

*На правах рукописи*



Прибиль Медея Михайловна

**Высокоэффективные лактатные  
биосенсоры на основе инженерии  
иммобилизованной лактатоксидазы**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор  
**Карякин Аркадий Аркадьевич**

Официальные доктор химических наук, профессор  
оппоненты: **Шлеев Сергей Валерьевич**

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», заведующий лабораторией бионики.

доктор химических наук, профессор

**Евтюгин Геннадий Артурович**

Химический институт им. А.М. Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», заведующий кафедрой аналитической химии.

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук.**

Защита состоится 7 октября 2015 года в 15 ч 00 мин на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте химического факультета <http://www.chem.msu.ru>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан \_\_ \_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Моногорова О.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Контроль за содержанием лактата в крови важен для клинической диагностики и спортивной медицины. В клинической диагностике уровень лактата в организме человека изменяется при наличии ряда заболеваний, например, гипоксии тканей, кардиогенного или бактериально-токсического шока, дыхательной недостаточности, диабета. Выработка лактата в энергично работающих скелетных мышцах может увеличиваться в десятикратном размере, что обосновывает интерес спортивной медицины к уровню лактата в крови.

Разработка высокочувствительных, надёжных и экспрессных методов определения лактата представляет большой интерес. Среди них биосенсоры занимают одну из лидирующих позиций, так как специфичность иммобилизованного фермента к своему субстрату позволяет проводить измерения непосредственно в образце, несмотря на сложность его состава, без предварительной пробоподготовки, что также сокращает время анализа. В настоящее время для определения лактата широко используются биосенсоры, основанные на действии фермента лактатоксидазы, в таком случае происходит детектирование пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции. На сегодняшний день наиболее эффективными сенсорами на пероксид водорода являются электроды, модифицированные берлинской лазурью, которая позволяет избирательно определять пероксид водорода по реакции его восстановления в присутствии кислорода.

Лактатоксидаза – очень лабильный фермент, поэтому повышение стабильности является одной из ключевых задач при создании биосенсоров на её основе. Основные затраты рабочего времени приходятся именно на подбор оптимальных условий иммобилизации фермента. Сканирующая электрохимическая микроскопия является мощнейшим способом визуализации в ближней зоне и позволяет отображать локальную электрохимическую поверхностную активность в микроскопическом разрешении. Адаптация сканирующей электрохимической микроскопии для скрининга ферментсодержащих мембран позволяет существенно уменьшить трудоемкость поиска условий иммобилизации.

В клинической диагностике и спортивной медицине лактат определяют в крови, однако всё большее внимание уделяется неинвазивным методам исследования, которые не нарушают целостности кожных и слизистых покровов и, тем самым, исключают заражение и травматизм. Химический анализ образцов с целью

неинвазивной диагностики подразумевает наличие экскреторной жидкости, концентрации искоемых метаболитов в которой коррелируют с содержанием их в крови. С этой точки зрения интерес вызывает пот, так как показано, что увеличение концентрации лактата в крови коррелирует с увеличением содержания аналита в поте. В процессе тяжелых спортивных тренировок концентрация лактата в поте достигает 40 - 80 мМ, а, вместе с тем, верхняя граница определяемых содержаний аналита с использованием наилучшего известного лактатного биосенсора составляет 5 мМ; то есть, определение лактата в поте можно проводить только путем разбавления образца в 100 и более раз, что не представляется возможным при мониторинге в режиме реального времени.

Таким образом, было необходимо разработать лактатные биосенсоры, характеризующиеся длительной стабильностью, высокой чувствительностью и воспроизводимостью, с возможностью расширения диапазона определяемых концентраций в область высоких значений с целью создания неинвазивного монитора для определения лактата.

**Цель работы** состояла в создании высокоэффективных лактатных биосенсоров на основе инженерии лактатоксидазы при иммобилизации для возможности определения лактата в различных диапазонах содержания, в частности при разработке неинвазивного монитора состояния гипоксии.

Достижение поставленной цели предусматривало решение **следующих задач**:

- ✓ адаптация метода сканирующей электрохимической микроскопии для определения пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции, с целью скрининга ферментсодержащих мембран;
- ✓ исследование ферментсодержащих мембран на основе  $\gamma$ -аминопропилсилоксана различной плотности с целью нахождения оптимального состава смеси для иммобилизации фермента и создания высокостабильного и высокочувствительного биосенсора для определения лактата;
- ✓ использование перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации лактатоксидазы с целью понижения сродства фермента к субстрату и, тем самым, расширения диапазона определяемых концентраций лактата с использованием биосенсора в область высоких значений, необходимых для анализа неразбавленного пота;

- ✓ нахождение оптимального содержания  $\gamma$ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера в водно-органической смеси для иммобилизации фермента с целью создания биосенсора, позволяющего определять физиологические содержания лактата в поте (5 - 80 мМ);
- ✓ интеграция полученного биосенсора на высокие концентрации лактата в неинвазивный монитор для определения лактата в поте непосредственно с поверхности кожи в режиме реального времени;
- ✓ апробация неинвазивного монитора для определения лактата в поте в режиме реального времени в состоянии покоя и при физической нагрузке, сравнение результатов определения с данными, полученными альтернативным методом.

### **Научная новизна.**

Адаптирован метод сканирующей электрохимической микроскопии с использованием высокостабильного микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью, для выявления профиля концентрации пероксида водорода. С помощью сканирующего электрохимического микроскопа проведен скрининг ферментсодержащих мембран различного состава и установлено оптимальное содержание  $\gamma$ -аминопропилсилоксана в водно-органической смеси для иммобилизации лактатоксидазы, при использовании которого достигаются наивысшие показатели чувствительности и стабильности лактатных биосенсоров. По чувствительности биосенсор ( $0.33 \cdot \text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) в четыре раза превосходит лучший известный датчик для определения лактата. Стабильность разработанного биосенсора в два раза выше в сравнении с наилучшим известным лактатным датчиком.

Предложено использовать отрицательно заряженный перфторсульфонируемый полимер при иммобилизации лактатоксидазы для экранирования субстрат-связывающего участка, с целью понижения сродства фермента к субстрату. Использование смешанных мембран из перфторсульфонируемого полимера и  $\gamma$ -аминопропилсилоксана позволило расширить диапазон определяемых концентраций лактата в область высоких значений вплоть до 80 мМ в периодическом режиме тестирования, что покрывает физиологическое содержание аналита в поте. После трех часов непрерывных измерений уровень сигнала биосенсора остается на первоначальном уровне. Кажущаяся константа Михаэлиса лактатоксидазы достигает 10 мМ, что в 30 раз выше,

чем при использовании электронейтральных силоксановых мембран для иммобилизации фермента.

Разработана система для непрерывного неинвазивного мониторинга состояния гипоксии. Достоверность результатов по содержанию лактата в поте в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки, полученных при апробации неинвазивного монитора, подтверждена с помощью альтернативного метода.

### **Практическая значимость.**

Разработан высокостабильный микроэлектрод для определения пероксида водорода, используемый в качестве зонда для сканирующего электрохимического микроскопа. Коэффициент чувствительности микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью, составляет  $1.6 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , линейный диапазон определяемых концентраций пероксида водорода от  $1 \cdot 10^{-5}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$  М. Показана высокая операционная стабильность даже в очень жестких условиях (1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ): после двух часов непрерывных измерений сенсор не теряет чувствительности, а спустя 17 ч работы остается более 67% от первоначальной величины сигнала.

Создан высокочувствительный и высокостабильный лактатный биосенсор на основе ферментсодержащих мембран из  $\gamma$ -аминопропилсилоксана с аналитическими характеристиками в периодическом режиме тестирования: коэффициент чувствительности  $0.33 \cdot \text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , диапазон определяемых концентраций лактата  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-3}$  М, время отклика – 40 с. Продемонстрирована высокая операционная стабильность: величина отклика биосенсора после двух часов непрерывных измерений остается не менее 85% от первоначального значения. Также отмечено, что при хранении в течение 18 мес при  $+4^\circ\text{C}$  биосенсор сохраняет по крайней мере 80% от исходного значения чувствительности.

Разработан лактатный биосенсор на основе смешанных мембран из  $\gamma$ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации лактатоксидазы, позволяющий проводить определение лактата в неразбавленном поте. Аналитические характеристики в периодическом режиме тестирования: диапазон определяемых концентраций лактата 0.1 – 80 мМ, коэффициент чувствительности  $1.13 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , время отклика 1 мин. Показана высокая операционная стабильность: после 3 ч непрерывных измерений биосенсор не теряет сигнала. При хранении в течение 3 мес при  $+4^\circ\text{C}$  сохраняется исходное значение чувствительности.

Создан лабораторный образец неинвазивного монитора состояния гипоксии. Разработанный образец применим для непрерывного определения лактата в поте непосредственно с поверхности кожи в состоянии покоя и в процессе физической нагрузки. Коэффициент корреляции результатов анализа с данными, полученными альтернативным методом, составил 0.9930.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Использование сканирующей электрохимической микроскопии в качестве нового метода скрининга ферментсодержащих мембран различного состава для улучшения аналитических характеристик биосенсоров для определения лактата.
2. Создание высокочувствительного и высокостабильного лактатного биосенсора на основе  $\gamma$ -аминопропилсилоксана в качестве мембранообразующего соединения для лактатоксидазы.
3. Новый способ понижения аффинности лактатоксидазы к лактату, основанный на экранировании субстрат-связывающего участка отрицательно заряженным перфторсульфонируемым полимером при иммобилизации фермента на поверхность электрода, для расширения диапазона определяемых концентраций лактата в область высоких значений.
4. Создание биосенсора для определения высоких (миллимолярных) концентраций лактата с использованием  $\gamma$ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонируемого полимера для иммобилизации фермента.
5. Разработка конструкции неинвазивного монитора путем интеграции биосенсора, тонкослойной ячейки и потосборника.
6. Создание лабораторного образца неинвазивного монитора состояния гипоксии; новый способ определения лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке в режиме реального времени.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 3 статьях в зарубежных рецензируемых научных журналах и доложены на 3 всероссийских и международных научных конференциях, включающих XIX и XX Международную конференцию студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2012 - 2013 гг.) и Второй съезд аналитиков России

(Москва, Россия, 2013 г.), а также на международной выставке «Аналитика Экспо 2015» (Москва, Россия, 2015 г.).

### **Вклад автора в представленную работу.**

В основу диссертации положены результаты научных исследований, выполненных непосредственно автором в период 2012 - 2015 гг. Личный вклад соискателя заключается в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации, а также формулировке защищаемых научных положений и выводов. Основная часть работы была выполнена автором в лаборатории электрохимических методов кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа с использованием сканирующего электрохимического, электронного и лазерного микроскопов, изготовление гибких планарных микроэлектродов проводилось автором под руководством Dr. Fernando Cortes-Salazar, Dr. Andreas Lesch и Prof. Hubert Girault в лаборатории физической и аналитической электрохимии федеральной политехнической школы Лозанны (Швейцария) во время стажировки.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, трех основных разделов (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), выводов и списка литературы (207 ссылок). Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, включая 81 рисунок и 10 таблиц.



# СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Введение

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулирована цель исследований, показана научная новизна и практическая значимость работы.

## Обзор литературы

В главе «Лактат» систематизированы сведения о различных методах определения лактата, показана необходимость неинвазивного мониторинга аналита в режиме реального времени. Приведены данные об измерениях лактата в крови и в различных экскреторных жидкостях человека. В главе «Электрохимические биосенсоры» рассмотрены принцип действия, аналитические характеристики и приведена классификация биосенсоров. Показано, что при создании высокоэффективных биосенсоров решающими факторами являются выбор трансдьюсера (сенсора на пероксид водорода) и метода иммобилизации фермента на поверхности электрода. В главе «Электрокатализаторы окисления и восстановления пероксида водорода» приведено сравнение основных известных электрокаталитических систем окисления и восстановления пероксида водорода. Показано, что берлинская лазурь является наилучшим известным электрокатализатором восстановления пероксида водорода. В главе «Иммобилизация ферментов при конструировании биосенсоров» описаны различные способы иммобилизации ферментов, рассмотрены силоксаны и нафион в качестве мембранообразующих соединений для лактатоксидазы. Обращено внимание на улучшенный способ иммобилизации ферментов с использованием водно-органических смесей с высоким содержанием органического растворителя. В главе «Сканирующая электрохимическая микроскопия» рассмотрен принцип работы сканирующего электрохимического микроскопа, отмечены преимущества использования гибких планарных микроэлектродов в качестве зондов при проведении экспериментов. Сделанные на основании обзора литературы выводы подтверждают актуальность выбранной темы исследования.

## Экспериментальная часть

В главе, посвященной экспериментальной части, приведены способы модификации планарных электродов и микроэлектродов берлинской лазурью, методы определения активности фермента, а также способы его иммобилизации в мембраны силоксана и перфторсульфонируемого полимера. Описаны: порядок проведения экспериментов на сканирующем электрохимическом микроскопе, методики изготовления сенсоров и биосенсоров, а также процесс тестирования лактатных биосенсоров в проточно-инжекционном и периодическом режимах. Представлены стадии конструирования модельной тонкослойной ячейки, а также этапы создания неинвазивного монитора для определения лактата в поте в режиме реального времени. Приведена методика проведения электрофореза с пилокарпином, стимулирующего выработку пота.

## Результаты и их обсуждение

*Глава «Высокочувствительный биосенсор для определения лактата на основе лактатоксидазы и мембран с использованием  $\gamma$ -аминопропилсилоксана»<sup>1</sup>* посвящена созданию высокоэффективного лактатного биосенсора на основе лактатоксидазы (ЛОД), иммобилизованной в мембрану  $\gamma$ -аминопропилсилоксана.

Берлинская лазурь (БЛ) была выбрана в качестве трансдьюсера пероксида водорода, как обладающая наилучшими аналитическими и электрокаталитическими характеристиками. Широкий диапазон определяемых концентраций  $H_2O_2$ , стабильность, а также высокая чувствительность и селективность определения позволяют успешно применять электроды, модифицированные берлинской лазурью, в качестве основы при создании биосенсоров.

В лаборатории электрохимических методов химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова был разработан способ иммобилизации ферментов (глюкозооксидазы и лактатоксидазы) в пленки нерастворимого в воде полимера на поверхности трансдьюсера, заключающийся в экспонировании фермента в водно-органической полимерной смеси с высоким содержанием органического растворителя,

---

<sup>1</sup> M. M. Pribil, F. Cortés-Salazar, E. A. Andreyev, A. Lesch, E. E. Karyakina, O. G. Voronin, H. H. Girault, A. A. Karyakin. Rapid optimization of a lactate biosensor design using soft probes scanning electrochemical microscopy // J. Electroanal. Chem. 2014. V. 731. P. 112–118.

нанесении на поверхность рабочего электрода и высушивании. Данный способ обладает тем преимуществом, что формирование мембраны происходит из истинного раствора полимера, что приводит не только к повышению однородности ферментсодержащих мембран, но и к увеличению их активности и стабильности. Эта идеология была применена при создании лактатного биосенсора с иммобилизованной лактатоксидазой в мембраны  $\gamma$ -аминопропилсилоксана, фенилсилоксана и винилсилоксана, с содержанием в смеси от 0.1 до 0.5 об.%. Биосенсор на основе 0.3 об.%  $\gamma$ -аминопропилсилоксана (далее в тексте – силоксан) продемонстрировал аналитические характеристики, превосходящие все существующие аналоги, а именно, чувствительность  $0.18 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , линейный диапазон определяемых концентраций  $1\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-3} \text{ M}$  лактата, после 500 инъекций сохраняется 85% от исходного значения отклика<sup>2</sup>.

Поскольку ЛОД представляет собой очень лабильный фермент, то было необходимо оптимизировать условия иммобилизации с целью увеличения стабильности биосенсоров на её основе.

В настоящей работе было решено исследовать более высокие содержания силоксана в иммобилизующей смеси для фермента, что могло привести к повышению стабильности и активности биосенсоров на основе данных мембран.

### **Использование сканирующей электрохимической микроскопии для скрининга ферментсодержащих мембран различного состава<sup>3</sup>**

Сканирующая электрохимическая микроскопия (СЭХМ) - мощнейший современный метод исследования локальных свойств поверхности, который позволяет регистрировать электрохимическую активность в ближней зоне. В настоящей работе СЭХМ была впервые адаптирована для выявления профиля концентрации пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции, с целью упрощения и ускорения процесса оптимизации биосенсоров.

---

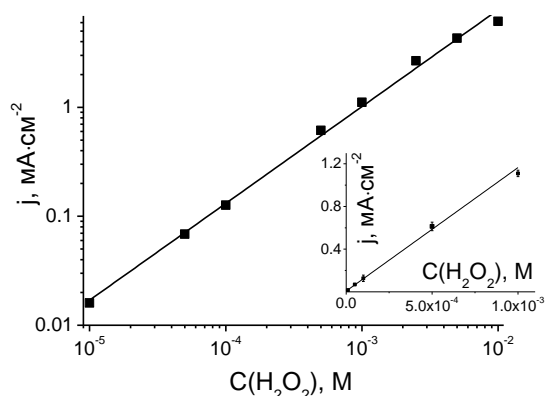
<sup>2</sup> Yashina E. I., Borisova A. V., Karyakina E. E., Shchegolikhina O. I., Vagin M. Y., Sakharov D. A., Tonevitsky A. G., Karyakin A. A. Sol-gel immobilization of lactate oxidase from organic solvent: toward the advanced lactate biosensor // Anal. Chem. 2010. V. 82, № 5. P. 1601-1604.

<sup>3</sup> Работа с использованием СЭХМ была выполнена автором во время стажировки в лаборатории физической и аналитической электрохимии федеральной политехнической школы Лозанны (Швейцария).

С помощью микроскопа сканировали участок подложки с ферментсодержащими мембранами и измеряли ток, продуцируемый на микроэлектроде. На основании регистрируемого тока получали изображение, по которому судили об изменении ферментативной активности ЛОД при иммобилизации в различные полимерные мембраны. Предполагалось, что биосенсоры на основе мембран, демонстрирующих максимальную ферментативную активность, будут обладать наилучшими аналитическими характеристиками. Вместе с тем, подготовка единичного эксперимента при использовании СЭХМ занимает приблизительно в 20 раз меньше времени по сравнению с тестированием биосенсоров.

В качестве зондов для СЭХМ были использованы гибкие планарные микроэлектроды, изготовленные методом лазерной абляции; основным преимуществом их использования является возможность сканирования по неровной и наклонной поверхности без каких-либо дополнительных приспособлений.

Путем электрохимической модификации гибких планарных микроэлектродов берлинской лазурью были созданы высокостабильные сенсоры на пероксид водорода,



**Рис. 1.** Градуировочный график для определения пероксида водорода в периодическом режиме тестирования при перемешивании с помощью микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М  $KH_2PO_4$  (рН 6.0), потенциал 0.00 В ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

характеризующиеся широким линейным диапазоном определяемых концентраций  $H_2O_2$  от  $1 \cdot 10^{-5}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$  М, как видно на рис. 1<sup>1, 4</sup>; предел обнаружения равен  $9 \cdot 10^{-6}$  М пероксида водорода. Коэффициент чувствительности сенсоров, измеряемый как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости, составляет  $1.6 \pm 0.5 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$  ( $n = 4$ ,  $P = 0.95$ ).

После двух часов непрерывных измерений сенсор стабильно работает и не теряет

активности, спустя 8 ч работы обеспечивается по крайней мере 70% от исходного

<sup>4</sup> S. Rastgar, H. Deng, F. Cortes-Salazar, M. D. Scanlon, M. M. Pribil, V. Amstutz, A. A. Karyakin, S. Shahrokhian and H. H. Girault. Oxygen reduction at soft interfaces catalyzed by in situ-generated reduced graphene oxide // ChemElectroChem. 2014. V. 1(1). P. 59–63.

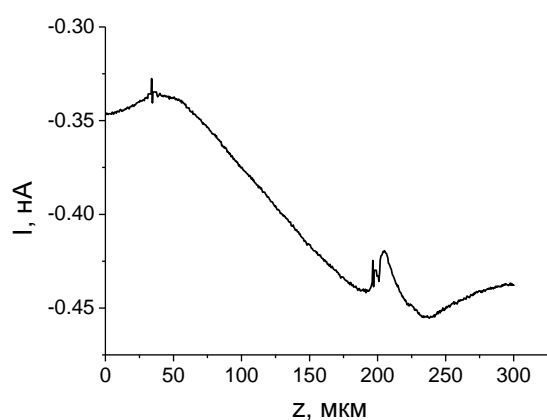
значения отклика, а после 17 ч - около 57% от первоначального сигнала. Стоит отметить, что стабильность была измерена в очень жестких условиях – 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , концентрация пероксида водорода в реальном эксперименте на СЭХМ на несколько порядков меньше, а, следовательно, стабильность будет гораздо выше.

Получение изображения с использованием СЭХМ может занимать до 10 ч, таким образом, созданный сенсор пригоден для проведения длительных непрерывных экспериментов с целью выявления профиля концентрации пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции.

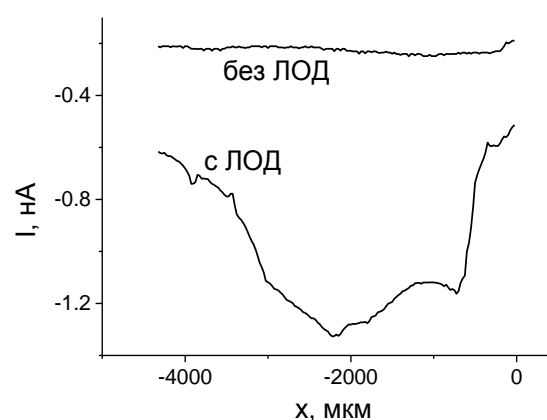
Для получения изображения ферментсодержащей мембраны с помощью СЭХМ ЛОД иммобилизовали на подложку из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) с нанесенной графитовой пастой. Иммобилизация фермента на подложку происходила в соответствии с методикой, включающей солиubilизацию ферментов в водно-органических смесях с высоким содержанием органического растворителя. Покрытие ПЭТФ с графитовой пастой полностью воспроизводит поверхность планарных электродов и, тем самым, приближает условия эксперимента к реальным – при иммобилизации ЛОД на поверхность планарных структур в процессе создания биосенсоров для определения лактата.

Зонд изначально находился на некотором расстоянии от исследуемой поверхности, где через него протекал фоновый ток, обусловленный фоновым электролитом и лимитированный полусферической диффузией электроактивных частиц к рабочей поверхности микроэлектрода. Микросенсор позиционировался таким образом, чтобы при касании подложки он находился у края ферментсодержащей капли, а линейное сканирование проходило по её центру. Приведение зонда в контакт с подложкой осуществлялось на основании кривой приближения в растворе 5 мМ лактата, приготовленном с использованием буферного раствора (рН 6.0). Кривая приближения представляет собой функцию зависимости тока, регистрируемого на микроэлектроде, от расстояния до исследуемой подложки (ось  $Z$  – относительная величина, рис 2). Наблюдается увеличение катодного тока по мере приближения к подложке, что демонстрирует процесс восстановления пероксида водорода на микроэлектроде, в области 200 мкм по оси  $Z$  на кривой наблюдается точка перегиба, соответствующая расстоянию, на котором зонд коснулся поверхности. Далее микроэлектрод начинает изгибаться, что обуславливает всплеск тока и дальнейший выход на стационарный уровень. После приведения зонда в контакт с подложкой,

содержащей иммобилизованную ЛОД, микроэлектрод опускали ниже на величину  $h_p = -100$  мкм, достигая изгиба зонда на некоторый угол для более уверенного контакта с исследуемой поверхностью. Далее проводили линейное сканирование пробы. На рис. 3 видно, что по мере приближения к центру капли наблюдается возрастание катодного тока, что демонстрирует процесс восстановления на электроде пероксида водорода, выделяющегося в ходе ферментативной реакции. Для подтверждения полученных данных эксперимент был воспроизведен в отсутствие фермента в мембране, в данном случае, как и ожидалось, не наблюдалось возрастания тока при прохождении зондом вдоль капли.



**Рис. 2.** Кривая приближения зонда в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0). По оси абсцисс отложено расстояние, пройденное зондом, по оси ординат – ток; скорость 1 мкм/с, шаг 0.5 мкм, потенциал 0.00 В.

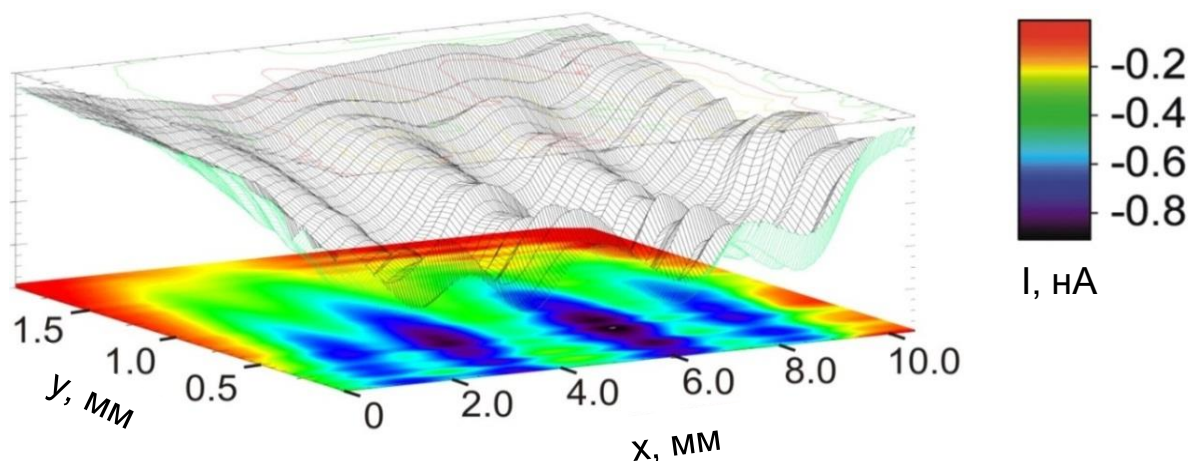


**Рис. 3.** Линейные сканирования ферментсодержащей силоксановой мембраны и аналогичной капли в отсутствие фермента в растворе 5 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0); скорость 50 мкм/с, шаг 50 мкм,  $h_p = -100$  мкм, потенциал 0.00 В.

Получение кривой приближения и линейное сканирование пробы являются неотъемлемыми составляющими проведения экспериментов СЭХМ, именно с их помощью демонстрируется пригодность сенсора и подложки для получения изображения иммобилизованной ЛОД путем амперометрической детекции выделяющегося при ферментативном катализе пероксида водорода.

Содержание силоксана в смеси для иммобилизации фермента варьировалось от 0.1 до 3.0 об.%, в качестве примера приведено сканирование четырех ферментсодержащих мембран с использованием смесей, содержащих: 0.3 %, 0.9 %, 3.0 %, 6.0 %.

1.5 %, 2.8 % силоксана (рис. 4). Для достижения максимального контраста изображения измерения проводились в растворе 50 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0).



**Рис. 4.** Трехмерное изображение участка подложки с ферментсодержащими мембранами в растворе 50 мМ лактата в буферном растворе (рН 6.0); скорость 50 мкм/с, шаг по X 50 мкм, шаг по Y 50 мкм,  $h_p = -100$  мкм, потенциал 0.00 В. Содержание силоксана в смеси для иммобилизации (слева направо): 0.3% , 0.9% , 1.5% и 2.8%.

Тёмно-синие участки на рис. 4 соответствуют высоким значениям катодных токов, демонстрируя, таким образом, участки подложки, где происходит генерация пероксида водорода в результате ферментативной реакции; красные участки соответствуют нулевым значениям токов; зеленые – переходным. Отчетливо видны области нанесения четырех мембран. Необходимо заметить, что, несмотря на проведение эксперимента по получению изображения в течение 10 ч, наблюдается локальный контраст с точностью до десятков микрон между областями генерации и областями проникновения пероксида водорода в результате диффузии, что говорит о высокой точности данного метода получения трехмерного электрохимического изображения.

Мембрана с содержанием силоксана 0.3 % использовалась для сравнения, так как биосенсор на её основе превосходил по аналитическим характеристикам существующие аналоги<sup>2</sup>. Однако, при использовании для иммобилизации силоксана в широком диапазоне содержаний видно, что данная мембрана демонстрирует наименьший сигнал, а наивысшей ферментативной активностью обладает ЛОД в смеси, содержащей 1.5 % силоксана. Сравнительно хороший результат достигается также при использовании 0.9 % силоксана, чуть хуже с применением 2.8 % силоксана.

Таким образом, сканирующая электрохимическая микроскопия позволила быстро и результативно оценить изменение ферментативной активности лактатоксидазы при иммобилизации в силоксановые мембраны. Наивысшую активность показала ЛОД с использованием смеси для иммобилизации, содержащей 1.5 % силоксана, что предварительно говорит о максимальной чувствительности биосенсоров на основе данной мембраны. Для подтверждения полученных результатов было необходимо изучить аналитические характеристики лактатных биосенсоров на основе мембран с различным содержанием силоксана.

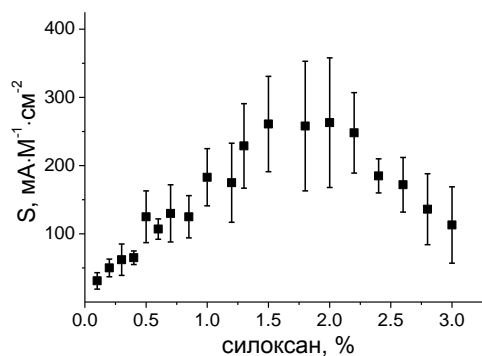
### **Лактатные биосенсоры на основе ферментсодержащих силоксановых мембран различной плотности**

Биосенсоры создавались на основе планарных трехэлектродных структур, изготовленных методом трафаретной печати, рабочий электрод модифицировали берлинской лазурью методом межфазного синтеза. Сенсоры на пероксид водорода показали высокую чувствительность, определяемую как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости,  $0.6 \pm 0.1 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$  ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ) и широкий линейный диапазон определяемых концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  – от  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  М. Иммобилизация ЛОД на поверхность рабочего электрода, модифицированного БЛ, происходила из сред с высоким содержанием органического растворителя. Содержание силоксана в смеси для иммобилизации фермента варьировалось от 0.1 до 3.0 об. %.

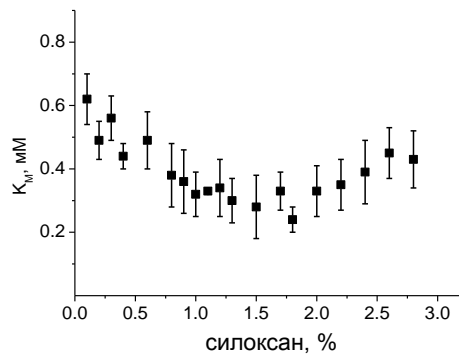
На рис. 5 приведен график зависимости чувствительности биосенсоров для определения лактата от содержания силоксана в иммобилизующей смеси для фермента. Отчетливо видно увеличение чувствительности определения на участке от 0.1 до 1.5 % силоксана, оптимум наблюдается при содержании силоксана 1.3 - 2.2 % в иммобилизующей смеси, использование более концентрированных растворов ведет к понижению чувствительности. Данные, полученные при тестировании лактатных биосенсоров, полностью согласуются с результатами, показанными с использованием СЭХМ, где наивысшей ферментативной активностью обладала мембрана с содержанием силоксана в смеси 1.5 %, а проба с применением 0.3 %-ного раствора демонстрировала наименьшую активность относительно рассмотренных. Биосенсоры с содержанием силоксана 0.9 % и 2.8 % с учетом погрешности показывают приблизительно одинаковые значения чувствительности, что также подтверждает исследования СЭХМ. Стоит заметить, что чувствительность разработанных



биосенсоров (при использовании 1.3 – 2.2 % силоксана) в четыре раза превышает значение лучшего известного датчика на лактат, с применением 0.3 % силоксана для иммобилизации.



**Рис. 5.** Зависимость чувствительности биосенсоров для определения лактата от содержания силоксана в иммобилизующей смеси для фермента ( $n = 10$ ,  $P = 0.95$ ).



**Рис. 6.** Зависимость кажущейся константы Михаэлиса от содержания силоксана в иммобилизующей смеси для фермента ( $n = 10$ ,  $P = 0.95$ ).

На рис. 6 приведена зависимость кажущейся константы Михаэлиса ( $K_M$ ) от содержания силоксана в иммобилизующей смеси. Константа Михаэлиса - кинетический параметр ферментативной реакции, характеризующий сродство фермента к субстрату: чем меньше значение константы, тем сильнее связывание фермента с субстратом. Эмпирические данные при построении градуировочной зависимости для определения лактата при помощи биосенсора хорошо описываются функцией гиперболы, из коэффициентов которой рассчитывается значение  $K_M$ . На графике видно уменьшение значения  $K_M$  на участке от 0.1 до 1.5 % силоксана, что говорит об увеличении сродства фермента к субстрату, оптимум наблюдается также в промежутке 1.3 - 2.2 % силоксана в смеси для иммобилизации.

В настоящей работе методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) была изучена структура ферментсодержащих мембран, их шероховатости и текстуры поверхности; высоты и площади мембран были определены с помощью сканирующего лазерного микроскопа (СЛМ) и профилометра<sup>5</sup>. На основании полученных данных было рассчитано, что ферментсодержащие мембраны, с содержанием силоксана 1.5 %

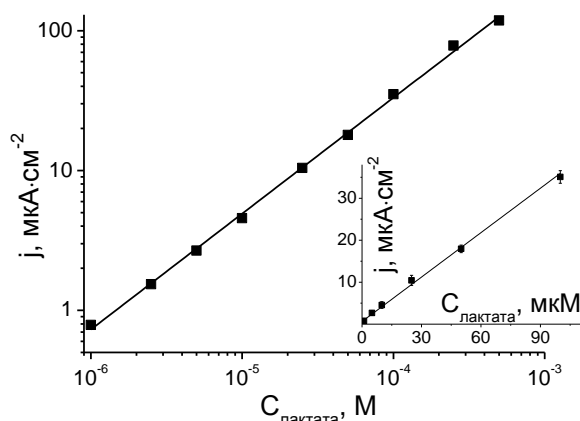
<sup>5</sup> Работа с использованием СЭМ и СЛМ была выполнена автором во время стажировки в лаборатории физической и аналитической электрохимии федеральной политехнической школы Лозанны (Швейцария).

и 2.8 % в смеси плотнее 0.3 %-ных в 1.1 и 1.3 раза соответственно. Из этого сделан вывод, что плотности ферментсодержащих силоксановых мембран возрастают с увеличением концентрации силоксана в иммобилизующей смеси.

В связи с диффузионными затруднениями при увеличении плотности ферментсодержащих мембран сродство фермента к субстрату обычно падает. Однако в нашем случае наблюдается обратная картина - аффинность фермента к субстрату возрастает при увеличении плотности мембраны (от 0.1 до 1.5 % силоксана в смеси). При этом минимум значения  $K_m$  приходится на содержание силоксана 1.3 – 2.2 %, что говорит о создании максимально благоприятной среды для фермента, именно в такой мембране ЛОД будет демонстрировать наивысшую активность и стабильность.

Наилучшей воспроизводимостью, а вместе с тем и максимальной чувствительностью, широким диапазоном определяемых концентраций лактата и длительной стабильностью характеризовался биосенсор с использованием 1.5% силоксана в смеси для иммобилизации лактатоксидазы.

Градуировочный график для определения лактата с использованием



**Рис. 7.** Градуировочный график для определения лактата с помощью биосенсора в периодическом режиме тестирования при перемешивании. Смесь для иммобилизации фермента содержала 1.5% силоксана. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 6.0), потенциал 0.00 В ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

разработанного биосенсора представлен на рис. 7, на вставке приведена начальная часть градуировочной зависимости, по тангенсу угла которой рассчитывался коэффициент чувствительности, составляющий в данном случае  $0.33 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ . Диапазон определяемых концентраций лактата в периодическом режиме тестирования составляет от  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $5 \cdot 10^{-3}$  М, время отклика порядка 40 с.

Биосенсор стабильно работает и после 2 ч непрерывных измерений при постоянном перемешивании в периодическом режиме тестирования сохраняется 85% от первоначального отклика, а спустя 4 ч работы обеспечивается 50% от исходного значения, что в два раза выше в

сравнении с биосенсорами на основе 0.3% силоксана. Таким образом, увеличение концентрации силоксана в смеси для иммобилизации фермента привело к увеличению стабильности лактатных биосенсоров на их основе.

Также была измерена стабильность при хранении в холодильной камере при +4°C. Коэффициент чувствительности свежеприготовленного биосенсора составляет  $0.3 \pm 0.1 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $n = 10$ ,  $P = 0.95$ ), а после хранения в течение 18 мес наблюдается по крайней мере 80% от заданного значения, что говорит о возможности длительного хранения и открывает перспективы коммерческого применения лактатных биосенсоров.

Таким образом, был разработан биосенсор для определения лактата, характеризующийся высокой чувствительностью, длительной операционной стабильностью и стабильностью при хранении, время отклика составило 40 с. Биосенсор показывает улучшение аналитических характеристик относительно лучшего лактатного датчика: чувствительности - в четыре раза, а операционной стабильности - в два раза.

*Глава «Биосенсор для определения высоких (миллимолярных) концентраций лактата»* посвящена созданию биосенсора на высокие содержания лактата.

Концентрация лактата в поте в состоянии покоя составляет от 4 до 25 мМ, однако при тяжелых физических нагрузках эта концентрация достигает 40 – 80 мМ. Для анализа неразбавленного пота необходим лактатный биосенсор, позволяющий проводить измерения в диапазоне концентраций аналита по крайней мере от 4 до 80 мМ. При создании биосенсора за основу был взят разработанный в настоящей работе лактатный датчик.

Для расширения диапазона определяемых концентраций лактата в область высоких значений с использованием биосенсоров предложено понизить сродство фермента к субстрату, и, тем самым, увеличить значение кажущейся константы Михаэлиса. Из литературных источников известно, что в активном центре лактатоксидазы присутствуют два положительно заряженных аргининовых остатка Arg181 и Arg268, расположенных в непосредственной близости от кофактора флаavinмоноклеотида и, вероятно, являющихся частью субстрат-связывающего участка фермента.

В настоящей работе предложено экранировать субстрат-связывающий участок отрицательным зарядом, и, благодаря чему, добиться понижения сродства фермента к субстрату. С этой целью использовался перфторсульфонированный полимер (ПФС – отечественный аналог нафiona), содержащий отрицательно заряженные сульфогруппы.

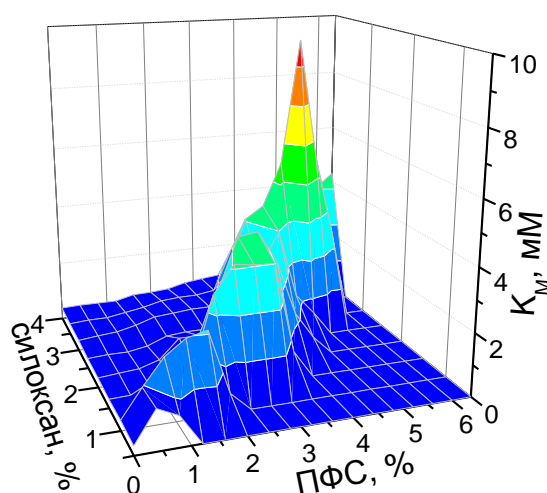
Тестировали биосенсоры на основе мембран, содержащих 0.1 – 1.0 об.% ПФС. Однако при использовании 0.3 – 1.0 % ПФС активный центр фермента блокируется отрицательно заряженными сульфо-заместителями молекулы, что предотвращает отклик биосенсора. Наилучшими аналитическими характеристиками обладал биосенсор на основе 0.2 % ПФС: коэффициент чувствительности датчика  $20 \text{ мкА} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ , диапазон определяемых концентраций 0.05 – 1 М лактата. Таким образом, при использовании ПФС в качестве единственного мембранообразующего соединения для иммобилизации ЛОД чувствительность биосенсоров значительно падает, диапазон определяемых концентраций лактата сужается и сдвигается в область высоких значений, однако нижняя граница определяемых содержаний становится чрезмерно высокой для измерения аналита в поте.

Так как использование ПФС для иммобилизации ЛОД приводит к чрезмерному сдвигу диапазона определяемых концентраций, то целесообразно использовать смесь ПФС с силиоксаном для иммобилизации фермента. Для достижения требуемых аналитических характеристик варьировали содержание компонентов в иммобилизующей смеси: силиоксана от 0.01 до 5.00 %, ПФС от 0.10 до 8.50 %. При тестировании биосенсоров было выявлено, что искомый диапазон определяемых концентраций лактата от 0.1 до 50, а в некоторых случаях даже до 80 мМ в периодическом режиме, а вместе с тем максимальные значения кажущейся константы Михаэлиса наблюдаются при использовании силиоксана и ПФС в иммобилизующей смеси в определенных соотношениях (силиоксан:ПФС): на начальном участке 2:1, далее 1:1, а ближе к концу 2:3 (рис. 8). В табл. 1 приведены аналитические характеристики только тех биосенсоров, диапазон определяемых концентраций которых максимально приближен к искомому (4 - 80 мМ лактата).

**Таблица 1.** Аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата на основе смешанных мембран силоксана и перфторсульфонируемого полимера в режиме периодического тестирования ( $n = 10$ ,  $P = 0.95$ )

Содержание силоксана в смеси, об. %	Содержание ПФС в смеси, об. %	Линейный диапазон концентраций, М	$c_{max}$ , мМ	$S$ , $mA \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$	$K_m$ , мМ
0.4	0.2	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$	50	$0.7 \pm 0.2$	$2 \pm 1$
1.0	1.2	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	$1.1 \pm 0.5$	$3 \pm 2$
1.5	2.0	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	$1.1 \pm 0.9$	$3 \pm 1$
1.5	2.5	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	$1.8 \pm 0.2$	$4 \pm 2$
2.0	3.0	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	50	$0.4 \pm 0.2$	$4 \pm 2$
3.0	5.0	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	50-80	$1.2 \pm 0.5$	$10 \pm 3$
4.0	6.5	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$	30-50	$1.9 \pm 0.4$	$4 \pm 3$

Для иллюстрации инженерии фермента при иммобилизации в смешанные мембраны на рис. 8 приведена диаграмма зависимости кажущейся  $K_m$  от содержания силоксана и ПФС в смеси.

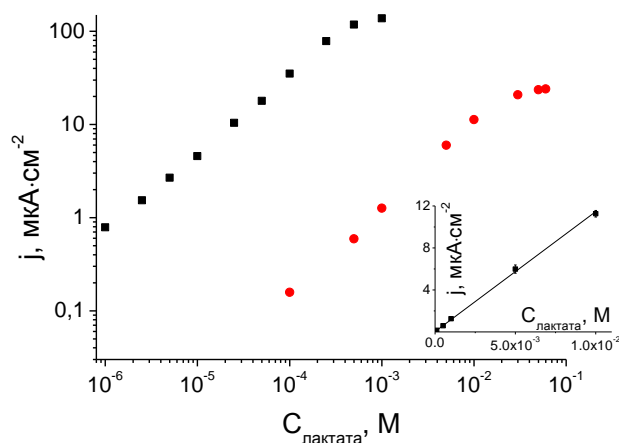


**Рис. 8.** Трехмерная диаграмма зависимости кажущейся константы Михаэлиса от содержания силоксана и перфторсульфонируемого полимера в иммобилизующей смеси для лактатоксидазы<sup>6</sup>.

<sup>6</sup> *M. M. Pribil, G. U. Laptev, E. E. Karyakina, and A. A. Karyakin.* Noninvasive hypoxia monitor based on gene-free engineering of lactate oxidase for analysis of undiluted sweat // *Anal. Chem.* 2014.V. 86 (11). P. 5215–5219.

При высоких содержаниях ПФС и низких – силоксана наблюдается деактивация фермента по причине блокирования ЛОД отрицательным зарядом ПФС. При высоких содержаниях силоксана и низких – ПФС маленькие значения  $K_m$  объясняются высоким сродством фермента к субстрату, за счет того что силоксан образует благоприятную среду для фермента. Абсолютный максимум значения константы наблюдается при использовании смеси 3 % силоксана и 5 % ПФС, кажущаяся константа Михаэлиса фермента в таком случае достигает 10 мМ, что в 30 раз выше, чем при использовании электронейтральных силоксановых мембран.

На рис. 9 красным цветом приведен градуировочный график для определения лактата с помощью биосенсора на основе смешанной мембраны, для примера черным цветом показана градуировочная зависимость для определения лактата с использованием биосенсора с



**Рис. 9.** Градуировочные графики для определения лактата в режиме периодического тестирования при перемешивании. Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 6.0), потенциал 0.00 В. Смесь для иммобилизации фермента содержала: ■ - 1.5% силоксана, ● - 3 % силоксана и 5% перфторсульфонируемого полимера ( $n = 3, P = 0.95$ ).

использованием биосенсора с силоксановой мембраной. Видно, что диапазон определяемых концентраций лактата при использовании биосенсора с мембраной силоксан-ПФС сдвинут в область высоких значений на два порядка и составляет в периодическом режиме 0.1 - 80 мМ. Время отклика 60 с, коэффициент чувствительности биосенсора, измеряемый как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости, равен  $1.1 \text{ мА}\cdot\text{М}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$ .

Для определения операционной стабильности биосенсора были проведены эксперименты в периодическом режиме тестирования при постоянном перемешивании раствора 2.5 мМ лактата. Отмечено, что спустя 3 ч непрерывной работы сохраняется первоначальное значение отклика, а спустя 9 ч измерений обеспечивается по крайней мере 50% от исходного значения, что в два раза выше в сравнении с биосенсорами на

основе силиконовых мембран. При хранении в течение 3 мес при +4°C биосенсоры стабильно работают и не теряют чувствительности.

Таким образом, путем понижения сродства фермента к субстрату удалось достичь сдвига диапазона определяемых концентраций лактата при использовании биосенсоров на два порядка в область высоких значений. Создан биосенсор для определения миллимолярных концентраций лактата, характеризующийся высокой операционной стабильностью и длительной стабильностью при хранении, что позволяет его использовать для анализа неразбавленного пота и дает возможность перейти к разработке неинвазивного монитора состояния гипоксии.

Глава «Создание неинвазивного монитора состояния гипоксии» посвящена разработке неинвазивного монитора, проводящего непрерывные измерения лактата в поте в процессе тренировок.



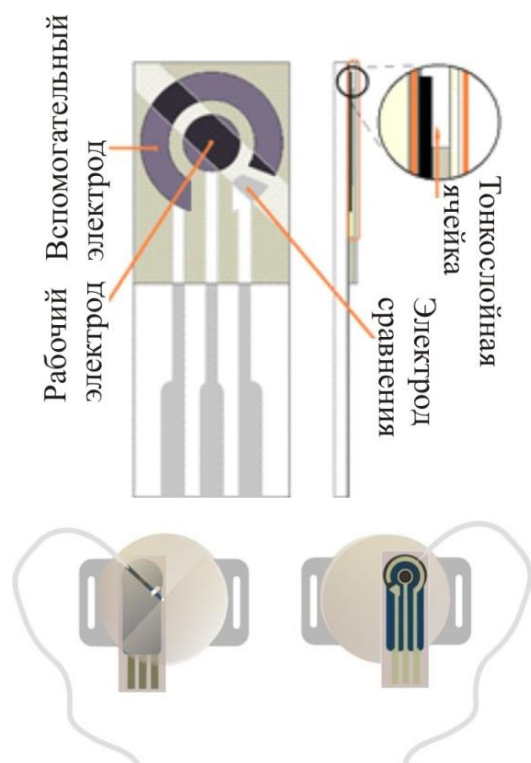
**Рис. 10.** Коммерчески доступный потосборник Macroduct.

В качестве прототипа при создании неинвазивного монитора был взят коммерчески доступный потосборник Macroduct, содержащий с одной стороны длинный капилляр, а с другой небольшое конусообразное углубление, которое при сборе пота прилегает к поверхности кожи и пот самопроизвольно всасывается в капилляр (рис. 10).

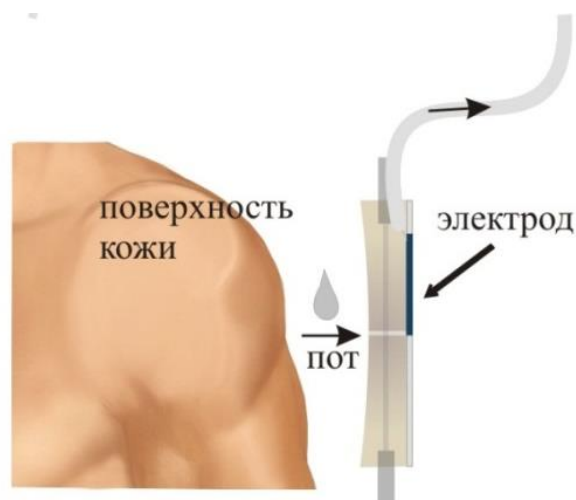
Неинвазивное определение лактата предусматривало создание монитора, фиксируемого на поверхности кожи, проводящего всасывание выделяемого пота и непрерывное определение лактата в нем. Для этого по подобию потосборника был сконструирован элемент из органического стекла, с одной стороны содержащий конусообразное углубление с отверстием, а с другой – плоскость, на которую впоследствии приклеивали электрод. Биосенсор на лактат фиксировали при помощи двусторонней ленты с липким слоем таким образом, чтобы незаклеенная поверхность содержала часть вспомогательного электрода, рабочего и электрода сравнения, как показано на рис. 11.

Встроенный биосенсор представлял собой планарную трехэлектродную структуру с рабочим электродом, модифицированным БЛ с иммобилизованным ферментом ЛОД в мембрану, содержащую 3 % силикона и 5 % ПФС. Сторона ячейки,

содержащая конус, была предназначена для непосредственного контакта с поверхностью кожи, всасывания пота и дальнейшего прохождения его по капилляру через электрод, как показано на рис. 12.



**Рис. 11.** Схема неинвазивного монитора.

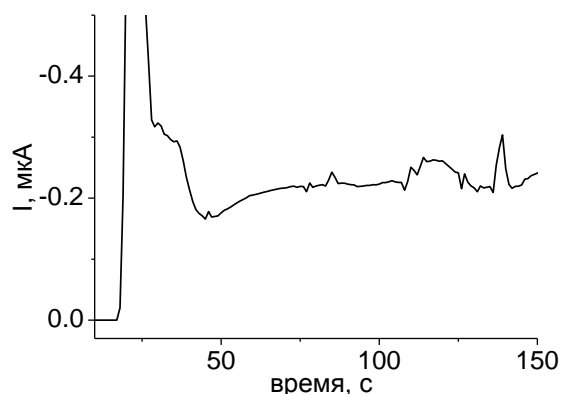
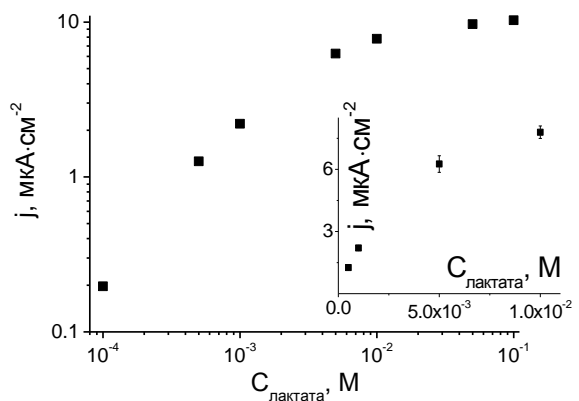


**Рис. 12.** Принцип работы неинвазивного монитора.

Перед измерением лактата в поте электрод предварительно градуировали с использованием модельных растворов аналита. Для выхода на стационарный уровень в область конусообразного углубления на монитор наносили несколько капель буферного раствора (рН 6.0), которые самопроизвольно всасывались и заполняли капилляр, после чего наблюдали фоновые значения токов. Затем наносили растворы лактата, приготовленные с использованием буферного раствора, и прислоняли ячейку к поверхности кожи для лучшего всасывания.

На рис. 13 приведен градуировочный график для определения лактата в системе неинвазивного монитора, диапазон определяемых концентраций лактата составляет 0.1 – 80 мМ, что полностью покрывает физиологическое содержание аналита в поте в состоянии покоя и в процессе физических нагрузок. Коэффициент чувствительности, определяемый как тангенс угла наклона начальной части градуировочной зависимости, равен  $1.6 \pm 0.5 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $n = 3, P = 0.95$ ).





**Рис. 13.** Градуировочный график для определения лактата в системе неинвазивного монитора (смесь для иммобилизации фермента содержала 3% силоксана и 5% ПФС). Буферный раствор 0.1 М КСl, 0.05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 6.0), потенциал 0.00 В ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

**Рис. 14.** Отклик неинвазивного лактатного монитора на пот (смесь для иммобилизации фермента содержала 3% силоксана и 5% ПФС).

Для непрерывного мониторинга лактата в поте у добровольцев заведомо проводили активацию выделения пота при помощи электрофореза с пилокарпином. Эксперимент начинали с выхода на стационарный уровень, для чего на монитор в область капилляра наносили несколько капель буферного раствора, который самопроизвольно заполнял капилляр, далее монитор прикладывали к месту выделения пота и фиксировали с помощью эластичного жгута. Наблюдался всплеск тока и дальнейший выход на стационарный уровень, соответствующий содержанию лактата в поте, с течением времени уровень сигнала изменялся в большую или меньшую сторону, при уменьшении потока жидкости в капилляре сигнал спадал к минимуму.

Также с помощью монитора регистрировали динамику накопления лактата, в таком случае сухую ячейку прикладывали к месту выделения пота, отклик биосенсора на примере этой системы представлен на рис. 14. Первые несколько секунд наблюдаются нулевые значения токов, что объясняется отсутствием раствора в системе. Далее неинвазивный монитор фиксировали на ноге (на заранее активированном месте), при заполнении капилляра потом наблюдается поляризация электрода, что объясняет всплеск тока, после чего, менее чем за минуту, система приходит к равновесию и виден выход на стационарный уровень. В течение

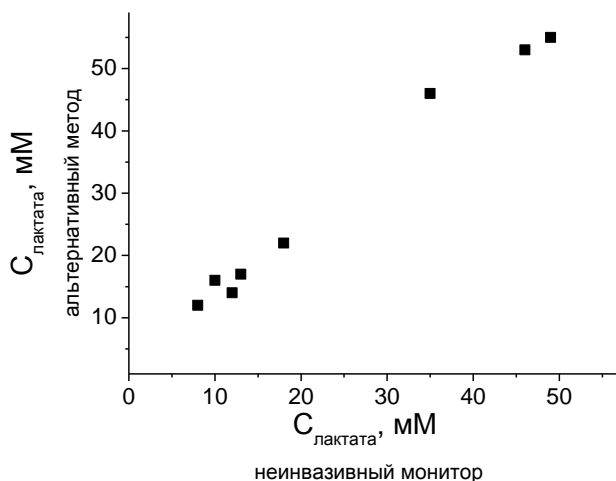
последующих 100 с регистрируется значение тока, соответствующее содержанию лактата в поте в состоянии покоя.

В неинвазивном мониторе предусмотрен капилляр для выведения жидкости из системы, посредством которого пот собирали в пробирку Эппендорфа и в дальнейшем исследовали альтернативным методом в системе проточно-инжекционного анализа с разбавлением образца в 100 раз. Альтернативно образец изучали с помощью полуавтоматического проточно-инжекционного анализатора на лактат, правильность работы которого была подтверждена с помощью сертифицированного автоматического биохимического анализатора HumaStar 300. Данные по содержанию лактата в поте, полученные с помощью монитора и альтернативного метода, представлены в табл. 2; корреляция результатов между этими методами наглядно продемонстрирована на рис. 15.

**Таблица 2.** Концентрации лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке, полученные с использованием неинвазивного монитора и альтернативного метода ( $n = 3, P = 0.95$ )

Состояние	Доброволец	С(лактата), мМ	
		неинвазивный монитор	альтернативный метод
В состоянии покоя	1	10 ± 5	16 ± 2
	2	12 ± 4	14 ± 1
	3	13 ± 4	17 ± 2
	4	8 ± 4	12 ± 2
В процессе физической нагрузки	1	18 ± 4	22 ± 3
	2	46 ± 8	53 ± 4
	3	49 ± 8	55 ± 4
	4	35 ± 8	46 ± 3

Как видно на рис. 15, наблюдается высокая корреляция результатов, полученных при помощи неинвазивного монитора и альтернативного метода,  $R = 0.9930$ .



**Рис. 15.** Корреляция по содержанию лактата в поте, измеренному с помощью неинвазивного монитора непосредственно с мышцы руки/ноги и с использованием альтернативного метода в системе ПИА с разбавлением образца в 100 раз,  $R = 0.9930$ .

Таким образом, создан лабораторный образец неинвазивного монитора состояния гипоксии, позволяющий проводить непрерывное определение лактата в поте в состоянии покоя и при физической нагрузке. Показана высокая корреляция результатов по определению содержания лактата в поте, полученных с использованием монитора и альтернативного метода.

Создание монитора состояния гипоксии открывает обширные перспективы развития неинвазивной диагностики, в том числе в области спортивной медицины.

## ВЫВОДЫ

1. Сканирующая электрохимическая микроскопия адаптирована для скрининга ферментсодержащих мембран. Для этого разработан высокостабильный микросенсор для определения пероксида водорода на основе микроэлектрода, модифицированного берлинской лазурью и применен в качестве зонда электрохимического микроскопа. Таким образом, определен оптимальный состав смеси для иммобилизации лактатоксидазы, обеспечивающий наивысшую активность и стабильность включенного в мембрану фермента.
2. Создан высокочувствительный и высокостабильный биосенсор для определения лактата на основе планарных электродов, модифицированных берлинской лазурью, и лактатоксидазы, иммобилизованной в мембрану  $\gamma$ -аминопропилсилоксана. Диапазон определяемых концентраций лактата составляет  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-3}$  М, коэффициент чувствительности достигает  $0.33 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ . Чувствительность биосенсора повышается в четыре раза, операционная стабильность - в два раза по

сравнению с лучшим лактатным датчиком. Биосенсор сохраняет 80% исходного значения чувствительности при хранении при +4°C в течение 18 мес.

3. Предложен метод инженерии лактатоксидазы при иммобилизации. Для расширения диапазона определяемых содержаний лактата в область высоких концентраций, необходимых для анализа неразбавленного пота, предложено использовать отрицательно заряженный перфторсульфонированный иономер (аналог нафтона) в качестве компонента мембраны. За счет экранирования субстрат-связывающего участка фермента полимером достигается понижение сродства лактатоксидазы к субстрату. Это иллюстрируется повышением кажущейся константы Михаэлиса в 30 раз по сравнению с константой, наблюдаемой в случае электронейтральных силоксановых мембран.
4. Разработан биосенсор для определения высоких (миллимолярных) концентраций лактата на основе смешанных мембран из  $\gamma$ -аминопропилсилоксана и перфторсульфонированного полимера. Диапазон определяемых концентраций лактата сдвигается в область высоких значений на два порядка и составляет в периодическом режиме 0.1 – 80 мМ. После 3 ч непрерывных измерений сигнал биосенсора остается на первоначальном уровне, а при хранении в течение 3 мес при +4°C сохраняется исходное значение чувствительности.
5. Путем интеграции биосенсора на высокие концентрации и потосборника создан неинвазивный монитор состояния гипоксии, работающий на основе непрерывного мониторинга лактата в поте. Достоверность результатов по содержанию лактата в поте как в состоянии покоя, так и в процессе физической нагрузки, полученных при апробации монитора, подтверждена с помощью альтернативного метода, коэффициент корреляции составляет 0.9930.

**Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 3 статьях в зарубежных рецензируемых научных журналах:**

1. M. M. Pribil<sup>7</sup>, G. U. Laptev, E. E. Karyakina, and A. A. Karyakin. Noninvasive hypoxia monitor based on gene-free engineering of lactate oxidase for analysis of undiluted sweat // *Anal. Chem.* 2014.V. 86 (11). P. 5215–5219.
2. M. M. Pribil, F. Cortés-Salazar, E. A. Andreyev, A. Lesch, E. E. Karyakina, O. G. Voronin, H. H. Girault, A. A. Karyakin. Rapid optimization of a lactate biosensor design using soft probes scanning electrochemical microscopy // *J. Electroanal. Chem.* 2014. V. 731. P. 112–118.
3. S. Rastgar, H. Deng, F. Cortes-Salazar, M. D. Scanlon, M. M. Pribil, V. Amstutz, A. A. Karyakin, S. Shahrokhian and H. H. Girault. Oxygen reduction at soft interfaces catalyzed by in situ-generated reduced graphene oxide // *ChemElectroChem.* 2014. V. 1(1). P. 59–63.

**и доложены на 4 международных и российских научных конференциях:**

1. Мчедlishvili M.M.<sup>8</sup>. Биосенсор для определения лактата в неразбавленном поте / XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2012». Москва. 2012.
2. Мчедlishvili M.M. Изменение способов иммобилизации фермента для разработки высокочувствительного биосенсора для определения лактата / XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2013». Москва. 2013.
3. Мчедlishvili M.M., Карякин А.А. Высокочувствительный биосенсор для определения лактата. Использование метода сканирующей электрохимической микроскопии для исследования аналитических характеристик биосенсоров / Второй съезд аналитиков России. Москва. 2013. С. 465.
4. Прибиль М. М. Неинвазивный монитор оценки гипоксии на основе инженерии лактатоксидазы для анализа неразбавленного пота / Международная выставка «Аналитика Экспо 2015». Семинар «Биосенсорные системы для клинической диагностики и охраны окружающей среды». Москва. 2015.

---

<sup>7,8</sup> Автор сменила фамилию с Мчедlishvili на Прибиль в 2013 г.

*Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю д.х.н., проф. А.А. Карякину и к.б.н. Е.Е. Карякиной за внимание, участие и помощь в постановке задач и обсуждении результатов исследований; Г.Ю. Лаптеву, М.А. Статкусу, А.В. Лухновичу, К. М. Анучину за предоставление образцов пота для исследований; всем членам лаборатории электрохимических методов за отзывчивость, теплую атмосферу и помощь в работе; Dr. Fernando Cortes-Salazar и Dr. Andreas Lesch за внимание и помощь в освоении установки СЭХМ; своей семье за понимание, неоценимую помощь, поддержку на всех этапах работы над диссертацией.*