, поті, конденсаті видихуваного повітря та слізній рідині. Так, Thomas та колеги випустили електронну контактну лінзу для безперервного вимірювання лактату в слюзах, інтегрувавши амперометричний платиновий сенсор в прозорому полімері [14]. Yeо та колеги надрукували карбонові електроди на браслеті, що щільно прилягає до тіла, для аналізу біомаркерів у поті [15]. Ще одним сучасним напрямком розвитку біосенсорної діагностики є створення

мультибіосенсорів та сенсорних масивів для одночасного визначення декількох аналітів.

Тому метою даної роботи була розробка та оптимізація амперометричного біосенсора на основі лактатоксидази для визначення лактату в біологічних рідинах, що має свою діагностичну значимість. Крім того, розроблений біосенсор буде використаний для включення до складу масивів біосенсорів для одночасного визначення лактату в комбінації з іншими біосенсорами для аналізу важливих метаболітів: перекис водню, аскорбінова кислота, глутамат, АТФ, глюкоза, холін, ацетилхолін та ін.

2. Матеріали і методи

Матеріали

В роботі використовували лактат оксидазу (ЛОД) із *Pedicoccus* sp. (КФ 1.1.3.2), активність 35 од. акт. мг⁻¹, лактат натрію (субстрат для ЛОД), бичачий сироватковий альбумін, 50% водний розчин глутарового альдегіду та НЕРЕС виробництва Sigma–Aldrich Chimie. Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

Конструкція амперометричних перетворювачів

Платинові дискові електроди виготовлялись в нашій лабораторії за наступною технологією: шматочок платинового дроту діаметром 0,5 мм і довжиною 3 мм поміщався в звужений з одного боку скляний капіляр з зовнішнім діаметром 3,5 мм, після чого звужений кінець капіляру із платиною у середині герметизувався

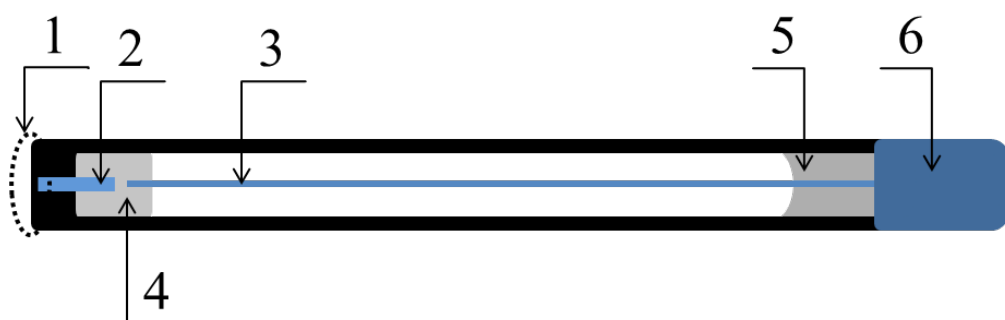


Рис. 1. Схематичний вигляд платинових дискових електродів. 1 – біоселективна мембрана, 2 – платиновий дріт, 3 – внутрішній провідник, 4 – сплав Вуда, 5 – епоксидна смола, 6 – контактна площадка.

запаюванням в полум'ї пальника. Електричне з'єднання платини з провідником у вигляді срібного дроту забезпечувалось низько температурним запаюванням за допомогою сплаву Вуда. Відкритий кінець електроду заповнювався епоксидною смолою, частина провідника знаходилась в середині капіляру, а частина залишалась ззовні, до нього в свою чергу припаювався мідний контакт необхідний для з'єднання з вимірювальною установкою. Перед першим використанням, робоча частина електроду зі впаяною платиною проходила механічну обробку на наждачному папері та за допомогою алюмінієвої пасти. При необхідності, робоча поверхня платинового електрода поновлювалася за допомогою повторного шліфування. Схематичне зображення структури електрода зображено на Рис. 1.

Виготовлення біоселективних елементів

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом ковалентної іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхню амперометричного перетворювача. Вихідний розчин містив 8 % (тут і далі – масова частка) ЛОД, 4 % БСА, 10 % гліцеролу 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Гліцерол додавали, щоб стабілізувати ферменти впродовж їх іммобілізації та запобігти передчасному висиханню краплі і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. Перед нанесенням на поверхню перетворювачів цей розчин змішували з 1 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та висушували протягом 40 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після іммобілізації, біосенсори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани та надлишку глутарового альдегіду.

Методика вимірювання

Використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу. Робочі амперометричні електроди на основі платинових дисків, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння (хлорсрібний) підключались до потенціостату PalmSens (PalmInstruments BV, Нідерланди). 8-ми

канальний пристрій (CH-8 multiplexer, PalmInstruments BV, Нідерланди), що підключався до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали одночасно з 8 робочих електродів, проте зазвичай до нього були підключені 2-3 робочі електроди. Відстань між допоміжним платиновим електродом та усіма робочими біосенсорами в процесі вимірювання була однаковою і складала приблизно 5 мм. Виміри проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 2 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Ми використовували робочий буфер 10 мМ HEPES, рН 7,4. Усі дослідження проводились щонайменше у трьох повторностях.

3. Результати та їх обговорення

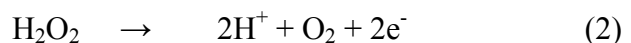
Принцип роботи біосенсора для визначення лактату

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення лактату лежить ензиматична реакція (1), яка відбувається в товщі біоселективної мембрани. Внаслідок реакції відбувається окиснення лактату до пірувату та утворення пероксиду водню, що є електрохімічно-активною речовиною. Прикладення позитивного потенціалу на електроді стимулює реакцію розкладу перекису водню (2) в результаті якої утворюються електрони, що безпосередньо реєструються амперометричним перетворювачем:

ЛОД



+0,6 В



Біосенсор заздалегідь під'єднаний до приладу для потенціометричних вимірювань поміщали до вимірювальної комірки 2 мл, заповненої 10 мМ буфером HEPES, рН 7,4, та витримували декілька хвилин для отримання стабільної базової лінії. Потім додавали певну аліквоту модельного розчину лактату, отримували сигнал. Сигнал від біосенсора автоматично обробляється комп'ютером і виводиться у

графічному вигляді на екран монітора. На Рис. 2 приведено типовий вигляд біосенсорного сигналу на лактат. В даному випадку спостерігається ефект насичення ензиму за умови високої концентрації субстрату. Шляхом додавання різної кількості певних аліквот модельних розчинів лактату було побудовано калібрувальну криву біосенсорного визначення концентрації лактату. Після отримання кожного відгуку біосенсор відмивали від продукту, змінюючи робочий буфер мінімум 3 рази.

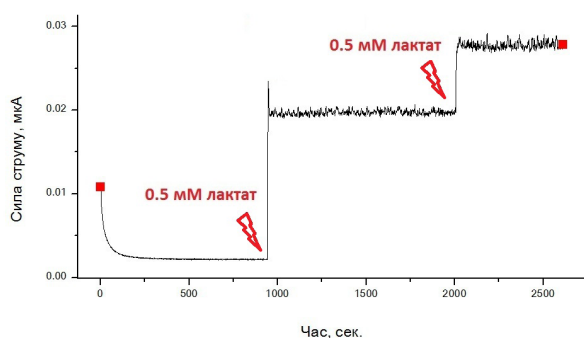


Рис. 2. Реальний вигляд відгуку амперометричного біосенсора на різні концентрації лактату.

Вплив характеристик буферного розчину на роботу біосенсора

Як відомо з літератури, робота біосенсора може залежати як від його власних характеристик, так і від характеристики робочого розчину, зокрема буферної ємності та іонної сили аналізованого розчину [7,8].

У реальних біологічних системах, зокрема в крові, наявна велика кількість іонів, зокрема K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , бікарбонат іон, іони органічних кислот та ін. Електролітний баланс в крові може варіювати внаслідок різних фізіологічних та особливо патологічних процесів. Тому нами було проведено дослідження стабільності відгуку біосенсора в умовах різної іонної сили розчину. Експеримент проводили додаванням робочого буферного розчину $NaCl$ різної концентрації від 1 мМ до 50 мМ (Рис. 3). Концентрації $NaCl$ вибирались з врахуванням можливих варіантів розведення

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

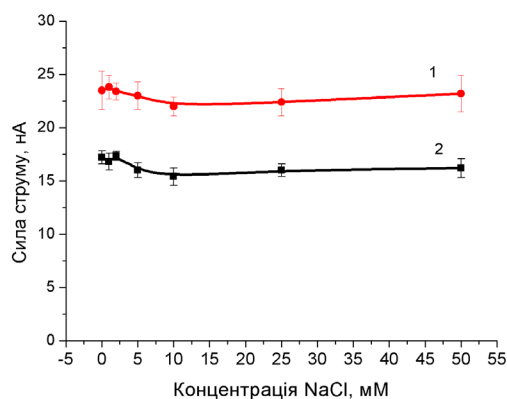


Рис. 3. Залежність величини відгуків лактатнобіосенсора від іонної сили розчину. Концентрації лактату – 1 мМ (1) та 0,5 мМ (2). Вимірювання проводились у 10 мМ $HEPES$ буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння.

Оскільки біологічним системам у важких патологічних станах властива зміна буферного балансу, а характеристики робочого розчину є одним з факторів, що можуть впливати на роботу біосенсора, то було вирішено дослідити також вплив концентрації буфера (буферної ємності) на величину відгуків біосенсора. Для цього був використаний буфер $HEPES$ в діапазоні концентрації від 1 мМ до 25 мМ. Як бачимо, на Рис. 4 приведено результати проведеного експерименту. Величини відгуків біосенсора практично не змінювались зі збільшенням концентрації буфера, за винятком дуже малих концентрацій, що може бути пов'язано з недостатнім забезпеченням стабільності рН, а не властивостями самого буфера. Це дає можливість використовувати розроблений біосенсор для визначення лактату в біологічних зразках, що характеризуються різними буферними ємностями.

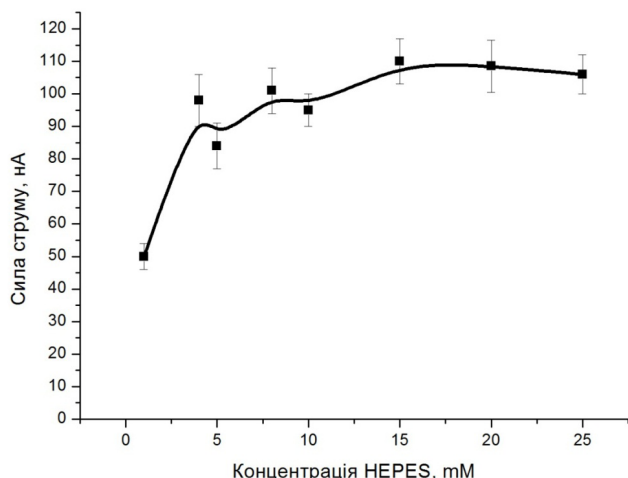


Рис. 4. Залежність величини відгуків біосенсора на основі лактат оксидази від буферної ємності розчину. Концентрація лактату – 0,5 мМ. Вимірювання проводились у HEPES буфері за різних концентрацій, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Стабільність біосенсора при безперервній роботі та при зберіганні

Відтворюваність відгуків біосенсора протягом роботи є одним з основних показників якості його роботи. Особливо це важливо при вимірюванні малих концентрацій. Тому нами було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж кількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання відгуку займало 10 хв, проміжок між ними – 4-5 хв., за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер. Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів на лактат представлено на Рис. 5.

Помітного падіння відгуків за 12 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на лактат в середньому становило 1,4 %.

Ще однією дуже важливою характеристикою біосенсора, є можливість його використання протягом тривалого часу. Однак в процесі використання внаслідок інтенсивного перемішування робочого буферу та інших чинників відбувається деяке вимивання іммобілізованих компонентів з біоселективної мембрани та інактивація самого ферменту. Тому наступним етапом нашої роботи стала пере-

вірка стабільності відгуків біосенсора при його зберіганні протягом тривалого часу, а також вибір оптимальних умов зберігання.

Для цього біосенсори на основі ЛОД було вирішено зберігати в різних умовах: 1) +4°C, в сухому стані; 2) +4°C, в буферному розчині; 3) -18°C, в сухому стані; 4) +25°C, в буферному розчині; 5) +25°C, в сухому стані. Перевірка активності проводилась протягом 30 днів з моменту створення біосенсорів, з періодичністю в 3-4 дні, а саме було проведено вимірювання відгуків на ідентичну концентрацію лактату. Результати дослідження представлено на Рис. 6.

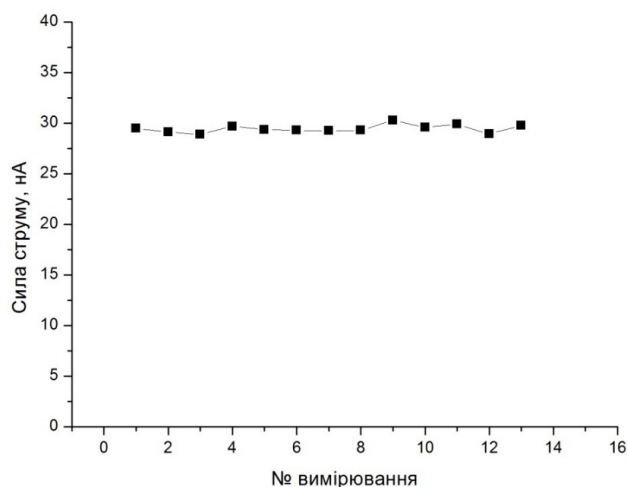


Рис. 5. Відтворюваність відгуків біосенсора на лактат при безперервній роботі. Концентрація лактату – 0,05 мМ. Вимірювання проводились у 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Так, при зберіганні в буферному розчині при +4°C біосенсори зберігали 79% та 58% своєї початкової активності на 12-й та 30-й день зберігання відповідно, тоді як зберігання за цієї ж температури у сухому стані залишало лише 49,9% та 39% активності, відповідно. Було встановлено, що оптимальними умовами для зберігання біосенсорів на основі лактатоксидази є -18°C в сухому стані та +4°C за умови зберігання в буферному розчині. Зберігання при +4°C в сухому стані є менш ефективним. Зберігання за кімнатної температури для даних біосенсорів на основі ЛОД є взагалі непридатним.

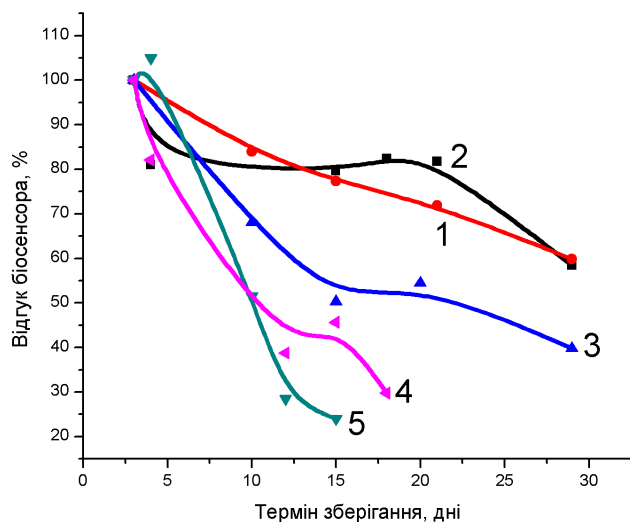


Рис. 6. Порівняльна динаміка відгуків біосенсорів на лактат за різних умов зберігання впродовж 30 днів: -18°C , в сухому стані (1); $+4^{\circ}\text{C}$, в буферному розчині (2); $+4^{\circ}\text{C}$, в сухому стані (3); $+25^{\circ}\text{C}$, в сухому стані (4); $+25^{\circ}\text{C}$, в буферному розчині (5). Дані нормалізовані, за 100% прийнято перше вимірювання. Експеримент проводився у 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу $+0,6\text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Аналітичні характеристики біосенсора для визначення лактату

Після розробки та оптимізації роботи біосенсора на основі ЛОД для визначення концентрації лактату необхідно було визначити основні аналітичні характеристики запропонованого біосенсора. Показано, що при використанні 10 мМ HEPES буферу, рН 7,4, як робочого буфера, мінімальна межа вимірювання лактату, яка вимірювалась як концентрація лактату, що дає відгук в три рази більший за величину шуму базової лінії, становила 3-4 мкМ. Вона несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора. Лінійний діапазон роботи був від 5 мкМ до 300-350 мкМ (залежно від конкретного біосенсора), чутливість до лактату становила 204 нА/мМ. Типова калібрувальна крива біосенсора для визначення лактату наведена на Рис. 7.

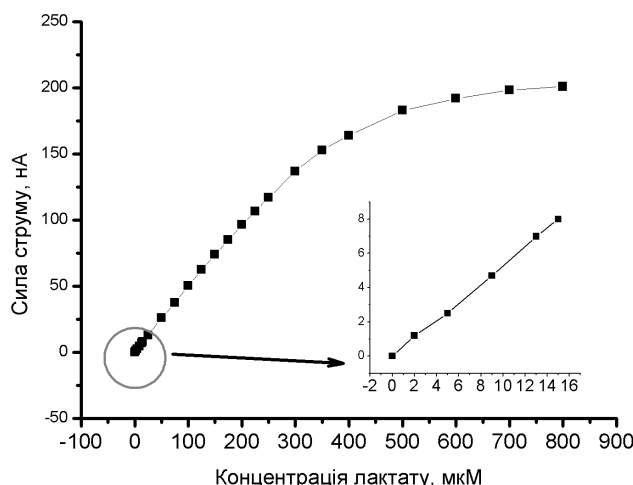


Рис. 7. Залежність величини відгуку біосенсора на основі ЛОД від концентрації лактату. Вимірювання проводились у 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4; за постійного потенціалу $+0,6\text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

4. Висновки

Було розроблено амперометричний біосенсор для визначення концентрації лактату в водних розчинах та визначено його основні аналітичні характеристики. Даний сенсор характеризувався хорошою відтворюваністю відгуків, також відносно незначним падінням активності під час тривалого зберігання. Оптимальними були умови зберігання біосенсора за температури 18°C в сухому стані та за $+4^{\circ}\text{C}$ при зберіганні в буферному розчині (10 мМ HEPES, рН 7,4). Показано відсутність відчутного впливу зміни параметрів розчину (іонної сили в діапазоні 1-50 мМ NaCl та концентрації робочого буфера в діапазоні 2-25 мМ) на роботу біосенсора. Лінійний діапазон визначення лактату становить від 5 мкМ до 300-350 мкМ, з мінімальною границею визначення лактату – 3-4 мкМ.

Пропонований біосенсор в подальшому планується використати для вимірювання реальних зразків в біологічних рідинах та для подальшого включення його до складу масивів біосенсорів для одночасного визначення лактату в комбінації з іншими важливими біологічними речовинами: перекис водню, аскарбінова кислота, глутамат, АТФ, глюкоза, холін, ацетилхолін та ін.

Подяка

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

Список використаної літератури

- [1] Scott E. Buchalter, Michael R. Crain and Robert Kreisberg, Regulation of lactate metabolism *in vivo*//Diabetes/Metabolism Reviews Volume 5, Issue 4, pages 379–391, June(1989)
- [2] Jean-Sebastien Rachoin, Lawrence S. Weisberg, Christopher B. McFadden, Treatment of Lactic Acidosis: Appropriate Confusion//Journal of Hospital Medicine Vol 5 №4 April(2010)
- [3] Barfod C., Lundstrøm L. H., Lauritzen M. M., Danker J. K., Sölétormos G., Forberg J. L., Berlac P. A., Lippert F. K., Antonsen K., Lange K. H., Peripheral venous lactate at admission is associated with in-hospital mortality, a prospective cohort study//Acta Anaesthesiol Scand. Apr, 59(4) P:514-23. (2015)
- [4]. Kruse O., Grunnet N., Barfod C., Blood lactate as a predictor for in-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review.// Scand J Trauma Resusc Emerg Med. Dec 28;19:74(2011)
- [5] Zhang Z., Xu X/ Lactate clearance is a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis/ Crit Care Med. Sep;42(9): P. 2118 - 2125(2014)
- [6] Gardner A.J1, Griffiths J.// A case of type B lactic acidosis as a complication of chronic myelomonocyticleukaemia: a case report and review of the literature. J Med Case Rep. Jan 14; P. 9-16(2015)
- [7] Nadia Nikolaus, Beate Strehlitz, Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for lifequality and wellbeing//MicrochimActa 160: 15-55 Chemistry.- 1993.-Vol.65, №15.- P.2072-2077. (2008)
- [8] Rassaei, L.; Olthuis, W.; Tsujimura, S.; Sudholter, E. J. R.; van den Berg, A. Lactate biosensors: current status and outlook//Anal. Bioanal. Chem., 406, pp123– 137(2014)
- [9] Smutok O., Dmytruk K., Gonchar M., Sibirny A., Schuhmann W. Permeabilized cells of flavocytochrome b₂ over-producing recombinant yeast *Hansenula polymorpha* as biological recognition element in amperometric lactate biosensors// Biosens. Bioelectron. 23(5):599–605 (2007)
- [10] Lin C. L., Shih C. L., Chau L. K. Amperometric L-lactate sensor based on sol-gel processing of an enzyme-linked silicon alkoxide//Anal Chem 79(10):3757–3763 (2007)
- [11] Goran J. M., Lyon J. L., Stevenson K. J. Amperometric detection of L-lactate using nitrogen-doped carbon nanotubes modified with lactate oxidase. Anal Chem 83(21):8123–8129(2011)
- [12] Gamero M., Pariente F., Lorenzo E., Alonso C. Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors. Biosens Bioelectron 25(9):2038–2044 (2010)
- [13] He X. R., Yu J. H., Ge S. G., Zhang X. M., Lin Q., Zhu H., Feng S., Yuan L., Huang J. D. Amperometric L-lactate biosensor based on sol-gel film and multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticles enhancement. Chin J Anal Chem 38(1):57–61(2010)
- [14] Thomas N., Lahdesmaki I., Parviz B. A. A contact lens with an integrated lactate sensor. Sensor Actuators B. Chem. 162(1):128-134 (2012)
- [15] Yeo W. H., Kim Y. S., Lee J., Ameen A., Shi L., Li M., Wang S., Ma R., Jin S. H., Kang Z. Multifunctional epidermal electronics printed directly onto the skin. Adv Mater 25(20):2773-2778(2013)

Стаття надійшла до редакції 17.01.2016 р.

UCD 543.553+577.15+543.06

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED ON LACTATE OXIDASE FOR LACTATE DETERMINATION

Ya. V. Topolnikova¹, I. S. Kucherenko², L. V. Shkotova¹, I. I. Khomenko^{1,3}, S. V. Dzyadevych^{1,2}, O. O. Soldatkin^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo str., 03680, Kyiv, Ukraine

² Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska str., 01003, Kyiv, Ukraine

³ Center of intellectual property and technology transfer of NAS of Ukraine, 54 Volodymyrska str., 01601, Kyiv, Ukraine

Summary

Diagnosis of lactate level is important in clinical practice, particularly, in resuscitation, as well as in sports medicine and food industry. An elevated lactate level in blood (lactic acidosis) is a marker of tissue hypoxia, especially in all kinds of shock, CO poisoning, pulmonary edema, or in systemic liver and kidney diseases, and diabetes. Currently, there are numerous methods of determination of the lactate concentration; the most accurate results are provided by the biosensor technologies, which are characterized by high selectivity, the absence of requirement for sample pretreatment, the possibility of real-time measurements.

Aim. The development and optimization of the amperometric lactate oxidase (LOX)-based biosensor for lactate determination in biological fluids.

Methods. The amperometric method of analysis was used. Three-electrode circuit, consisting of disc amperometric electrode, auxiliary platinum electrode and Ag/AgCl reference electrode, was connected to the potentiostat PalmSens (Netherlands). LOX was immobilized on the surface of amperometric transducer using covalent cross-linking of the enzyme with BSA via glutaraldehyde.

Results. The developed biosensor was characterized by high reproducibility (RSD = 3.4%) and good operational stability over period of several days. It was shown that there was no significant impact of the changes in ion strength and capacity of the working buffer on the biosensor operation. The conditions of long-time storage of the biosensor were analyzed and optimized. The linear range of lactate determination was 5 μM to 300-350 μM , with a minimum limit - 3-4 μM .

Conclusions: The proposed biosensor was highly sensitive to lactate, insensitive to the variations in solution characteristics, and demonstrated good stability over the period of operation. Therefore, the developed LOX-based biosensor can be further used for lactate analysis in real biological fluids.

Keywords: lactate, amperometric electrode, biosensor, immobilized enzymes, lactate oxidase

УДК 543.553+577.15+543.06

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ЛАКТАТОКСИДАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ

Я. В. Топольнікова¹, І. С. Кучеренко², Л. В. Шкотова¹, І. І. Хоменко^{1,3}, С. В. Дзядевич^{1,2},
О. О. Солдаткін^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, 03680,
м. Київ, Україна, *e-mail*: topolnyk.ya@gmail.com

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

³ Центр інтелектуальної власності та передачі технологій НАН України,
вул. Володимирська, 54, 01601, м. Київ, Україна.

Реферат

Діагностика рівня лактату є важливою в клінічній практиці, зокрема реаніматології, а також спортивній медицині та харчовій промисловості. Підвищення рівня лактату в крові (лактатацидоз) є маркером гіпоксії тканин, зокрема при всіх видах шоку, отруєння СО, набряку легень, або при системних хворобах печінки, нирок, цукровому діабеті. На сьогоднішній день існує багато методик визначення концентрації лактату, однак найбільшу точність забезпечують біосенсорні технології, які характеризуються високою селективністю, не потребують попередньої підготовки проби, а також відображають результат вимірювання в режимі реального часу.

Метою даної роботи була розробка та оптимізація амперометричного біосенсора на основі лактатоксидази для визначення лактату в біологічних рідинах.

Методи дослідження: В роботі використовували амперометричний метод аналізу. Амперометричні електроди на основі платинових дисків, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння за триелектродною схемою вимірювання під'єднувались до потенціостату PalmSens (Нідерланди). Імобілізація лактатоксидази на поверхні амперометричного перетворювача здійснювалась за допомогою ковалентного зшивання ферменту з БСА за допомогою глутаральдегіду.

Результати дослідження: Розроблений біосенсор характеризувався високою відтворюваністю (RSD = 3.4%) та хорошою операційною стабільністю протягом кількох днів. Було показано відсутність суттєвого впливу на роботу біосенсора зміни таких параметрів буферного розчину як йонна сила та буферна ємність. Проаналізовано та підібрано оптимальні умови зберігання біосенсора протягом тривалого часу. Лінійний діапазон визначення лактату становив від 5 мкМ до 300-350 мкМ, з мінімальною границею визначення лактату – 3-4 мкМ.

Узагальнення та висновки: Запропонований в роботі біосенсор має високу чутливість до лактату, нечутливість до коливання параметрів розчину та був високо стабільним при роботі. Тому, розроблений біосенсор на основі лактатоксидази можна в подальшому використовувати для аналізу лактату в реальних біологічних рідинах.

Ключові слова: лактат, амперометричний електрод, біосенсор, іммобілізовані ферменти, лактатоксидаза