

BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

ОПТИМІЗАЦІЯ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ОЦІНКИ ШВИДКОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ ІЗОЛЬОВАНИМИ НЕРВОВИМИ ТЕРМІНАЛЯМИ МОЗКУ

*Д. Ю. Кучеренко^{1,2}, І. С. Кучеренко^{1,2}, Д. В. Седюко³, Д. В. Книжникова²,
О. О. Солдаткін^{1,2}, А. А. Борисов⁴, А. Г. Назарова⁴, Н. В. Крисанова⁴, Т. О. Борисова⁴,
О. П. Солдаткін^{1,2}*

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

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

³ Національний авіаційний університет, пр. Космонавта Комарова, 1,
03680, м. Київ, Україна

⁴ Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, 01601, м. Київ, Україна

e-mail: didukh.d@gmail.com, kucherenko.i.s@gmail.com, dasha.sedyuko@mail.ru,
melonika5@gmail.com, alex_sold@yahoo.com, arsenjkeee@ukr.net, srkr@ukr.net,
nazaroshvily@ukr.net, tborisov@biochem.kiev.ua, a_soldatkin@yahoo.com

ОПТИМІЗАЦІЯ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ОЦІНКИ ШВИДКОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ ІЗОЛЬОВАНИМИ НЕРВОВИМИ ТЕРМІНАЛЯМИ МОЗКУ

*Д. Ю. Кучеренко, І. С. Кучеренко, Д. В. Седюко, Д. В. Книжникова, О. О. Солдаткін,
А. А. Борисов, А. Г. Назарова, Н. В. Крисанова, Т. О. Борисова, О. П. Солдаткін*

Анотація. Розроблено глутаматний біосенсор та адаптовано його для аналізу швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналами головного мозку щурів. Для ство-

рення біомембрани біосенсора використовували глутаматоксидазу, коіммобілізовану з бичачим сироватковим альбуміном за допомогою глутарового альдегіду на поверхню амперометричного дискового платиного електроду. Для покращення селективності біосенсора на поверхню електроду наносилась додаткова напівпроникна мембрана на основі поліфенілендіаміну. Проведено оптимізацію умов іммобілізації ферменту на поверхню робочого електроду (перевірено залежність роботи біосенсора від концентрації ферменту, глутарового альдегіду та часу іммобілізації). Досліджено вплив параметрів розчину (іонна сила, буферна ємність, рН) на роботу біосенсора. Лінійний діапазон роботи біосенсора був 2-600 мкМ глутамату, мінімальна межа визначення становила 0,5-2 мкМ, чутливість - 250-300 нА/мМ. Біосенсор характеризувався доброю відтворюваністю відгуків та операційною стабільністю.

З використанням біосенсора виявлено наявність ендogenous глутамату у препаратах ізольованих нервових терміналей головного мозку. Показано, що початкова швидкість Na-залежного накопичення глутамату та його акумуляція нервовими терміналями суттєво не відрізнялись від результатів, отриманих з використанням радіоактивно-міченого L-[¹⁴C]глутамату.

Проведена робота дозволить широко використовувати розроблений біосенсор у медицині, а також у біохімічних та біотехнологічних дослідженнях.

Ключові слова: глутамат, біосенсор, глутаматоксидаза, активне накопичення глутамату, нервові терміналі головного мозку, m-фенілендіамін

OPTIMIZATION OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR EVALUATION OF RATE OF GLUTAMATE UPTAKE BY ISOLATED BRAIN NERVE TERMINALS

D. Yu. Kucherenko, I. S. Kucherenko, D. V. Siediuko, D. V. Knyzhnykova, O. O. Soldatkin, A. A. Borysov, A. G. Nazarova, N. V. Krisanova, T. O. Borisova, A. P. Soldatkin

Abstract. An amperometric glutamate biosensor was developed and adapted for analysis of velocity of glutamate uptake by isolated nerve terminals of rat's brain. Glutamate oxidase was used for creation of biomembrane of the biosensor; the enzyme was co-immobilized with bovine serum albumin via glutaraldehyde on the surface of platinum disc electrode. Additional semi-permeable membrane based on phenylenediamine was placed onto the surface of the electrode for improvement of selectivity of the biosensor. Conditions for the enzyme immobilization onto the surface of working electrode were optimized (dependence of the biosensor work on concentrations of the enzyme and glutaraldehyde, as well as immobilization time were studied). The influence of parameters of working buffer (ionic strength, buffer capacity, pH) on the biosensor work was investigated. Linear range of the biosensor was 2-600 μ M of glutamate, limit of glutamate detection was 0.5-2 μ M, sensitivity was 250-300 nA/mM. The biosensor was characterized by good reproducibility of responses and operational stability.

The presence of endogenous glutamate in preparations of isolated nerve terminals of brain was shown by using the biosensor. It was demonstrated that the initial rate of Na-dependent glutamate uptake and accumulation by the nerve terminals measured by the biosensor were not significantly different from the results obtained by using radioactive-labeled L-[¹⁴C] glutamate.

The described work will allow wide usage of the developed biosensor in medicine, as well as in biotechnological and biochemical studies.

Keywords: glutamate, biosensor, glutamate oxidase, active glutamate uptake, brain nerve terminals, m-phenylenediamine

ОПТИМИЗАЦИЯ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОЦЕНИВАНИЯ СКОРОСТИ ЗАХВАТА ГЛУТАМАТА ИЗОЛИРОВАННЫМИ НЕРВНЫМИ ТЕРМИНАЛЯМИ МОЗГА

Д. Ю. Кучеренко, И. С. Кучеренко, Д. В. Седюко, Д. В. Книжникова, А. А. Солдаткин, А. А. Борисов, А. Г. Назарова, Н. В. Крисанова, Т. А. Борисова, А. П. Солдаткин

Аннотация. Разработан глутаматный биосенсор и адаптирован для анализа скорости накопления глутамата изолированными нервными терминалями головного мозга крыс. Для создания биомембраны биосенсора использовали глутаматоксидазу, которая была коиммобилизована с бычьим сывороточным альбумином с помощью глутарового альдегида на поверхность амперометрического дискового платинового электрода. Для улучшения селективности биосенсора на поверхность рабочего электрода наносилась дополнительная полупроницаемая мембрана на основе полифенилендиамина. Проведена оптимизация условий иммобилизации фермента на поверхность рабочего электрода (проверено зависимость работы биосенсора от концентрации фермента, глутарового альдегида и времени иммобилизации). Исследовано влияние параметров раствора (ионная сила, буферная емкость, pH) на работу биосенсора. Линейный диапазон работы биосенсора был 2-600 мкМ глутамата, минимальный предел определения составлял 0,5-2 мкМ, чувствительность – 250-300 нА/мМ. Биосенсор характеризовался хорошей воспроизводимостью откликов и операционной стабильностью.

С использованием биосенсора выявлено наличие эндогенного глутамата в препаратах изолированных нервных терминалей головного мозга. Показано, что начальная скорость Na⁺-зависимого накопления глутамата и его аккумуляция нервными терминалями существенно не отличались от результатов, полученных с использованием радиоактивно-меченого L- [¹⁴C] глутамата.

Проведенная работа позволит широко использовать этот биосенсор в медицине, а также в биохимических и биотехнологических исследованиях.

Ключевые слова: глутамат, биосенсор, глутамат оксидаза, активное накопление глутамата, нервные терминали головного мозга, m-фенилендиамин

1. Вступ

Глутамат у центральній нервовій системі ссавців є основним збуджуючим медіатором, який бере участь у здійсненні більшості функцій головного мозку, зокрема розпізнаванні, пам'яті, навчанні тощо. Порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу майже всіх нейрологічних захворювань [1]. Постійне зростання числа пацієнтів з такими розладами становить глобальну і дотепер невирішену проблему сучасного суспільства.

Передача нервового сигналу ініціюється деполяризацією плазматичної мембрани пресинаптичного нервового закінчення і призводить до вивільнення глутамату шляхом екзотозу в синаптичну щілину, його взаємодії

з рецепторами постсинаптичної мембрани та активації сигнальних шляхів. У нормі, позаклітинна концентрація нейромедіатора між епізодами його вивільнення шляхом екзотозу зберігається на низькому рівні, тим самим запобігаючи постійній активації постсинаптичних іонотропних рецепторів глутамату. Підвищена позаклітинна концентрація глутамату призводить до розвитку глутаматної нейротоксичності, що виникає внаслідок надмірної стимуляції рецепторів та зумовлює загибель нейронів. В синаптичній щілині відсутні ферменти деградації глутамату, і єдиним шляхом для підтримання низької позаклітинної концентрації глутамату, є його транспорт за участі високоафінних Na⁺-залежних транспортерів глутамату в нейронах

і гліальних клітинах. Ці транспортери використовують Na^+/K^+ -електрохімічний градієнт на плазматичній мембрані в якості рушійної сили. Зміни в активності транспортерів глутамату є характерною рисою поширених нейрологічних і нейродегенеративних захворювань [2, 3].

Приймаючи до уваги цей факт, очевидно, що реєстрація змін у кінетичних характеристиках процесу накопичення глутамату нервовими терміналами головного мозку є надзвичайно важливим фізіологічним показником. Визначення кінетичних характеристик процесу високоафінного Na^+ -залежного накопичення глутамату нервовими терміналами дасть можливість оцінити активність роботи глутаматних транспортерів та їх здатність підтримувати низький позаклітинний рівень глутамату.

Постійний контроль концентрації глутамату в біологічних зразках є необхідним для профілактики та лікування нейропатологій. Сучасні загальноприйняті методи високоточного визначення глутамату, такі як газова та рідинна хроматографія, спектрофотометрія, різноманітні хімічні та фізичні методи, потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання [4, 5]. Ще одним недоліком наведених методів аналізу є необхідність у складній попередній підготовці проб, що виливається у великі затрати часу та коштів. Тому сьогодні постає дуже актуальне питання створення більш зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу визначення вмісту глутамату в біологічних зразках.

На даний момент в світі, дуже перспективним напрямком є розробка нових підходів до визначення концентрації глутамату за допомогою біосенсорів [6]. Інтерес до розробки біосенсорів обумовлений низкою їхніх потенційних переваг у порівнянні з загальноприйнятими методами: дешевизною, простотою використання, можливістю їхньої мініатюризації, експресністю аналізу, низькою собівартістю при масовому виробництві - і все це із забезпеченням необхідного рівня чутливості та селективності.

Найбільш перспективними і успішними серед електрохімічних біосенсорів вважаються амперометричні біосенсиори. Саме вони найчастіше використовуються для визначення

глутамату [4,7-9]. В більшості робіт з розробки глутамат-чутливих біосенсорів використовується фермент L-глутаматоксидаза, отримана з різних джерел [10-14]. При розробці біосенсорів для визначення глутамату використовують також ферменти глутаматдекарбоксилазу, глутаматдегідрогеназу і глутаматсинтетазу, але біосенсиори на основі глутаматоксидази значно перевершують їх за характеристиками [4].

Метою даної роботи була розробка та оптимізація роботи амперометричного біосенсора на основі глутаматоксидази для визначення глутамату та адаптація його аналітичних характеристик для оцінки швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналами мозку.

Розробка методології використання глутамат-чутливого біосенсора для аналізу активного транспорту глутамату в нервових терміналях головного мозку дозволить широко використовувати цей сенсор у медицині, а також у біохімічних та біотехнологічних дослідженнях. У цілому світі є значний інтерес до вирішення проблеми контролю нейрональної активності, профілактики та діагностики нейропатологій, ідентифікації тригерних факторів розвитку нейродегенеративних захворювань.

2. Матеріали і методи

2.1. Конструкція амперометричних перетворювачів

Як амперометричні перетворювачі в роботі використовували платинові дискові електроди (Рис. 1.). Платиновий дріт діаметром 0,4 мм і довжиною 3 мм запаювали в кінцевій частині скляного капіляра із зовнішнім діаметром 3,5 мм. Відкритий торець дроту був робочою поверхнею перетворювача. Платиновий дріт за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда з'єднували з провідником, розміщеним всередині капіляра. На другому кінці провідника приєднували контактну площадку для підключення до вимірювальної установки. Робочу поверхню електродів отримували шліфуванням із використанням порошку оксиду алюмінію (розмір частинок 0.1 та 0.05 мкм) та обробляли спиртом перед іммобілізацією біоселективного елемента.

Періодично, для повторного використання, електродну поверхню поновлювали за допомогою такого ж шліфування.



Рис. 1. Схематичний вигляд платинових дискових електродів. 1 – скляний корпус електроду; 2 – платиновий дріт; 3 – електричне з'єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда; 4 – внутрішній провідник; 5 – захисний чохол; 6 – епоксидна смола; 7 – контактна площадка

2.2. Використання поліфенілендіамінової мембрани для покращення селективності амперометричного перетворювача

Селективність біосенсора є важливим фактором при роботі з реальними біологічними рідинами, тому дослідження селективності біосенсора до можливих інтерферентів є майже обов'язковим етапом при розробці біосенсорів.

В даній роботі був використаний безмедіаторний біосенсор з відносно високим робочим потенціалом (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння), через що на поверхні електроду можливе окиснення ряду електроактивних сполук, що можуть бути наявні в аналізованому розчині та призводити до похибки у вимірюваннях. Одним з напрямків для запобігання окиснення інтерферуючих речовин є нанесення додаткових напівпроникних мембран, які селективно пропускають до електрода лише цільову речовину (в нашому випадку – перекис водню).

Як відомо з-поміж широкого класу окси- та аміноароматичних речовин, які здатні до електрополімеризації, в біосенсорах найчастіше використовують ізомери фенілендіаміну [15-20]. Найкращою селективністю характеризуються перетворювачі, модифіковані полімерною плівкою на основі *m*-фенілендіаміну, який було використано

нами як мономер для створення додаткової мембрани на поверхні платинового електроду за методикою, описаною в [20].

Ця мембрана утворює пори, розмір яких є достатнім для проходження перекису водню до поверхні електрода, та є недостатнім для проходження більших за розміром речовин. Для формування поліфенілендіамінової (ПФД) мембрани триелектродну систему з чистим робочим електродом занурювали у 5 мМ розчин *m*-фенілендіаміну та отримували 4-5 циклічних вольтамперограм. Після цього поверх ПФД мембрани іммобілізували біоселективну мембрану на основі ферменту ГлОД.

2.3. Виготовлення біоселективних елементів біосенсора

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом ковалентної іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхню амперометричного перетворювача. Вихідний розчин містив 8 % глутаматоксидази (ГлОД, ЕС 1.4.3.11 із *Streptomyces sp.* з активністю 7 од.акт.мг⁻¹ фірми Yamasa Corporation (Токіо, Японія)), 4 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА, фракція V, Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина)), 10 % гліцерину (Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина)) у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Перед нанесенням на поверхню перетворювачів цей розчин змішували з 0,8 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) (Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина)) 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 біомембрани та надлишку глутарового альдегіду.

2.4. Методика вимірювання

Робочі амперометричні електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння підключались до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). 8-ми каналний пристрій (CH-8 multiplexer) того ж виробника, що підключався до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали

одночасно з декількох робочих електродів, зазвичай до нього були підключені 2 – 3 робочі електроди. 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. Робочим буфером виступав 25 мМ HEPES з рН 7,4. Концентрації субстрату в робочій комірці задавали додаванням аліквот концентрованих розчинів субстрату (1-50 мМ глутамату).

Дослідження проводили з використанням препарату ізольованих нервових терміналей (синаптосом). Синаптосоми є прекрасним адекватним інструментом для дослідження процесу синаптичної передачі, оскільки вони зберігають здатність накопичувати та вивільнювати нейромедіатори у відповідь на деполяризацію плазматичної мембрани, підтримувати протонний градієнт синаптичних везикул та мембранний потенціал.

Реєстрацію накопичення нейромедіатора традиційно проводять з використанням радіоактивно міченого L-[¹⁴C]глутамату. Цей метод використовувався нами як контрольний, щоб оцінити точність вимірювання глутамату біосенсором.

При використанні біосенсорів час визначення концентрації глутамату в розчині складає приблизно 1-2 хвилини. Динаміка змін концентрації L-глутамату в нервових терміналях є досить швидкою, і не є можливим акуратно вимірювати концентрацію глутамату біосенсором безпосередньо у синаптосомальній суспензії, яка продовжує активно поглинати нейромедіатор. Тому у наших експериментах вимірювання проводилися у супернатанті після осадження та видалення активних синаптосом для попередження подальших неконтрольованих змін позаклітинної концентрації глутамату.

Вимірювання глутамату біосенсором в зразках з ізольованими нервовими терміналями проводилося за допомогою двох методів – використанням калібрувальної кривої та стандартних додавань [21].

2.5 Виділення препарату ізольованих нервових терміналей (синаптосом) з мозку щурів

Експерименти на тваринах (щурах-самцях лінії Вістар, 100-120г, з віварію ННЦ «Інститут кардіології імені М.Д. Стражеско» НАМН України) проводились у відповідності до європейських принципів і міжнародного законодавства. Після декапітації щурів головний мозок швидко видаляли, відділяли стовбурову частину та мозочок. Великі півкулі мозку повільно гомогенізували у скляному гомогенізаторі Поттера у середовищі виділення (охолоджена льодом 0,32 М сахароза, 5 мМ HEPES-NaOH, рН 7,4, 0,2 мМ ЕДТА (Sigma, U.S.A.)). Всі маніпуляції проводили при 4°C. Синаптосоми отримували після диференційного центрифугування та центрифугування в градієнті щільності фіколу за методом [22] з невеликими змінами. Препарати синаптосом використовувались в експериментах протягом 2-4 години після ізоляції. Стандартний сольовий розчин насичувався киснем і містив (у мМ): NaCl-126; KCl-5; MgCl₂-2,0; NaH₂PO₄-1,0 (всі солі з Reachim, Ukraine); HEPES (Sigma, U.S.A.); рН 7,4 і D-глюкозу (Sigma, U.S.A.). Ca²⁺-вмісне середовище містило додатково 2 мМ CaCl₂ (Reachim, Ukraine). Концентрацію білка вимірювали згідно [23].

2.6 Визначення накопичення L-[¹⁴C] глутамату синаптосомами

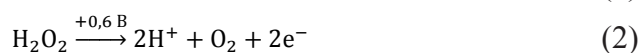
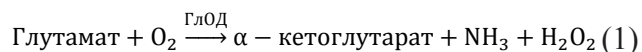
Реєстрацію накопичення нейромедіатора традиційно проводять з використанням радіоактивно міченого L-[¹⁴C]глутамату. Вимірювання проводять наступним чином: проби синаптосом (250 мкл суспензії, 0,2 мг білка/мл) преінкубують в стандартному сольовому розчині при температурі 37°C протягом 10 хв. Поглинання ініціюють додаванням 10 мкМ L-глутамату (з 420 нМ L-[¹⁴C] глутамату (0.1 мКі/мл), інкубують протягом різних часових інтервалів (1, 2, 10 хв.) при температурі 37°C. Аліквоти (250 мкл) фільтрують через скловолоконні фільтри Whatman GF/C, фільтри двічі швидко промивають охолодженим буфером. Радіоактивність, що залишається на фільтрі, визначають за допомогою стандартної методики з використанням сцинтиляційної рідини для аналізу безводних зразків OCS (1,5 мл) (Amersham-Biosciences).

Тобто, накопичення L-[¹⁴C]глутамату нервовими терміналями визначали за збільшенням радіоактивності у осаді, який знаходиться на фільтрі. Для того щоб аналізувати зміни концентрації глутамату у рідкому зразку було розроблено новий методичний підхід, адекватність якого була доведена у паралельних експериментах з використанням L-[¹⁴C] глутамату. У новому методичному підході реєстрацію накопичення L-[¹⁴C] глутамату визначали не за допомогою фільтрування суспензії синапсом та аналізу радіоактивності у осаді, а за аналізом радіоактивності у супернатанті після осадження аліквот на мікроцентрифузі (20 с при 10000 g). При цьому накопичення L-[¹⁴C] глутамату нервовими терміналями розраховувалось як зменшення радіоактивності у супернатанті. Радіоактивність супернатанта визначали за допомогою стандартної методики з використанням сцинтиляційної рідини для аналізу водомістких зразків ACS (1,5 мл) (Amersham-Biosciences). Паралельне проведення експериментів показано ідентичність динаміки накопичення L-[¹⁴C] глутамату двома методичними підходами.

3. Результати та їх обговорення

3.1. Розробка та оптимізація роботи глутаматного біосенсора, перевірка його основних характеристик

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення глутамату лежить ферментативна реакція (1), що протікає в біоселективній мембрані. В результаті реакції відбувається окиснення глутамату і утворення електрохімічно-активного перекису водню. При прикладанні позитивного потенціалу на електроді відбувається реакція розкладу перекису водню (2), в результаті якої утворюються електрони, що безпосередньо реєструються амперометричним перетворювачем:



Для покращення селективності біосенсора при роботі з реальними зразками на поверхню робочого електроду було нанесено ПФД

мембрану. Вона запобігає окисненню електроактивних речовин, розмір яких перевищує розмір перекису водню. Відгуки біосенсора на деякі інтерференти з мембраною та без показують, що селективність значно покращується при нанесенні ПФД мембрани (Табл. 1).

Таблиця 1
Селективність амперометричного перетворювача до та після нанесення ПФД мембрани

Електроактивні речовини	Відгук амперометричного перетворювача, нА	
	Електрод без ПФД мембрани	Електрод з ПФД мембраною
Перекис водню, 50 мкМ	34,7 ± 2,6	27,6 ± 0,8
Дофамін, 20 мкМ	14,8 ± 1,3	1,2 ± 0,3
Цистеїн, 100 мкМ	2,8 ± 0,4	0,02 ± 0,02
Парацетамол, 100 мкМ	7,3 ± 1,2	0
Сечова кислота, 100мкМ	10,6 ± 1,8	0
Аскорбінова кислота, 500 мкМ	33,2 ± 1,7	0,9 ± 0,5

На початку роботи було проведено оптимізацію умов іммобілізації ферменту на поверхню робочого електроду. Дослідження показали, що найкращі відгуки біосенсора на глутамат спостерігались при концентрації ферменту у мембрані 2 - 4% , а глутарового альдегіду 0,4 %. Було також проведено дослідження залежності роботи біосенсора від часу іммобілізації. Як бачимо з Табл. 2, найкращі результати спостерігались при іммобілізації протягом 30 хв.

Таблиця 2

Залежність відгуків біосенсора від часу іммобілізації фермента

Характеристики біосенсора	Тривалість іммобілізації		
	20 хв.	30 хв.	40 хв.
Відгук на 100 мкМ глутамату, нА	$16,7 \pm 1,2$	$21,1 \pm 1,4$	$15,7 \pm 0,9$
Мінімальна межа вимірювання, мкМ	$5,6 \pm 1,1$	$3,8 \pm 1,5$	$7,4 \pm 1,2$

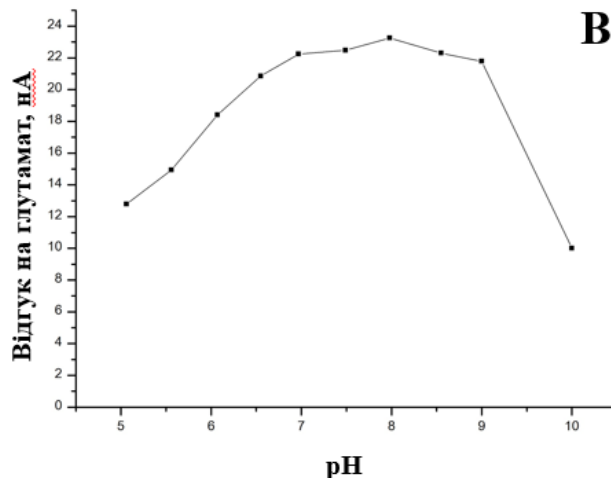
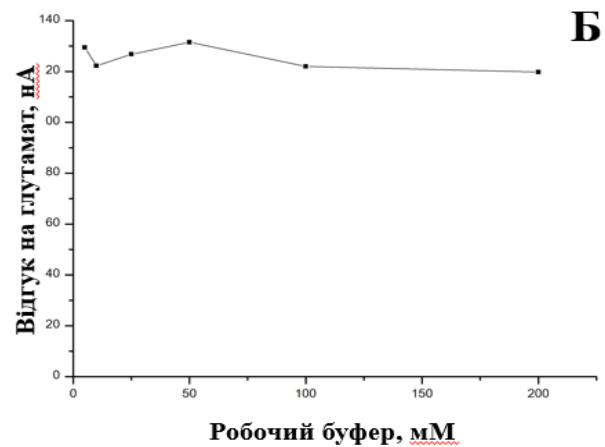
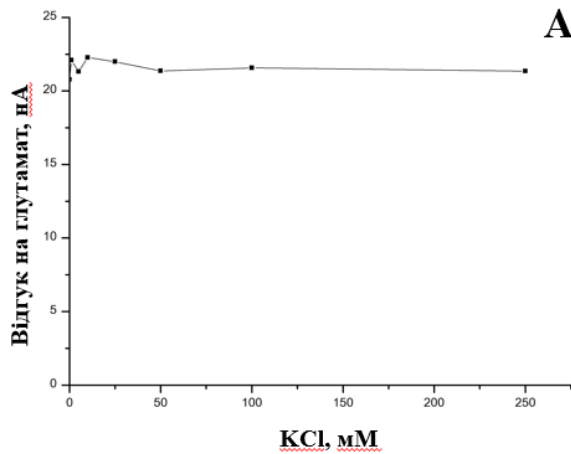


Рис. 2. Залежність величини відгуків біосенсора від параметрів розчину: іонної сили розчину (концентрація глутамату – 100 мкМ) (А), концентрації буферу (концентрація глутамату – 0,7 мМ) (Б) та рН (концентрація глутамату – 200 мкМ) (В). Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, та 10 мМ універсальному буфері за різних значень рН за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Як відомо, робота кожного біосенсора залежить як від його власних характеристик, так і від властивостей розчину, в якому виконують вимірювання. Реальні біологічні розчини, крім наявності в них різних електроактивних сполук, можуть характеризуватися значною іонною силою та різною буферною ємністю, що може впливати на роботу біосенсора. Тому ми вирішили дослідити залежність відгуків біосенсора від різних концентрацій КСІ та буферу. Результати дослідження представлені на Рис. 2, А і Б відповідно. Як бачимо, величини відгуків біосенсора практично не змінювались зі збільшенням іонної сили та буферної ємності.

Внаслідок іммобілізації ферменту може змінюватись рН оптимум його роботи. Тому було проведено дослідження впливу рН буферу на роботу даного біосенсора. Для проведення експерименту було використано універсальний буфер (що містив тріс-НСІ, KH_2PO_4 , лимонну кислоту та тетраборат натрію в концентраціях 10мМ), який має однакоvu буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Результати дослідження наведено на Рис. 2, В. Як бачимо з рисунка, найкращі відгуки біосенсора спостерігались в діапазоні рН 7-8,5.

Можливість використання біосенсорів протягом тривалого часу для багатьох вимірювань є дуже важливою. Але в процесі роботи може відбуватися часткове вимивання компонентів з біологічної мембрани, чи певне зменшення активності ферменту в процесі зберігання. Все це може призводити до певного падіння відгуків біосенсорів в процесі роботи.

Тому було перевірено операційну стабільність біосенсора. Для цього впродовж дня отримували 8-12 відгуків на 50 мкМ концентрацію глутамату, після чого біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури $+4^\circ\text{C}$ до наступного використання. Далі, через кілька днів, знову протягом кількох годин отримували відгуки біосенсора на ті самі концентрації глутамату. Сумарний термін зберігання та роботи біосенсорів становив 11 днів.

Результати дослідження представлено на Рис. 3. Як видно з рисунку, відгуки залишалися стабільними протягом всього періоду вимірювань.

При зберіганні протягом двох місяців за температури -18°C у сухому вигляді біосенсори втратили 25 % активності.

Відтворюваність відгуків біосенсора є ще одним з показників якості його роботи. Для того, щоб мати змогу досить точно вимірювати концентрацію глутамату в розчині, відгуки біосенсора повинні бути практично однаковими. Тим більш це дуже важливо, коли потрібно вимірювати малі концентрації. Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів на глутамат представлено на Рис. 3.

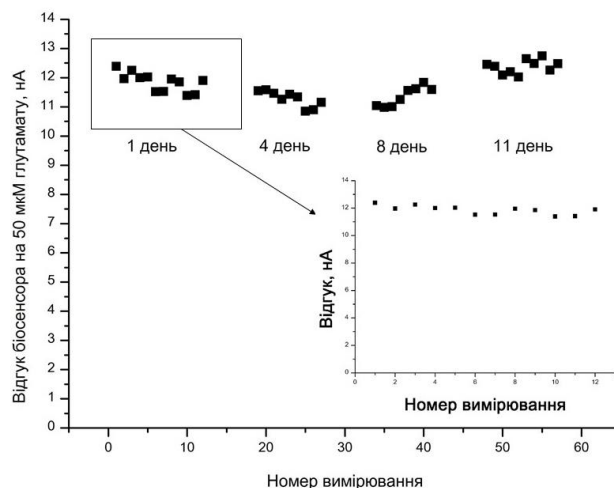


Рис. 3. Операційна стабільність та відтворюваність відгуків біосенсора на 50 мкМ глутамату. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу $+0,6$ В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Типова калібрувальна крива біосенсора для визначення глутамату наведена на Рис. 4. Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рівнянням $I=315 \cdot C$ ($R^2=0,997$), де I – сила струму після виходу відгуку на плато (нА), C – концентрація глутамату (мМ).

Біосенсор характеризувався наступними аналітичними характеристиками. Мінімальна межа вимірювання глутамату, яка визначалась як концентрація глутамату, що дає відгук біосенсора в три рази більший за величину шуму базової лінії, становила 0,5-4 мкМ. Лінійний діапазон роботи був від 2-5 мкМ до 600-800 мкМ (залежно від конкретного біосенсора), чутливість до глутамату становила 250-300 нА/мМ.

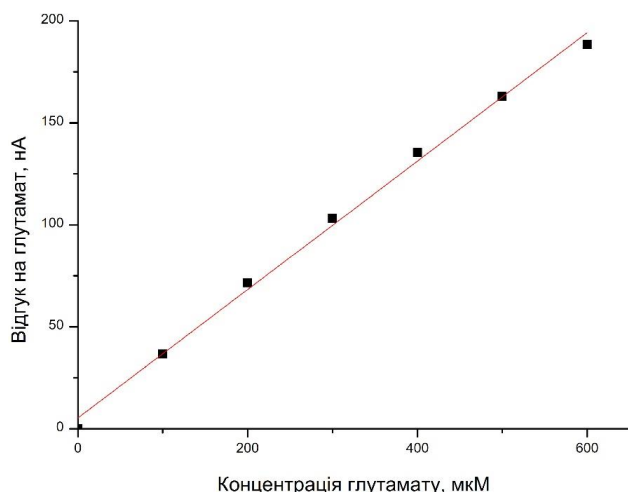


Рис. 4. Калібрувальна крива біосенсора на основі ГлОД для визначення глутамату. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.2. Використання розробленого біосенсора для оцінки швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналями мозку

Оскільки властивості розчину, в якому проводять вимірювання, впливають на роботу біосенсорів, то було перевірено, чи викликають безпосередньо компоненти середовища інкубації синапсом відгук біосенсора. Показано, що стандартний сольовий розчин, який використовується при аналізі транспорту глутамату у нервових терміналях, не викликає відгуку біосенсору.

У наступній серії експериментів був виміряний відгук біосенсору у середовищі інкубації синапсом, але до ініціювання процесу накопичення додаванням екзогенного нейромедіатора. Ця відповідь біосенсору є дуже важливим показником, оскільки відображає базовий рівень сигналу, який повинен бути врахований при дослідженні початкової швидкості накопичення та акумуляції глутамату нервовими терміналями. Було зареєстровано відповідь біосенсору на додавання супернатанту, отриманого після преінкубації синапсом у стандартному сольовому розчині. Ця відповідь біосенсору була базовим сигналом, який відображав базальний (тонічний) рівень нейромедіатора

в препараті синапсом та у розрахунку на глутамат складав приблизно 9 мкМ. Однак, окрім глутамату, цей сигнал може бути зумовленим наявністю в середовищі таких речовин як сечовина, аскорбінова кислота, аспарат та інші сполуки.

Далі проводили аналіз швидкості Na^+ -залежного накопичення і акумуляції глутамату в синапсомах за допомогою глутаматного біосенсора. При розрахунках за 100% приймали початковий рівень базового сигналу відразу після додавання до синапсом суміші 10 мкМ L-глутамату з 420 нМ L-[^{14}C] глутамату (0.1 мКі/мл) при використанні сцинтиляційного аналізу або 10 мкМ неміченого глутамату при вимірюванні біосенсором. Показано, що на початкових часових інтервалах, що використовуються для визначення початкової швидкості накопичення глутамату синапсомами, у разі використання біосенсору рівень відгуку складав 79% (калібрувальна крива) та 78% (стандартні додавання) та 75% при використанні L-[^{14}C] глутамату та сцинтиляційного методу (Табл. 3). Табл. 3 відображає зменшення концентрації глутамату або глутамату/L-[^{14}C] глутамату у суспензії синапсом за 1 хв після ініціації процесу накопичення шляхом додавання у середовище інкубації 10 мкМ глутамату або глутамату/L-[^{14}C] глутамату. Тобто, 21%, 22% та 25% від доданого глутамату (глутамату/L-[^{14}C] глутамату) захоплювалось нервовими терміналями за 1 хв.

Аналогічні серії вимірювань були проведені на часових проміжках, що використовувались для розрахунку акумуляції глутамату у синапсомах. Показано, що у разі використання біосенсору рівень відгуку складав 58% (калібрувальна крива) та 56% (стандартні додавання), а також 53% при використанні глутамату/L-[^{14}C] глутамату та сцинтиляційного методу (Табл. 3). У таблиці відображено зменшення концентрації глутамату або глутамату/L-[^{14}C] глутамату у суспензії синапсом за 10 хв після ініціації процесу накопичення шляхом додавання у середовище інкубації 10 мкМ глутамату або глутамату/L-[^{14}C] глутамату. Тобто, 42%, 44% та 47% від доданого глутамату (глутамату/L-[^{14}C] глутамату) акумулювалось нервовими терміналями за 10 хв.

Таблиця 3

Зменшення концентрації глутамату або глутамату/L-[¹⁴C]глутамату у суспензії синапсом за 1 хв та 10 хв після ініціації процесу накопичення шляхом додавання у середовище інкубації 10 мкМ глутамату або глутамату/L-[¹⁴C]глутамату.

Метод вимірювання		Концентрація глутамату у супернатанті, мкМ	
		1 хв	10 хв
Біосенсор	Калібрувальна крива	7,9 ± 0,2	5,8 ± 0,2
	Стандартні додавання	7,8 ± 0,4	5,6 ± 0,3
Сцинтиляційний метод	L – [¹⁴ C]глутамат	7,5 ± 0,3	5,3 ± 0,2

Таким чином, було показано, що значення початкової швидкості накопичення і акумуляції глутамату нервовими закінченнями, вимірних за допомогою глутаматного біосенсора і L-[¹⁴C] глутамату були майже однаковими (якщо брати до уваги рівень базового сигналу).

4. Висновки

В роботі було досліджено та проаналізовано аналітичні характеристики біосенсора при визначенні глутамату в модельних зразках, після чого проведено вимірювання вмісту глутамату у зразках з ізольованими нервовими терміналями.

Розроблено методичний підхід для аналізу динаміки накопичення глутамату в нервових терміналях головного мозку з використанням біосенсору.

З використанням глутамат-чутливого біосенсору показано наявність базового сигналу у препараті ізольованих нервових терміналей головного мозку за відсутності екзогенного глутамату.

Враховуючи базовий сигнал, показано, що початкова швидкість натрій – залежного накопичення глутамату та його акумуляція нервовими терміналями головного мозку, яка вимірювалася з використанням глутамат-чутливого біосенсору та радіоактивно-міченого L-[¹⁴C]глутамату суттєво не відрізнялись.

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» та проекту УНТЦ № 6055.

Список використаної літератури

- [1]. G. B. Richerson, Y. Wu. The dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J. Neurophysiol.*, V. 90, P. 1363-1374 (2003).
- [2]. Y. Zhou, N. C. Danbolt. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol.*, 4 (165), 1 - 14. doi:10. 3389/fendo. 2013. 00165 (2013).
- [3]. T. Borisova, N. Krisanova. Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions. *Adv. Space Res.*, V. 42, P. 1971-1979 (2008).
- [4]. R. L. Villarta, D. D. Cunnigham, G. G. Guilbault. Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate // *Talanta*, 38, pp. 49-55 (1991).
- [5]. S. Ghobadi, E. Csoregi, G. Marko-Varga, L. Gorton. Bienzyme carbon paste electrodes for

L-glutamate determination // *Curr. Sepr.*, 14, pp. 94-102 (1996).

[6]. S. V. Dzyadevych, O. P. Soldatkin. Naukovi ta tehnologichni zasady stvorenniya miniat'urnih electrohimichnih biosensoriv. *Naukova dumka*, K. 256 s. (2006).

[7]. N. F. Almeida, A. K. Mulchandani. A mediated amperometric enzyme electrode using tetrathiafulvalene and L-glutamate oxidase for the determination of L-glutamic acid // *Anal. Chim. Acta*, 282, pp. 353-361 (1993).

[8]. W. Vahien, J. Bradley, U. Bilitewski, R. D. Schmid. Mediated enzyme electrode for the determination of L-glutamate // *Anal. Lett.*, 24, pp. 1445-1452 (1991).

[9]. U. Wollenberger, F. W. Scheller, R. Hintsche, K. Bohm. Verfahren zur amperometrischen bestimmung von L-glutamat. Pat. DD 272 478 A1 (1989).

[10]. H. Y. Kusakabe, T. F. Midorikawa, A. Kuninaka, H. Yoshino. Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6, grown on wheat brain. *Agric Biol Chem*; 47: 6: 1323-1328 (1983).

[11]. H. Y. Kusakabe, T. F. Midorikawa, T. Fujishima. Methods for determining L-glutamate in soy sauce with L-glutamate oxidase. *Agric Biol Chem*; 48: 1: 181-184 (1984).

[12]. U. Wollenberger, F. W. Scheller, R. Renneberg et al. Biosensor zur bestimmung von glutamat und substanzen die in glutamat umgewandelt werden. Pat DD 257272 A1. (1988).

[13]. B. C. Ye, Q. Sh. Li, You-R. Li. et al. L-Glutamate biosensor using a novel L-glutamate oxidase and its application to flow injection analysis system. *J Biotechnol*; 42: 1: 45-52 (1995).

[14]. C. Y. Chen, Y. C. Su. Amperometric L-glutamate sensor using a novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces platensis* NTU 304. *Anal Chim Acta*; 243: 9-15 (1991).

[15]. Y. Zhang, Y. Hu, G. S. Wilson, D. Moattis-Sirat, V. Poitout, G. Reach. Elimination of the acetaminophen interference in an implantable glu-

cose sensor // *Analytical Chemistry*. Vol. 66, №7. - P. 1183-1188 (1994).

[16]. F. Moussy, D. J. Harrison, D. W. O'Brien, R. V. Rajotte. Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating // *Analytical Chemistry*. Vol. 65, №15. - P. 2072-2077 (1993).

[17]. Q. Yang, P. Atanasov, E. Wilkins. Development of needle-type glucose sensor with high selectivity // *Sensors and Actuators B: Chemical*. Vol. 46, №3. - P. 249-256 (1998).

[18]. O. M. Schuvailo, O. O. Soldatkin, A. Lefebvre, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin. Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate // *Analytica Chimica Acta*. Vol. 573. -P. 110-116 (2006).

[19]. S. C. Kelly, P. J. O'Connell, C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault. Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of L-lysine in food // *Analytica Chimica Acta*. Vol. 412, №1-2. - P. 111-119 (2000).

[20]. S. J. Killoran, R. D. O'Neill. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications // *Electrochimica Acta*. V. 53. – P. 7303–7312 (2008).

[21]. O. Soldatkin, A. Nazarova, N. Krisanova, A. Borysov, D. Kucherenko, I. Kucherenko, N. Pozdnyakova, A. Soldatkin., T. Borysova. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. *Talanta*, -Vol. 135, -P. 67-74 (2015).

[22]. C. W. Cotman. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Meth. Enzymol*, V. 31. - P. 445-452 (1974).

[23]. E. Larson, B. Howlett, A. Jagendorf. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.*, V. 155. -P. 243-248 (1986).

Стаття надійшла до редакції 15.02.2016 р.

OPTIMIZATION OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR EVALUATION OF RATE OF GLUTAMATE UPTAKE BY ISOLATED BRAIN NERVE TERMINALS

D. Yu. Kucherenko^{1,2}, I. S. Kucherenko^{1,2}, D. V. Siediuko³, D. V. Knyzhnykova², O. O. Soldatkin^{1,2}, A. A. Borysov⁴, A. G. Nazarova⁴, N. V. Krisanova⁴, T. O. Borisova⁴, A. P. Soldatkin^{1,2}

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

²Taras Shevchenko Kyiv National University, 64 Volodymyrska str., 01601, Kyiv, Ukraine

³National Aviation University, 1 Avenue Cosmonaut Komarov, 03680, Kyiv, Ukraine

⁴Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9 Leontovicha str., 01601, Kyiv, Ukraine

Summary

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). The glutamate concentration in certain parts of the body may influence the development of heart attacks, strokes and various neuropathological states. Determination of glutamate is important in clinical biochemistry for the diagnosis of diseases associated with abrupt changes of glutamate level in the body. Continuous monitoring of glutamate concentrations in biological samples is necessary for the prevention and treatment of neuropathologies. Therefore, accurate and rapid methods of glutamate determination are required in neurophysiology and neuropathology, fundamental and clinical medicine, pharmaceutical industries as well as in analytical biochemistry and biotechnology. Today, there are numerous methods of glutamate measurement, the most promising of which are those based on biosensors. They are very accurate, rapid, highly selective, do not require sample pretreatment, allow real time measurements.

The aim of the study was the development and optimization of work of a glutamate-sensitive amperometric biosensor based on glutamate oxidase and adaptation of its analytical characteristics for evaluation of the rate of glutamate uptake by the isolated nerve terminals of rat brain.

Methods: The amperometric method of analysis was used. The platinum disc electrodes served as amperometric transducers. Working amperometric electrodes, auxiliary platinum electrode and Ag/AgCl reference electrode for measuring were connected by three-electrode scheme to the potentiostat PalmSens (Netherlands). Eight-channel device (CH-8 multiplexer) of the same manufacturer was connected to the potentiostat, which allowed simultaneous obtaining signals from several working electrodes. Glutamate oxidase was immobilized on the surface of amperometric transducer using covalent cross-linking of the enzyme with BSA via glutaraldehyde. The study was performed with the preparation of synaptosomes using two methods - calibration curves and standard additions.

Results: In the work a glutamate-sensitive biosensor was developed; its work was optimized for glutamate determination in biological samples, and afterwards glutamate was determined in samples of synaptosomes. The presence of a base signal in the synaptosome preparation was shown in the absence of exogenous glutamate. The rate of sodium-dependent uptake of glutamate and its accumulation by synaptosomes was determined.

Conclusions: Glutamate-sensitive amperometric biosensor based on glutamate oxidase was developed and optimized. The biosensor proposed is highly sensitive and selective to glutamate, characterized by good reproducibility and operational stability. Taking into account the base signal, it was shown

that there was no significant difference in the initial rate of sodium-dependent glutamate uptake and its accumulation by the brain synaptosomes whether it was measured using glutamate-sensitive biosensors or radioactively-labeled L-[¹⁴C] glutamate.

Keywords: glutamate, biosensor, glutamate oxidase, active glutamate uptake, brain nerve terminal, m-phenylenediamine

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

ОПТИМІЗАЦІЯ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ОЦІНКИ ШВИДКОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ ІЗОЛЬОВАНИМИ НЕРВОВИМИ ТЕРМІНАЛЯМИ МОЗКУ

Д. Ю. Кучеренко^{1,2}, І. С. Кучеренко^{1,2}, Д. В. Седюко³, Д. В. Книжникова², О. О. Солдаткін^{1,2}, А. А. Борисов⁴, А. Г. Назарова⁴, Н. В. Крисанова⁴, Т. О. Борисова⁴, О. П. Солдаткін^{1,2}

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

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

³ Національний авіаційний університет, пр. Космонавта Комарова, 1,
03680, м. Київ, Україна

⁴ Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, 01601, м. Київ, Україна

Реферат

Глутамат є основним збуджуючим нейротрансмітером в ЦНС ссавців. Концентрація глутамату в окремих частинах організму може впливати на розвиток інфарктів, інсультів та різні нейропатологічні стани. Визначення глутамату займає важливе місце в клінічній біохімії при діагностиці захворювань, що пов'язані з різкими змінами рівня глутамату в організмі. Постійний контроль концентрації глутамату в біологічних зразках є необхідним для профілактики та лікування нейропатологій. Через це виникає потреба в методах точної та швидкої детекції глутамату для потреб нейрофізіології і нейропатології, фундаментальної та клінічної медицини, фармацевтичної промисловості, а також в аналітичній біохімії та біотехнології. На сьогоднішній день існує багато методик визначення концентрації глутамату, однак найбільш перспективним є використання біосенсорів, які є дуже точними, швидкими, характеризуються високою селективністю, не потребують попередньої підготовки проби, а також відображають результат вимірювання в режимі реального часу.

Метою даної роботи була розробка та оптимізація роботи амперометричного біосенсора на основі глутаматоксидази для визначення глутамату та адаптація його аналітичних характеристик для оцінки швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналями мозку.

Методи дослідження: В роботі використовували амперометричний метод аналізу. Як амперометричні перетворювачі в роботі використовували платинові дискові електроди. Робочі амперометричні електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння за триелектродною схемою вимірювання під'єднувались до потенціостату PalmSens (Нідерланди). 8-ми каналний пристрій (CH-8 multiplexer) того ж виробника, що підключався до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали одночасно з декількох робочих електродів. Імобілізація глутаматоксидази на поверхню амперометричного перетворювача здійснювалась за допомогою ковалентного зшивання ферменту з БСА за допомогою глутарового альдегіду. Дослідження проводили з використанням препарату синаптосом за допомогою двох методів – використанням калібрувальної кривої та стандартних додавань.

Результати дослідження: В роботі було розроблено глутамат-чутливий біосенсор та проведено оптимізацію його роботи для визначення глутамату в біологічних зразках, після чого проведено вимірювання вмісту глутамату у зразках синаптосомами. Показано наявність базового сигналу у препараті синаптосом за відсутності екзогенного глутамату. Визначено швидкість натрій-залежного накопичення та акумуляції глутамату синаптосомами.

Висновки: Розроблено глутамат-чутливий амперометричний біосенсор на основі глутаматоксидази та проведено оптимізацію його роботи. Запропонований в роботі біосенсор має високу чутливість та селективність до глутамату, характеризується гарною відтворюваністю та операційною стабільністю. Враховуючи базовий сигнал, показано, що початкова швидкість натрій-залежного накопичення глутамату та його акумуляція синаптосомами головного мозку, що вимірювалися з використанням глутамат-чутливого біосенсору та радіоактивно-міченого L-[¹⁴C]глутамату суттєво не відрізнялись.

Ключові слова: глутамат, біосенсор, глутаматоксидаза, активне накопичення глутамату, нервові терміналі головного мозку, m-фенілендіамін