
БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553
DOI 10.18524/1815-7459.2018.3.142042

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ ТА ПІРУВАТУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ

І. С. Кучеренко¹, Я. В. Топольнікова¹, Д. В. Книжникова², О. О. Солдаткін^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 02680, м. Київ, Україна

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

e-mails: kucherenko.i.s@gmail.com, topolnyk.ya@gmail.com, melonika5@gmail.com,
alex_sold@yahoo.com

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ ТА ПІРУВАТУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ

І. С. Кучеренко, Я. В. Топольнікова, Д. В. Книжникова, О. О. Солдаткін

Анотація. Метою даної роботи була оптимізація процедури одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату в сироватці крові людини з використанням біосенсорної системи. Система складалась з двох амперометричних біосенсорів на основі піруватоксидази та лактатоксидази відповідно, що підключались до однієї вимірювальної схеми та одночасно працювали в єдиній вимірювальній комірці. В роботі було перевірено залежність відгуків біосенсорної системи від ступеня розведення сироватки крові в робочій комірці. Досліджено відтворюваність відгуків і зміну калібрувальних кривих біосенсорної системи при роботі з сироваткою крові. Визначено концентрації лактату, пірувату та їх співвідношення в зразках сироватки крові і показана висока кореляція отриманих результатів з даними контрольного методу. Доведено, що запропонована біосенсорна система придатна для швидкого визначення лактату, пірувату та їх співвідношення і може бути використана при медичній діагностиці відповідних захворювань.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, лактат, піруват, співвідношення лактату і пірувату, сироватка крові

OPTIMIZATION OF THE PROCEDURE OF LACTATE AND PYRUVATE DETERMINATION IN BLOOD SERUM USING A BIOSENSOR SYSTEM

I. S. Kucherenko, Ya. V. Topolnikova, D. V. Knyzhnykova, O. O. Soldatkin

Abstract. The purpose of this work was to optimize the procedure for simultaneous determination of concentrations of lactate and pyruvate in human serum using a biosensor system. The system consisted of two amperometric biosensors based on pyruvate oxidase and lactate oxidase, respectively, that were connected to one measuring circuit and simultaneously operated in a single measuring cell. In the work, the dependence of the responses of the biosensor system on the dilution of serum in the working cell was tested. The reproducibility of the responses and the change in the calibration curves of the biosensor system when working with serum were studied. The concentrations of lactate, pyruvate and their ratio in blood serum samples were determined and a high correlation of the results with the data of the control method was shown. It is proved that the proposed biosensor system is suitable for the rapid determination of lactate, pyruvate and their ratio and can be used in the medical diagnostics of the relevant diseases.

Keywords: amperometric biosensor, lactate, pyruvate, lactate to pyruvate ratio, blood serum

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТАТА И ПИРУВАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ

И. С. Кучеренко¹, Я. В. Топольникова¹, Д. В. Книжникова², О. О. Солдаткин^{1,2}

Аннотация. Целью данной работы была оптимизация процедуры одновременного определения концентраций лактата и пирувата в сыворотке крови человека с использованием биосенсорной системы. Система состояла из двух амперометрических биосенсоров на основе пируватоксидазы и лактатоксидазы соответственно, что подключались к одной измерительной схеме и одновременно работали в единой измерительной ячейке. В работе была проверена зависимость откликов биосенсорной системы от степени разведения сыворотки крови в рабочей ячейке. Исследована воспроизводимость откликов и изменение калибровочных кривых биосенсорной системы при работе с сывороткой крови. Определены концентрации лактата, пирувата и их соотношение в образцах сыворотки крови и показана высокая корреляция полученных результатов с данными контрольного метода. Доказано, что предложенная биосенсорная система пригодна для быстрого определения лактата, пирувата и их соотношения и может быть использована при медицинской диагностике соответствующих заболеваний.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, лактат, пируват, соотношение лактата и пирувата, сыворотка крови

1. ВСТУП

Лактат є продуктом метаболізму глюкози та утворюється з пірувату в анаеробних умовах. Підвищення концентрації лактату (лактатацидоз) в крові виникає при гіперпродукції лактату за анаеробних умов внаслідок тканинної гіпоксії. Гіпоксія виникає при багатьох патологічних станах, наприклад ішемії, значної крововтрати, асфіксії, пневмотораксі. Також лактатацидоз виникає або посилюється при недостатньому кліренсі лактату, зокрема при недостатності нирок, печінки, діабеті, тощо [1]. Тому вимірювання концентрації лактату у крові використовується у відділеннях реанімації для оцінки тяжкості стану пацієнта, прогнозу імовірності шоквих станів та колапсу і смертності пацієнтів [2]. Так, стабільна концентрація лактату в крові більше 5 мМ на фоні важкого ацидозу (рН крові менше 7,35) дає прогноз 80% смертності [3].

На сьогоднішній день метаболічні схеми виникнення та перебігу лактатацидозу є предметом дискусії, особливо у випадках, пов'язаних із септичними станами [4]–[6]. Однак розрізнення причин лактатацидозу має цінне діагностичне значення для невідкладної терапії, і в клінічних умовах з цією метою визначають відношення лактату до пірувату у венозній крові. Коли клітинне дихання порушене і є дефіцит кисню, окислення пірувату зменшується, при цьому накопичується багато відновлених форм НАДН і ФАДН₂, і відношення лактату до пірувату зростає, на фоні зростання концентрації обох субстратів. Натомість, порушення функції піруватдегідрогенази блокує цикл Кребса та дихальний ланцюг на самому початку, тому відновлені форми не накопичуються, і співвідношення не змінюється. Також відношення лактату до пірувату у венозній крові використовується для розрізнення вроджених дисфункцій піруватдегідрогеназного комплексу та інших форм вродженого лактатацидозу у новонароджених, для діагностики септичних станів [7].

При підвищеній концентрації лактату в новонароджених проводять визначення кон-

центрації пірувату для додаткової діагностики, але величини співвідношення лактату до пірувату дещо відрізняються в різних літературних джерелах. Згідно з ARUP Laboratories (США), співвідношення більше 30 вказує на порушення дихального ланцюга або циклу Кребса, в той час як співвідношення менше 25 вказує на порушення метаболізму пірувату. Медичні лабораторії Майо (Mayo Medical Laboratories, США) вважають, що дефекти дихального ланцюга зазвичай приводять до співвідношення лактату до пірувату більше 20, в той час як дефекти піруватдегідрогеназного комплексу – до співвідношення менше 10. Таким чином, в обох випадках низьке співвідношення свідчить про проблеми в роботі піруватдегідрогенази, а високе – про порушення роботи мітохондрій.

Крім медичних цілей, визначення концентрацій та співвідношення лактату до пірувату може бути інформативним для харчової промисловості, зокрема, для контролю деяких процесів бродіння та оцінки якості молочних продуктів [8].

Традиційними методами вимірювання лактату та пірувату в клінічній практиці є спектрометрія [1] та флуориметрія [9], також застосовуються такі методи як ЯМР [10] та високоефективна рідинна хроматографія [11]. Однак ці методи потребують тривалої попередньої обробки проби біоматеріалу, а також наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. Біосенсорні методи є також високоточними, швидкими та селективними, при цьому потребують незначних об'ємів зразків біологічних рідин для аналізу.

На сьогодні існують розробки біосенсорів для аналізу лактату та пірувату, як для клінічної діагностики, так і для інших потреб, зокрема харчової промисловості. Так, Canbay et al. розробили біосенсорну систему для одночасного вимірювання лактату та пірувату у молочнокислих продуктах на основі бактерій *Lactobacillus delbrueckii*, іммобілізованих у шарі поліпіролу [8]. Revzin et al. розробили лабораторний прототип біосенсорного масиву для одночасного вимірювання глюкози,

лактату та пірувату [12]. Однак систем чи мультибіосенсорів для одночасного вимірювання концентрацій лактату та пірувату, які б були апробовані при роботі з сироваткою крові, досі не було описано.

Тому метою даної роботи була оптимізація амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату і їх співвідношення в сироватці крові людини та порівняння отриманих результатів з контрольним методом визначення лактату і пірувату.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріали

Для виготовлення біоселективних елементів біосенсорної системи використовували ферменти лактатоксидазу (ЛОД) із *Pedococcus sp.* (КФ 1.1.3.2) з активністю 35 од. акт./мг та піруватоксидазу (ПОД) з *Aerococcus sp.* (КФ 1.2.3.3) з активністю 54 од. акт./мг виробництва Sigma-Aldrich Chimie (США).

Субстратами біосенсорної системи виступали лактат натрію та піруват натрію виробництва Sigma-Aldrich Chimie (США). Також в роботі використовували бичачий сироватковий альбумін, фотополімер полівінілалкоголь, що містить стирилпіридинові групи (PVA-SbQ), 25% водний розчин глутарового альдегіду, *m*-фенілендіамін, $Mg(NO_3)_2$, NEPES, 4-аміноантипирин та натрієва сіль 3-(*N*-етил-3-метиланліно)-2-гідроксипропансульфонової кислоти (ЕМГК) виробництва Sigma-Aldrich Chimie (США). Тіамінпірофосфат (ТПФ) у вигляді ліофілізату для приготування розчинів для ін'єкцій був вироблений фірмою «Biofarma» (Україна). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

Зразки сироватки крові людей були люб'язно надані Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу. Зразки містили відносно невеликі концентрації пірувату (до 50 мкМ), тому в декілька зразків було штучно додано піруват для перевірки роботи біосенсорної системи

в усьому діапазоні можливих концентрацій пірувату і співвідношень лактату до пірувату.

Виготовлення біоселективних елементів

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхню амперометричних перетворювачів. Перед іммобілізацією чутливу поверхню перетворювачів модифікували плівкою з полі(фенілендіамін) у, метод нанесення якої був описаний в попередній роботі [13]. Дана плівка запобігала окисненню інтерферуючих речовин, які могли бути присутніми в зразках сироватки крові.

Вихідний розчин для виготовлення піруват-чутливого біосенсора містив 20% (тут і далі – масова частка) ПОД, 5% БСА, 10% гліцеролу в 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Вихідний розчин для виготовлення лактат-чутливого біосенсора містив 8% ЛОД, 4% БСА, 10% гліцеролу в 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Дані розчини змішували з 13,3 % водним розчином PVA-SbQ у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на чутливу поверхню перетворювача і опромінювали її ультрафіолетовим світлом протягом 25 хв. за допомогою УФ лампи КФ-4М для формування біоселективних мембран.

Методика вимірювання

В якості робочих перетворювачів для створення біосенсорної системи виступали платинові дискові електроди власного виробництва, які описані у попередній роботі [14]. Вони склалися з платинового дроту діаметром 0,5 мм, запаяного у скляній трубці. Після нанесення відповідних ферментів на чутливі області перетворювачів отримували біосенсори, чутливі до лактату та пірувату. Два біосенсори, допоміжний платиновий електрод (платиновий дріт) та Ag/AgCl електрод порівняння під'єднували до потенціостату PalmSens (PalmInstruments BV, Нідерланди) із використанням мультиплексору тієї ж фірми. Виміри проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 1,5 мл при постійному переми-

шуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. В якості робочого буфера використовували 25 мМ HEPES, до якого додавали кофактори піруватоксидази – іони магнію (125 мкМ Mg²⁺), ТПФ (500 мкМ) та іони фосфорної кислоти (20 мМ), і доводили рН до 7,4. Усі дослідження проводились щонайменше у трьох повторностях.

Методика фотометричного визначення лактату та пірувату

Для фотометричного вимірювання концентрацій лактату та пірувату застосовувались кольорові реакції.

Вимірювання проводились у пластикових кюветах об'ємом 1 мл. У кювету додавали: 0,3 мМ ЕМГК, 0,1 мМ 4-аміноантипірину, 1 од. акт. пероксидази хрому, 25 мМ HEPES, рН 7,4, та аліквоту сироватки крові конкретного пацієнта (10 мкл для визначення лактату та 100 мкл для визначення пірувату). Запуск реакції починався при додаванні 0,56 од. акт. лактатоксидази або 0,74 од. акт. піруватоксидази. Лактат окиснювався ЛОД до пірувату і пероксиду водню, який в присутності пероксидази реагував з ЕМГК з утворенням фіолетової сполуки. Інтенсивність забарвлення була пропорційна концентрації лактату у пробі. Аналогічно відбувалось і визначення пірувату, оскільки ПОД окиснювала піруват і утворювала пероксид водню.

Оскільки сироватка крові може мати певне забарвлення навіть у розведеному вигляді, а також містити власний пероксид водню, значення абсорбції (інтенсивності поглинання світла розчином) досліджуваного розчину перед додаванням ЛОД чи ПОД прирівнювали до нуля. Після цього в кювету додавали ЛОД чи ПОД і інкубували протягом 5 хв, після чого вимірювали значення абсорбції проби. Підбір оптимального часу інкубації було проведено попередньо.

Вимірювання абсорбції розчину сироватки проводилось спектрофотометром Thermo Electron Corporation Bio Mate 5. На початку роботи було підбрано оптимальну довжину хвилі світла для вимірювання абсорбції

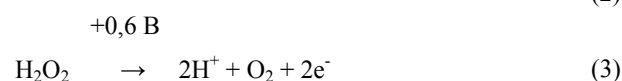
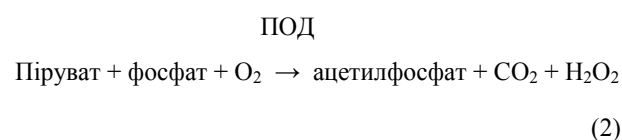
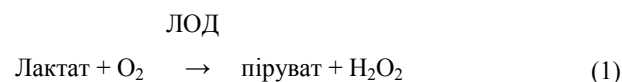
– найвищий пік поглинання продукту реакції спостерігався при довжині хвилі 555 нм, і саме цю довжину хвилі використовували у всіх фотометричних вимірюваннях.

Абсорбцію невідомого зразку порівнювали з попередньо отриманими калібрувальними кривими, які показували залежність абсорбції розчину від концентрацій лактату та пірувату.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Принцип роботи біосенсорної системи

Робота біосенсорної системи базується на наступних ферментативних реакціях. Лактат-чутливий біосенсор містить ЛОД, яка окиснює лактат до пірувату, генеруючи одночасно пероксид водню (1). Піруват-чутливий біосенсор містить ПОД, яка перетворює піруват і фосфат на ацетилфосфат, вуглекислий газ та пероксид водню (2). Утворений H₂O₂ розкладається на чутливій поверхні перетворювачів в реакції (3) і поява в ній електронів призводить до відгуків біосенсорів.



Розробку та детальний опис біосенсорної системи було представлено авторами в попередній роботі [15]. Коротко, за оптимальних умов (див. розділ «Методика вимірювання»), лінійний діапазон визначення лактату становив від 5-1000 мкМ, а пірувату – 10-5000 мкМ. Мінімальна межа визначення лактату складала 3 мкМ, а пірувату – 5 мкМ. Тривалість одного аналізу була 5 хв.

Підбір оптимального розведення сироватки крові

В принципі біосенсорна система придатна для визначення лактату та пірувату у нероз-

веденій сироватці крові, але це не є доцільним, оскільки сироватка містить велику кількість компонентів (білки, ліпіди, фрагменти зруйнованих клітин), які можуть адсорбуються на чутливій поверхні біосенсорів [16], [17]. Це призводить до погіршення дифузії речовин до поверхні і зменшення чутливості біосенсора.

Для зменшення впливу компонентів зразку і збільшення кількості зразків, які можуть бути проаналізовані біосенсорною системою без необхідності заміни біосенсорів, потрібно проводити розведення зразку. Друга необхідність у розведенні зразка полягає в надто високій концентрації лактату в сироватці, яка часто перевищує лінійний діапазон роботи лактат-чутливого біосенсора. Розведення зразку дозволяє зменшити концентрацію лактату, щоб напевно потрапити в лінійну ділянку роботи біосенсора.

В нашому випадку розведення відбувається безпосередньо у робочій комірці, тобто попередньої обробки проби проводити не потрібно. Зважаючи на мінімально можливу концентрацію лактату у сироватці (близько 0,5 мМ), можливо розводити пробу до 150 разів. Об'єм робочої комірки біосенсора становить 1,5 мл, відповідно 150-кратне розведення потребує додавання до комірки 10 мкл сироватки. Ми вирішили дослідити залежність відгуків біосенсора від доданого об'єму сироватки крові (Рис. 1).

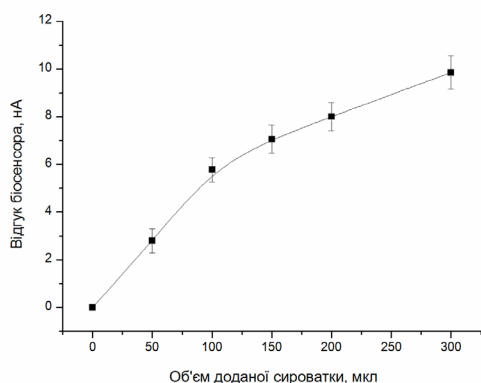


Рис. 1. Залежність відгуку лактат-чутливого біосенсора від об'єму сироватки крові, який було додано до робочої комірки.

Виявилось, що відгук зростає лінійно при додаванні до 100 мкл сироватки (тобто 15-кратного розведення), після чого збільшення відгуків стає повільнішим, що свідчить про погіршення чутливості біосенсора при надто високій концентрації сироватки. Це можна пояснити негативним впливом компонентів сироватки на роботу біосенсора. Для піруват-чутливого біосенсора спостерігалась аналогічна картина, але діапазон можливих розведень сироватки був значно вужчим: мінімальна межа визначення пірувату становили 5 мкМ, а мінімальна концентрація пірувату в сироватці крові за нормальних умов – 40 мкМ, тому максимально можливим є 8-кратне розведення зразку. В подальшій роботі використовували 5-кратне розведення зразку для забезпечення надійного попадання концентрації пірувату та лактату в межі лінійного діапазону роботи біосенсорної системи.

Перевірка впливу сироватки крові на калібрувальні криві біосенсорної системи

Як було згадано раніше, передбачалося, що під час вимірювань сироватки крові відбудеться осадження речовин на поверхні біоселективної мембрани біосенсорів, що призведе до поступового зменшення чутливості біосенсорів. Тому необхідно було порівняти калібрувальні криві біосенсорної системи до та після аналізу сироватки. Як виявилось, після 7 вимірювань сироватки крові чутливість біосенсорної системи не тільки не зменшилась, а навіть збільшилась на 10-20% (Рис. 2). Ймовірно це пояснюється поступовим відновленням активності ферментів після іммобілізації, в той час як блокування чутливої поверхні компонентами сироватки було несуттєвим. Цей ефект слід враховувати при проведенні вимірювань. Наприклад, для розрахунків концентрацій речовин можливо використовувати середню чутливість біосенсорів до та після аналізів сироватки, або ввести коефіцієнт збільшення чутливості біосенсорів з часом. Також можливе використання методу стандартних додавань, для якого не потрібне попереднє отримання калібрувальних кривих.

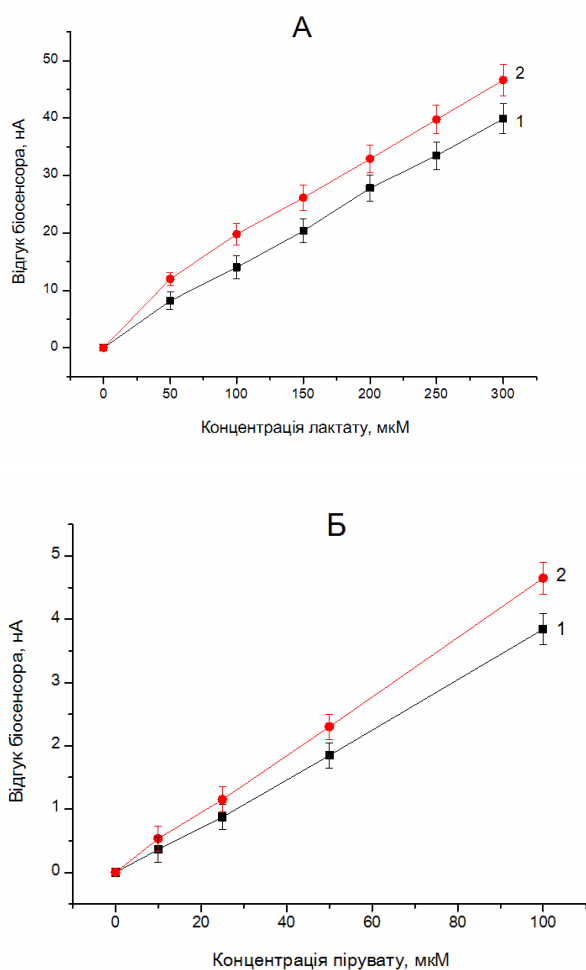


Рис. 2. Калібрувальні криві лактат-чутливого біосенсора (А) та піруват-чутливого біосенсора (Б), отримані до (1) та після (2) семи вимірювань сироватки крові.

Відтворюваність відгуків біосенсорної системи на сироватку крові

Відтворюваність відгуків біосенсорів є важливою аналітичною характеристикою, яка показує розбіжність між результатами декількох вимірювань одного зразку. Для її оцінки було отримано 7 відгуків біосенсорної системи на додавання сироватки крові до робочої комірки (Рис. 3). Під час вимірювань, зменшення відгуків не спостерігалось. Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків лактат-чутливого біосенсора становило 4,5%, а піруват-чутливого – 9,3%. Це свідчить про достатньо високу точність біосенсорної системи і можливість її практич-

ного використання для багаторазового вимірювання реальних зразків.

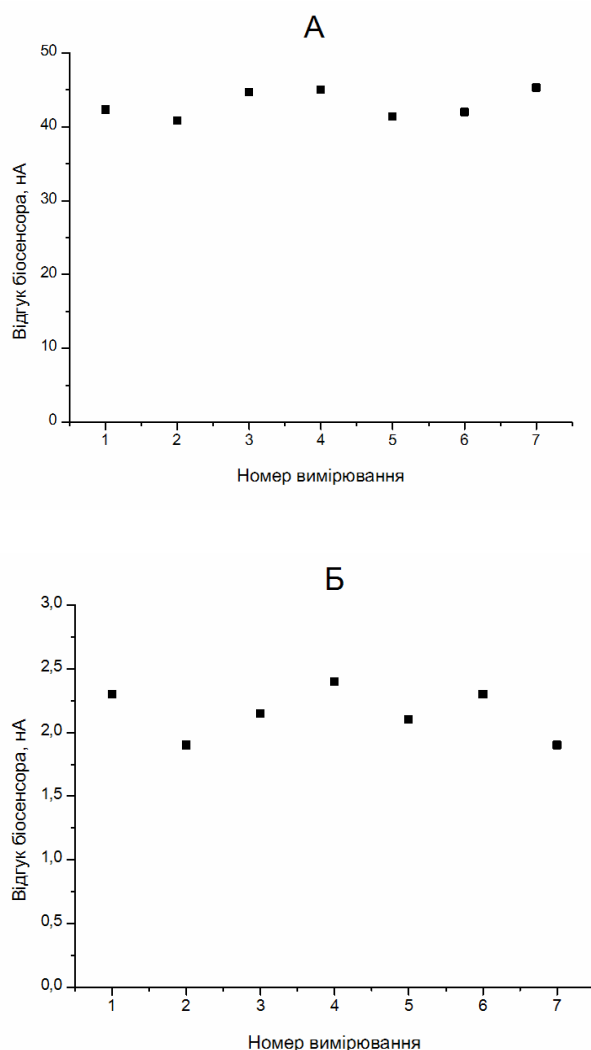


Рис. 3. Відтворюваність відгуків лактат-чутливого біосенсора (А) та піруват-чутливого біосенсора (Б) при проведенні послідовних вимірювань сироватки крові.

Визначення концентрації лактату, пірувату і їх співвідношення у зразках сироватки крові

Після оптимізації процедури вимірювання було проведено визначення концентрації лактату та пірувату у семи зразках сироватки крові людей. Біосенсорні вимірювання проводились із використанням калібрувальних кривих, в той час як контрольним методом виступав фотометричний метод визначення лактату та пірувату (Табл. 1). Також були

побудовані кореляційні графіки (Рис. 4). Кореляція (R^2) між результатами, отриманими за допомогою лактат-чутливого біосенсора і фотометрією становила 0,944, результатами піруват-чутливого біосенсора і фотометрією – 0,964, що є досить високим показником і свідчить про співвідносність результатів біосенсорної системи та контрольного метода. Таким чином, біосенсорну систему можна використовувати для визначення концентрацій лактату, пірувату і їх співвідношення у сироватці крові.

Доцільно порівняти отримані результати з літературними даними. Зокрема, в роботі [18] в 7 здорових людей у стані спокою концентрація лактату в крові була встановлена як $0,8 \pm 0,03$ мМ, а пірувату – $0,11 \pm 0,04$ мМ. Співвідношення лактату до пірувату становило $8,9 \pm 3,2$. В іншій роботі досліджували концентрації лактату і співвідношення лак-

тату до пірувату у 60 пацієнтів з шоківим станом і лактатацидозом [19]. У випадку септичного шоку, концентрації лактату становили від 4,6 мМ до 12,2 мМ, а співвідношення лактату до пірувату – від 19 до 37. В пацієнтів, які одужували, концентрація лактату зменшилась до $2,8 \pm 0,4$ мМ, а співвідношення лактату до пірувату зменшилось до 14 ± 1 після 24 годин. У випадку кардіогенного шоку, концентрація лактату складала 4 ± 1 мМ, а співвідношення лактату до пірувату – 40 ± 6 . В іншій роботі були встановлені співвідношення лактату до пірувату в 110 дітей з гострою печінковою недостатністю, які становили від 2,8 до 170,0, а медіанне значення складало 22,5 [20]. Таким чином, наші результати вимірювань концентрацій лактату та пірувату і їх співвідношення, наведені в Табл. 1, є цілком співставними з літературними даними.

Таблиця 1.

Результати визначення концентрацій лактату та пірувату в сироватці крові за допомогою біосенсорної системи та фотометричного метода.

Номер зразку	Концентрація лактату		Концентрація пірувату		Співвідношення лактату до пірувату
	Біосенсор, мМ	Фотометрія, мМ	Біосенсор, мкМ	Фотометрія, мкМ	
1	$2,7 \pm 0,7$	$3,0 \pm 0,7$	113 ± 19	121 ± 21	24
2	$1,4 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	116 ± 18	108 ± 20	12
3	$1,1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	98 ± 15	91 ± 14	11
4	$0,6 \pm 0,1$	$0,54 \pm 0,2$	31 ± 4	25 ± 4	19
5	$1,3 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,4$	32 ± 3	27 ± 5	41
6	$1,2 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	26 ± 6	35 ± 7	46
7	$1,4 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,6$	134 ± 17	146 ± 20	10

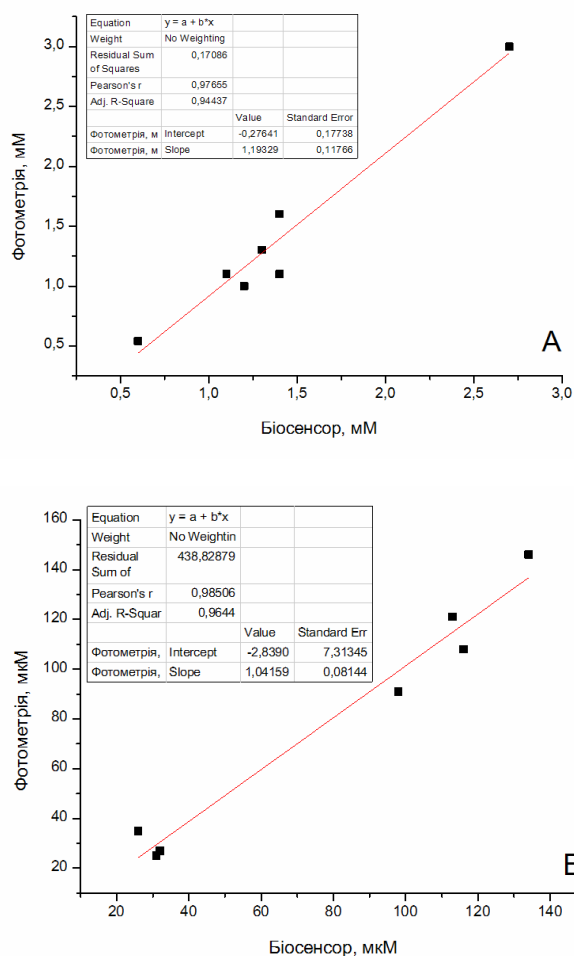


Рис. 4. Кореляція між результатами визначення концентрацій лактату (А) та пірувату (Б) в сироватці крові за допомогою біосенсора та фотометричного метода.

4. ВИСНОВКИ

В роботі оптимізовано біосенсорну систему для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату в сироватці крові. Встановлено, що оптимальне розведення сироватки крові для проведення вимірювань становить 5 разів. Показано, що після послідовних аналізів 7 зразків сироватки крові, біосенсорна система демонструє незначне збільшення чутливості до субстратів, що, ймовірно, пояснюється поступовою активацією ферментів в складі біоселективних елементів після їх іммобілізації. Відтворюваність відгуків біосенсорної системи при роботі з сироваткою становила 4,5% для лактат-чутливого біосенсора та 9,3% – піруват-чутливого.

Проведено вимірювання концентрації лактату і пірувату в 7 зразках сироватки крові, визначено співвідношення лактату до пірувату і показано високу кореляцію отриманих результатів з контрольним методом – фотометричним визначенням. Розроблена біосенсорна система може використовуватись у клінічній діагностиці захворювань, які пов'язані зі змінами в концентраціях лактату та пірувату у сироватці крові.

ПОДЯКА

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] C. S. Pundir, V. Narwal, and B. Batra, "Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 86, pp. 777–790, Dec. 2016.
- [2] O. Kruse, N. Grunnet, and C. Barfod, "Blood lactate as a predictor for in-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review," *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.*, vol. 19, no. 1, p. 74, 2011.
- [3] Z. Zhang and X. Xu, "Lactate Clearance Is a Useful Biomarker for the Prediction of All-Cause Mortality in Critically Ill Patients," *Crit. Care Med.*, vol. 42, no. 9, pp. 2118–2125, Sep. 2014.
- [4] B. Suetrong and K. R. Walley, "Lactic Acidosis in Sepsis: It's Not All Anaerobic," *Chest*, vol. 149, no. 1, pp. 252–261, Jan. 2016.
- [5] E. Nuzzo, X. Liu, K. Berg, L. Andersen, and M. Doninno, "Pyruvate dehydrogenase levels are low in sepsis," *Crit. Care*, vol. 19, no. Suppl 1, p. P33, 2015.
- [6] M. Garcia-Alvarez, P. Marik, and R. Bellomo, "Sepsis-associated hyperlactatemia," *Crit. Care*, vol. 18, no. 5, p. 503, Oct. 2014.
- [7] F.-G. Debray, G. A. Mitchell, P. Allard, B. H. Robinson, J. A. Hanley, and M. Lambert, "Diagnostic Accuracy of Blood Lactate-to-Pyruvate Molar Ratio in the Differential Diagno-

sis of Congenital Lactic Acidosis,” *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 5, pp. 916–921, Mar. 2007.

[8] E. Canbay, A. Habip, G. Kara, Z. Eren, and E. Akyilmaz, “A microbial biosensor based on *Lactobacillus delbrueckii* sp. bacterial cells for simultaneous determination of lactic and pyruvic acid,” *Food Chem.*, vol. 169, pp. 197–202, Feb. 2015.

[9] Q. Xue and E. S. Yeung, “Indirect fluorescence determination of lactate and pyruvate in single erythrocytes by capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 661, no. 1–2, pp. 287–295, Feb. 1994.

[10] G. D. Graham *et al.*, “Proton magnetic resonance spectroscopy of cerebral lactate and other metabolites in stroke patients,” *Stroke*, vol. 23, no. 3, pp. 333–40, Mar. 1992.

[11] A. Hallström, A. Carlsson, L. Hillered, and U. Ungerstedt, “Simultaneous determination of lactate, pyruvate, and ascorbate in microdialysis samples from rat brain, blood, fat, and muscle using high-performance liquid chromatography,” *J. Pharmacol. Methods*, vol. 22, no. 2, pp. 113–24, Sep. 1989.

[12] A. F. Revzin, K. Sirkar, A. Simonian, and M. V. Pishko, “Glucose, lactate, and pyruvate biosensor arrays based on redox polymer/oxidoreductase nanocomposite thin-films deposited on photolithographically patterned gold microelectrodes,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 81, no. 2–3, pp. 359–368, Jan. 2002.

[13] T. Borisova *et al.*, “An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma,” *Anal. Chim. Acta*, Mar. 2018.

[14] I. S. Kucherenko, D. Y. Didukh, O. O. Soldatkin, and A. P. Soldatkin, “Amperometric biosensor system for simultaneous determina-

tion of adenosine-5'-triphosphate and glucose,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 11, 2014.

[15] Y. V. Topolnikova, D. V. Knyzhnykova, I. S. Kucherenko, S. V. Dzyadevych, and O. O. Soldatkin, “Development of amperometric biosensor system for simultaneous determination of pyruvate and lactate,” *Sens. Electron. Microsyst. Technol.*, vol. 14, no. 4, pp. 13–26, Dec. 2017.

[16] G. Rocchitta *et al.*, “Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 6, p. 780, May-2016.

[17] N. Wisniewski and M. Reichert, “Methods for reducing biosensor membrane biofouling,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 18, no. 3–4, pp. 197–219, Oct. 2000.

[18] M. A. Mintun, A. G. Vlassenko, M. M. Rundle, and M. E. Raichle, “Increased lactate/pyruvate ratio augments blood flow in physiologically activated human brain,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 2, pp. 659–664, Jan. 2004.

[19] B. Levy, L.-O. Sadoune, A.-M. Gelot, P.-E. Bollaert, P. Nabet, and A. Larcan, “Evolution of lactate/pyruvate and arterial ketone body ratios in the early course of catecholamine-treated septic shock,” *Crit. Care Med.*, vol. 28, no. 1, pp. 114–119, Jan. 2000.

[20] A. G. Feldman, R. J. Sokol, R. M. Hardison, E. M. Alonso, R. H. Squires, and M. R. Narkewicz, “Lactate and Lactate: Pyruvate Ratio in the Diagnosis and Outcomes of Pediatric Acute Liver Failure,” *J. Pediatr.*, vol. 182, p. 217–222.e3, Mar. 2017.

Стаття надійшла до редакції 16.08.2018 р.

UDC: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI 10.18524/1815-7459.2018.3.142042

OPTIMIZATION OF THE PROCEDURE OF LACTATE AND PYRUVATE DETERMINATION IN BLOOD SERUM USING A BIOSENSOR SYSTEM

I. S. Kucherenko¹, Ya. V. Topolnikova¹, D. V. Knyzhnykova², O. O. Soldatkin^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,
Zabolotnogo Str. 150, Kyiv, 02680, Ukraine.

²Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Volodymyrska Str. 64, Kyiv, 01003, Ukraine.

Summary

Aim: optimization of the procedure for simultaneous determination of concentrations of lactate and pyruvate in human serum using a biosensor system.

Methods. Biosensor system contained two amperometric biosensors, connected to one measuring circuit and simultaneously worked in a single measuring cell. Both biosensors were based on platinum disk electrodes. Using the PVA-SbQ photopolymer, the pyruvate oxidase was immobilized on the sensitive surface of one electrode, and lactate oxidase – on the second electrode. In the presence of lactate and pyruvate, the corresponding enzymes produced hydrogen peroxide, which was detected using an amperometric measurement method.

Results. The dependence of responses of the biosensor system on the degree of serum dilution in the work cell was checked. It was investigated how the calibration curves of the biosensor system change after work with serum. The reproducibility of biosensor system responses when working with serum has been studied. The concentrations of lactate, pyruvate and their ratio in serum samples were determined and compared with the results of the control method.

Conclusions. The amperometric biosensor system is adapted for the determination of the concentrations of lactate and pyruvate and their ratio in serum. It is proved that the proposed biosensor system is suitable for the rapid determination of lactate, pyruvate and their ratio and can be used in the medical diagnosis of certain diseases.

Keywords: amperometric biosensor, lactate, pyruvate, lactate to pyruvate ratio, blood serum

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI 10.18524/1815-7459.2018.3.142042

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ ТА ПІРУВАТУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ

І. С. Кучеренко¹, Я. В. Топольнікова¹, Д. В. Книжникова², О. О. Солдаткін^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 02680, м. Київ, Україна

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

Реферат

Мета: оптимізація процедури одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату в сироватці крові людини з використанням біосенсорної системи.

Методи дослідження. Біосенсорна система на основі двох амперометричних біосенсорів, що підключались до однієї вимірювальної схеми та одночасно працювали в єдиній вимірювальній комірці. Обидва біосенсори були на основі платинових дискових електродів. За допомогою фотополімеру PVA-SbQ на чутливу поверхню одного електроду було іммобілізовано фермент піруватоксидазу, а на другому електроді – лактатоксидазу. При наявності субстратів ферменти продукували пероксид водню, який і реєструвався.

Результати дослідження. Перевірено залежність відгуків біосенсорної системи від ступеня розведення сироватки крові в робочій комірці. Досліджено, як змінюються калібрувальні криві біосенсорної системи після роботи з сироваткою. Перевірено відтворюваність відгуків біосенсорної системи при роботі з сироваткою. Визначено концентрації лактату, пірувату та їх співвідношення в зразках сироватки крові і порівняно отримані результати з даними контрольного методу.

Висновки. Біосенсорну систему адаптовано для визначення концентрацій лактату і пірувату та їх співвідношення у сироватці крові. Доведено, що запропонована біосенсорна система придатна для швидкого визначення лактату, пірувату та їх співвідношення і може бути використана при медичній діагностиці деяких захворювань.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, лактат, піруват, співвідношення лактату і пірувату, сироватка крові