

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри нанофізики конденсованих середовищ

проф. Валерій Антонович Скришевський

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 20__ р.

**РОЗРОБКА БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
АКТИВНОСТІ АЛТ ТА АСТ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності

105 Прикладна фізика та наноматеріали

ОП «Прикладна фізика та наноматеріали»

Мруги Дарини Олександрівни

Науковий керівник

к. б. н. Солдаткін Олександр Олексійович

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Мруга Д.О. Розробка біосенсорної системи для визначення активності АЛТ та АСТ. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 105 Прикладна фізика та наноматеріали ОП «Прикладна фізика та наноматеріали».

Ця робота присвячена розробці біосенсорної системи для визначення активності АЛТ та АСТ. Перед початком роботи був проведений аналіз відповідної літератури для підтвердження актуальності даної теми та встановлення конкретних задач. По результатам аналізу літератури було обрано амперометричний підхід до детекції ензимів. В якості електрохімічного датчика було використано платиновий дисковий електрод. Біоселективний елемент на поверхні датчика формувався шляхом висушування краплі на повітрі. Імобілізація здійснювалась методом ковалентного зшивання ГлОкс та БСА за допомогою глутарового альдегіду. Оптимізація даного процесу описана в бакалаврській кваліфікаційній роботі.

В даній роботі було змодельовано універсальний метод для вимірювання активності АЛТ та АСТ з використанням розробленого біосенсора. Для максимальної чутливості було обрано оптимальні концентрації субстратів АЛТ (α -кетоглутарат та аланін). Також була обґрунтована необхідність коферменту ПФ та підібрана його оптимальна концентрація. Після оптимізації було досліджено аналітичні характеристики розробленого біосенсора, а саме, чутливість, лінійний діапазон, мінімальна межа визначення, час вимірювання, тривалість аналізу, стабільність і т.д. Також була досліджена селективність розробленого біосенсора до різних типів речовин, наприклад, електроактивні молекули, амінокислоти, іони. Показана принципова можливість використання цього біосенсора для вимірювання вмісту АЛТ в реальних зразках шляхом моделювання хімічного складу сироватки. Було перевірено можливість проведення вимірювання активності АСТ даним сенсором та перевірена його селективність до однієї трансамінази, в присутності іншої. Проаналізувавши особливості його

роботи, було визначено, що, для одночасного вимірювання АСТ і АЛТ, необхідно модифікувати даний сенсор у двоферменту систему. Таким чином, даний лабораторний прототип може слугувати базисом для розробки комерційного біосенсора для детекції АЛТ в біологічних рідинах.

В ході проведення досліджень було видано декілька тез, 2 статті [^{1,2}] та патент на корисну модель.

Ключові слова: амперометрія, біосенсори, іммобілізований фермент, глутамат оксидаза, аланінамінотрансфераза, вимірювання активності аланінамінотрансферази, печінкові ферменти

ЗМІСТ

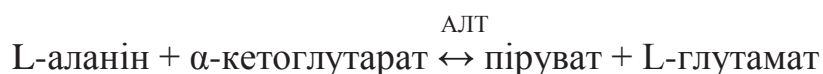
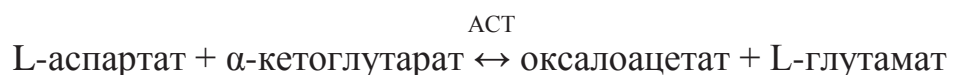
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1 1.1 ІНФОРМАЦІЙНЕ НАВАНТАЖЕННІ РІВНЯ АКТИВНОСТІ ТРАНСАМІНАЗ В КРОВІ.....	9
2 1.2 ТРАДИЦІЙНІ МЕТОДИ ДЕТЕКЦІЇ.....	11
<i>Хроматографія</i>	<i>11</i>
<i>Спектрофотометрія та колориметрія</i>	<i>12</i>
<i>Хемолюмінесценція.....</i>	<i>14</i>
<i>Флуорисценція та УФ-абсорбція</i>	<i>15</i>
<i>Радіохімічний аналіз.....</i>	<i>16</i>
<i>Імунофлуорисцентний аналіз.....</i>	<i>17</i>
<i>Електрохімічні методи та біосенсиори</i>	<i>17</i>
3 1.3 ПІДСУМКИ ОГЛЯДУ ЛІТЕРАТУРИ	23
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	25
3.1 МАТЕРІАЛИ	25
3.2 КОНСТРУКЦІЯ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ПЕРЕТВОРЮВАЧА ТА СХЕМА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ УСТАНОВКИ	25
3.3 МЕТОДИКА НАНЕСЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНОЇ МЕМБРАНИ... ..	26
3.4 МЕТОДИКА ВИМІРЮВАННЯ ВМІСТУ АЛТ	27
4 РЕЗУЛЬТАТИ	28
4.1 ПРИНЦИП РОБОТИ БІОСЕНСОРА	28
4.2 ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ РЕАГЕНТІВ	30
4.3 ВПЛИВ АСТ НА РОБОТУ БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ АЛТ	34
4.4 ВИВЧЕННЯ СЕЛЕКТИВНОСТІ БІОСЕНСОРА	36

4.5 АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛТ	38
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	43

ВСТУП

В процесі існування організм людини щодня здійснює мільйони катаболічно-анаболічних хімічних перетворень, з метою накопичення насичених високоенергетичними зв'язками молекул (енергетична функція – АТФ, НАДФ, ліпіди, глюкоза) або забезпечення функціональних потреб, зокрема каталітичних (ензими, коферменти), регуляторних (месенджери, гормони, рецептори), структурних (складові мембран, органел, міжклітинного простору – тубулін, актин, фосфоліпіди, глюкозаміни), транспортних (білки-транспортери, пороутворюючі та інші трансмембранні білки), захисних (фізичні бар'єри, антитіла, цитотоксини). Одним із процесів метаболізму є реакція трансамінації, яка реалізує перенесення аміногрупи між двома молекулами різного класу (амінокислота та α -кетокислота). Для кожної комбінації субстрати-продукти існують свої ензими-каталізатори.

В даній роботі розглядаються дві важливі трансамінази – АЛТ (аланінамінотрансфераза або глутамат-піруват трансаміназа) та АСТ (аспартатамінотрансфераза або глутамат-оксалоацетат трансаміназа). Вони є органоспецифічними внутрішньоклітинними цитоплазматичними ферментами, що каталізують оборотні перетворення:



Цей процес відіграє надзвичайно важливу роль в метаболізмі, бо є першим етапом катаболізму амінокислот та остаточним етапом синтезу замінних амінокислот та відповідних α -кетокислот. Трансамінування призводить до перерозподілу амінного Нітрогену в організмі, що дозволяє певною мірою контролювати вмісту аміаку. Аміак постійно синтезується в тканинах організму в ході дезамінування органічних речовин, при розпаді пуринових та піримідинових основ, в ході катаболізму біогенних амінів та в результаті життєдіяльності бактерій товстого кишківника [3], при цьому він володіє

токсичною дією (наприклад, високий вміст аміаку порушує трансмембранний перенос іонів Na^+ та K^+ або підвищує синтез глутамату та глутаміну, накопичення яких призводить до росту осмотичного тиску та спричиняє набряк мозку)[⁴]. Крім того, один із субстратів АСТ (а саме аспартат) бере участь в орнітиновому циклі печінки, в ході якого Нітроген (амінокислотного походження) перетворюється на сечовину [⁵].

Також субстрати АЛТ і АСТ є частиною циклу трикарбонових кислот (α -КГ, оксалоацетат) та малат-аспартатної човникової системи, яка транспортує цитоплазматичний водень у внутрішній простір мітохондрії шляхом перетворення оксалоацетат-малат-оксалоацетат-аспартат [⁶] (α -КГ та глутамат також беруть в ньому участь, але в якості супутніх субстратів). Варто зазначити, що піруват і оксалоацетат є попередниками глюкози, тому вони відіграють роль і в енергетичному забезпеченні організму.

Глутамат має регуляторні функції: він є збуджуючим нейротрансмітером, попередником інгібуючого нейротрансмітера γ -аміномасляної кислоти, бере участь в локальній регуляції кісткових клітин [⁷] та регуляції вмісту катіонів (Na^+ в серці, скелетних м'язах, нирках; K^+ в серці, нирках, печінці [⁸]; глутамат-чутливі рецептори стимулюють вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулула [⁹] [¹⁰], впливає на ріст ракових [^{11,12}] та епітеліальних клітин [¹³].

Аспартат також має регуляторні функції – він стимулює NMDA-рецептори [¹⁴] та є необхідним при синтезі пуринів та піримідинів, відповідно, пов'язаний з проліферацією клітини, подвоєнням та трансляцією ДНК [¹⁵]. Аспартат лімітує ріст ракових новоутворень [¹⁶] та є критично важливим для росту лейкозних клітин [¹⁷].

Оскільки АСТ і АЛТ є органоспецифічними ферментами, то їх вміст в крові незначний та сталий (в сироватці крові дорослої людини в нормі концентрація АСТ не сягає більше 40 од.акт./л та 35 од.акт./л АЛТ [¹⁸]), що дозволяє використовувати цей параметр для діагностики захворювань органів-депо. АСТ міститься в основному в печінці та клітинах серця, проте

наявні також в еритроцитах, скелетній мускулатурі, підшлунковій та нирках. АЛТ наявний майже виключно в печінці. При пошкодженні цих органів вміст АЛТ і АСТ в крові зростає в десятки, а то і сотні разів, відповідно, це дозволяє моніторити стан міокарда та печінки. Наприклад, вміст АЛТ і АСТ в крові вважається біомаркером таких хвороб як інфаркт міокарда, гепатити, цироз, отруєння хлорорганічними сполуками та ін. Перелічені хвороби можуть мати фатальні наслідки, тому зрозуміло, що наявність швидкого і точного тесту для визначення вмісту цих ферментів у крові на сьогодні є доволі злободенним питанням.

Традиційні методи детекції АЛТ і АСТ мають ряд недоліків (делікатне, масивне і дороговартісне обладнання, яке потребує специфічних навичок для роботи, довготривалий аналіз та складна попередня підготовка зразку), тому зараз доволі актуальною є розробка нових методів детекції, зокрема біосенсиори та біосенсорні системи, що дозволяють створити портативний, автоматизований та недорогий пристрій.

Саме тому метою даної роботи була розробка біосенсорної системи для визначення АЛТ і АСТ.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1 1.1 Інформаційне навантаженні рівня активності трансаміназ в крові

В разі пошкодження будь-якого органу в міжклітинний матрикс вивільняється цитоплазматичний та внутрішньоорганелний ій вміст органел, що спричиняє зміну його якісного та кількісного складу. Зміна складу міжклітинного складу в свою чергу веде до змін в складі крові. Така залежність дозволяє використовувати органоспецифічні білки в якості маркерів пошкодження цих органів. Зокрема, АЛТ і АСТ є біомаркерами захворювань міокарда та печінки. Для оцінки концентрації ензимів в крові застосовується така одиниця вимірювання як одиниці активності на літр, яка виражає кількість ферменту, що необхідна для перетворення одного молю субстрату за одну хвилину. Оскільки ефективність роботи ензиму сильно змінюється залежно від умов навколишнього середовища, то цей параметр не є сталим, тобто кількість молекул ензиму змінюється, залежно від умов.

В клінічній медицині для діагностичних цілей застосовуються абсолютне значення рівня активності АЛТ і АСТ, співвідношення активностей АСТ і АЛТ (або коефіцієнт де Рітиса, який в нормі становить біля 1,33), періодичність та тривалість зміни їх концентрації та порівняння з концентраціями інших речовин в крові. Базуючись на цих даних лікарі в змозі оцінити ступінь пошкодження органу, а в деяких випадках навіть причину патології. Наприклад, через 4 години після серцевого нападу, що перетворився на інфаркт міокарда, в крові пацієнта починає зростати рівень АСТ (у 6-8 разів відносно норми) та АЛТ (у 1,5-2 рази) [19]. В поєднанні з ростом активності креатинінфосфокінази (в 3-4 рази), лактатдегідрогенази (у 5-9 разів) та лабораторним спостереженням (максимальний вміст АСТ припадає на 3 добу; АЛТ - через 24 години, креатинінкіназа - через 2 доби, а

лактатдегідрогеназа - на 5-7 добу) спостерігається доволі характерне поєднання клінічних показників.

АСТ і АЛТ також слугують лабораторними маркерами розвитку гепатитів різних типів, в тому числі вірусних та безсимптомних. Для прикладу, при гепатиті В вміст АСТ в сироватці крові підвищений більше ніж в 2 рази порівняно з нормою, АЛТ — в 3, а коефіцієнт де Рітіса становив близько 1,56. Гепатит С індукує більш істотне підвищення вмісту внутрішньопечінкових ферментів в кров'яному руслі: АСТ — майже в 3 рази, АЛТ — в 4,5, обернений коефіцієнт де Рітіса — 1,94 [20]. Гострий вірусний гепатит спричиняє короткочасний ріст рівня АСТ в 5-10 разів та тривале підвищення рівня АЛТ в 10 з повільним зниженням концентрації. При алкогольному гепатиті обидві трансферази зростають в 5-10 разів, але їх співвідношення між собою наближається до 2 [21].

Порівнявши показники при пошкодженні різних органів можна спостерігати наступне: при ішемічному інсульті та при токсикологічному пошкодженні печінки рівень АСТ в обох випадках зростає однаково — приблизно в 10 разів, а АЛТ по-різному — в 50 разів при інсульті та в 10 при отруєнні.

Ішемічний інсульт [22], ішемічна хвороба серця, цироз, жирова інфільтрація [23] та рак [24,25] печінки, хронічний гепатит, жовтяниця, серцева та печінкова недостатність, діабет, пародонтоз [26], дерматоміозит, м'язова дистрофія Дюшенна [27], рак легенів [28], прекампусія [29], метаболічний синдром [30,31] — ці та деякі інші хвороби супроводжуються підвищенням концентрації АСТ і АЛТ в крові. Крім того, рівні печінкових ферментів в крові також застосовується для прогностичних цілей [32,33].

Тому зрозуміло, що медична галузь потребує прилади різного призначення - високочутливі методики для лабораторної діагностики, швидкі та надійні експрес-аналізи та прості масові домашні тести для певної групи населення, що потребує моніторингу печінкових ферментів. З моменту виявлення показовості рівня АЛТ та АСТ в терапевтичній практиці,

дослідники розробляють якомога більш простий та безпечний у використанні, швидкий, точний, дешевий та експресний метод детекції.

2 1.2 Традиційні методи детекції

Всі методи визначення активності ензимів поділяються на 2 великі класи - прямий (детектування безпосередньо молекули ензиму або її комплексів) та опосередкований (вимірювання вмісту складника ензиматичної реакції - субстрату або продукту - та математичний обрахунок концентрації ферменту відповідно до схеми протікання реакції та особливостей вимірювання). До прямих методів можна віднести хроматографію [34] та радіохімічні методи. Для непрямой детекції АЛТ і АСТ застосовуються хроматографія, спектрофотометрія, хемолюмінесценція, флуорисценція, колориметрія, біосенсорика. Різноманітність методів велика і всі базуються на принципово відмінних підходах.

Хроматографія

Хроматографія — метод розділення, аналізу та дослідження фізико-хімічних властивостей речовин та їх сумішей. В хроматографічній колонці в результаті дії капілярного ефекту та специфічний електростатичних взаємодій функціональних груп речовини розподіляються між рухомою і нерухомою фазами. На розташування аналіту на нерухомій фазі впливає безліч факторів - склад, іонна сила, температура, рН, швидкість реакційної суміші, характеристики реакційної суміші (склад, іонна сила, температура, рН), нерухомої фази (тип сорбенту, пористість, хімічні модифікації поверхні, блокування кінцевих груп, вміст вуглецю), колонки (розмір, температур, тиск) та самого аналіту (заряд, молекулярна маса, рухливість, гідрофобність і тд). Хроматографія один із найстаріших методів аналізу, тому і методів описано достатньо.

Канепарі з колегами описав методику вимірювання АСТ за допомогою високоефективної рідинної хроматографії та УФ-детектора [35]. Це було

досягнуто вимірюванням зміни концентрації продуктів реакції (глутамату) за встановлений період часу.

Оскільки АСТ та АЛТ мають дуже подібні масу, структуру, гідрофобність, заряд, то і хроматографічні характеристики в них майже однакові, відповідно, для їх розділення та одночасного детектування необхідна оптимізація умов методу. Хроматографічна методика для одночасного вимірювання активності обох ферментів була описана в роботі [36]. В ній визначались 2 продукти реакції (ксантин і глутамат), а межа визначення становила 0,1 од.акт/л при необхідному об'ємі сироватки — 0,1 мл.

Існує форма АСТ, при якій її молекулярна маса в декілька разів більша. Така форма називається макро-АСТ і виникає в результаті конденсації ензиму з сироватковими імуноглобулінами або полісахаридами. Ця форма рідко враховується при клінічних дослідженнях, що спотворює реальну картину. В літературі описана методика вимірювання таких молекул на базі мас-спектроскопії у поєднанні з обернено-фазовою рідинною хроматографією [37].

Також було проведено дослідження по визначенню вміста АЛТ і АСТ в сечі щурів за допомогою ультраефективної РХ з іонізуючим розпиленням та мас-спектроскопії [38].

Спектрофотометрія та колориметрія

Колориметрія — метод фізико-хімічного аналізу розчину, який дозволяє визначити кількісний вміст аналіту. В його основі лежить здатність речовини поглинати електромагнітне випромінювання певної довжини з видимого спектру. Прямий аналіз відбувається шляхом порівняння оптичної густини зразка з оптичною густиною еталона (чистий розчинник, або відома концентрація аналіту в такому ж розчиннику, що і зразок). Важливою вимогою до вимірювання є однакова температура та товщина шару розчину, через який проходить промінь. Також існує компенсаційний

колориметричний метод, який базується на доведенні оптичної густини зразку до еталонної і подальшого розрахунку початкової концентрації.

Наприклад, було розроблено декілька методів на основі діазонієвої солі для визначення концентрацій АСТ та АЛТ. Метод перший - стабілізована діазонієва сіль специфічно реагує з оксалоацетатом з утворенням сполуки червоного кольору [39]. Наступний метод ґрунтується на процесі дегідрування глутамату, внаслідок чого зменшується концентрація діазонієвої солі [40]. Також в складі мультиметодики по вимірюванню переліку ферментів було описано визначення вмісту АСТ та АЛТ. Дана методика базувалася на взаємодії NADH (один з продуктів ензиматичної реакції трансаміназ) з сіллю заліза або сіллю тетразолію [41].

На відміну від колориметрії, в спектрофотометрії застосовується монохромне випромінювання видимого, ультрафіолетового та інфрачервоного спектра. Це дозволило проводити значно точніші дослідження.

Спектрофотометричних методик в літературі описано значно більше, ніж колориметричних, до того ж цей метод набув ширшого розповсюдження і нині є одним із тих, що застосовуються в медичних лабораторіях [42,43]. В основі одного з найстаріших спектрометричних методів лежить конденсація оксалоацетату і ацетил СоА, що призводить до синтезу цитрату і СоASH. В даному методі вимірюється кількість тіолових груп, яка утворилася після реакції між СоASH з DTNB (5,5'-дітіо-біс-(2-нітробензойна кислота). Утворений в такій молекулі хромофор має високий молярний коефіцієнт згасання і пік поглинання при 412 нм [44]).

Спектрофотометрію також було застосовано для детекції пероксиду водню, який утворюється при окисненні глутамату іммобілізованою на платиновому мікроелектроді глутаматоксидазою в проточно-інжекційній системі [45].

В іншій роботі було синтезовано нанозим Fe@BC, який в присутності пероксиду водню окиснює 3,3',5,5'-тетраметилбензидин та утворює синю

сполуку, з піком поглинання на 450 нм [46]. На основі тетрабензидину також існує сучасна колориметрична платформа для детектування АСТ, АЛТ і лужної фосфатази [47]. В ній застосовується нанозим Au/LDO.

Також було описано методику вимірювання активності АСТ і АЛТ за допомогою автоматизованого короткоінтервального аналізатора Beckman System TR. Він проводить пролонговану двопроточну спектроскопію та оцінює зміну оптичних характеристик зразку та еталону через певний час [48].

Нині більшість експериментів проходить із застосуванням комерційних наборів для вимірювання АЛТ і АСТ на спектрометрах (наприклад, набори компанії Alphaslab [49,50])

Значним недоліком спектральних методів є вимоги до прозорості зразку - сироватки з ознаками гемолізу або забруднені оптично активними речовинами не піддаються аналізу.

Хемолюмінесценція

Хемолюмінесценція — це фізичне явище випромінення світла в результаті протікання хімічної реакції. Хемолюмінесцентні методи демонструють високу чутливість, малий шум та широкий лінійний діапазон вимірювання. Складнощі з цим методом виникають, якщо в сироватці присутні існують інгібітори хемолюмінесценції, бо в такому разі результати вимірювання спотворені. Природними інгібіторами хемолюмінесценції слугують супероксиддисмутаза, гідрохлорид метилового ефіру N-нітро-L-аргініну, N-іміноетил-L-орнітин [51].

При вимірюванні АСТ та АЛТ загальна хемолюмінесцентна реакція виглядає наступним чином: окиснення глутамату глутаматоксидазою з утворенням пероксиду водню, а водень окиснює люмінол, ініціюючи хемолюмінесценцію.

В Німеччині був розроблений хемолюмінесцентний проточно-інжекційний метод визначення аланіну, α -КГ і глутамату в складі середовища для культивування клітин ссавців [52]. В даній роботі застосовувались

іммобілізовані АЛТ і ГлОкс. Хемолюмінесцентна реакція в даному випадку ініціювалась реакцією між пероксидом водню (продукт ГлОкс) та люмінолом (для каталізу процесу необхідна присутність іонів Со (II) та іммобілізованої грибоквова пероксидаза). Якщо не іммобілізувати АЛТ на скляних кульках в детекторі та додати субстрати в надлишку, то лімітуючим фактором стане робота ензимів, відповідно можна буде вимірювати активність АЛТ і АСТ спостерігаючи динаміку світіння детектору. Світіння буде корелювати з концентрацією глутамату в розчині, яка лінійно зростає з часом в результаті роботи трансаміназ.

Маркетт з колегами запропонував масив електрохемілюмінесцентних біосенсорів серед аналітів якого був і глутамат [53]. В цій методиці у фотополімерну сітку (матеріал VA-SbQ) було включено 2 типи кульок - з ковалентно іммобілізованими оксидазами (хелатовані кульки імідодіціанової кислоти або діетилметилового аніоніту) та люмінолові кульки. Сітка розміщувалась на поверхні скловуглецевої плівки. Схема роботи стандартна: оксидаза в ході реакції виробляє пероксид водню, він взаємодіє з люмінолом і викликає люмінесценцію. Сигнал біосенсора зчитувався за допомогою CCD-камери, а диференціація сигналу досягалась шляхом строгої локалізації оксидаз в просторі — розташування виконано зонами, що дозволяло візуально визначати аналіт. Як і в попередній статті, активність сироваткових АСТ і АЛТ можна визначити дослідивши динаміку зміни вмісту їх субстратів в сироватці.

Флуорисценція та УФ-абсорбція

Ці методи високоточні, але потребують такого ж точного контролю середовища, оскільки воно впливає спотворює результати гасінням або виникненням неспецифічної флуорисценції. Контролювати треба все: рН, іонна сила, інтенсивність світла, температура, нековалентні взаємодії, матеріал лабораторного посуду, обладнання, характеристики реагенту (високі концентрації речовин, наявність домішок та суспензій, оптична густина, наявність розчиненого кисню). Однак, при дотриманні необхідних умов

інтенсивність випромінювання світла прямо пропорційна концентрації аналіту. На жаль, через делікатність методу в комерційній практиці він не застосовується.

На базі флуорисценції та УФ-поглинання описана методика, в якій ініціюється окиснення глутамату до α -оксоглутарату, що супроводжується відновленням NAD^+ до NADH . Відновлення запасів глутамату було забезпечено роботою ферменту D-фенілгліцинамінотрансєрази, яка здійснювала зворотню трансамінацію. Нагромадження NADH впродовж рециркуляції і вимірювалося стандартним методом (пік поглинання при 455 нм)^[54].

В літературі також описано метод, в якому вимірювався ступінь відновлення флуорисценції. Для цього використовували загашений родамін. При рН 7 глутамат селективно заміщує індикатор в складі молекули дикоптера (II) октаміна. В результаті формування групи $\text{Cu}^{2+}/\text{-COO}^-$, родамін відновлював здатність до флуорисценції ^[55]. Таким чином, дозволяють вимірювати динамічну зміну концентрації глутамату, що є наслідком роботи АСТ і АЛТ.

Цікавою є робота 2005 року, яка описує генетично-кодований наносенсор на основі поверхневого флуорисцентного резонансного переносу енергії (FRET) ^[56], який дозволяє вимірювати концентрацію глутамату в позаклітинному просторі. Тут використовується флуорисцентний глутамат-індикаторний білок, який містить 2 варіанти зеленого флуорисцентного білка. Зв'язування з глутаматом або аспартатом призводить до конформаційних змін, які знижують рівень флуорисценції. Саме зниження інтенсивності світіння і слугує сигналом наносенсора. Цей пристрій дозволяє контролювати концентрацію глутамату та аспартату в розчині в реальному часі, відповідно дає змогу оцінити динаміку змін і розрахувати активність АСТ і АЛТ.

Радіохімічний аналіз

Радіохімічний аналіз - це високочутлива, але доволі специфічна методика, оскільки вона визначає наявність природних або штучних радіонуклідів. Вимірювання супроводжуються складними розрахунками та певним ризиком, тому радіохімічний аналіз не набув широкого розповсюдження для біохімічних тестів, проте це не завадило його активному застосуванню при енергетичних та геологічних дослідженнях. Хоча він і рідкісний, було розроблено та описано декілька методів детекції АСТ, АЛТ та їх продуктів на основі радіохімічних методів [57].

Наприклад, метод визначення оксалоацетату шляхом конверсії міченого ацетил-КоА до цитрату (процес каталізується цитрат-синтазою) та показано можливість його використання для аналізу вмісту АСТ [58]. Інший метод використовував радіоактивний ізотоп водню (третій), який приєднувався до нестабільної форми аспартату в 2 і 3 положеннях в результаті обміну атомами з водою. Важливим є факт, що ця нестабільна форма утворюється в процесі трансамінації, тобто міченим буде лише той аспартат, що брав участь в реакції [59]. В подальшому речовини розділяли методом ВЕРХ в катіонообмінній колонці. Для вимірювання радіактивності кожної фракції її опромінювали іонізуючим пучком та підраховували сцинтиляції (короткочасний світловий спалах).

Також розроблено методику радіоізотопного аналізу перетворення α -КГ на глутамат [60].

Імунофлуорисцентний аналіз

Імуносерологічні методи представлені на прикладі корейського дослідження [61], в якому АЛТ і АСТ детектувались за допомогою сендвіч ензим-зв'язаного імуносорбентного аналізу з використанням флуорисцентно мічених моноклональних антитіл.

Електрохімічні методи та біосенсиори

Зараз розробляються в основному електрохімічні методи вимірювання АЛТ і АСТ, які дозволяють детектувати хімічні процеси в розчині за допомогою змін в електричному ланцюзі. Таке вимірювання можливе, якщо в ході реакцій утворюються електроактивні речовини і змінюється сила струму в ланцюзі (амперометрія), або якщо змінюється електропровідність розчину (кондуктометрія) чи ЕРС (потенціометрія), відбувається деформація зовнішнього шару датчика (тензометрія) та зміна його оптичних і потенціальних характеристик (поверхневий плазмонний резонанс) і тд. Порівняно з іншими методами, їх роздільна здатність невисока, але цей недолік компенсується простотою конструкції приладу та його компактністю, мінімальною попередньою підготовкою зразку, малою тривалістю аналізу, легким застосуванням установки, простою і зрозумілою обробкою результатів, можливістю автоматизації вимірювання, аналізу та підключення приладу до системи BYOD (bring your own device) або IoT (internet of things)[⁶²]. Такі характеристики демонструють перспективу створення експрес-аналізаторів на базі електрохімічних методів. До того ж, дослідники постійно шукають і знаходять методи покращення чутливості та збільшення роздільної здатності цих методів.

Зазвичай селективний елемент датчиків таких приладів базується на застосуванні органічних речовин біологічного походження (біосенсиори), але в літературі також описано і хемосенсиори, в яких селективність забезпечення абіотичними органічними молекулами. В якості перетворювача хімічного сигналу в електричний застосовуються золоті, платинові, вуглецеві, скловуглецеві, скляні, паперові та багато інших електродів і їх модифікацій. Щороку виходять десятки статей, які описують нові матеріали, способи обробки, активації та модифікації поверхні датчиків. Також наразі існує тенденція до мікро- і нанорозмірності датчиків та поєднання різних методів аналізу в ході одного вимірювання.

У таблиці 1.2.1 наведено декілька розроблених методик вимірювання активності АЛТ і АСТ шляхом детекції їх продуктів, а також методики, які можна модифікувати під цю потребу.

Таблиця 1.2.1 Порівняння декількох методик для вимірювання активності АЛТ і АСТ

Автор	Метод і установка	Схема реакції	Лінійний діапазон
Хе [63]	диференціальна імпульсна вольтаметрія; трьохелектродна схема - робочий золотий (d 50 мкм), платиновий допоміжний, Ag/AgCl порівняльний мікроелектроди	0) робота АЛТ 1) піруват → (лактатдегідрогеназа) → NAD ⁺ 2) відновлення NAD ⁺	0,3-200 од.акт./л
Пеген [64]	Двохелектродна схема — з ферментною мембраною та з мембраною без ферменту	0) АЛТ: 1) піруват → (піруватоксидаза) → H ₂ O ₂ 0) АСТ: 1) оксалоацетат → (оксалоацетатдекарбоксилаза) → піруват → (піруватоксидаза) → H ₂ O ₂	6-30000 од.ак./л
Кіхара [65,66]	Двохензимна ролівінілхлоридна мембрана на полярографічному електроді	Схема така ж як і в попередньому дослідженні	5-1600 од.акт./л
Суман [67]	Амперометрія. Скляна пластина, покрита оксидом олова, на неї нанесена плівка з поліанілін-кофтороаміну. Є додатковий платиновий електрод	1) піруват → (лактатдегідрогеназа) → лактат → (лактатоксидаза) → H ₂ O ₂	0.1-5.5 мМ лактату 1,18 мкА/мМ можна застосувати для детекції АЛТ

Пан [⁶⁸]	Амперометрія. Платиновий мікроелектрод з нафіоновою напівпроникною мембраною	1) глутамат → (глутаматоксидаза) → Н ₂ О ₂	0.3-800 мкМ глутамату
Рахман [⁶⁹]	Амперометричний платиновий мікросенсор голчастого типу з провідним субстратом для іммобілізації ферменту (полімерний матеріал 5',2"-тертіофен-3'-карбонова кислота, утворений методом циклічної вольтамперометрії)	1) глутамат → (глутаматоксидаза) → Н ₂ О ₂	0.2-100 мкМ глутамату
Мое [⁷⁰]	Амперометрія. Підвищення рівня АЛТ призводить до споживання Н ₂ О ₂ та падіння рівня відновленої берлінської лазурі (БЛ), що зменшує струм	0) АЛТ 1) α-КГ + Н ₂ О ₂ → Н ₂ О ₂ ↓ 2) Н ₂ О ₂ + БЛ → БЛ↓ 3) БЛ окиснюється на електроді	40-1990 од.акт./л
Ценг [⁷¹]	Амперометрія. Мікроплатиновий дротяний електрод, поверня якого модифікована пермселективними полімерними мембранами з надокисненого поліпіролу та нафіону (розділяє катіони з аніонами)	0) АЛТ, АСТ 1) глутамат → (глутаматоксидаза) → Н ₂ О ₂	10-900 од.акт./л
Сайгілі [⁷²]	Диференційна імпульсна вольтамперометрія. Платиновий тонкоплівковий електрод.	0) АЛТ, АСТ 1) глутамат → (глутаматоксидаза) → Н ₂ О ₂	5-120 од.акт./л

В Південній Кореї було розроблено багат шаровий амперометричний імуносенсор [⁷³]. Перший етап його роботи - на зовнішній нейлоновій мембрані іммобілізовані моноклональні антитіла до рекомбінантної АЛТ захоплюють трансаміназу, потім піруват проходить крізь цю мембрану до другого шару, на якому абсорбована піруватоксидаза. Там відбувається процес окиснення пірувату, який супроводжується відновленням металу, після чого метал знову окиснюється під дією поданого на електрод

потенціалу в 0,3 В, що викликає появу струму в системі. Лінійний діапазон визначення АЛТ розробленого біосенсору лежав в межах 10 пг/мл — 1 мкг/мл, а чутливість становила 26,3 нА/(нг/мл). В даній роботі було використано двохелектродну амперометричну установку.

Наступна робота описує дешевий метод створення паперових мікроаналітичних пристроїв для детекції АЛТ та АСТ шляхом розпилення реагенту за допомогою модифікованого струменевого п'єзоелектричного принтера та комерційного твердочорнильного принтера (для створення воскової підкладки на хроматографічному фільтрувальному папері [74]. Вимірювання в даному випадку здійснювалось за допомогою індикаторної реакції на NADH. Для цього використано відповідні ферменти (при детекції АЛТ малатдегідрогеназа для відновлення оксалоацетату та при детекції АСТ лактатдегідрогеназа для відновлення пірувату). Сигналом слугувала зміна інтенсивності забарвлення з часом, яка була проаналізована в ПЗ Photoshop.

На паперовій основі також було створено тривимірні мікрофлюїдні пристрої для визначення ряду біомаркерів та їх аналізу за допомогою смартфона [75]. Активність трансаміназ вимірювалась за допомогою комерційних реагентів, відповідно до рекомендацій IFCC [Ошибка! Закладка не определена.].

Інша робота описує нову матрицю для іммобілізації ензимів, яка застосовувалась при вольтамперометричному та хроноамперометричному вимірюванні АЛТ і АСТ [76]. Матриця побудована з біметалічної ієрархічної структури наночастинок Pt/Au, яка використовується в якості додаткового протонного транспортера, що покращує чутливість до пероксиду водню. Лінійний діапазон цього сенсору сягає 20-180 од.акт.л АСТ та 20-140 од.акт./л АЛТ.

Також було представлено прототип одноразового біосенсора для детекції АСТ, який амперометрично вимірює концентрацію пероксиду водню [77]. Покращення чутливості цього сенсора досягнуто за рахунок

застосування вуглецевою пасти с каталізатором — наночастинками Гридiю. Діапазон вимірювання становив 0-250 од.акт./л.

1.3 Підсумки огляду літератури

Після аналізу літератури було продемонстровано актуальність та необхідність розробки новітніх методик вимірювання АСТ і АЛТ, особливо експрес-методик (які дозволяють регулярно або в критичних ситуаціях моніторити стан здоров'я) та надточних методів (для лабораторної діагностики захворювань). Ці методи повинні володіти ознаками, необхідними для комерційного впровадження, такими як точність, гарна відтворюваність, стабільність, простота та дешевизна виготовлення, універсальність (можливість комбінування з іншими аналізами для одночасної детекції кількох аналітів), автоматизація безпечність, швидкість та інше.

Було виявлено та проаналізовано багато цікавих сучасних робіт в даній сфері. Огляд літератури демонструє тенденцію до створення амперометричних біосенсорів для детекції пероксиду водню, що доводить високих потенціал таких пристроїв.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Матеріали

Для створення біосенсора використана рекомбінантна глутаматоксидаза (ГлОкс), отримана з *Streptomyces sp.* з активністю 7 од. акт. мг⁻¹ (Yamasa Corporation, Японія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), АЛТ, АСТ, піридоксальфосфат (ПФ), L-аланін, α-кетоглутарат (α-КГ), 25% водний розчин глутаровий альдегід (ГА), гліцерин, NERES, аскорбінова кислота, цистеїн, *мета*-фенілендіамін, L-глутамат натрію, інші амінокислоти (метіонін, валін, ізолейцин, гліцин, аспарагін, серін, треонін, гістидин, пролін, фенілаланін, триптофан) були виробництва фірми Sigma-Aldrich, США. Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, зокрема пероксид водню, етиловий спирт, порошок оксиду алюмінію та ін. були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

2.2 Конструкція амперометричного перетворювача та схема експериментальної установки

В даній роботі як амперометричний перетворювач використали платиновий дисковий електрод. Його детальна конструкція описана в статті [78], а схема приведена на рис. 2.2.1В.

В ході експерименту використовувалася триелектродна схема амперометричного аналізу (рис.2.2.1С). До потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди) підключались робочі електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння. Також було підключено 8-канальний PulmSens multiplexer, що дозволяв отримувати сигнали з декількох робочих електродів одночасно. Сигнал від потенціостату

виводився на екран приєднаного комп'ютера за допомогою використання відповідного програмного забезпечення (PalmSens7).

Відстань між всіма електродами була однаковою і складала близько 5 мм. Робочу зону періодично механічно обробляють за допомогою шліфувального паперу та пасти з порошку оксиду алюмінію різного діаметру (0,3 та 0,05 мкм). Очищення робочої поверхні спиртовим розчином здійснювалося перед кожним нанесенням біоселективного елементу.

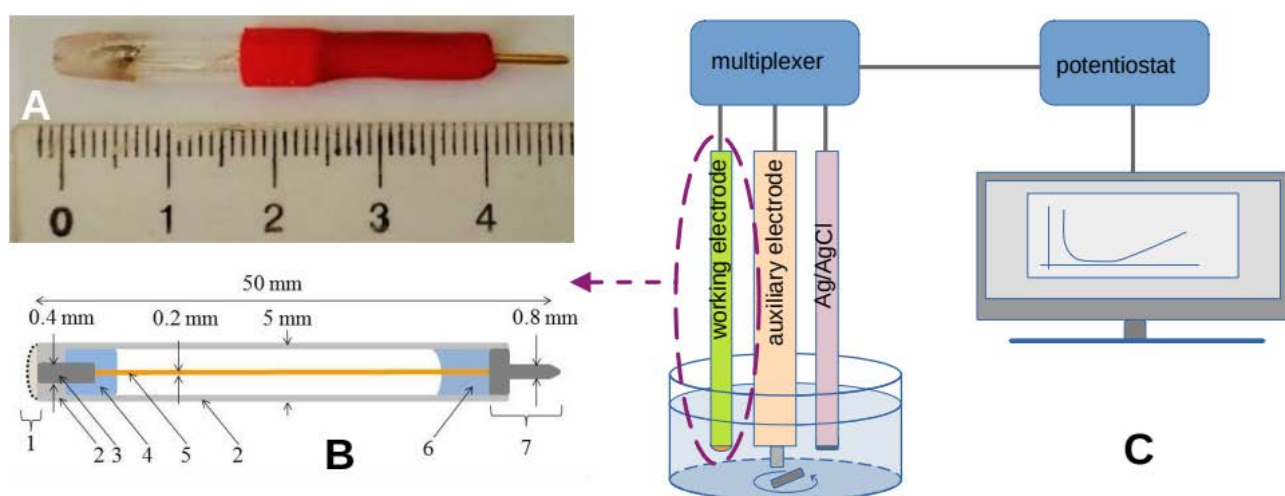


Рис. 2.2.1 — Фото робочого електроду (А). Схематичне зображення амперометричного електроду на основі платинового дроту діаметром 1 мм (В): 1 – біоселективний елемент; 2 скляний корпус електроду; 3 – платиновий дріт; 4 – електричне з'єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда; 5 - внутрішній провідник; 6 – епоксидна смола для герметизації. Схема вимірювальної установки (С).

2.3 Методика нанесення біоселективної мембрани

Для створення чутливого до глутамату елементу біосенсора взяли за основу метод ковалентної іммобілізації ферменту на поверхні електроду з використанням зшиваючого агенту – глутарового альдегіду (методика описана в бакалаврській роботі). Готувався ферментний гель, що містив 8% ГлОкс, 4% БСА та 10% гліцерину у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Гліцерин необхідний для стабілізації ферменту і покращення адгезії мембрани. Наступним кроком цей гель змішувався з водним розчином ГА (концентрацією 0,05%) в пропорції (1:2). Суміш одразу наносили на чутливу зону електроду і висушували на повітрі за кімнатної температури протягом 35 хвилин. Готовий біосенсор відмивали від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани в робочому буферному розчині (25 мМ HEPES, pH 7,4) протягом 10 хвилин.

2.4 Методика вимірювання вмісту АЛТ

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

Вимірювання проводилися за кімнатної температури у відкритій комірці, об'ємом 2,5 мл, при постійному перемішуванні та постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння, що відповідає потенціалу окиснення пероксиду водню H_2O_2 на аноді. Робочим буфером слугував 25 мМ HEPES з pH 7,4, а концентрації субстратів у вимірювальній комірці задавалась додаванням аліквот концентрованих розчинів.

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

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ

3.1 Принцип роботи біосенсора

Принцип роботи даного біосенсора базується на ряді реакції ферментативних та електрохімічних реакцій (схема 3.1.1).

АЛТ каталізує біомолекулярну реакцію трансамінування (схема 3.1.1-1), в ході якої відбувається перенесення аміногрупи з амінокислоти (аланін) на α -кетокислоту (α -кетоглутарат) (проміжним носієм аміногрупи слугує кофермент піридоксаль-5-фосфат). В результаті утворюється нові α -кетокислота (піруват) та амінокислота (глутамат).

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

Для визначення концентрації глутамату, а, відповідно, і активності АЛТ, застосовується біосенсор на основі ГлОкс. В ході ферментативної реакції в біоселективній мембрані окиснюється глутамат та утворюється електрохімічно-активний пероксид водню (схема 3.1.1-2).

Якщо прикласти потенціал в 600 мВ на електроді відбувається анодне розкладання пероксиду водню (схема 3.1.1-3), з утворенням електронів, які реєструє амперометричний перетворювач.

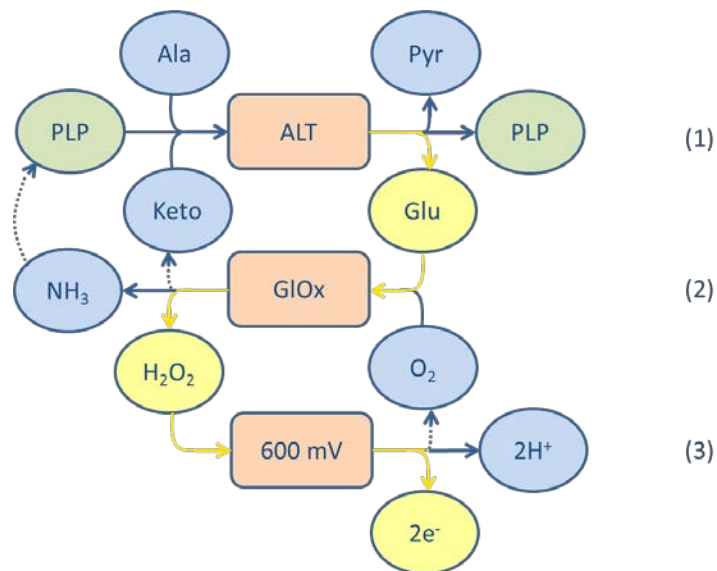


Схема 3.1.1

Принцип роботи біосенсора для визначення активності АЛТ приведено на рисунку 3.1.1. Як видно на рисунку, спочатку отримується базова лінія біосенсора, далі у вимірювальну комірку з сенсором вносяться субстрати та кофактор АЛТ – аланін, α -КГ та ПФ, що не призводить до відгуку біосенсора. Далі в реакційний розчин вноситься АЛТ, і, в результаті її безперервної роботи, концентрація глутамату в комірці починає неспинно зростати, відповідно, ми бачимо реакцію біосенсора. Чим вища активність ферменту, тим стрімкіше зростає концентрація продукту, тобто тим швидше зростає величина відгуку. В якості одиниці вимірювання відгуку біосенсора було взято різницю величини сили струму за одну хвилину.

Принцип роботи біосенсора для визначення активності АСТ такий самий, тільки замість аланіну додається аспартат. Було перевірено і продемонстровано спроможність даного біосенсора відчувати присутність АСТ в розчині за умови наявності аланіну та α -кетоглутарату (рис. 3.1.2).

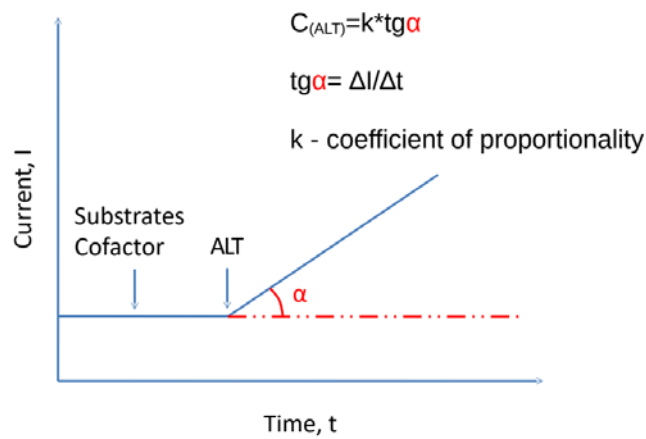


Рис. 3.1.1 — Принцип роботи біосенсора для визначення активності АЛТ

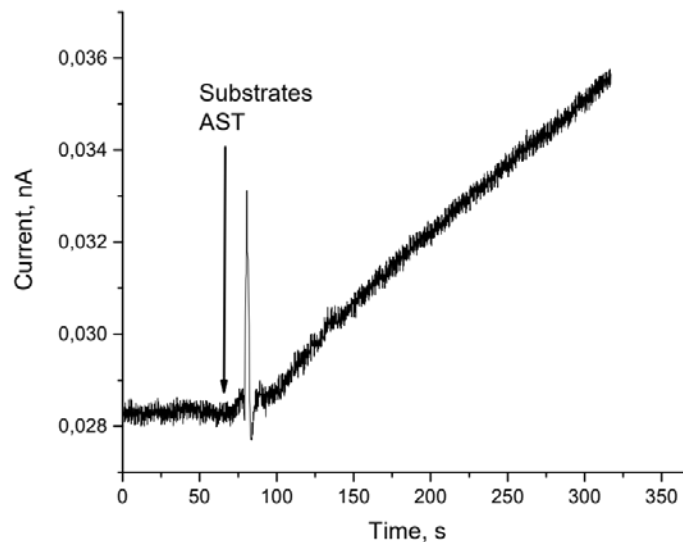


Рис. 3.1.2 — Типовий відгук біосенсора на присутність АСТ. Концентрація α -КГ — 4 мМ, аспаратат — 4 мМ, АСТ — 120 од.акт./л.

3.2 Підбір оптимальних концентрацій реагентів

АЛТ каталізує реакцію типу «пінг-понг», тобто трансамінування проходить в 2 етапи. Перший етап (схема 3.2.1-1) - α -аміногрупа з амінокислоти переноситься на кофермент і аланін перетворюється α -кетокислоту (піруват).

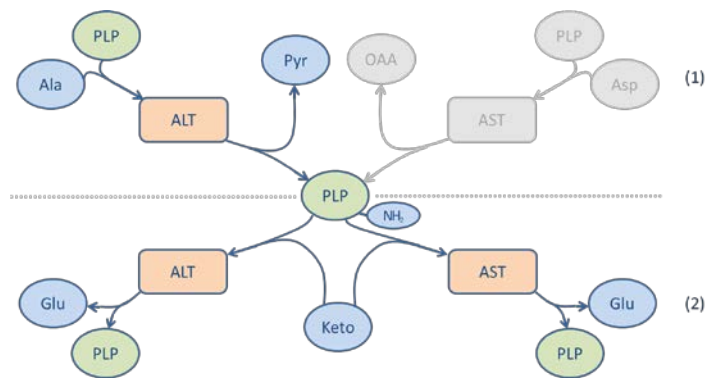


Схема 3.2.1

ПФ діє як проміжний переносник аміногрупи в активному центрі АЛТ [79,80,81]. Він зазнає оборотні перетворення між своєю альдегідною формою (ПФ, який може приймати аміногрупу) і амінованою формою (піридоксамінфосфат або ПАФ, який може віддавати свою аміногрупу α -кетокислотам). ПФ ковалентно зв'язаний з активним сайтом ферменту через альдимінний зв'язок (основа Шиффа) з ϵ -аміногрупою на залишку лізину, який в ході трансамінування замінюється на такий самий, але з α -аміногрупою амінокислоти. Один протон на субстраті видаляється і залишається вільна електронна пара на вуглеці, тобто утворюється карбаніон. В нормі карбаніон дуже нестабільний і утворюється з малою швидкістю, але ПФ делокалізує негативний заряд, стабілізуючи карбаніони. Після цього послідовно утворюються хіноїдний проміжний продукт та кетимін. Останній розпадається на нову α -кетокислоту (піруват) та ПАФ.

Другий етап (схема 3.2.1-2) трансамінування починається з приєднання другого субстрату (α -КГ) до комплексу АЛТ-ПАФ і процес йде в обернену сторону: кофермент дезамінується до ПФ, а зв'язана з активним центром ферменту α -кетокислота приєднує аміногрупу, перетворюючись на амінокислоту (глутамат).

Зрозуміло, що для досягнення максимальної продуктивності необхідно, щоб ензиматична реакція не спинялась, тобто кожна наявна молекула ферменту в кожний момент часу брала участь в перетворенні субстрату в продукт. За оптимальних умов будь-який фермент має деяку

максимальну швидкість протікання реакції, тобто за 1 хвилину він зможе утворити не більше певної кількості продукту. Таким чином, логічно припустити, що для досягнення цього максимуму необхідно взяти субстрат у надлишку відносно ферменту, щоб час його надходження до активного центру був мінімальний. Проте, якщо в реакції бере участь 2 і більше субстратів, що з'єднуються з одним активним центром, їх надлишок може викликати конкурентне інгібування, внаслідок чого, швидкість протікання реакції знизиться. Відповідно, існує загроза інгібування ферменту субстратами, через що було вирішено підібрати оптимальні концентрації субстратів ферментативної реакції.

В ході досліджень було виявлено, що присутність аланіну у надвисоких концентраціях (3-15 мМ) не мало суттєвого впливу на швидкість протікання реакції (рис. 3.2.1), тому було вирішено проводити вимірювання в присутності 4 мМ аланіну.

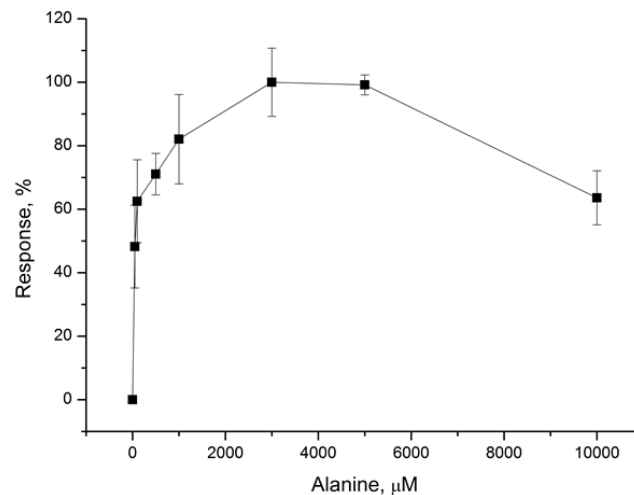


Рис. 3.2.1 — Залежність відгуку різних біосенсорів від концентрації аланіну в робочій комірці. Концентрація α -КГ — 4 мМ, АЛТ — 100 од.акт./л.

Також експериментальні дані показали спад активності АЛТ при підвищенні вмісту α -КГ більше 50 мкМ (рис. 3.2.2), що свідчить про його високу спорідненість до ферменту, в результаті чого висока енергія зв'язку

не дозволяє вільного розриву системи АЛТ- α -КГ. Це призводить до того, що ензим не може дезамінувати кофермент і перенести аміногрупу на α -КГ, що, в свою чергу, сповільнює протікання реакції. Крім того, α -КГ також утворюється в якості продукту окиснення глутамату, що поновлює його кількість в робочому розчині.

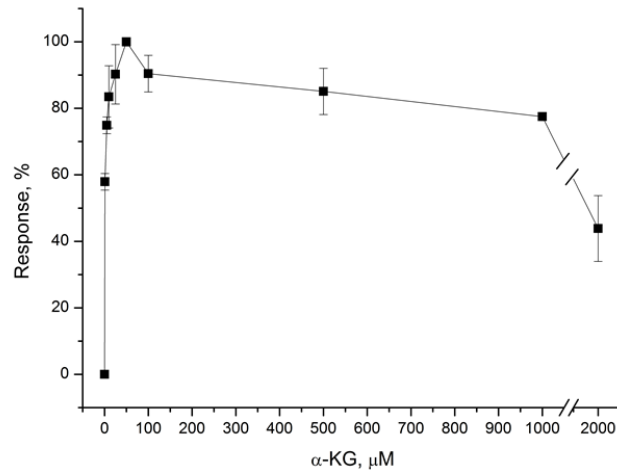


Рис. 3.2.2 — Залежність відгуку біосенсора від концентрації α -КГ в робочій комірці. Концентрація аланіну — 4 мМ, АЛТ – 100 од.акт./л.

Оскільки ПФ являється коферментом АЛТ, тобто не вичерпується в процесі ферментативної реакції, прогнозувалося, що для оптимальної роботи біосенсора не буде необхідності у високій концентрації ПФ в комірці. Також прогнозувалося, що надлишок ПФ може призвести до погіршення ефективності роботи ферменту через конкуренцію за субстрат. Експериментальні дані підтвердили прогнозовану залежність та показали, що оптимальна концентрація ПФ в робочій комірці становить 50 мкМ (рис. 3.2.3).

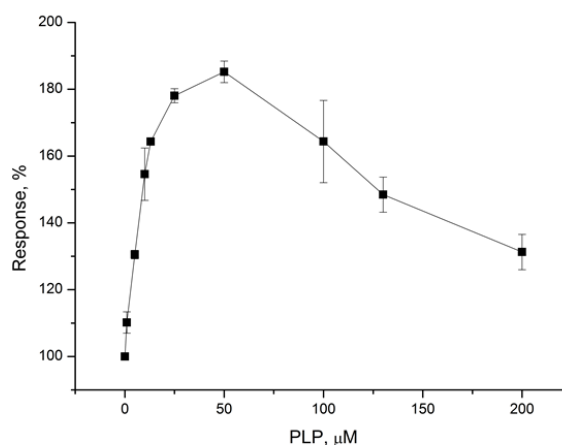


Рис. 3.2.3 — Залежність відгуку біосенсора від концентрації ПФ в робочій комірці. Концентрація аланіну — 4 мМ, α -КГ – 50мкМ, АЛТ – 100 од.акт./л.

3.3 Вплив АСТ на роботу біосенсора для вимірювання АЛТ

Оскільки АСТ має однаковий принцип роботи з АЛТ, існує імовірність його впливу на функціонування розробленого біосенсора. Тому було вирішено перевірити даний аспект. Перевірка здійснювалась двома способами: послідовним внесенням в робочий розчин субстратів, АЛТ, а потім АСТ (рис.3.3.1-А), та навпаки – субстрати, АСТ, а потім АЛТ (рис.3.3.1-В). В ході експерименту ми спостерігали високу селективність сенсору до АЛТ, оскільки присутність АСТ в комірці не ініціювала змін в системі. Також було зазначено зростання відгуків біосенсора чутливого до АЛТ на 9 ± 3.5 % в присутності такої ж концентрації АСТ, порівняно з відгуком без АСТ. Оскільки цей показник лежав в межах похибки вимірювання, спричинений присутністю в розчині АСТ вплив було вирішено вважати допустимим для нормального функціонування біосенсора в складних біологічних розчинах. В подальшому коли буде розроблено другий біосенсор для визначення АСТ, ефект деякого зростання реакції біосенсора для визначення АЛТ в присутності АСТ можна буде невілювати математично.

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

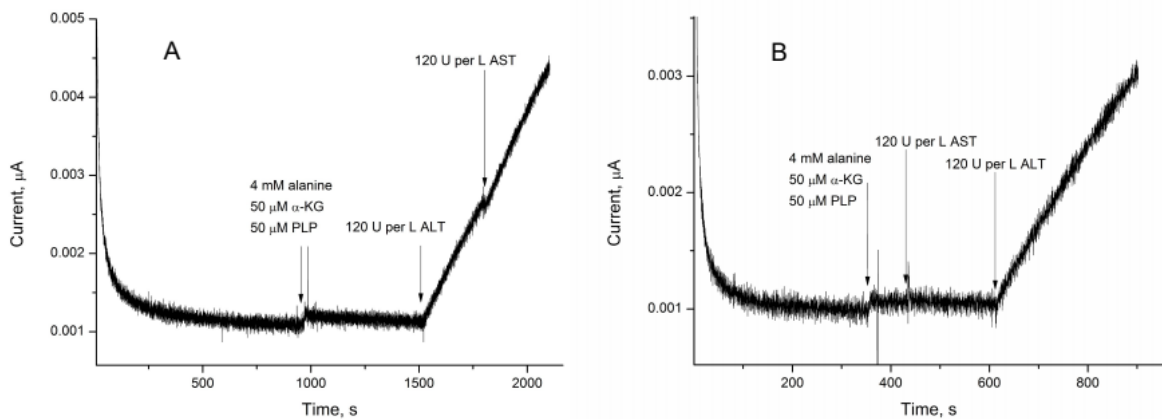


Рис. 3.3.1 — Відгук біосенсора на внесення 120 од. акт./л АЛТ, а потім АСТ (А) та 120 од. акт./л АСТ, а потім АЛТ (В), в присутності субстратів та коферменту (аланін 4 мМ, α -КГ 50 мкМ, ПФ 50 млМ).

Незважаючи на це, також стало зрозуміло, що через особливості алгоритму роботи даного біосенсора на його базі неможливо створити моноферментну систему для послідовного вимірювання АСТ і АЛТ. Щоб досягнути цієї мети необхідно буде створювати мультиферментну біосенсорну систему. Така потреба виникла, оскільки при послідовному внесенні в комірку субстратів АЛТ, а потім зразку з АЛТ і АСТ буде спостерігатись незначне неселективне збільшення величини відгуку. Друга проблема — при продовженні експерименту величина відгуку на АСТ буде

менша на ту величину, на яку збільшено відгук на АЛТ. Третя — на внесення субстратів для АСТ спричинить розведення і, відповідно, зменшення концентрації аналіту. Таким чином, стало зрозуміло, що необхідно розробляти біосенсорну систему, здатну виміряти і розрізнити активність АСТ і АЛТ одночасно в присутності всіх субстратів.

3.4 Вивчення селективності біосенсора

Даний біосенсор розробляється з метою подальшого вимірювання АЛТ в зразках біологічного походження. Крім субстратів та продуктів реакції в даних зразках можуть бути присутні інші електроактивні речовини, що окиснюються при докладанні потенціалу і дають хибний позитивний відгук (аскорбінова кислота, цистеїн, сечова кислота та ін.). Їх вплив на амперометричний перетворювач було усунуто нанесенням на поверхню амперометричного електроду додаткової ПФД мембрани, яка працює як «біологічне сито» не пропускаючи до поверхні електрода молекули більші за розміром за перекис водню. Нанесення додаткової мембрани проводили згідно описаної раніше методики [82].

Селективність будь-якого біосенсора залежить як від селективності перетворювача, так і від селективності біоселективного елементу. Відповідно, було перевірено селективність біосенсора відносно різних амінокислот (табл. 3.4.1). Внесення в комірку 1 мМ аспарагіну, глутаміну, аспарагінової кислоти та гістидину призводило до разового відгуку біосенсора, меншого в 50-100 разів, за чутливість біосенсора до глутамату, а інші амінокислоти не спричиняли відгуку біосенсора. Чутливість до деяких амінокислот можна пояснити неідеальною селективністю ГлОкс до глутамату, а також наявністю у препараті ГлОкс слідових кількостей інших ферментів (наприклад, оксидази L-амінокислот).

Також необхідно було перевірити вплив інших, неелектроактивних речовин, присутніх в біологічних розчинах, зокрема сечовини, ЕДТА,

глюкози, лимонної та бензойної кислоти, азиду натрію, KCl та CaCl₂. Було встановлено, що за концентрації 1 мМ жодна з цих речовин не спричиняла відгуку біосенсора та не викликала зміну величини відгуку на цільову речовину.

Таблиця 3.4.1 — величина відгуку біосенсора (з ПФД мембраною) на внесення 1 мМ різних інтерферентів.

Речовина, 1мМ	Відгук, нА	Речовина, 1мМ	Відгук, нА
глутамат	175	сечовина	0
аспарагін	0.9	ЕДТА	0
глутамін	0.35	глюкоза	0
аспарагінова кислота	0.3	бензойна кислота	0
гістидин	0.2	азид натрію	0
метіонін	0.1	KCl	0
тирозин	0.15	CaCl ₂	0
дофамін	1.2	ізолейцин	0
лейцин	0.05	аргінін	0
лимонна кислота	0.85	треонін	0
пролін	0	валін	0
серин	0	лізін	0
цистін	0	аланін	0

Головною метою даної роботи є розробка біосенсора, здатного вимірювати активність АЛТ в зразках крові, тому було вирішено перевірити вплив компонентів крові на роботу даного біосенсора.

Для цього в першу чергу було перевірено вплив амінокислот на величину відгуку біосенсора на АЛТ. Перевірка здійснювалась наступним чином: у вимірювальну комірку вносили інтерференти та субстрати, після вирівнювання базової лінії вносили АЛТ і порівнювали величину відгуку біосенсора без та в присутності амінокислот. Концентрація вільних амінокислот в сироватці крові становить близько 6 мМ [83], відповідно для перевірки була обрана суміш таких амінокислот в концентрації по 1мМ: метіонін, валін, ізолейцин, гліцин, аспарагін, серин, треонін, гістидин, пролін, фенілаланін, триптофан. Присутність амінокислот загальною

концентрацією 11 мМ призводила до падіння величини відгуку біосенсора на $36\pm 7\%$. Спроба відтворити йонний склад крові показала, що при наявності в комірці 2 мМ MgCl_2 , 50 мМ KHCO_3 , 150 мМ NaCl та 1 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ спостерігалось падіння величини відгуку на глутамат на $27.7\pm 4\%$.

Отримані дані продемонстрували, що розроблений біосенсор не можна використовувати для вимірювання активності АЛТ в цільній крові. Але, в разі застосування методики 10-кратного розведення сироватки крові у вимірювальній комірці, концентрація цих речовин суттєво зменшується. Таким чином їх вплив на роботу біосенсора буде незначним.

Також важливо зазначити, що для подальших вимірювань реальних зразків планується використовувати метод стандартних додавань, тому навіть цей вплив можна не враховувати, оскільки присутність амінокислот призводить до загального зниження чутливості сенсора, а не неселективного відгуку.

3.5 Аналітичні характеристики біосенсора для визначення АЛТ

Розроблений біосенсор характеризувався широким лінійним діапазоном визначення вмісту АЛТ (10-500 од.акт./л). На рис.3.5.1 приведено калібрувальну криву біосенсора для визначення АЛТ, з яких видно, що чутливість становила 0.5 нА/хв на 100 од.акт./л АЛТ. Мінімальна границя визначення – 5 од.акт./л. Час з моменту внесення АЛТ до моменту виходу відгуку на лінійний проміжок становив близько 10 с. Тривалість вимірювання після виходу на лінійний проміжок становила 60 с. Тривалість всього аналізу з урахуванням відмивання, виходу базової лінії на плато та стабілізації базової лінії після внесення субстратів становила близько 10 хв.

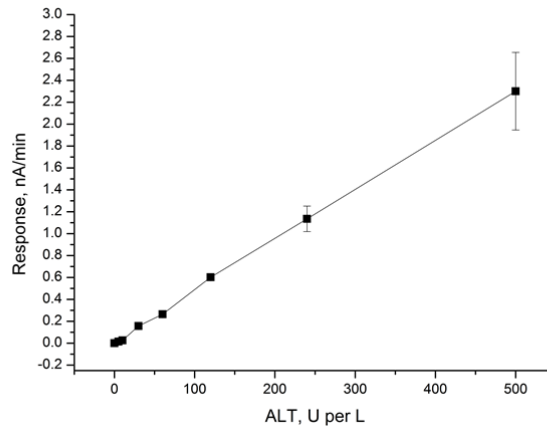


Рис. 3.5.1 — Калібрувальна крива біосенсора для вимірювання активності АЛТ в робочій комірці. Концентрація аланіну 4 мМ, α -КГ — 50 мкМ, ПФ — 50 мкМ.

Також було досліджено операційну стабільність розробленого біосенсора (рис. 3.5.2). Для цього було проведено по 3-4 вимірювань в день протягом 3 діб. Результати тестування трьох біосенсорів продемонстрували, що падіння величини відгуку біосенсора протягом усього експерименту становило $11,5 \pm 3\%$ від початкової активності. Отримані результати свідчать, що умови використання розробленого біосенсора кожен день, бажано проводити перед початком роботи додаткові калібрування сенсора.

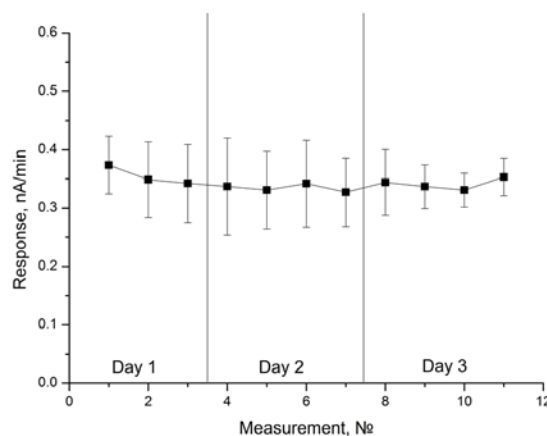


Рис. 3.5.2 — Операційна стабільність розробленого біосенсора протягом 3 днів. Концентрація аланіну 4 мМ, α -КГ — 50 мкМ, АЛТ – 100 од. акт./л.

Крім того в роботі було досліджено відтворюваність сигналів біосенсора протягом одного дня безперервних вимірювань, для цього було отримано низку відгуків на концентрацію АЛТ 100 од.акт./л та встановлено похибку вимірювання ($RSD = 7.6\%$) (рис.3.5.3).

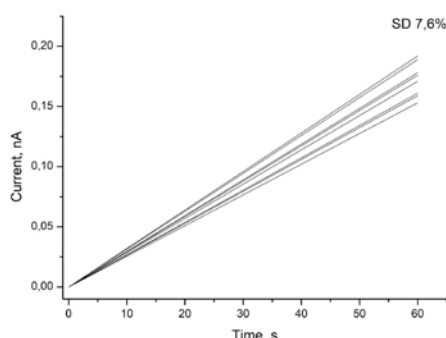


Рис. 3.5.3 — Відтворюваність відгуків розробленого біосенсора протягом дня. Концентрація аланіну 4 мМ, α -КГ — 50 мкМ, АЛТ – 100 од.акт./л.

Дослідивши аналітичні характеристики розробленого амперометричного біосенсора було встановлено, що можна переходити до стадії тестування його тестування при роботі з реальними біологічними зразками

Відповідно, подальші дослідження будуть направлені на застосування розробленого біосенсора для аналізу вмісту АЛТ в реальних зразках сироватки крові, розробці біосенсора для визначення АСТ та створенню біосенсорної системи для одночасного визначення АЛТ, АСТ та їх співвідношення.

ВИСНОВКИ

В даній роботі описано розробку і оптимізацію амперометричного біосенсора на основі глутаматоксидази для вимірювання вмісту АЛТ та АСТ в розчині. Описано його принцип роботи та методику вимірювання.

Неселективний відгук на електроактивні речовини нівельовано нанесенням додаткової напівпроникної ПФД-мембрани між робочою поверхнею електрода та біоселективною мембраною. Чутливість сенсора до аналіту, було покращено шляхом оптимізації умов експлуатації, а саме - підібрано оптимальні концентрації субстратів АЛТ (аланін — 4 мМ та α -КГ — 50 мкМ) та його коферменту (50 мкМ ПФ).

Також було проаналізовано селективність запропонованого в роботі біосенсора, відносно неелектроактивних компонентів біологічних рідин (йони, амінокислоти, інші органічні речовини) та змодельовано його роботу в сироватці крові (в присутності відповідних амінокислот та солей).

Дослідження аналітичних характеристик розробленого біосенсора при визначенні модельного глутамату виявило, що його лінійний діапазон роботи становив 5-600 мкМ, а чутливість – 150-200 нА/мМ. Лінійний діапазон для визначення АЛТ лежав в межах 5-500 од.акт./л, що цілком задовольняє потреби клінічної діагностики. Чутливість становила близько 0.5 нА/хв 100 од.акт./л АЛТ. Мінімальна границя визначення – 10 од.акт./л. Падіння величини відгуків за 3 дні функціонування сягало $11,5 \pm 3\%$, а похибка відтворюваності сигналу біосенсора протягом одного дня безперервної роботи – 7.6%. Тривалість вимірювання становила 60с, а тривалість одного аналізу з урахуванням підготовки — приблизно 10 хв.

Отримані результати показали потенціальну можливість використання розробленого біосенсора для моніторингу рівня активності АЛТ в сироватці крові. Також було перевірено здатність біосенсора до вимірювання активності АСТ та проаналізовано можливість одночасного вимірювання обох ензимів, що показало наявність систематичної похибки, яку необхідно

буде обраховувати математичним шляхом. Після перевірки, було запропоновано модель біосенсорної системи на базі 2 ензимів, яка зменшить розмір похибки. Таким чином, було продемонстровано перспективу розробки біосенсорної системи для визначення активності та співвідношення АСТ/АЛТ.

Також, розроблений лабораторний прототип може слугувати основою для розробки комерційного приладу для вимірювання активності АЛТ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elan.202060449>

2 <http://semst.onu.edu.ua/article/view/205823>

3 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7381915/>

4 Severin E, Nikolaeva A (2002) Biochemistry. Brief course with exercises and tasks 2nd edition: 139

5 Severin E, Nikolaeva A (2002) Biochemistry. Brief course with exercises and tasks 2nd edition: 240

6 Gubskiy Y (2000) Biological chemistry:153

7 Chenu C (2002) Glutamatergic regulation of bone remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2(3):282-4.

8 Han M , Kopec W, Solov'yov I, Khandelia H (2017) Glutamate Water Gates in the Ion Binding Pocket of Na⁺ Bound Na⁺, K⁺-ATPase. *Sci Rep* 7:39829

9 Trister A, Scott J, Rockne R, Yagle K, Johnston S, Hawkins-Daarud A, Baldock A, Swanson K (2014) Response to “Tumor cells in search for glutamate: an Alternative explanation for increased invasiveness of IDH1 mutant gliomas”. *Neuro Oncol* 16(12):1670-1

10 van Lith S, Molenaar R, Noorden C, Leenders W (2014) Tumor cells in search for glutamate: an Alternative explanation for increased invasiveness of IDH1 mutant gliomas. *Neuro Oncol* 16(12):1669-70

11 Jin L, Li D, Alesi N, Fan J, Kang H, Lu Z, Boggon T, Jin P, Yi H, Wright E, Duong D, Seyfried N, Egnatchik R, DeBerardinis R, Magliocca K, He C, Arellano M, Khoury H, Shin D, Khuri F, Kang S (2015) Glutamate Dehydrogenase 1 Signals Through Antioxidant Glutathione Peroxidase 1 to Regulate Redox Homeostasis and Tumor Growth. *Cancer Cell* 27(2):257-70

-
- 12 Son J, Lyssiotis S, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera R, Ferrone C, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang, Fleming Y, Bardeesy N, Asara J, Haigis M, DePinho R, Cantley L, Kimmelman A (2013) Glutamine supports pancreatic cancer growth through a Kras-regulated metabolic pathway. *Nature* 496(7443): 101–105
- 13 Coloff J, Murphy J, Braun C, Harris I, Shelton L, Kami K, Gygi S, Selfors L, Brugge J (2016) Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells. *Cell Metab* 23(5):867-80
- 14 Dingledine R, McBain C (1999) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Glutamate and Aspartate Are the Major Excitatory Transmitters in the Brain.
- 15 Lomelino C, Andring J, McKenna R, Kilberg M (2017) Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *J Biol Chem*. 292(49):19952–19958.
- 16 Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu X, Fidelin J, Sviderskiy V, Papagiannakopoulos T, Molina H, Snuderl M, Lewis C, Possemato R, Birsoy K (2018) Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumors. *Nat Cell Biol*. 20(7): 775–781.
- 17 Mattson M (2008) Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal PRACTicity and Disease. *Ann N Y Acad Sci* 144:97-112
- 18 Teng J, Wei Y, Su F, Guo Z, Zhong J (2015) Evaluating of Physiological Chemical Levels in Blood to Assess the Risk of Morbidity and Mortality of Ischemic Cardiovascular Disease. *Int J Environ Res Public Health* 12(9):11549–11559.
- 19 Severin E (2004) *Biochemistry* 2nd edition: 470
- 20 Mastoi A, Devrajani B, Shah S, Rohopoto Q, Memon S, Baloch M, Qureshi G, Sami W (2010) Metabolic investigations in patients with hepatitis B and C. *World J Gastroenterol* 16(5): 603
- 21 Giannini EG, Testa R, Savarino V (2005) Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 172(3): 367–379

-
- 22 Muscari A, Collini A, Fabbri E, Giovagnoli M, Napoli C, Rossi V, Vizioli L, Bonfiglioli A, Magalotti D, Puddu G, Zoli M (2014) Changes of Liver Enzymes and Bilirubin During Ischemic Stroke: Mechanisms and Possible Significance. *BMC Neurol* 14:122
- 23 Mahale A, Prabhu S, Nachiappan M, Fernandes M, Ullal S (2018) Clinical Relevance of Reporting Fatty Liver on Ultrasound in Asymptomatic Patients During Routine Health Checkups. *J Int Med Res* 46(11):4447-4454
- 24 Yang J, He X, Huang B, Zhang H, He Y (2018) Rule of Changes in Serum GGT Levels and GGT/ALT and AST/ALT Ratios in Primary Hepatic Carcinoma Patients With Different AFP Levels. *Cancer Biomark* 21(4):743-746
- 25 <https://link.springer.com/article/10.1186/s12885-019-6011-8>
- 26 <https://www.saudijos.org/article.asp?issn=1658-6816;year=2016;volume=3;issue=1;spage=21;epage=24;aulast=Siddique>
- 27 Lehmann-Werman R, Magenheimer J, Moss J, Neiman D, Abraham O, Piyanzin S, Zemmour H, Fox I, Dor T, Grompe M, Landesberg G, Loza B, Shaked A, Olthoff K, Glaser B, Shemer R, Dor Y (2018) Monitoring Liver Damage Using Hepatocyte-Specific Methylation Markers in Cell-Free Circulating DNA. *JCI Insight* 3(12):e120687
- 28 Li J, Yuan Z, Wang Q, Fan W, Zhang G (2019) Meta-analysis of Overall Incidence and Risk of ALK Inhibitors-Induced Liver Toxicities in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *98(1):e13726*
- 29 Kasraeian M, Asadi N, Vafaei H, Zamanpour T, Shahraki H, Bazrafshan K (2018) Evaluation of Serum Biomarkers for Detection of Preeclampsia Severity in Pregnant Women. *Pak J Med Sci* 34(4):869-873
- 30 <https://www.mdpi.com/1660-4601/15/8/1658/html><https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221074011730150X>
- 31 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221074011730150X>
- 32 <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/911>

-
- 33 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0164057>
- 34 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcla.22690>
- 35 Canepari S, Carunchio V, Girelli A, Messina A (1994) Determination of aspartate aminotransferase activity by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B: Biomed Sci and App* 656.1:191-195
- 36 Carunchio V, Castellano P, Girelli A, Messina A (1997) Simultaneous assay for aspartate aminotransferase and guanase in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B: Biomed Sci and App* 689.2:305-311
- 37 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcla.22690>
- 38 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048357515300389>
- 39 BABSON A, SHAPIRO P, WILLIAMS P, PHILLIPS G (1962) The Use of a Diazonium Salt for the Determination of Glutamic-Oxalacetic Transaminase in Serum. *Clin Chim Acta* 7:199-205
- 40 Lippi U, Guidi G (1970) A New Colorimetric Ultramicromethod for Serum Glutamic-Oxalacetic and Glutamic-Pyruvic Transaminase Determination. *Clin Chim Acta* 28(3):431-7
- 41 Bailey W, DeRouen T, Ziskind M, Greenberg H, (1975) Autoanalytic (Colormetric) Determinations of SGOT in Isoniazid Recipients Are Reliable. *Am Rev Respir Dis* 111(2):237-8
- 42 <https://bio-protocol.org/e931>
- 43 International Federation of Clinical Chemistry. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. *Clin Chem.* 1977;23:887.
- 44 Karmen A (1955) A Note on the Spectrometric Assay of Glutamic-Oxalacetic Transaminase in Human Blood Serum. *J Clin Invest* 34(1):131-3.
- 45 Ye B, Li Q, Li Y, Li X, Yu J (1995) L-Glutamate biosensor using a novel L-glutamate oxidase and its application to flow injection analysis system. *Journal of Biotechnology* 42.1:45-52
- 46 <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-021-05056-w>
- 47 <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.1c21578#>

-
- 48 Itoh H, Srere P (1970) A new assay for glutamate-oxaloacetate transaminase. *Analytical Biochemistry* 35.2:405-410
- 49 <https://www.alphalabs.co.uk/17234h>
- 50 <https://www.alphalabs.co.uk/17224h>
- 51 Catz S, Carreras M, Poderoso J (1995) Nitric Oxide Synthase Inhibitors Decrease Human Polymorphonuclear Leukocyte Luminol-Dependent Chemiluminescence. *Free Radic Biol Med* 19(6):741-8
- 52 Janasek D, Spohn U (1999) Chemiluminometric Flow Injection Analysis procedures for the enzymatic determination of L-alanine, α -ketoglutarate and L-glutamate. *Biosensors and Bioelectronics* 14.2:123-129
- 53 Marquette C, Dequili A, Blum L (2003) Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate. *Biosensors and Bioelectronics* 19.5:433-439
- 54 Khampha W, Yakovleva J, Isarangkul D, Wiyakrutta S, Meevootisom V, Emneus J (2004) Specific detection of L-glutamate in food using flow-injection analysis and enzymatic recycling of substrate. *Analytica Chimica Acta* 518.1-2:127-135
- 55 Bonizzoni M, Fabbrizzi L, Piovani G, Taglietti A (2004) Fluorescent detection of glutamate with a dicopper(II) polyamine cage. *Tetrahedron* 60.49:11159-11162
- 56 Okumoto S, Looger L, Micheva R, Reimer K, Smith S, Frommer W (2005) Detection of Glutamate Release From Neurons by Genetically Encoded Surface-Displayed FRET Nanosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24):8740-5
- 57 An L (2015) Detection of glutamate, glutamine, and glutathione by radiofrequency suppression and echo time optimization at 7 tesla. *Magn Reson Med* 73(2):451-8
- 58 An L (2015) Detection of glutamate, glutamine, and glutathione by radiofrequency suppression and echo time optimization at 7 tesla. *Magn Reson Med* 73(2):451-8

-
- 59 Garrison D, Beattie J, Namboodiri M (1988) A Radiochemical Microassay for Aspartate Aminotransferase Activity in the Nervous System. *Anal Biochem* 172(1):96-103
- 60 Perales M, Sener A, Malaisse W (1992) Radioisotopic Assay of Aspartate and Alanine Aminotransferase. *Clin Biochem* 25(2):105-7
- 61 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30665287/>
- 62 <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.8b00719>
- 63 He Y, Chen H (1997) The kinetics-based electrochemical determination of serum glutamate pyruvate transaminase activity with a gold microelectrode. *Analytica Chimica Acta* 353.2-3:319-323
- 64 Peguin S, Coulet P, Bardeletti G (1989) Pyruvate oxidase and oxaloacetate decarboxylase enzyme electrodes : Simultaneous Determination of Transaminases with a Two-electrode-based Analyzer. *Analytica Chimica Acta* 222.1:83-93
- 65 Kihara K, Yasukawa E, Hayashi M, Hirose S (1984) Determination of glutamate-pyruvate transaminase activity in blood serum with a pyruvate oxidase/poly(vinyl chloride) membrane sensor. *Analytica Chimica Acta* 59:81-86
- 66 Kihara K, Yasukawa E, Hirose S (1984) Sequential Determination of Glutamate-Oxalacetate Transaminase and Glutamate-Pyruvate Transaminase Activities in Serum Using an Immobilized Bienzyme-Poly(vinyl Chloride) Membrane Electrode. *Anal Chem* 56(11):1876-80
- 67 Suman S, Singhal R, Sharma A, Malthotra B, Pundir (2004) Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical* 107.2:768-772
- 68 Pan S, Arnold M (1996) Selectivity Enhancement for Glutamate With a Nafion/glutamate Oxidase Biosensor. *Talanta* 43(7):1157-62
- 69 Rahman A, Kwon N, Won M, Choe E, Shim Y (2015) Functionalized Conducting Polymer as an Enzyme-Immobilizing Substrate: An Amperometric Glutamate Microbiosensor for in Vivo Measurements. *Anal Chem* 7(15):4854-60
- 70 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566319301393>

-
- 71 <https://www.mdpi.com/1424-8220/16/6/767/htm>
- 72 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269719309066>
- 73 Xuan G, Oh S, Choi E (2003) Development of an Electrochemical Immunosensor for Alanine Aminotransferase. *Biosens Bioelectron* 19(4):365-71
- 74 <https://www.mdpi.com/2072-666X/7/1/9>
- 75 <https://www.mdpi.com/2079-6374/10/11/187/htm>
- 76 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19362203/>
- 77 <https://www.mdpi.com/2079-6374/2/2/234/htm>
- 78 Pyeshkova V, Kucherenko I, Soldatkin O, Dzyadevych S (2010) Sensor's degradation, methodology and certification. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 1(7)
- 79 Lehninger A, Nelson D, Cox M (1982) *Principles of biochemistry* 1nd edition: 175
- 80 Toney M D (2013) *Encyclopedia of Biological Chemistry // Pyridoxal Phosphate:708–711*
- 81 Lehninger A, Nelson D, Cox M (1993) *Principles of biochemistry* 2nd edition // Amino Acid Oxidation and the Production of Urea
- 82 Soldatkina O, Kucherenko I, Pyeshkova V, Alekseev S, Soldatkin O, Dzyadevych S (2017) Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Research Letters* 12(1):594
- 83 Ferguson D (1988) "Physiology for Dental Student", chapter 3 – Blood plasma, pp 42-53