

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 20__ р.

**РОЗРОБКА ТА АДАПТАЦІЯ АМПЕРОМЕТРИЧНОЇ
БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ НА ОСНОВІ БІЛРУБІНОКСИДАЗИ
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛРУБІНУ**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Бужак Ангеліни Владиславівни

Науковий керівник від кафедри

канд. біол. наук, Коваль Т. В.

Робота виконана у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом завідувача відділу, д-ра біол. наук, ст. наук. співроб. Солдаткіна Олександра Олексійовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БОкс	—	білірубіноксидаза;
БСА	—	бичачий сироватковий альбумін;
ГА	—	глутаровий альдегід;
м-ПФД	—	мета-поліфенілендіамін;
HEPES	—	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (4-(2-гідроксиетил)-1-піперазейнульфенова кислота);
RSD	—	relative standard deviation (відносне стандартне відхилення).

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. Сучасний стан та перспективи моніторингу білірубіну як клінічного маркера.....	6
1.1. Білірубін як важливий біохімічний маркер у клінічній діагностиці.....	6
1.2. Аналіз традиційних методів детекції білірубіну.....	8
1.3. Біосенсиори як альтернативний інструмент медичного моніторингу.....	9
1.3.1. Типи біосенсорних систем.....	10
1.3.2. Білірубіноксидаза як біоселективний елемент в амперометричних перетворювачах.....	13
1.3.3. Методи іммобілізації ензимів на поверхні електродів.....	15
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	18
2.1. Матеріали та реактиви.....	18
2.2. Принцип роботи та схема амперометричної установки.....	19
2.3. Виготовлення біоселективного шару на основі білірубіноксидази.....	20
2.4. Методика проведення амперометричних вимірювань.....	22
2.5. Статистична обробка результатів.....	22
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	24
3.1. Підбір оптимальних параметрів для роботи ензиматичної мембрани....	24
3.2. Оцінка чутливості біосенсора до параметрів робочого розчину.....	29
3.3. Оцінка селективності білірубін-чутливого біосенсора.....	33
3.4. Визначення стабільності відгука та відтворюваності іммобілізації біоселективного елементу біосенсора.....	35
3.5. Аналітичні характеристики розробленого біосенсора.....	37
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	41

ВСТУП

З розвитком біотехнології та електроніки біосенсиори зарекомендували себе як високочутливі прилади для експрес-аналізу аналітів у розчині, що забезпечують високу специфічність аналізу. Особливого значення біосенсорні системи набувають у сфері медичного моніторингу, де критично важливим є швидке визначення специфічних біомаркерів, що допомагають оцінити стан організму [1].

Серед ключових біохімічних маркерів у клінічній діагностиці патологій гепатобіліарної системи та шлунково-кишкового тракту можна виділити білірубін, що є кінцевим продуктом розпаду гему, який надає жовчі характерного жовтого кольору. Його надлишок в організмі призводить до гіпербілірубінемії, яка клінічно проявляється у вигляді жовтяниці [2]. Підвищення кон'югованого білірубину зазвичай вказує на порушення відтоку жовчі або печінкову недостатність, а непрямого – на гемолітичну анемію. Також високі концентрації білірубину в крові характерні для гепатитів, цирозу та раку печінки та низки інших синдромів. Особливо поширеною є фізіологічна жовтяниця новонароджених, що потребує особливої уваги в постнатальний період. Моніторинг зазвичай проводиться у сироватці крові або слині [3].

Традиційні методи визначення білірубину, такі як спектрофотометрія, капілярний електрофорез чи хроматографія, попри їхню точність, поступаються біосенсорним тест-системам за швидкістю аналізу, портативністю та відносною собівартістю вимірювань [4]. Завдяки цим параметрам, а також відсутності складної пробопідготовки зразків до аналізу та потреби у громіздкому обладнанні, біосенсиори стають оптимальним інструментом для клінічної детекції біомолекул.

Аналіз літературних джерел [5–21] дозволив оцінити кількість й параметри функціонування вже існуючих біосенсорів для визначення білірубину в модельних розчинах та біологічних рідинах й підтвердив

необхідність розробки нового інструменту для використання у медичній сфері.

Метою даної роботи було розробити та оптимізувати електрохімічну біосенсорну систему на основі білірубіноксидази для вимірювання білірубіну в модельних розчинах та біологічних зразках.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Підібрати оптимальні параметри для роботи ензиматичної мембрани перетворювача та робочий потенціал.
2. Оцінити чутливість біосенсорної системи до параметрів робочого розчину.
3. Дослідити селективність розробленого білірубін-чутливого біосенсора.
4. Оцінити стабільність біосенсорного відгука та відтворюваність приготування біоселективного елементу біосенсора.
5. Визначити основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора.

Запропонований біосенсор може бути використаний у біохімічних дослідженнях, клінічній діагностиці та експрес-моніторингу патологічних станів, а також стати інструментом для аналізу концентрації білірубіну в біологічних рідинах.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ МОНІТОРИНГУ БІЛІРУБІНУ ЯК КЛІНІЧНОГО МАРКЕРА

1.1. Білірубін як важливий біохімічний маркер у клінічній діагностиці

Білірубін – це ключовий золотисто-жовтий пігмент жовчі, який є кінцевим продуктом катаболізму гему. Основними джерелами його утворення в організмі є руйнування еритроцитів у селезінці, а також розпад інших гемопротейнів, зокрема міоглобіну в м'язах та цитохромів у печінці [2].

Вивільнений білірубін являє собою непряму (некон'юговану) фракцію, характеризується високою токсичністю і нерозчинністю у водних середовищах. Тому для транспортування до печінки він зв'язується з альбуміном, утворюючи високомолекулярний комплекс, який не здатний долати нирковий фільтр, що слугує бар'єром від великих плазматичних білків. Відтак, при відсутності патологій некон'югований білірубін у сечі не виявляється, а його референтні значення у сироватці крові дорослої людини становлять від 5 до 33 мкМ [2, 22].

У печінці під дією ферментів відбувається процес кон'югації білірубіну та молекул глюкуронової кислоти з утворенням прямого (кон'югованого) білірубіну, що є водорозчинним, малотоксичним та не потребує міцного зв'язку з альбуміном для транспортування й повністю виводиться з жовчу в кишківник [2].

Порушення процесів синтезу або виведення білірубіну призводить до гіпербілірубінемії, що клінічно проявляється у вигляді жовтяниці й викликає інтоксикацію всього організму, а також характеризується зміною забарвлення шкіри, слизових оболонок та склер на жовте (див. табл. 1.1) [3].

Високий рівень непрямого білірубіну у сироватці крові найчастіше свідчить про гемолітичну анемію, яка може викликати гіпоксію або тромбоз.

Таблиця 1.1

**Характеристика основних патологічних станів за типом
гіпербілірубінемії та рівнем концентрації білірубіну**

Патологія	Форма гіпербілірубінемії	Концентрація білірубіну, мкмоль/л
Синдром Жильбера	Некон'югована	17–85, до 100 [23]
Синдром Криглера-Найяра	Некон'югована	100, до 800 [23]
Синдром Дабіна-Джонсона	Кон'югована	50–100, до 400 [23]
Синдром Ротора	Змішана форма	50–100 [23]
Ядерна жовтяниця	Некон'югована	>220–256 [24]
Норма	—	5–33 [4]

Для некон'югованої гіпербілірубінемії також характерна низка спадкових порушень, таких як синдром Жильбера [25, 26], при якому печінці бракує ензимів для переробки пігменту і його концентрація зростає до 100 мкМ у сироватці крові. Синдром Криглера-Найяра являє собою вроджену жовтяницю з тяжкими ускладненнями, концентрація білірубіну піднімається до рівня 425–765 мкМ [26, 27].

Підвищення рівня кон'югованого білірубіну вказує на холестази, порушення відтоку жовчі або серйозні ураження печінки такі як гепатити, цироз, рак чи печінкову недостатність. Важливою діагностичною ознакою таких дисфункцій гепатобіліарної системи є поява білірубіну в сечі – білірубінурія [28]. Синдром Дабіна-Джонсона, який часто помилково сприймають за жовчнокам'яну хворобу, що призводить до непотрібних хірургічних втручань, проявляється кон'югованою гіпербілірубінемією на фоні нормальних показників інших печінкових проб, відсутності гемолізу та характерного накопичення темного пігменту в печінці [29].

Змішана форма гіпербілірубінемії з переважанням прямої фракції

характерна для рідкісного синдрому Ротора, що має аутосомно-рецесивний характер успадкування. На відміну від більшості інших гепатопатій, цей стан зумовлений генетичним дефектом білків-транспортів, які відповідають за захоплення білірубину гепатоцитами з крові. Оскільки ця патологія не потребує специфічного лікування, його точна ідентифікація за допомогою біосенсорних систем або стандартних тестів дозволяє уникнути зайвих інвазивних процедур, таких як біопсія печінки [30].

Особливу небезпеку становить фізіологічна жовтяниця новонароджених, за якої концентрація білірубину в сироватці крові може перевищувати 500 мкМ. У них стан гіпербілірубінемії потребує особливої уваги, оскільки може переходити у білірубінову енцефалопатію й поширюватись на центральну нервову систему, спричиняючи незворотні неврологічні ураження, такі як глухота, затримка розвитку і судоми [31, 32].

Враховуючи високу токсичність білірубину та його роль як критичного маркера функціонального стану організму, швидке та точне визначення його концентрації в біологічних рідинах (сироватці крові, сечі та слині) має вирішальне діагностичне значення й потребує надійних та швидких методів вимірювання.

1.2. Аналіз традиційних методів детекції білірубину

Для діагностики патологічних станів печінки, підшлункової залози та шлунково-кишкового тракту критично важливим є точне визначення рівня білірубину в біологічних рідинах організму людини. На сьогодні основними референсними методами аналізу є спектрофотометрія [33, 34], колориметрія [35], флуориметрія [36] та вимірювання люмінесценції [37], а також капілярний електрофорез [38, 39] і високоефективна рідинна хроматографія [40].

Найбільш розповсюдженим у клінічній практиці є колориметричний

метод, що базується на реакції Ван ден Берга (діазореакції). Принцип реакції полягає у взаємодії білірубину з діазореагентом у результаті чого утворюються фіолетові азопігменти з піком поглинання за 540 нм. Проте колориметрія є чутливою до світла та рН середовища, а також потребує використання агресивних реагентів і додаткових сполук для виявлення непрямой фракції, що робить її малоефективною для швидкої діагностики патологічних станів у клінічних умовах. [35].

Інші оптичні підходи, такі як флуориметрія та вимірювання люмінесценції, ґрунтуються на здатності молекул випромінювати світло після збудження зовнішнім джерелом або внаслідок хімічних чи ензиматичних реакцій. Попри широке застосування ці методи мають низку недоліків, таких як висока вартість специфічних реагентів, а також вплив мутності зразка, присутній при ліпемії або гемолізі, що спотворює результати вимірювання [36, 37].

Капілярний електрофорез та високоефективна рідинна хроматографія характеризуються найвищою роздільною здатністю та точністю вимірювання концентрації білірубину у сироватці крові, проте їх впровадження у масову діагностику обмежене через складність аналітичних систем та високу вартість обладнання, необхідність тривалої та ретельної підготовки зразків сироватки та високі вимоги до кваліфікації персоналу [38–40].

1.3. Біосенсиори як альтернативний інструмент медичного моніторингу

Завдяки простоті дизайну, швидкому аналізу та можливості мініатюризації, електрохімічні біосенсиори є оптимальним інструментом для детекції біологічно активних речовин.

Принцип їхньої дії базується на специфічній взаємодії біологічного компонента з аналітом, що супроводжується фізико-хімічними змінами. Будь-який біосенсор складається з біорозпізнавального елемента, який може

бути представлений ензимами, антитілами, нуклеїновими кислотами, іммобілізованими на поверхні перетворювача [41].

Найбільш поширеними є біоселективні елементи на основі ензимів різних класів, зокрема іммобілізовані ензими, що каталізують окисно-відновну реакцію. Отриманий у процесі біохімічної реакції відгук конвертується перетворювачем в електричний сигнал. При цьому величина генерованого сигналу перебуває у прямій залежності від концентрації аналіту в зразку, що дозволяє проводити точний кількісний аналіз [42].

1.3.1. Типи біосенсорних систем

Біосенсорні системи можна класифікувати залежно від природи розпізнавального елемента, що покладений в основу їхньої роботи, та залежно від типу перетворювача, який допомагає реєструвати отриманий сигнал у ході взаємодії з аналітом.

Біологічним компонентом, тобто елементом біорозпізнавання, може виступати ензим, антитіло, біоміметик, а також ДНК або РНК, що й визначатиме подальшу специфічну взаємодію та виявлення таргетної молекули [43].

Перетворювач конвертує біохімічний сигнал отриманий в ході реакції з розпізнавальним елементом на кількісно вимірюваний електричний сигнал, який зазвичай пропорційний концентрації аналіту в досліджуваному зразку. Залежно від типу перетворювача біосенсори можна поділити на такі групи як електрохімічні, оптичні, масові та термометричні [44].

До електрохімічних сенсорів належать амперометричні, потенціометричні, кондуктометричні та імпедансні біосенсори [42]. Кожен електрохімічний перетворювач характеризується здатністю генерувати потенціал або електричний струм, що виникає в ході реакції на поверхні робочого електроду або в приелектродному просторі.

Найбільш розповсюдженими у сучасній медичній діагностиці є амперометричні методи [5, 6], що забезпечують високу точність дослідження. Окрім амперометричних систем для діагностичного скринінгу рівня білірубіну у крові та слині можуть також застосовуватись потенціометричні [7, 8], п'єзоелектричні [9] та імпедансні [10] електрохімічні перетворювачі (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Класифікація електрохімічних біосенсорних систем [42]

Амперометричний метод дослідження полягає у вимірюванні струму як функції часу при фіксованому значенні прикладеного електричного потенціалу. У таких біосенсорних системах ензим закріплюється на електроді, на якому в ході біохімічного процесу відбуваються реакції окиснення або відновлення. Струм, що при цьому виникає, слугує аналітичним сигналом, величина якого дозволяє кількісно визначити вміст аналіту в розчині. Біосенсиори з даним типом фіксації сигналу складаються з системи трьох електродів: додаткового, електроду порівняння та робочого [45], які можуть бути як окремими електродами так і інтегрованими в один друкований чіп для швидкого масштабування їх виробництва.

Амперометричні біосенсиори, що функціонують на основі оксидоредуктаз, прийнято розділяти на три покоління залежно від механізму перенесення електронів. Перше покоління базується на моніторингу концентрації субстрату або продуктів реакції (наприклад, кисню чи пероксиду водню), що утворюються в ході ензиматичного процесу. Друге

покоління передбачає використання ензимів у поєднанні зі специфічними окисно-відновними медіаторами, які забезпечують електрокаталітичний транспорт заряду. Третє покоління охоплює системи (переважно на основі дегідрогеназ), де реалізується пряме перенесення електронів між активним центром ензиму та поверхнею електрода без сторонніх посередників [46].

Потенціометричні біосенсиори використовуються для кількісного визначення речовин на основі різниці електричних потенціалів між електродом порівняння та робочим електродом, що безпосередньо контактує з аналітом. Потенціометричні перетворювачі використовують іон-чутливі та газочутливі електроди, а також польові транзистори. Найпоширенішим потенціометричним електродом є рН-метричний [8, 47].

Хоч переважна більшість на біосенсорному ринку належить амперометричним системам, потенціометрія має низку переваг серед яких можна виділити нижчий прикладений потенціал при вимірюванні, що знижує вплив інтерферуючих факторів на результат аналізу. Крім того, вона дає можливість зменшити розмір електроду для компактизації приладу без суттєвої втрати чутливості, що може бути критичним фактором для переходу приладу від лабораторного прототипу до комерційних моделей сенсорів [48].

Кондуктометричні перетворювачі фіксують зміну провідності або електричного опору як оберненої величини до неї, в результаті реакцій за участі біорозпізнавального елементу. Утворення заряджених продуктів у ході реакції змінює рухливість та кількість йонів, трансформуючи хімічний відгук у вимірюваний електричний сигнал. Метод передбачає використання двох паралельних електродів, тобто на відміну від амперометрії не потребує електроду порівняння [49]. Проте для аналізу концентрації білірубіну в біологічних рідинах такий тип перетворювачів не застосовується, оскільки при ензиматичній реакції за участі білірубіноксидази в розчині не утворюються речовини, що можуть бути зафіксованими даним типом перетворювача.

Імпедансний тип електрохімічного перетворювача аналізує опір та

ємність електричного кола, тобто імпеданс середовища. Такий тип аналізу поєднує дослідження резистивних та ємнісних властивостей перетворювача за допомогою синусоїдальної напруги, тобто потенціалом з різницею фаз відносно струму, який виводить систему зі стану рівноваги. Усі речовини у вимірювальній комірці чинять опір руху електронів та іонів, що призводить до зміни імпедансу, який вимірюється як функція частоти [50].

Окремим класом біосенсорів, які використовуються для визначення концентрації білірубіну, можна виділити п'єзоелектричні масочутливі сенсори, що реєструють молекулярні взаємодії через зміну маси на активній поверхні. Робота таких датчиків, зокрема кварцових мікроваг, базується на зсуві резонансної частоти кристала під впливом механічних коливань, викликаних змінною напругою. Будь-яка адсорбція речовини на електродах призводить до зниження частоти коливань, що є прямо пропорційним масі нанесеного шару [42].

1.3.2. Білірубіноксидаза як біоселективний елемент в амперометричних перетворювачах

В основу амперометричних біосенсорних систем для моніторингу рівня білірубіну в біологічних зразках або визначення концентрації в модельних розчинах найчастіше залучена білірубіноксидаза (КФ 1.10.3.2) – ензим класу оксидаз, що каталізує окиснення білірубіну до білівердину з одночасним відновленням кисню до води (рис. 1.2) [11].

Менш специфічною взаємодією з білірубіном володіє іммобілізована на поверхні електроду каталаза [12], яка виступає в ролі електрокаталізатора й знижує енергію активації окиснення білірубіну, полегшуючи та пришвидшуючи перенесення електронів до поверхні електрохімічного перетворювача, а також ще менш специфічна аскорбатоксидаза [13], іммобілізована у ензимну мембрану на поверхні амперометричного

біосенсора.

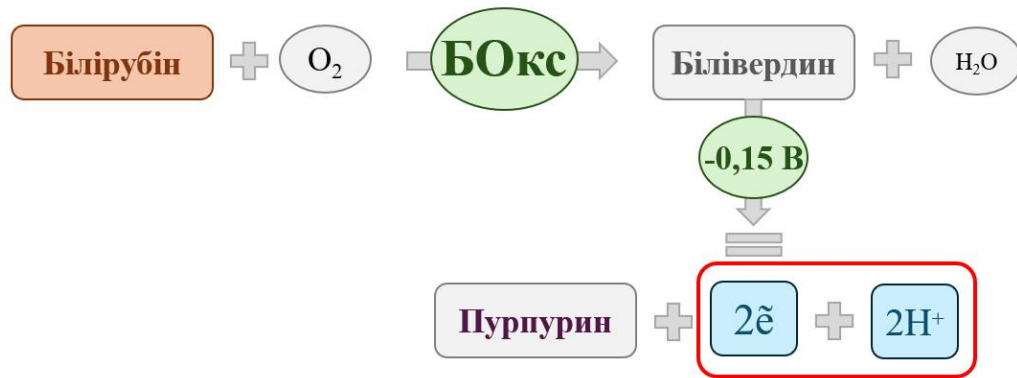


Рис. 1.2. Схема ензиматичної реакції, що відбувається на поверхні перетворювача за участі іммобілізованої БОкс [14]

Для створення одного з перших білірубін-чутливих біосенсорів застосовувалася система з двох ензимів: білірубіноксидази та пероксидази, де БОкс каталізує окиснення білірубину до білівердину та вимірюється у присутності коіммобілізованої пероксидази, де концентрація відновленого перекису прямо пропорційна концентрації білірубину в зразку [15].

Білірубіноксидаза, що використовується в ензиматичних мембранах, найчастіше отримана з *Myrothecium verrucaria* та *Trachyderma tsunodae* (рис.1.3) [14].

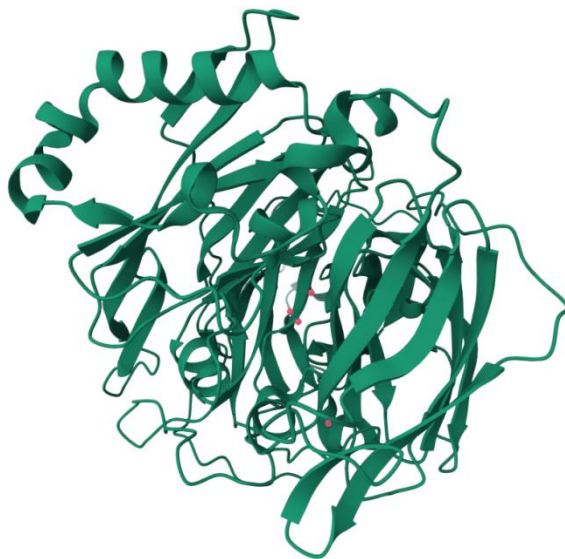


Рис. 1.3. Кристалічна структура білірубіноксидази, отриманої з *Myrothecium verrucaria*. Червоним кольором у центрі виділено чотири атоми

Купруму, що входять до складу активного центру ензиму [51]

Білірубіноксидаза характеризується високою активністю та стабільністю при нейтральному рН, а також виявляє стійкість до дії хлоридів, що зумовлює вибір цього ензиму як біоселективного елементу амперометричного перетворювача для роботи у фізіологічних умовах.

1.3.3. Методи іммобілізації ензимів на поверхні електродів

Виготовлення біосенсорної системи передбачає іммобілізацію ензиму на поверхні робочого електрода, тобто його фізичне або хімічне захоплення у просторі задля збереження його активності на перетворювачі, а також можливості багаторазового використання біосенсора [52].

Вибір методу залежить від типу біорецептора, характеристик перетворювача, фізико-хімічних властивостей аналізованої речовини та умов експлуатації, оскільки іммобілізація впливає на кінетичні параметри ензиму й може обмежувати його активність шляхом перешкоджання доступу аналіту до активного центру [42].

Відповідно, метод іммобілізації може бути фізичним, наприклад при включенні в гель або полімер та адсорбції, або хімічним, коли ензими хімічно зв'язані ковалентним зв'язком або за допомогою перехресного зшивання (рис. 1.4).

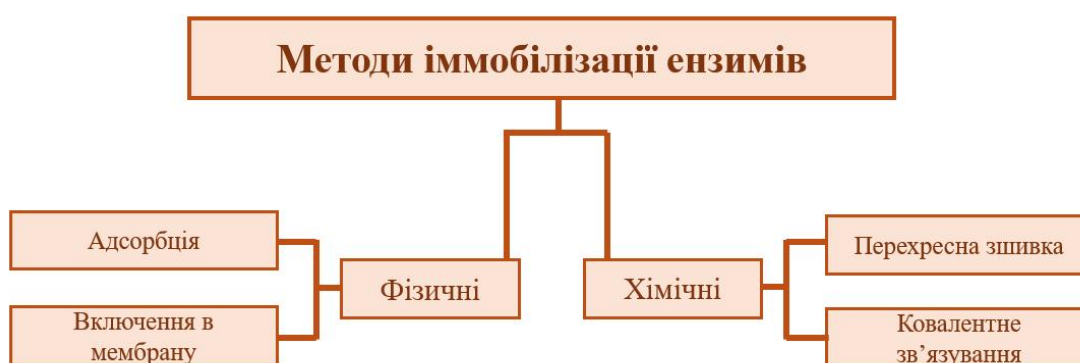


Рис. 1.4. Класифікація методів іммобілізації ензимів для створення

біосенсорних систем [42]

Найпростішим методом, що не викликає змін у структурі білкової молекули є адсорбція, під час якої ензим оборотно зв'язується з носієм за допомогою таких слабких фізичних сил як водневі зв'язки, сили Ван-дер-Ваальса, йонні або гідрофобні зв'язки. Використання такого підходу до іммобілізації дозволяє зберегти активний центр ензиму, а також не потребує складних реагентів, проте через слабкі зв'язки з поверхнею електрода будь-яка зміна рН, температури або іонної сили може спровокувати десорбцію. У якості сорбенту можуть виступати мікроскляні кульки, активоване вугілля тощо [53].

Включення в гель або полімер є незворотнім процесом, під час якого ензими фізично стабілізуються у волокнистій або гелевій мережі за допомогою нековалентних взаємодій. Такий метод характеризується надійним утриманням ензиму в матриці, що мінімізує його вимивання, а також перешкоджає доступу інтерферуючих речовин. Незважаючи на низку переваг, такий спосіб іммобілізації має певні дифузні обмеження, тобто молекулам субстрату, наприклад білірубіну, важче проникати крізь шар полімеру, що може збільшити час отримання відгуку. Полімерами, які використовуються для включення, можуть стати хітозан, альгінати, колаген, целюлоза, крохмаль, цеоліти, діоксид кремнію тощо [54].

При ковалентній іммобілізації функціональні групи (такі як аміно-, карбонова, фенольна, сульфгідрильна, тіолова, імідазольна, індольна, гідроксильна тощо), присутні в ензими, зв'язуються з матрицею-носієм за допомогою ковалентних взаємодій, що призводить до міцного зв'язування. Такий метод дозволяє міцно зафіксувати ензим, що надає можливість використовувати його навіть у жорстких умовах експлуатації, але одночасно й знизити чутливість, що пов'язано з зв'язуванням активного центру ензиму. Крім того, біосенсори на основі такої іммобілізації зазвичай мають найдовший термін зберігання. Серед найпоширеніших агентів для ковалентного зв'язування можна виділити глутаральдегід, карбодіїмід,

епоксиди, гліюксаль тощо [55].

При іммобілізації методом перехресного зшивання молекули ензимів зшиваються один з одним за відсутності будь-якого додаткового носія. Зшиваючий агент, наприклад глутаровий альдегід, діє як молекула, що слугує своєрідним містком між молекулами ензиму, підвищуючи його стабільність та захищаючи його від зовнішніх умов, які потенційно можуть знизити каталітичну активність. Цей спосіб характеризується високою механічною та термічною стабільністю іммобілізованого ензиму, зі збереженням високої каталітичної активності завдяки утворенню полімерної структури на поверхні електродів. Проте хімічні агенти часто є токсичними сполуками, що може стати недоліком у роботі з ними, а також суттєво вплинути на активність ензиму за використання їх високих концентрацій або довгого часу інкубації [56].

Крім того, поряд з традиційними зшиваючими агентами та методами іммобілізації широкої популярності серед біосенсорів набули носії на основі наноматеріалів, що забезпечують широкі можливості для модифікації. Поверхня вуглецевих структур може бути змінена шляхом приєднання або видалення певних функціональних груп.

Описані в літературі біосенсори для визначення білірубіну часто додатково містять наночастинки та наноматеріали, що покращують селективність та чутливість, а також зменшують час отримання відгуку, проте потребують складного багатоетапного хімічного синтезу. Білірубін може бути зв'язаний з наночастинками срібла [16], золота [17, 18] або цинку [12] для підвищення сигналу до таргетної молекули білірубіну, а також містити нанокompозити на основі оксиду графену [19, 20], хітозану [21] або поліпіролу [6].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

Для створення біоселективної мембрани на поверхні біосенсора було використано білірубіноксидазу (КФ 1.3.3.5) отриману з гриба *Myrothecium verrucaria* з активністю 11,8 од.акт./мг; бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V), гліцерин, 25% розчин глутарового альдегіду отримані від фірми - Sigma- Aldrich, США.

Субстратом для ензиматичної реакції був стоковий 5 мМ розчин білірубину (Sigma- Aldrich, Швейцарія), який був розчинений у буферному розчині HEPES з додаванням 0,035 М розчину гідроксиду натрію (Sigma- Aldrich, США) для повного розчинення. Для створення додаткової напівпроникної м-ПФД-мембрани було використано м-фенілендіамін (Sigma–Aldrich, США).

Для оцінки селективності біосенсора були використані стокові 5 мМ розчини амінокислот L- цистеїну, L- аргініну, L- феніланіну, L- метіоніну (Sigma- Aldrich, Японія); L- аскорбінової кислоти, L- гістидину, L- серину, L- валіну, L- лейцину, L- аспарагінової кислоти (Sigma- Aldrich, Німеччина); L- аспарагіну (Sigma- Aldrich, США); L- глутаміну, L- ізолейцину (Sigma- Aldrich, Бразилія); L- лізину, L- аланіну (Sigma- Aldrich, Китай); α - кетоглутарату, сечовини, креатиніну (Sigma- Aldrich, Японія); лимонної кислоти (Sigma- Aldrich, Австрія); D-(+)-глюкози (Sigma- Aldrich, Мексика); сечовини, лактату, пірувату (Sigma–Aldrich, Швейцарія).

Для перевірки іонної сили був використаний 2 М розчин хлориду натрію (IMCoPharma, Австрія).

Решта неорганічних речовин, які використовувалися у роботі були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.» або «ч.д.а.».

2.2. Принцип роботи та схема амперометричної установки

У роботі була використана класична амперометрична система на основі трьох електродів: платинових дискових робочих електродів, на які наносився біоселективний шар, електроду порівняння (Ag/AgCl) та додаткового електроду, що замикав електричне коло. Електроди були поміщені у вимірювальну комірку з постійним перемішуванням, наповнену буферним розчином. Під час експерименту відстань між допоміжним, порівняльним та робочими електродами була однаковою й складала близько 5 мм (рис. 2.1).

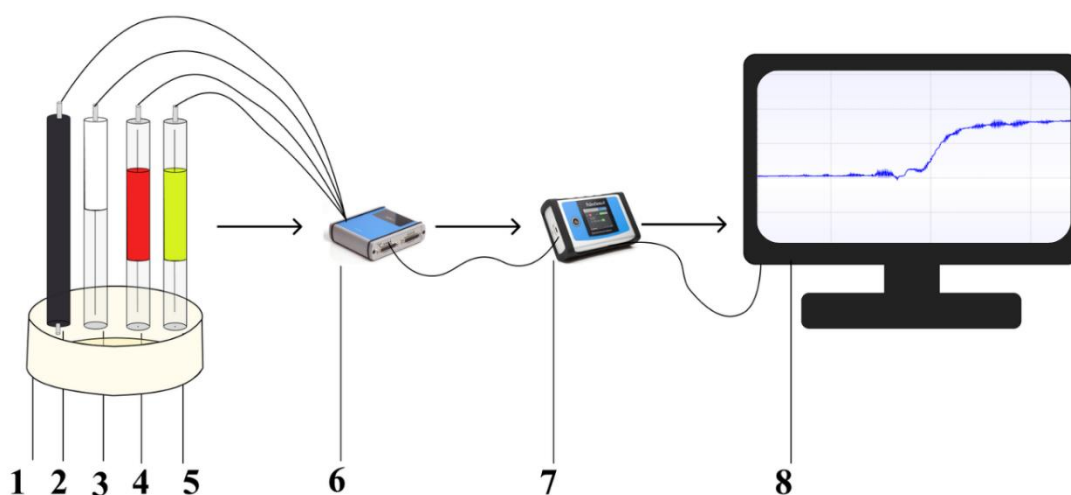


Рис. 2.1. Схема амперометричної установки, що використовувалась у роботі. 1 – вимірювальна комірка, 2 – електрод порівняння, 3 – додатковий електрод, 4, 5 – робочі електроди, 6 – мультиплексор, 7 – потенціостат PalmSens, 8 – комп'ютер з програмним забезпечення PStace 5.8

Робочі електроди були виготовлені на базі відділу бімолекулярної електроніки за наступною методикою: платиновий дріт (діаметром 0,5 мм та довжиною 3 мм) поміщали у скляний капіляр (зовнішній діаметр 3,5 мм), один кінець якого герметизували шляхом запаювання у полум'ї пальника. Електричне з'єднання платини зі срібним провідником забезпечували за допомогою низькотемпературного сплаву Вуда. Вільний об'єм капіляра

заповнювали епоксидною смолою, а для підключення перетворювача до вимірювальної установки припаювали мідний контакт.

Вимірювання сигналу здійснювали за допомогою потенціостата PalmSens (Palm Instruments, BV, Нідерланди). Використання 8-канального мультиплексора (CH-8) дозволяло одночасно проводити вимірювання на декількох електродах.

2.3. Виготовлення біоселективного шару на основі білірубіноксидази

У біосенсоріці для підвищення селективності біосенсорних систем, а також мінімізації впливу сторонніх компонентів зразка на результати аналізу, застосовуються напівпроникні мембрани. У їх основі можуть бути молекули поліаніліну (PANI) або м-поліфенілєндіаміну (м-ПФД), які завдяки наявності функціональних аміногруп у структурі цих полімерів, суттєво збільшують питому площу активної поверхні електрода, що сприяє ефективнішій іммобілізації біоселективного елементу.

Крім того, використання напівпроникного шару не дає великим молекулам, які можуть завадити роботі перетворювача, доступу до поверхні електрода завдяки ефекту «молекулярного сита» для макромолекул. Додаткові мембрани також здатні обмежувати доступ до поверхні електрода потенційних електроактивних інтерферентів, таких як аскорбінова та сечова кислоти, які часто присутні в біологічних рідинах і можуть спотворювати аналітичний сигнал [57].

Тому для покращення роботи біосенсора на поверхню амперометричних перетворювачів перед формуванням ензиматичного шару наносили додаткову напівпроникну полі-м-фенілдіамінову мембрану методом електрополімеризації (20 циклів; від -1 В до 1 В).

Біоселективний елемент біосенсора складався з ензиматичної білірубіноксидазної мембрани, що формувалась на поверхні

амперометричних датчиків. Для цього на поверхню перетворювача наносили суміш для іммобілізації, яка складалась зі змішаних у рівному співвідношенні 1:1 0,75% розчину глутарового альдегіду та ензиматичного гелю, що містив 15% білірубін оксидази (БОкс), 5% БСА та 10% гліцерину в 25 мМ HEPES буфері з рН 7.4. Після цього отриману ензиматичну мембрану інкубували впродовж 20 хв за температури $+20\pm0,5^{\circ}\text{C}$ на відкритому повітрі. Біоселективний шар формувався завдяки ковалентній зшивці молекул БОкс у краплі глутарового альдегіду (рис. 2.2).

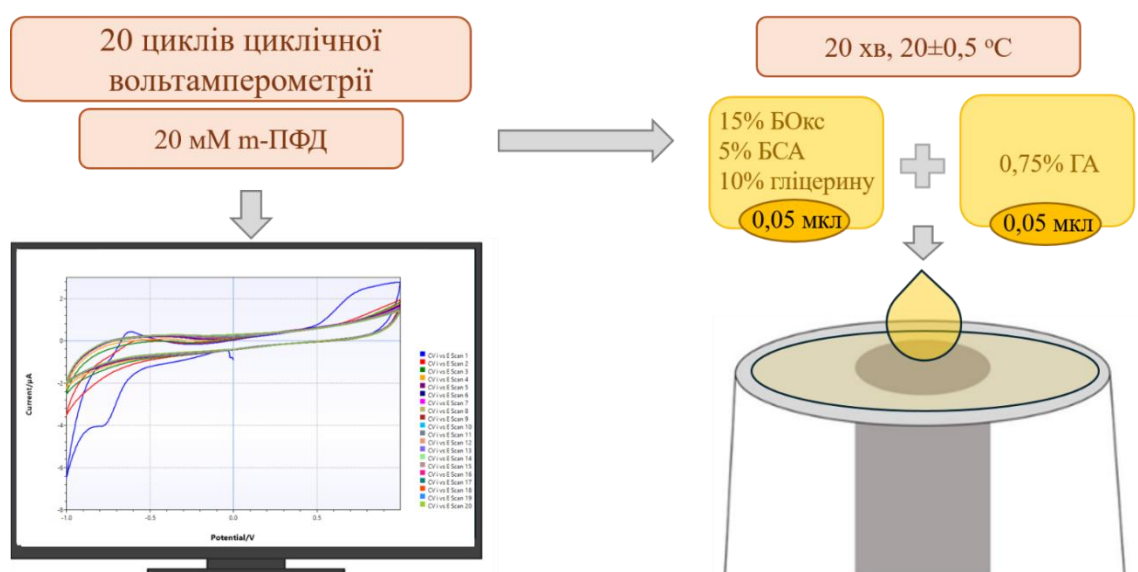


Рис. 2.2. Методика приготування біоселективного елементу на основі білірубіноксидази

0,75% розчин глутарового альдегіду був приготований з вихідного розчину, що мав концентрацію 25%.

Фінальною стадією виготовлення біосенсора було трьохразове промивання перетворювачів у буферному розчині (25 мМ HEPES, рН 7.4) впродовж 3 хв, щоб позбутись неіммобілізованих елементів мембрани та залишків вільного глутарового альдегіду.

2.4. Методика проведення амперометричних вимірювань

Дослідження проводили у вимірювальній комірці об'ємом 2 мл, що була заповнена робочим буферним розчином 25 мМ HEPES з pH 7,4. Тривалість вимірювання становила 1,5–2 хв з подальшим трьохразовим промиванням комірки та датчиків буферним розчином впродовж 3 хв.

Аналіз отриманих амперограм та інтерпретація аналітичного сигналу може здійснюватися двома методами. У першому варіанті, що був застосований у даній роботі, розраховується різниця між фоновим струмом (базовою лінією) та піковим значенням сили струму, що фіксується у відповідь на додавання субстрату. Такий підхід забезпечує високу точність та відтворюваність результатів, оскільки сила струму прямо пропорційна концентрації аналіту в зразку, метод є найбільш надійним для характеристики лінійного діапазону та чутливості розробленого біосенсора.

Другий варіант передбачає вимірювання швидкості зміни сили струму відносно стандартного відгука на початковому етапі реакції, одразу після внесення субстрату. Такий варіант здатен скоротити тривалість аналізу, що робить його перспективним саме для систем експрес-діагностики.

Математичні розрахунки та побудови графіків отриманих даних були виконані у програмному середовищі OriginPro 2024 (OriginLab).

2.5. Статистична обробка результатів

Для статистичного аналізу отриманих результатів застосовували стандартні методи варіаційної статистики. З метою забезпечення високого рівня відтворюваності та достовірності даних кожен дослід проводили у 3–5 паралельних повторях. Опрацювання даних передбачало обчислення середнього арифметичного значення та стандартного відхилення.

Статистично значущими вважали результати за умови $p \leq 0,05$. Графічну візуалізацію даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення OriginLab (версія Pro 2024).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Розробка та покращення аналітичних характеристик біосенсора полягала у дослідженнях, що були спрямовані на визначення оптимальних умов іммобілізації ензиму на поверхні перетворювача, а також перевірку впливу основних параметрів розчину для аналізу, які можуть змінювати умови функціонування біосенсора.

Тому в рамках розробки біосенсора було проведено низку експериментів з підбору оптимальних параметрів іммобілізації біологічного матеріалу, зокрема визначено оптимальні концентрації глутарового альдегіду та ензиму в суміші, а також визначено оптимальний прикладений потенціал для роботи білірубін-чутливої біосенсорної системи.

У ході експериментів також було перевірено вплив іонної сили, буферної ємності розчину та концентрації білка в зразку на функціонування біосенсора й оцінено селективність біосенсора щодо можливих електроактивних інтерферентів.

3.1. Підбір оптимальних параметрів для роботи ензиматичної мембрани

Першочерговою задачею, яка постає при розробці біосенсорної системи є підбір параметрів функціонування ензиматичної мембрани. Для забезпечення ефективної роботи біосенсора у експериментах було підібрано оптимальний потенціал для роботи амперометричного перетворювача. Для цього спочатку було проаналізовано відгук біосенсора на додавання 500 мкМ білірубіну у режимі циклічної вольтаметрії (CV) в межах від -1 В до 1 В (рис. 3.1). Усі вимірювання проводились у 25 мМ буферному розчині HEPES (pH 7.4). Концентрація білірубіну на цьому етапі роботи в усіх

експериментах становила 500 мкМ.

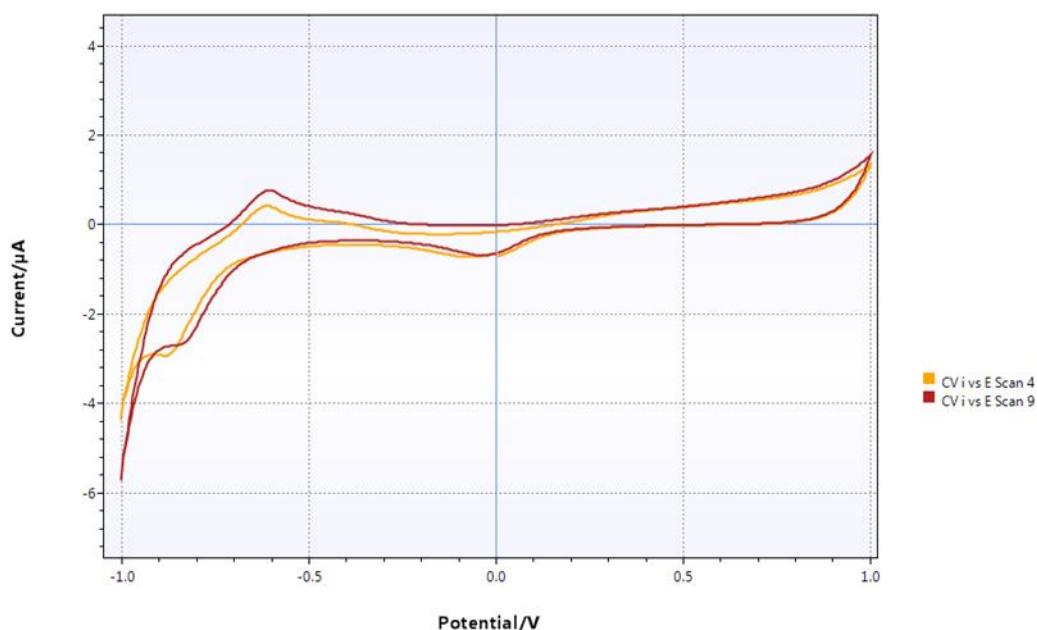


Рис. 3.1. Криві типової циклічної вольтаметрії отримані за допомогою програми PSTrace 5.8. Жовтим кольором наведено графік залежності сили струму від прикладеного потенціалу у буферному розчині; червоним кольором – зміна сили струму за додавання 500 мкМ білірубіну

Наведена крива жовтого кольору з рис. 3.1 відповідає базовому значенню струмів при прикладеному потенціалі в межах від -1 В до 1 В та має вигляд суцільної лінії, що свідчить про відсутність сторонніх електрохімічно активних домішок у приелектродному просторі. При додаванні у вимірювальну комірку 500 мкМ білірубіну спостерігається чітко виражена зміна фоновому струму на проміжку від -0,6 В до 0,3 В, що вказує на каталітичну активність іммобілізованої білірубіноксидази щодо її субстрату.

Тому на основі отриманих результатів було детальніше досліджено залежність амперометричного відгуку від прикладеної напруги для визначення максимальної можливої чутливості біосенсора на

білірубін (рис. 3.2). Кількість повторів для кожного експерименту становила 9 разів.

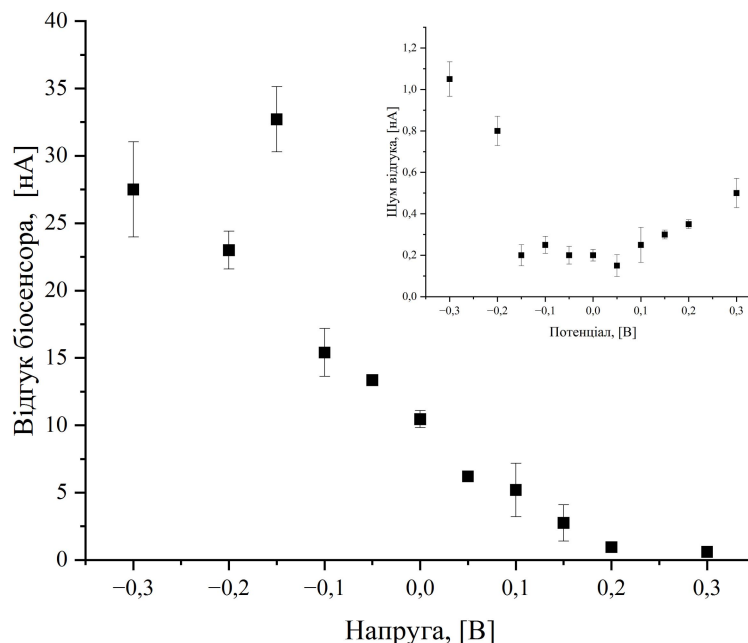


Рис. 3.2. Залежність значення відгуку біосенсора від потенціалу

Як видно з наведеного графіка, найвищий рівень біосенсорного відгуку спостерігався при прикладеному потенціалі -0,15 В, який і був обраний як оптимальний робочий потенціал для подальших досліджень. Саме при такому потенціалі спостерігається окиснення білірубіну до білівердину з утворенням вільних електронів, які фіксуються амперометричною системою як відгук біосенсора [26]. Крім того, робота у даній області забезпечує відносно низький рівень шуму, що можна побачити на внутрішньому графіку, тобто окиснення компонентів буферного розчину або матеріалу електрода має мінімальний вплив на базову лінію та чутливість перетворювача під час вимірювань.

Відповідно, використання потенціалу -0,15 В дозволяє досягти нижчої межі виявлення білірубіну та забезпечує кращу селективність біосенсора, оскільки більшість типових інтерферуючих речовин крові (наприклад,

аскорбінова або сечова кислоти) електрохімічно активні при високих позитивних значеннях потенціалу.

Після підбору оптимального робочого потенціалу було проаналізовано параметри іммобілізації біоселективного елементу. Дослідження полягало у визначенні оптимальної концентрації глутарового альдегіду (ГА), який використовується як агент ковалентної зшивки молекул білірубуноксидази між собою на поверхні амперометричного перетворювача (рис. 3.3). Кількість повторів для кожного експерименту становила 9 разів.

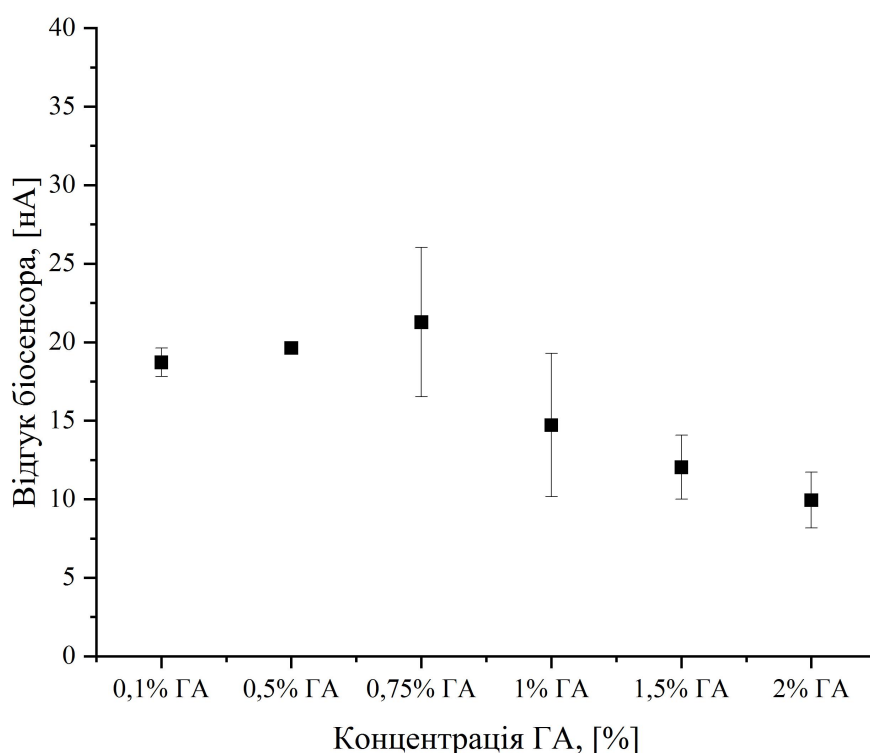


Рис. 3.3. Залежність значення відгуку біосенсора від концентрації глутарового альдегіду при іммобілізації ензиматичної мембрани

У ході експерименту було виявлено, що оптимальною концентрацією ГА є 0,75%. Низькі відгуки при використанні менших концентрацій глутарового альдегіду можна пояснити недостатньою кількістю агенту іммобілізації для перехресного зшивання між всіма молекулами ензиму в мембрані. При цьому надто висока концентрація ГА блокує активні центри БОкс, з якими потенційно міг зв'язатися білірубін, знижуючи чутливість

біосенсора.

Наступним етапом дослідженням став підбір оптимальної концентрації ензиму в суміші для іммобілізації. (рис.3.4). Кількість повторів для кожного експерименту становила 9 разів.

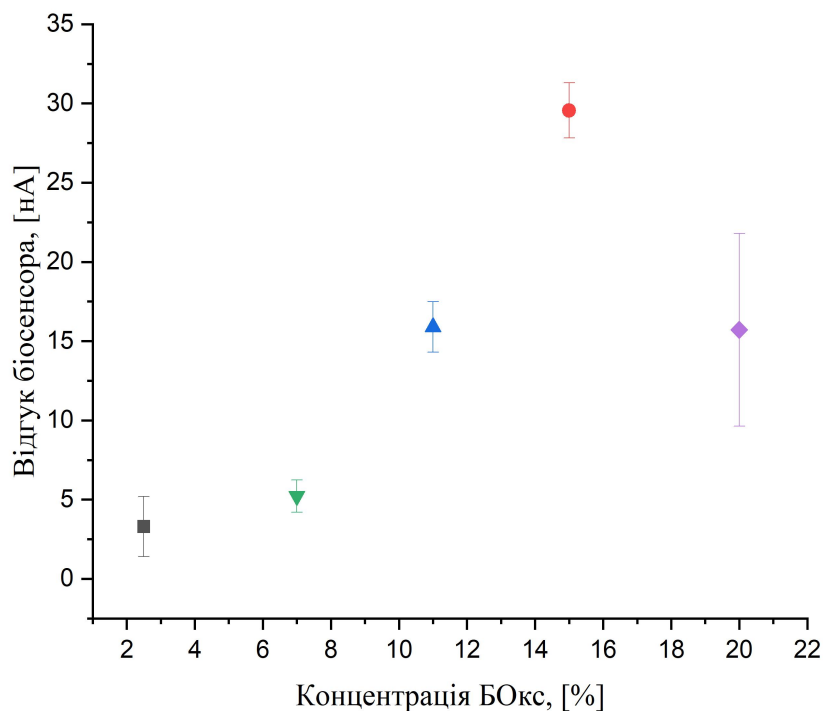


Рис. 3.4. Залежність значення відгуку біосенсора від концентрації білірубіноксидази

Отримані результати свідчать про наявність низького амперометричного відгуку при малих концентраціях білірубіноксидази, що можна пояснити недостатньою щільністю активних центрів на поверхні перетворювача, а також швидким вимиванням ензиму з біоселективного шару.

Концентрація БОкс 20% також виявилася неефективною при роботі, оскільки шар ензиму стає занадто товстим й не дає білірубіну вільно дифундувати крізь мембрану, а активні центри можуть бути закриті іншими молекулами білірубіноксидази.

З наведено графіку можна побачити, що при використанні 15% БОкс спостерігаються найвищі відгуки на внесення модельного розчину білірубіна,

тому ця концентрація була обрана для подальшої роботи з оптимізації розробленого біосенсора.

3.2. Оцінка чутливості біосенсора до параметрів робочого розчину

Наступним етапом після визначення оптимальної композиції біоселективного елементу біосенсора була оптимізація робочого середовища, оскільки аналітичні характеристики біосенсора суттєво залежать від фізико-хімічних властивостей розчину, у якому проводяться вимірювання. Оптимізація включала в себе визначення впливу різних параметрів робочого розчину на результат біосенсорних вимірювань.

Першочерговим завданням стало дослідження впливу буферної ємності на роботу білірубіноксидазної біосенсорної системи. Буферна ємність безпосередньо впливає на здатність середовища підтримувати стабільне значення рН у приелектродному просторі під час перебігу ензиматичної реакції, що, у свою чергу, визначає лінійний та динамічний діапазони вимірювання, а також величину відгуку.

У ході експерименту було приготовано серію буферних розчинів HEPES (рН 7.4) із концентраціями 1 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 150 мМ та 200 мМ. Для оцінки результатів дослідження були отримані калібрувальні криві роботи біосенсора у кожному буферному розчині (рис 3.5). Кількість повторів для кожного експерименту становила 9 разів. На основі аналізу калібрувальних кривих, оптимальною буферною системою для роботи було обрано концентрацію 25 мМ HEPES. Саме за таких умов спостерігався найширший лінійний діапазон функціонування біосенсора та були отримані стабільно високі значення відгуку на білірубін.

З наведеного графіка видно, що при використанні низьких концентрацій буфера HEPES (1–5 мМ) спостерігалася висока чутливість біосенсора до білірубіну, а високі, концентрації HEPES (100–200 мМ) призводили до

зниження величини біосенсорного відгуку майже вдвічі.

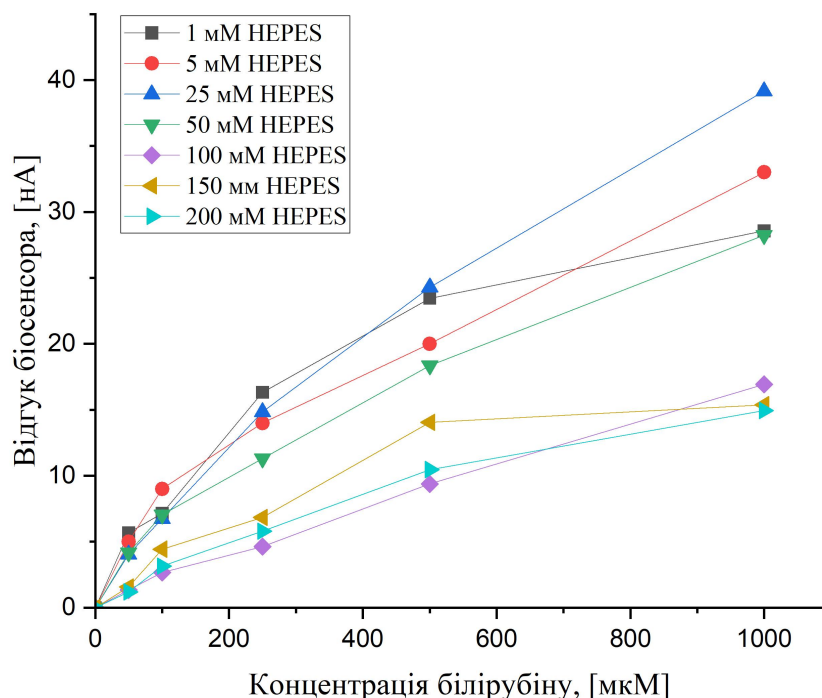


Рис. 3.5. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації білірубину

Попри гарну ефективність роботи біосенсорної системи за використання низьких концентрацій солей в буферах, такі умови не забезпечують належної відтворюваності результатів вимірювання, оскільки така ємність розчину є недостатньою для ефективної стабілізації рН робочого середовища при внесенні реальних зразків біологічних рідин для аналізу, які порушуючи рН системи можуть спотворювати відгук біосенсора.

Наступним етапом дослідження стала перевірка впливу іонної сили робочого розчину на величину біосенсорного відгуку (рис. 3.6). Кількість повторів для кожного експерименту становила 9 разів. Біологічні рідини, які є таргетними зразками даного біосенсора, часто можуть містити досить високі концентрації солей (у межах до 180 мМ), що можуть спотворювати результати вимірювання [58].

При концентраціях солі 10–40 мМ ефективність роботи білірубін-

чутливого біосенсора з додатковою *m*-ПФД-мембраною залишається високою, на що вказує незначне відсоткове зниження відгуку. Проте при концентраціях NaCl, вище 50 мМ, біосенсорний відгук падав майже на 50%, що можна пояснити погіршенням проникності мембрани на основі білірубіноксидази та зниженням дифузії до поверхні перетворювача.

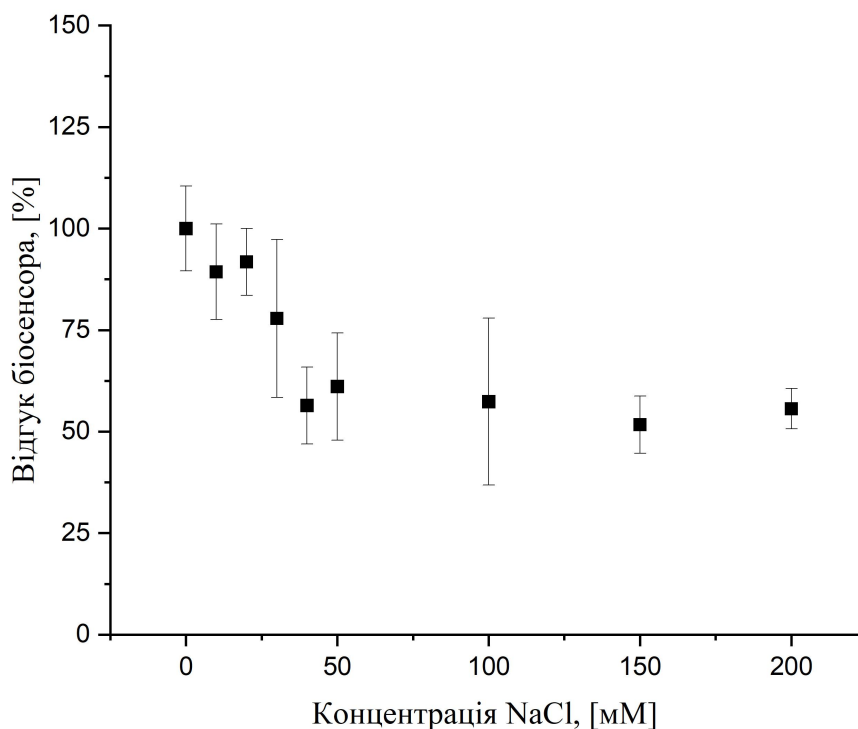


Рис. 3.6. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації NaCl. Концентрація білірубіну у вимірювальній комірці постійно становила 500 мкМ. Концентрації солі для експерименту становили 10-50 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ та безсольовий розчин

Незважаючи на це, суттєвої перепони в подальшій роботі з реальними зразками це не чинитиме, оскільки такий вплив буде скомпенсовано їх двадцятикратним розведенням перед вимірюванням, й кінцева концентрація солі у вимірювальній комірці становитиме $>8 \pm 1$ мМ. Відповідно наявність NaCl у таких концентраціях матиме мінімальний вплив на визначення концентрації білірубіну.

Окрім високої іонної сили реальні зразки біологічних рідин також можуть містити досить високі концентрації білків, зокрема альбумінів крові, які спотворюватимуть біосенсорний сигнал. Зважаючи на те, що стандартна концентрація білка в сироватці крові здорової людини становить 60-80 г/л [59], дослідження впливу БСА у цьому діапазоні є важливим для оцінки аналітичних характеристик біосенсора. Молекули протеїнів, неспецифічно адсорбуючись на поверхні перетворювача, перешкоджають вільній дифузії молекул білірубину до активних центрів БОкс, що в свою чергу може знижувати біосенсорний відгук, погіршувати стабільність роботи біосенсорної системи, а також впливати на відтворюваність результатів вимірювання.

З огляду на це, було перевірено вплив концентрації білка у вимірювальній комірці на величину відгука біосенсора. Аналіз проводився з концентраціями БСА 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% та 3% від загальної маси робочого розчину в вимірювальній комірці (рис. 3.7).

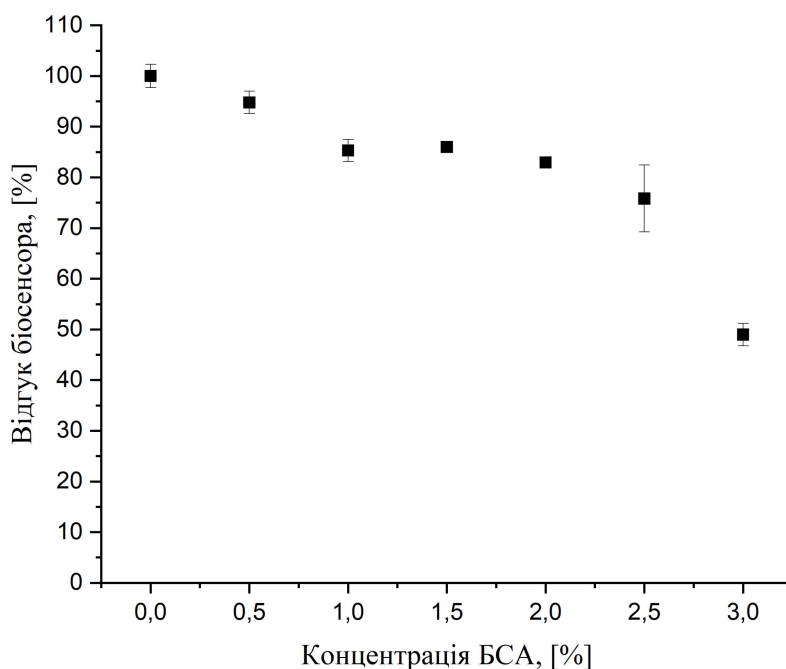


Рис. 3.7. Залежність величини відгука біосенсора від концентрації білка у вимірювальній комірці. Концентрація білірубину під час дослідження становила 500 мкМ

Проаналізувавши графіки, можна побачити, що високі концентрації білка, так само як і високі концентрації солі, пригнічують роботу біосенсорної системи, спричиняючи нижчі відгуки на аналіт.

Встановлено, що при концентрації БСА у межах 0–1,5% величина біосенсорного відгуку зменшується на 14%. При подальшому збільшенні вмісту білка до 2,5% та 3% спостерігається суттєве падіння сигналу відповідно до 76% та 50% від початкового значення. Проте враховуючи, що кінцеве розведення лабораторних зразків для клінічних вимірювань становитиме близько 20–25 разів, концентрація білка у пробі буде зменшена до 0,2–0,4%, тож вплив білка на результат вимірювання буде мінімальним й не погіршить ефективність роботи біосенсора.

3.3. Оцінка селективності білірубін-чутливого біосенсора

Ще одним фактором, який може вплинути на отримання результатів біосенсорного вимірювання, можуть стати сполуки, які потенційно присутні у реальних біологічних зразках. Такими інтерферентами для аналізу було обрано канонічні амінокислоти, а саме аланін, метіонін, триптофан, тирозин, цистеїн, валін, серин, фенілаланін, лейцин, ізолейцин, гістидин, лізин, аргінін, аспарагін, аспартат, глютамін, а також сечовину, креатинін, глюкозу, лимонну кислоту, α -кетоглутарат та аскорбінову кислоту в концентрації 100 мкМ. Дані були нормалізовані та представлені у відсотках, при цьому за 100% був прийнятий відгук на відповідну концентрацію білірубіну (рис. 3.8). Кількість повторів для експерименту становила 6 разів.

Результати вимірювання свідчать про невеликий вплив позитивно заряджених амінокислот на роботу білірубін-чутливої біосенсорної амперометричної системи – гістидину та аргініну, що при робочому потенціалі -0,15 В здатні до електрохімічного перетворення на поверхні перетворювача. Аргінін давав найбільший біосенсорний відгук, що

дорівнював близько 17% відгуку на білірубін, а вплив цистеїну склав близько 9% у порівнянні з внесенням білірубіну в такий же концентрації.

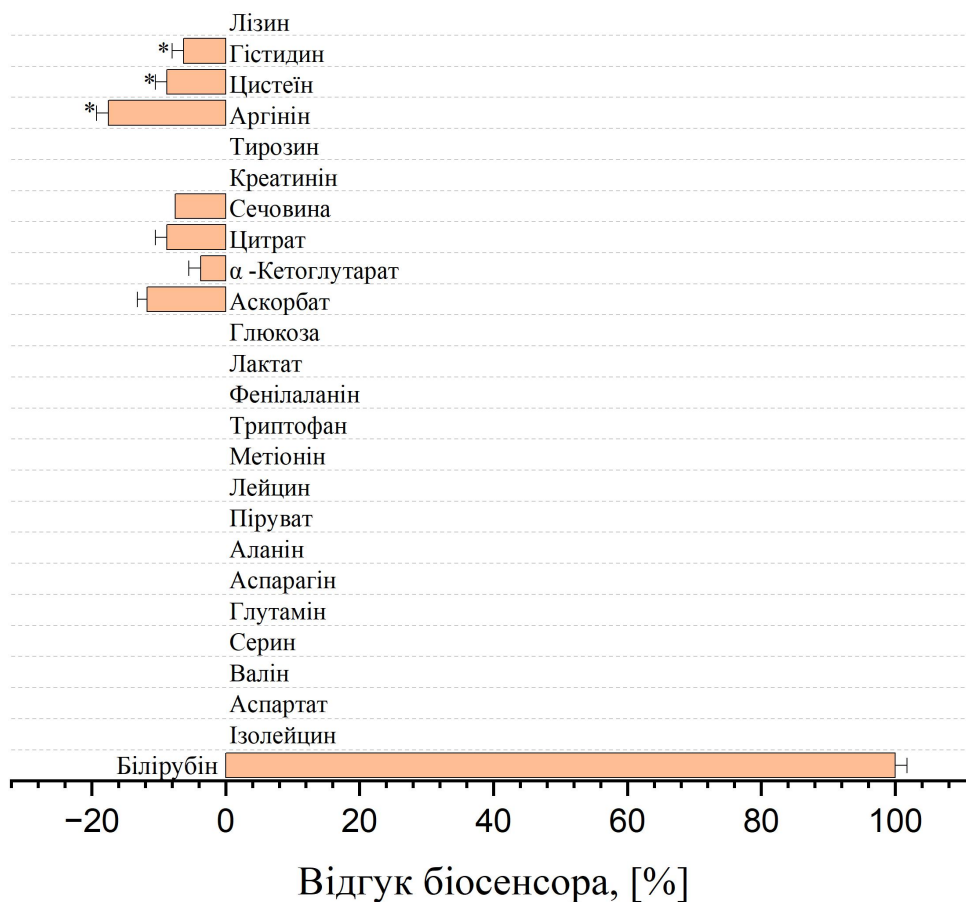


Рис. 3.8. Залежність відносної величини біосенсорного відгуку від концентрації інтерферентів. При вимірюваннях концентрація усіх речовин в комірці становила 100 мкМ

Крім того, наявність невеликого відгуку спостерігалася на такі речовини як сечовина, лимонна, аскорбінова та α-кетоглутарова кислоти, що можна пояснити малим розміром їхніх молекул, що дозволяє цим речовинам дифундувати крізь ензимний шар та селективну м-ПФД-мембрану і відновлюватись на робочій поверхні електрода.

Проте, враховуючи кінцеве розведення проби під час аналізу, а також відносно низький вміст наведених речовин у реальних біологічних рідинах, їхній сумарний вплив на результати вимірювання буде мінімальним.

3.4. Визначення стабільності біосенсорного відгука та відтворюваності іммобілізації біоселективного елементу біосенсора

Після перевірки параметрів розчину на роботу біосенсора, було досліджено стабільність його функціонування в умовах безперервної роботи упродовж дня. Для оцінки цього параметра було отримано 12 послідовних відгуків на внесення білірубіну у вимірювальну комірку в концентрації 100 мкМ. Експеримент тривав близько 1,5–2 хвилин з подальшим трьохразовим промиванням комірки робочим буфером впродовж 2 хвилин (рис. 3.9).

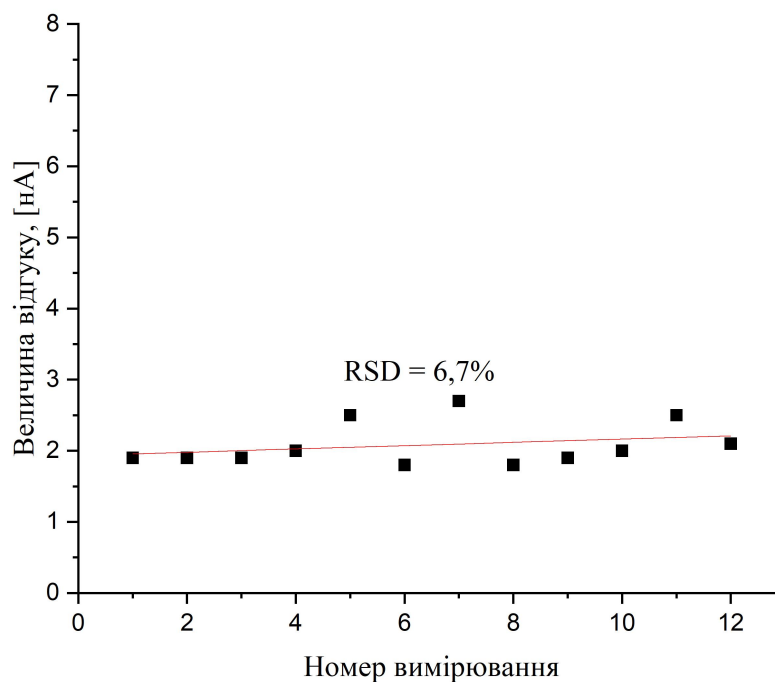


Рис. 3.9. Відтворюваність стабільності функціонування амперометричного біосенсора на основі БОкс. Концентрація білірубіну під час вимірювань становила 100 мкМ

Результати свідчать, що відносне середньоквадратичне відхилення (RSD) для серії вимірювань склало 6,7%. Відсутність суттєвого падіння

амперометричного відгуку свідчить про високу стабільність роботи біосенсора в модельних умовах, а несуттєве підвищення сигналу наприкінці дослідження пов'язано з безперервним промиванням амперометричного перетворювача в комірці, що звільняє активні центри БОкс для субстрату, які були заблоковані надлишком елементів іммобілізації під час перших вимірів. Також цей ефект можна пояснити незначним накопиченням продуктів реакції у мембрані при багаторазовому використанні.

Окрім того, було досліджено відтворюваність процедури приготування біоселективної мембрани на поверхні перетворювача для дослідження розробленого протоколу іммобілізації білірубіноксидази й перевірки стабільності каталітичної роботи ензиму (рис. 3.10).

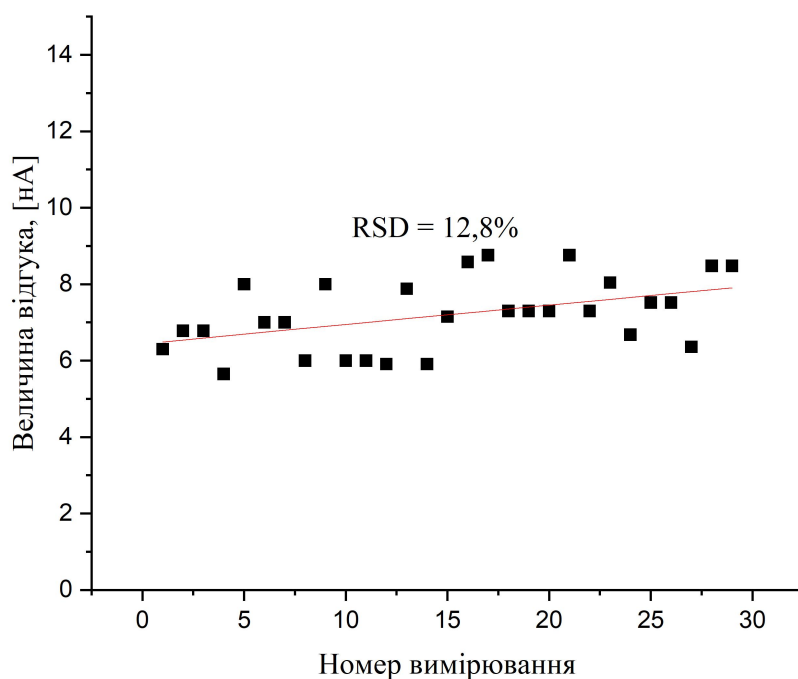


Рис. 3.10. Відтворюваність процесу іммобілізації біоселективного елементу на поверхні перетворювача. Концентрація білірубіну під час вимірювань становила 100 мкМ

Наявність відтворюваних аналітичних характеристик біосенсора

дозволяє використовувати його для серійних вимірювань концентрації білірубину в реальних зразках та модельних розчинах з високою точністю. Відтворювана процедура іммобілізації дозволяє використовувати єдиний калібрувальний графік для однієї партії біосенсорів й відповідно зменшити витрати часу на тестування кожного нового електрода перед вимірюванням зразків. На основі аналізу 30 незалежних іммобілізацій встановлено, що відносне середньоквадратичне відхилення (RSD) між ними складає 12,8%. Отримане значення свідчить про високу стабільність процедури приготування запропонованого біосенсора при ручному нанесенні мембран та можливість впровадження масового виробництва білірубін-чутливих біосенсорних систем.

3.5. Аналітичні характеристики розробленого біосенсора

Завершальним етапом дослідження стало визначення основних аналітичних характеристик оптимізованого біосенсора на основі БОкс для оцінки можливості його практичного застосування при аналізі вмісту білірубину в сироватці крові. На основі отриманих амперометричних відгуків та побудованих калібрувальних кривих було розраховано ключові параметри розробленої біосенсорної системи (табл. 3. 1).

Було встановлено, що лінійний діапазон розробленого та оптимізованого біосенсора з додатковою напівпроникною м-ПФД-мембраною, становить 7,5–1000 мкМ. Враховуючи вміст аналіту в сироватці крові та розведення проби у вимірювальній комірці, такий робочий діапазон є достатнім для практичного застосування білірубін-чутливої біосенсорної системи.

Межа виявлення, розрахована за трикратним перевищенням рівня фонового шуму ($S/N=3$), склала 7,5 мкМ. Чутливість розробленого біосенсору становить $45 \pm 5,2$ нА/мМ. Тривалість біосенсорного відгуку

складає 1,5-2 хв, а загальний час одного аналізу 7-10 хв.

Таблиця 3.1

**Аналітичні характеристики розробленого біосенсора на основі
білірубіноксидази**

Характеристика	Значення
Лінійний діапазон	7,5–1500 мкМ
Динамічний діапазон	7,5–2500 мкМ
Мінімальна межа визначення	7,5 мкМ
Чутливість	45 нА/мМ ± 5,2 нА/мМ
Шум базової лінії	0,2–0,3 нА
Час отримання відгуку	1,5–2 хв
Загальний час аналізу	7–10 хв
RSD (на 100 мкМ білірубіну)	6,7%

Отримані результати підтверджують можливість ефективного використання розробленої системи для клінічного аналізу білірубіну в біологічних рідинах.

ВИСНОВКИ

Таким чином, було розроблено та оптимізовано амперометричну біосенсорну систему на основі іммобілізованої білірубіноксидази з використанням додаткової напівпроникної мета-поліфенілендіамінової мембрани для визначення концентрації білірубіну в модельних розчинах та реальних біологічних зразках. Запропонований біосенсор є перспективним інструментом для клінічної діагностики та експрес-моніторингу патологічних станів, що дозволяє проводити швидкий аналіз біологічних рідин у межах біохімічних досліджень.

1. Підібрано оптимальні параметри функціонування біоселективного елементу у складі біосенсора, а також оптимальний робочий потенціал, що забезпечував максимально можливу чутливість розробленої біосенсорної системи для визначення білірубіну.
2. Встановлено, що високі концентрації солі та білка знижують біосенсорний відгук, проте кінцеве розведення реального зразку в вимірювальній комірці нівелюватиме цей вплив на результат аналізу.
3. Виявлено, що оптимальною буферною системою є 25 мМ HEPES, при використанні якого спостерігався найширший лінійний діапазон функціонування з усіх проаналізованих варіантів, а чутливість біосенсора знаходилась на найвищому рівні.
4. Показано, що розроблений біосенсор є практично нечутливим до речовин-інтерферентів, які теоретично можуть бути присутні в реальних зразках.
5. Оцінено стабільність біосенсорного відгука при безперервному використанні системи упродовж дня та стабільність приготування біоселективного елементу біосенсора й показано що біосенсорна система характеризується гарною відтворюваністю результатів ($RSD = 6,7\%$).
6. Продемонстровано, що оптимізована біосенсорна система має широкий

лінійній діапазон (7,5–1000 мкМ), низьку границю визначення білірубіну (7,5 мкМ) та швидкий час аналізу (1,5–2 хв), що робить її придатною для клінічного тестування біологічних зразків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lino, C., Barrias, S., Chaves, R., Adegas, F., Martins-Lopes, P. and Fernandes, J. (2022). Biosensors as diagnostic tools in clinical applications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, [online] Volume 1877(3) p. 188726. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188726> [Accessed 31 Mar. 2022].
2. Cepelak, I., Dodig, S. and Pavic, I. (2025). Bilirubin – new insights into an old molecule. *Biochemia medica*, [online] Volume 35(2), p. 020501. Available at: <https://doi.org/10.11613/BM.2025.020501> [Accessed 15 Jun. 2025].
3. Nocentini, A., Bonardi, A., Pratesi, S., Gratterer, P., Dani, C. and Supuran, C. (2022). Pharmaceutical strategies for preventing toxicity and promoting antioxidant and anti-inflammatory actions of bilirubin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), pp. 487–501.
4. Rawal, R., Kharangarh, P., Dawra, S., Tomar, M., Gupta, V. and Pundir, C. (2020). A comprehensive review of bilirubin determination methods with special emphasis on biosensors. *Process Biochemistry*, 89, pp. 165–174.
5. Anzar, N., Suleman, S., Kumar, R., Rawal, R., Pundir, C., Pilloton, R. and Narang, J. (2022). Electrochemical Sensor for Bilirubin Detection Using Paper-Based Screen-Printed Electrodes Functionalized with Silver Nanoparticles. *Micromachines*, [online] Volume 13(11), p. 1845. Available at: <https://doi.org/10.3390/mi13111845> [Accessed 28 Oct. 2022].
6. Batra, B., Malik, N. and Pundir, C. (2015). Covalent Immobilization of *Myrothecium verrucaria* Bilirubin Oxidase onto Polypyrrole Nanoparticles and Polyaniline Composite Film for Amperometric Detection of Serum Bilirubin. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(7), pp. 875–888.
7. Bell, J., Mousavi, M., Rahman, M., Tan, E., Homer-Vanniasinkam, S. and

- Whitesides, G. (2019). Paper-based potentiometric sensing of free bilirubin in blood serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, pp. 115–121.
8. Sheetal, A., Malik, N., Kumar, P. and Rana, R. (2023). Potentiometric sensor for estimation of free bilirubin in blood serum using ion selective membrane. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 12(10), pp. 523-534.
 9. Yang, Z., Yan, J. and Zhang, C. (2012). Piezoelectric detection of bilirubin based on bilirubin-imprinted titania film electrode. *Analytical Biochemistry*, 421(1), pp. 37–42.
 10. Narang, J. (2015). A Third Generation Bilirubin Sensor Development By Using Gold Nanomaterial As An Immobilization Matrix For Signal Amplification. *Advanced Materials Letters*, 6(11), pp. 1012–1017.
 11. Thangavel, B., Venkatachalam, G. and Shin, J. (2024). Emerging Trends of Bilirubin Oxidases at the Bioelectrochemical Interface: Paving the Way for Self-Powered Electrochemical Devices and Biosensors. *ACS Applied Bio Materials*, 7(3), pp. 1381–1399.
 12. Dehghani, H., Khoramnejadian, S., Mahboubi, M., Sasani, M., Ghobadzadeh, S., Haghighi, S. and Negahdary, M. (2016). Bilirubin Biosensing by Using of Catalase and ZnS Nanoparticles as Modifier. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(3), pp. 2029–2045.
 13. Rahman, M., Lee, K., Park, D., Won, M. and Shim, Y. (2008). An amperometric bilirubin biosensor based on a conductive poly-terthiophene–Mn(II) complex. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(6), pp. 857–864.
 14. Mano, N. and Edembe, L. (2013). Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, pp. 478485.
 15. Wang, J. and Ozsoz, M. (1990). A polishable amperometric biosensor for bilirubin. *Electroanalysis*, 2(8), pp. 647–650.
 16. Anzar, N., Suleman, S., Kumar, R., Rawal, R., Pundir, C., Pilloton, R. and Narang, J. (2022). Electrochemical Sensor for Bilirubin Detection Using Paper-Based Screen-Printed Electrodes Functionalized with Silver

Nanoparticles. *Micromachines*, [online] Volume 13(11), p. 1845. Available at: <https://doi.org/10.3390/mi13111845> [Accessed 28 Oct. 2022].

17. Santhosh, M., Chinnadayala, S., Singh, N. and Goswami, P. (2016). Human serum albumin-stabilized gold nanoclusters act as an electron transfer bridge supporting specific electrocatalysis of bilirubin useful for biosensing applications. *Bioelectrochemistry*, 111, pp. 7–14.
18. Feng, Q., Du, Y., Zhang, C., Zheng, Z., Hu, F., Wang, Z. and Wang, C. (2013). Synthesis of the multi-walled carbon nanotubes-COOH/graphene/gold nanoparticles nanocomposite for simple determination of Bilirubin in human blood serum. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185, pp. 337–344.
19. Ahmed, N., Hsu, C., Mahmoud, Z., Sayadi, H. and Kianfar, E. (2023). A graphene oxide/polyaniline nanocomposite biosensor: synthesis, characterization, and electrochemical detection of bilirubin. *RSC Advances*, 13(51), pp. 36280–36292.
20. Chauhan, N., Rawal, R., Hooda, V. and Jain, U. (2016). Electrochemical biosensor with graphene oxide nanoparticles and polypyrrole interface for the detection of bilirubin. *RSC Advances*, 6(68), pp. 63624–63633.
21. Batra, B., Lata, S., Sunny, S., Rana, J. and Pundir, C. (2013). Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film. *Biosensors and Bioelectronics*, 44, pp. 64–69.
22. Ngashangva L., Bachu V. and Goswami P. (2019). Development of new methods for determination of bilirubin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, pp. 272–285.
23. De Silva, A., Nuwanshika, N., Niriella, M. and de Silva, H. (2025). Gilbert's syndrome: The good, the bad and the ugly. *World Journal of Hepatology*, [online] Volume 17(2) p. 98503. Available at: <https://doi.org/10.4254/wjh.v17.i2.98503> [Accessed 27 Feb. 2025].
24. Hegyi, T. and Kleinfeld, A. (2022). Neonatal hyperbilirubinemia and the role of unbound bilirubin. *The journal of maternal-fetal and neonatal medicine*,

- 35(25), pp. 9201–9207.
25. Vitek, L. and Tiribelli, C. (2023). Gilbert's syndrome revisited. *Journal of Hepatology*, 79(4), pp. 1049–1055.
 26. Adin, C. (2021). Bilirubin as a Therapeutic Molecule: Challenges and Opportunities. *Antioxidants*, [online] Volume 10(10), p. 1536. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox10101536> [Accessed 28 Sep. 2021].
 27. Sambati, V., Laudisio, S., Motta, M. and Esposito, S. (2024). Therapeutic Options for Crigler–Najjar Syndrome: A Scoping Review. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 25(20), p. 11006. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms252011006> [Accessed 13 Oct. 2024].
 28. Kwon, J., Nietert, P. and Rockey, D. (2023). Hyperbilirubinemia in hospitalized patients: Etiology and outcomes. *Journal of Investigative Medicine*, 71(7), pp. 773–781.
 29. Morais, M. and Machado, M. (2022). Benign inheritable disorders of bilirubin metabolism manifested by conjugated hyperbilirubinemia—A narrative review. *United European Gastroenterology Journal*, [online] Available at: <https://doi.org/10.1002/ueg2.12279> [Accessed 20 Jul. 2022].
 30. Aronson, S., Ronzitti, G. and Bosma, P. (2023). What's next in gene therapy for Crigler-Najjar syndrome?. *Expert opinion on biological therapy*, 23(2), pp. 119–121.
 31. Mannan, J. and Assad, M. (2026). Treatment of Neonatal Unconjugated Hyperbilirubinemia: A Brief Review. *Academic Journal of Pediatrics and Neonatology*, [online] Volume 16(1) p. 555981. Available at: <https://doi.org/10.19080/ajpn.2026.16.555981> [Accessed 6 Jan. 2026].
 32. Amin, S., Saluja, S. and Kler, N. (2023). Unbound Bilirubin and Acute Bilirubin Encephalopathy in Infants Born Late Preterm and Term with Significant Hyperbilirubinemia. *The Journal of Pediatrics*, [online] Volume 266, p. 113880. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2023.113880> [Accessed 20 Dec. 2023].
 33. Cheng, T., Tsui, T., Kwok, J., Lit, L., Wong, E., Kam, R., Grote-Koska, D.,

- Staaden, A., Okada, H., Fuke, N., Wong, R., Li, C. and Chan, M. (2020). Comprehensive characterization and resolution of discrepant spectrophotometric bilirubin results in patients on eltrombopag therapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(10), pp. 1713-1723.
34. Zucchini, L., Coda Zabetta, C., Ajčević, M. and Accardo, A. (2024). A Method for Compensating Hemoglobin Interference in Total Serum Bilirubin Measurement Using a Simple Two-Wavelength Reflectance Photometer. *Sensors*, [online] Volume 24(20), p. 6749. Available at: <https://doi.org/10.3390/s24206749> [Accessed 20 Oct. 2024].
 35. Guirguis, N., Bertrand, A., Rose, C. and Matoori, S. (2023). 175 Years of Bilirubin Testing: Ready for Point-of-Care?. *Advanced Healthcare Materials*, [online] Volume 12(18), p. e2203380. Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.202203380> [Accessed 10 Apr. 2023].
 36. Santhosh, M., Chinnadayala, S., Kakoti, A. and Goswami, P. (2014). Selective and sensitive detection of free bilirubin in blood serum using human serum albumin stabilized gold nanoclusters as fluorometric and colorimetric probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 59, pp. 370–376.
 37. Yang, W., Xia, J., Zhou, G., Jiang, D. and Li, Q. (2018). Sensitive detection of free bilirubin in blood serum using β -diketone modified europium-doped yttrium oxide nanosheets as a luminescent sensor. *RSC Advances*, 8(32), pp. 17854–17859.
 38. Yeung, C., Fung, Y. and Sun, D. (2001). Capillary electrophoresis for the determination of albumin binding capacity and free bilirubin in jaundiced neonates. *Seminars in Perinatology*, 25(2), pp. 50–54.
 39. Crivellente, F., Bocchini, N., Vandin, L. and Cristofori, P. (2009). Capillary electrophoresis for the detection of bilirubin in rat serum. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(3), pp. 326–331.
 40. Martelanc, M., Žibera, L., Passamonti, S. and Franko, M. (2016). Application of high-performance liquid chromatography combined with ultra-

- sensitive thermal lens spectrometric detection for simultaneous biliverdin and bilirubin assessment at trace levels in human serum. *Talanta*, 154, pp. 92–98.
41. Kuntoji, G., Kousar, N., Gaddimath, S. and Koodlur Sannegowda, L. (2024). Macromolecule–Nanoparticle-Based Hybrid Materials for Biosensor Applications. *Biosensors*, [online] Volume 14(6), p. 277. Available at: <https://doi.org/10.3390/bios14060277> [Accessed 28 May 2024].
 42. Vasconcelos, H., Coelho, L., Matias, A., Saraiva, C., Jorge, P. and de Almeida, J. (2021). Biosensors for Biogenic Amines: A Review. *Biosensors*, [online] Volume 11(3), p. 82. Available at: <https://doi.org/10.3390/bios11030082> [Accessed 13 Mar. 2021].
 43. Hassan, R. (2022). Advances in Electrochemical Nano-Biosensors for Biomedical and Environmental Applications: From Current Work to Future Perspectives. *Sensors*, [online] Volume 22(19) p. 7539. Available at: <https://doi.org/10.3390/s22197539> [Accessed 5 Oct. 2022].
 44. Kim, J., Campbell, A., de Ávila, B. and Wang, J. (2019). Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nature Biotechnology*, 37(4), pp. 389-406.
 45. Bollella, P. (2022). Enzyme-based amperometric biosensors: 60 years later ... Quo Vadis? *Analytica Chimica Acta*, [online] Volume 1234, p. 340517. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340517> [Accessed 14 Oct. 2022].
 46. Schachinger, F., Chang, H., Scheiblbrandner, S. and Ludwig, R. (2021). Amperometric Biosensors Based on Direct Electron Transfer Enzymes. *Molecules*, [online] Volume 26(15), p. 4525. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26154525> [Accessed 27 Jul. 2021].
 47. Thévenot, D., Toth, K., Durst, R. and Wilson, G. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and bioelectronics*, 16(1–2), pp. 121–131.
 48. Lenar, N. and Paczosa-Bator, B. (2025). Small-Molecule Detection in Biological Fluids: The Emerging Role of Potentiometric Biosensors. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 26(23)

- p. 11604. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms262311604> [Accessed 29 Nov. 2025].
49. Saiapina, O., Berketa, K., Sverstiuk, A., Fayura, L., Sibirny, A., Dzyadevych, S. and Soldatkin, O. (2024). Adaptation of Conductometric Monoenzyme Biosensor for Rapid Quantitative Analysis of L-arginine in Dietary Supplements. *Sensors*, [online] Volume 24(14), p. 4672. Available at: <https://doi.org/10.3390/s24144672> [Accessed 18 Jul. 2024].
 50. Verma, A., Arqam, M. and Fraiwan, A. (2025). Advances in Impedimetric Biosensors: Current Applications and Future Directions. *Micromachines*, [online] Volume 16(11), p. 1244. Available at: <https://doi.org/10.3390/mi16111244> [Accessed 31 Oct. 2025].
 51. Akter, M., Tokiwa, T., Shoji, M., Nishikawa, K., Shigeta, Y., Sakurai, T., Higuchi, Y., Kataoka, K. and Shibata, N. (2018). Redox Potential-Dependent Formation of an Unusual His-Trp Bond in Bilirubin Oxidase. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 24(68), pp. 18052- 18058.
 52. Bashir, N., Sood, M. and Bandral, J. (2020). Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), pp. 254–261.
 53. Lee, C., Jang, S. and Chung, H. (2017). Improving the Stability of Cold-Adapted Enzymes by Immobilization. *Catalysts*, [online] Volume 7(12), p. 112. Available at: <https://doi.org/10.3390/catal7040112> [Accessed 12 Apr. 2026].
 54. Guisan, J., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martin, J. and Moreno-Gamero, D. (2022). Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, [online] Volume 35, p. 100593. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100593> [Accessed 18 Jun. 2022].
 55. Bié, J., Sepodes, B., Fernandes, P. and Ribeiro, M. (2022). Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications. *Processes*, [online] Volume 10(3), p. 494. Available at:

<https://doi.org/10.3390/pr10030494> [Accessed 1 Mar. 2022].

56. Maghraby, Y., El-Shabasy, R., Ibrahim, A. and Azzazy, H. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 8(6), pp. 5184–5196.
57. Thongkhao, P., Numnuam, A., Khongkow, P., Sangkhathat, S. and Phairatana, T. (2024). Disposable polyaniline/m-phenylenediamine-based electrochemical lactate biosensor for early sepsis diagnosis. *Polymers*, [online] Volume 16 (4), p. 473. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym16040473> [Accessed 8 Feb. 2024].
58. Schwarze, T., Müller, H., Ast, S., Steinbrück, D., Eidner, S., Geißler, F., Kumke, M. and Holdt, H. (2014). Fluorescence lifetime-based sensing of sodium by an optode. *Chem. Commun*, 50(91), pp. 14167–14170.
59. Duvall, L., Shipman, A. and Shipman, K. (2023). Investigative algorithms for disorders affecting plasma proteins with a focus on albumin and the calculated globulin fraction: a narrative review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, [online] Volume 8, p. 19. Available at: <https://doi.org/10.21037/jlpm-23-15> [Accessed 30 Jul. 2023].