НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної біоінженерії

«На правах рукопису»
УДК _____

До захисту допущено:

Завідувач кафедри
_____Олександр ГАЛКІН
(підпис)

«___»_____2024 р.

Магістерська дисертація

зі спеціальності: 163 Біомедична інженерія, ОПП «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»_____
на тему: Розробка високочутливого амперометричного біосенсора для визначення АСТ в біологічних рідинах _____

Виконала: студентка 2 курсу, групи БФ-21мп

_____Марчук Оксана Дмитрівна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Науковий керівник доц. каф. ТМБ, д.б.н., с.н.с., Солдаткін О.О. _____
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент д.б.н., професор каф. біоенергетики, біоінформатики і екобіотехнології, Горго Ю.П. _____
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.
Студентка _____
(підпис)

Київ – 2024 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної біоінженерії

Рівень вищої освіти: другий (магістерський)
Спеціальність: 163 – Біомедична інженерія
Освітньо-професійна програма «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
В.о. завідувача кафедри
трансляційної медичної
біоінженерії

_____Олександр ГАЛКІН
«____» _____2023 р.

ЗАВДАННЯ
на магістерську дисертацію студенту
Марчук Оксані Дмитрівні
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема дисертації: Розробка високочутливого амперометричного біосенсора для визначення АСТ в біологічних рідинах
науковий керівник дисертації доц. каф. ТМБ, д.б.н., с.н.с., Солдаткін О.О.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом по університету від «06» листопада 2023 р. № 5161-с.
2. Термін подання дисертації здобувачем «09» січня 2024 р.
3. Об'єкт дослідження: методи визначення рівня АСТ в зразках крові людини.
4. Предмет дослідження: розробка ферментної системи та підбір оптимальних умов функціонування високочутливого амперометричного біосенсору.
5. Перелік завдань, які потрібно розробити: 1. Проаналізувати наявну літературу стосовно таридиційних та сучасних методів вимірювання АСТ. 2. Розробити амперометричний біосенсор на основі глутаматоксидази для визначення АСТ. 3. Дослідити вплив параметрів іммобілізації глутаматоксидази та концентрацій субстратів АСТ на функціонування біосенсору. 4. Вивчити аналітичні характеристики розробленого АСТ-чутливого біосенсору. 5. Здійснити апробацію розробленого біосенсору при аналізі АСТ в зразках сироватки. 6. Оптимізувати методику спектрофотометричного вимірювання АСТ та провести

спектрофотометричний аналіз зразків сироватки крові. 7. Порівняти результати біосенсорного та спектрофотометричного методів визначення АСТ. 8. Розробити стартап-проект по створенню та комерціалізації амперометричного біосенсору для визначення рівня АСТ в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові людини.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: презентація на 16 слайдів.
7. Консультанти розділів дисертації*: не передбачено робочим навчальним планом.
8. Дата видачі завдання: «02» листопада 2023 р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Отримання завдання на МД	До 2.11.2023	
2	Огляд та аналіз літератури для МД	До 13.11.2023	
3	Розробка ферментної системи, підбір оптимальних умов функціонування, опис розроблених методик	До 13.12.2023	
4	Дослідження аналітичних характеристик розробленого біосенсору	До 18.12.2023	
5	Апробація розробленого біосенсору	До 22.12.2023	
6	Розробка стартап-проєкту	До 29.12.2023	
7	Формування висновків до отриманих результатів МД	До 01.01.2024	
8	Оформлення роботи	До 05.01.2024	
9	Здача роботи на нормоконтроль	До 09.01.2024	
10	Захист МД	18.01.2024	

Здобувач _____ _____
(підпис) (ініціали, прізвище)

Науковий керівник дисертації _____ _____
(підпис) (ініціали, прізвище)

РЕФЕРАТ

Марчук О.Д. Розробка високочутливого амперометричного біосенсора для визначення АСТ в біологічних рідинах. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 163 Біомедична інженерія, ОПП «Регенеративна та біофармацевтична інженерія».

Обсяг роботи становить 73 сторінки, містить 26 ілюстрацій, 4 таблиці. Загалом опрацьовано 75 джерел.

Актуальність: Аспартатамінотрансфераза (АСТ) — ендогенний фермент із групи трансфераз, підгрупи амінотрансфераз, широко використовуваний у медичній практиці для лабораторної діагностики уражень міокарда і печінки. Референтним значенням АСТ в крові є від 5 до 40 од.акт./л. Зростання показника в 1,5-2 рази від верхнього граничного значення може свідчити про пошкодження внутрішніх органів. При пошкодженні міокарда (н-д, при інфаркті міокарда), печінки (при гепатитах, цирозі печінки) в результаті цитолізу (руйнування клітин) цей фермент потрапляє в кров, внаслідок чого його можна виявити та використати для діагностики та контролю патологічних змін в організмі людини. Відповідно, створення нових експрес-методів для швидкого, точного, безпечного та чутливого визначення вмісту АСТ у крові на сьогодні є важливим питанням.

Мета: розробити високочутливий амперометричний біосенсор для визначення АСТ в біологічних рідинах. Об’єкт дослідження: методи визначення рівня АСТ в зразках крові людини. Предмет дослідження: розробка ферментної системи та підбір оптимальних умов функціонування високочутливого амперометричного біосенсора. Практична цінність: проведено апробацію роботи біосенсора при роботі з реальними зразками сироватки крові і показано принципову можливість практичного застосування.

Ключові слова: біосенсор, медична діагностика, АСТ, біоселективна мембрана, глутаматоксидаза, амперометричний перетворювач.

ABSTRACT

Marchuk O.D. Development of a Highly Sensitive Amperometric Biosensor for AST Determination in Biological Fluids. – Master's Thesis in Biomedical Engineering, Specialization 'Regenerative and Biopharmaceutical Engineering.'

The volume of the work is 73 pages, containing 26 illustrations, 4 tables. A total of 75 sources have been processed.

Relevance: Aspartate aminotransferase (AST) is an endogenous enzyme from the aminotransferase group, widely used in medical practice for laboratory diagnostics of myocardial and liver damage. The reference value of AST in the blood is from 5 to 40 U/L. An increase in the indicator by 1.5-2 times from the upper limit may indicate damage to internal organs. In the case of myocardial (e.g., myocardial infarction) or liver damage (hepatitis, cirrhosis), due to cytolysis (cell destruction), this enzyme enters the blood, making it detectable and usable for the diagnosis and monitoring of pathological changes in the human body. The availability of a rapid, accurate, safe, and sensitive test for determining the AST content in the blood is currently an important issue.

Objective: To develop a highly sensitive amperometric biosensor for AST determination in biological fluids.

Research Object: Methods for determining AST levels in human blood samples. Research Subject: Development of an enzymatic system and selection of optimal conditions for the operation of a highly sensitive amperometric biosensor.

Practical Value: The developed biosensor was validated in the analysis of real blood serum samples from patients.

Keywords: biosensor, medical diagnostics, AST, biosensitive membrane, glutamate oxidase, amperometric transducer.

ЗМІСТ

ВСТУП 8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД 10
1.1. Обґрунтування важливості визначення рівня АСТ в сироватці крові 10
1.2. Традиційні методи вимірювання АСТ 14
1.3. Біосенсорні методи вимірювання АСТ 23
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ 34
2.1. Матеріали 34
2.2. Конструкція амперометричного перетворювача 34
2.3. Схема установки для амперометричних вимірювань 35
2.4. Методика нанесення біоселективної мембрани 36
2.5. Методика біосенсорного вимірювання вмісту АСТ 37
2.6. Методика спектрофотометричного вимірювання вмісту АСТ 38
2.7. Методика роботи з реальними зразками при біосенсорному аналізі 40
2.8. Методика роботи з реальними зразками при спектрофотометричному аналізі 41
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДНА ЧАСТИНА 41
3.1. Розробка амперометричного біосенсора для визначення АСТ 41
3.1.1. Принцип роботи біосенсора для визначення АСТ 41
3.1.2. Вплив параметрів іммобілізації глутаматоксидази на функціонування біосенсора 44
3.1.3.Підбір концентрацій субстратів АСТ для оптимального функціонування біосенсора 46
3.1.4. Дослідження аналітичних характеристик біосенсора 48
3.1.5. Біосенсорне вимірювання АСТ в зразках сироватки крові 49
3.2. Спектрофотометрична методика вимірювання АСТ 50
3.2.1. Принцип спектрофотометричного вимірювання АСТ 50
3.2.2. Підбір довжини хвилі 52
3.2.3. Оптимізація процедури реєстрації сигналу спектрофотометра 54

3.2.4.Вивчення впливу концентрації глутаматоксидази на спектрофотометричний аналіз 55
3.2.5. Аналітичні характеристики спектрофотометричного методу 56
3.2.6.Спектрофотометричне вимірювання АСТ в зразках сироватки крові . 57
3.2.7. Порівняння результатів біосенсорного та спектрофотометричного методів……...58
РОЗДІЛ 4. ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА 60
ВИСНОВКИ 64
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 65

ВСТУП

Сучасна медицина надзвичайно прагматична у своїх зусиллях спрямування на покращення діагностики та моніторингу хвороб. Одним із ключових аспектів є розробка високочутливих та швидкодіючих біосенсорів, які дозволяють виявляти та квантифікувати різноманітні біомаркери у біологічних рідинах. В цьому контексті, значну увагу привертає аспартатамінотрансфераза (АСТ), один з ключових ензимів, що відіграє важливу роль у діагностиці печінкових та серцевих захворювань.

АСТ — ендогенний фермент із групи трансфераз, підгрупи амінотрансфераз, широко використовуваний у медичній практиці для лабораторної діагностики уражень міокарда (серцевого м'яза) і печінки. Синтезується внутрішньоклітинно, і в нормі лише невелика частина цього ферменту потрапляє в кров. Референтним значенням АСТ в крові є від 5 до 40 од.акт./л. Зростання показника в 1,5-2 рази від верхнього граничного значення може свідчити про пошкодження внутрішніх органів. При пошкодженні міокарда (наприклад, при інфаркті міокарда), печінки (при гепатитах, цирозі печінки) в результаті цитолізу цей фермент потрапляє в кров, внаслідок чого його можна виявити та вжити необхідних медичних заходів для збереження життя пацієнта.

Об’єкт дослідження: методи визначення рівня АСТ в зразках крові людини. Предмет дослідження: розробка ферментної системи та підбір оптимальних умов функціонування високочутливого амперометричного біосенсору. Мета: розробити високочутливий амперометричний біосенсор для визначення АСТ в біологічних рідинах.

Завдання:

1. Проаналізувати наявну літературу стосовно традиційних та сучасних методів вимірювання АСТ.

2. Розробити амперометричний біосенсор на основі глутаматоксидази для визначення АСТ.

3. Дослідити вплив параметрів іммобілізації глутаматоксидази та концентрацій субстратів АСТ на функціонування біосенсору.

4. Вивчити аналітичні характеристики розробленого АСТ-чутливого біосенсору.

5. Здійснити апробацію розробленого біосенсору при аналізі АСТ в зразках сироватки.

6. Оптимізувати методику спектрофотометричного вимірювання АСТ та провести спектрофотометричний аналіз зразків сироватки крові.

7. Порівняти результати біосенсорного та спектрофотометричного методів визначення АСТ.

8. Розробити стартап-проект по створенню та комерціалізації амперометричного біосенсору для визначення рівня АСТ в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові людини.

Теоретичну основу дослідження становлять фахова література з біомедичної інженерії, матеріали конференцій та статті в вітчизняних і закордонних фахових виданнях, в тому числі індексованих в базах даних, матеріали з інтернет-ресурсів. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані та описані автором особисто. Планування експериментальної роботи, аналіз та обговорення результатів, формулювання висновків проводилось спільно із науковим керівником.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Обґрунтування важливості визначення рівня АСТ в сироватці крові

Аспартатамінотрансфераза (АСТ) є ферментом, який відіграє вирішальну роль у метаболізмі амінокислот, підтримці співвідношення NAD+/NADH у клітинах, активності циклу Кребса, синтезі пуринових/піримідинових основ, синтезі сечовини та білка та глюконеогенезі. Первинна структура АСТ включає послідовність амінокислот, які згортаються в тривимірну форму, створюючи каталітичні центри, необхідні для його ферментативної функції. Специфічне розташування амінокислот у структурі АСТ має вирішальне значення для його здатності полегшувати перенесення аміногруп між субстратами.

Центральна біохімічна функція АСТ включає каталізування реакції трансамінування між аспартатом і альфа-кетоглутаратом, яка була відкрита в м'язовій тканині в 1937 році Браунштейном і Кріцманом [1]. У цій реакції аміногрупа з аспартату переноситься на альфа-кетоглутарат, що призводить до утворення оксалоацетату та глутамату. Це трансамінування є ключовим етапом у метаболізмі амінокислот, полегшуючи взаємоперетворення амінокислот у клітинах. АСТ є піридоксальфосфат (PLP)-залежним ферментом, тобто для його активності потрібен вітамін B6 у формі піридоксальфосфату як кофактора.

Роль АСТ у метаболізмі амінокислот виходить за межі трансамінування аспартату. Беручи участь у перенесенні аміногруп, АСТ сприяє синтезу незамінних амінокислот і розщепленню надлишку азотовмісних сполук. Ця взаємопов’язана мережа реакцій підкреслює важливість АСТ у підтримці амінокислотного балансу в біологічних системах.

У людини АСТ існує у вигляді двох генетично та імунологічно відмінних ізоферментів: цитоплазматичної АСТ (cAST або GOT1) та

мітохондріальної АСТ (mAST або GOT2), і обидві форми зустрічаються в кровообігу [2].

Обидва ізоферменти каталізують ту саму реакцію, хоча й з різною кінетикою, мають спільну гомологію послідовності ~45% і, як вважають, еволюціонували із загального предкового гена (через дуплікацію гена) [3]. Фермент складається з двох ідентичних димерів, де кожен димер складається з великого та малого доменів [4]. Кожен мономер цитоплазматичної АСТ являє собою поліпептидний ланцюг із 413 амінокислотних залишків із вторинною структурою, що складається з α-спіралей і β-ланцюгів, і молекулярною масою приблизно 45 кД [5,6]. Кожен димер має ідентичний сайт зв’язування піридоксаль-5’-фосфату, який розташований на межі розділу димерів (рис. 1.1).

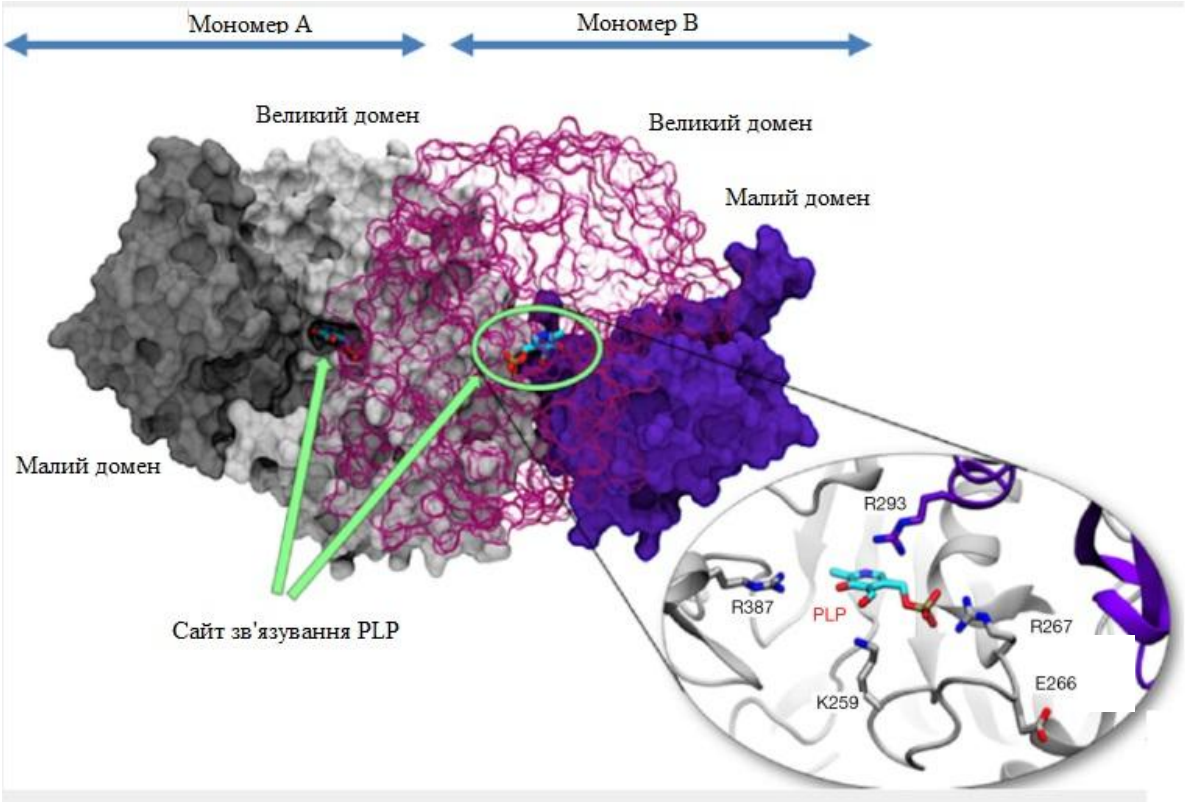

Рисунок 1.1 - Структура цитоплазматичної АСТ людини. Каталітично важливі амінокислотні залишки показані однією літерою та цифрою: Е глутамінова кислота; К, лізин; R — аргінін; PLP — піридоксаль-5'-фосфат [6].

Піридоксаль-5'-фосфат стабілізується низкою навколишніх амінокислотних залишків. Мітохондріальна АСТ людини містить 430 амінокислотних залишків (виведених з аналізу нуклеотидної послідовності кДНК), включаючи N-кінцеву послідовність 29 амінокислот, яка необхідна для проникнення ферменту в мітохондрії [7,8]. Цитоплазматична АСТ є більш кислою (ізоелектрична точка ~5,5) порівняно з мітохондріальною АСТ (ізоелектрична точка >8) [9,10].

У той час як мітохондріальна АСТ існує як єдина форма, цитоплазматична АСТ існує в 3-5 ізоформах, які виявляються за допомогою ізоелектричного фокусування [2]. У печінці 80% активності АСТ знаходиться в мітохондріях і 20% в цитоплазмі [11]. На частку мітохондріальної АСТ припадає близько 65% загальної активності АСТ у серцевій тканині людини [12].

Клітини органів, в яких присутня АСТ, руйнуються при захворюваннях і це призводить до виведення ізоферментів АСТ в кровообіг. Білок АСТ виводиться з кровообігу переважно синусоїдними клітинами в печінці [13]. Середній період напіввиведення з плазми становить 17 годин для загальної АСТ і 87 годин для мітохондріальної АСТ [14].

Відмінності в періодах напіврозпаду мітохондріальної та цитоплазматичної АСТ мають функціональне значення. Було виявлено, що активність мітохондріальної АСТ (АСТм) була нижчою та виникла пізніше порівняно з активністю цитоплазматичної АСТ (АСТц) після гострого інфаркту міокарда [15]. Активність ASTm значно корелювала з дисфункцією лівого шлуночка та лівошлуночковою недостатністю [16]. Крім того, активність ASTm негативно корелювала з піковим тиском у лівому шлуночку, максимальним dp/dt, серцевим продуктом, коронарним кровотоком, рівнем аденозинтрифосфату та рівнем креатинфосфату після реперфузії, що вказує на вищий ступінь ураження міокарда [17]. Ці дані свідчать про те, що сироваткова активність ASTm у коронарній венозній крові може бути використана як індекс для оцінки ступеня ураження міокарда [18].

Відмінності в періодах напіврозпаду між ASTm і ASTc можуть відображати їхню різну роль у клітинних процесах і потенційно можуть слугувати діагностичним інструментом для оцінки серцевої функції та травми [19].

Активність АСТ була виявлена майже у всіх тканинах людини. Розподіл активності АСТ у тканинах людини, виражений як відношення (в дужках) до активності, виявленої в сироватці, є таким: серце (7700), печінка (7000), скелетні м’язи (4800), нирки (4500), мозок (2500) , підшлункова залоза (1400), селезінка (700), легені (500) та еритроцити (40) [11].

На початку 1950-х років були розроблені різні методи вимірювання амінотрансфераз і введено показання до діагностичного тестування (переважно для захворювань печінки) [11,20].

Рівень АСТ у сироватці крові в нормі становить 5–40 Од/л. [21]. Нормальний рівень АСТ у крові становить 23,4 ± 9,9 од.акт./л для чоловіків і 19,1 ± 9,8 од.акт./л для жінок [22]. Нещодавно було підраховано, що >19 од.акт./л для жінок і >30 од.акт./л для чоловіків вважається аномальним рівнем [23,24]. Пошкодження клітин гепатоцитів або будь-якої з вищезгаданих тканин викликає аномально високий рівень АСТ у сироватці крові.

Такі хвороби, як ішемічний інсульт [25], ішемічна хвороба серця, жирова інфільтрація [26], жовтяниця, діабет, дерматоміозит, м’язова дистрофія Дюшенна [27], рак легенів [28], прекламмпсія [29], отруєння хлорорганічними сполуками, гепатит (запалення печінки) [30], цироз (рубцювання печінки) [31], пухлина або рак печінки [32], алкогольна хвороба печінки [33], інфаркт міокарда (серцевий напад) [34], застійна серцева недостатність [35], пошкодження або запалення скелетних м’язів [36], рабдоміоліз (важке руйнування м'язів) [37], панкреатит (запалення підшлункової залози) [38], гемохроматоз (розлад перевантаження залізом) [39], шокові або сильні стресові стани також можуть супроводжуватися підвищенням активності АСТ в крові. Наприклад, при розвитку інфаркту

міокарда в крові пацієнта спостерігається підвищення активності АСТ у 6-8 разів [40].

Таким чином, вміст цього ферменту в сироватці може служити біомаркером для клінічного діагностування. АСТ, хоч і не є специфічним маркером для конкретних хвороб, відіграє важливу роль у загальному оцінюванні здоров'я. Його вимірювання допомагає вчасно виявляти та контролювати потенційні патологічні зміни в організмі. Зважаючи на серйозні наслідки перерахованих захворювань, важливо мати ефективний і швидкий метод визначення вмісту АСТ у крові.

1.2. Традиційні методи вимірювання АСТ

Активність АСТ традиційно визначається двома основними шляхами. Перший шлях включає пряме виявлення молекул цього ферменту за допомогою хроматографії та радіохімічних методів. Другий шлях використовує підрахунок вмісту продуктів ензиматичної реакції та подальший математичний розрахунок концентрації ферменту. Серед технік, що використовуються для цього, можна виділити хроматографію, спектрофотометрію, хемолюмінесценцію, флуоресценцію та колориметрію.

Колориметрія

Історично колориметричні методи широко використовувалися для вимірювання АСТ. Принцип колориметричного аналізу базується на взаємодії ферменту та субстрату для утворення та колориметричної оцінки кольорового, світлопоглинаючого комплексу. Це досягається за допомогою додавання іншого реагента після зупинки реакції ферменту. Цей метод також відомий як метод кінцевої точки, двох точок, вибірковий чи фіксованого часу, і вимагає створення калібрувальних кривих для точного вимірювання.

Бабсон та ін. [41] представили колориметричний аналіз активності АСТ у сироватці крові з використанням стабілізованої солі діазонію, яка специфічно реагує з щавлевооцтовою кислотою з утворенням сполуки

червоного кольору. Lippi та Guidi [42] повідомили про колориметричний ультрамікрометод (префікс «ультра-» означає здатність методу виявляти та вимірювати речовини в наднизькому діапазоні мікрограмів або нанограмів) для визначення АСТ у сироватці, що заснований на використанні глутаматдегідрогенази для ферментативної оцінки утвореного глутамату. Дегідрування глутамату призводило до відновлення солі діазонію, а далі виконувалось фотометричне зчитування забарвленої сполуки при 520 нм. Їхні експериментальні результати показали, що необхідно 20 мкл сироватки та лише 45 хвилин інкубації при температурі 37 °C. Загальну колориметричну процедуру для вимірювання АСТ, яка була пов'язані з системою NADH/NAD+, описав Whitaker [43]. В описаній колориметричній процедурі вимірювання АСТ обговорюються дві різні колірні реакції, пов'язані з використанням PMS (феназину метосульфат):

- Реакція виробництва формазану: NADH відновлює сіль тетразолію INT (2-(4-йодофеніл)-3-(4-нітрофеніл)-5-(2,4-дисульфофеніл)-2H-тетразолію, мононатрієва сіль) у присутності PMS. Це відновлення призводить до утворення забарвленого формазану. Стабільний формазановий продукт потім вимірюють при 500 нм.
- Реакція утворення дипіридильного комплексу заліза: NADH знижує вміст солі заліза за наявності PMS. Це відновлення призводить до утворення забарвленого двовалентного дипіридильного комплексу. Стабільний забарвлений комплекс вимірюється при 520 нм.

Екстинкція (поглинання) на вказаних довжинах хвиль вказує на концентрацію NADH в реакції, що дозволяє кількісно визначити активність ферменту.

Переваги колориметричного методу вимірювання АСТ: висока специфічність та чутливість реакції, мінімізація впливу фону з допомогою вимірювання зразка, що не містить аналіту («порожній реагент»), яка дозволяє отримати більш точні результати вимірювань. Недоліки колориметричного методу вимірювання АСТ: обмежена кількість проб

(можливість лише одноразового вимірювання проби або потреба у великому обсязі вихідного матеріалу для проведення повторних досліджень), чутливість до зовнішніх факторів, необхідність у тривалому експерименті для виконання реакції та отримання результатів.

Спектрофотометрія

Спектрофотометричний метод заснований на вимірюванні поглинання світла, яке поглинається речовиною при проходженні через неї. У випадку вимірювання активності АСТ, основний фокус спрямований на поглинання світла ферментом у процесі його реакції зі специфічним субстратом.

У 1951 році Каммарата і Коен [44] представили спектрофотометричний метод для вивчення кінетики амінотрансферазних реакцій. У 1954 році Кармен та ін. [45] продемонстрував наявність АСТ і АЛТ у сироватці та крові за допомогою паперової хроматографії. Однак цей метод був непрактичним і займав дуже багато часу [46]. У тому ж році Кармен та ін. розробив точний і простий спектрофотометричний метод, який пізніше використали Ladue та ін. для того, щоб вперше продемонструвати підвищення активності АСТ у сироватці крові пацієнтів з гострим інфарктом міокарда [47]. Історично це перший біохімічний тест, який використовується для діагностики гострого інфаркту міокарда. Метод послужив основою для багатьох сучасних аналізів. Вимірювання АСТ десятиліттями використовувалося для діагностики гострого інфаркту міокарда, поки його не замінили більш чутливими та точними методами, такими як визначення рівнів біомаркерів, зокрема, серцевих тропонінів, які стали стандартом у сучасній діагностиці серцевих захворювань [34].

Itoh і Srere [48] описали спектроскопічний метод, який використовується для постійного вимірювання активності АСТ. У каскаді реакцій першою є перетворення аспартату в оксалоацетат, яке каталізується з допомогою АСТ. Потім оксалоацетат бере участь у реакції з ацетил-CoA, якій сприяє цитратсинтаза, утворюючи цитрат і CoA. CoA утворюється у формі CoASH (відновлений коензим А). CoASH реагує з DTNB (5,5'-дитіо-біс

(2-нітробензойна кислота)), в результаті чого утворюється хромофор (сполука, яка поглинає світло) з високим молярним коефіцієнтом екстинкції. Поглинання світла цим хромофором при 412 нм служить кількісним показником активності ферменту.

До переваг використання спектрофотометрії для визначення рівня активності АСТ належать: висока специфічність, точність результатів, широкий діапазон застосування. Недоліки використання спектрофотометрії включають: специфічні вимоги до підготовки зразків, обмежену чутливість до низьких концентрацій, високу чутливість до зовнішніх чинників, таких як забруднення або зміни температури, що впливає на точність вимірювань.

Хемолюмінесценція і електрохемолюмінесценція

Метод хемілюмінісценції для визначення АСТ базується на вимірюванні світіння, яке виникає під час хімічної реакції між певними речовинами, яка відбувається у присутності АСТ.

Основні етапи цього методу виглядають наступним чином:

1. Конвертація субстрату - спочатку l-аланін (амінокислота) перетворюється на піруват за участю АСТ, утворюючи l-глутамат.

2. Каталіз глутаматоксидазою - далі l-глутамат піддається каталізу глутаматоксидазою, що призводить до утворення перекису водню (H_2O_2).

3. Хемілюмінесценція - окислений H_2O_2 реагує з реагентом, таким як люмінол, що призводить до хемілюмінісценції - виділення світла в результаті хімічної реакції.

У джерелі [49] описано два методи визначення концентрації АСТ в культуральному середовищі клітин ссавців за допомогою хемілюмінісцентного проточно-інжекційного аналізу (flow injection analysis, FIA) та електрохемілюмінісцентного (electrochemiluminescent, ECL) детектування.

Дослідники Janasek та Spohn [50] розробили хемілюмінісцентні процедури FIA для ферментативного визначення l-аспартату, α-кетоглутарату та l-глутамату в середовищі для культивування клітин ссавців

у концентраційному діапазоні від 5 мкМ до 1 мМ. Використовувався проточний мікрореактор із АЛТ та глутаматоксидазою, що були іммобілізовані на пористих скляних кульках, та хемілюмінісцентний детектор для генерованого пероксиду водню. Реакцію яку каталізували або іони Co(II), або грибкова пероксидаза. Після певних модифікацій активність АСТ можливо опосередковано вимірювати за динамікою світіння детектору.

Marquette та інші [51] розробили біосенсорний чіп, який використовує ECL детектування ферментативно виробленого пероксиду водню. Чіп містить шість різних оксидаз, специфічних для різних речовин, іммобілізованих на хелатних або аніонообмінних кульках, що закріплені на поверхні скляної вуглецевої фольги, та покритих PVA-SbQ фотополімером. Вимірювання чіпа проводилося за допомогою прикладання потенціалу між електродами та захоплення числового зображення чіпа камерою CCD протягом 3 хвилин.

Таким чином, інтенсивність світіння є пропорційною кількості АСТ у зразку. Вимірюючи це світіння, можна визначити концентрацію АСТ. Цей метод відрізняється високою чутливістю, низьким фоновим сигналом і широким діапазоном вимірювань концентрацій, що робить його ефективним для діагностики та вивчення різних станів, пов'язаних із роботою АСТ. Існують речовини, які можуть знижувати або блокувати хемілюмінесцентний сигнал, такі як супероксиддисмутаза або гідрохлорид метилового ефіру N-нітро-L-аргініну. Перед проведенням вимірювання концентрація таких інгібіторів повинна бути зменшена, оскільки вони можуть впливати на ефективність методу [52]. Недоліки методу хемілюмінісценції для визначення рівня АСТ включають можливість впливу інгібіторів, складність використання, обмежену специфічність та високі витрати на реагенти та обладнання.

Хроматографія

Хроматографія - це метод розділення та аналізу фізико-хімічних властивостей речовин у зразках. У джерелі [53] автори представили чутливий

і відтворюваний аналіз активності АСТ за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) на основі УФ-детектора. Це означає, що розділення проводиться у рідинній фазі (розчиннику) під високим тиском через колонку з роздільним матеріалом. УФ-детектор вимірює абсорбцію світла при визначеній довжині хвилі, що дозволяє визначати кількість специфічних речовин у зразку. У даному методі ферментативно утворений глутамат розділяється на компоненти за допомогою хроматографічного розділення. Головна перевага цього методу полягає в тому, що він дозволяє прямо вимірювати активність АСТ, визначаючи кількість утвореного глутамату протягом визначеного періоду часу, без необхідності проведення додаткових реакцій. Цей підхід також є дуже чутливим та дозволяє ідентифікувати всі компоненти реакції, що робить контроль за експериментом ефективним і спрощеним.

Недоліки методу включають: складність оптимізації умов хроматографії (завдяки наявності різних сполук із схожою хроматографічною поведінкою, оптимізація умов хроматографії може бути складною, особливо коли речовини мають різні гідрофобність та заряд), необхідність використання спеціалізованого обладнання та високих витрат (що робить метод недоступним для деяких лабораторій), специфічність детектора (використання УФ-детектора може вимагати високої специфічності для аналізу, особливо при наявності інших сполук, які можуть абсорбувати світло при аналогічних довжинах хвиль), можливість побічних реакцій (що може впливати на точність та відтворюваність результатів), обмежена кількість інформації (хоча HPLC дозволяє розділити компоненти реакції, він може обмежити кількість інформації, що може бути отримана про реакційний хід та можливі побічні продукти).

Флуорисценція та УФ-абсорбція

Флуоресцентний метод - це метод аналізу, який використовує вимірювання флуоресценції для визначення концентрації або активності

речовин у зразку. У випадку вимірювання активності АСТ, використовується флуоресценція NADH, що виникає під час ферментативної реакції.

Процес включає наступні етапи:

1. Підготовка реакційної суміші - зразок, який містить АСТ, змішується з реагентами, включаючи компоненти необхідні для ферментативної реакції.

2. Ферментативна реакція - АСТ у каталітичній реакції перетворює аспартат та α-кетоглутарат у оксалоацетат та глутамат, з супутнім утворенням NADH.

3. Накопичення NADH - надлишковий NADH, сформований під час реакції, може перециклюватися або накопичуватися під час взаємодії з іншими компонентами системи.

4. Вимірювання флуоресценції NADH за допомогою флуоресцентного детектора при заданих характеристиках світлового збудження та емісії.

5. Кількісне визначення - флуоресцентний сигнал пов'язується з концентрацією або активністю АСТ у зразку. Лінійний відгук дозволяє кількісно визначати цю концентрацію або активність.

Головна перевага полягає в тому, що флуоресцентний метод дозволяє виміряти активність АСТ без необхідності проведення додаткових реакцій, а чутливість ідентифікувати всі компоненти реакції робить контроль за експериментом ефективним і спрощеним. Однак слід зазначити, що на результати може впливати ряд факторів, таких як pH, освітленість, температура тощо.

У методі Rietz і Guilbault [54], флуоресценція NADH вимірюється при 455 нм (λex=365 нм) як показник активності АСТ. Лінійний відгук спостерігається в діапазоні концентрацій АСТ від 2.2 до 106 од.акт./л.

В іншому методі, представленому Khampha et al. [55], застосовується бі-ферментний підхід для підсилення сигналу. Надлишковий NADH, сформований під час ферментативної реакції, перециклюється між двома

ферментами, що призводить до накопичення NADH. Флуоресценція та УФ-абсорбція цього накопиченого NADH використовуються для кількісного визначення концентрації АСТ.

Флуоресцентний метод для визначення активності АСТ має свої обмеження та недоліки: чутливість до змін у фізичних та хімічних умовах (pH, температура, сила іонів), менша специфічність у порівнянні з іншими методами, великі витрати на обладнання та певну експертизу для його обслуговування, наявність фонового сигналу або його відбиття від інших компонентів, що ускладнює інтерпретацію результатів.

Радіохімічний аналіз

Гаррісон та ін. [56] описали радіохімічну процедуру для вимірювання активності АСТ, що передбачає використання L-2,3-[3H] аспартату, міченого тритієм. L-2,3-[3H] аспартат використовується як субстрат, де атоми тритію розташовані в положеннях 2 і 3 молекули аспартату. Мічений аспартат піддавався трансамінуванню в присутності α-кетоглутарату з утворенням оксалоацетату. Реакція включала обмін атомів тритію з водою. Тритієва вода, що утворювалась під час реакції трансамінування, відокремлювалась від радіоактивно міченого аспартату шляхом пропускання реакційної суміші через катіонообмінну колонку. Після цього проводилось підтвердження, що радіоактивність продукту реакції (оксалоацетату) пов'язана з водою за допомогою аніонного обміну HPLC та випарювання. Внаслідок вимірювання рівня радіоактивності у кожній фракції ізотопомірної речовини з допомогою рідино-сцинтиляційного лічильника, визначалась активність АСТ. Цей високочутливий метод дозволяв визначати навіть невеликі кількості АСТ в тканині мозку. Недоліками радіохімічного аналізу для визначення активності АСТ є його складність у виконанні, потенційна шкідливість для здоров'я, а також необхідність використання спеціального обладнання та освітлення.

Фактори, що негативно впливають на точність вимірювань

1. Вплив гемолізу

Гемоліз (розпад еритроцитів) може перешкоджати вимірюванню АСТ. Вивільнення внутрішньоклітинної АСТ з пошкоджених еритроцитів може призвести до хибно підвищених результатів. Належне поводження зі зразками та заходи контролю якості допомагають запобігти цій проблемі.

2. Відсутність конкретності

Деякі методи вимірювання можуть бути недостатньо специфічними, особливо коли інші ферменти або речовини сприяють спостережуваній зміні кольору. Ця відсутність специфічності може призвести до неточних результатів, особливо у складних біологічних зразках.

3. Вплив температури та pH

Ферментативні реакції, що беруть участь у вимірюванні АСТ, залежать від температури та pH. Коливання цих параметрів під час обробки та аналізу зразків можуть вплинути на точність вимірювань. Правильне калібрування та контроль мають вирішальне значення для усунення цих впливів.

4. Матричні ефекти в комплексних зразках

Біологічні зразки, особливо ті, що отримані з різних тканин, можуть містити різноманітні інтерферуючі речовини. Ці матричні ефекти можуть впливати на точність вимірювань, особливо в методах з обмеженою специфічністю. Для мінімізації цих ефектів може знадобитися попередня обробка зразків або використання матричних стандартів.

5. Нестандартизація між методами

Відсутність стандартизації різних методів вимірювання може створити проблеми при порівнянні результатів між лабораторіями. Різні методології, реагенти та інструменти можуть давати різні результати, що робить важливим встановлення та дотримання стандартизованих протоколів.

6. Стандарти калібрування

Неадекватні або суперечливі стандарти калібрування можуть призвести до неточних вимірювань. Регулярне калібрування з використанням сертифікованих еталонних матеріалів має вирішальне значення для підтримки точності в різних партіях і приладах.

7. Стабільність ферменту

Стабільність ферменту АСТ може бути порушена під час тривалого зберігання або за певних умов зразка. Забезпечення належного зберігання зразків і поводження з ними є життєво важливим для підтримки активності ферментів і досягнення надійних результатів.

8. Варіабельність приладів

Різниця в інструментарії, навіть в межах одного методу, може сприяти мінливості результатів. Регулярне технічне обслуговування, перевірки калібрування та перевірка приладу необхідні для мінімізації невизначеності, пов’язаної з приладом.

9. Забруднення зразків

Забруднення зразків під час збирання або аналізу може ввести сторонні речовини, які перешкоджають ферментативній реакції. Суворе дотримання належних протоколів поводження зі зразками та підтримання чистоти лабораторного середовища має важливе значення.

Усунення цих обмежень вимагає постійного контролю якості, валідації методів і постійних зусиль у напрямку стандартизації для підвищення надійності та порівнянності вимірювань АСТ у різних лабораторіях і методологіях.

1.3. Біосенсорні методи вимірювання АСТ

Для того, щоб подолати проблеми, які виникають під час застосування традиційних методів вимірювання, вчені використовують у дослідженнях біосенсорні системи, що забезпечують високу специфічність вимірювань та надають більш точні дані для подальшого аналізу. До переваг їх використання належать портативність, простота конструкції та використання, можливість автоматизованого вимірювання, потреба невеликого об’єму зразку та невисока вартість аналізу.

Біосенсор — це пристрій, який вимірює біологічні або хімічні реакції шляхом генерування сигналів, пропорційних концентрації специфічної хімічної сполуки (аналіту) в реакції [57]. Біосенсори використовуються для виявлення забруднюючих речовин, для відкриття нових ліків, для моніторингу захворювань, викликаних мікробами тощо [22]. Основною функцією даних приладів є точне виявлення та передача інформації про кількість та присутність конкретної речовини в досліджуваному зразку [58].

Типові компоненти біосенсора зображені на рис. 1.2:

1. Аналіт: термін, що використовується в аналітичній хімії для позначення хімічної сполуки або речовини, яка піддається аналізу або вимірюванню.

2. Біорецептор: молекула, яка розпізнає аналіт. Ферменти, клітини, аптамери, дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) і антитіла є деякими прикладами біорецепторів. Процес генерування сигналу (у вигляді світла, тепла, pH, заряду або зміни маси тощо) під час взаємодії біорецептора з аналітом називається біорозпізнаванням [57].

3. Перетворювач: елемент, основна роль якого полягає в сигналізації - перетворенні процесу біорозпізнавання в сигнал, який можна виміряти [59]. Більшість перетворювачів виробляють або оптичні, або електричні сигнали, які зазвичай пропорційні кількості взаємодій аналіт-біорецептор [57].

4. Електроніка: сукупність елементів біосенсора, що обробляє перетворений сигнал і готує його до відображення. Формування сигналу, наприклад, посилення та перетворення сигналів з аналогової форми в цифрову, виконує електронна схема.

5. Відображення: складається з системи інтерпретації користувача, такої як рідкокристалічний дисплей комп’ютера або прямого принтера, який генерує числа або криві, зрозумілі користувачеві. Ця частина часто складається з комбінації апаратного та програмного забезпечення, яке генерує результати біосенсора у зручний спосіб. Вихідний сигнал на дисплеї

може бути числовим, графічним, табличним або зображенням, залежно від вимог кінцевого користувача [57].

Рисунок 1.2 – Типові компоненти біосенсора [57].

Залежно від типу перетворювача біосенсори поділяються на такі категорії: оптичні, п’єзоелектичні, електрохімічні.

Оптичні біосенсори

В оптичному біосенсорі виявлення аналітів здійснюється на основі поглинання, флуоресценції або розсіювання світла (рис. 1.3). Зміна показників заломлення на поверхнях між двома середовищами, що мають різну густину, також спричиняє варіацію поглинання та флуоресценції [60].

Біосенсор містить елемент біологічного розпізнавання, наприклад ферменти, антитіла або нуклеїнові кислоти. Цей елемент вибірково взаємодіє з цільовим аналітом. Коли елемент біологічного розпізнавання зв’язується з цільовим аналітом, він викликає специфічну біохімічну реакцію або конформаційну зміну. Біохімічна реакція або конформаційна зміна призводить до зміни оптичних властивостей системи. Це може включати зміни абсорбції, флуоресценції, показника заломлення або поверхневого плазмонного резонансу. Оптичні зміни виявляються та вимірюються за

допомогою оптичних компонентів, таких як фотодетектори, спектрометри або датчики поверхневого плазмонного резонансу. Величина зміни оптичного сигналу пропорційна концентрації цільового аналіту.

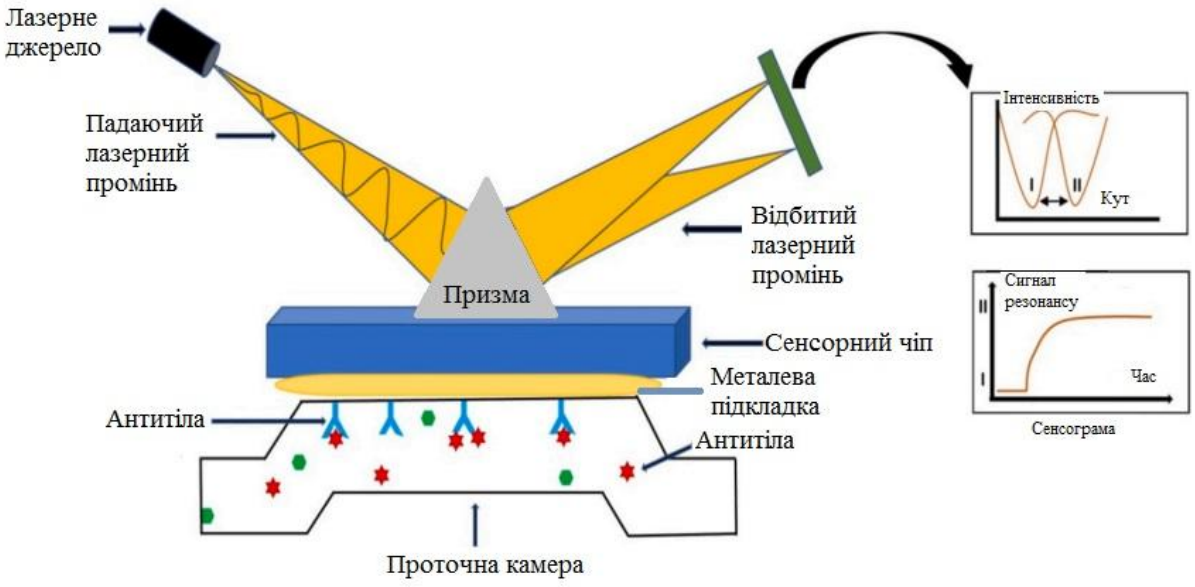

Рисунок 1.3 – Способи виявлення аналітів в оптичних біосенсорах [60].

П'єзоелектричні біосенсори

П’єзоелектричний біосенсор (біосенсор чутливий до зміни маси), також званий акустичним біосенсором, створює електричний сигнал у разі застосування механічної сили. У цьому біосенсорі взаємодія між аналітом і чутливою молекулою відбувається на п’єзоелектричній поверхні — перетворювачі маси в частоту, що призводить до механічної вібрації. Ця вібрація пропорційна кількості аналітів і розглядається як переведений електричний сигнал [61].

П’єзоелектричні біосенсори працюють на основі принципу виявлення змін маси на поверхні п’єзоелектричного кристала в результаті біохімічних взаємодій. Біосенсор містить п’єзоелектричний кристал, зазвичай кварц, який демонструє п’єзоелектричний ефект. Цей ефект означає, що кристал генерує електричний заряд у відповідь на механічну дію, і навпаки. Елемент біологічного розпізнавання, такий як ферменти, антитіла або нуклеїнові кислоти, іммобілізований на поверхні п’єзоелектричного кристала. Цей

елемент вибірково взаємодіє з цільовим аналітом. Коли елемент біологічного розпізнавання зв’язується з цільовим аналітом, він викликає зміну маси на поверхні кристала. Ця зміна викликає зсув резонансної частоти п'єзокристала. Зміна резонансної частоти створює електричний заряд на поверхні кристала завдяки п’єзоелектричному ефекту. Величина заряду пропорційна зміні маси, спричиненій подією зв’язування. Генерований електричний заряд виявляється як електричний сигнал, зазвичай у формі зміни напруги, яка пропорційна зміні маси на кристалі. Кількісно визначається електричний сигнал і визначається концентрація цільового аналіту. Результати можуть бути відображені на екрані або іншому пристрої виведення.

П’єзоелектричні біосенсори цінуються за високу чутливість, можливість моніторингу в реальному часі, широкий діапазон вимірювань та можливість інтеграції в мікросистеми. Недоліки п'єзоелектричних біосенсорів: підвищена вартість (складність виготовлення та використання п'єзоелектричних матеріалів), специфічність конструкції, вплив зовнішніх факторів (наприклад, шуму та вібрацій) на точність вимірювань.

Електрохімічні біосенсори

Електрохімічні біосенсори працюють на основі виявлення біологічних молекул за допомогою електрохімічних реакцій. Біосенсор містить електрохімічний перетворювач, як правило, електрод, який перетворює біохімічний сигнал, отриманий у результаті взаємодії між елементом розпізнавання та аналітом, на електричний сигнал. Під час реакції біорозпізнавання відбувається генерація або споживання електронів чи йонів, що призводить до зміни електричних властивостей електроду та приелектродного простору. Ця зміна вимірюється як електричний сигнал (струм, напруга або імпеданс), який пропорційний концентрації аналіту. Потім цей сигнал обробляється та відображається на екрані чи іншому пристрої виведення. Величина сигналу корелює з концентрацією цільового аналіту в зразку. Це фундаментальна концепція таких біосенсорів [62]. Вони поділяються на наступні види:

- Амперометричні: сприймають струм, отриманий внаслідок реакції відновлення або окислення, яка відбувається, коли до електрохімічної комірки прикладається оптимальний потенціал [22].
- Потенціометричні: сигнал вимірюється як зміна потенціалу між двома електродами, переважно контрольного та робочого типів. Ця різниця потенціалів утворюється через потік фактично нульового струму між двома розчинами, розділеними іонселективною мембраною [22].
- Кондуктометричні: взаємодія між елементом біологічного розпізнавання та аналітом може призвести до зміни провідності розчину за рахунок зміни кількості заряджених частинок. Зміна провідності вимірюється як електричний сигнал (зазвичай опір або провідність) [63].
- Іонно-чутливі: працюють за принципом виявлення змін концентрації іонів, а ISFET (іоночутливі польові транзистори) є типом датчика, який зазвичай використовується в цих пристроях [64].

Іонно-чутливий польовий транзистор (ISFET) - це тип польового транзистора, у якого потенціал затвора регулюється концентрацією іонів в вимірюваному/аналізованому середовищі. Затвор зазвичай покритий матеріалом, який взаємодіє з певними іонами в розчині. Елемент біологічного розпізнавання, такий як ферменти або антитіла, іммобілізований на поверхні затвора ISFET, вибірково взаємодіє з цільовими іонами або молекулами в зразку. Коли цільові іони зв’язуються з елементом біологічного розпізнавання, це викликає зміну заряду на затворі ISFET. Ця зміна заряду змінює провідність транзистора, що в свою чергу призводить до зміни електричного сигналу (струму або напруги) ISFET. Відповідно, ця зміна пропорційна концентрації цільових іонів у зразку. Електричний сигнал потім обробляється, кількісно визначається та відображається. Величина сигналу відповідає концентрації конкретних іонів, забезпечуючи кількісну міру аналіту в зразку.

До переваг електрохімічних біосенсорів відносяться: висока чутливість (здатність виявляти низькі концентрації аналіту), селективність (можливість

специфічного виявлення конкретних біомолекул), низька вартість (у порівнянні з традиційними методами), мініатюрність (здатність інтегруватись в компактні пристрої). Недоліки електрохімічних біосенсорів включають: можливість інтерференції (вплив інших речовин на результати вимірювань), обмежену стабільність (біорозпізнавальні матеріали можуть втрачати активність з часом), обмежений діапазон вимірів (в деяких випадках обмеження вимірювань великих концентрацій).

Для вимірювання рівня АСТ нині розробляють велику кількість електрохімічних біосенсорів. Деякі з них виготовляються з використанням різних наноматеріалів, які дослідники використовують для модифікації робочого електрода.

Біосенсор на основі паладієвого електроду та глутаматоксидази (GlOx/NefionPdE)

У статті [65] було описано розробку біосенсора для вимірювання активності АСТ і АЛТ, модифікованого катіонообмінною мембраною на паладієвому (Pd) електроді з метою запобігання перешкодам і забрудненню електродів під час роботи з сироваткою. Дані ферменти вимірювались описаним біосенсором послідовно, а не одночасно, тому ми розглядаємо характеристики біосенсора лише щодо ферменту, який нас цікавить. Швидкість зареєстрованого сигналу для активності АСТ становила 0,259 нА/хв. Лінійний діапазон, зареєстрований для АСТ, становив 8–200 од.акт./л. Чутливість цього біосенсора була задовільною та відповідала клінічним результатам цього ферменту.

Біосенсор на основі кремнієвого електроду та глутаматоксидази (GlOx/кремній)

У роботі [66] було описано виготовлення системи електрохімічних біосенсорів для діагностики та моніторингу захворювань печінки, яка містить датчики білірубіну, глутамату та холестерину. Іммобілізацію ферментів забезпечували методом силанізації (використання силанів, хімічних сполук, які можуть реагувати з поверхнею матеріалів і утворювати тонкий шар). Для

збільшення площі поверхні робочого електрода використовувалися шари кремнію з порами. Модифіковані електроди були закріплені в лунках контейнерів для зразків, щоб спростити процес збору кількох зразків і зменшити негативні ефекти, спричинені інтерференцією. У порівнянні з традиційними методами вимірювання аналіту, описаний аналітичний пристрій продемонстрував прийнятну чутливість для аналізу кількох зразків і аналітів без помітного ефекту перехресної інтерференції. Спостережувані показники чутливості приладу становили 0,45439 мкА/(од.акт./л) для АСТ.

Біосенсор на основі золотого електроду, піруватооксидази та оксалоацетатдекарбоксилази (PyOX–OAC/Au)

Автори статті [67] досліджували електрохімічне виявлення АСТ за допомогою мультиферментно-модифікованої поверхні електрода. Ферменти, які беруть участь у механізмі реакції АСТ, такі як піруватоксидаза (POX) і оксалоацетатдекарбоксилаза, були іммобілізовані на поверхні електрода за допомогою аміноактивного самоорганізованого моношару та гомобіфункціонального крос-лінкеру. Аміноактивний самоорганізований моношар - це тонкий шар матеріалу, який формується на поверхні електрода, має аміногрупи для подальшої іммобілізації ферментів та створює сприятливе середовище для прив'язання біологічних молекул. Гомобіфункціональний крос-лінкер - спеціальний з'єднувач, який має дві різні функціональні групи і використовується для надійної фіксації ферментів на поверхні електрода.

В результаті реакції перенесення аміногрупи між α-кетоглутаратом і L-аспартатом, що каталізується АСТ, утворювався піруват (кінцевий продукт). Його електроаналіз проводили за допомогою фероценметанолу та піруватооксидази (рис. 1.4). Фероценметанол — це сполука, що містить фероцен - молекулу з атомом заліза, затисненим між двома циклопентадієніловими аніонами. Залізо у фероценметанолі може піддаватися реакціям окислення та відновлення, що робить його придатним посередником для полегшення перенесення електронів у електрохімічних

реакціях. Діапазон виявлення АСТ: 7,5–720 од.акт./л. [22].

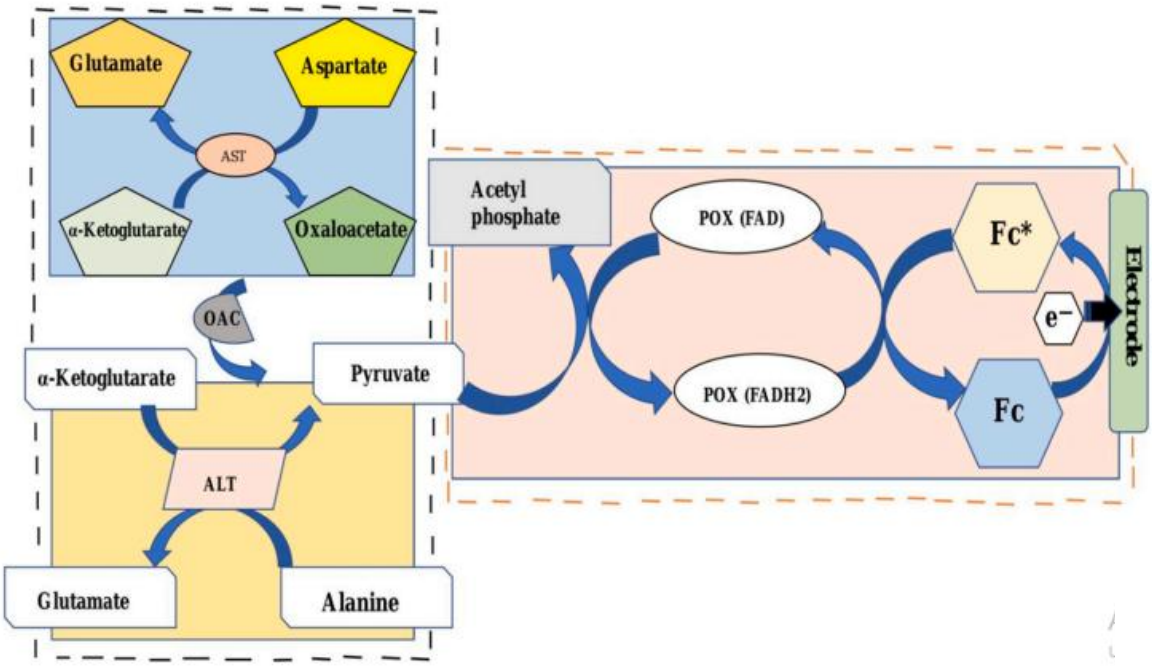

Рисунок 1.4 - (a) Утворення пірувату, (b) Використання каталітичної активності фероценметанолу та піруватооксидази для окислення пірувату [22].

Біосенсор на основі глутаматоксидази та платинового електроду, модифікованого полідиметилсилоксаном та пористим кремнієм (PDMS/пористий кремній/PtE)

У роботі [68] було описано біосенсорну систему з двох датчиків для визначення глутамату, за допомогою яких міряли активність АСТ та АЛТ. Для збільшення площі поверхні робочих електродів наносили шари пористого кремнію. Мікроканалом служив полідиметилсилоксан (ПДМС), а в якості електрохімічного перетворювача використовували платиновий електрод. Мікроканал - це малий канал чи канали в масштабах мікрометрів, що використовуються для перенесення рідин чи реагентів. У даному випадку, полідиметилсилоксан (ПДМС) використовувався як матеріал для мікроканалу, і це дозволяло подавати рідини або реагенти точно до чутливої поверхні датчика. Для взяття кількох зразків і зменшення ефекту перехресної інтерференції іммобілізація глутаматоксидази була виконана за допомогою техніки силанізації. Це покращує стабільність та довговічність ферменту на

поверхні. Чутливість становила 0,463 мкА/(од.акт./л) для АСТ. Для домашнього та клінічного використання чутливість цього біосенсора з діапазоном від 1,3 до 250 од.акт./л зазначена авторами як задовільна [22].

Біосенсор на основі електроду із модифікованої вугільної пасти, наночастинок піруватооксидази та іридію (PyOx/Ir-C)

У роботі [69] наночастинки іридію, що слугує каталізатором, нанесли на електрод з вугільної пасти для виявлення присутності H_2O_2, що утворюється ферментативно в каскаді реакцій. За допомогою цього біосенсора в концентрованій сироватці крові людини та фосфатному буфері можна визначити АСТ в діапазоні від 0 до 0,89 мкг/мл, що еквівалентно 0-250 од.акт./л АСТ. Біосенсор працює при відносно низькому потенціалі окиснення (+0,3 вольта (V) щодо друкуваного Ag/AgCl) [69].

У таблиці 1.1 наведено основні характеристики описаних вище біосенсорів для вимірювання рівня активності АСТ.

Таблиця 1.1. Порівняння біосенсорів для вимірювання рівня активності АСТ

Каркас електрода	Лінійний діапазон (од.акт./л)	Межа виявлення (од.акт./л)	Потенціал (В)	pH	Посилання
GlOx / NafionPdE	8-200	-	-	7.0	[62]
PDMS / Porous Silicon electrode	1.3-250	-	-0.6 до 0.6	7.0	[63]
PyOX–OAC / Au electrode	30-240	20	-	-	[64]

Продовження таблиці 1.1

PDMS / Porous Silicon electrode	1.3-250	-	-0.6 до 0.6	7.0	[65]
Ir-NPs / Carbon Paste	0-612.76	123.929	-0.1 до +0.4	7.0	[66]
PyOx / Chi-IL/IrC	0-134	0-0.5286	+0.3	7.0	[67]
Ni(mnt)2 / Graphene film/ AuE	0.1667-60	0.0833	-	7.0	[68]

Лінійний діапазон усіх перелічених в таблиці біосенсорів є достатнім для роботи з реальними зразками, однак не було знайдено точних відомостей щодо апробації даних біосенсорів, їх стабільності та можливого комерційного застосування.

Розглянуті джерела інформації показують відсутність універсального методу для точного вимірювання активності ферменту АСТ. Отже, було вирішено розробити новий біосенсор на основі глутаматоксидази із застосуванням амперометричного методу для визначення активності АСТ.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали

Для створення біосенсора використана рекомбінантна глутаматоксидаза (ГлОкс), отримана з *Streptomycessp.* з активністю 7 од. акт./мг (YamasaCorporation, Японія). БСА (фракція V), АСТ, піридоксальфосфат (ПФ), L-аспартат, α-кетоглутарат (α-КГ), 25% водний розчин глутаровий альдегід (ГА), гліцерин, HEPES, L-глутамат натрію були виробництва фірми Sigma-Aldrich, США. Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, зокрема пероксид водню, етиловий спирт, порошок оксиду алюмінію, KCl та ін. були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

2.2. Конструкція амперометричного перетворювача

Як електрохімічний амперометричний перетворювач використовувався платиновий дисковий електрод (рис. 2.1). Спершу шматок платинового дроту (діаметр 0,4 мм і довжина 3 мм) вставлялили в скляний капіляр (зовнішній діаметр 3,5 мм), звужений з одного боку. Далі звужений кінець капіляру герметизували (запаювали). Відкритий торець дроту є робочою поверхнею перетворювача. Електричне з’єднання платини з провідником у вигляді срібного дроту забезпечували низькотемпературним запаюванням за допомогою сплаву Вуда. Відкритий кінець капіляру заповнювали епоксидною смолою. Частина провідника знаходилась всередині капіляру, а частина – ззовні. До неї припаювали мідний контакт для з’єднання з вимірювальною установкою. Перед використанням робоча частина електроду зі впаяною платиною проходила механічну обробку на наждачному папері шляхом шліфування за допомогою пасти з порошку оксиду алюмінію (розмір частинок 0,3 мкм та 0,05 мкм) полірувальною машинкою Einshell CC-PO

протягом 1 хвилини при швидкості 1000 об/хв. За необхідності, робоча поверхня платинового електрода поновлювалася за допомогою повторного шліфування [72]. Схематичне зображення структури електрода зображено на рис. 2.1 [72].

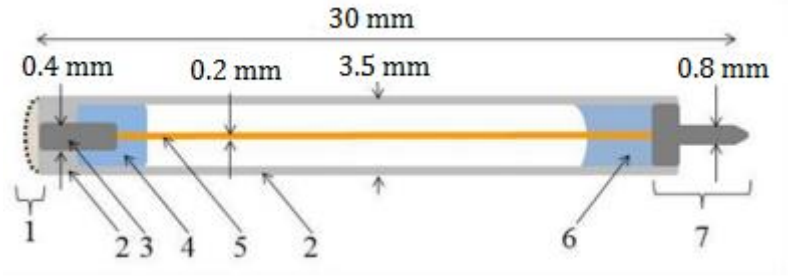

Рисунок 2.1 - Схематичне зображення амперометричного перетворювача на основі платинового дроту діаметром 0,4 мм: 1 – біоселективний елемент; 2 – скляний корпус електроду; 3 – платиновий дріт; 4 – електричне з'єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда; 5 – внутрішній провідник; 6 – епоксидна смола; 7 – контактна площина стандартного типу [72].

2.3. Схема установки для амперометричних вимірювань

Для проведення вимірювань використовували триелектродну схему амперометричного аналізу, наведену на рис. 2.2.

Електрод порівняння (Ag/AgCl) необхідний в даній схемі аналізу для використання в якості сталої точки потенціалу в системі та коректного встановлення прикладеного потенціалу на робочому електроді. Допоміжний платиновий електрод забезпечує замикання електричного кола та повернення електронів до розчину. Це викликає процес відновлення на допоміжному електроді, який еквівалентний процесу окиснення на робочому електроді. Власне робочий платиновий дисковий електрод слугує в якості електрохімічного перетворювача. Біомембрана на його поверхні каталізує каскад цільових електрохімічних реакцій з утворенням проміжного аналіту. Внаслідок прикладання потенціалу до поверхні робочого електрода

каталізується процес окиснення проміжного аналіту, що і спричиняє відгук сенсора у вигляді зміни величини сили струму в системі.

Усі електроди були підключені до потенціостата PalmSens (PalmInstruments BV, Нідерланди), який регулює прикладені потенціали та забезпечує точні вимірювання сигналу.

8-канальний мультиплексор CH-8 (PalmInstruments BV, Нідерланди), інтегрований з потенціостатом, служив для одночасного отримання сигналів з кількох (до 8) робочих електродів. Використання кількох робочих електродів дозволяє проводити більш точні дослідження і уникнути деяких видів похибок. Відстань між усіма електродами в системі становила приблизно 5 мм і була однаковою протягом всіх дослідів.

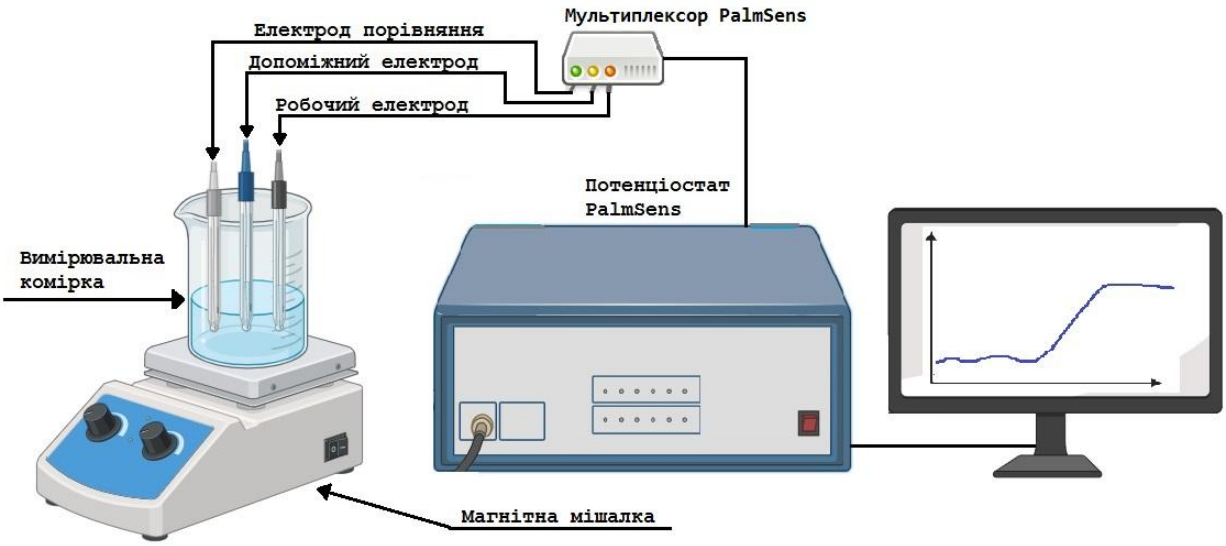

Рисунок 2.2 - Схема вимірювальної установки для амперометричних вимірювань.

2.4. Методика нанесення біоселективної мембрани

Щоб створити біосенсор, здатний до кількісної та якісної оцінки концентрації АСТ в досліджуваному зразку, необхідно на поверхню електрохімічного сенсора нанести біоселективну мембрану, яка генерує вимірювальний сигнал. Дана мембрана є ферментною та для її формування було вирішено використати метод ковалентної іммобілізації ферменту на

поверхні електроду з використанням зшиваючого агенту – глутарового альдегіду. Цей метод полягає у тому, що аміногрупи ферменту реагують із глутаровим альдегідом, утворюючи ковалентні зв'язки між ними, кількість яких визначає стійкість іммобілізації ферменту на поверхні електроду. Мембрана була сформована щляхом змішування двох розчинів (ферментного гелю та розчину ГА) та подальшого висушування на повітрі. Для приготування ферментного гелю використовували 8% ГлОкс, 4% БСА та 10% гліцерину у 100мМ фосфатному буфері, pH 6,5. БСА забезпечував додаткову каркасну функцію мембрани, оскільки як і фермент володіє здібністю до формування поперечних зшивок з ГА. Гліцерин необхідний для стабілізації ферменту, покращення адгезії мембрани та забезпечення вологозберігаючої функції. Опісля гель змішували з водним розчином ГА (концентрацією 0,5%) в пропорції 1:2. Отриману суміш миттєво наносили на чутливу поверхню електроду і розподіляли на ній до утворення однорідного тонкого шару. Після чого висушували на повітрі при кімнатній температурі. Час іммобілізації складав 35 хв. Після іммобілізації готовий біосенсор відмивали від незв’язаних компонентів біоселективної мембрани в робочому буферному розчині (25 мМ HEPES, pH 7,4) 10 хвилин, що дозволяло утримувати тільки закріплений фермент.

2.5. Методика біосенсорного вимірювання вмісту АСТ

У цьому дослідженні активність АСТ визначали шляхом вимірювання швидкості утворення продуктів його реакції. Присутність продуктів реакції АСТ в вимірювальній комірці спричиняла зміні струму в системі. Відповідно, ця зміна струму при оптимальних умовах (правильній кінетиці реакції, стабільності, високій активності та ефективності використання ферментом свого коферменту) пропорційна вмісту АСТ. Досліди проводили кілька разів при кімнатній температурі у відкритій кюветі об'ємом 2 мл. Вимірювання проводили при постійному перемішуванні та постійному потенціалі (+0,6 В

відносно хлорсрібного електрода порівняння). Зазначений потенціал було підібрано експериментально в попередніх роботах і є характерним для процесу окислення пероксиду водню H_2O_2 на платиновому аноді.

Робочим буфером був 25 мМ HEPES при pH 7,4, а концентрація аналіту в комірці задавалась внесенням малих об'ємів концентрованих розчинів.

Усі отримані дані, наведені в роботі, є середніми значеннями кількох дослідів. Для розрахунків використовувалася програма OriginLab OriginPro 8.5.

2.6. Методика спектрофотометричного вимірювання вмісту АСТ

Активність АСТ спектрофотометричним методом вимірювалася у вигляді швидкості зміни оптичної густини на хвилину. У нашому експерименті АСТ ініціює каскад реакцій, що призводить до утворення хінонімінового барвника. Його поява вимірюється при довжині хвилі 552 нм. Зміна оптичної густини розчину корелює з концентрацією одиниць активності АСТ в даному розчині, оскільки чим більше концентрація АСТ, тим швидше зростає оптична густина розчину через утворення дедалі більшої кількості барвника.

Вимірювання проводились на спектрофотометрі SPECORD 50 PLUS, виготовленому компанією Analytik Jena. Це двопроменевий, з технологією розщепленого променя з високою енергією в шляху вимірювального променя і внутрішнього опорного каналу, прилад. Як приймач у ньому використовуються два великих незагартованих фотодіода. Оптичні прилади: монохроматор з голографічною решіткою, кварцова пластина для поділу на шлях вимірювального променю і шлях внутрішнього опорного променю. Спектральний діапазон 190-1100 нм. У експериментах використовувались одноразові кювети Plastibrand® об'ємом 1,5 мл, які відносяться до типу "півмікро" або "семі-мікро", та виготовляються в Німеччині. Розміри кювети

становлять 12,5 х 12,5 х 45 мм. Кожна кювета має однозначний номер для ідентифікації.

Вимірювання проводились за кімнатної температури, з використанням буферу HEPES з концентрацією 25 mM та рівнем pH 7,4. Це значення (відоме також як фізіологічний pH) близьке до рівня кислотно-лужного балансу в організмі людини. Зокрема, рівень pH 7,4 є типовим для внутрішньоклітинного середовища та екстрацеллярної рідини в організмі. Використання такого буфера допомагає забезпечити оптимальні умови для біохімічних реакцій та експериментів, що можуть відбуватися при фізіологічних умовах.

Каскад реакцій, що використовувався в дослідженні, детально описаний в п.3.2.1.

Стокові розчини, які використовувались для приготування проб:

- 4-aminoantipyrine 0,68 mM in HEPES;
- EHSPT 0,94 mM in HEPES;
- L-аспартат 80 mM in HEPES;
- α-кетоглутарат 20 mM in HEPES;
- пероксидаза (ПерОкс) 2420 U/ml (0,44%);
- глютаматоксидаза (ГлОкс) 56 U/ml (0,8%);
- АСТ (із змінною концентрацією X mM).

Всі стокові розчини зберігались в холодильнику, а ємності 4-аміноатипірину та EHSPT були світонепроникними, щоб уникнути фотодеградації, змін фізико-хімічних властивостей та утворення продуктів розпаду.

Об’єм аналізованого розчину становив 1мл. Для проведення одного аналізу необхідно було 100 мкл АСТ. Концентрація субстратів та ферментів в комірці задавалась додаванням аліквот відповідних концентрованих розчинів. Аліквоти реагентів вносились в наступному порядку: буфер, субстрати (4-aminoantipyrine, EHSPT, L-aspartate, α-ketoglutarate), ферменти (пероксидаза, глютаматоксидаза), АСТ. Речовини були додані в такому порядку, щоб

запустити каскад хімічних реакцій тільки при введенні ферменту АСТ, а не раніше. Це необхідно для коректного визначення активності ферменту, оскільки даний каскад реакцій працює лінійно тільки протягом певного проміжку часу після активації.

Щоб досягнути рівномірної концентрації розчину в кюветі, одразу після внесення останньої аліквоти проводилось перемішування розчину шляхом репіпетування з використанням самплеру. Після цього, за фіксованих умов (температура, вологість, освітлення, pH) проводилось вимірювання концентрації продукту реакції протягом певного проміжку часу. За отриманими даними будувалась кінетична крива, що відображала динаміку реакції, і з якої обрахувавалась швидкість реакції. Відгук отримувався у вигляді Δ оптичної густини на хвилину (Δопт.густ./хв.)

2.7. Методика роботи з реальними зразками при біосенсорному аналізі

Визначення вмісту АСТ у зразках сироватки крові проводилося згідно з принципом, описаним в підрозділі 2.5. Об’єм робочої комірки при роботі з реальними зразками становив 1мл. Для проведення одного аналізу необхідно було 100 мкл сироватки.

Спочатку в комірку додавали аліквоти субстратів та чекали стабілізації базової лінії. Потім вводили аліквоту сироватки чекали виходу реакції на лінійну ділянку та послідовно вводили ще 3 аліквоти модельного розчину АСТ (стандартні додавання). Отримували 4 відгуки біосенсора у вигляді Δ нА/хв. Концентрацію АСТ у зразку сироватки визначали двома методами: шляхом порівняння отриманого відгуку із калібрувальною кривою та за допомогою методу стандартних додавань. Перший відгук порівнювали з попередньо отриманою калібрувальною кривою, яка відображала залежність відгуку (Δ нА/хв) від концентрації АСТ (од.акт./л).

2.8. Методика роботи з реальними зразками при спектрофотометричному аналізі

Для спектрофотометричного аналізу вмісту АСТ в зразках сироватки крові використовувалась кольорова реакція, описана в пункті 2.6. Аналіз проводився при десятикратному розведенні зразку, відповідно, отримана експериментально концентрація АСТ в кюветі в подальшому перераховувалась відповідно до розведення. Об’єм аналізованого розчину становив 1мл. Для проведення одного аналізу необхідно було 200мкл сироватки.

Оскільки сироватка крові є комплексною біологічною рідиною в ній міститься багато оптично активних речовин. Тому, для уникнення впливу біологічної матриці на результати аналізу, в якості референтного розчину було використано суміш вимірюваної сироватки з буферним розчином у співвідношенні 1:9. Після змішування розчин відстоювався 15 хвилин для того, щоб відбулись всі динамічні фізико-хімічні процеси взаємодії між зразком і буфером. Це необхідно для стабільнішого сигналу спектрофотометра. Для вимірювання активності АСТ в сироватці аналогічним чином змішувалась сироватка з буфером, отримана суміш відстоювалась 15хв, а потім туди вносились реагенти для кольорової реакції у порядку, вказаному в пункті 2.6. Суміш швидко і ретельно перемішувалась шляхом 50 натисків самплера та негайно починалось вимірювання спектрофотометром. Відгук отримувався у вигляді різниці оптичних густин розчина між 14 і 15 хвилинами вимірювання (дельта опт.густ./хв.).

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДНА ЧАСТИНА

3.1. Розробка амперометричного біосенсора для визначення АСТ

3.1.1. Принцип роботи біосенсора для визначення АСТ

Розроблений біосенсор забезпечує визначення концентрації АСТ у біологічних зразках завдяки взаємодії ферментативних та електрохімічних процесів (рис. 3.1).

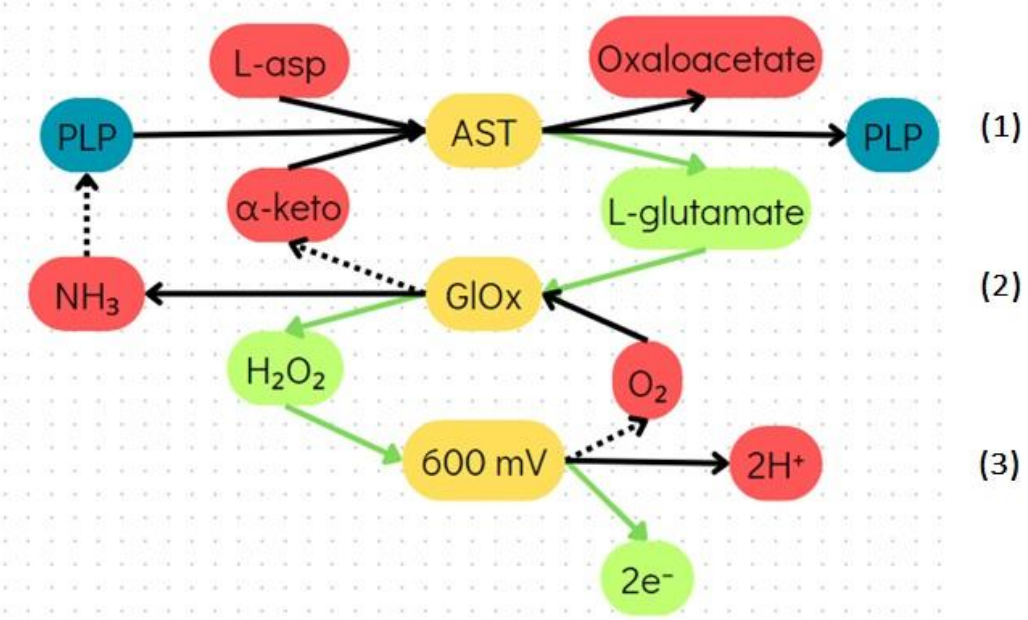

Рисунок 3.1 – Схематичне зображення каскаду ферментативних та електрохімічних реакцій

АСТ каталізує реакцію обміну між L-аспартатом та α-кетоглютаратом (рис. 3.1). У цій реакції аміногрупа аспартату (L-аспартат) переносяться на α-кетоглютарат, утворюючи L-глютамат та оксалоацетат (рис. 3.2 А). Це можливо завдяки двом напівреакціям у пінг-понг кінетичному механізмі (рис. 3.2 В). У першій напівреакції фермент піридоксал 5'-фосфат (PLP) реагує з L-аспартатом, утворюючи фермент піридоксамін 5'-фосфат (PMP) та оксалоацетат. Реверс цієї напівреакції з α-кетоглютаратом відновлює фермент PLP та формує амінокислотний продукт, L-глютамат, який є

амінокислотою, що використовується в метаболізмі для транспорту і обміну азоту між різними молекулами [73].

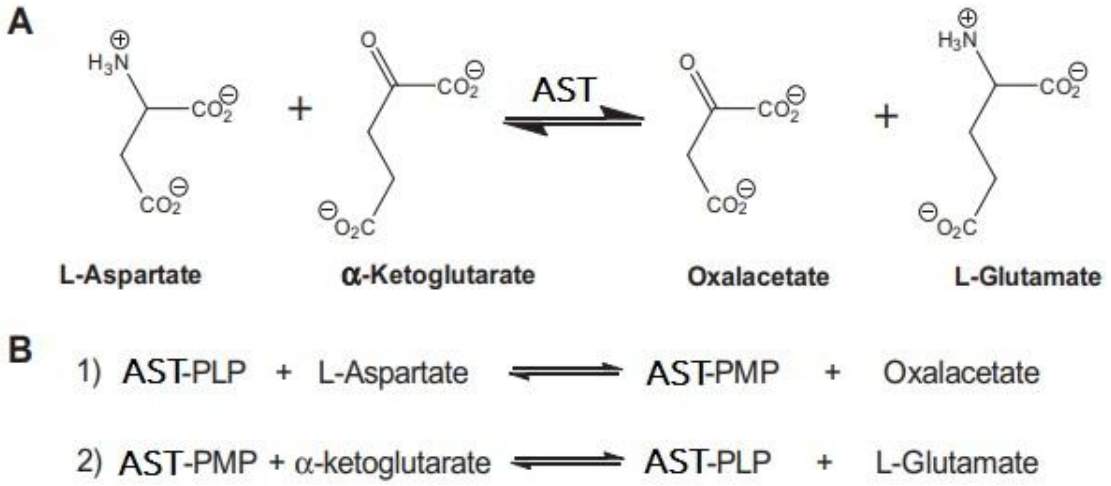

Рисунок 3.2 - (A) Загальна реакція, каталізована АСТ; (B) Механізм реакції, каталізованої АСТ [73].

У разі наявності необхідних субстратів у робочій комірці, АСТ разом із коферментом систематично синтезує L-глутамат. Кількість синтезованого L-глутамату прямо залежить від кількості введеної АСТ, однак ми не можемо виміряти її. Ця речовина не є електрохімічно активною сполукою, оскільки не виявляє власних електрохімічних властивостей або здатностей проводити електричний струм. Однак глутамат може брати участь у електрохімічних процесах, коли відбувається окислення чи редукція його молекул, тому було вирішено додати реакцію окислення (рис. 3.1, (2)) у каскад реакцій. Результатом цієї реакції є утворення пероксиду водню, який під дією прикладеного потенціалу окиснюється на електроді, змінюючи величину струму (рис. 3.1, (3)), бо розклад пероксиду супроводжується утворенням електродів, які реєструє амперометричний перетворювач. Ця зміна струму й є відгуком біосенсора, який ми бачимо на екрані монітора. Цей відгук прямопропорційний концентрації АСТ в комірці в певному діапазоні її концентрацій. Тому при подальшому збільшенні концентрації АСТ бачимо збільшення відгуку.

Отже, активність АСТ, внесеного в робочу комірку, впливає на інтенсивність виробництва L-глутамату, що, в свою чергу, корелює з швидкістю зміни струму на чутливій поверхні електродів. Швидкість зміни струму (відгук біосенсора) було вирішено реєструвати протягом однієї хвилини.

Типовий експеримент (рис. 3.3) включає в себе вимірювання базової лінії датчика, додавання субстратів АСТ та аліквоти ферменту. Після введення останньої спостерігається зростання інтенсивності струму, реєстроване приладом. Отримані дані оброблюються в графічному редакторі OriginLab - лінеаризуються для підвищення точності, а відгук вказується у вигляді Δ нА/хв.

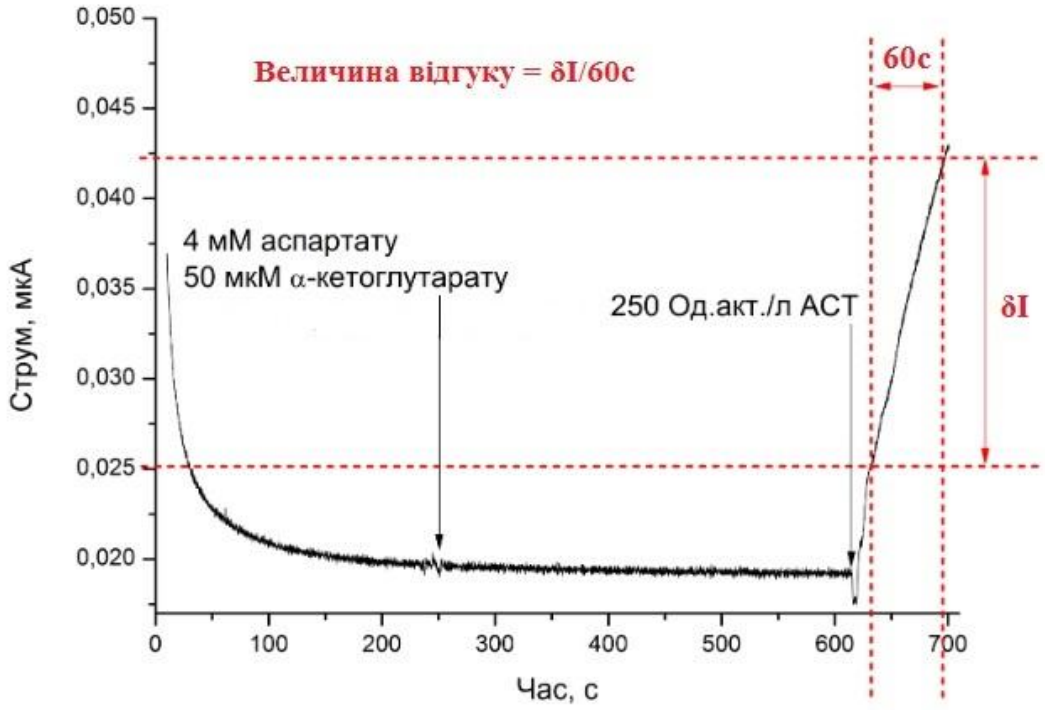

Рисунок 3.3 – Типовий відгук біосенсора на внесення аліквоти АСТ. Концентрація аспартату – 4 мМ, α-кетоглутарату – 50 мМ, АСТ – 250 од.акт./л.

3.1.2. Вплив параметрів іммобілізації глутаматоксидази на функціонування біосенсора

В даній роботі фермент глютаматоксидаза було іммобілізовано на чутливій поверхні робочого електрода за допомогою зшивки цього ферменту з БСА глутаровим альдегідом (ГА).

Концентрацію ГА важливо було обрати так, щоб фермент іммобілізувався достатньо сильно, аби не вимиватись буфером через слабкі зв'язки, але і не занадто міцно, аби не втрачати активність через надмірну кількість зшивок. Як видно з рис. 3.4, найбільший відгук біосенсора був при концентрації ГА 0,05%, тому для подальшої роботи було вирішено використовувати її. Оптимальна співвідношення об'ємів розчинів глютаматоксидази та ГА також визначалась експериментально і в підсумку в роботі використовували співвідношення 1:4 (рис. 3.5). Оптимальний час іммобілізації склав 35 хвилин (рис. 3.6).

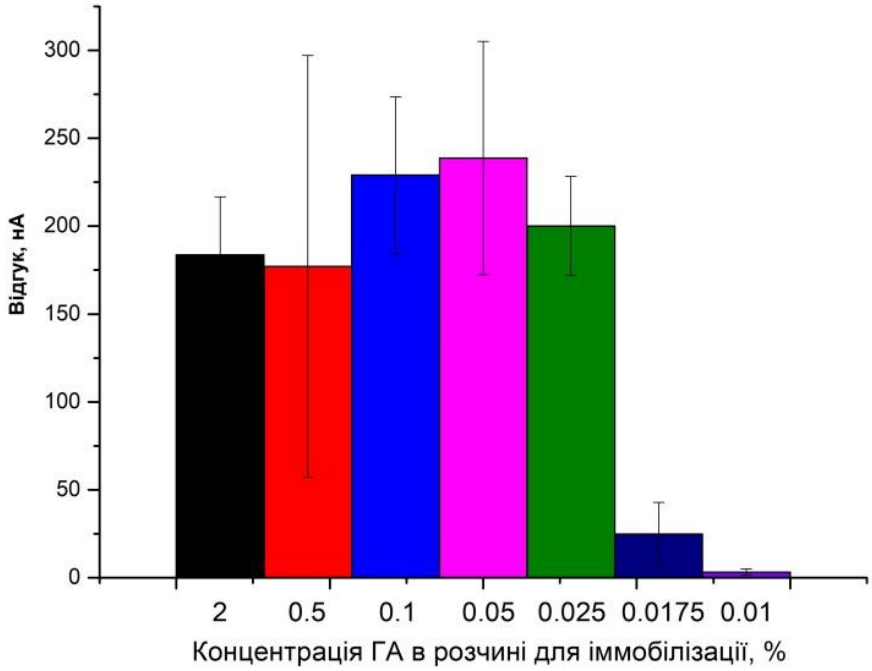

Рисунок 3.4 – Залежність відгуку біосенсора на 100мкМ глутамату від концентрації ГА при створенні біоселективної мембрани.

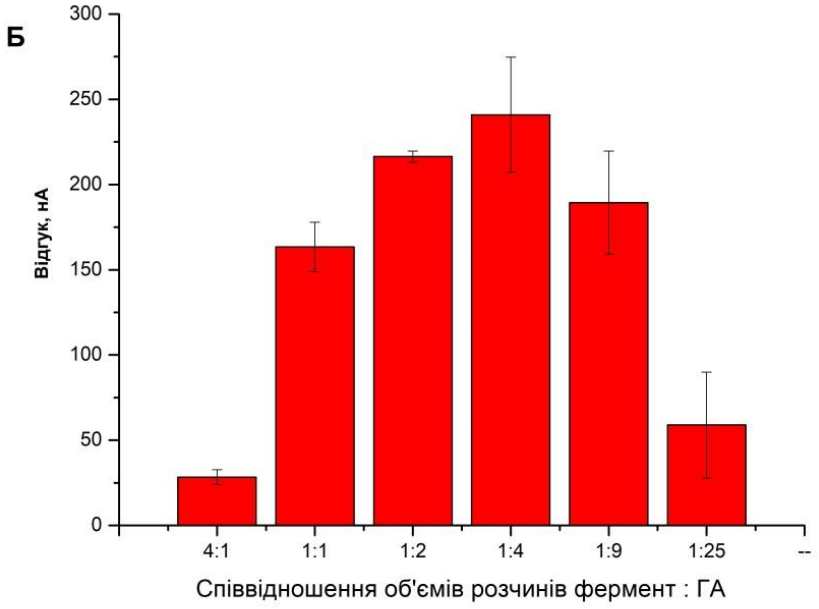

Рисунок 3.5 - Залежність відгуку біосенсора на 100мкМ глутамату від співвідношення об’ємів розчинів ферменту та ГА при створенні біоселективної мембрани.

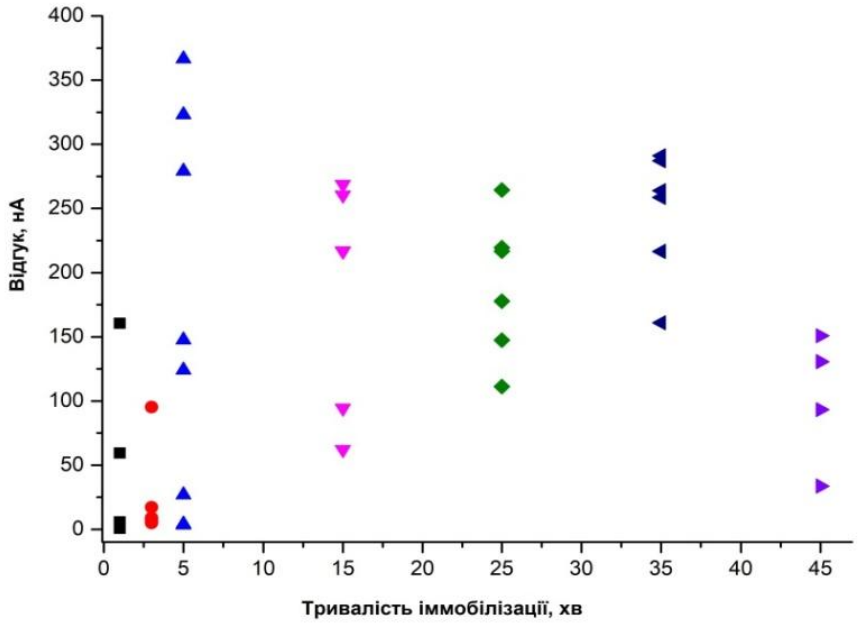

Рисунок 3.6 - Залежність відгуку біосенсора на 100мкМ глутамату від тривалості іммобілізації при створенні біоселективної мембрани.

3.1.3. Підбір концентрацій субстратів АСТ для оптимального функціонування біосенсора

Оскільки даний біосенсор визначає концентрацію АСТ через динаміку кінетичної реакції, яку каталізує даний фермент, необхідно забезпечити її ефективне протікання реакції (стабільне надходження субстратів та утворення продуктів реакції). Два субстрати ферменту (l-аспартат та α-кетоглютарат) мають неоднаковий ступінь спорідненості до активного центру АСТ і це спричиняє конкурентне інгібування при їх некоректному співвідношенні, тому було вирішено підібрати оптимальне співвідношення їх концентрацій.

Спершу було здійснено пошук робочої концентрації аспартату (рис. 3.7) для подальшого пошуку оптимального співвідношення концентрацій субстрату шляхом підбору оптимальної концентрації α -кетоглутарату (рис. 3.8). Співвідношення вийшло найбільш ефективним при 4:1 (в даному випадку 4мМ апартату до 1мМ α-кето).

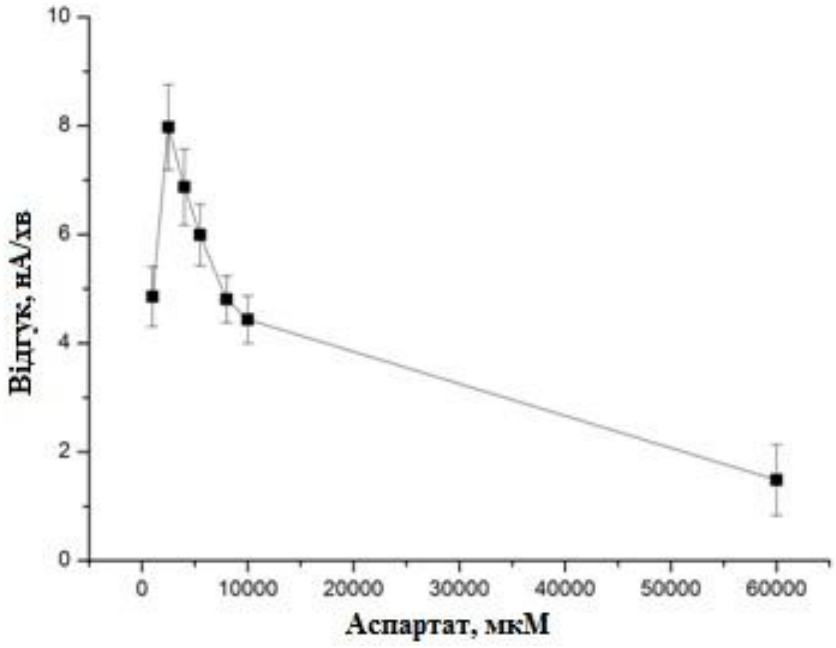

Рисунок 3.7 – Залежність відгуку біосенсора від концентрації аспартату, внесеного у вимірювальну комірку.

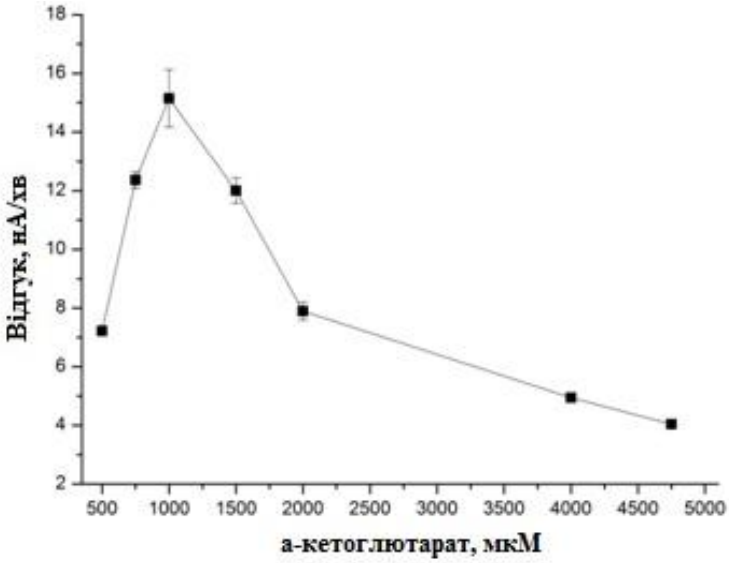

Рисунок 3.8 - Залежність відгуку біосенсора від концентрації а-кетоглютарату, внесеного у вимірювальну комірку.

Далі ми підбирали оптимальні концентрації в межах даного співвідношення і виявили, що відгук біосенсора однаково високий як для 6/1,5 мМ, так і 8/2 мМ концентрацій аспартату і кетоглютарату (рис. 3.9). При порівнянні лінійності відгуків біосенсора було визначено, що відгук для 8мМ аспартату і 2мМ кетоглютарату має довшу ділянку лінійності (рис. 3.10), а отже біосенсор довше може визначати активність АСТ при таких концентраціях внесених субстратів.

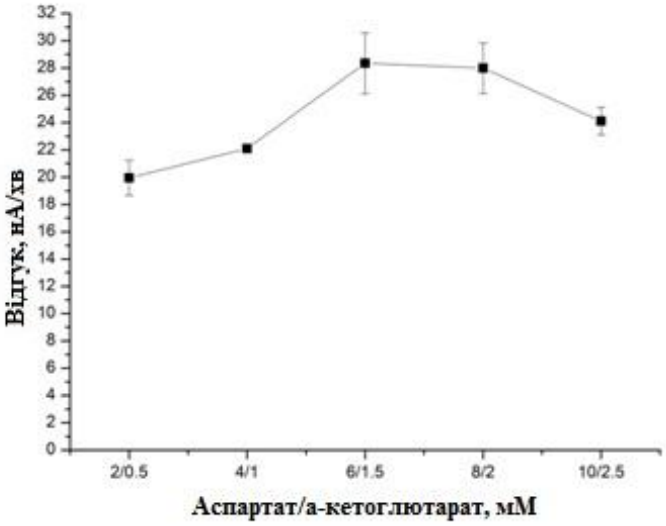

Рисунок 3.9 - Залежність відгуку біосенсора від співвідношення визначених раніше концентрацій субстратів.

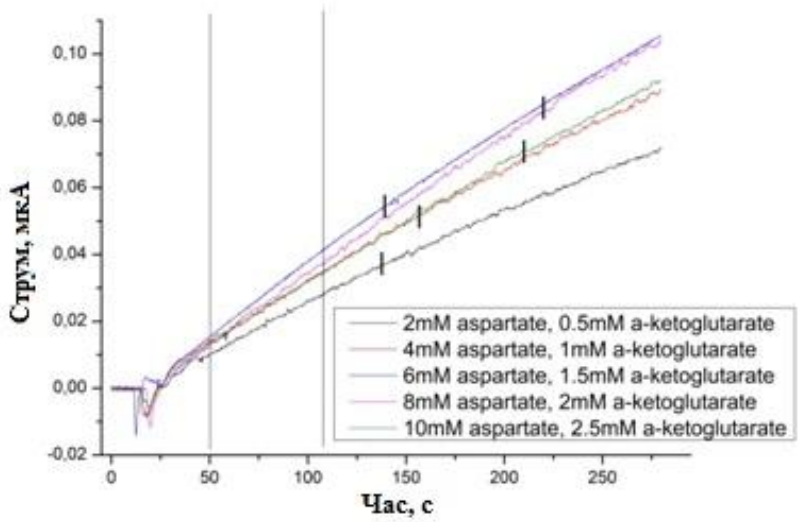

Рисунок 3.10 – Порівняння лінійності відгуків біосенсора на внесення в комірку різних співвідношень визначених раніше концентрацій субстратів.

3.1.4. Дослідження аналітичних характеристик АСТ-чутливого біосенсора

Розроблений біосенсор характеризувався чутливістю 12 нА/хв на 50 од.акт. АСТ/л. та межею детекції близько 1 од.акт./л АСТ (рисунок 3.11). Лінійний діапазон лежав в межах 5-100 од.акт./л АСТ, що є достатнім для визначення нормальних рівнів АСТ та перевищень, що свідчать про можливі патології. Динамічний діапазон лежав в межах 1-500 од.акт. АСТ/л.

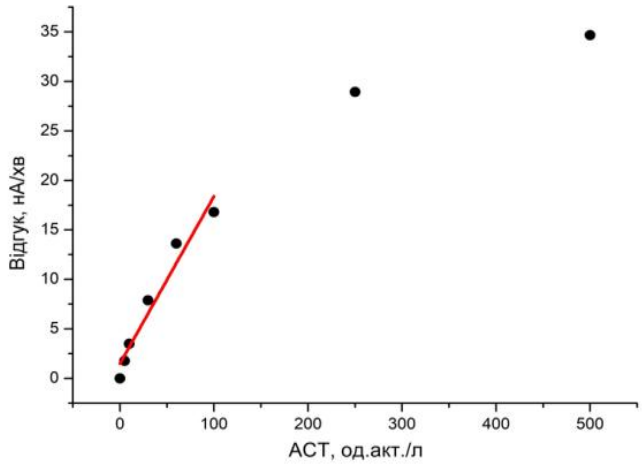

Рисунок 3.11 – Калібрувальна крива для визначення концентрації АСТ, отримана після серії вимірювань, виконаних амперометричним методом.

3.1.5. Біосенсорне вимірювання АСТ в зразках сироватки крові

Для вимірювання концентрацій АСТ в реальних зразках амперометрично використовували та порівнювали два методи визначення невідомих концентрацій: з використанням калібрувальної кривої та метод стандартних додавань.

Спершу ми одержували калібрувальну криву біосенсора та визначали її лінійний діапазон. При ньому відгук біосенсора припадає на лінійну ділянку калібрувальної кривої. Його значення потім підставляли в рівняння прямої калібрувальної прямої і за допомогою нього отримували концентрацію АСТ в комірці.

При використанні методу стандартних додавань спочатку отримували відгук біосенсора на аліквоту зразка, а потім – на аліквоти трьох наступних додавань (причому у всіх трьох ми вносили відомі заздалегідь концентрації ферменту). Отже, отримували 4 послідовні відгуки, з яких будували пряму залежність таким чином, що відгук на досліджуваний зразок мав значення 0 по осі Ох. Лінійна екстраполяція цього графіка перетинала вісь Ох в точці, що відповідала концентрації АСТ в вимірювальній комірці, але з протилежним знаком. Після врахування ступеню розведення зразка в комірці одержували значення концентрації АСТ в досліджуваному зразку.

Для імітування патологічних значень концентрацій АСТ, ми вносили у зразки сироватки модельний розчин АСТ. Як ми бачимо з рис. 3.12 по осі Х відкладені відомі нам значення концентрацій АСТ у реальних зразках сироватки крові, а по осі У – обраховані за допомогою двох методів. Значення, отримані за допомогою методу стандартних додавань, значно більше відхилялись від справжніх, відомих нам концентрацій у зразках. Тому було вирішено використовувати метод калібрувальної кривої.

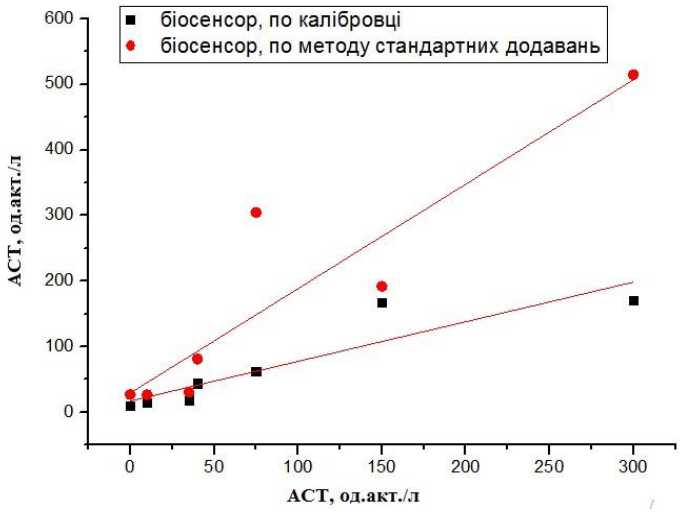

Рисунок 3.12 - Порівняння значень концентрацій АСТ, обрахованих двома методами визначення невідомих концентрацій: з використанням калібрувальної кривої та методом стандартних додавань.

3.2. Спектрофотометрична методика вимірювання АСТ

3.2.1. Принцип спектрофотометричного вимірювання АСТ

Розроблений нами біосенсор необхідно апробувати при роботі з реальними зразками. Щоб адекватно оцінювати результати такої апробації, реальні зразки потрібно міряти двома методами – розробленим амперометричним і традиційним. В якості рефееретного традиційного методу було обрано спектрофотометричне дослідження. Для вимірювання біохімічних процесів за допомогою спектрофотометрії необхідно, щоб в цих процесах брали участь оптично активні речовини. У процесі опрацювання різноманітних джерел було знайдено методику аналізу бактеріальної піруватооксидази [74]. В основі даної методики лежить наступний каскад реакцій: піруватоксидаза каталізує перетворення пірувату до ацетилфосфату з формуванням молекул пероксиду водню; в свою чергу пероксидаза, при появі пероксиду водню, каталізує реакцію між 4-аміноантипірином та N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine в результаті якої формується хіноіміновий барвник з максимумом поглинання при 550нм.

Описану методику було адаптовано для вимірювання АСТ таким чином, що в якості каталізатора пероксидазної реакції було використано реакцію глутамат оксидази, яка також продукує пероксид водню (рис. 3.13).

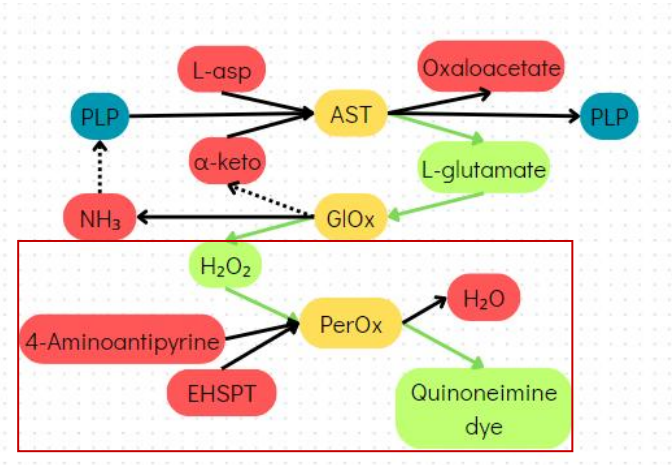

Рисунок 3.13 – Схематичне зображення каскаду ферментативних реакцій спектрофотометричного вимірювання активності АСТ.

Активність глутаматоксидази лімітувалась наявністю в кюветі глутамату, продукту реакції АСТ. Таким чином, в кюветі постійно зростала концентрація глутамату внаслідок роботи АСТ, що призводило до постійного утворення пероксиду водню і хіноімінового барвнику відповідно. Отже, спектрофотометрично можна спостерігати лінійне зростання оптичної густини розчину (рис. 3.14), швидкість якого корелювала з концентрацією АСТ в кюветі.

Таким чином, типовий експеримент виглядав так: змішування необхідних речовин в кюветі, внесення аліквоти АСТ, вимірювання зміни оптичної щільності розчину відносно виміряної раніше оптичної щільності буферу та обрахування відгуку спектрофотометра у вигляді дельта оптична густина на хвилину. Графік типового експерименту зображений на рис 3.14.

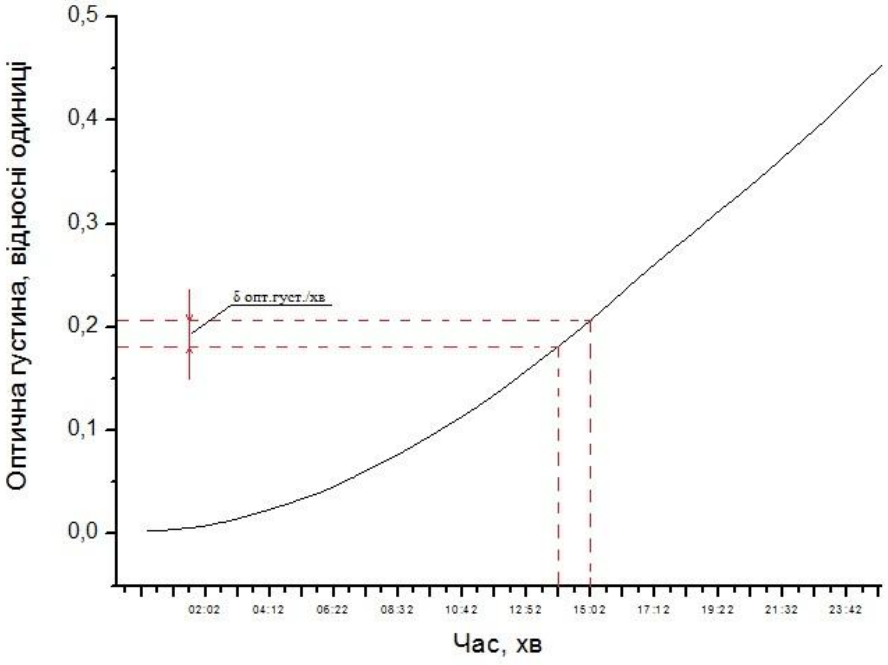

Рисунок 3.14 – Типовий відгук спектрофотометра на внесення аліквоти АСТ. Концентрація АСТ становила 100 U/L, GlOx – 0,025 U/ml, PerOx – 4,84 U/ml, L-аспартат – 8 mM, а-кетоглутарат – 2 mM, аміноантипірин – 0,48 mM, EHSPT – 0,66 mM.

Зміна оптичної густини, яка спостерігається на графіку, відбувається внаслідок динамічого утворення барвника, що свідчить про перебіг всіх етапів каскаду реакцій. Швидкість цієї зміни корелює з активність лімітуючої стадії (АСТ), що дозволяє кількісно визначити вміст АСТ в кюветі.

3.2.2. Підбір довжини хвилі

Будь-яка оптично активна речовина найбільш ефективно взаємодіє зі світлом певної довжини. Відповідно, для максимальної точності відгуку необхідно було підібрати таку довжину хвилі, при якій поглинання світла хіноіміновим барвником є максимальним. Даний підбір допомагає уникнути помилок, пов’язаних з поглинанням світла іншими речовинами, що присутні в зразку, а також усунути похибку, викликану неточностями устаткування (неправильне відображення довжини випромінюваного світла порівняно з

фактичним, вплив зовнішніх факторів на роботу світлових джерел, зокрема, температура, вологість). У методиці [74] вказано, що довжина хвилі, при якій поглинання хіноніміну максимальне, - 550 нм. Було вирішено перевірити дане значення на нашому обладнанні.

Перший етап роботи полягав в отриманні спектру поглинання і визначення максимуму поглинання (рис. 3.15). Для цього в кюветі було змішано всі реагенти і витримано певний час для протікання реакції і встановлення рівноваги в оптичній густині розчину. Потім було отримано спектр поглинання в діапазоні 320-720 нм, з інтервалом в 1 секунду та повтором 3 рази. В якості референтного розчину використовували 25 мМ HEPES.

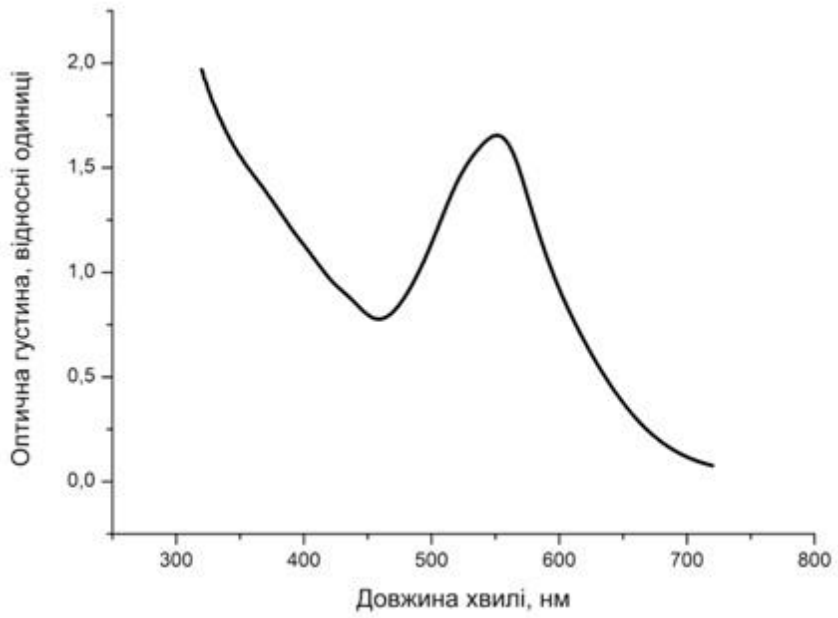

Рисунок 3.15 - Залежність коефіцієнту поглинання хінонімінового барвника від довжини хвилі світла.

За отриманими даними найвищий пік поглинання спостерігався на довжині хвилі рівній 552 нм, що сходиться з даними у джерелі [74] і тому всі подальші спектрофотометричні вимірювання проводились саме на такій довжині хвилі. Високе поглинання, що спостерігається на 320-400нм спричинене технічними обмеженнями кювети до пропускання світла не з видимого діапазону.

3.2.3. Оптимізація процедури реєстрації сигналу спектрофотометра

Відомо, що швидкість протікання ензиматичних реакцій на початкових етапах є нелінійною. Тому важливо, щоб вимірювання охоплювали фазу стаціонарності реакції. Під час цієї фази концентрація речовин є стабільною, а фермент АСТ ефективно конвертує субстрати в продукти.

Також відомо, що у спектрофотометра є конструктивні обмеження, що не дозволяють визначати оптичну густину нижче певного рівня. Відповідно необхідно було підібрати такий інтервал для отримання відгуку після ініціювання каскаду реакцій в кюветі, в якому оптична густина лежатиме в межах чутливого діапазону спектрофотометра та зростатиме лінійно і з максимальною швидкістю внаслідок того, що всі реагенти прийдуть в динамічну рівновагу. Для цього було проаналізовано типовий відгук та обраховано зміну оптичної густини за хвилину протягом 25 хвилин з ініціювання каскаду реакцій.

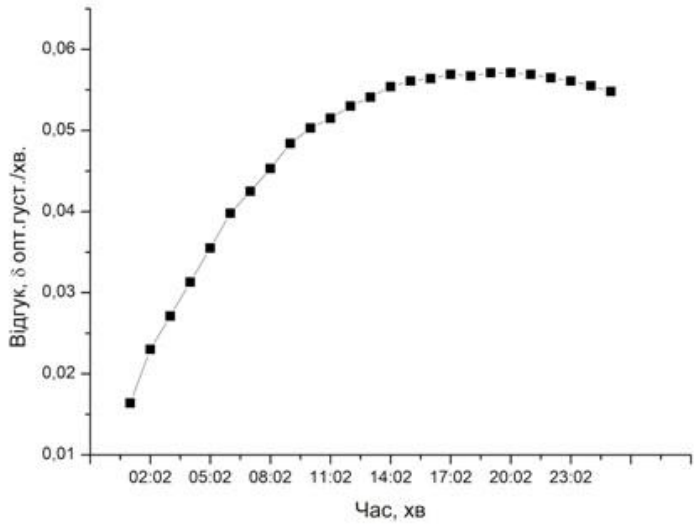

Рисунок 3.16 - Величина відгуку спектрофотометру в залежності від тривалості протікання реакції. Відгук обраховувався з типового експерименту, наведеного на рис. 3.14. Вимірювання проводилось у 25 мМ HEPES буфері, pH 7,4 за кімнатної температури, 552нм. Концентрація АСТ становила 100 U/L, GlOx – 0,025 U/ml, PerOx – 4,84 U/ml, L-аспартат – 8 mM, а-кетоглутарат – 2 mM, аміноантипірин – 0,48 mM, EHSPT – 0,66 mM.

Як видно на рис. 3.16, протягом перших хвилин 15 спостерігається параболічне зростання оптичної густини, що відображено як ділянка зростання величини відгуку. Після неї починається лінійна ділянка, в межах якої величина відгуку стабілізувалась і на якій можна проводити аналіз зразку. Саме в цьому діапазоні (15-18 хвилин) лежить найбільший відгук, тому було обрано проміжок 14-15 хвилини для використання в обрахунках різниці одиниць оптичної щільності розчину. Приблизно після 23 хвилини на високих концентраціях АСТ спостерігається спадання інтенсивності швидкості забарвлення розчину, що можна пояснити виснаженням якогось субстрату або виходом за межі робочого діапазону оптичного приладу.

25-хвилинна тривалість експерименту обумовлена тим, що саме такий час дозволяє отримати достатню кількість даних для вивчення кінетики реакції.

Інтервал точками вимірювання у 10 секунд вибраний через те, що короткі інтервали дозволяють зафіксувати більше точок даних, виявити динаміку процесу на високому роздільному рівні та допомогають виявити швидкі зміни у кінетиці реакції, які можуть бути пропущені при більших інтервалах вимірювань. Також це дозволяє виявити піки та максимуми у динаміці змін, що є важливим для визначення максимальних реакційних швидкостей та інших параметрів.

Отже, ми проводимо спектрофотометричне вимірювання 25 хвилин з інтервалом 10 секунд, а зміну оптичної густини розчину визначаємо в проміжку 14-15 хвилина.

3.2.4. Вивчення впливу концентрації глутаматоксидази на спектрофотометричний аналіз

Оскільки в даному дослідженні було адаптовано відому методику, то необхідно було підібрати оптимальні концентрації реагентів для максимально ефективного протікання реакції та уникнення лімітування

іншими компонентами, окрім АСТ. Концентрації субстратів АСТ, а саме аспартату та а-кетоглутарату було підібрано амперометрично (пункт 3.1.3). Тому наступним етапом був підбір оптимальної концентрації глутаматоксидази, щоб забезпечити достатню чутливість та лінійність відгуків.

Для цього було отримано калібрувальні криві відгуків на АСТ при наступних концентраціях ГлОкс: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 од.акт./мл. Як видно з рисунку 3.17 А найбільша чутливість спостерігалась при концентрації 0.25 од.акт./мл. Тому для подальшої роботи при дослідженні вмісту АСТ в зразках сироватки крові було обрано саме цю концентрацію ГлОкс в кюветі.

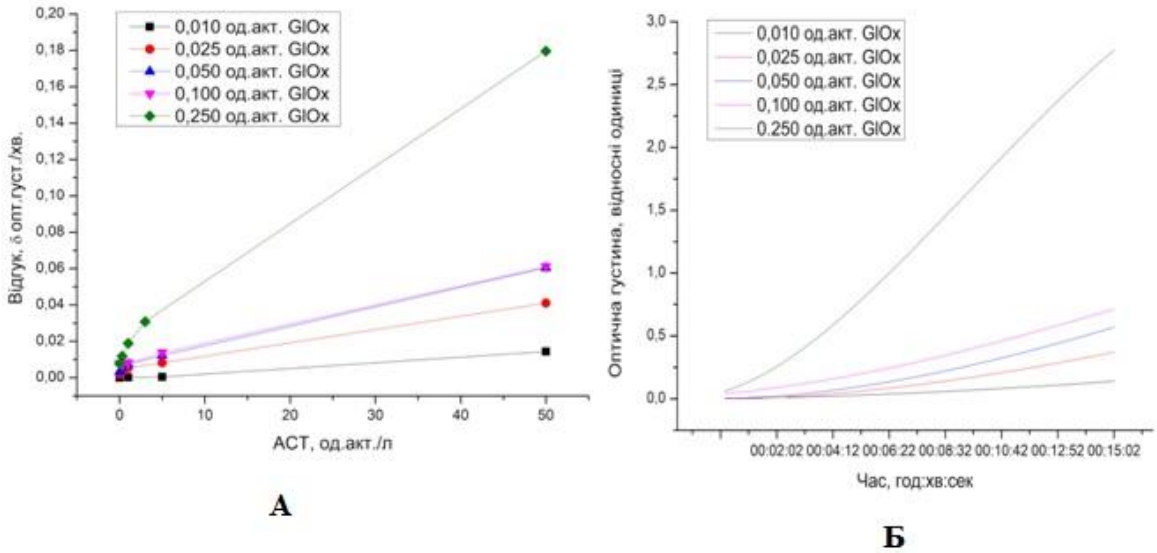

Рисунок 3.17 - Калібрувальні криві спектрофотометра при різних концентраціях ГлОкс в кюветі (А) та зміна оптичної густини розчину при 50 од.акт./л АСТ на відповідних концентраціях ГлОкс (Б)

3.2.5. Аналітичні характеристики спектрофотометричного методу

Спектрофотометричний метод вимірювання характеризувався чутливістю 0,18 од.опт.густ./хв на 50 од.акт.АСТ/л та межею детекції близько 0,3 од.акт./л АСТ (рис. 3.18). Лінійний діапазон лежав в межах 0.3-10 од.акт./л АСТ, що, з урахування 10-кратного розведення, цілком достатньо

для визначення нормальних рівнів АСТ та невисоких перевищень. Однак для точного визначення вмісту АСТ в зразках з значним перевищенням норми необхідне проведення повторного аналізу з більшим розведенням зразку.

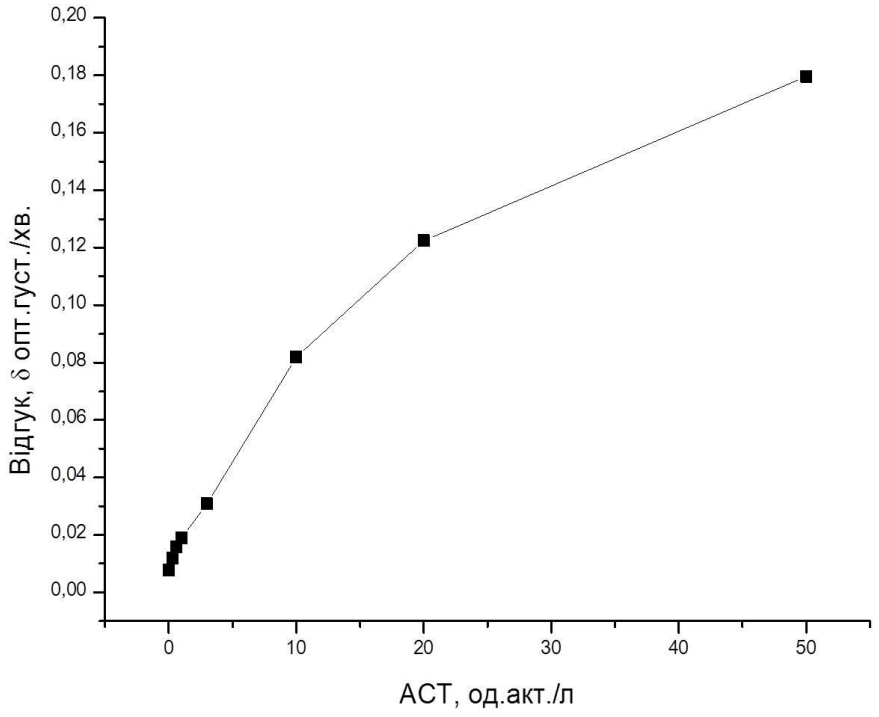

Рисунок 3.18 – Калібрувальна крива для визначення концентрації АСТ у досліджуваних зразках.

3.2.6. Спектрофотометричне вимірювання АСТ в зразках сироватки крові

Як відомо, сироватка часто має певне забарвлення, відповідно, це буде впливати на результати оптичних досліджень. Нівелювати цей вплив частково можна використанням тої самої сироватки, що аналізується, в якості референтного розчину. Це допоможе вилучити фонові сигнали, викликані наявністю в сироватці оптично активних речовин, що поглинають світло на тій самій хвилі, що і хіноіміновий барвник, який є індикатором протікання реакції в даному дослідженні.

Тому було вирішено дослідити взаємодію сироватки з буферних розчином після 10-кратного розведення (рис. 3.19).

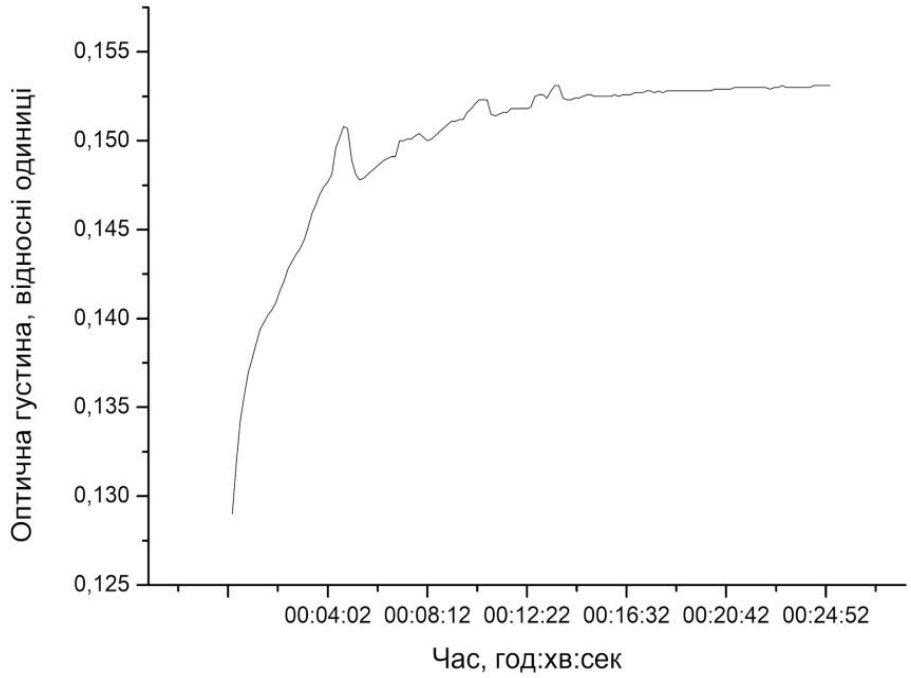

Рисунок 3.19 - Зміна оптичної густини 10-кратно розведеної сироватки протягом 25 хвилин після розведення

Експериментальні дані показали, що після розведення сироватки в буфері HEPES 25мМ, pH 7.4 протягом 13 хвилин в кюветі відбуваються певні фізико-хімічні процеси, що впливають на оптичну густину розчину в місці детекції. Тому було вирішено, що в подальшому сироватка буде змішуватись з буферним розчином, відстоюватись протягом 15 хвилин і лише потім будуть вноситись всі інші реагенти для ініціації реакції. Це дозволить уникнути хибнопозитивних (завищених) результатів.

3.2.7. Порівняння результатів біосенсорного та спектрофотометричного методів

Після аналізу 7 зразків сироватки крові з різним вмістом АСТ (як норма так і патологія) біосенсорним та спектрофотометричним шляхом було

отримано кореляційний графік (рис. 3.20). Коефіцієнт кореляції (R2) між результатами становив 0.9, що є досить високими показниками і свідчить про співвідносність результатів біосенсорної системи та контрольного метода. Таким чином, було підтверджено здатність даного біосенсора правильно розрізняти різні концентрації АСТ, відповідно, його можна використовувати для визначення вмісту АСТ в реальних зразках сироватки крові.

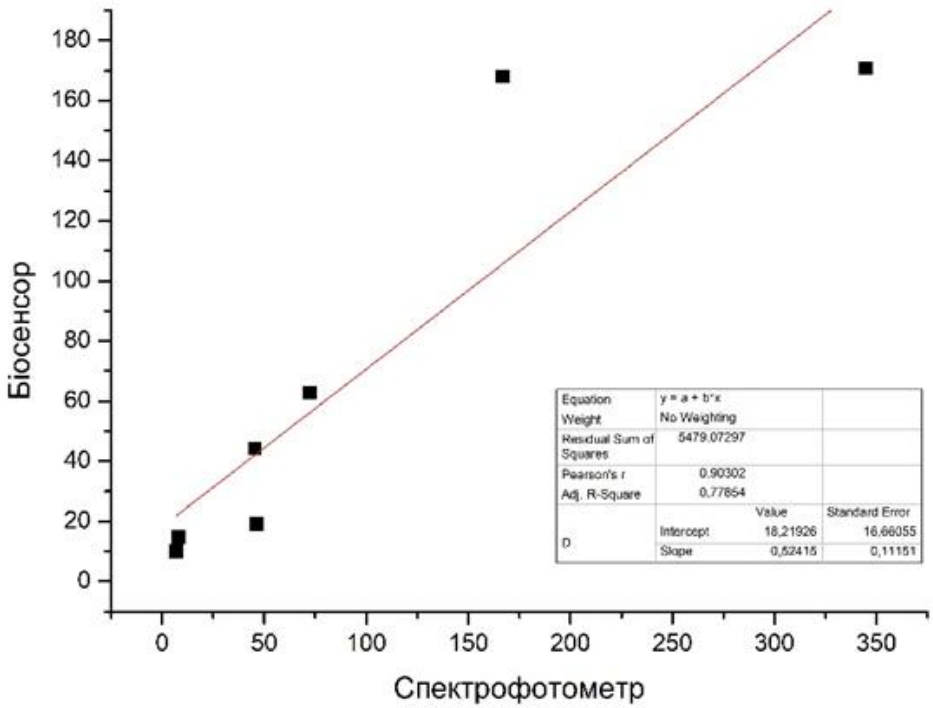

Рисунок 3.20 – Графік кореляції між результатами визначення рівня АСТ у реальних зразках сироватки, отриманих двома методами – амперометричним та спектрофотометричним.

РОЗДІЛ 4. ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА

Резюме стартап-проєкту

Бізнес-ідея: розробка та комерціалізація амперометричного біосенсора для визначення рівня АСТ в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові людини.

Мета стартапу: розробити і випустити на ринок високочутливий біосенсор, який дозволяє швидко та точно визначати рівень АСТ в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові людини

Об’єкт дослідження: біосенсорна технологія та її застосування для точного визначення рівня АСТ у сироватці крові людини.

Місце розробки в інноваційному ланцюжку цінності: суспільна цінність полягає у ефективному визначенні рівня АСТ у сироватці крові, що впливає на точність діагнозів та результативність лікування.

Місце товару у міжнародній класифікації товарів: МКТП (Клас 10): До цього класу належать, головним чином, хірургічні, медичні, стоматологічні та ветеринарні апарати, інструменти та вироби, що зазвичай використовуються для діагностування, лікування або покращування функцій або стану організму людей і тварин [75].

Глобальний ринок біосенсорів демонструє стійкий ріст завдяки зростанню інтересу до точної медицини та діагностики. Попит на високочутливі біосенсори для визначення біомаркерів у біологічних рідинах постійно зростає. Український ринок сенсорів поки не має власних виробників амперометричних біосенсорів. Ринок зазвичай спрямований на закордонних виробників, але існує великий потенціал для створення вітчизняних продуктів.

Наступні дві таблиці надають загальну інформацію зовнішнього та внутрішнього середовища, наочно відображаючи позитивні та негативні сторони наукової розробки.

Таблиця 4.1. Перелік загроз і можливостей зовнішнього і внутрішнього середовищ

Загрози	Можливості
Застаріння технології біосенсору	Гнучка модернізація технології біосенсору
Виток інформації про технологію	Посилення заходів збереження конфіденційності та інтелектуальної власності
Втрата позицій на ринку	Розширення маркетингових зусиль та підвищення якості продукту
Зміни в законодавстві щодо біомедичних вимірювань	Активна співпраця з правовими експертами та адаптація до нових стандартів
Вплив змін в економіці на фінансування проекту	Пошук альтернативних джерел фінансування та диверсифікація інвестицій

Таблиця 4.2. Перелік переваг та недоліків зовнішнього і внутрішнього середовищ

Переваги	Недоліки
Висока чутливість вимірювань	Чутливість до нецільових складових досліджуваного зразка
Інноваційні технології у розробці сенсорів	Великі витрати на дослідження та розробку
Гнучкість у виготовленні та масштабуванні	Обмежений термін придатності продукту
Наявність власної наукової інфраструктури	Необхідність постійного оновлення технічних знань
Монополізація ринку України	Негативний вплив на ринкову динаміку та благополуччя споживачів
Високий рівень достовірності та надійності результатів досліджень	Потреба в ретельній валідації продукту перед використанням в медичних дослідженнях

Таблиця 4.3. Технологічна здійсненність ідеї проекту

Ідея проекту	Технології її реалізації	Наяв-ність технологій	Доступ-ність техно логій
Розробка амперометричного біосенсора для визначення рівня АСТ в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові людини	Виготовлення фізичного електрохімічного перетворювача (низькотемпературне запаювання, припаювання мідного контакту, механічна обробка шліфуванням)	+	+
	Формування біоселективної мембрани за допомогою методу ковалентної іммобілізації ферменту на поверхні електроду з використанням зшиваючого агенту	+	+

Вказані у таблиці технології забезпечують успішне виконання стартап-проекту. Всі необхідні засоби та складові доступні в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України, у відділі біомолекулярної електроніки.

Вироблені технологічні рішення, пов'язані з розробкою високочутливого амперометричного біосенсора для визначення рівня АСТ в біологічних рідинах, можуть бути передані в користування різним суб'єктам, таким як приватні підприємці, державні установи та інші зацікавлені сторони. Зазначена інформація, що включає схему електрохімічного перетворювача, схему вимірювальної установки, опис методики формування та нанесення

біоселективної мембрани, а також методики проведення вимірювань, може бути використана переліченими суб’єктами для: створення лабораторії для масового серійного аналізу зразків сироватки крові, що постачатимуться, наприклад, медичними установами; проведення подальших наукових досліджень, спрямованих на мініатюризацію вимірювальної установки для досягнення справжньої портативності біосенсора.

ВИСНОВКИ

З урахуванням проаналізованої літератури стосовно сучасних методів вимірювання АСТ було:

1. Розроблено амперометричний біосенсор для визначення вмісту АСТ.
2. Досліджено вплив параметрів іммобілізації глутаматоксидази та концентрацій субстратів АСТ на функціонування біосенсора.
3. Вивчено аналітичні характеристики розробленого АСТ-чутливого біосенсора: лінійний діапазон (5-100 од.акт./л), динамічний діапазон (1-500 од.акт./л), мінімальна межа визначення (1 од.акт./л), чутливість (12 нА/хв на 50 од.акт.АСТ/л).
4. Апробовано розроблений біосенсор при аналізі АСТ в зразках сироватки крові.
5. Оптимізовано методику спектрофотометричного вимірювання АСТ та проведено спектрофотометричний аналіз зразків сироватки крові.
6. Проведено порівняльний аналіз результатів біосенсорного та спектрофотометричного методів визначення АСТ. Коефіцієнт кореляції становив 0,9.
7. Доведено, що розроблений біосенсор можна з успіхом використовувати для визначення рівня активності АСТ в сироватці крові.
8. Розроблено стартап-проєкт по створенню та комерціалізації амперометричного біосенсора для визначення рівня АСТ в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові людини. Визначено, що розроблений біосенсор є лабораторним прототипом і може слугувати основою для розробки комерційного портативного приладу для вимірювання активності АСТ або для розробки лабораторії, де буде проводитись серійний аналіз зразків сироватки крові, які постачатимуться, наприклад, медичними установами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Braunstein AE, Kritzmann MG. Decomposition and synthesis of amino acids by conversion of amines; studies on muscle tissue. Enzymologia 1937;2:129-46.

2. Panteghini M. Aspartate-Aminotransferase Isoenzymes. Clin Biochem 1990;23:311-9.

3. Hayashi H, Wada H, Yoshimura T, et al. Recent Topics in Pyridoxal 5'-Phosphate Enzyme Studies. Annu Rev Biochem 1990;59:87-110.

4. Mcphalen CA, Vincent MG, Picot D, et al. Domain Closure in Mitochondrial Aspartate-Aminotransferase. J Mol Biol 1992;227:197-213.

5. Doyle JM, Schinina ME, Bossa F, et al. The Amino-Acid-Sequence of Cytosolic Aspartate-Aminotransferase from Human Liver. Biochem J 1990;270:651-7.

6. Lee J, Gokey T, Ting DL, et al. Dimerization misalignment in human glutamate-oxaloacetate transaminase variants is the primary factor for PLP release. PLoS One 2018;13:e0203889.

7. Martini F, Angelaccio S, Barra D, et al. The Primary Structure of Mitochondrial Aspartate-Aminotransferase from Human-Heart. Biochimica Et Biophysica Acta 1985;832:46-51.

8. Schatz G, Butow RA. How Are Proteins Imported into Mitochondria. Cell 1983;32:316-8.

9. Rej R. Multiple Molecular-Forms of Human Cytoplasmic Aspartate-Aminotransferase. Clin Chim Acta 1981;112:1-11.

10. Leung FY, Henderson AR. Isolation and Purification of Aspartate-Aminotransferase Isoenzymes from Human-Liver by Chromatography and Isoelectric-Focusing. Clin Chem 1981;27:232-8.

11. Rej R. Aminotransferases in disease. Clin Lab Med 1989;9:667-87.

12. Vanderlaarse A, Dijkshoorn NJ, Hollaar L, et al. The (Iso) Enzyme-Activities of Lactate-Dehydrogenase, Alpha-Hydroxybutyrate Dehydrogenase,

Creatine-Kinase and Aspartate-Aminotransferase in Human Myocardial Biopsies and Autopsies. Clin Chim Acta 1980;104:381-91.

13. Kamimoto Y, Horiuchi S, Tanase S, et al. Plasma-Clearance of Intravenously Injected Aspartate-Aminotransferase Isozymes - Evidence for Preferential Uptake by Sinusoidal Liver-Cells. Hepatology 1985;5:367-75.

14. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, et al. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. Clin Chem 2000;46:2027-49.

15. Alkan, H. F., Walter, K. E., Luengo, A., Madreiter-Sokolowski, C. T., Stryeck, S., Lau, A. N., Al-Zoughbi, W., Lewis, C. A., Thomas, C. J., Hoefler, G., Graier, W. F., Madl, T., Vander Heiden, M. G., & Bogner-Strauss, J. G. (2018). Cytosolic Aspartate Availability Determines Cell Survival When Glutamine Is Limiting. In Cell Metabolism (Vol. 28, Issue 5, pp. 706-720.e6). Elsevier BV. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.021

16. Infantino V, Dituri F, Convertini P, et al. Epigenetic upregulation and functional role of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier isoform 1 in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(1):38-47. doi:10.1016/j.bbadis.2018.10.018

17. Rabkin, S. W., & Desjardins, P. (1984). Mitochondrial and cytoplasmic isoenzymes of aspartate aminotransferase in sera of patients after myocardial infarction. In Clinica Chimica Acta (Vol. 138, Issue 3, pp. 245–257). Elsevier BV. https://doi.org/10.1016/0009-8981(84)90131-1

18. AMANO, J., SUNAMORI, M., OKUMURA, T., KAMEDA, T., & SUZUKI, A. (1982). Studies on the significance of serum mitochondrial aspartate aminotransferase activity following ischemic cardiac arrest. In Japanese Circulation Journal (Vol. 46, Issue 12, pp. 1345–1352). Japanese Circulation Society. https://doi.org/10.1253/jcj.46.1345

19. Hartmann, C. M., Lindenmann, J.-M., Christen, P., & Jaussi, R. (1991). The precursor of mitochondrial aspartate aminotransferase is imported into mitochondria faster than the homologous cytosolic isoenzyme with the same

presequence attached. In Biochemical and Biophysical Research Communications (Vol. 174, Issue 3, pp. 1232–1238). Elsevier BV. https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91553-o

20. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. EXCLI J 2016;15:817-28.

21. 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.

22. Sarita Yadav, Radha Jangra, Bhagya Rekha Sharma, Minakshi Sharma, Current Advancement in Biosensing techniques for determination of Alanine aminotransferase and Aspartate aminotransferase-a Mini Review, Process Biochemistry, Volume 114, 2022, Pages 71-76, ISSN 1359-5113, https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.010.

23. A.D. Aulbach, C.J. Amuzie, A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development. Biomarkers in Nonclinical Drug Development, second edi., Elsevier Inc., 2017, pp. 447–471, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620- 4.00017-7.

24. Z. Liu, S. Que, J. Xu, T. Peng, Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review, Int. J. Med. Sci. 11 (2014) 925–935, https://doi.org/10.7150/ ijms.8951.

25. 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

26. 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

27. Lehmann-Werman R, Magenheim 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. Giannini E, Risso D, Botta F, et al. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch Intern Med*. 2003;163(2):218-224. doi:10.1001/archinte.163.2.218

31. Tameda M, Shiraki K, Ooi K, et al. Aspartate aminotransferase-immunoglobulin complexes in patients with chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2005;11(10):1529-1531. doi:10.3748/wjg.v11.i10.1529

32. Peng, Xiulan et al. “Prognostic and Clinical Significance of Aspartate Aminotransferase-to-Lymphocyte Ratio Index in Individuals with Liver Cancer: A Meta-Analysis.” *Disease markers* vol. 2022 3533714. 9 Feb. 2022, doi:10.1155/2022/3533714

33. H. NYBLOM, U. BERGGREN, J. BALLDIN, R. OLSSON, HIGH AST/ALT RATIO MAY INDICATE ADVANCED ALCOHOLIC LIVER DISEASE RATHER THAN HEAVY DRINKING, *Alcohol and Alcoholism*, Volume 39, Issue 4, July 2004, Pages 336–339, https://doi.org/10.1093/alcalc/agh074

34. Ndrepepa, G. (2020). Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. *Journal Of Laboratory And Precision Medicine, 6*. doi:10.21037/jlpm-20-93

35. Kubo SH, Walter BA, John DHA, et al. Liver-Function Abnormalities in Chronic Heart-Failure - Influence of Systemic Hemodynamics. Arch Intern Med 1987;147:1227-30.

36. Han, Ji-Hee et al. “Markedly Elevated Aspartate Aminotransferase from Non-Hepatic Causes.” *Journal of clinical medicine* vol. 12,1 310. 30 Dec. 2022, doi:10.3390/jcm12010310

37. Lim, Andy Kh. “Abnormal liver function tests associated with severe rhabdomyolysis.” *World journal of gastroenterology* vol. 26,10 (2020): 1020-1028. doi:10.3748/wjg.v26.i10.1020

38. Liu, Wei et al. “Liver injury associated with acute pancreatitis: The current status of clinical evaluation and involved mechanisms.” *World journal of clinical cases* vol. 9,34 (2021): 10418-10429. doi:10.12998/wjcc.v9.i34.10418

39. Palmer, William C et al. “Diagnosis and Management of Genetic Iron Overload Disorders.” *Journal of general internal medicine* vol. 33,12 (2018): 2230-2236. doi:10.1007/s11606-018-4669-2

40. Severin E (2004) Biochemistry 2nd edition: 470

41. Babson A.L., Shapiro P.O., Williams P.A.R., Phillips G.E. The use of a diazonium salt for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase in serum. *Clin. Chim. Acta.* 1962;7:199–205.

42. Lippi U., Guidi G. A new colorimetric ultramicromethod for serum glutamicoxalacetic and glutamic-pyruvic transaminase determination. *Clin. Chim. Acta.* 1970;28:431–437.

43. Whitaker J.F. A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the $NADH/NAD^+$ system. *Clin. Chim. Acta.* 1969;24:23–27.

44. Cammarata PS, Cohen PP. Spectrophotometric measurement of transamination reactions. J Biol Chem 1951;193:45-52.

45. Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS. Transaminase Activity in Human Blood. J Clin Invest 1955;34:126-31.

46. Danese E, Montagnana M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. Ann Transl Med 2016;4:194.

47. Ladue JS, Wroblewski F, Karmen A. Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase Activity in Human Acute Transmural Myocardial Infarction. Science 1954;120:497-9.

48. Itoh H., Srere P.A. A new assay for glutamate-oxaloacetate transaminase. *Anal. Biochem.* 1970;35:405–410.

49. Huang, Xing-Jiu et al. "Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques." *Sensors (Basel, Switzerland)* vol. 6,7 756–782. 31 Jul. 2006

50. Janasek D., Spohn U. Chemiluminometric flow injection analysis procedures for the enzymatic determination of L-alanine, α-ketoglutarate and lglutamate. *Biosens. Bioelectron.* 1999;14:123–129.

51. Marquette C.A., Degiuli A., Blum L.J. Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate. *Biosens. Bioelectron.* 2003;19:433–439.

52. Catz S.D., Carreras M.C., Poderoso J.J. Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence. *Free Radic. Biol. Med.* 1995;19:741–748.

53. Canepari S., Carunchio V., Girelli A.M., Messina A. Determination of aspartate aminotransferase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1994;656:191–195.

54. Rietz B., Guilbault G.G. Fluorimetric assay of serum glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase and α-hydroxybutyrate dehydrogenàse by solution and solid surface fluorescent methods. *Anal. Chim. Acta.* 1975;77:191–198.

55. Khampha W., Yakovleva J., Isarangkul D., Wiyakrutta S., Meevootisom V., Emnéus J. Specific detection of L-glutamate in food using flow-injection analysis and enzymatic recycling of substrate. *Anal. Chim. Acta.* 2004;518:127–135.

56. Garrison D., Beattie J., Namboodiri M.A.A. A radiochemical microassay for aspartate aminotransferase activity in the nervous system. *Anal. Biochem.* 1988;172:96–103.

57. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. Essays Biochem. 2016 Jun 30;60(1):1-8. doi: 10.1042/EBC20150001. PMID: 27365030; PMCID: PMC4986445.

58. Chandra S. Pundir, Vinay Narwal, Bhawna Batra, Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review, Biosensors and Bioelectronics, Volume 86, 2016, Pages 777-790, ISSN 0956-5663, https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.076.

59. Hamid R. Zare, Zahra Shekari, Chapter 6 - Types of monitoring biosensor signals, Editor(s): Ali A. Ensafi, Electrochemical Biosensors, Elsevier, 2019, Pages 135-166, ISBN 9780128164914, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00006-1.

60. V. Narwal, R. Deswal, B. Batra, V. Kalra, R. Hooda, M. Sharma, J.S. Rana, Cholesterol biosensors: a review, Steroids 143 (2019) 6–17, https://doi.org/ 10.1016/j.steroids.2018.12.003.

61. C.S. Pundir, V. Narwal, B. Batra, Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: a review, Biosens. Bioelectron. 86 (2016) 777–790, https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.076.

62. Daniel R. Thévenot, Klara Toth, Richard A. Durst, George S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1, Biosensors and Bioelectronics, Volume 16, Issues 1–2, 2001, Pages 121-131, ISSN 0956-5663, https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4.

63. A. Ahmed, J.V. Rushworth, N.A. Hirst, P.A. Millner, Biosensors for whole-cell bacterial detection, Clin. Microbiol. Rev. 27 (2014) 631–646, https://doi.org/ 10.1128/CMR.00120-13.

64. B.A. Cornell, Handbook of biosensors and biochips, Ion Channel Biosens. (2008) 321–336, https://doi.org/10.1002/9780470061565.

65. K.S. Chang, C.K. Chang, S.F. Chou, C.Y. Chen, Sequential measurement of aminotransferase activities by amperometric biosensors, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 2914–2920, https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.12.001.

66. M.J. Song, D.H. Yun, N.K. Min, S.I. Hong, Electrochemical biosensor array for liver diagnosis using silanization technique on nanoporous silicon electrode, J. Biosci. Bioeng. 103 (2007) 32–37, https://doi.org/10.1263/jbb.103.32.

67. Y.D. Han, S.Y. Song, J.H. Lee, D.S. Lee, H.C. Yoon, Multienzyme-modified biosensing surface for the electrochemical analysis of aspartate transaminase and alanine transaminase in human plasma, Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 797–805, https://doi.org/10.1007/s00216-011-4797-6.

68. M.J. Song, D.H. Yun, S.I. Hong, An electrochemical biosensor array for rapid detection of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, Biosci. Biotechnol. Biochem. 73 (2009) 474–478, https://doi.org/10.1271/bbb.60043.

69. C.J. Hsueh Alan, J.H. Wang, L. Dai, C.C. Liu, Development of an electrochemicalbased aspartate aminotransferase nanoparticle ir-c biosensor for screening of liver diseases, Biosensors 2 (2012) 234–244, https://doi.org/10.3390/bios2020234.

70. C. Hsueh, Development of Electrochemical Biosensors for Potential Liver Disease Detections of Alt & Ast and Application of Ionic Liquid Into Biosensing-Modified Electrodes, 2013, pp. 1–166.

71. D. Jiang, C. Li, T. Liu, L. Li, Z. Chu, W. Jin, X. Ren, A regular nanostructured dithiolene metal complex film for ultrasensitive biosensing of liver enzyme, Sens. Actuators B Chem. 241 (2017) 860–867, https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.122.

72. Мруга, Д. О., Кучеренко, Д. Ю., Борисова, Т. О., Дзядевич, С. В., & Солдаткін, О. О. (2020). DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF

CONSTRUCTION OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED ON THE GLUTAMATE OXIDASE FOR DETECTION OF GLUTAMATE IN THE SERUM SAMPLES. In Sensor Electronics and Microsystem Technologies (Vol. 17, Issue 2, pp. 35–49). Odesa I.I. Mechnikov National University. https://doi.org/10.18524/1815-7459.2020.2.205823

73. Aspartate aminotransferase: An old dog teaches new tricks Michael D. Toney M.D. Toney, Arch. Biochem. Biophys. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.002

74. Assay Procedure for Pyruvate Oxidase Bacterial [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/assay-procedure-for-pyruvate-oxidase-bacterial.

75. Перелік класів Міжнародної класифікації товарів і послуг (МКТП) з поясненнями [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://justicon.ua/ua/info/perecen-klassov-mezdunarodnoj-klassifikacii-tovarov-i-uslug-mktu-s-obasneniem.html.