

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Laura  
GLUMBOKAITĖ

# Poli(pirrol-2-karboksirūgšties) sintezė ir taikymas gliukozės biologiniuose jutikliuose

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Chemija N 003

---

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2015 – 2019 metais Vilniaus Universitete Chemijos ir geomokslų fakultete, Chemijos institute. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė:

**Doc. dr. Asta Kaušaitė-Minkštimienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003)

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS .....	7
DARBO TIKSLAS .....	9
DARBO UŽDAVINIAI .....	9
DARBO GINAMIEJI TEIGINIAI .....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	10
1.1. Biologiniai jutikliai .....	10
1.2. Gliukozės biologiniai jutikliai .....	14
1.3. Fermentų imobilizavimo būdai .....	17
1.4. Elektronų pernašos tarpininkai .....	19
1.5. Konjuguotųjų polimerų taikymas biologiniuose jutikliuose .....	21
1.6. Aukso nanodalelės biologiniuose jutikliuose .....	24
2. TYRIMŲ METODIKOS .....	26
2.1. Poli(pirrol-2-karboksirūgšties) cheminė, fermentinė ir elektrocheminė sintezė .....	26
2.2. Poli(pirrol-2-karboksirūgšties) dalelių tyrimai .....	27
2.3. Poli(pirrol-2-karboksirūgšties) modifikavimas .....	28
gliukozės oksidaze .....	28
2.4. Aukso nanodalelių sintezė .....	28
2.5. Indikatorinio elektrodo paruošimas .....	29
2.6. Biologinio jutiklio analizinių charakteristikų tyrimas .....	30
2.7. Realių mėginių tyrimai .....	31
3. POLI(PIROL-2-KARBOKSIRŪGŠTIES) FERMENTINĖ IR CHEMINĖ SINTEZĖS .....	32
4. JUTIKLIS POLI(PIROL-2-KARBOKSIRŪGŠTIES) .....	41
DALELIŲ IR GLIUKOZĖS OKSIDAZĖS .....	41
BIOKOMPOZITO PAGRINDU .....	41

5. BEREAGENTINIS JUTIKLIS ELEKTROCHEMIŠKAI SUSINTETINTOS POLI(PIROL-2-KARBOKSIRŪGŠTIES), POLI(1,10-FENANTROLIN-5,6-DIONO), AUKSO NANODALELIŲ IR GLIUKOZĖS OKSIDAZĖS PAGRINDU .....	54
IŠVADOS.....	69
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA .....	70
PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS .....	71
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	72

## SANTRUMPOS

AAF – acetaminofenas  
AR – askorbo rūgštis  
ASR – acetilsalicilo rūgštis  
A-PBS – acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas  
A-PBS-KCl – acetatinis-fosfatinis buferinis su kalio chloridu  
Ag/AgCl – sidabro/sidabro chlorido elektrodas  
Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup> – sidabro/sidabro chlorido elektrodas su 3 mol/l kalio chlorido  
AuND – aukso nanodalelės  
JSA – jaučio serumo albuminas  
CV – ciklinė voltamperograma  
DP – dopaminas  
EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimido hidrochloridas  
ELP – elektrai laidūs polimerai  
EPT – elektronų pernašos tarpininkas  
EPT<sub>OX</sub> – oksiduota elektronų pernašos tarpininko forma  
EPT<sub>RED</sub> – redukuota elektronų pernašos tarpininko forma  
FAD – flavino adenino dinukleotidas  
FADH<sub>2</sub> – redukuota flavino adenino dinukleotido forma  
FMS – fenazino metosulfatas  
FTIR – Furjė transformacijos IR spindulių spektroskopija  
I<sub>max</sub> – ribinė difuzinė srovė  
GA – glutaro aldehidas  
Glu – gliukozė  
GOx – gliukozės oksidazė  
GR – grafito elektrodas  
GR/GOx – grafito elektrodas modifikuotas GOx ją adsorbuojant ir chemiškai surišant fermento molekules tarpusavyje glutaro aldehido garais  
GR/PD – grafito elektrodas modifikuotas adsorbuotu 1,10-fenantrolin-5,6-dionu  
GR/PPD – grafito elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetintu poli(1,10-fenantrolin-5,6-dionu)  
GR/PPD/PPK<sub>EL</sub> – grafito elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetintu poli(1,10-fenantrolin-5,6-dionu) ir poli(pirrol-2-karboksirūgštimi)  
GR/PPD/PPK<sub>EL</sub>-GOx – grafito elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetintu poli(1,10-fenantrolin-5,6-dionu), poli(pirrol-2-karboksirūgštimi) ir kovalentiškai prijungta gliukozės oksidaze

GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub> – grafito elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetintu poli(1,10-fenantrolin-5,6-dionu), poli(pirol-2-karboksirūgštimi) su įterptomis aukso nanodalelėmis

GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GO<sub>x</sub> – grafito elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetintu poli(1,10-fenantrolin-5,6-dionu), poli(pirol-2-karboksirūgštimi) su įterptomis aukso nanodalelėmis ir kovalentiškai prijungta gliukozės oksidaze

GR/PPKR<sub>CH</sub>-GO<sub>x</sub> – grafito elektrodas modifikuotas chemiškai susintetinta poli(pirol-2-karboksirūgštimi) ir kovalentiškai prijungta gliukozės oksidaze

GR/PPKR<sub>EL</sub> – grafito elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetinta poli(pirol-2-karboksirūgštimi)

K<sub>M</sub> – Michaelio konstanta

KP –  $\pi$ - $\pi$  konjuguotasis polimeras

NHS – N-hidroksisukcinimidas

PD – 1,10-fenantrolin-5,6-dionas

PKR – pirol-2-karboksirūgštis

PPD – poli(1,10-fenantrolin-5,6-dionas)

PPKR – poli(pirol-2-karboksirūgštis)

PPKR<sub>CH</sub> – chemiškai susintetinta poli(pirol-2-karboksirūgštis)

PPKR<sub>CH</sub>-GO<sub>x</sub> – chemiškai susintetinta poli(pirol-2-karboksirūgštis) su kovalentiškai prijungta gliukozės oksidaze

PPKR<sub>EL</sub> – elektrochemiškai susintetinta poli(pirol-2-karboksirūgštis)

PPKR<sub>EL</sub>-GO<sub>x</sub> – elektrochemiškai susintetinta poli(pirol-2-karboksirūgštis) su kovalentiškai prijungta gliukozės oksidaze

PPy – polipirolas

SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas

SN – standartinis nuokrypis

SSN – santykinis standartinis nuokrypis

V<sub>max</sub> – maksimalus fermentinės reakcijos greitis

ŠR – šlapimo rūgštis

## IVADAS

Viena iš svarbiausių chemijos užduočių yra sudėtingų biologinių objektų analizė. Daugeliu atveju tiriamajame mėginyje yra ne tik mus dominanti medžiaga, bet ir daugybė kitų, kurios gali daryti įtaką analizės rezultatams. Analitės kiekybinis ar kokybinis nustatymas, neišskiriant jos iš terpės, nepalyginamai sumažina analizės trukmę ir kaštus. Analitės koncentraciją daugiakomponentiniame mėginyje galima nustatyti analiziniu įrenginiu – biologiniu jutikliu, kuriame esantis imobilizuotas biologinis atpažinimo elementas atrankiai atpažįsta tik tam tikrą vieną analitę. Šiuose analiziniuose įrenginiuose naudojami įvairūs biologinės kilmės atpažinimo elementai, vienas iš variantų – fermentai.

Oksidoreduktazių klasės fermentas gliukozės oksidazė (GOx) atrankiai atpažįsta  $\beta$ -D-gliukozę, todėl jutiklis su imobilizuota GOx gali nustatyti gliukozės koncentraciją įvairiuose mėginiuose. Gliukozės biologiniai jutikliai naudojami medicinoje, maisto ir gėrimų pramonėje. Gliukozės kiekio nustatymas kraujyje taip pat yra itin svarbus cukriniu diabetu sergantiems pacientams. Pirmasis gliukozės biologinis jutiklis buvo sukonstruotas beveik prieš šešiasdešimt metų, o praėjus penkiolikai metų, gliukozės jutiklis buvo pirmą kartą komercializuotas. Nepaisant didžiulio susidomėjimo ir tyrimų gausos šioje srityje, vis dar yra nemažai iššūkių, kuriuos reikia įveikti tam, kad gliukozės jutikliai būtų visiškai išstobulinti.

Vieni dažniausiai naudojamų ir tiriamų – amperometrinių gliukozės biologiniai jutikliai. Jie pasižymi trumpa analizės trukme, dideliu atrankumu ir jautriu analitei. Amperometrinių fermentinių biologinių jutiklių kaip analizinių įrenginių yra gan paprasti ir pigūs, bet kartu ir leidžiantys pritaikyti įvairias medžiagas:  $\pi$ - $\pi$  konjuguotuosius polimerus (KP), nanodaleles, kvantinius taškus bei kitas nanomedžiagas. Šie papildomi jutiklio komponentai padidina signalo stabilumą ir pakartojamumą, jautrį, sumažina atsako trukmę ir kitas analizines charakteristikas. Be to, jų pagalba palengvinamas analizinio signalo perdavimas iš biologinio atpažinimo elemento signalo vertikliui, o fermentas gali būti stabiliai imobilizuojamas elektrodo paviršiuje ir apsaugomas nuo galimos desorbcijos nuo paviršiaus. Taip pat šių papildomų komponentų naudojimas gali sumažinti ar net panaikinti trukdančių medžiagų įtaką biologinio jutiklio analiziniam signalui.

Biologiniame jutiklyje pritaikyti KP suteikia jutikliui daug privalumų: stabili matrica, fermento įterpimas arba prijungimas, elektronų pernašos palengvinimas. Viena iš populiariausių KP, naudojamų jutiklių

konstrukcijoje, yra polipirolas (PPy). Šis polimeras pasižymi ne tik jau minėtais privalumais, bet yra ir biologiškai suderinamas. Tačiau ne ką mažesnius privalumus žada PPy darinys – poli(pirol-2-karboksirūgštis) (PPKR). Karboksilo grupė esanti pirol žiedo antroje padėtyje suteikia galimybę kovalentiškai prijungti fermentą. Stabiliu ryšiu prie elektrodo paviršiuje esančio polimero prijungtas fermentas nedesorbuoja nuo elektrodo paviršiaus. Dažnu atveju fermentas netgi ilgiau išlaiko savo aktyvumą.

Dar viena biologinio jutiklio savybes pagerinanti medžiaga – aukso nanodalelės (AuND). Kaip ir kitos nanomedžiagos, AuND padidina paviršiaus plotą ir elektrinį laidį. O naudojant jas biologiniuose jutikliuose, gaunamas jutiklis, pasižymintis geresniu stabilumu, pakartojamumu, mažesne aptikimo ir nustatymo riba.

Taigi, gliukozės biologiniai jutikliai yra aktyviai tiriami ir tobulinami tam, kad sukonstruoti stabilų, ilgai veikiančią, pasižymintį nepriekaištingomis savybėmis analizinį įrankį. Toks jutiklis bus naudojamas tiksliai, greitai ir nebrangiai nustatyti gliukozės koncentraciją maisto produktuose, gėrimuose, vaistiniuose preparatuose, o svarbiausia – pacientų kraujyje.



## DARBO TIKSLAS

Fermentiniu, cheminiu ir elektrocheminiu būdu susintetinti poli(pirol-2-karboksirūgštį) ir pritaikyti ją konstruojant gliukozės biologinius jutiklius.

## DARBO UŽDAVINIAI

1. Ištirti ir palyginti poli(pirol-2-karboksirūgšties) dalelių susidarymą cheminės ir fermentinės sintezės būdais.
2. Cheminės polimerizacijos būdu susintetintas poli(pirol-2-karboksirūgšties) daleles modifikuoti gliukozės oksidaze, sukonstruoti gliukozės biologinį jutiklį, naudojant tirpų elektronų pernašos tarpininką fenazino metosulfatą, ištirti pagrindines jutiklio analizines charakteristikas, bei patikrinti jo gebėjimą nustatyti gliukozės kiekį realiuose mėginiuose.
3. Elektrocheminės sintezės būdu susintetintą poli(pirol-2-karboksirūgštį) modifikuoti gliukozės oksidaze, sukonstruoti bereagentinį gliukozės biologinį jutiklį, naudojant 1,10-fenantrolin-5,6-dioną ir aukso nanodaleles, ištirti pagrindines jutiklio analizines charakteristikas, bei patikrinti jo gebėjimą nustatyti gliukozės kiekį realiuose mėginiuose.

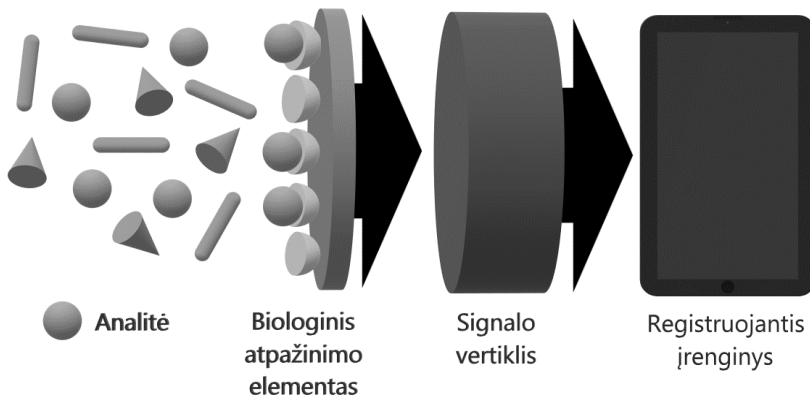
## DARBO GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Poli(pirol-2-karboksirūgšties) dalelės gali būti susintetintos cheminės polimerizacijos būdu, polimerizacijos iniciatoriumi naudojant vandenilio peroksidadą, bei fermentinės polimerizacijos būdu, naudojant gliukozės oksidazę ir gliukozę.
2. Gliukozės oksidaze modifikuotos cheminės polimerizacijos būdu susintetintos poli(pirol-2-karboksirūgšties) dalelės gali būti taikomos konstruojant gliukozės biologinį jutiklį tinkamą realių mėginių analizei.
3. Gliukozės oksidaze modifikuota elektrocheminės sintezės būdu susintetinta poli(pirol-2-karboksirūgštis) gali būti taikoma konstruojant bereagentinį gliukozės biologinį jutiklį tinkamą realių mėginių analizei.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Biologiniai jutikliai

Jutiklis – tai prietaisas, gebantis pateikti analizinę informaciją apie mėginį [1]. Analizinė informacija gali būti vienos ar daugiau analizių koncentracija mėginyje. Tokį prietaisą sudaro atpažinimo elementas ir signalo vertiklis. Jutiklis, kurio atpažinimo elementas yra biologinės kilmės (fermentai, antikūnai, audiniai, mikroorganizmai, ląstelės) vadinamas biologiniu jutikliu. Biologinis elementas tiesiogiai kontaktuoja su signalo vertikliu ir šio sąveiką su analite arba biokatalizinius procesus paverčia išmatuojamais elektroniniais signalais, proporcingais analitės koncentracijai.



**1 pav.** Biologinio jutiklio principinė schema.

Biologinis jutiklis yra išskirtinis prietaisas tuo, kad yra atrankus vienai analitei. Taip yra todėl, kad biologinis elementas atrankiai sąveikauja tik su analite. Todėl galima analizuoti mėginį, kuriame yra kitų cheminių ar biologinių medžiagų. Tai supaprastina ir pagreitina analizę. Biologiniai jutikliai pritaikomi daugelyje sričių: maisto pramonėje, aplinkos objektų tyrimuose ir medicinoje. Maisto pramonėje jutiklių pagalba nustatomi junginiai: naudingų maisto medžiagų koncentracijos arba pašalinės medžiagos, kurios gali pakenkti produkto prekybei išvaizdai, naudojimui trukmei arba sutrikdyti vartotojo sveikatą [2]. Taip pat yra vystomos kompleksinės jutiklių sistemos gebančios nustatyti kiekybiškai ir kokybiškai įvairių medžiagų buvimą maiste, o tai leistų daryti išvadas apie maisto produkto saldumą (gliukozė, fruktozė, saldikliai ir kt.), rūgštumą (acto,

citrinos ir kt. rūgštys), kartumą (chininas, kofeinas ir kt.) [3]. Ore, vandenyje ar dirvožemyje esančias medžiagas taip pat galima nustatyti jutiklių pagalba, o aplinkos teršalų, toksinių medžiagų nustatymas yra labai svarbus [4]. Šioje srityje taip pat siekiama sukurti jautrius, greitus, pigius jutiklius. Medicinoje naudojami jutikliai padeda stebėti daugelio ligų vystymąsi ir gydymą, jų pagalba gali būti nustatomos infekcijos, identifikuojamos ir kiekybiškai nustatomos medžiagos pacientų kūno skysčiuose [5, 6]. Per pastarąjį dešimtmetį biologiniai jutikliai yra naudojami hormonų, biomolekulių, neuromediatorių, bakterijų, virusų, širdies ligų ar vėžinių ląstelių žymenų nustatyme [7]. Jutikliai yra miniatiūrizuojami, gaminami masiškai, lengvai transportuojami. Todėl biologiniu jutikliu galima tirti mėginį bet kur ir bet kada.

Plačiau apžvelgiant medicinoje taikomus biologinius jutiklius, ypatingai išsiskiria gliukozės biologiniai jutikliai. To paaiškinimui galima rasti daug priežasčių. Pirmiausia, gliukozės biologiniai jutikliai yra nepamainomi nustatant gliukozės kiekį žmonių, kurie serga cukriniu diabetu, kraujyje. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis 2014 metais pasaulyje buvo 422 milijonai žmonių sergančių diabetu, o kiekvienais metais nuo su diabetu susijusių sveikatos negalavimų miršta apie 1,6 milijono žmonių [8]. Dėl šios priežasties gliukozės kiekio matavimas, o ypač pastovus jos koncentracijos registravimas kraujyje yra gyvybiškai svarbus. Šiuo metu pacientui pasimatuoti pačiam gliukozės koncentraciją kraujyje problemų nėra. Komerciniai gliukozės matuokliai yra pakankamai tikslūs ir greiti. Tačiau norint stebėti koncentraciją pastoviai ir taip įvertinti paciento būklę ir atsaką į gydymą, reikia toliau tobulinti jutiklius, ieškoti naujų sprendimų. Tam pritaikomos skirtingos medžiagos (anglis, stiklas, silikonas, metalai ir polimerai) [9].

Gliukozės biologiniai jutikliai priklauso didžiausiai biologinių jutiklių klasei, t. y. fermentiniams biologiniams jutikliams. Šiuo atveju jutiklio atpažinimo elementas, kuris atrankiai atpažįsta analizę, yra fermentas. Pagal signalo vertiklio tipą biologiniai jutikliai gali būti skirstomi į elektrocheminius, optinius, gravimetrinius. Dėl naudojimo paprastumo ir pigumo, vieni iš daugiausiai tiriamų yra elektrocheminiai biologiniai jutikliai [10]. Taigi, pasirinkus populiariausią atpažinimo elementą – fermentą ir pritaikius jį elektrocheminiame jutiklyje, gauname analizinę sistemą, kuri pasižymi daugybe patrauklių savybių. Be jau minėtų jutiklių pranašumų, elektrocheminiai fermentiniai jutikliai gali būti naudojami tiriant sudėtingas matricas, rezultatai gaunami greitai. Šie jutikliai tiriami jau beveik šešis

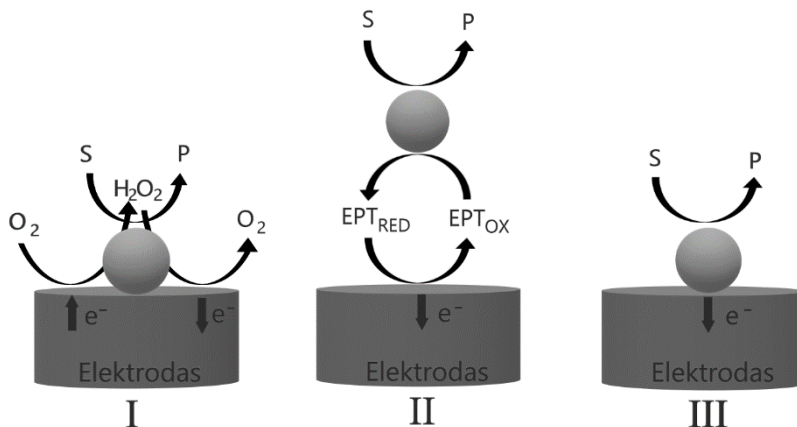
dešimtmečius, nuo tada kai praeito amžiaus septintajame dešimtmetyje buvo sukurtas pirmasis gliukozės biologinis jutiklis [11].

Iš elektrocheminių jutiklių galima išskirti amperometrinius biologinius jutiklius. Jų veikimas pagrįstas elektrochemiškai aktyvios medžiagos oksidacija arba redukcija indikatorinio elektrodo paviršiuje, esant tam tikram jo potencialui. Indikatorinio elektrodo potencialas parenkamas atsižvelgiant į elektrochemiškai aktyvios medžiagos prigimtį, kitas tiriamajame mėginyje esančias medžiagas, jei naudojamas elektronų pernašos tarpininkas (EPT), tuomet – pagal jo redokso potencialą. Esant pastoviam indikatorinio elektrodo potencialui, registruojamas srovės stipris, kuris yra proporcingas reakcijoje dalyvaujančių medžiagų koncentracijai. Indikatorinis elektrodas turi būti stabilus įvairiose aplinkose, pasižymėti plačiu darbinių potencialų diapazonu, turi būti atsparus oksidatorių ir reduktorių poveikiui, neturi katalizuoti oksidacijos ar redukcijos reakcijų.

Srovės stipris gali būti išmatuotas naudojant dvielektrodę arba trielektrodę elektrocheminę celę. Dažniausiai naudojama trielektrodė. Ją sudaro indikatorinis, pagalbinis ir lyginamasis elektrodai. Indikatorinis ir pagalbinis elektrodai turi būti chemiškai inertiški (Au, Pt, anglis), lyginamasis dažniausiai būna sidabro/sidabro chlorido (Ag/AgCl) elektrodas. Jutiklio signalas atsiranda tuomet, kai esant pastoviam indikatorinio elektrodo potencialui elektrochemiškai aktyvios medžiagos (reakcijos substratai arba produktai, elektronų pernašos tarpininkai, interferuojančios medžiagos) oksiduojasi arba redukuojasi indikatorinio elektrodo paviršiuje. Trielektrodinėje celėje srovė teka tarp indikatorinio ir pagalbinio elektrodų, o potencialas suteikiamas lyginamojo elektrodo atžvilgiu. Todėl yra kompensuojamas potencialo kritimas, atsirandantis srovei tekant per tirpalą. Matavimo metu gauti rezultatai yra tikslesni nei naudojant dvielektrodę elektrocheminę celę.

Amperometriniuose fermentiniuose biologiniuose jutikliuose dažniausiai naudojami oksidoreduktazių klasės fermentai, pasižymintys oksidaziniu arba dehidrogenaziniu aktyvumu. Daugelis iš jų yra pakankamai stabilūs ir pigūs, o jų reakcijų substratus, produktus arba elektronų pernešimo tarpininkus galima lengvai registruoti. Šiuo atveju, kalbant apie gliukozės biologinius jutiklius, naudojamas fermentas GOx. Fermentas gali būti įvairiais būdais imobilizuojamas indikatorinio elektrodo paviršiuje. Suteikus indikatoriniam elektrodai tinkamą potencialą lyginamojo elektrodo atžvilgiu, nustatoma reakcijos substrato koncentracija. Vykstant fermentinei reakcijai, substratas fermentą gali pasiekti dviem būdais: konvekcijos arba difuzijos keliu. Todėl bendras jutiklio atsakas priklauso nuo elektrodo tipo,

fermentinės reakcijos ir masės pernašos procesų. Kadangi amperometrinio matavimo metu vyksta heterogeninės prigimties procesai, reakcijos greitis priklauso nuo elektronų pernašos bei analizės, reakcijos produkto ir EPT pernašos greičio. Elektrochemine cele tekanti srovė atspindi šių procesų visumą.



**2 pav.** Amperometrinių fermentinių biologinių jutiklių principinės veikimo schemas: I – pirmą kartą; II – antrą kartą; III – trečią kartą. S – substratas, P – produktas,  $EPT_{RED}$  – redukuota EPT forma,  $EPT_{OX}$  – oksiduota EPT forma.

Pagal elektronų iš fermento aktyviojo centro elektrodai perdavimo principą amperometriniai fermentiniai biologiniai jutikliai skirstomi į tris kartas [12] (2 pav.). Pirmosios kartos jutikliuose matuojama fermentinės reakcijos substrato arba produkto koncentracija. Daugumoje šių jutiklių naudojamos įvairios oksidazės katalizuojančios reakcijos, kurių metu matuojamas deguonies arba susidariusio vandenilio peroksido kiekis. Tačiau šie jutikliai nėra pakankamai patikimi, dėl ištirpusio analizuojamame tirpale deguonies kiekio kitimo ar reikalingo indikatoriniam elektrodai suteikti gan didelio potencialo (+0,6 V) vandenilio peroksido nustatymui [13]. Dėl to jutiklio analiziniam signalui įtaką gali daryti kitos biologiniuose mėginiuose dažnai pasitaikančios medžiagos, tokios kaip askorbo rūgštis, šlapimo rūgštis, bilirubinas, cholesterolis, kreatininas, trigliceridai, bei kai kurie vaistai, tokie kaip acetaminofenas, salicilo rūgštis, tetraciklinas, dopaminas, efedrinas, ibuprofenas, tolazamidas ir kiti. Antrosios kartos jutikliuose naudojami EPT, gebantys greitai pernešti elektronus nuo fermento aktyviojo centro prie elektrodo paviršiaus arba atvirkščiai. Taip sumažinama deguonies

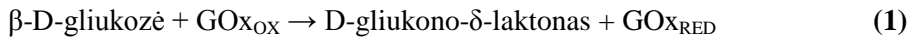
įtaka analiziniam signalui, bei sumažinamas indikatoriniam elektrodui reikalingas suteikti potencialas. Antrai kartai priskiriami ir biologiniai jutikliai, kurie elektrodo paviršiuje turi ne tik imobilizuotą fermentą, bet ir EPT, kuris yra elektrodo sudedamoji dalis ir tokiu būdu užtikrina elektronų pernašą iš fermento aktyviojo centro elektrodo paviršiui [14]. Tokie jutikliai vadinami bereagentiniais jutikliais, nes dirbant su jais nebereikia papildomai pridėti jokių reagentų išskyrus analizę. Trečios kartos jutiklių veikimas pagrįstas tiesiogine elektronų pernaša nuo fermento aktyviojo centro elektrodo paviršiui [15]. Tokiu atveju nebelieka daugumos problemų, su kuriomis susiduria pirmos ir antros kartos biologiniai jutikliai, nereikia naudoti EPT. Tačiau tokia pernaša galima tik su fermentais, kurių aktyvusis centras yra pakankamai arti baltymo paviršiaus. Tik keli žinomi fermentai pasižymi tiesiogine elektronų pernaša, kadangi daugumos fermentų aktyvusis centras yra giliai baltymo globulėje, kuri veikia kaip izoliatorius. Todėl nepaisant to, kad trečiosios kartos jutikliai yra patraukliausi, šiuo metu vis dar plačiausiai naudojami ir tobulinami antros kartos biologiniai jutikliai.

## 1.2. Gliukozės biologiniai jutikliai

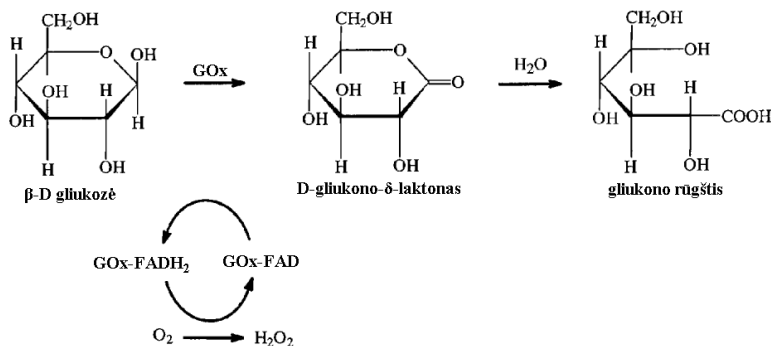
Antros kartos biologiniams jutikliams priklauso ir dauguma dabar kuriamų ir tiriamų gliukozės biologinių jutiklių [16]. Būtent šie jutikliai per pastaruosius kelis dešimtmečius tapo didžiulio susidomėjimo sulaukusia tyrimų sritimi. Svarbiausioje gliukozės biologinių jutiklių panaudojimo srityje – medicinoje – jau yra pasiekta labai daug – kraujo gliukozės matavimas yra paprastas, pakankamai tikslus ir prieinamas pacientams. Tačiau norint stebėti kraujo gliukozės kiekio svyravimą, vis dar reikia tobulinti gliukozės jutiklius, kad jie veiktų kuo ilgesnį laiką [17]. Tuo pačiu svarbu pagerinti ir kitas svarbias analizes charakteristikas: jautrį, pakartojamumą, atrankumą. Gliukozės jutiklio biologiniu atpažinimo elementu dažniausiai būna GOx, taip pat gali būti naudojama gliukozės-6-fosfato dehidrogenazė, gliukozės dehidrogenazė, nuo pirolochinolino chinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė ir nuo flavino adenino dinukleotido (FAD) priklausoma gliukozės dehidrogenazė [18]. Taip pat naudojamas elektronų pernašos tarpininkas, kuris perneša elektronus nuo giliai fermento globulėje esančio kofaktoriaus iki elektrodo paviršiaus.

GOx katalizuoja  $\beta$ -D-gliukozės oksidaciją molekulinio deguonimi iki D-gliukono-1,5-laktono, kuris spontaniškai hidrolizuojasi iki gliukono rūgšties ir vandenilio peroksido. GOx yra dimerinis baltymas, kurio

kiekvienas subvienetas turi vieną FAD kofaktorių. GOx veikia tam tikroje pH srityje, didžiausias aktyvumas stebimas rūgštinėje terpėje. Iš *Aspergillus niger* gauta GOx veikia pH srityje 5,0 – 7,0 [19]. Paprastai šiam fermentui oksiduojant gliukozę, elektronų akceptoriumi yra molekulinis deguonis. Tačiau, esant EPT, jo redukcija vyksta žymiai greičiau ir deguonies įtaka signalui yra praktiškai eliminuojama. Fermentinė reakcija vyksta pagal schemą:



Vykstant gliukozės oksidacijai, FAD redukuojamas. Tuomet oksiduota EPT forma ( $\text{EPT}_{\text{OX}}$ ) paima elektronus iš redukuoto FAD ir fermentas yra reoksiduojamas. Galiausiai redukuotas EPT ( $\text{EPT}_{\text{RED}}$ ) oksiduojasi elektrodo paviršiuje. Tokiu būdu gaunamas srovės signalas, kuris yra proporcingas gliukozės koncentracijai.



**3 pav.** Gliukozės oksidazės katalizuojama reakcija.

Fermentinė reakcija taip pat aprašoma:



kur: E – fermentas; S – substratas; ES – fermento-substrato kompleksas; P – produktas;  $k_{+1}$  – fermento-substrato komplekso susidarymo iš substrato ir fermento reakcijos greičio konstanta;  $k_{-1}$  – fermento-substrato komplekso disociacijos į fermentą ir substratą reakcijos greičio konstanta;  $k_{+2}$  –

fermento-substrato komplekso skilimo į fermentą ir produktą reakcijos greičio konstanta.

Michaelis-Menten lygtis:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

kur:  $V$  – reakcijos greitis;  $V_{\max}$  – maksimalus reakcijos greitis;  $(S)$  – substrato koncentracija;  $K_M$  – Michaelio konstanta.

Viena iš pastarųjų gliukozės biologinių jutiklių tyrimo krypčių yra nešiojami neinvaziniai gliukozės matuokliai. Šie įrenginiai taip pat pasitelkia mobiliąsias technologijas. Tokie matuokliai detektuoja gliukozę žmogaus biologiniuose skysčiuose: prakaitė, ašarose, seilėse, tarpadiniame skystyje [20]. Jie yra nešiojami, lankstūs, tvirtinami prie odos [21]. Šiems jutikliams taip pat priskiriami minimaliai invaziniai adatiniai jutikliai, kurie dažniausiai yra įduriami į poodinį sluoksnį pilvo ar rankos srityje. Pirmieji šių matuoklių prototipai buvo pasiūlyti praeito amžiaus pabaigoje. Tačiau buvo susidurta su biologinio suderinamumo problema, todėl jie nebuvo komercializuoti. Pirmieji sėkmingai komercializuoti ir visiems pacientams prieinami matuokliai buvo pasiūlyti 2005 metais. Svarbiausias reikalavimas šiems jutikliams yra tikslumas, nes nuo matavimo rezultato priklauso insulino dozavimas. Tačiau per pastarąjį dešimtmetį sukurti neinvaziniai ar minimaliai invaziniai gliukozės matuokliai yra nepakankamai tikslūs, lyginant su įprastiniais kraujyje gliukozės matuokliais. Tik pakankamai neseniai pasirodę matuokliai pasižymi pakankamai neblogomis savybėmis: didesnis tikslumas, patogesnis naudojimas, sumažintas dydis, padidėjusi naudojimo trukmė.

Kita kryptis – implantuojami gliukozės jutikliai. Tokia sistema leistų nepertraukiamai stebėti gliukozės kiekį kraujyje, taip pat ir prireikus automatiškai suleisti vaistus. Šie jutikliai turėtų reaguoti į matuojamos analizės koncentracijos pokyčius, turėtų būti ypatingai atsparūs kitų fiziologinių medžiagų poveikiui. Tam, kad būtų pasiekta kuo mažesnė kitų matuojamo skysčio komponentų, temperatūros, pH įtaka, biologinis analizės atpažinimo elementas turi būti kuo geriau apsaugotas. Šiam tikslui dažnai yra pasitelkiamos nanomedžiagos (anglies nanovamzdeliai, aukso ar kitos nanodalelės), kurios padidina paviršiaus plotą ir jautrį. Tačiau susiduriama su toksiškumo ir biologinio suderinamumo klausimu. Taigi bandoma suderinti pakankamą jautrį su atsparumu pašalinėms medžiagoms, taip pat siekiama kuo ilgesnio naudojimo, tikslumo. Implantuojamas gliukozės



jutiklis turėtų turėti jautrų signalo vertiklį, kuo didesnę aktyvų paviršiaus plotą, tinkamą biologinės atpažinimo medžiagos ir signalo vertiklio kontaktavimą ir kuo mažesnę interferuojančių medžiagų įtaką [22]. Per šiek tiek daugiau nei pastarąjį dešimtmetį buvo atlikti keli klinikiniai implantuojamų jutiklių tyrimai [23, 24]. 2016 metais Europoje, o 2018 metais JAV buvo išduoti leidimai pirmajam nuolatinio gliukozės matavimo (CGM – angl. *continuous glucose monitoring*) sistemai su visiškai implantuojamu gliukozės jutikliu, kuris yra suderinamas su mobiliąja programėle, suaugusiems sergantiems diabetu [25]. Ši sistema yra pilnai implantuojama ir gali būti naudojama iki 90 dienų. Mažas jutiklis yra implantuojamas po oda, jis reguliariai matuoja gliukozės koncentraciją ir siunčia informaciją programėlei.

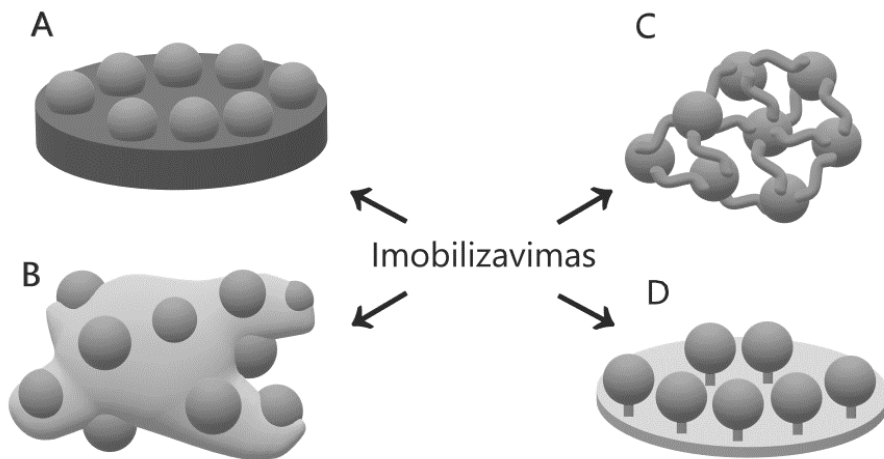
Taigi, ir neinvazinių, ir invazinių gliukozės jutiklių tobulinimas dar tikrai nėra baigtas. Tikslumas, patikimumas, pritaikomumas, naudojimo trukmė turi būti gerinami. Pašalinami ar maksimaliai sumažinami tokie veiksniai kaip: rezultatų vėlavimas, iškreipimas, kalibravimo klaidos ir kiti netikslumai, kurie tiesiogiai daro įtaką žmogaus sveikatai. Todėl ir toliau yra tobulinama jutiklių sandara.

### 1.3. Fermentų imobilizavimo būdai

Fermento ar kitos biologinės medžiagos, kuri atrankai atpažįsta analitę, imobilizavimas signalo vertiklio paviršiuje yra bene svarbiausias biologinio jutiklio kūrimo etapas. Būtent tai nulemia jutiklio efektyvumą (ilgalaikiškumas, analizės kaina). Fermento imobilizavimas dažnai daro įtaką fermento katalizinėms savybėms, jutiklio atrankumui analitei. Būtent per mažas fermento stabilumas ir aktyvumas yra didžiausia problema. Todėl ieškoma imobilizavimo būdų, kurie ne tik užtikrintų kuo geresnį fermento stabilumą ir aktyvumą, bet būtų nesunkiai įgyvendinami, lengvai atkuriami.

Dažniausiai sutinkami fermentų imobilizavimo būdai yra adsorbicija signalo vertiklio paviršiuje, įterpimas į matricas: gelį ar polimerą, surišimas tarpusavyje skersiniais ryšiais panaudojant bifunkcinius reagentus ir prijungimas kovalentiniais ryšiais (4 pav.). Kiekvienas iš būdų turi privalumų ir trūkumų. Adsorbicija yra paprasčiausias būdas imobilizuoti fermentą: nereikalingos papildomos medžiagos, modifikacijos, maža kaina. Tačiau šis prijungimas yra jautrus pH pasikeitimui, temperatūrai, joninei jėgai. Fermentas lengvai desorbuoja nuo paviršiaus. Kitas būdas – įterpimas į gelį ar polimero sluoksnį. Šis metodas pasižymi geresniu fermento išlaikymu signalo vertiklio paviršiuje. Tačiau nors ir galima kontroliuoti

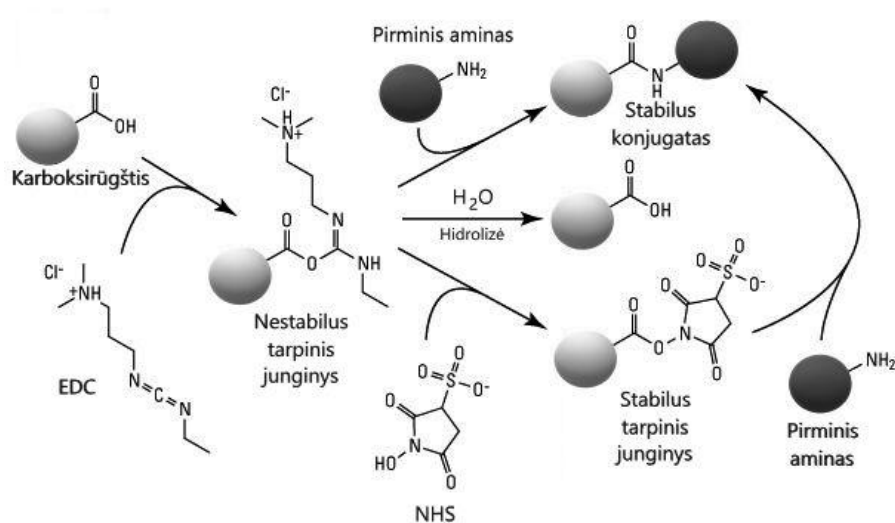
gelio poringumą ar polimero sluoksnio storį, analitės difuzija prie fermento yra apsunkinama.



**4 pav.** Dažniausiai naudojami fermentų imobilizavimo būdai: A – adsorbcija, B – įterpimas į matricas, C – surišimas bifunkciniais reagentais, D – kovalentinis prijungimas.

Kitas itin tradicinis būdas yra fermento molekulių surišimas skersiniais ryšiais naudojant bifunkcinius reagentus (pvz.: glutaro aldehidas (GA), 1,5-dinitro-2,4-difluorbenzenas, heksametilendiizocianatas). GA bene labiausiai naudojamas reagentas, kurio aldehidinės grupės susijungia su fermento amino grupėmis, taip susidarant pakankamai tvirtam tinklui [26]. Šiuo atveju fermentas yra išlaikomas elektrodo paviršiuje gana gerai, tačiau naudojami reagentai yra toksiški ir gali neigiamai paveikti fermento aktyvumą. Paskutinis apžvelgiamas būdas – prijungimas kovalentiniais ryšiais. Fermentas tokiu būdu yra stabiliai imobilizuotas paviršiuje, atsparus įvairioms aplinkos sąlygoms. Šiuo atveju taip pat gali būti naudojami gan toksiški reagentai. Tačiau 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimido hidroklorido (EDC) ir N-hidroksisukcinimido (NHS) mišinys yra dažnai naudojamas įvairių biologinių medžiagų imobilizavimui ar modifikavimui. Jei paviršiuje, ant kurio norima imobilizuoti fermentą ar kitą biologinę medžiagą, yra karboksilo grupės, tai EDC ir NHS naudojami sudaryti amidinį ryšį tarp paviršiaus karboksilo ir biomolekulės amino grupės. Tačiau šių medžiagų ar jų dalių galutiniame konjugate nelieka. EDC reaguoja su karboksilo grupe, sudarydamas vandeninėje terpėje nestabilių tarpinį junginį,

todėl lengvai pakeičiamas pirminiu aminu arba hidrolizuojasi, regeneruodamas karboksilo grupę. Todėl dažniausiai tam, kad padidinti reakcijos išeigą, kartu naudojamas NHS. Jis sudaro labai reaktyvų stabilų NHS esterį ir taip efektyviau susidaro amidinis ryšys (5 pav.).



**5 pav.** Amidinio ryšio susidarymas, naudojant EDC ir NHS.

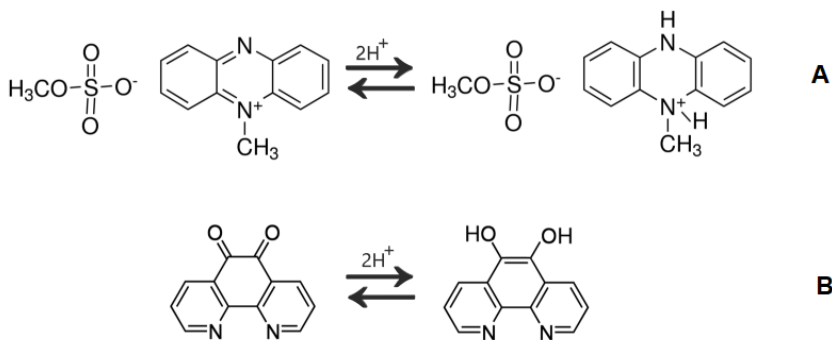
Pasitelkus šiuos biologinių medžiagų imobilizavimo būdus, yra sukurta ir pasiūlyta daug biologinių jutiklių. Kaskart norima išryškinti privalumus ir kuo labiau sumažinti trūkumus. Dėl tos priežasties, imobilizavimo metodai taip pat yra derinami tarpusavyje. Pavyzdžiui, fermentas gali būti ne tik adsorbuojamas elektrodo paviršiuje, bet ir surišamas skersiniais ryšiais, o elektrai laidūs polimerai gali būti ne tik kaip matrica, į kurią įterpiamas fermentas, bet kaip ir struktūra, kuri palengvina ir pagreitina elektronų pernašą nuo fermento aktyviojo centro iki elektrodo paviršiaus.

#### 1.4. Elektronų pernašos tarpininkai

Gliukozės biologiniai jutikliai su EPT pasižymi geresnėmis savybėmis. EPT – tai mažos molekulinės masės medžiaga, kuri perneša elektronus nuo fermento aktyviojo centro iki elektrodo paviršiaus. Dažniausiai tai organiniai ir neorganiniai pereinamųjų metalų kompleksiniai

junginiai arba organiniai junginiai. Kaip jau minėta, vienas iš svarbiausių pranašumų naudojant EPT – biologinio jutiklio signalas nepriklauso nuo ištirpusio deguonies kiekio nepastovumo. Kitas privalumas – galima naudoti mažesnę potencialą, todėl sumažėja pašalinių elektroaktyvių medžiagų, kurių gali būti biologiniuose mėginiuose, oksidavimosi ant elektrodo paviršiaus tikimybė. EPT gali būti įpilamas į analizuojamąjį tirpalą arba imobilizuotas elektrodo paviršiuje. Pirmasis atvejis yra paprastesnis, tačiau nėra taikomas gliukozės matuoklių gamybos technologijoje. Optimalesnis ir perspektyvesnis variantas yra imobilizuoti EPT [27]. Tam, kad EPT galėtų būti pritaikytas gliukozės biologiniame jutiklyje, jis turi atitikti reikalavimus [28]:

- efektyvus greitas elektronų paėmimas iš fermento kofaktoriaus;
- greita grįžtama elektronų perdavimo kinetika;
- mažas ir nepriklausantis nuo pH redokso potencialas;
- stabilus redukuotoje ir oksiduotoje formose;
- redukuota forma nereaguojanti su deguonimi;
- oksiduota forma nedalyvaujanti kituose procesuose;
- netoksiškas (jei kuriamas implantuojamas gliukozės jutiklis).



**6 pav.** FMS (A) ir PD (B) oksiduota ir redukuota formos.

Dažniausiai naudojami EPT yra metileno mėlis, tioninas, fenazino metosulfatas (FMS), ferocenas, fericianidas, tetratiofulvalenas, benzochinonas [29]. Taip pat prie medžiagų palengvinančių elektronų pernašą galima priskirti elektrai laidžius polimerus (polianilinas, polipirolas ir kt.), kurie yra dažnai pritaikomi biologiniuose jutikliuose [30-32]. FMS yra dažnai pritaikomas biologinių jutiklių kūrime ir tyrimuose [33-35]. Jis atitinka visus pagrindinius EPT keliamus reikalavimus, nors yra labai jautrus

šviesai. Dažniausiai naudojamas kaip tirpus EPT, tačiau gali būti pritaikytas ir polimero sluoksnyje. FMS oksiduota ir redukuota formos pavaizduotos 6 paveikslo A dalyje. 1,10-fenantrolin-5,6-dionas (PD) dažniau yra tiriamas kaip metalų katijonų ligandas. Tačiau šis junginys gali būti ir puikus EPT biologiniuose jutikliuose [36-38]. PD yra netirpus vandeninėje terpėje, todėl pritaikant jį biologiniuose jutikliuose, jis turi būti įkomponuotas į jutiklio struktūrą. Vienas iš variantų – adsorbicija elektrodo paviršiuje. Susidaręs elektronų pernašos tarpininko sluoksnis veikia kaip puikus laidininkas tarp elektrodo ir fermento aktyviojo centro. Fermentinės reakcijos metu PD, paimdamas elektronus iš fermento kofaktoriaus, redukuojasi, o prie elektrodo, atiduodamas jam elektronus, oksiduojasi. PD oksiduota ir redukuota formos pavaizduotos 6 paveikslo B dalyje.

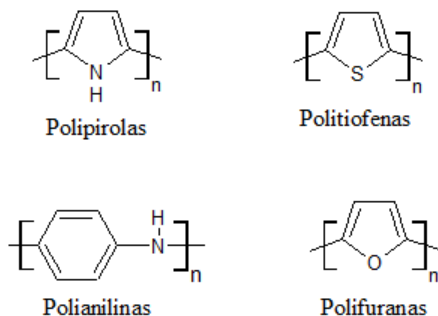
### 1.5. Konjuguotųjų polimerų taikymas biologiniuose jutikliuose

Polimerų taikymas biologiniuose jutikliuose prasidėjo po KP polimerų atradimo. KP – tai palyginti nauja organinių polimerų klasė savo struktūroje turinti konjuguotą  $\pi$ - $\pi$  elektronų sistemą. KP dažnai pasižymi laidumu būdingu metalams ir puslaidininkiams, todėl šie polimerai dar yra vadinami elektrai laidžiais polimerais (ELP). KP biologinių jutiklių kūrimo, kaip ir kitose srityse, sulaukė didelio mokslininkų bendruomenės susidomėjimo. KP pasirodė esantys tinkama matrica fermentams imobilizuoti [39]. Dažnai KP pagerina elektronų pernašą bei biologinio jutiklio jautrį, analizinio signalo stabilumą, pakartojamumą. Šie polimerai gali būti ne tik matrica biologinėms medžiagoms imobilizuoti, bet ir apsauginis sluoksnis, kuris padidina jutiklio atrankumą norimai analizei. Be kita ko, KP pasižymi geru biologiniu suderinamumu – nedaro neigiamos įtakos fermento veikimui. Fermento aktyvumo sumažėjimas ir jo pašalinimas nuo paviršiaus yra vienos iš didžiausių komercinių jutiklių problemų. Dažniausiai naudojami biologinių junginių imobilizavimo būdai yra surišimas skersiniais ryšiais, kovalentinis prijungimas arba įterpimas į gelius ar membranas. Tačiau šie būdai pasižymi pernelyg mažu pakartojamu ir padengimo kontroliavimu, todėl šioms problemoms spręsti taip pat gali būti pasitelkiami KP.

KP taip pat pasižymi tokiais savybėmis kaip lankstumas, nedidelis svoris, cheminis inertiškumas, lengvas apdorojimas [40]. Tokie polimerai išsiskiria geresne cheminių, fizikinių ir mechaninių savybių visuma nei

metalai ar neorganinės panašių savybių medžiagos [41]. Anglies nanovamzdėliai, nanopluoštai, nanodalelės taip pat pasižymi geromis savybėmis biologinių medžiagų imobilizavimo srityje. Dėl savo ypatingos struktūros, didelio poringumo ir paviršiaus ploto, gali būti pritaikomi mažo dydžio ir kitų jutiklių kūrime. O sujungus dvi ar tris medžiagas – gaunami nanokompozitai/nanohibridai, kurie biologiniams jutikliams suteikia gerą analizinio signalo pakartojamumą, stabilumą, didesnę jautrį [42].

Biologiškai suderinami KP naudojami ne tik biologinių jutiklių gamyboje, bet ir mediciniuose implantuose, nervų sąsajose, bioaudinių struktūrose. Šiose srityse KP yra daug žadantys, nes be kita ko, gali būti funkcionalizuoti, taip siekiant pagerinti tirpumą, priešuždegimines savybes, gebėjimą moduluoti ląstelių augimą ir diferenciaciją [43]. Polimerai gali būti biosąsaja tarp ląstelių, audinių ar biomolekulių ir kitų paviršių. Dažniausiai naudojamas, tradicinis polimero funkcionalizavimas yra biologinių medžiagų įterpimas į polimerą. Tai efektyvu ir paprasta, tačiau naudojant tik adsorbciją, molekulės gali pasišalinti iš polimero. Dažniausiai į KP įterpiamos biomolekulės yra glikozaminoglikanai (chondroitino sulfatas [44], hialurono rūgštis [45], heparinas [45, 46]). Kitas įterpimo būdas – kovalentinis prijungimas. Tačiau dauguma KP neturi funkcinių grupių, prie kurių būtų įmanoma kovalentiškai prijungti kitas molekules. Todėl didelis dėmesys skiriamas polimerų, turinčių funkcines grupes (hidroksilo, karboksilo) sintezei [47, 48].



**7 pav.** Dažniausiai naudojamų KP struktūros.

Dažniausiai tiriami ir naudojami KP yra PPy, politiofenas, polianilinas, polifuranas. PPy ir jo dariniai yra vieni iš populiariausių KP pritaikomų biologiniuose jutikliuose [49, 50]. Šis polimeras pasižymi geru

elektriniu laidumu, atrankumu, stabilumu ir lengva polimerizacija neutraliame pH [51]. PPy naudojamas kaip pakankamai stabilus ir aktyvaus matrica fermentų imobilizavimui: adsorbicijai arba įterpimui. Nors polipirolas yra plačiai taikomas ne tik jutikliuose, bet ir elektroniniuose prietaisuose, tačiau galima būtų teigti, kad funkcionalizuotas PPy būtų dar tinkamesnis šioje srityje.

Neseniai buvo susintetinti PPy dariniai poli-N-alkilpirolas [52], poli(pirol-3-karboksirūgštis) [53], o taip pat ir elektrochemiškai susintetinta PPKR [54]. Pirol-2-karboksirūgštis (PKR) skiriasi nuo pirol-3, kad turi priešingą anglies atomą prijungtą karboksilo funkcinę grupę. Kadangi pirolas jungiasi į grandinę per žiedo antrą ir penktą atomus, kyla klausimas kaip polimerizuojasi PKR monomerai. Ši polimerizacija nėra iki galo išnagrinėta, tačiau Foschini su bendraautorais pasiūlė galimą mechanizmą [54]. Pagal pasiūlytą mechanizmą monomeras oksiduojasi, susidaro radikalkatijonas su įvairiomis rezonansinėmis formomis. Tačiau manoma, kad lengviausias junginys vyksta prie C4 ir C5 anglies atomų. Taip formuojasi oligomerai.

Polimerai su funkcinėmis grupėmis gali būti lengvai modifikuojami fermentais ar kitais biologiškai aktyviais junginiais tarp polimero karboksilo grupės ir fermento amino grupės sudarant amidinį ryšį. Tai užtikrina stabilų fermento prijungimą prie polimero. Porėta polimero struktūra leidžia padidinti imobilizuojamo fermento kiekį. Taip pat buvo nustatyta, kad PPy dariniai turintys karboksilo grupę pasižymi savybe atstumti medžiagas (askorbo rūgštis, šlapimo rūgštis, acetaminofenas ir kt.), kurios gali būti mėginyje ir daryti įtaką jutiklio analizinio signalo dydžiui [55].

Poli(pirol-2-karboksirūgštis) buvo panaudota elektrodo modifikavimui, kuriant biologinį jutiklį ankstyvai Alzheimerio diagnostikai [56]. Qin su bendraautorais modifikavo aukso elektrodą elektrai laidžiu PPKR sluoksniu. Polimerizacija buvo atlikta ciklinės voltamperometrijos metodu acetonitrilo tirpale su LiClO<sub>4</sub>. Po to prie polimero buvo prijungta priono baltymo ląstelinė forma, kuri yra Alzheimerio biožymenų – beta amiloido oligomerų – receptoriai. Autorių teigimu, šis jutiklis pasižymi ypatingai maža aptikimo riba ir dideliu jautriu. Poli(pirol-3-karboksirūgštis) buvo panaudota elektrodo modifikavimui, kuriant jutiklį dopamino nustatymui kraujo serume ir vaistiniuose preparatuose [57], bei serotonino nustatymui [58]. Šie jutikliai pasižymėjo plačia tiesine signalo priklausomybe nuo analitės koncentracijos, maža aptikimo riba, ilgalaikiu stabilumu.

## 1.6. Aukso nanodalelės biologiniuose jutikliuose

Nanomedžiagos dėl savo didelio paviršiaus ploto, įvairaus dalelių dydžio, formos ir agregacijos būsenos, pasižymi įvairiomis cheminėmis ir fizikinėmis savybėmis nebūdingomis mikro- ar makromatmenų toms pačioms medžiagoms, todėl yra plačiai taikomos įvairiose srityse [59]. Ypač nanodalelės yra tinkamos biologiniuose jutikliuose, dėl katalizinių savybių, elektronų pernašos, taip pat dėl galimybės panaudoti jas kaip biomolekulių žymenis ar paviršių adsorbcijai [60]. Dažniausiai yra tiriamas metalų nanodalelių pritaikymas, o iš šių didžiausio dėmesio sulaukia AuND, kurių dydis yra nuo 1 iki 100 nm dydžio, šių dalelių vandeninis tirpalas dar vadinamas koloidiniu auksu. AuND yra stabiliausias iš metalų nanodalelių, pasižymi unikaliomis savybėmis, labai paprasta sinteze, kurios metu dalelių dydis ir forma yra lengvai kontroliuojami. Dėl didelio paviršiaus ploto, nanodalelių paviršius gali būti funkcionalizuojamas ir naudojamas imobilizavimui. Taip pat AuND pasižymi unikaliomis optinėmis savybėmis dėl sužadintų paviršiaus elektronų, vadinamų paviršiaus plazmonais, osciliavimo. AuND yra suderinamos su beveik visomis biologiškai aktyviomis medžiagomis [61]. Dėl šių savybių AuND pritaikomos terapijoje, diagnostikoje, kaip biožymenis, vaistų pernašoje [62], cheminiuose ir biologiniuose jutikliuose, vaizdinime [63], netiesinėje optikoje, fotoelektronikoje ir katalizėje [64].

AuND gali būti gaunamos įvairiais metodais. Populiariausi metodai yra tokie, kurie leidžia kontroliuoti dalelių dydį, formą, tirpumą, stabilumą ir funkcionalumą. Metodai dažniausiai skirstomi į du pagrindinius būdus: „iš viršaus į apačią“ ir „iš apačios į viršų“. Pirmuoju būdu nanodalelės gaunamos smulkinant metalą. Naudojamos įvairios stabilizuojančios medžiagos. Antruoju būdu nanodalelės gaunamos redukuojant metalų druskas. Taip gaunamas koloidinis dalelių tirpalas. Šiuo atveju taip pat naudojamos stabilizuojančios medžiagos.

Galima teigti, kad populiariausią sintezės metodą dar 1951 m. pasiūlė Turkevich su bendraautoriais [65]. Pagal jų pasiūlytą metodiką, vandenilio tetrachlorauratas kaitinamas kartu su trinatrio citratu. Trinatrio citratas veikia ir kaip redukuojanti medžiaga, ir kaip dalelių stabilizatorius. 1973 m. Frens patobulino šį metodą – nustatė, kad keičiant vandenilio tetrachloraurato ir trinatrio citrato santykį, galima gauti norimo dydžio daleles [66]. Gaunamos pakankamai stabilios sferinės dalelės, kurių diametras yra nuo 10 iki 20 nm. 1994 m. Brust ir Schiffrin atrado metodą susintetinti 1 – 8 nm daleles [67]. Vėliau buvo pasiūlyta įvairių kitų



reduktorių ir stabilizatorių, eksperimentinių parametrų pakeitimai. Kaip reduktoriai gali būti naudojami borhidridai, hidridai, vandenilio peroksidas, sulfitai ir t. t. [68].

Literatūroje galima rasti daug duomenų apie AuND panaudojimą gliukozės biologiniuose jutikliuose. Visi šaltiniai teigia, kad dalelių naudojimas padidina jutiklio jautrį, atrankumą, stabilumą, sumažina aptikimo ribą ar pasižymi puikiu pakartojamumu [69]. Pavyzdžiui, Xue su bendraautoriais pasiūlė amperometrinių gliukozės biologinių jutiklių, kuriame gliukozės oksidazė yra įterpta į elektrochemiškai nusodintą chitozano – AuND hibridinę plėvelę [70]. Autoriai teigia, kad ši plėvelė yra homogeniška su mažomis poromis. O tai pagerino jutiklio stabilumą ir jautrį. Jutiklis buvo sėkmingai pritaikytas matuoti gliukozės koncentraciją kraujo serumo mėginiuose. Kitas pavyzdys – gliukozės jutiklis paruoštas ant elektrodo paviršiaus adsorbuojant AuND kartu su fermentu ir padengiant PPy sluoksniu [71]. Biologinio jutiklio tyrimai parodė, kad AuND palengvina elektronų pernašą ir padidina amperometrinių signalą. Taip pat buvo įvertinta AuND dydžio įtaka jutiklio savybėms. Dar vienas įdomus pavyzdys – gliukozės jutiklis grafo popieriaus pagrindu, kuris buvo modifikuotas GOx, AuND ir padengtas ELP [72]. Tyrimuose teigiama, kad AuND sukuria tvirtą ir biologiškai suderinamą matricą tarp fermento ir ELP, veikia kaip puikus tarpininkas. Jutiklis buvo išbandytas matuojant gliukozės kiekį gėrimuose. Rezultatai buvo artimi gamintojų nurodytiems gliukozės kiekiams.

## 2. TYRIMŲ METODIKOS

### 2.1. Poli(pirrol-2-karboksirūgšties) cheminė, fermentinė ir elektrocheminė sintezė

Polimerizacijos reakcijos vykdomos 0,05 mol/l natrio acetato, 0,05 mol/l natrio hidrofosfato ir 0,05 mol/l kalio hidrofosfato buferiniame tirpale (A-PBS) su 0,1 mol/l arba 0,2 mol/l PKR ištirpintos etanolyje. Reikiamas A-PBS pH gaunamas rūgštinant acto arba druskos rūgštimi arba šarminant natrio šarmu. Darbe naudojami skirtingo pH tirpalai – nuo 2,0 iki 9,0 pH. Polimerizacija atliekama vienkartinėse 1,5 ml talpos uždaromose kiuvetėse, kambario temperatūroje, tamsoje.

Cheminė polimerizacija atliekama oksidatoriumi naudojant  $H_2O_2$ . Šiuo atveju polimerizacijos tirpalas susidaro iš 854  $\mu$ l A-PBS (tam tikro pH), 600  $\mu$ l PKR (0,5 mol/l etanolyje, šviežiai paruoštas) ir 46  $\mu$ l  $H_2O_2$  (30 % tirpalas). Polimerizacijos tirpale yra 0,2 mol/l PKR ir 0,3 mol/l  $H_2O_2$ . Polimerizacijos tirpalas paliekamas nustatytam laikui. Daleles naudojant biologinio jutiklio indikatorinio elektrodo ruošimui, susidariusios polimero dalelės atskiriamos nuo polimerizacijos tirpalo centrifuguojant 13300 min/s  $\times$  g, 30 minučių. Tuomet dalelės plaunamos dejonizuotu vandeniu ir vėl centrifuguojamos. Procedūra kartojama 3 kartus.

Fermentinės polimerizacijos tirpalas susidaro iš 735  $\mu$ l A-PBS (tam tikro pH), 600  $\mu$ l PKR (0,5 mol/l etanolyje, šviežiai paruoštas), 150  $\mu$ l gliukozės tirpalo (2 mol/l vandenyje) ir 15  $\mu$ l GOx tirpalas (100 mg/ml ištirpinta A-PBS, pH 6,0, šviežiai paruoštas). Šiuo atveju polimerizacijos tirpale yra 0,2 mol/l PKR, 0,2 mol/l gliukozės ir 1 mg/ml GOx. Polimerizacijos tirpalas paliekamas nustatytam laikui.

Elektrocheminė polimerizacija vykdoma elektrocheminėje celėje, esant trielektrodei sistemai (lyginamasis Ag/AgCl elektrodas, pagalbinis platinos elektrodas ir grafito strypelis kaip indikatorinis elektrodas). Polimerizacijos tirpalas susidaro iš 4 ml A-PBS (pH 6,0) ir 1 ml PKR (0,5 mol/l etanolyje, šviežiai paruoštas). Šiuo atveju polimerizacijos tirpale yra 0,1 mol/l PKR. Polimerizacija atliekama naudojant ciklinės voltamperometrijos metodą. Potencialo skleidimo ribos nustatomos nuo  $-0,4$  iki  $+0,9$ ;  $1,0$ ;  $1,1$ ;  $1,2$ ;  $1,3$ ;  $1,4$  arba  $1,5$  V. Polimerizacijos trukmė 5, 10 arba 15 ciklų, o greitis keičiamas nuo 50 iki 150 mV/s. Šie parametrai keičiami tam, kad būtų nustatytos sąlygos, kuriomis gautas jutiklis pasižymėtų geriausiomis analizinėmis savybėmis. Sintezės metu ant grafito elektrodo susidaro PPKR sluoksnis. Elektrocheminės polimerizacijos metu į polimero

sluoksnį buvo įterptos AuND. Tokiu atveju polimerizacijos tirpale papildomai yra 0,1; 0,15 arba 0,2 nmol/l AuND tirpalo.

## 2.2. Poli(pirrol-2-karboksirūgšties) dalelių tyrimai

PPKR dalelių susidarymas stebimas registruojant UV-Vis absorbcijos spektrą 300 – 800 nm bango ilgių srityje spektrofotometru Perkin-Elmer LAMBDA 25 (Perkin Elmer Inc, USA). Optinio kelio ilgis 1 cm. Sugerties spektrai registruojami iš karto po polimerizacijos tirpalų paruošimo ir po tam tikro laiko intervalo.

PPKR dalelių morfologija nagrinėjama skenuojančiu elektroniniu mikroskopu FE-SEM SU-70 (Hitachi, Japonija), esant 2000 arba 5000 V įtampai ir 20 000 – 100 000 didinimui. Polimerizacijos tirpalas sumaišomas ir po 3  $\mu$ l tirpalo užlašinama ant lygios silicio plokštelės (CrysTech Kristalltechnologie, Germany). Mėginys džiovinamas kambario temperatūroje, o plokštelė su adsorbuotu mėginu kruopščiai nuplaunama du kartus dejonizuotu vandeniu. Nuplovus ant silicio plokštelės išsikristalinusias mėginio druskas ir blogai adsorbuotas PPKR daleles, mėginys išdžiovinamas ir analizuojamas.

Atliekama PPKR dalelių analizė Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos (FTIR) metodu. FTIR spektras 500 – 3650  $\text{cm}^{-1}$  bangos skaičių intervale registruojamas Perkin Elmer BX FTIR spektrometru (Perkin Elmer Inc, USA). Mėginiai analizei ruošiami: PPKR dalelės centrifuguojamos, centrifugatas nupilamas, o dalelės užpilamos dejonizuotu vandeniu, išmaišoma ir vėl centrifuguojama, plovimas dar kartą pakartojamas. Atskirtos nuo polimerizacijos tirpalo PPKR dalelės liofilizuojamos liofilizatoriuje Christ Alpha 2-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Vokietija). Gauti PPKR milteliai naudojami FTIR analizėje. Spektras registruojamas paruošus PPKR-KBr tabletes (masės santykis 1:10).

Potenciometrinis titravimas atliekamas PPKR daleles  $\text{NaHCO}_3$  tirpale titruojant HCl, stebint tirpalo pH. 100 mg liofilizuotų PPKR miltelių užpilama 10 ml 50 mmol/l  $\text{NaHCO}_3$  ir pamaišoma 30 min. Tuomet titruojama su 50 mmol/l HCl tirpalu. Tirpalo pH registruojamas Mettler Toledo SevenEasy pH matuokliu. Kontrolinis titravimas atliekamas 10 ml 50 mmol/l  $\text{NaHCO}_3$  titruojant tuo pačiu 50 mmol/l HCl tirpalu.

### 2.3. Poli(pirrol-2-karboksirūgšties) modifikavimas gliukozės oksidaze

PPKR dalelių ar elektrochemiškai susintetintų PPKR (PPKR<sub>EL</sub>) sluoksnių modifikavimo GOx procesas atliekamas tuo pačiu metodu. Karboksilo grupės esančios polimero paviršiuje aktyvuojamos EDC ir NHS tirpalų mišiniu (tūrio santykis 1:1, koncentracijos atitinkamai 0,4 mol/l ir 0,1 mol/l). Aktyvacijos metu EDC reaguoja su karboksilo grupe ir susidaro aktyvus tarpinis junginys. O šis jungiasi su NHS ir gaunamas esteris, kuris reaguoja su fermento pirmine amino grupe. Praėjus aktyvacijos laikui polimeras su aktyvuotomis karboksilo grupėmis sumaišomas su GOx tirpalu. Modifikuojant polimero daleles buvo naudojamas 10 mg/ml GOx ištirpinta A-PBS buferiniame tirpale, kurio pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 arba 6,0. O modifikuojant polimero sluoksnį – 40 mg/ml GOx ištirpinta A-PBS buferiniame tirpale, kurio pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 arba 8,0.

Atlikus aktyvaciją ir prijungus GOx gaunamos fermentu modifikuotos chemiškai susintetintos polimero dalelės (PPKR<sub>CH</sub>-GOx) ir fermentu modifikuotas elektrochemiškai susintetintas polimero sluoksnis (PPKR<sub>EL</sub>-GOx). PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitas po modifikavimo centrifuguojamas ir plaunamas A-PBS pH 6,0 tris kartus. Taip atskiriamas visas neprijungęs fermentas. Galiausiai PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitas užpilamos 250 µl A-PBS pH 6,0 su 5 mg/ml jaučio serumo albuminu (JSA). Šis homogeniškas mišinys toliau naudojamas indikatorinio elektrodo paruošimui.

### 2.4. Aukso nanodalelių sintezė

AuND sintezė atliekama pagal standartinį metodą. Tam pagaminami du tirpalai. Pirmasis tirpalas: 40,5 ml 0,01 % vandenilio tetrachloraurato trihidrato. Antrasis tirpalas gaunamas sumaišius 2 ml 1 % trinatrio citrato, 8 ml H<sub>2</sub>O ir 0,0125 ml 1 % tanino rūgšties. Abu tirpalai pašildomi iki 60 °C ir sumaišomi. Šį mišinį pastoviai maišant, temperatūra pakeliamą iki 98 °C ir palaikoma šioje temperatūroje 3 minutes. Tuomet leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros. Gautas koloidinis AuND tirpalas laikomas tamsaus stiklo butelyje 4 °C temperatūroje. AuND tirpalo absorbcija matuojama spektrofotometru tam, kad būtų įvertintas susidariusių AuND dydis. Pagal sintezei naudotą tanino rūgšties kiekį, susidariusios dalelės turi būti 13 nm

dydžio, o jų tirpalo absorbcijos juostos maksimumas ties 520 nm bangos ilgiu. Susintetinus ir patikrinus AuND tirpalą, šis toliau naudojamas biologinio jutiklio gaminyje.

## 2.5. Indikatorinio elektrodo paruošimas

Biologinio jutiklio konstravime svarbus indikatorinio elektrodo paruošimas. Naudojamas grafito elektrodas (GR) yra 3 mm skersmens grafito strypelis. Šis iš pradžių šlifuojamas šiurkščiu švitrinu popieriumi, po to švelnesniu, kol galiausiai metalinis blizgesys pasiekiamas šlifavimui naudojant popierių. Nušlifuotas elektrodas kruopščiai nuplaunamas dejonizuotu vandeniu ir išdžiovinamas. Grafito strypelio šoninis paviršius izoliuojamas silikoniniu vamzdeliu. Taip gaunamas 0,71 cm<sup>2</sup> darbinis paviršius. Paruoštą GR galima toliau modifikuoti reikiamomis medžiagomis.

Elektrodas, modifikuotas PPKR<sub>CH</sub>-GOx, ruošiamas ant GR darbinio paviršiaus užlašinant tam tikrą kiekį PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos. Vieno sluoksnio padengimui pasirenkamas 3 µl suspensijos tūris. Užlašinus vieną sluoksnį, elektrodo paviršiui leidžiama nudžiūti kambario temperatūroje. Tuomet elektrodas palaikomas uždareme indelyje virš 25 % GA tirpalo 10 minučių. Norint padengti elektrodą daugiau sluoksnių – procedūra yra pakartojama. Galiausiai pagamintas GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx jutiklis nuplaunamas, tam kad pasišalintų nesusijungęs PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitas ir JSA. Paruoštas GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx indikatorinis elektrodas, kai yra nenaudojamas, laikomas uždareme indelyje, 4 °C virš A-PBS pH 6,0 tirpalo. Tai apsaugo fermentą – neprarandamas šio aktyvumas. Toliau tiriamos sukonstruoto jutiklio analizinės charakteristikos.

Elektrodas, kurį norima modifikuoti poli(1,10-fenantrolin-5,6-diono) (PPD), PPKR<sub>EL</sub> ir kovalentiškai prijungtos GOx (GR/PPD/PPKR<sub>EL</sub>-GOx) sluoksniu ruošiamas iš pradžių ant nušlifuoto GR užlašinant 3 µl PD (9,52 mmol/l etanolyje). Ant elektrodo paviršiaus gaunamas 8,45 µg/cm<sup>2</sup> PD kiekis. Elektrodo paviršiui nudžiūvus, šis merkiamas į polimerizacijos tirpalą turintį 0,1 mol/l PKR ir atliekama elektrocheminė polimerizacija. Polimerizacijos metu susidaro poli(1,10-fenantrolin-5,6-diono) ir PPKR<sub>EL</sub> sluoksniai. Gaunamas GR/PPD/PPKR<sub>EL</sub> elektrodas, kuris toliau kovalentiškai modifikuojamas GOx, kaip aprašyta ankstesniame 2.3. skyriuje ir tokiu būdu praruošiamas GR/PPD/PPKR<sub>EL</sub>-GOx indikatorinis elektrodas. Elektrodas, kurį norima modifikuoti PPD, PPKR<sub>EL</sub> su įterptomis

AuND ir kovalentiškai prijungta GOx (GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx) ruošiamas analogiškai kaip ir GR/PPD/PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodas, tik polimerizacijos metu į polimerizacijos tirpalą papildomai įpilama AuND tirpalo. Paruošti GR/PPD/PPKR<sub>EL</sub>-GOx ir GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodai nenaudojant laikomi uždarame indelyje, 4 °C virš A-PBS pH 6,0 tirpalo.

## 2.6. Biologinio jutiklio analizinių charakteristikų tyrimas

Jutiklio analizinės charakteristikos nustatomos amperometrinių matavimų metu. Jie atliekami kompiuterizuotu potenciostatu-galvanostatu PGSTAT 30 su GPES 4.9 programine įranga. Matavimai atliekami elektrodus patalpinus į elektrocheminę celę, kuri patalpinta į Faradėjaus narvą. Naudojama trijų elektrodų sistema. Modifikuotas GR naudojamas indikatoriniu elektrodu, 2 cm<sup>2</sup> paviršiaus ploto platinos elektrodas – pagalbinis ir sidabro/sidabro chlorido su 3 mol/l KCl (Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup>) – lyginamuoju. Amperometriniu matavimo metu registruojamas srovės stiprio kitimas laike. Soties srovė tiesiogiai proporcinga substrato, kurį oksiduoja fermentas koncentracijai:

$$I = \frac{nFDc}{d} \quad (6)$$

kur: I – soties srovės stipris, n – elektronų skaičius, F – Faradėjaus skaičius, D – difuzijos koeficientas, c – koncentracija, d – difuzinio sluoksnio storis.

Amperometriniu matavimo metu celė užpildoma 5 ml tam tikro pH A-PBS su 0,1 mol/l KCl (A-PBS-KCl). Tuo atveju, kai tiriamas GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodas, į celę papildomai įpilamas FMS (koncentracija celėje 10 mmol/l). Amperometriniai matavimai atliekami esant +300 arba +200 mV potencialui pagal Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup> elektrodą. Elektrocheminėje celėje esantis tirpalas maišomas 300 aps./min greičiu. Pradėjus matavimą palaukiama kol nusistovės bazinė linija, tuomet į celę įpilamas tam tikras gliukozės kiekis ir palaukiama srovės signalo nusistovėjimo (soties srovė). Taip gaunamas analizinis signalas proporcingas analitės koncentracijai. Šie duomenys leidžia matyti jutikliui charakteringą tiesinį diapazoną, dinaminį diapazoną, aptikimo bei nustatymo ribas. Taip pat iš amperometrinių matavimų metu gautų duomenų nustatomas jutiklių analizinio signalo pakartojamumas ir atkuriamumas. Pakartojamumo tyrimo

metu optimaliomis sąlygomis paruoštas vienas elektrodas matuojamas penkis kartus tą pačią dieną. Apskaičiuojamas santykinis standartinis nuokrypis (SSN), esant 5 mmol/l gliukozės koncentracijai. Nustatant jutiklių atkuriamumą, tomis pačiomis sąlygomis gaminami penki elektrodai. Pamatavus kiekvieną iš jų, taip pat įvertinamas SSN.

Dar viena svarbi jutiklio charakteristika, stabilumas, nustatomas matuojant jutiklio signalą tam tikrą laiko tarpą. Šiuo atveju jutikliai buvo stebimi tam tikrą laiko tarpą – matuojamas atsakas į tam tikrą gliukozės koncentraciją. Nenaudojamas indikatorinis elektrodas laikomas uždareme indelyje virš A-PBS pH 6,0 buferinio tirpalo 4 °C temperatūroje.

Gliukozės jutiklio atrankumas gliukozei patikrinamas įvertinus jutiklio atsaką į kitus angliavandenius (galaktozę, manozę, fruktozę, ksilozę ir sacharozę). Į matavimo ceļę, nusistovėjus signalui, pilama 5 mmol/l kiekvieno iš paminėtų angliavandenių tirpalų, stebimas signalas. Trukdančių medžiagų, kurios gali būti realiame matuojamame mėginyje, t. y. šlapimo rūgštis, acetaminofenas, dopaminas, askorbo rūgštis, įtaką jutiklio signalui įvertinama į elektrocheminę ceļę, nusistovėjus signalui, įpilant tam tikrą šių medžiagų tirpalų kiekį. Šiems tyrimams pasirinktos vidutinės žmogaus kraujyje esančios minėtų medžiagų koncentracijos. Interferuojančių medžiagų tirpalai pilami į ceļę nusistovėjus signalui vienas po kito, registruojamas signalo pokytis.

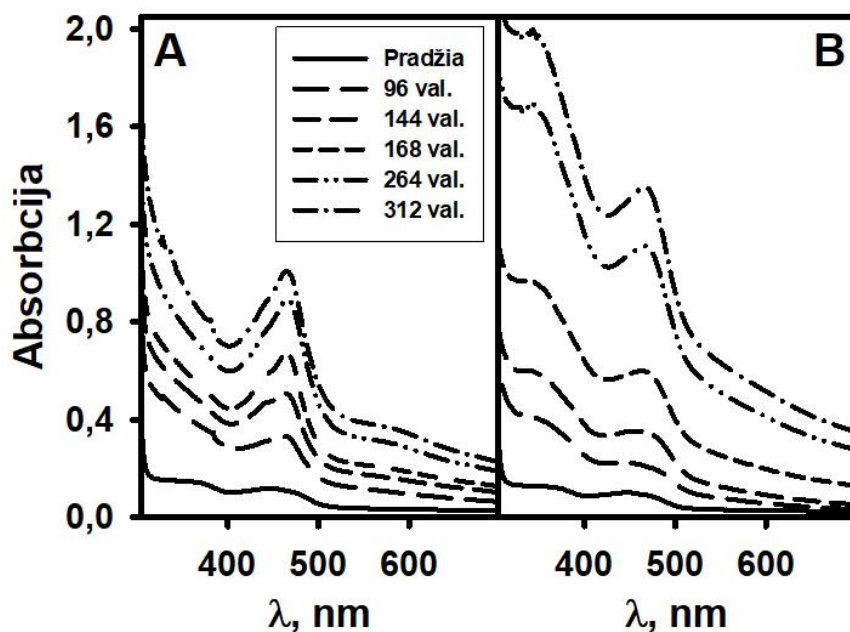
## 2.7. Realių mėginių tyrimai

Sukonstruotų gliukozės jutiklių gebėjimas nustatyti gliukozės kiekį patikrintas analizuojant realius mėginius. Jutiklis GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx pagrindu buvo naudojamas nustatyti gliukozės koncentraciją žmogaus kraujo serume. Tyrimo metu kraujo serumo mėginys praskiedžiamas 10 kartų su A-PBS-KCl buferiniu tirpalu. Naudojamas priedo metodas.

Jutiklis GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx pagrindu iširtas nustatant gliukozės kiekį vaistiniuose preparatuose *Orsalit Drink* ir *Rehydron Optim*, taip pat žmogaus kraujo serume. Nusistovėjus bazinei linijai, į elektrocheminę ceļę, kurioje yra 5 μl A-PBS-KCl (pH 6,0) buferinio tirpalo, įpilama 200 μl preparato *Orsalit Drink*, arba 200 μl preparato *Rehydron Optim*, arba 500 μl kraujo serumo. Gliukozės koncentracija apskaičiuojama iš kalibracinės kreivės. Po matavimų elektrodas yra kruopščiai nuplaunamas dejonizuotu vandeniu. Matavimai kartojami tris kartus.

### 3. POLI(PIROL-2-KARBOKSIRŪGŠTIES) FERMENTINĖ IR CHEMINĖ SINTEZĖS

Šiame skyriuje aprašoma PPKR fermentinė ir cheminė sintezė. Prieš tai, mūsų žiniomis, literatūroje nebuvo aprašyta nei viena iš šių sintezių atliekama vandens/etanolio tirpale. Cheminė sintezė buvo atliekama polimerizacijos tirpale esant monomero PKR ir oksidatoriaus  $H_2O_2$ , kai tuo tarpu fermentinė sintezė buvo vykdoma polimerizacijos tirpale sudarytame iš PKR, GOx ir gliukozės. Pradinės koncentracijos buvo: 200 mmol/l PKR, 200 mmol/l gliukozės ir 1 mg/ml GOx. Dar vienas svarbus komponentas – polimerizacijos tirpale ištirpęs deguonis, kuris veikia kaip reakcijos elektronų akceptorius.



**8 pav.** PPKR oligomerų absorbcijos spektras A-PBS ir etanolio tirpale, kurio pH 3,0 (A) ir 5,0 (B), esant 200 mmol/l PKR, 1 mg/ml GOx ir 200 mmol/l gliukozės.

PPKR susidarymas buvo stebimas registruojant polimerizacijos tirpalo absorbcijos spektrus 300 – 800 nm bangos ilgių srityje. Spektrai registruojami tam tikrais polimerizacijos trukmės intervalais. Absorbcijos

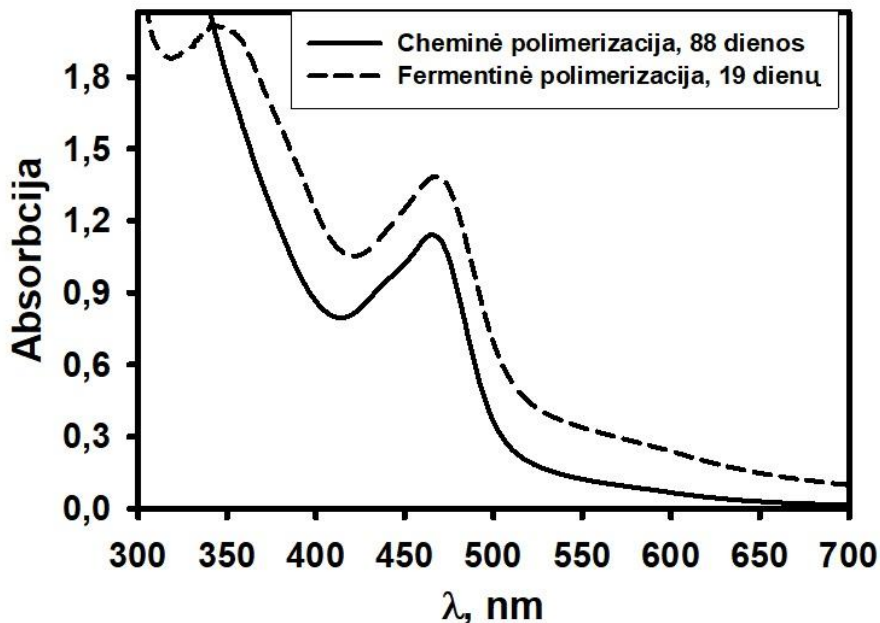


spektrai registruoti vykdant fermentinę PPKR sintezę pavaizduoti 8 paveiksle. 8 paveikslo A dalyje pavaizduoti spektrai polimerizacijos tirpalo, kurio pH 3,0, o B dalyje – pH 5,0. Pradžioje abu tirpalai buvo gelsvos spalvos, o jiems registruotuose absorbcijos spektruose stebimos dvi absorbcijos juostos, kurių maksimumas yra ties 359 ir 445 nm. Fermentinės sintezės metu GOx katalizuoja  $\beta$ -D-gliukozės oksidaciją iki D-gliukono-1,5-laktono, tuo pačiu susidaro oksidatoriaus  $H_2O_2$ , kuris inicijuoja PKR polimerizaciją. Susidaro aktyvūs PKR katijonradikalai. Pradėjus vykti polimerizacijai tirpalas tampa gelsvai rudos spalvos. Polimerizacijos tirpalo spalvos keitimosi greitis, t. y. polimerizacijos greitis priklauso nuo tirpalo pH.

PKR polimerizaciją galima pagrįsti spektre atsirandančia ir didėjančia absorbcijos juosta, kurios maksimumas ties 465 nm, kuri yra būdinga PKR oligomerų pirolo žiedams. Taip pat tikėtina, kad susidaro tirpios PPKR nanodalelės [73-76]. Kaip matoma 8 paveiksle, skirtingo pH polimerizacijos tirpalams registruoti absorbcijos spektrai yra skirtingi. PPKR daleles sintetinant 2,0, 3,0 ar 4,0 pH tirpaluose, spektruose stebima tik viena absorbcijos juosta, kurios maksimumas ties 465 nm. O polimerizaciją vykdant nuo 5,0 iki 9,0 pH tirpaluose, stebimos dvi absorbcijos juostos, kurių maksimumai ties 345 ir 465 nm. Absorbcijos juosta, kurios maksimumas yra ties 345 nm atitinka C=C ryšio  $\pi$ - $\pi^*$  perėjimą. Absorbcijos juosta, kurios maksimumas yra ties 465 nm atitinka bipolarono perėjimą charakteringą oksiduotai PPKR būsenai. Taip pat ši absorbcijos juosta gali būti priskirta didesniai PPKR konjugacijos laipsniui. Absorbcijos juostų padėtis spektre taip pat priklauso nuo tokių veiksnių kaip priešjonai, tirpiklis, polimero struktūra ir morfologija. Tuo atveju, kai polimerizacija vykdoma nuo 5,0 iki 9,0 pH tirpaluose, absorbcijos juostos ties 345 nm intensyvumas yra didesnis nei absorbcijos juostos ties 465 nm. Tai galima paaiškinti tuo, kad šiame pH intervale PPKR yra mažiau oksiduota, negu labiau rūgštinėje terpėje. PPKR polimerizacijos metu registruoti absorbcijos spektrai atitinka anksčiau aprašytus PPy spektrus [77, 78].

Atlikus fermentinę PPKR sintezę, ši buvo palyginta su chemine sinteze. Vykdant cheminę oksidacinę polimerizaciją taip pat tam tikrais polimerizacijos trukmės intervalais buvo registruoti absorbcijos spektrai 300 – 800 nm bangos ilgių srityje. Cheminė polimerizacija atlikta tirpaluose, kurių pH buvo nuo 2,0 iki 9,0. Pradinės polimerizacijos tirpalo koncentracijos: 200 mmol/l PKR ir 300 mmol/l  $H_2O_2$ . Užregistruoti absorbcijos spektrai skirtingo pH polimerizacijos tirpaluose yra labai panašūs. Matoma viena absorbcijos juosta, kurios maksimumas ties 465 nm.

9 paveiksle pateiktas fermentinės ir cheminės PPKR sintezės pH 5,0 polimerizacijos tirpalų absorbcijos spektrų palyginimas.



**9 pav.** PPKR oligomerų ir tirpių PPKR nanodalelių absorbcijos spektrai A-PBS ir etanolio tirpale pH 5,0. Pradinės koncentracijos: 200 mmol/l PPKR ir 300 mmol/l  $H_2O_2$  (vykdant cheminę polimerizaciją) bei 200 mmol/l PPKR, 1 mg/ml GOx ir 200 mmol/l gliukozės (vykdant fermentinę polimerizaciją).

8 ir 9 paveiksluose matoma, kad vykstant polimerizacijai absorbcija didėja visame spektre. Tai stebima dėl šviesos sklaidos polimerizacijos tirpale susidarantiomis PPKR dalelėmis. Šis reiškinys stebimas ir kituose vandeniuose tirpaluose, kuriuose vyksta polimerizacija [79]. Vykstant cheminei polimerizacijai susidaro tirpūs oligomerai, tačiau polimero grandinei ilgėjant polimeras tampa netirpus. Susidaro netirpios dalelės, ant kurių paviršiaus toliau vyksta polimerizacija. Galiausiai dalis susidariusių juodų netirpių PPKR dalelių nusėda polimerizacijos tirpale.

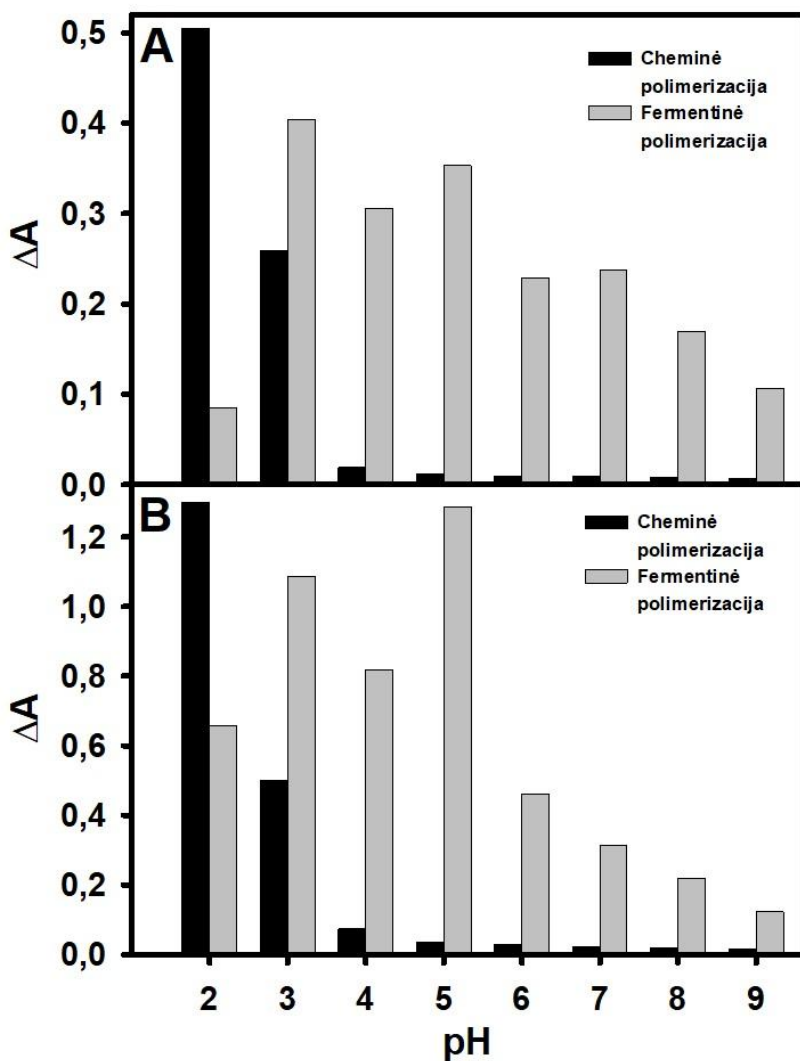
Buvo palyginti fermentinės ir cheminės PPKR sintezių metu susidarantių PPKR dalelių susidarymo greičiai. 10 paveiksle pateikiama PPKR oligomerų ir tirpių PPKR dalelių absorbcijos priklausomybė nuo polimerizacijos tirpalo pH. Susiformavusios PPKR dalelės ne tik absorbuoja

šviesą, bet ir ją sklaido. Norint atmesti šviesos sklaidos įtaką absorbcijos vertei, absorbcija ties 465 nm bangos ilgiu pateikiama kaip skirtumas tarp absorbcijos vertės registruotos ties 465 ir 800 nm ( $\Delta A = A_{\lambda(465)} - A_{\lambda(800)}$ ). PKR oligomerų ir tirpių PPKR dalelių sintetinių cheminės polimerizacijos būdu absorbcija buvo registruojama 88 dienas, o tyrimo rezultatai pateikti 10 paveiksle. Aiškiai matoma, kad cheminei polimerizacijai geriausia terpė yra stipriai rūgštinė. Didžiausia absorbcija stebima esant pH 2,0. Didėjant terpės pH PPKR susidarymo greitis mažėja. Jei terpės pH yra 6,0 ar daugiau, polimeras nebesusidaro. Toks pats rezultatas stebimas ir polimerizuojant polipirolą cheminės polimerizacijos būdu [80, 81]. Be to, tyrimas parodė, kad cheminė polimerizacija yra palyginus lėta: esant pH 2,0 ir 3,0, tamsios polimero dalelių nuosėdos pasirodo tik 7 ir 20 polimerizacijos dieną, o esant pH mažiau rūgštiniam, polimerizacijos tirpalas tampa gelsvai rudas tik po 88 dienų.

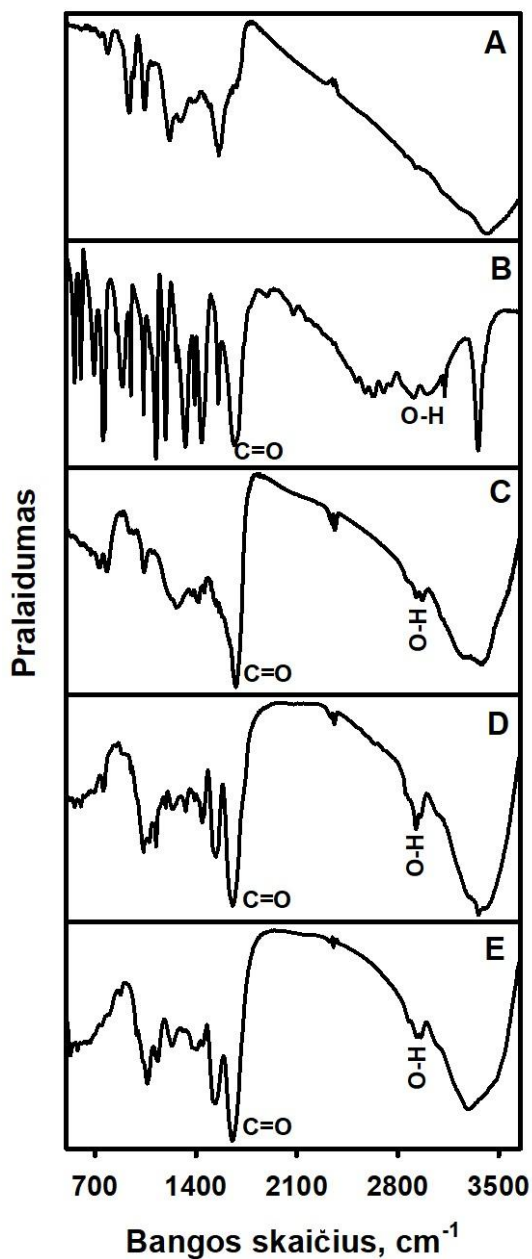
Fermentinės polimerizacijos polimero susidarymas stebimas visoje tirtoje pH srityje. Panašūs rezultatai gauti nagrinėjant pirolo ir anilino GOx katalizuojamas polimerizacijas [82, 83]. Didžiausias PPKR susidarymo greitis pirmų šešių dienų laikotarpyje stebimas esant pH 3,0 (10 pav.). Tačiau polimerizacijos trukmei ilgėjant, didžiausia  $\Delta A$  vertė gaunama esant pH 5,0. Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad nors polimerizacija vyksta greičiau labiau rūgštinėje terpėje, tačiau GOx pasižymi didžiausiu aktyvumu esant pH 5,5, todėl esant panašiam pH, fermentinė reakcija, kuomet  $\beta$ -D-gliukozė yra oksiduojama į D-gliukono-1,5-laktoną ir susidaro  $H_2O_2$ , vyksta greičiausiai. Fermentinė reakcija vyksta ir prie mažiau palankių pH reikšmių. Susidaręs  $H_2O_2$  inicijuoja PKR polimerizacijos reakciją. Polimerizacija prasideda tuomet, kai  $H_2O_2$  oksiduoja monomerą. Susidaro aktyvus katijonradikalas su didžiausiu nesuporuotų elektronų tankiu ties C5 pozicija, kaip pasiūlė Foschini su bendraautoriais [54] Tuomet šie katijonradikalai jungiasi ir susidaro tirpūs dimerai. Polimerizacijai vykstant toliau, polimerinė grandinė ilgėja molekulėms jungiantis per C4 ir C5 pozicijas.

Tyrimas parodė, kad fermentinė polimerizacija vyksta greičiau už cheminę, tačiau juodos polimero dalelės matomos vėliau. Tai galima paaiškinti tuo, kad GOx daro įtaką ir susidarančių polimero dalelių pasiskirstymui tirpale ir koloidiniam stabilumui. Galima teigti, kad PPKR dalelės, kurios dar yra nepasiekusios tam tikro dydžio, yra tolygiai pasiskirsčiusios polimerizacijos tirpale. Panašūs rezultatai gauti tiriant ir kitų KP tirpias vandeniniame tirpale daleles [84, 85]. Tikėtina, kad vykstant fermentinei reakcijai prie GOx paviršiaus lokalus pH sumažėja, nes susidaro gliukono rūgštis, o lokali  $H_2O_2$  koncentracija padidėja. Būtent rūgštinė terpė

ir didelė oksidatoriaus koncentracija ir yra palankios polimerizacijai sąlygos [86].



**10 pav.** PKR oligomerų ir tirpių PPKR nanodalelių absorbcija ties 465 nm bangos ilgiu, esant skirtingiems polimerizacijos tirpalo pH. Pradinės koncentracijos: 200 mmol/l PKR ir 300 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (atliekant cheminę polimerizaciją) ir 200 mmol/l PKR, 1 mg/ml GOx ir 200 mmol/l gliukozės (atliekant fermentinę polimerizaciją). Polimerizacijos trukmė 6 (A) dienos ir 19 (B) dienų.



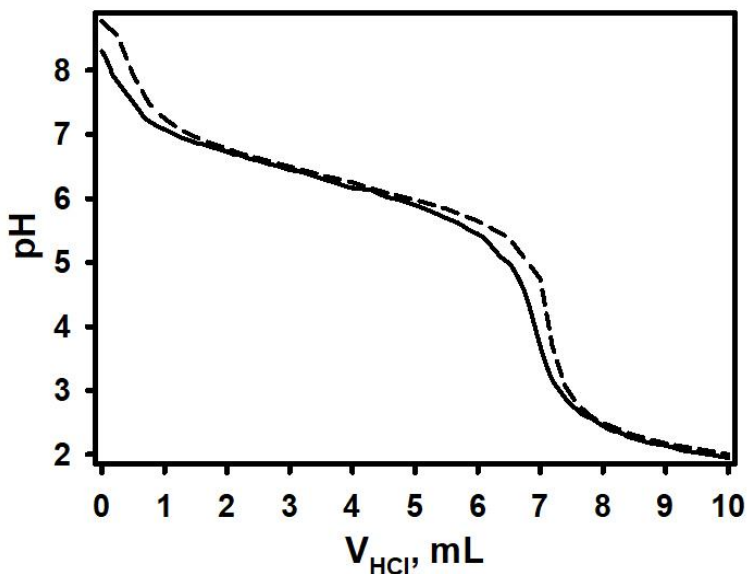
**11 pav.** PPy (A), PKR (B), PPKR dalelių, gautų cheminės polimerizacijos metu, esant pH 2,0 (C), ir fermentinės polimerizacijos metu, esant pH 2,0 (D) ir pH 5,0 (E), FTIR spektrai.

PPKR susidarymas buvo patvirtintas FTIR spektroskopijos metodu. PPKR dalelės buvo atskirtos nuo polimerizacijos tirpalo. 11 paveiksle pateikiami PPKR dalelių susintetintų cheminės polimerizacijos (C), fermentinės polimerizacijos prie pH 2,0 (D) ir fermentinės polimerizacijos prie pH 5,0 (E) FTIR spektrai. Palyginimui 11 paveikslo A dalyje pateiktas cheminės polimerizacijos būdu A-PBS ir etanolio tirpale, esant pH 2,0 (polimerizacijos tirpalas: 200 mmol/l pirolo ir 300 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) susintetinto PPy, o paveikslo B dalyje PKR monomero FTIR spektrai. Visuose spektruose matomų IR absorbcijos juostų padėtys yra panašios į gautas kitų autorių atliktuose PPy susidarymo tyrimuose [87, 88]. PKR (11 B pav.) ir PPKR (11 C-E pav.) FTIR spektruose matomos papildomos IR absorbcijos juostos, kurių nėra PPy spektre, atitinkančios C=O ir O–H grupės, kurios rodo karboksilo grupės buvimą susidariusiame polimere. C=O ir O–H grupių IR absorbcijos juostų maksimumai pateikti 1 lentelėje.

**1 lentelė.** C=O ir O–H grupių IR absorbcijos juostos ir jų maksimumų vertės.

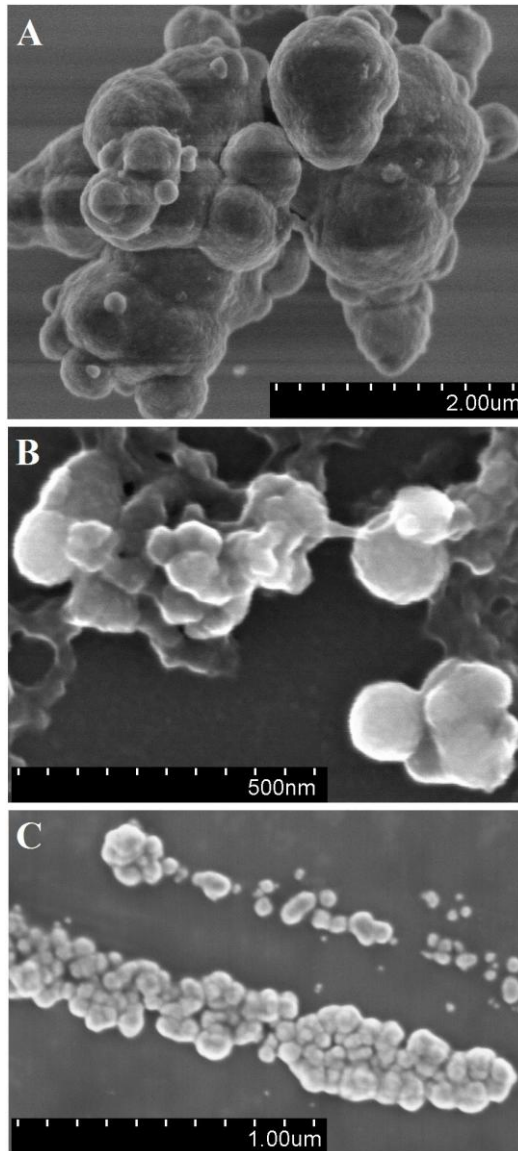
	IR absorbcijos smailės pozicija, bangos skaičius (cm <sup>-1</sup> )			
	PKR	PPKR (cheminė polimerizacija)	PPKR (fermentinė polimerizacija pH 2,0)	PPKR (fermentinė polimerizacija pH 5,0)
C=O	1664	1674	1652	1652
O–H	2912 (plati)	2970	2926	2945

Norint patvirtinti karboksilo grupių buvimą, taip pat buvo atliktas atvirkštinis potenciometrinis titravimas. 100 mg liofilizuotų PPKR dalelių buvo sumaišyta su NaHCO<sub>3</sub> tirpalu. Bazės perteklius titruojamas HCl tirpalu. Titravimo kreivė pateikta 12 paveiksle (ištininė linija). Kontrolinis eksperimentas buvo atliekamas titruojant žinomos koncentracijos NaHCO<sub>3</sub> tirpalą HCl tirpalu (12 pav., punktyrinė linija). Kaip matoma 12 paveiksle, pridėdamas PPKR dalelių tirpalą HCl tirpalo pH atitinkamai mažėja. Pridėjus 6,90 ml (ištininė linija) ir 7,15 ml (punktyrinė linija), tirpalo pH staigiai sumažėja. Sunaudoto HCl tūrio skirtumas šiuose ekvivalentiniuose taškuose įrodo, kad PPKR dalelės turi karboksilo grupę.



**12 pav.** PPKR dalelių, pridėjus 10 ml 50,0 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, tirpalo (ištinė linija) ir kontrolinio 10 ml 50,0 mmol/l NaHCO<sub>3</sub> tirpalo (punktyrinė linija) titravimo 50,0 mmol/l HCl tirpalu kreivės.

PPKR dalelių morfologija buvo charakterizuota skenuojančiu elektroniniu mikroskopu. SEM vaizduose matoma dalelių globulinė struktūra (13 pav.). Nėra matomo didelio skirtumo tarp cheminės ir fermentinės polimerizacijos būdais gautų dalelių morfologijos. PPKR morfologija yra panaši į kitų cheminės polimerizacijos būdu gautų KP morfologiją, kadangi ši polimerizacija vyksta susidarant polimero branduoliui ir šiai dalelei po truputį didėjant, prisijungiant ar adsorbuojant oligomeras [89, 90]. Visuose pavyzdžiuose matoma ganėtinai panaši dalelių forma, kuomet mažesnės dalelės yra agregavusios. Chemiškai susintetintų PPKR dalelių agregatai (13 pav. A dalis) yra kelių mikronų skersmens ir sudaryti iš mažesnių 200–1000 nm skersmens dalelių. Tuo tarpu fermentinės polimerizacijos būdu gautos dalelės (13 pav. B ir C dalys) sudaro mažesnio skersmens globules (50–150 nm). Panašūs PPy dalelių, sintetintų cheminiu ir fermentiniu būdu, morfologijos rezultatai gauti ir kitų autorių darbuose [91, 92].

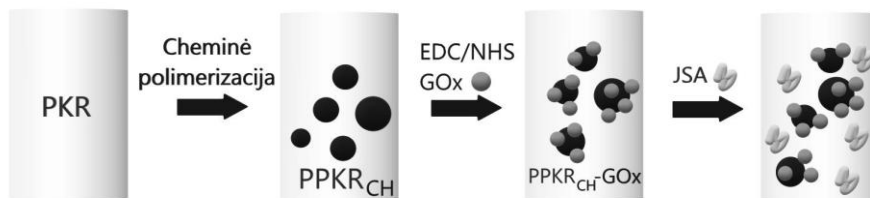


**13 pav.** PPKR dalelių SEM vaizdai. Cheminė polimerizacija prie pH 2,0 (A), fermentinė polimerizacija prie pH 2,0 (B) ir prie pH 5,0 (C). Sąlygos: (A) 10 dienų polimerizacijos trukmė, 20 000 didinimas, 2000 V įtampa, 30 000 nA srovės stipris, (B) 12 dienų polimerizacijos trukmė, 100 000 didinimas, 5000 V įtampa, 28 000 nA srovės stipris, (C) 70 dienų polimerizacijos trukmė, 50 000 didinimas, 2000 V įtampa, 30 000 nA srovės stipris.



#### 4. JUTIKLIS POLI(PIROL-2-KARBOKSIRŪGŠTIES) DALELIŲ IR GLIUKOZĖS OKSIDAZĖS BIOKOMPOZITO PAGRINDU

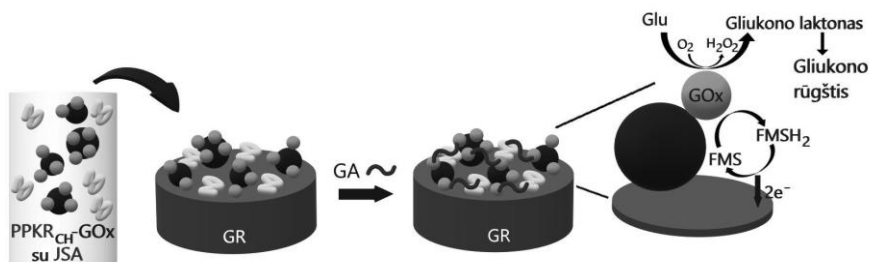
Amperometriniame gliukozės biologiniame jutiklyje buvo pritaikytos chemiškai susintetintos PPKR dalelės. PPKR dalelių paviršiuje kovalentiškai prijungta GOx ir paruoštas PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitas (14 pav.). Jutiklio amperometrinis atsakas gaunamas vykstant imobilizuotos GOx katalizuojamai β-D-gliukozės oksidacijai molekulinio deguonimi iki D-gliukono-δ-laktono, kuris hidrolizuojasi į gliukono rūgštį. Fermentinės reakcijos metu du gliukozės elektronai perduodami GOx kofaktoriui FAD. Tuomet EPT FMS paima šiuos elektronus ir redukuojasi. FMSH<sub>2</sub> atiduodamas elektronus elektrodai reoksiduojasi. Proceso metu gaunamas amperometrinis signalas proporcingas gliukozės koncentracijai.



**14 pav.** Schema vaizduojanti PPKR cheminę polimerizaciją ir PPKR dalelių susidarymą, PPKR dalelių karboksilo grupių aktyvavimą EDC/NHS ir GOx prijungimą prie dalelių ir PPKR<sub>CH</sub>-GOx sumaišymą su JSA tirpalu.

Prieš tiriant GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo analizes charakteristikas, buvo parinktos tokios PPKR dalelių sintezės ir modifikavimo sąlygos, kurios sąlygotų didžiausią jutiklio jautrį. PPKR dalelės buvo gautos cheminės polimerizacijos būdu, naudojant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaip oksidatorių ir polimerizacijos reakcijos iniciatorių. Tuomet dalelės buvo kovalentiškai modifikuotos GOx, naudojant EDC ir NHS mišinį PPKR dalelių karboksilo grupių aktyvavimui. Aktyvavimo metu karboksilo grupės esančios PPKR dalelių paviršiuje paverčiamos labai reaktyviais NHS esteriais, kurie reaguoja su pirminėmis GOx amino grupėmis. Tokiu būdu gaunamas PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitas, kuriuo ruošiant jutiklio indikatorinį elektrodą modifikuojamas paruoštas grafito elektrodas. Taigi, PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito paruošimą galima suskirstyti į dvi stadijas: PPKR dalelių sintezę ir PPKR dalelių

modifikavimas GOx. Šios dvi stadijos buvo ištirtos plačiau tam, kad būtų išrinktos optimalios sąlygos PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito paruošimui.

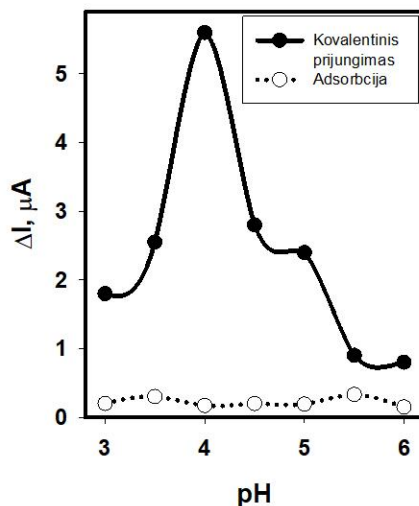


**15 pav.** Schema vaizduojanti elektrodo modifikavimą PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitu, fermento surišimą GA ir jutiklio veikimą.

PPKR dalelių cheminės polimerizacijos trukmė yra svarbus veiksnys, nulemiantis jutiklio savybes. Polimerizacijos metu iš pradžių susidaro oligomerai, iš kurių formuojasi netirpios polimerų grandinės. Taip susidaro nanodalelės, ant kurių paviršiaus tęsiasi polimerizacija. Remiantis ankstesniais tyrimais [80, 93], susidariusios nanodalelės agreguoja tarpusavyje ir sudaro didesnes daleles. Todėl galima teigti, kad ilgėjant polimerizacijos trukmei, didėja ir dalelių dydis ir kiekis. Taigi buvo svarbu nustatyti polimerizacijos trukmę, per kurią susidarytų optimalus dalelių kiekis ir dydis. Polimerizacija buvo atliekama 24, 48, 96 ir 144 valandas. Tačiau po 24 valandų polimerizacijos, buvo gautos per mažos dalelės, kad jas būtų galima atskirti nuo polimerizacijos tirpalo. Todėl šios dalelės nebuvo tyrinėtos plačiau. Atlikus polimerizaciją 48, 96 ir 144 valandas, dalelės buvo sėkmingai atskirtos nuo polimerizacijos tirpalo ir modifikuotos GOx. Gautas PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitas užpiltas 250  $\mu$ l A-PBS buferiniu tirpalu su 5 mg/ml JSA. Tuomet ant elektrodo buvo užlašinama 3  $\mu$ l šios suspensijos (15 pav.).

Svarbi PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito paruošimo stadija yra GOx imobilizavimas ant polimero dalelių. Atskirtos nuo polimerizacijos tirpalo PPKR dalelės yra užpilamos NHS ir EDC tirpalų mišiniu. Taip aktyvuojamos karboksilo grupės, esančios polimero dalelių paviršiuje. Tuomet ant aktyvuotų polimero dalelių užpilamas GOx tirpalas. Šios stadijos metu buvo ištirta, ar tirpalo pH turi įtakos fermento prisijungimui. Dalelės buvo polimerizuotos, atskirtos nuo polimerizacijos tirpalo, modifikuotos ir užpiltos A-PBS buferiniu tirpalu su 5 mg/ml JSA kaip aprašyta anksčiau. Elektrodas paruoštas jį modifikuojant 3  $\mu$ l paruoštos PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos ir tirtas tomis pačiomis sąlygomis. Tyrimas

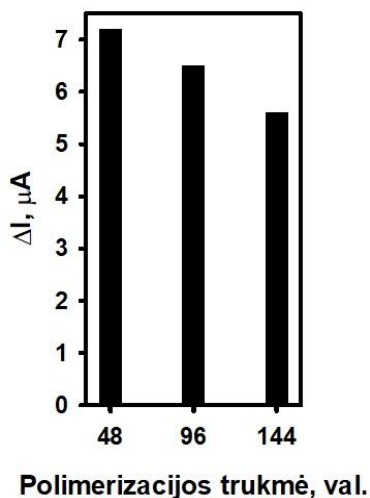
atliekamas nusistovėjus bazinei linijai, stebimas elektrodo atsakas į 20 mmol/l gliukozės. Kaip matoma 16 paveiksle elektrodo atsakas labai priklauso nuo terpės pH, kuriai esant buvo modifikuotos polimero dalelės fermentu. Didžiausias signalas gaunamas tuomet, kai GOx yra ištirpinta pH 4,0 tirpale. Tirpalo pH mažėjant arba didėjant, signalas pastebimai sumažėja. Tai galima paaiškinti tuo, kad PPKR  $pK_a$  reikšmė lygi 3,6 [94], o natyvios GOx izoelektrinis taškas yra 4,2 [95]. Taigi galima teigti, kad esant didesniam pH tam tikras kiekis neaktyvuotų PPKR dalelių karboksilo grupių yra deprotonizuotoje formoje. Dėl to PPKR dalelės turi neigiamai įkrautų grupių. Tuo tarpu pH esant mažesniai nei 4,2 GOx yra įkrauta teigiamai. Galima manyti, kad prie pH 4,0 susidaro elektrostatinė sąveika tarp neigiamai įkrautų likusių karboksilo grupių ir teigiamai įkrauto fermento. Prie didesnių pH verčių neaktyvuotos karboksilo grupės ir GOx yra įkrautos neigiamai, todėl fermentas nuo dalelių paviršiaus yra atstumiamas. Dėl šios priežasties prisijungusio fermento kiekis esant tirpalo pH 4,0 yra žymiai didesnis nei prie mažesnių ar didesnių pH verčių. Remiantis šiais rezultatais, buvo nuspręsta PPKR daleles modifikuoti GOx A-PBS tirpale, kurio pH yra 4,0.



**16 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo amperometrinio signalo priklausomybė nuo naudojamo PPKR dalelių modifikavimui GOx tirpalo pH, esant kovalentiniam prijungimui arba adsorbcijai. Sąlygos: 144 val. PPKR polimerizacijos trukmė, 3 μl PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos. Matavimo sąlygos: +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 6,0, 20,0 mmol/l gliukozės, 10,0 mmol/l FMS.

Norint įrodyti, kad PPKR dalelių modifikavimas GOx vyksta prijungiant fermentą prie dalelių karboksilo grupių, buvo atliktas kontrolinis eksperimentas. Šio bandymo metu buvo atliktos visos tos pačios procedūros, išskyrus tai, kad nebuvo naudojamos karboksilo grupes aktyvuojančios medžiagos NHS ir EDC. Rezultatai parodė, kad elektrodų modifikuotų tokiomis dalelėmis atsakas į gliukozę yra labai mažas (16 pav.) lyginant su elektrodu, kuris padengtas PPKR dalelėmis su kovalentiškai prijungta GOx. Taigi galima teigti, kad nenaudojant aktyvacijos medžiagų, PPKR dalelių paviršiuje adsorbuojasi labai mažas fermento kiekis.

17 paveiksle parodytas elektrodų amperometrinio signalas į 20 mmol/l gliukozės koncentraciją. Matuojama trielektrodinėje celėje, A-PBS-KCl buferiniame tirpale pH 6,0 kartu su 10 mmol/l FMS. 17 paveiksle matoma, kad didėjant polimerizacijos trukmei, amperometrinis jutiklio atsakas mažėja. Tai galima paaiškinti tuo, kad pailgėjus polimerizacijos trukmei, padidėja dalelių dydis. GOx prijungiama tik prie su karboksilo grupių esančių PPKR dalelių paviršiuje. Todėl padidėjus PPKR dalelių dydžiui, prisijungusios GOx kiekis sumažėja. Pagal šiuos duomenis, buvo nuspręsta PPKR polimerizaciją atlikti 48 valandas.



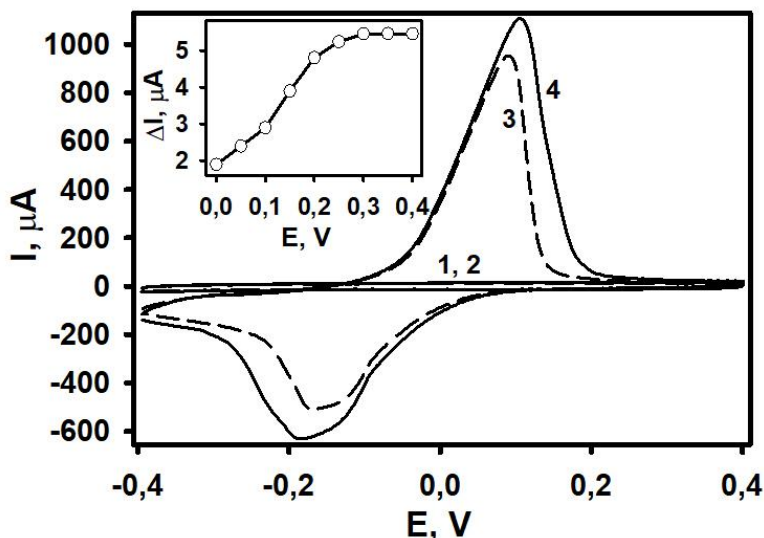
**17 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo amperometrinio signalo priklausomybė nuo PPKR dalelių polimerizacijos trukmės. Sąlygos: 3 μl PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos. Matavimo sąlygos: +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 6,0, 20,0 mmol/l gliukozės, 10,0 mmol/l FMS.

Kaip buvo paminėta aukščiau, PPKR dalelės modifikuotos GOx užpilamos A-PBS buferiniu tirpalu, kuriame yra ištirpintas JSA. Šis baltymas yra dažnai naudojamas biologinių jutiklių konstravime, nes yra netoksiškas, nėra imunogeniškas ir yra biologiškai suderinamas. Literatūroje pateikiama daug pavyzdžių, kuomet fermento surišimas kryžminiais ryšiais su JSA pagerina fermento aktyvumą ir stabilumą [96-99]. Nusprendus naudoti JSA buvo svarbu ištirti koks baltymo kiekis būtų optimalus. PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitas buvo užpilamas 250 μl A-PBS (pH 6,0) su 1,0; 2,5 arba 5,0 mg/ml JSA. Tuomet 3 μl šios suspensijos užlašinama ant paruošto GR elektrodo. Pagaminti GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodai tiriami kaip įprasta. Gauti rezultatai parodė, kad didžiausias signalas gliukozei gaunamas kuomet naudojama 2,5 mg/ml JSA. Tačiau pakartojus eksperimentą po trijų dienų tam, kad ištirti stabilumą, šis elektrodas išlaikė tik 79 % pirminio signalo dydžio. Tuo tarpu elektrodo su 5 mg/ml JSA tirpalu signalas nepakito. Remiantis šiais rezultatais tolimesniems eksperimentams buvo nuspręsta naudoti 5 mg/ml JSA tirpalą PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos paruošimui.

GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo charakterizavimas atliktas registruojant ciklines voltamperogramas. 18 paveiksle pateikiama ciklinė voltamperograma užregistruota gryname A-PBS-KCl buferiniame tirpale (18 paveikslas, 1 kreivė) ir A-PBS-KCl buferiniame tirpale su 5,0 mmol/l gliukozės (18 paveikslas, 2 kreivė), su 10,0 mmol/l FMS (18 paveikslas, 3 kreivė) arba su 5,0 mmol/l gliukozės ir 10,0 mmol/l FMS (18 paveikslas, 4 kreivė). Kaip matoma, oksidacijos-redukcijos smailių nėra, kuomet voltamperogramos registruojamos gryname A-PBS-KCl pH 6,0 buferiniame tirpale arba A-PBS-KCl pH 6,0 buferiniame tirpale su 5,0 mmol/l gliukozės. Kai voltamperograma registruojama A-PBS-KCl pH 6,0 buferiniame tirpale su FMS, gaunamos aiškiai matomos srovės smailės. FMS oksidacija vyksta ties +91,3 mV vs Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup>, redukcija ties -165,8 mV vs Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup>. Anodinės ir katodinės smailių potencialų skirtumas yra 257,1 mV. Kuomet tirpale yra ir FMS, ir gliukozės, matomas aiškus FMSH<sub>2</sub>/FMS redukcijos-oksidacijos smailių intensyvumo padidėjimas. Šie rezultatai parodo, kad elektronai perduodami nuo FAD elektrodo paviršiui per FMS.

18 paveiksle matoma, kad FMS oksidacijos smailė, esant tirpale gliukozės yra ties +104,7 mV (18 paveikslas, 4 kreivė). Tačiau registruojant GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo amperometrinių signalą prie pastovaus potencialo nuo 0 iki +400 mV vs Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup>, gauti rezultatai parodė, kad didžiausias amperometrinių signalo pokytis (ΔI) registruojamas prie +300 mV vs Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup>, esant 5 mmol/l gliukozės. Todėl norint gauti

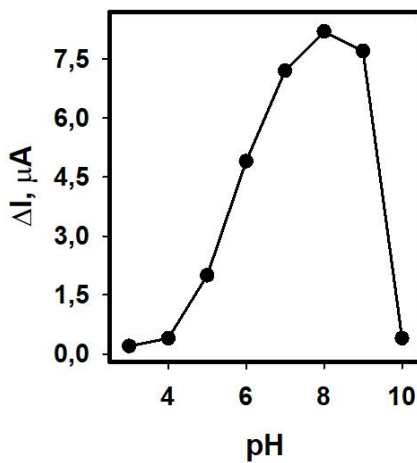
didžiausią amperometrinio signalo pokytį, buvo pasirinkta amperometriniais matavimams būtent ši potencialo vertė.



**18 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo ciklinės voltamperogramos, užregistruotos gryname A-PBS-KCl pH 6,0 (1 kreivė) ir A-PBS-KCl pH 6,0 su 5,0 mmol/l gliukozės (2 kreivė), su 10,0 mmol/l FMS (3 kreivė) arba su 5,0 mmol/l gliukozės ir 10,0 mmol/l FMS (4 kreivė). Intarpas vaizduoja stovės stiprio pokyčio priklausomybę nuo GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo suteikto potencialo A-PBS-KCl tirpale pH 6,0 esant 5,0 mmol/l gliukozės ir 10,0 mmol/l FMS. Elektrodo paruošimo sąlygos: PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val., 6  $\mu\text{l}$  PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos.

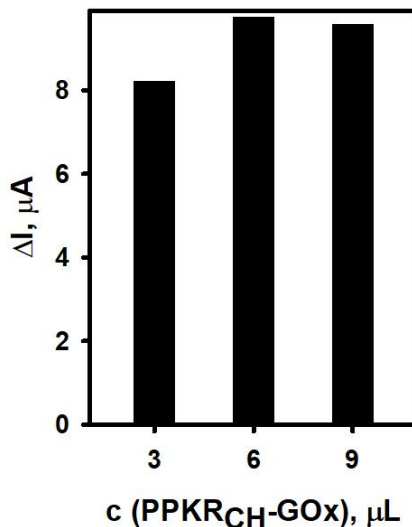
Kadangi tiriamo tirpalo pH gali daryti stiprią įtaką imobilizuoto fermento biokataliziniam aktyvumui ir EPT elektrocheminėms savybėms, buvo iširta pH įtaka GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo signalo dydžiui. Optimali terpės pH vertė tam tikram elektrodo gali kisti nuo naudoto metodo fermento imobilizavimui [100]. Todėl mėginio pH daro įtaką biologinio jutiklio veikimui, t. y. jautriai analizei. Norint įvertinti šią įtaką ir nustatyti optimalų pH jutiklio veikimui, GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodas buvo matuojamas A-PBS-KCl buferiniuose tirpaluose, kurių pH kito nuo 3,0 iki 10,0. Elektrodo atsakas buvo registruojamas esant po 10,0 mmol/l gliukozės ir FMS. Kaip matyti iš 19 paveikslo, didžiausias signalas gaunamas kuomet tirpalo pH yra 8,0. Kuomet A-PBS-KCl buferinio tirpalo pH buvo stipriai

rūgštinis arba bazinis, GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo signalas buvo beveik neaptinkamas. Esant pH 3,0 arba 10,0 registruojama atitinkamai tik 1,8 % ir 6,2 % maksimalaus signalo. Ankstesni tyrimai parodė, kad optimali terpės pH reikšmė yra 5,5 [101, 102] neimobilizuotai GOx ir 6,0 [103], kai GOx yra imobilizuota ant GR elektrodo ir naudojamas EPT FMS. Taigi atsižvelgiant į gautus rezultatus ir ankstesnių tyrimų duomenis, galima teigti, kad GOx imobilizavus PPKR dalelių paviršiuje, tiriamo mėginio pH vertės maksimumas pasislenka į bazinę pusę. Tokie patys rezultatai buvo gauti tiriant biologinius jutiklius, kuriuose pritaikyta GOx ir poli(1-karboksietil)pirolas [104] arba poli(1-karboksietil)pirolo/pirolo nanovielos [105]. Panašūs rezultatai gauti ir prie elektrochemiškai susintetintos PPKR kovalentiškai prijungus polifenoloksidazę [54]. Optimalios pH vertės pasislinkimas paaiškintinas tuo, kad ant polimero likusios laisvos karboksilo grupės sumažina rūgštingumą aplink GOx molekulę. Tuo tarpu Reiter su bendraautoriais [106] daro prielaidą, kad dėl karboksilo grupių deprotonizacijos atsirandanti neigiamo krūvio lokalizacija ant polimero, lemia polimero pabrinkimą dėl vandens įsiterpimo. Todėl polimero grandinės tampa lankstesnės, pagerėja substrato ir EPT difuzija ir jutiklio signalas padidėja. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, tolimesnius GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx tyrimus buvo nuspręsta atlikti pH 8,0 tirpaluose.



**19 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo amperometrinio signalo priklausomybė nuo A-PBS-KCl buferinio tirpalo pH. Sąlygos: 48 val. PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val., 3 μl PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos. Matavimo sąlygos: +300,0 mV, 10 mmol/l gliukozės, 10,0 mmol/l FMS.

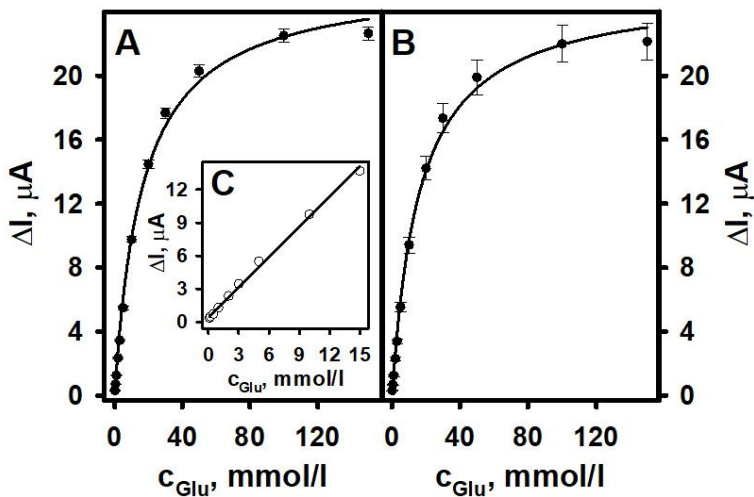
Svarbu nustatyti optimalų PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito kiekį elektrodo paviršiuje. Parenkamas toks kiekis, kurį užlašinus ant elektrodo gaunamas didžiausias GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo atsakas į gliukozę. Tyrimas atliekamas A-PBS-KCl buferiniame tirpale pH 8,0 su 10 mmol/l FMS ir 10 mmol/l gliukozės. Rezultatai pateikiami 20 paveiksle. Ant elektrodo yra užlašinama 3,0, 6,0 arba 9,0  $\mu\text{l}$  paruoštos biokompozito suspensijos. Iš gautų rezultatų galima spręsti, kad didėjant biokompozito kiekiui, jutiklio atsakas didėja, po to mažėja. Didžiausias signalas 9,73  $\mu\text{A}$  užfiksuotas naudojant 6,0  $\mu\text{l}$  biokompozito suspensijos, o šiek tiek mažesnis signalas 9,57  $\mu\text{A}$  – naudojant 9,0  $\mu\text{l}$  suspensijos. Taigi padidėjus ant elektrodo biokompozito kiekiui, padidėja imobilizuotos GOx kiekis, tačiau tuo pačiu metu padidėja ir sluoksnio storis ant elektrodo. Rezultatai rodo, kad padidėjus imobilizuotos GOx kiekiui GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo signalas padidėja, tačiau sluoksnio storis daro įtaką gliukozės, gliukono laktono ir FMS pralaidumui [30]. Todėl ant elektrodo užlašinus daugiau nei 6,0  $\mu\text{l}$  PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos, elektrodo atsakas į gliukozę sumažėja. Pagal gautus rezultatus indikatorinis elektrodas tolimesniuose tyrimuose buvo ruošiamas naudojant 6,0  $\mu\text{l}$  PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos.



**20 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo amperometrinio signalo priklausomybė nuo PPKR-GOx biokompozito kiekio ant elektrodo. Sąlygos: PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val. Matavimo sąlygos: +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 8,0, 10 mmol/l gliukozės, 10,0 mmol/l FMS.



Toliau buvo tiriamos GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodų analizinės charakteristikos. Visų pirma buvo nustatyta elektrodo signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos 0,10 – 150,0 mmol/l intervale. Rezultatai pateikiami 21 paveiksle. Iš duomenų matoma, kad didėjant gliukozės koncentracijai signalas didėja, kol pasiekiamas įsisotinimas, esant koncentracijai didesnei nei 150 mmol/l. Tai rodo, kad fermento aktyvūs centrai yra įsisotinę gliukoze esant šiai koncentracijai. Iš 21 C paveikslo matyti, kad tiesinė analizinio signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos stebima iki 15,0 mmol/l. Tiesės lygtis  $I(\mu A)=0,91 \cdot C_{\text{gliukozės}}+0,42$  ir  $R^2=0,9967$  (N:5). Literatūros duomenimis, suaugusių žmonių normali gliukozės koncentracija yra 3,3 – 5,5 mmol/l kapiliariniame kraujyje, 4,1 – 5,9 mmol/l veniniame kraujyje ir 4,25 – 6,4 mmol/l kraujo serume. Ligonių sergančių cukriniu diabetu gliukozės koncentracija veniniame kraujyje gali pakilti net iki 11,1 mmol/l. Todėl galima teigti, kad gauta 0,1 – 15,0 mmol/l tiesinė priklausomybė yra tinkama matuoti gliukozės kiekį ir sveikų, ir sergančių pacientų kraujyje. Aptikimo riba yra 0,039 mmol/l, kai signalo ir triukšmų santykis lygus 3.

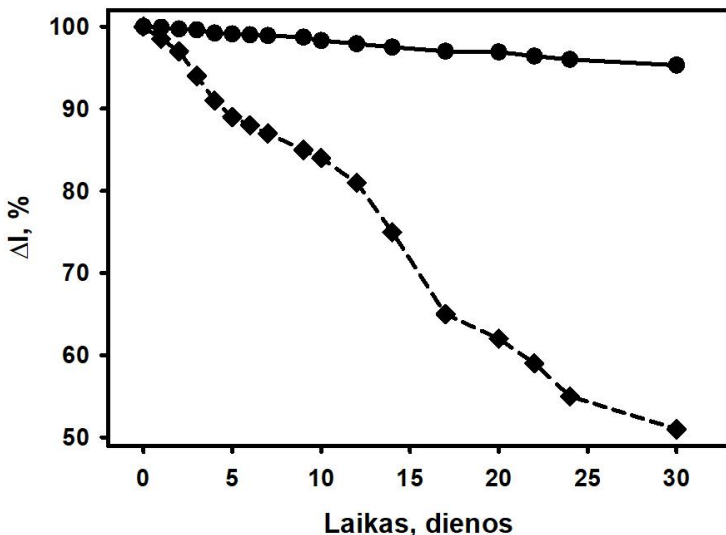


**21 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx amperometrinio signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos: A – vienas elektrodas, B – penki elektrodai, C – GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo kalibracinė kreivė. Sąlygos: PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val., 6,0  $\mu l$  PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos. Matavimų sąlygos: +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 8,0, 10,0 mmol/l FMS.

Svarbi jutiklio charakteristika – signalo pakartojamumas. GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo paruošto nustatytomis optimaliomis sąlygomis pakartojamumas įvertintas matuojant atsaką į gliukozę 0,1 – 150,0 mmol/l koncentracijų intervale penkis kartus. Matavimas atliekamas tą pačią dieną, vienodomis sąlygomis elektrocheminėje celėje, užpildytoje A-PBS-KCl (pH 8,0) buferiniu tirpalu su 10 mmol/l FMS. 21 paveiksle pateikiami pakartojamumo rezultatai. Pateikiamas penkių nepriklausomų matavimų standartinis nuokrypis (SN). SN ir santykinis standartinis nuokrypis (SSN) paskaičiuotas esant 5,0 mmol/l gliukozės koncentracijai atitinkamai yra 0,1 ir 1,8 %. Kita svarbi savybė – atkuriamumas. Šiuo atveju matuojami penki vienodai paruošti GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodai. Kiekvienam elektrodai sudaroma kalibravimo kreivė 0,1 – 150,0 mmol/l gliukozės koncentracijų intervale vienodomis sąlygomis. Rezultatai pateikiami 21 B paveiksle. Esant 5,0 mmol/l gliukozės apskaičiuota SN yra 0,3, o SSN 5,2 %. Šie rezultatai parodo, kad jutiklis pasižymi geru pakartojamumu ir atkuriamumu. Didesnis netikslumas atskirų elektrodų atveju atsiranda dėl šiek tiek skirtingo PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito kiekio ant elektrodo.

Jutiklio stabilumas nustatytas registruojant GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo signalą 30 dienų laikotarpyje. Matavimai atliekami tomis pačiomis sąlygomis: A-PBS-KCl (pH 8,0), 10 mmol/l FMS ir 10 mmol/l gliukozės. Nenaudojamas GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodas laikomas uždarame indelyje virš lašo A-PBS-KCl (pH 8,0) buferinio tirpalo 4 °C temperatūroje. Kaip matoma iš gautų duomenų (22 pav.), GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodas po vieno mėnesio išlaikė 95,3 % pradinio signalo (ištisinė linija). Tai parodo labai gerą jutiklio stabilumą. Palyginimui buvo atliktas analogiškas eksperimentas su GR elektrodu modifikuotu GOx jį adsorbuojant ir chemiškai surišant fermento molekules tarpusavyje GA garais (GR/GOx). Šio elektrodo (brūkšninė linija) signalas po mėnesio sumažėjo perpus. Tą lemia fermento denatūracija bei desorbcijos nuo elektrodo paviršiaus. Žymiai geresnis GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo stabilumas gali būti paaiškintas tuo, kad visų pirma GOx yra kovalentiškai prijungta prie polimero dalelių. Šis ryšys neleidžia fermentui atsiskirti nuo elektrodo paviršiaus atliekant pakartotinius matavimus ir elektrodo plovimus po matavimų. Taip pat kovalentinis prijungimas neleidžia vykti GOx konformaciniams pasikeitimams laikui bėgant, dėl kurių sumažėja fermento aktyvumas [102]. Kita galima gero stabilumo priežastis – JSA naudojimas. Dispergavus PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozitą buferiniame tirpale su JSA, išlaikomas GOx biologinis aktyvumas ir stabilizuojama fermento struktūra [98]. Taip pat galima teigti, kad polimero dalelės sudaro biologiškai suderinamą matricą GOx

imobilizavimui. Atsižvelgiant į tyrimo metu gautus rezultatus, galima teigti, kad jutiklis gali būti naudojamas ilgalaikiams matavimams.

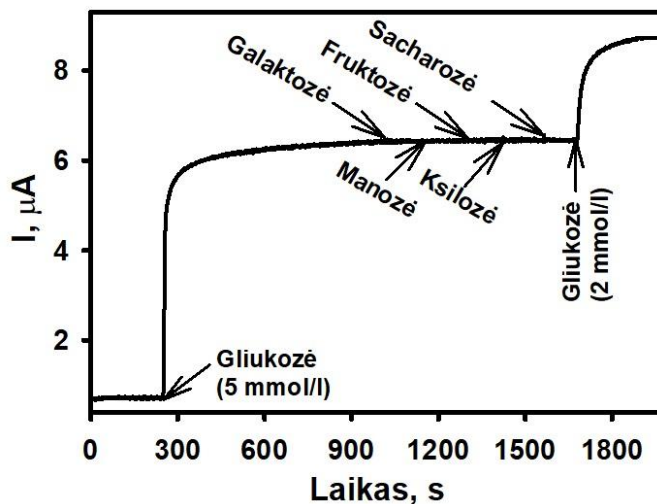


**22 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GO<sub>x</sub> (ištisinė linija) ir GR/GO<sub>x</sub> (punktyrinė linija) elektrodų amperometrinio signalo priklausomybė nuo laiko. GR/PPKR<sub>CH</sub>-GO<sub>x</sub> elektrodo ruošimo ir tyrimo sąlygos: PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val., 6,0 μl PPKR<sub>CH</sub>-GO<sub>x</sub> biokompozito suspensijos, +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 8,0, 10,0 mmol/l gliukozės, 10,0 mmol/l FMS. GR/GO<sub>x</sub> elektrodo ruošimo ir tyrimo sąlygos: 3 μl 40 mg/ml GO<sub>x</sub>, 10 min. virš 25 % GA, +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 6,0, 10,0 mmol/l gliukozės, 10,0 mmol/l FMS.

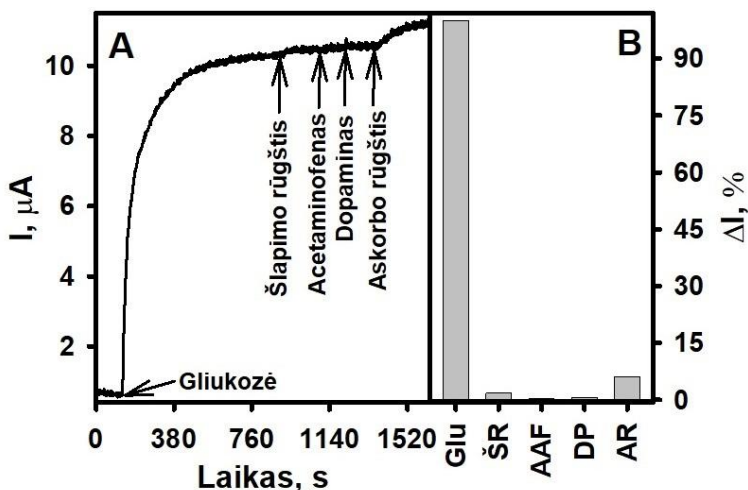
Jutiklio atrankumas gliukozei buvo įvertintas stebint GR/PPKR<sub>CH</sub>-GO<sub>x</sub> elektrodo atsaką į galaktozę, manozę, fruktozę, ksilozę ir sacharozę. Eksperimentas atliktas elektrocheminėje celėje užpildytoje A-PBS-KCl (pH 8,0) ir 10 mmol/l FMS. Kuomet bazinė srovė pasiekė pastovią vertę, į elektrocheminę celę buvo įpilta 5,0 mmol/l gliukozės ir stebimas srovės pokytis. Nusistovėjus signalui, į elektrocheminę celę buvo įpilta 5,0 mmol/l galaktozės, po to tiek pat manozės, fruktozės, ksilozės, sacharozės ir galiausiai 2 mmol/l gliukozės. Rezultatai pateikiami 23 paveiksle. Akivaizdu, kad jutiklis yra atrankus gliukozei.

Svarbus iššūkis gaminant biologinius jutiklius yra pašalinių medžiagų įtakos jutiklio signalui mažinimas ar panaikinimas. Pašalinės medžiagos gali būti šlapimo rūgštis (ŠR), acetaminofenas (AAF), dopaminas

(DP), ir askorbo rūgštis (AR). Šių medžiagų koncentracijos sveiko suaugusio žmogaus kraujyje: 149 – 446  $\mu\text{mol/l}$  ŠR, 70 – 200  $\mu\text{mol/l}$  AAF, <0,13  $\text{nmol/l}$  DP ir 0,040 – 0,14  $\text{mmol/l}$  AR. Tiriant šių medžiagų įtaką jutiklio signalui, buvo naudojami šie kiekiai: 300  $\mu\text{mol/l}$  ŠR, 100  $\mu\text{mol/l}$  AAF, 0,07  $\text{mmol/l}$  DP ir 0,1  $\text{mmol/l}$  AR. Eksperimentas atliktas elektrocheminėje celėje, užpildytoje A-PBS-KCl (pH 8,0) ir 10  $\text{mmol/l}$  FMS. Nusistovėjus signalui, į elektrocheminę celę buvo paeiliui įpilta 10,0  $\text{mmol/l}$  gliukozės (Glu) ir tam tikri kiekiai ŠR, AAF, DP, AR. 24 paveiksle pateikiamuose rezultatuose matoma, kad ŠR signalą padidina 1,75 %, AAF – 0,21 %, DP – 0,52 % ir AR – 6,19 % lyginant su analiziniu signalu gautu 10  $\text{mmol/l}$  gliukozės. Gauta pašalinių medžiagų įtaka yra pakankamai maža. Tai gali lemti ir polimero deprotonizuotos karboksilo grupės, kurios turi neigiamą krūvį. Kadangi GOx dėl didelių matmenų buvo imobilizuota tik PPKR dalelių paviršiuje, kitos karboksilo grupės lieka laisvos. Esant A-PBS buferinio tirpalo pH 8,0, karboksilo grupės yra deprotonizuotos, susidaręs neigiamas krūvis elektrostatiškai galimai atstumia kai kurias pašalines medžiagas. Gauti rezultatai dera su kitų tyrimų rezultatais, kuomet gliukozės jutikliai taip pat pasižymi geru atsparumu pašalinėms medžiagoms [55, 105].



**23 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo atsakas į gliukozę, galaktozę, manozę, fruktozę, ksilozę ir sacharozę. Sąlygos: PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val., 6,0  $\mu\text{l}$  PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos, +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 8,0, 10,0  $\text{mmol/l}$  FMS, 5 ir 2  $\text{mmol/l}$  gliukozės, kitų cukrų koncentracijos 5  $\text{mmol/l}$ .



**24 pav.** GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo atsakas į gliukozę, šlapimo rūgštį, acetaminofeną, dopaminą ir askorbo rūgštį. Sąlygos: PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val., 6,0 μl PPKR<sub>CH</sub>-GOx biokompozito suspensijos, +300,0 mV, A-PBS-KCl pH 8,0, 10,0 mmol/l FMS, 10 mmol/l Glu, 0,30 mmol/l ŠR, 0,10 mmol/l AAF, 0,07 mmol/l DP ir 0,10 mmol/l AR.

Galiausiai GR/PPKR<sub>CH</sub>-GOx elektrodo veikimas buvo išbandytas praktiškai. Žmogaus kraujo serumo mėginys buvo praskiestas 10 kartų A-PBS-KCl pH 8,0 buferiniu tirpalu. Gliukozės koncentracija buvo nustatyta naudojant priedų metodą. Į skiestą serumo mėginį buvo papildomai įpilta žinomos koncentracijos gliukozės tirpalo tiek, kad jame būtų tam tikras kiekis gliukozės: 2,0, 6,0 ir 12,0 mmol/l. Kiekvienos koncentracijos mėginio tyrimai pakartoti tris kartus. Pridėtos ir nustatytos gliukozės koncentracijos pateikiamos 2 lentelėje. Gauti rezultatai parodė, kad jutiklis pasižymi geru tikslumu ir gali būti pritaikomas realių mėginių analizei.

**2 lentelė.** Gliukozės nustatymas žmogaus kraujo serumo mėginyje.

Pridėta gliukozės koncentracija, mmol/l	Nustatyta gliukozės koncentracija, mmol/l	Išgava, %
2,0	2,12	106,0
6,0	6,1	101,7
12,0	11,9	99,17

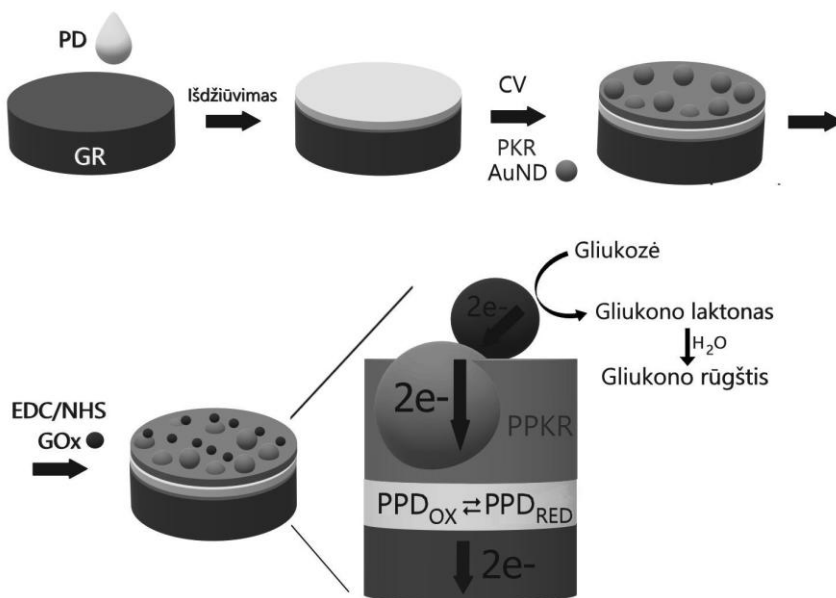
## 5. BEREAGENTINIS JUTIKLIS ELEKTROCHEMIŠKAI SUSINTETINTOS POLI(PIROL-2-KARBOKSIRŪGŠTIES), POLI(1,10-FENANTROLIN-5,6-DIONO), AUKSO NANODALELIŲ IR GLIUKOZĖS OKSIDAZĖS PAGRINDU

Konstruojant bereagentinį gliukozės biologinį jutiklį buvo pritaikytas elektrochemiškai susintetinta PPKR, PPD, AuND ir GOx. Šiuo atveju EPT nėra papildomai įdedamas į tiriamąjį tirpalą, o yra įterpiamas į jutiklio konstrukciją. Taip gaunama pranašesnė bereagentinė sistema, kuriai matavimo metu reikalingos jokios kitos medžiagos išskyrus analizę. Bereagentiniai jutikliai gali būti vienkartiniai, tvirtinami prie odos ir kt. Tokie biologiniai jutikliai kuriami ir naudojami įvairiose srityse: tam tikrų medžiagų aptikimas ir nustatymas maisto ir gėrimų produktuose, tyrimai *in vivo*. AuND taikymas biologiniuose jutikliuose dar labiau pagerina šių savybes: jautrį, stabilumą, atsako laiką [107, 108], atrankumą ir laidumą [109]. Galiausiai, jutiklyje pritaikytas KP sukuria stabilią matricą fermento imobilizavimui [41]. KP taip pat praplečia aptikimo ribas [103, 110], prailgina stabilumą [111], padidina jutiklio atsparumą pašalinėms medžiagoms. Be to buvo nustatyta, kad KP laidumas ir stabilumas padidėja įterpus į jį AuND [112]. Taigi naudojant šiuos tris komponentus buvo pagamintas gliukozės biologinis jutiklis, iširtos pagrindinės jo analizinės charakteristikos ir patikrintas panaudojimas gliukozės nustatymui vaistiniuose preparatuose *Orsalit Drink* ir *Rehydron Optim*, kurie yra naudojami kompensuojant organizme druskų ir vandens netekimą, ir kraujo serume.

Elektrochemiškai susintetinti laidūs PPKR sluoksniai su imobilizuotomis biomolekulėmis buvo pritaikyti biologiniuose jutikliuose [54, 113]. Tačiau šiuo atveju elektropolimerizacija atliekama vandeninėje terpėje, nepašalinant deguonies, todėl susiformavęs PPKR sluoksnis nėra laidus. Nelaidus polimero sluoksnis turi savų privalumų – sluoksnio storis yra tik 10 – 100 nm, todėl substratas, produktas ir EPT gali laisvai ir lengvai difunduoti. Nepaisant to, sluoksnis yra dalinai nelaidus, o tai yra naudinga nepraleidžiant pašalinių, interferuojančių medžiagų, kurios gali daryti įtaką signalui ar užteršti elektrodo paviršių. Taigi nelaidžių polimerų taikymas biologiniuose jutikliuose niekuo nenusileidžia laidiesiems [114].

Gliukozės biologinio jutiklio pagaminimo ir veikimo schema parodyta 25 paveiksle. Jutiklis buvo konstruojamas GR elektrodo paviršiuje elektrocheminės polimerizacijos būdu suformuojant PPD ir PPKR su įterptomis AuND sluoksnį. Polimerizacija atlikta ciklinės

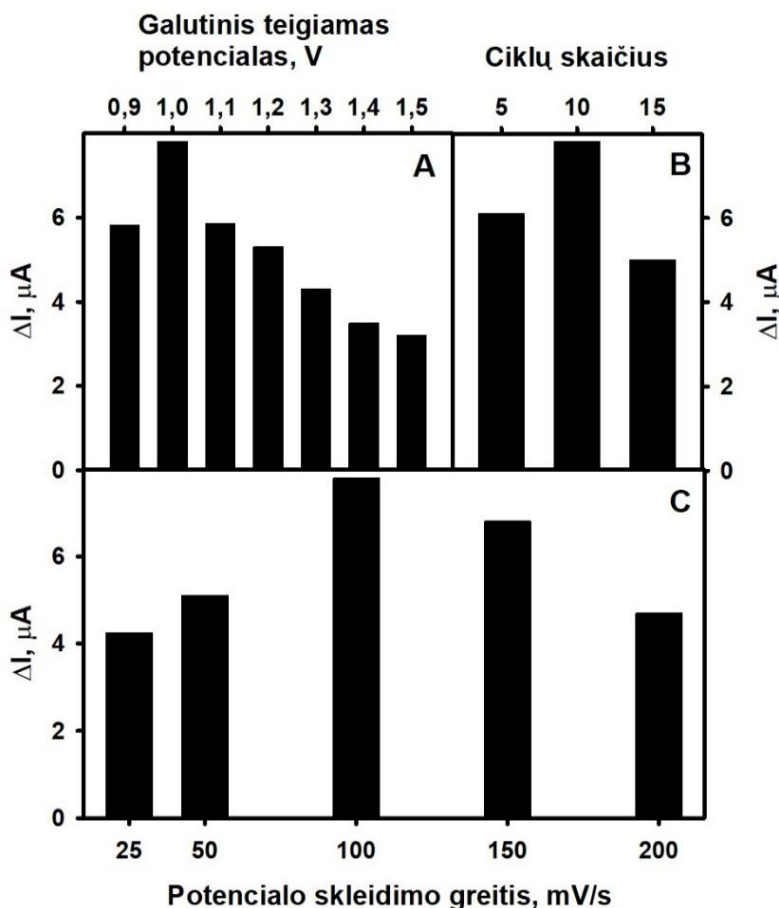
voltamperometrijos (CV) metodu, naudojant trielektrodinę elektrocheminę celę, kurioje yra Pt pagalbinis elektrodas, Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup> lyginamasis elektrodas ir GR indikatorinis elektrodas merkami į elektrocheminę celę su 5 ml A-PBS-KCl buferinio tirpalo (pH 6,0), 0,1 mol/l PKR ir 0,15 nmol/l AuND. Toliau indikatorinis elektrodas modifikuojamas GOx naudojant EDC ir NHS mišinį. Elektrochemiškai susintetintas PPD sluoksnis veikia kaip EPT, perduodantis elektronus susidariusius gliukozės oksidacijos metu elektrodui. Tuo tarpu AuND, esančios PPKR sluoksnyje, palengvina elektronų pernašą ir padidina jutiklio analizinį signalą.



**25 pav.** Schema vaizduojanti bereagentinio gliukozės jutiklio, kuriame pritaikytas PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx nanobiokompozitas, gamyba ir veikimo principas.

Konstruojant jutiklį svarbu parinkti optimalias elektropolimerizacijos ir fermento imobilizavimo sąlygas. Daug faktorių daro įtaką polimero sluoksnio susiformavimui, jo savybėms. Parenkant optimalias elektropolimerizacijos sąlygas, buvo parinktos ciklinės voltamperometrijos potencialo skleidimo ribos, potencialo skleidimo greitis ir ciklų skaičius. Potencialas turi būti toks, kad įvyktų PD ir PCA monomerų oksidacija. Keičiant potencialą, susintetinti polimero sluoksniai pasižymi skirtingomis savybėmis, kinta jų sluoksnio storis [115]. Polimero sluoksniui

taip pat daro įtaką ciklų skaičius ir potencialo skleidimo greitis. Gali susidaryti storesnis, plonesnis arba net pilnai nepasidengęs ant elektrodo sluoksnis. Tai daro įtaką imobilizuoto fermento kiekiui, kuris lemia jutiklio analizinio signalo dydį. Be to, per storas polimero sluoksnius gali sudaryti difuzinius apsunkinimus ir riboti elektronų pernašą iki elektrodo paviršiaus.



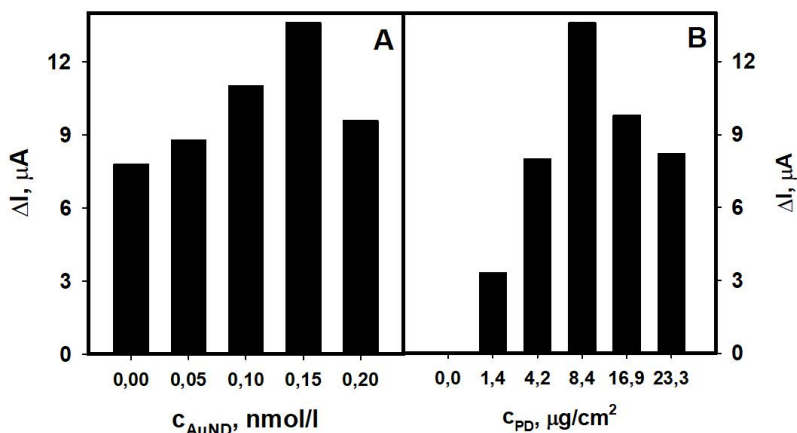
**26 pav.** GR/PPD/PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo signalo priklausomybė nuo galutinio teigiamo potencialo (A), potencialo skleidimo ciklų skaičiaus (B) ir potencialo skleidimo greičio (C). Matavimų sąlygos: +200,0 mV, A-PBS-KCl pH 6,0, 100,0 mmol/l gliukozės. Elektrodo paruošimo sąlygos: 8,45 μg/cm<sup>2</sup> PD; 0,1 mol/l PKR; 10 potencialo skleidimo ciklų (A ir C); galutinis teigiamas potencialas 1,0 V (B ir C), potencialo skleidimo greitis 100 mV/s (A ir B), 40 mg/ml GOx, aktyvacijos EDC/NHS trukmė 30 min, GOx imobilizacijos trukmė 30 min.



Visų pirma buvo parinkta tinkamiausia teigiamo potencialo skleidimo riba. GR elektrodas adsorbavus PD (GR/PD) merkiamas į elektrocheminę celę užpildytą A-PBS-KCl pH 6,0 tirpalu su 0,1 mol/l PKR. Pradinis indikatoriniam elektrodai suteiktas potencialas  $-0,4$ , o galutinis  $+0,9$ ;  $+1,0$ ;  $+1,1$ ;  $+1,2$ ;  $+1,3$ ;  $+1,4$  arba  $+1,5$  V vs Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup>. Šio tyrimo metu buvo naudotas 100 mV/s potencialo skleidimo greitis, skleidžiama 10 ciklų. Kito tyrimo metu buvo parinktas optimalus potencialo ciklų skaičius, potencialą skleidžiant nuo  $-0,4$  iki  $+1,0$  V, esant 100 mV/s greičiui. Ir galiausiai vykdoma elektropolimerizacija skleidžiant potencialą 25, 50, 100, 150 arba 200 mV/s greičiu, potencialą skleidžiant nuo  $-0,4$  iki  $+1,0$  V 10 ciklų. Elektrodai su skirtingomis sąlygomis susintetintais polimero sluoksniais buvo modifikuoti GOx ir išmatuotas jų atsakas į 100,0 mmol/l gliukozės, A-PBS-KCl pH 6,0 tirpale esant  $+200$  mV potencialui. Šių tyrimų rezultatai pateikiami 26 paveiksle. Eksperimentų rezultatai parodo, kad galutinis teigiamas potencialas, potencialo ciklų skaičius ir potencialo skleidimo greitis daro įtaką polimero sluoksnio susiformavimui. Nuo to priklauso imobilizuojamos GOx kiekis ir jutiklio analizinis signalas. Iš tyrimo galima spręsti, kad didžiausias anodinės srovės ( $\Delta I$ ) pasikeitimas GR/PPD/PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodai pasiekiamas, esant 1,0 V galutiniam teigiamam potencialui, 10 skleidžiamų ciklų ir esant 100 mV/s skleidimo greičiui. Šie rezultatai patvirtina, kad polimero sluoksnio storis gali būti keičiamas, keičiant elektropolimerizacijos sąlygas. Kaip minėta – keičiant elektropolimerizacijos sąlygas, kinta jutiklio atsakas. Todėl pagal gautus rezultatus tolimesniems tyrimams buvo parinktos elektropolimerizacijos sąlygos: galutinis teigiamas potencialas 1,0 V, 10 potencialo ciklų ir 100 mV/s potencialo skleidimo greitis.

Toliau buvo nuspręsta patikrinti, ar AuND palengvina elektronų pernašą ir padidina GR/PPD/PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodo analizinį signalą. Todėl buvo įvertinta AuND koncentracijos polimerizacijos tirpale įtaka pagaminto elektrodo signalui. Šio tyrimo metu polimerizacijos tirpale buvo skirtingos AuND tirpalo koncentracijos: 0; 0,05; 0,10; 0,15 ir 0,20 nmol/l. Kaip matyti iš 27 A paveikslo, AuND padidina jutiklio analizinį signalą. Didžiausias analizinis signalas gaunamas tuomet, kai polimerizacijos tirpale yra 0,15 nmol/l AuND. Gaunamas analizinis signalas yra 1,8 karto didesnis už signalą gaunamą nenaudojant AuND. Tačiau polimerizacijos tirpale, esant daugiau nei 0,15 nmol/l AuND, signalas pradeda mažėti. Tai galima paaiškinti tuo, kad ant elektrodo paviršiaus padidėjus AuND kiekiui susidaro dideli AuND agregatai, kurie yra mažiau efektyvūs elektronų pernašos procese negu pavienės AuND. Kitų autorių teigimu AuND koncentracija

polimerizacijos tirpale daro įtaką elektrochemiškai susintetinto PPy poringumui [112]. Remiantis šiais duomenimis, didėjant AuND koncentracijai (AuND)PPK<sub>EL</sub> sluoksnio poringumas padidėja, taip padidėja polimero paviršiaus plotas. Todėl daugiau karboksilo grupių polimero paviršiuje yra pasiekiamos GOx. Pagal šiuos duomenis GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo paruošimui buvo pasirinkta naudoti 0,15 nmol/l AuND koncentraciją.



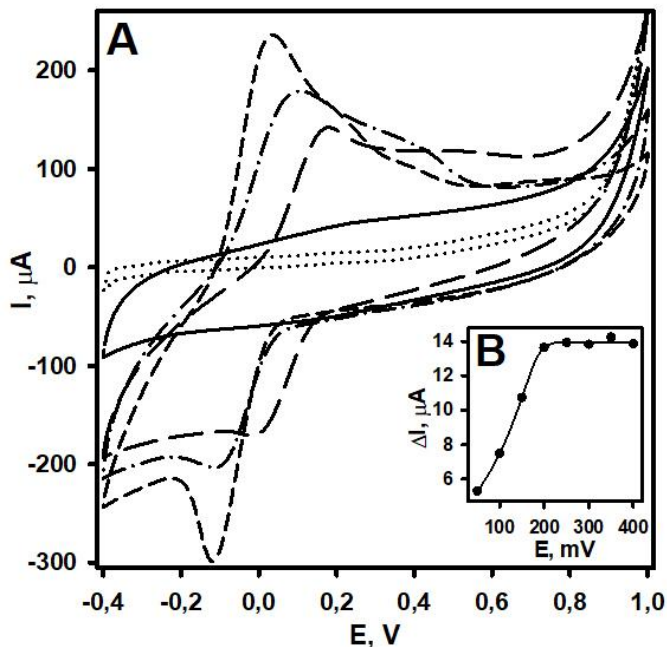
**27 pav.** GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo signalo priklausomybė nuo polimerizacijos tirpale esančios AuND koncentracijos (A) ir PD kiekio (B). Matavimų sąlygos: +200,0 mV, A-PBS-KCl pH 6,0, 100,0 mmol/l gliukozės. Elektrodo paruošimo sąlygos: 8,45  $\mu g/cm^2$  PD (A), 0,15 nmol/l AuND (B), 0,1 mol/l PKR, 10 potencialo skleidimo ciklų, potencialo skleidimo ribos -0,4 – 1,0 V, potencialo skleidimo greitis 100 mV/s, aktyvacijos EDC/NHS trukmė 30 min, 40 mg/ml GOx, GOx imobilizacijos trukmė 30 min.

Kuriant amperometrinę biologinę jutiklį svarbu sukurti efektyvią elektronų pernašą nuo fermento aktyvaus centro iki elektrodo paviršiaus. Ciftci ir bendraautorių paskelbtoje publikacijoje rašoma, kad fermentinės sintezės metu gautas PPD pasižymi geromis elektronų pernašos savybėmis [116]. Šiuo atveju PPD buvo sintetinamas elektrochemiškai. Iš pradžių PD tirpalas užlašinamas ant elektrodo darbinio paviršiaus ir išdžiovinamas. PD adsorbuojasi paviršiuje. Eksperimentų metu ant elektrodo paviršiaus buvo 0; 1,0; 3,0; 6,0; 12,0 ir 18,0  $\mu g$  PD. Gaunamos atitinkamos paviršinės koncentracijos: 0,0; 1,4; 4,23; 8,45; 16,9 ir 23,3  $\mu g/cm^2$ . 27 B paveiksle pateikta GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo analizinio signalo

priklausomybė nuo PD kiekio esant 100 mmol/l gliukozės. Matoma, kad signalas nėra registruojamas, jei ant elektrodo paviršiaus nėra PD. Didėjant PD kiekiui, analizinis signalas didėja, kol pasiekia didžiausią reikšmę, esant 8,45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  PD kiekiui. Toliau didinant PD kiekį, signalas ima mažėti. Tą galima paaiškinti tuo, kad ant elektrodo paviršiaus didėjant PD kiekiui – didėja PPD sluoksnio storis. Dėl jo padidėja atstumas nuo GOx iki elektrodo paviršiaus. Todėl, esant optimaliam sluoksnio storiui, gaunamas didžiausias elektrodo signalas. Toks sluoksnis pasižymi geriausiu pralaidumu. Storesnis sluoksnis apsunkina elektronų pernašą ir taip sumažina analitinį signalą. Pagal gautus rezultatus, tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas naudoti 8,45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  PD kiekis GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo paruošimui.

GR elektrodas, GR elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetintu PPD (GR/PPD), GR elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetinta PPK<sub>EL</sub> (GR/PPK<sub>EL</sub>), GR elektrodas modifikuotas elektrochemiškai susintetintu PPD ir PPKR su įterptomis AuND (GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>) bei GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodas buvo charakterizuoti CV metodu (28 pav.). Naudojant kiekvieną elektrodą buvo skleidžiamas potencialas nuo -0,4 iki +1,0 V, 10 potencialo skleidimo ciklų, 100 mV/s potencialo skleidimo greičiu A-PBS-KCl pH 6,0 buferiniame tirpale. Kaip matoma iš gautų duomenų, GR elektrodai nebuvo fiksuojamos oksidacinės-redukcinės smailės. Kitų trijų elektrodų voltamperogramos yra didesnio ploto. Per pirmą anodinį skleidimą ant GR elektrodo prasideda PPD ir PPKR sluoksnių formavimasis. Kaip matoma iš 28 A paveikslo, oksidacijos-redukcijos srovės smailės nėra fiksuojamos GR/PPK<sub>EL</sub> elektrodai. Tačiau stebint potencialo skleidimo ciklus matoma, kad voltamperogramos plotis didėja, o srovės stiprio vertė ties galutiniu teigiamu potencialu mažėja. Voltamperogramos pločio didėjimas nuo antro ciklo susijęs su PPKR sluoksnio susidarymu. O srovės stiprio mažėjimas parodo, kad susidarantis PPKR sluoksnis yra mažai laidus. Pirmoje GR/PPD elektrodo voltamperogramoje yra aiškiai matomos monomero oksidacijos ir redukcijos smailės ties +36,5 ir -118,3 mV vs Ag/AgCl|Cl<sup>-</sup>. Skirtumas tarp smailių 154,8 mV. Tačiau nuo antro ciklo šios smailės ima mažėti ir atsiranda nauja smailė ties 200 mV. Taigi, dėl susidarancio polimero ir mažėjančios monomero koncentracijos, oksidacijos smailė slenkasi į teigiamesnių potencialo verčių sritį ir mažėja oksidacijos ir redukcijos smailės [117]. 28 A paveiksle matomas aiškus PD ir PPD voltamperogramų smailių pasislinkimas link teigiamų potencialo verčių. Taip pat matomas GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub> elektrodo smailių mažėjimas. Tačiau

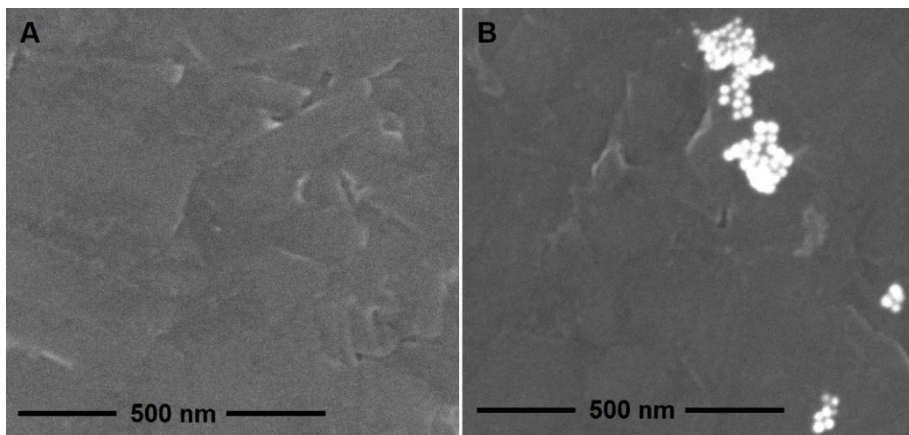
voltamperogramos plotis registruojamas didesnis nei GR/PPD elektrodo. Tai rodo, kad elektrodas yra padengtas PPKR sluoksniu. AuND įterpimo į polipirolo matricą (PPy/AuND) mechanizmą pasiūlė Chen su bendraautoriais [112]. Remiantis pasiūlytu mechanizmu, AuND difunduojamas prie elektrodo paviršiaus tampa pirolo polimerizacijos branduoliu. Buvo pastebėta, kad dengimosi pradžioje PPy/AuND sluoksnio polimerizacija prasideda ant AuND branduolio. Todėl susidaro PPy sluoksnis su įterptomis AuND.



**28 pav.** (A) GR (.....), GR/PPD (- - -), GR/PPKR<sub>EL</sub> (—), GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub> (— —) ir GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx (- · -) elektrodų ciklinės voltamperogramos A-PBS-KCl pH 6,0 (GR ir GR/PPD) ir esant 0,1 mol/l PKR (GR/PPKR<sub>EL</sub>) arba 0,1 mol/l PKR ir 0,15 nmol/l AuND (GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>). (B) GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodo srovės stiprio priklausomybė nuo suteikto potencialo. Matavimų sąlygos: A-PBS-KCl pH 6,0, 100 mmol/l gliukozės. Elektrodų paruošimo sąlygos: 8,45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  PD, 0,15 nmol/l AuND, 0,1 mol/l PKR, 10 potencialo skleidimo ciklą, potencialo skleidimo ribos -0,4 – 1,0 V, potencialo skleidimo greitis 100 mV/s, aktyvacijos EDC/NHS trukmė 30 min, 40 mg/ml GOx, GOx imobilizacijos trukmė 30 min.

GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo oksidacijos smailė matoma ties +104.9 mV. Tačiau kaip matyti iš 28 paveikslė B dalies, kuriame parodoma elektrodo atsako priklausomybė nuo suteikto potencialo A-PBS-KCl pH 6,0 buferiniame tirpale, esant 100 mmol/l gliukozės. Srovės stipris staigiai padidėja, kai suteiktas potencialas pasikeičia nuo 50 iki 200 mV. Toliau stipris didėja ne taip žymiai (13,65 μA ties 200 mV, 13,94 μA ties 250 mV, 13,84 μA ties 300 mV, 14,25 μA ties 350 mV ir 13,89 μA ties 400 mV). Atlikus šį tyrimą tolimesniems amperometriniais matavimams buvo pasirinktas +200 mV potencialas.

GR/PPK<sub>EL</sub> ir GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub> elektrodų paviršiaus morfologija buvo ištirta SEM. Vaizdai pateikiami 29 paveiksle. GR/PPK<sub>EL</sub> elektrodo paviršius (29 A pav.) yra lygus ir būdingas elektropolimerizacijos būdu gautiems KP sluoksniams. GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub> elektrodo paviršiaus (29 B pav.) morfologija yra panaši su sferinėmis maždaug 15 nm diametro dalelėmis, išsidėsčiusiomis polimero sluoksnyje. SEM vaizdai parodo, kad vis dėlto AuND nėra tolygiai pasiskirsčiusios polimero sluoksnyje. Dalelės linkusios telktis ir sudaryti nanoklasterius.



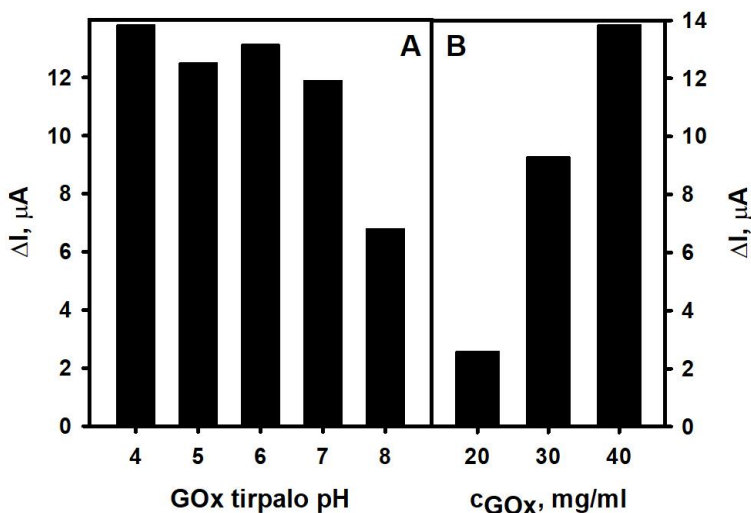
**29 pav.** GR/PPK<sub>EL</sub> (A) ir GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub> (B) elektrodų paviršiaus SEM vaizdai. Sąlygos: didinimas – 65 000 kartų, greitinimo įtampa – 5,0 kV, srovės stipris – 0,4 nA.

Vienas iš svarbiausių fermentinio elektrocheminio biologinio jutiklio gaminimo etapų yra fermento imobilizavimas elektrodo paviršiuje. Šiuo atveju GOx buvo prijungiama kovalentiškai naudojant EDC ir NHS. Šios medžiagos yra biologiškai suderinamos – nedaro įtakos biomolekulės

aktyvumui. Kovalentiškai imobilizuojant fermentą, pasiekiamas didesnis fermento aktyvumas, o tai padidina jutiklio stabilumą. Imobilizavimas gali būti išskirtas į aktyvacijos ir prijungimo etapus. Aktyvacijos etapo metu PPKR karboksilo grupės reaguoja su NHS esant EDC ir susidaro NHS esteris. Tuomet prisijungimo etapo metu NHS esteris reaguoja su fermento pirminėmis amino grupėmis, taip susidaro amidinis ryšys tarp PPKR ir GOx. Buvo ištirtos GOx imobilizavimo sąlygos: tirpalo, kuriame ištirpinta GOx, pH, GOx koncentracija, aktyvacijos ir prijungimo trukmė, kurioms esant pagaminamas jutiklis pasižymintis geriausiu veikimu. Norint nustatyti, kokio pH tirpalas yra tinkamiausias GOx prijungimui, GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub> elektrodai po karboksilo grupių aktyvacijos buvo merkami į GOx tirpalus paruoštus A-PBS buferiniuose tirpaluose, kurių pH: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 ir 8,0. Tuomet buvo pamatuotas modifikuotų elektrodų atsakas į 100,0 mmol/l gliukozės. Rezultatai pateikti 30 A paveiksle. Biologinio jutiklio amperometrinis signalas priklauso nuo modifikavimo metu naudoto GOx tirpalo pH. Didžiausias signalas (13,80  $\mu$ A) gaunamas tirpalo pH esant 4,0. Šiek tiek mažesnis analizinį signalas (13,14  $\mu$ A) registruojamas esant pH 6,0. GOx X-S tipo iš *Aspergillus niger* yra aktyvi plačiose pH ribose: nuo pH 4 iki pH 7. Natyvios gliukozės oksidazės optimalus veikimo pH yra 5,5. Tikėtina, kad esant pH 4,0 GOx susikoncentruoja prie GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub> elektrodo paviršiaus, kadangi fermento izoelektrinis taškas yra 4,2 [95], o PKR pKa vertė yra apie 3,6. Todėl esant pH daugiau nei 3,6 dalis likusių neaktyvuotų karboksilo grupių ant GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub> elektrodo paviršiaus yra deprotonuotoje formoje, turi neigiamą krūvį. Tuo tarpu GOx esant pH mažiau nei 4,2 turi teigiamą krūvį dėl amino grupių protonizacijos. Todėl esant pH 4,0 dėl elektrostatinių sąveikų prie GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub> elektrodo paviršiaus padidėja GOx koncentracija ir imobilizuojama daugiau fermento molekulių – registruojamas didžiausias analizinį signalas. Tolimesniems tyrimams imobilizavimui buvo pasirinkta naudoti pH 4,0 GOx tirpalą.

Buvo ištirta kokia GOx koncentracija po aktyvacijos EDC ir NHS reagentais lemia didžiausią GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodo analizinį signalą. Naudoti trijų koncentracijų GOx tirpalai: 20,0, 30,0 ir 40 mg/ml. Rezultatai pateikiami 30 B paveiksle. Didėjant GOx koncentracijai, didėja ir elektrodo amperometrinis signalas. Didžiausias atsakas gaunamas, esant didžiausiai naudotai GOx koncentracijai – 40 mg/ml. Tikėtina, kad dar didinant koncentraciją, elektrodo atsakas į gliukozę didėtų, tačiau ši koncentracija yra pakankamai didelė, todėl buvo nuspręsta jos nebedidinti.

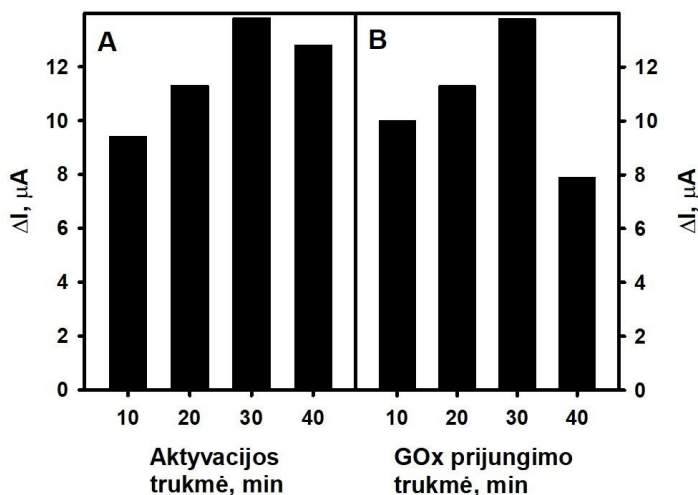
Taip pat buvo optimizuotos karboksilo grupių aktyvacijos ir GOx prijungimo trukmės. Šiam tikslui GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub> elektrodas buvo laikomas EDC/NHS mišinyje ar GOx tirpale 10, 20, 30 arba 40 minučių. Rezultatai matomi atitinkamai 31 A ir B paveiksluose. Didėjant aktyvacijos ir prijungimo trukmėms, prie PPKR prisijungia didesnis kiekis GOx, todėl didėja elektrodo analizinis signalas. Tačiau trukmėms padidėjus iki 40 minučių, elektrodo analizinis signalas sumažėja. Tai galimai įvyksta dėl pusiau stabilų esterių susidarymo ir GOx aktyvumo praradimo, laikant fermentą kambario temperatūroje. Pasirinkta karboksilo grupių aktyvacijos ir GOx prijungimo trukmės – 30 minučių.



**30 pav.** GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodo signalo priklausomybė nuo GOx tirpalo pH (A) ir GOx koncentracijos (B). Matavimų sąlygos: +200,0 mV, A-PBS-KCl pH 6,0, 100 mmol/l gliukozės. Elektrodo paruošimo sąlygos: 8,45 μg/cm<sup>2</sup> PD, 0,15 nmol/l AuND, 0,1 mol/l PKR, 10 potencialo skleidimo ciklų, potencialo skleidimo ribos -0,4 – 1,0 V, potencialo skleidimo greitis 100 mV/s, 30 min (A, B) aktyvacijos EDC/NHS trukmė, 40 mg/ml (A) GOx, GOx imobilizacijos trukmė 30 min (A, B), GOx tirpalo pH 4,0 (B).

Biologinio jutiklio signalas taip pat priklauso nuo terpės pH. Taip yra dėl to, kad pH daro įtaką fermento biokatalitiniui aktyvumui, EPT elektrocheminėms savybėms ir apskritai bendram biologinio jutiklio darbui. Todėl buvo ištirta A-PBS-KCl buferinio pH įtaka jutiklio signalui. Terpės pH buvo keičiamas nuo 4,0 iki 9,0. Jutiklio atsakas iš pradžių didėjęs iki pH

6,0 toliau mažėja. Optimalus jutiklio veikimas esant pH 6,0 taip pat buvo gautas amperometriniam jutikliui, kuriame pritaikytas PD ir GOx [36]. Taip pat jutikliui su GOx ir AuND sluoksniais [118]. Tačiau kitokie rezultatai gauti kitiems polipirolu dariniams [104-106], laisvai GOx išskirtai iš *Aspergillus niger* palankiausias pH yra 5,5 [101]. Taigi galima daryti išvadą, kad GOx aktyvumui įtaką daro imobilizacijos metodas [100], EPT [119], AuND [120]. Pagal šiuo atveju gautus rezultatus pasirinkta optimali pH 6,0. Taip gaunamas didžiausias jutiklio atsakas, didesnis pakartojamumas ir stabilumas.

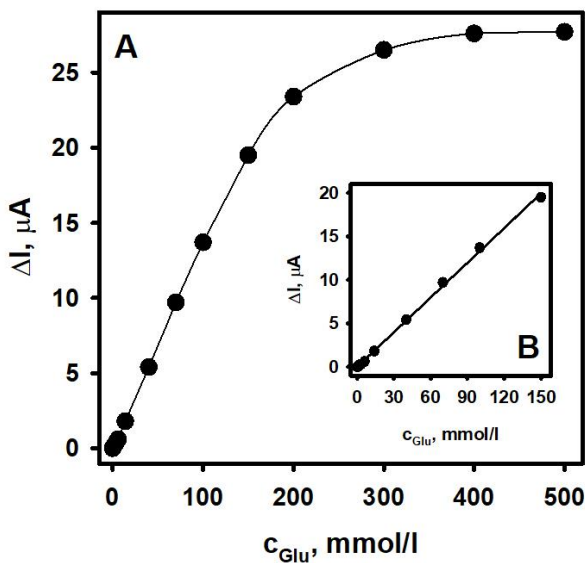


**31 pav.** GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo signalo priklausomybė nuo aktyvacijos trukmės (A) ir GOx prijungimo trukmės (B). Matavimų sąlygos: +200,0 mV, A-PBS-KCl pH 6,0, 100 mmol/l gliukozės. Elektrodo paruošimo sąlygos: 8,45 μg/cm<sup>2</sup> PD, 0,15 nmol/l AuND, 0,1 mol/l PKR, 10 potencialo skleidimo ciklų, potencialo skleidimo ribos -0,4 – 1,0 V, potencialo skleidimo greitis 100 mV/s, 30 min (B) aktyvacijos EDC/NHS trukmė, 40 mg/ml (A, B) GOx imobilizacijos trukmė 30 min (A), GOx tirpalo pH 4,0 (A, B).

Optimizavus GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo paruošimo ir matavimo sąlygas, buvo nustatyta elektrodo signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Didinant gliukozės koncentraciją A-PBS-KCl buferiniame tirpale, registruojamas srovės stipris. 32 A paveiksle matoma hiperbolinė priklausomybė tarp gliukozės koncentracijos nuo 0,2 iki 500,0 mmol/l ir GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo atsako. Tiesinė



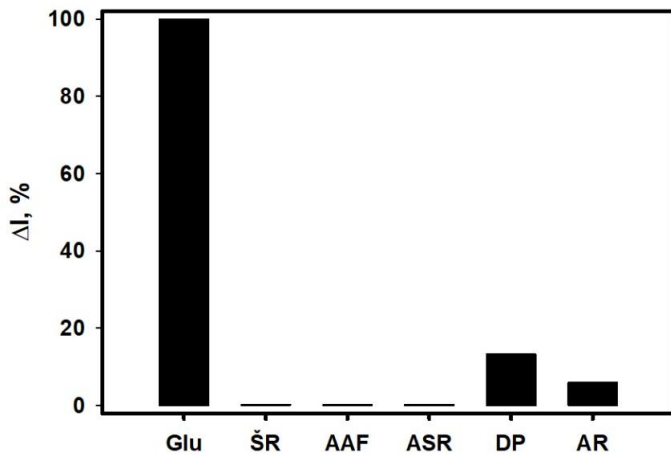
priklausomybė ( $R=0,999$  ( $N:3$ )) stebima iki 150,0 mmol/l gliukozės (32 B pav.). Aptikimo riba buvo gauta 0,08 mmol/l ( $N:3$ ). Biologinio jutiklio jautris 0,135  $\mu\text{A}/\text{mM}$ . Tiesės lygtis  $I$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $0,135 \times C_{\text{gliukoze}}(\text{mmol/l}) - 0,036$ , o  $R^2 = 0,999$  ( $N:3$ ). Gauta tiesinė priklausomybė yra žymiai platesnė nei kituose tyrimuose, kuriuose naudojamas PPy ar jo dariniai GOx imobilizavimui kartu su AuND [105, 121-123]. Gauta tiesinė priklausomybė yra pakankamai plati gliukozės aptikimui ne tik kūno skysčiuose, bet ir mėginiuose turinčiuose didesnę gliukozės koncentraciją: maisto produktuose, vyne ir kituose gėrimuose ar vaistiniuose preparatuose.



**32 pav.** (A) GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. (B) GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo kalibracinė kreivė. Elektrodo paruošimo sąlygos: 8,45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  PD, 0,15 nmol/l AuND, 0,1 mol/l PKR, 10 potencialo skleidimo ciklą, potencialo skleidimo ribos  $-0,4 - 1,0$  V, potencialo skleidimo greitis 100 mV/s, 30 min aktyvacijos EDC/NHS trukmė, 40 mg/ml GOx GOx imobilizacijos trukmė 30 min. Matavimų sąlygos: A-PBS-KCl pH 6,0, +200,0 mV.

Jutiklio pakartojamumas ir atkuriamumas buvo tiriamas matuojant GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo atsaką į gliukozę. Tiriant pakartojamumą, GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodas paruošiamas optimizuotomis sąlygomis, tuomet tris kartus matuojamas jo atsakas į 5,0,

50,0 ir 100,0 mmol/l gliukozės. SSN trims nepriklausomiems matavimams paskaičiuotas atitinkamai kiekvienai koncentracijai yra 4,22 %, 2,34 % ir 1,67 %. Tiriant atkuriamumą, trys GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodai paruošiami optimizuotomis sąlygomis ir matuojamas jų atsakas į 5,0, 50,0 ir 100,0 mmol/l gliukozės. SSN paskaičiuotas atitinkamai kiekvienai koncentracijai yra 6,93 %, 2,23 % ir 1,17 %. Šie duomenys parodo, kad jutiklis pasižymi geru pakartojamumu ir atkuriamumu, ypač esant didesnei gliukozės koncentracijai.

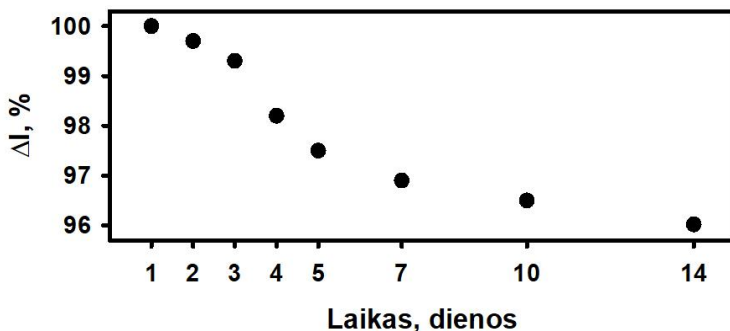


**33 pav.** (A) GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GOx elektrodo atsakas į gliukozę ir interferuojančias medžiagas. Elektrodo paruošimo sąlygos: 8,45 μg/cm<sup>2</sup> PD, 0,15 nmol/l AuND, 0,1 mol/l PKR, 10 potencialo skleidimo ciklų, potencialo skleidimo ribos -0,4 – 1,0 V, potencialo skleidimo greitis 100 mV/s, 30 min aktyvacijos EDC/NHS trukmė, 40 mg/ml GOx imobilizacijos trukmė 30 min. Matavimų sąlygos: A-PBS-KCl pH 6,0, +200,0 mV.

Realiuose mėginiuose, kuriuose norima pamatuoti gliukozės koncentraciją, dažniausiai būna ir kitų medžiagų, kurios gali daryti įtaką elektrodo signalui. Todėl reikia įvertinti šių medžiagų galimą efektą. Eksperimentui pasirinktos medžiagos: ŠR, AAF, acetilsalicilo rūgštis (ASR), DP ir AR. Tyrimo metu į matuojamą tirpalą iš pradžių buvo įpilta 5,0 mmol/l gliukozės. Gavus stabilų atsaką į gliukozę, įpilama 0,30 mmol/l ŠR ir vėl laukiama signalo nusistovėjimo. Procedūra kartojama įpilant 0,10 mmol/l AAF, 0,07 mmol/l ASR, 0,10 mmol/l DP ir galiausiai 0,10 mmol/l AR. Iš 33 paveikslo matyti, kad ŠR, AAF ir ASR nedaro įtakos jutiklio signalui. AR signalą padidina 6,45 %. Kraujyje normali gliukozės koncentracija yra

5,6 mmol/l, o AR – apie 0,1 mmol/l. Todėl galima teigti, kad AR įtaka jutiklio analiziniam signalui yra pakankamai nežymi. Kaip ir GR/PPK<sub>CH</sub>-GOx jutiklio atveju, polimero karboksilo grupės galimai deprotonizuojasi, todėl elektrodo paviršiuje susidaro neigiamas krūvis. Duomenys parodo, kad didžiausią įtaką signalui daro DP – signalas padidėja 13,31 %. Esant terpės pH 6,0, DP (pKa 10,75) yra protonizuotoje formoje, dėl elektrostatinių sąveikų DP koncentracija prie elektrodo paviršiaus padidėja ir galimai vykstant DP oksidacijai – padidėja registruojama srovė.

Geras jutiklių stabilumas yra viena iš svarbiausių savybių. GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo stabilumas buvo stebimas 14 dienų. Elektrodas buvo pagamintas optimizuotomis sąlygomis ir stebimas jo atsakas į 100 mmol/l gliukozės A-PBS-KCl buferiniame tirpale pH 6,0. Tyrimo rezultatai pateikiami 34 paveiksle. Signalas gan tolygiai mažėja kiekvieną dieną ir po 14 dienų sumažėja tik 4 %, lyginant su pradiniu signalu. Ruošiant elektrodą, fermentas yra kovalentiškai prijungiamas prie polimero. Todėl jutiklis pasižymi geru stabilumu. Signalo praradimas galimai susijęs su dalies fermento aktyvumo praradimu, dėl temperatūrų kaitos matuojant kambario temperatūroje, o tarp matavimų laikant 4 °C. Taip pat dalis fermento galėjo būti neprisijungusi prie polimero kovalentiškai, o buvo adsorbuota, todėl matavimų metu galėjo desorbuoti nuo elektrodo paviršiaus. Taigi po 14 dienų likęs 96,0 % elektrodo signalas parodo gerą jutiklio stabilumą.



**34 pav.** GR/PPD/(AuND)PPK<sub>EL</sub>-GOx elektrodo atsako kitimas laike. Elektrodo paruošimo sąlygos: 8,45 μg/cm<sup>2</sup> PD, 0,15 nmol/l AuND, 0,1 mol/l PKR, 10 potencialo skleidimo ciklų, potencialo skleidimo ribos –0,4 – 1,0 V, potencialo skleidimo greitis 100 mV/s, 30 min aktyvacijos EDC/NHS trukmė, 40 mg/ml GOx GOx imobilizacijos trukmė 30 min. Matavimų sąlygos: A-PBS-KCl pH 6,0, +200,0 mV.

Galiausiai sukurtas ir optimizuotas biologinis jutiklis buvo išbandytas matuojant gliukozės koncentraciją vaistiniuose preparatuose *Orsalit Drink*, *Rehydron Optim* ir kraujo serumo mėginyje. Nustatytos gliukozės koncentracijos buvo palygintos su vaistų gamintojų nurodytomis koncentracijomis. Kraujo serume buvo 5,55 mmol/l gliukozės koncentracija. *Orsalit Drink* tirpalas buvo naudojamas iš karto, o *Rehydron Optim* buvo ištirpintas 100 ml vandens, gautas tirpalas turintis 374,58 mmol/l gliukozės, pagal gliukozės kiekį nurodytą ant pakuotės. Nusistovėjus bazinei linijai, į celę su 5 ml A-PBS-KCl pH 6,0 buferinio tirpalo buvo įpilama 200 µl vieno iš vaistinių preparatų arba 500 µl kraujo serumo. Matavimai pakartoti tris kartus. Gliukozės koncentracija nustatyta iš kalibracinės kreivės, kuri buvo sudaryta analizuojant žinomos koncentracijos gliukozės tirpalus nuo 0,2 iki 150 mmol/l. Rezultatai pateikiami 3 lentelėje rodo, kad santykinė paklaida *Orsalit Drink*, *Rehydron Optim* ir kraujo serume atitinkamai buvo 1,64, 0,09 ir 0,54 %. Kaip minėta anksčiau, tiriant pašalinių medžiagų įtaką jutiklio signalui, ŠR įtakos nedaro. Tačiau mėginyje esant 0,1 mmol/l AR ir 5 mmol/l gliukozės, jutiklio signalas padidėja 6 %. Kraujo serume nustatyta gliukozės koncentracija buvo 0,03 mmol/l didesnė nei tikroji koncentracija. Tai gali būti dėl serume esančios AR. Tačiau šis pokytis yra gan nežymus. Todėl galima teigti, kad sukurtas GR/PPD/(AuND)PPKR<sub>EL</sub>-GO<sub>x</sub> jutiklis gali pakankamai tiksliai nustatyti gliukozės kiekį realiuose mėginiuose.

**3 lentelė.** Gliukozės nustatymas tikruose mėginiuose.

Mėginys	Mat. Nr.	Nustatyta koncentracija, mmol/l	Vidurkis	Deklaruojama koncentracija, mmol/l	Santykinė paklaida, %
<i>Orsalit Drink</i>	1	75,08	74,37	73,17	1,64
	2	73,92			
	3	74,12			
<i>Rehydron Optim</i>	1	373,36	374,93	374,58	0,09
	2	376,53			
	3	374,91			
Kraujo serumas	1	5,50	5,58	5,55	0,54
	2	5,66			
	3	5,58			

## IŠVADOS

- PPKR dalelės susintetintos cheminės polimerizacijos būdu, polimerizacijos iniciatoriumi naudojant  $H_2O_2$ , bei fermentinės polimerizacijos būdu, naudojant GOx ir gliukozę. Fermentinė polimerizacija vyksta 2,0 – 9,0 pH terpėje, optimalus pH 5,0. Tuo tarpu cheminės polimerizacijos vyksmui geriausia terpė yra pH 2,0. Silpnai rūgštinėje terpėje fermentinė polimerizacija vyksta greičiau nei cheminė, tačiau susidariusios PPKR dalelės yra mažesnio diametro.
- Panaudojant cheminės oksidacinės polimerizacijos būdu susintetintų PPKR dalelių ir GOx biokompozitą sukonstruotas gliukozės biologinis jutiklis veikiantis elektronų pernašos tarpininku naudojant FMS. Optimalios jutiklio indikatorinio elektrodo paruošimo sąlygos: PPKR dalelių sintezės trukmė 48 val., GOx tirpalo pH 4,0, 5 mg/ml JSA, 6,0  $\mu$ l biokompozito suspensijos. Optimalios sąlygos jutiklio veikimui: +300 mV, terpės pH 8,0. Jutiklio tiesinis diapazonas 0,1 – 15,0 mmol/l, aptikimo riba 0,039 mmol/l. Jutiklis gali būti taikomas realių mėginių analizei.
- Panaudojant elektrocheminės sintezės būdu susintetintos PPKR, PPD, AuND ir GOx nanobiokompozitą sukonstruotas bereagentinis gliukozės biologinis jutiklis. Optimalios jutiklio indikatorinio elektrodo paruošimo sąlygos: potencialo skleidimo ribos –0,4 – 1,0 V, 10 potencialo skleidimo ciklą ir 100 mV/s skleidimo greitis, 0,15 nmol/l AuND, 8,45  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> PD, 40 mg/ml GOx tirpalas pH 4,0, karboksilo grupių aktyvacijos ir GOx prijungimo trukmės 30 min. Optimalios jutiklio veikimui sąlygos: +200 mV, terpės pH 6,0. Jutiklio tiesinis diapazonas 0,2 – 150,0 mmol/l, aptikimo riba 0,08 mmol/l. Jutiklis gali būti taikomas realių mėginių analizei.

## PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. A. Kausaite-Minkstimiene, **L. Glumbokaite**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Reagent-less amperometric glucose biosensor based on nanobiocomposite consisting of poly(1,10-phenanthroline-5,6-dione), poly(pyrrole-2-carboxylic acid), gold nanoparticles and glucose oxidase. *Microchemical Journal*, 2020, 154, 104665 (IF: 3,206).
2. A. Kausaite- Minkstimiene, **L. Glumbokaite**, A. Ramanaviciene, E. Dauksaite, A. Ramanavicius, An Amperometric Glucose Biosensor Based on Poly (Pyrrole-2-Carboxylic Acid)/Glucose Oxidase Biocomposite. *Electroanalysis*, 2018, 30, 1634-1644 (IF: 2,691).
3. A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, R. Simanaityte, D. Gabrielaitis, **L. Glumbokaite**, A. Ramanavicius. Evaluation of poly(pyrrole-2-carboxylic acid) particles synthesized by enzymatic catalysis. *RSC Advances*, 2015, 5, 105475-105483 (IF: 3,049).

## PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS

1. **L. Glumbokaitė**, E. Daukšaitė, A. Kaušaitė-Minkštimienė. Development of a novel amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase functionalized poly(pyrrole-2-carboxylic acid) particles. Tarptautinė konferencija Ecobalt 2018, spalio 25-27, Vilnius.
2. **L. Glumbokaitė**, A. Kaušaitė-Minkštimienė. A Novel Glucose Biosensor Based on Polymer-Enzyme Biocomposite and Gold Nanoparticles. 20-oji tarptautinė konferencija-mokykla „Advanced Materials and Technology“, 2018 rugpjūčio 27-31, Palanga.
3. **L. Glumbokaitė**, A. Kaušaitė-Minkštimienė. Properties of glucose biosensor based on glucose oxidase-poly(pyrrole-2-carboxylic acid) biocomposite, 10th Nanoconference „Current Trends in Electrochemistry and Material Sciences“, 2017 spalio 25-26, Vilnius.
4. **L. Glumbokaitė**, A. Kaušaitė-Minkštimienė. An amperometric glucose biosensor based on poly(pyrrole-2-carboxylic acid)–glucose oxidase biocomposite. XII ECHEMS, 2017 June 6-9, Milano Marittima, Italy.
5. **L. Glumbokaitė**, A. Kaušaitė-Minkštimienė. Biocomposite consisting of poly(pyrrole-2-carboxylic acid) particles and glucose oxidase application in glucose biosensor. Jaunųjų chemikų konferencija „Inovatyvioji ir tvarioji chemija“, 2016 gruodžio 9-10, Puvočiai.
6. **L. Glumbokaitė**, A. Kaušaitė-Minkštimienė. The development and application of poly(pyrrole-2-carboxylic acid)–glucose oxidase biocomposite. 9th Nanoconference „Advances in Bioelectrochemistry and Nanomaterials“, 2016 spalio 22-23, Vilnius.
7. **L. Glumbokaitė**, A. Kaušaitė-Minkštimienė. Poly(pyrrole-2-carboxylic acid) synthesis and modification with enzyme glucose oxidase for use in glucose biosensor. 18-oji tarptautinė konferencija-mokykla „Advanced Materials and Technology“, 2016 rugpjūčio 27-31, Palanga.
8. **L. Glumbokaite**, R. Simanaityte, A. Kausaite-Minkstimiene. Reagentless amperometric biosensor based on poly(pyrrole-2-carboxylic acid) particles modified by glucose oxidase. 2nd International Conference of Chemists Nanochemistry and Nanomaterials, 2015 spalio 22 – 24, Vilnius.
9. R. Simanaityte, D. Gabrielaitis, **L. Glumbokaite**, A. Kausaite-Minkstimiene. Enzyme catalyzed synthesis of poly(pyrrole-2-carboxylic acid) nanoparticles. 2nd International Conference of Chemists Nanochemistry and Nanomaterials, 2015 spalio 22 – 24, Vilnius.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Banica F.G., *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. 2012: Wiley.
2. Rotariu L., Lagarde F., Jaffrezic-Renault N., and Bala C., *Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective*. Trends in Analytical Chemistry, 2016. **79**: p. 80-87.
3. Ghasemi-Varnamkhasia M., Apetreib C., Lozanoc J., and Anyogu A., *Potential use of electronic noses, electronic tongues and biosensors as multisensor systems for spoilage examination in foods*. Trends in Food Science & Technology, 2018. **80**: p. 71-92.
4. Maduraiveerana G. and Jin W., *Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications*. Trends in Environmental Analytical Chemistry, 2017. **13**: p. 10-23.
5. Metkar S.K. and Girigoswami K., *Diagnostic biosensors in medicine – A review*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019. **17**: p. 271–283.
6. Mehrotra P., *Biosensors and their applications – A review*. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research, 2016. **6**: p. 153-159.
7. Justino C.I.L., Duarte A.C., and Rocha-Santos T.A.P., *Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis*. Trends in Analytical Chemistry, 2016. **85**: p. 36-60.
8. Ustwania O.A., Guptab N., Bakhribaha H., Griffithsa E., Wanga E., and Wetzler M., *Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2016. **99**: p. 189-199.
9. Rebelo R., Barbosa A.I., Caballero D., Kwon I.K., Oliveira J.M., Kundu S.C., Reis R.L., and Correlo V.M., *3D biosensors in advanced medical diagnostics of high mortality diseases*. Biosensors and Bioelectronics, 2019. **130**: p. 20-39.
10. Rocchitta G., Spanu A., Babudieri S., Latte G., Madeddu G., Galleri G., Nuvoli S., Bagella P., Demartis M.I., Fiore V., Manetti R., and Serra P.A., *Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids*. Sensors, 2016. **16**(780).
11. Clark L.C. and Lyons C., *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**(29-45).
12. Wang J., *Electrochemical Glucose Biosensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 814–825.



13. Sarma A.K., Vatsyayan P., Goswami P., and Minter S.D., *Recent advances in material science for developing enzyme electrodes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**: p. 2313–2322.
14. Wang J., *Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges*. *Electroanalysis*, 2001. **13**(12): p. 983–988.
15. Das P., Das M., Chinnadaya S.R., Singha I.M., and Goswami P., *Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. **79**: p. 386–397.
16. Bollella P. and Gorton L., *Enzyme based amperometric biosensors*. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2018. **10**(157–173).
17. Bobrowski T. and Schuhmann W., *Long-term implantable glucose biosensors*. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2018. **10**: p. 112–119.
18. Galant A.L., Kaufman R.C., and Wilson J.D., *Glucose: Detection and analysis*. *Food Chemistry*, 2015. **188**: p. 149–160.
19. Bankar S.B. and Bule M.V., *Glucose oxidase - An overview*. *Biotechnology Advances*, 2009. **27**: p. 489–501.
20. Kim J., Campbell A.S., Ávila B.E.-F.d., and Wang J., *Wearable biosensors for healthcare monitoring*. *Nature Biotechnology*, 2019. **37**: p. 389–406.
21. Kim J., Campbell A.S., and Wang J., *Wearable non-invasive epidermal glucose sensors: A review*. *Talanta*, 2018. **177**: p. 163–170.
22. Scholten K. and Meng E., *A review of implantable biosensors for closed-loop glucose control and other drug delivery applications*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018. **544**: p. 319–334.
23. Bruttomesso D., Farret A., Costa S., Marescotti M.C., Vettore M., Avogaro A., Tiengo A., Man C.D., Place J., Facchinetti A., Guerra S., Magni L., Nicolao G.D., Cobelli C., Renard E., and Maran A., *Closed-Loop Artificial Pancreas Using Subcutaneous Glucose Sensing and Insulin Delivery and a Model Predictive Control Algorithm: Preliminary Studies in Padova and Montpellier*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2009. **3**(5): p. 1014–1021.
24. Hovorka R., Kumareswaran K., Harris J., Allen J.M., Elleri D., and Xing D., *Overnight closed loop insulin delivery (artificial pancreas) in adults with type 1 diabetes: crossover randomised controlled studies*. *BMJ (Clinical research ed.)*, 2011. **342**.
25. Cappon G., Acciaroli G., Vettoretti M., Facchinetti A., and Sparacino G., *Wearable Continuous Glucose Monitoring Sensors: A Revolution in Diabetes Treatment*. *Electronics*, 2017. **6**(3).
26. Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., Rodrigues R.C., and Fernandez-Lafuente R., *Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization*. *RSC Advances*, 2014(4).

27. Dzyadevych S.V., Arkhypova V.N., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Martelet C., and Jaffrezic-Renault N., *Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future*. ITBM-RBM, 2008. **171–180**(29): p. 171–180.
28. Chaubey A. and Malhotra B.D., *Mediated biosensors*. Biosensors & Bioelectronics, 2002. **17**: p. 441–456.
29. Yoo E.-H. and Lee S.-Y., *Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice*. Sensors, 2010. **10**(5): p. 4558–4576.
30. Deng H., Teo A.K.L., and Gao Z., *An interference-free glucose biosensor based on a novel low potential redox polymer mediator*. Sensors and Actuators B, 2014. **191**: p. 522–528.
31. Soganci T., Demirkol D.O., Ak M., and Timur S., *A novel organic–inorganic hybrid conducting copolymer for mediated biosensor applications*. RSC Advances, 2014. **86**(4): p. 46357–46362.
32. Şenel M., *Construction of reagentless glucose biosensor based on ferrocene conjugated polypyrrole*. Synthetic Metals, 2011. **161**(17–18): p. 1861–1868.
33. Mazeiko V., Kausaite-Minkstimiene A., Ramanaviciene A., Balevicius Z., and Ramanavicius A., *Gold nanoparticle and conducting polymer-polyaniline-based nanocomposites for glucose biosensor design*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. **189**: p. 187–193.
34. Durand F., Stines-Chaumeil C., Flexer V., André I., and Mano N., *Designing a highly active soluble PQQ–glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **402**(4): p. 750–754.
35. Bucur B., Mallat E., Gurban A.-M., Gocheva Y., Velasco C., Marty J.-L., and Noguier T., *Strategies to develop malic acid biosensors based on malate quinone oxidoreductase (MQO)*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(12): p. 2290–2297.
36. Kausaite-Minkstimiene A., Simanaityte R., Ramanaviciene A., Glumbokaite L., and Ramanavicius A., *Reagent-less amperometric glucose biosensor based on a graphite rod electrode layer-by-layer modified with 1,10-phenanthroline-5,6-dione and glucose oxidase*. Talanta, 2017. **171**: p. 204–212.
37. Mao X., Wu Y., Xu L., Cao X., Cui X., and Zhu L., *Electrochemical biosensors based on redox carbon nanotubes prepared by noncovalent functionalization with 1,10-phenanthroline-5,6-dione*. Analyst, 2011. **136**(2): p. 293–298.
38. Zor E., Oztekin Y., Ramanaviciene A., Anusevicius Z., Bingol H., Barkauskas J., Ersoz M., and Ramanavicius A., *Amperometric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase, 1,10-Phenanthroline-5,6-dione and Carbon Nanotubes*. J. Electrochem. Soc., 2014. **161**(13): p. 3064–3069.

39. Gerard M., Chaubey A., and Malhotra B.D., *Application of conducting polymers to biosensors*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2002. **17**: p. 345–359.
40. Saxena V. and Malhotra B.D., *Prospects of conducting polymers in molecular electronics*. *Current Applied Physics*, 2003. **3**(2-3): p. 293–305.
41. Teles F.R.R. and Fonseca L.P., *Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors*. *Materials Science and Engineering C*, 2008. **28**: p. 1530–1543.
42. Batool R., Rhouti A., Nawaz M.H., Hayat A., and Marty J.L., *A Review of the Construction of Nano-Hybrids for Electrochemical Biosensing of Glucose*. *Biosensors*, 2019. **9**(46).
43. J. Hackett A., Malmström J., and Travas-Sejdic J., *Functionalization of conducting polymers for biointerface applications*. *Progress in Polymer Science*, 2017. **70**: p. 18–33.
44. Yuan G.L. and Kuramoto N., *Synthesis of Helical Polyanilines Using Chondroitin Sulfate as a Molecular Template*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2004. **205**(13): p. 1744–1751.
45. Asplund M., Thaning E., Lundberg J., Sandberg-Nordqvist A.C., Kostyszyn B., Inganäs O., and Holst H.v., *Toxicity evaluation of PEDOT/biomolecular composites intended for neural communication electrodes*. *Biomedical Materials*, 2009. **4**(4).
46. Stewart E.M., Liu X., Clark G.M., Kapsa R.M.I., and Wallace G.G., *Inhibition of smooth muscle cell adhesion and proliferation on heparin-doped polypyrrole*. *Acta Biomaterialia*, 2012. **8**(1): p. 194–200.
47. Berezhetska O., Liberelle B., Crescenzo G.D., and Ciccoira F., *A simple approach for protein covalent grafting on conducting polymer films*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015. **3**(25): p. 5087–5094.
48. Jordan A.M., Viswanath V., Kim S.-E., Pokorski J.K., and Korley L.T.J., *Processing and surface modification of polymer nanofibers for biological scaffolds: a review*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016. **4**(36): p. 5958–5974.
49. Preethichandra D.M.G., Ekanayake E.M.I.M., Onoda M., and Kaneto K., *Performance Enhancement of Polypyrrole Based Nano-Biosensors by Different Enzyme Deposition Techniques*. *Modern Sensing Technologies* 2018. **229**: p. 213–229.
50. Jakhar P., Shukla M., and Singh V., *Improved Performance of Electrochemically Synthesized Polypyrrole Nanofiber Array-Based Amperometric Glucose Biosensor via Crosslinking Technique*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2019. **19**(12): p. 7605–7614.
51. Ahuja T., Mir I.A., Kumar D., and Rajesh, *Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications*. *Biomaterials*, 2007. **28**(5): p. 791–805.

52. Lee J.W., Serna F., Nickels J., and Schmidt C.E., *Carboxylic acid-functionalized conductive polypyrrole as a bioactive platform for cell adhesion*. *Biomacromolecules*, 2006. **7**: p. 1692-1695.
53. Roy C.J., Leprince L., Boulard A.D., Landoulsi J., Callegari V., Jonas A.M., and Demoustier-Champagne S., *Electrosynthesis of pyrrole 3-carboxylic acid copolymer films and nanotubes with tunable degree of functionalization for biomedical applications*. *Electrochimica Acta*, 2011. **56**: p. 3641-3648.
54. Foschini M., Marletta A., Faria R.C., Leonard D., Bessueille F., Jaffrezic-Renault N., and Goncalves D., *Electrochemically Prepared Polypyrrole-2-Carboxylic Acid Films: Synthesis Protocols and Studies on Biosensors*. *Electroanalysis*, 2013. **25**(3): p. 741 – 749.
55. Curulli A. and Palleschi G., *Electropolymerization of pyrrole-2-carboxylic acid and 4,4'-dihydroxybenzophenone on platinum electrodes*. *Electroanalysis*, 2005. **9**: p. 1107-1112.
56. Qina J., D. G. Job, Choa M., and Leea Y., *Monitoring of early diagnosis of Alzheimer's disease using the cellular prion protein and poly(pyrrole-2-carboxylic acid) modified electrode* *Biosensors and Bioelectronics*, 2018. **113**: p. 82-87.
57. Özcan A., İlkbaşı S., and Özcan A.A., *Development of a disposable and low-cost electrochemical sensor for dopamine detection based on poly(pyrrole-3-carboxylic acid)-modified electrochemically over-oxidized pencil graphite electrode* *Talanta*, 2017. **165**: p. 489-495.
58. Özcan A. and İlkbaşı S., *Poly(pyrrole-3-carboxylic acid)-modified pencil graphite electrode for the determination of serotonin in biological samples by adsorptive stripping voltammetry*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. **215**: p. 518-524.
59. Elahi N., Kamali M., and Baghersad M.H., *Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review*. *Talanta*, 2018. **184**: p. 537-556.
60. Taguchi M., Ptitsyn A., McLamore E.S., and Claussen J.C., *Nanomaterial-mediated Biosensors for Monitoring Glucose*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2014. **8**(2): p. 403–411.
61. Chen H., Zhou K., and Zhao G., *Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening*. *Trends in Food Science & Technology*, 2018. **78**: p. 83-94.
62. Beik J., Khateri M., Khosravi Z., Kamrava S.K., Kooranifar S., Ghaznavi H., and Shakeri-Zadeh A., *Gold nanoparticles in combinatorial cancer therapy strategies*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019. **387**: p. 299–324.

63. Wu Y., Ali M.R.K., Chen K., Fang N., and El-Sayed M.A., *Gold nanoparticles in biological optical imaging*. Nano Today, 2019. **24**: p. 120-140.
64. Kizling M., Dzwonek M., Wieckowska A., and Bilewicz R., *Gold nanoparticles in bioelectrocatalysis – The role of nanoparticle size*. Current Opinion in Electrochemistry, 2018. **12**: p. 113-120.
65. Turkevich J., Stevenson P.C., and Hillier J., *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. Discussions of the Faraday Society, 1951. **11**: p. 15-75.
66. Frens G., *Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions*. Nature Physical Science, 1973. **241**: p. 20-22.
67. Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J., and Whyman R., *Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system*. Journal of the Chemical Society, 1994(7): p. 801-802.
68. Male K.B., Li J., Bun C.C., Ng S.C., and Luong J.H.T., *Synthesis and Stability of Fluorescent Gold Nanoparticles by Sodium Borohydride in the Presence of Mono-6-deoxy-6-pyridinium- $\beta$ -cyclodextrin Chloride*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(2): p. 2443-451.
69. Yu X., Jiao Y., and Chai Q., *Applications of Gold Nanoparticles in Biosensors*. Nano LIFE 2016. **6**(2): p. 1642001
70. Xue M.-H., Xu Q., Zhou M., and Zhu J.-J., *In situ immobilization of glucose oxidase in chitosan-gold nanoparticle hybrid film on Prussian Blue modified electrode for high-sensitivity glucose detection*. Electrochemistry Communications, 2006. **8**(9): p. 1468-1474.
71. German N., Voronovic J., Ramanavicius A., and Ramanaviciene A., *Gold Nanoparticles and Polypyrrole for Glucose Biosensor Design*. Procedia Engineering, 2012. **47**: p. 482-485.
72. Gokoglan T.C., Kesik M., Soylemez S., Yuksel R., Unalan H.E., and Toppare L., *Paper Based Glucose Biosensor Using Graphene Modified with a Conducting Polymer and Gold Nanoparticles*. Journal of The Electrochemical Society, 2017. **164**(6).
73. Can M., Ozaslan H., Isildak O., Pekmez N.O., and Yildiz A., *Investigation of catalytic effects of the proton and Lewis acids on oligomerization and chemical polymerization of pyrrole*. Polymer, 2004. **45**(20): p. 7011-7016.
74. Henry M.C., Hsueh C.C., Timko B.P., and Freunda M.S., *Reaction of pyrrole and chlorauric acid. A new route to composite colloids*. Journal of the Electrochemical Society, 2011. **148**(11): p. 155-162.
75. Son A.J.R., Lee H., and Moon B., *Morphology and photoluminescence of colloidal polypyrrole nanoparticles*. Synthetic Metals, 2007. **157**: p. 597-602.

76. Zheng W., Razal J.M., Spinks G.M., Truong V.T., Whitten P.G., and Wallace G.G., *The role of unbound oligomers in the nucleation and growth of electrodeposited polypyrrole and method for preparing high strength, high conductivity films*. Langmuir, 2012. **28**(29): p. 10891-10897.
77. Junker K., Zandomenighi G., Schuler L.D., Kissner R., and Walde P., *Enzymatic polymerization of pyrrole with *Trametes versicolor* laccase and dioxygen in the presence of vesicles formed from AOT (sodium bis-(2-ethylhexyl) sulfosuccinate) as templates*. Synthetic Metals, 2015. **200**: p. 123-134.
78. Choudhary M., Ul I.R., Witcomb M.J., and Mallick K., *In situ generation of a high-performance Pd-polypyrrole composite with multi-functional catalytic properties*. Dalton Transactions, 2014. **43**(17): p. 6396-6405.
79. Appel G., Schmeisser D., Bauer J., Bauer M., Egelhaaf H.J., and Oelkrug D., *The formation of oligomers in the electrolyte upon polymerization of pyrrole*. Synthetic Metals, 1999. **99**(1): p. 69-77.
80. Kausaite-Minkstimiene A., Mazeiko V., Ramanaviciene A., and Ramanavicius A., *Evaluation of chemical synthesis of polypyrrole particles*. Colloids and Surfaces A, 2015. **483**: p. 224-231.
81. Chao T.H. and March J., *A study of polypyrrole synthesized with oxidative transition metal ions*. Polymer Chemistry, 1988. **26**(3): p. 743-753.
82. Kausaite A., Ramanaviciene A., and Ramanavicius A., *Polyaniline synthesis catalysed by glucose oxidase*. Polymer, 2009. **50**(8): p. 1846-1851.
83. Ramanavicius A., Kausaite A., Ramanaviciene A., Acaite J., and Malinauskas A., *Redox enzyme – glucose oxidase – initiated synthesis of polypyrrole*. Synthetic Metals, 2006. **156**(5-6): p. 409-413.
84. Liao Y., Li X.G., and Kaner R.B., *Facile synthesis of water-dispersible conducting polymer nanospheres*. ACS Nano, 2010. **4**(9): p. 5193-5202.
85. Ryu H.W., Kim Y.S., Kim J.H., and Cheong I.W., *Direct synthetic route for water-dispersible polythiophene nanoparticles via surfactant-free oxidative polymerization*. Polymer, 2014. **55**(3): p. 806-812.
86. Hawkins S.J. and Ratcliffe N.M., *A study of the effects of acid on the polymerisation of pyrrole, on the oxidative polymerisation of pyrrole and on polypyrrole*. Journal of Materials Chemistry, 2000. **10**: p. 2057-2062.
87. Ong C.K., Ray S., Cooney R.P., Edmonds N.R., and Eastal A.J., *Preparation and characterization of composites of polyethylene with polypyrrole-coated wollastonite*. Journal of Applied Polymer Science, 2008. **110**(1): p. 632-640.
88. Ozkazanc W., Zor S., Ozkazanc H., and Gumus S., *Preparation and characterization of polypyrrole/selenium composites*. Polymer Engineering and Science, 2013. **53**(6): p. 1131-1137.

89. He C., Yang C., and Li Y., *Chemical synthesis of coral-like nanowires and nanowire networks of conducting polypyrrole*. *Synthetic Metals*, 2003. **139**(2): p. 539-545.
90. Benabderrahmane S., Bousalem S., Mangeney C., Azioune A., Vaulay M.J., and Chehimi M.M., *Interfacial physicochemical properties of functionalized conducting polypyrrole particles*. *Polymer*, 2005. **46**(4): p. 1339-1346.
91. Cruz-Silva R., Amaro E., Escamilla A., Nicho M.E., Sepulveda-Guzman S., Arizmendi L., Romero-Garcia J., Castillon-Barraza F.F., and Farias M.H., *Biocatalytic synthesis of polypyrrole powder, colloids, and films using horseradish peroxidase*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008. **328**(2): p. 263-269.
92. Wang H., Lin T., and Kaynak A., *Polypyrrole nanoparticles and dye absorption properties*. *Synthetic Metals*, 2005. **151**(2): p. 136-140.
93. Kausaite-Minkstimiene A., Ramanaviciene A., Simanaityte R., Gabrielaitis D., Glumbokaite L., and Ramanavicius A., *Evaluation of poly(pyrrole-2-carboxylic acid) particles synthesized by enzymatic catalysis*. *RSC Advances*, 2015. **5**: p. 105475-105483.
94. Park D.H., Oh J.M., Shul Y.G., and Choy J.H., *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ Polypyrrole Core-Shell Nanohybrid for Efficient DNA Retrieval*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008. **8**(10): p. 5014-5017.
95. Harris J.M., Reyes C., and Lopez G.P., *Common causes of glucose oxidase instability in in vivo biosensing: a brief review*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2013. **7**: p. 1030-1038.
96. Chen X.H., Hu Y.B., and Wilson G.S., *Glucose microbiosensor based on alumina sol-gel matrix/electropolymerized composite membrane*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2002. **17**(11-12): p. 1005-1013.
97. He C., Xie M., Hong F., Chai X., Mi H., Zhou X., Fan L., Zhang Q., Ngai T., and Liu J., *A Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Gold Nanoparticles/Bovine Serum Albumin/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Biocomposite Nanoparticles*. *Electrochimica Acta*, 2016. **222**: p. 1709-1715.
98. He C., Liu J., Zhang Q., and Wu C., *A novel stable amperometric glucose biosensor based on the adsorption of glucose oxidase on poly(methyl methacrylate)-bovine serum albumin core-shell nanoparticles*. *Sensors and Actuators B*, 2012. **166-167**: p. 802-808.
99. He C., Liu J., Xie L., Zhang Q., Li C., Gui D., Zhang G., and Wu C., *Activity and thermal stability improvements of glucose oxidase upon adsorption on core-shell PMMA-BSA nanoparticles*. *Langmuir* 2009. **25**: p. 13456-13460.
100. Senel M. and Nergiz C., *Development of a novel amperometric glucose biosensor based on copolymer of pyrrole-PAMAM dendrimers*. *Synthetic Metals*, 2012. **162**: p. 688-694.

101. Arica M.Y. and Bayramoglu G., *Polyethyleneimine-grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for reversible glucose oxidase immobilization*. *Biochemical Engineering Journal*, 2004. **20**: p. 73-77.
102. Zhou L., Jiang Y., Gao J., Zhao X., Ma L., and Zhou Q., *Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide*. *Biochemical Engineering Journal*, 2012. **69**: p. 28-31.
103. Kausaite-Minkstimiene A., Mazeiko V., Ramanaviciene A., and Ramanavicius A., *Enzymatically synthesized polyaniline layer for extension of linear detection region of amperometric glucose biosensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010. **26**: p. 790-797.
104. Kojima K., Yamauchi T., Shimomura M., and Miyauchi S., *Covalent immobilization of glucose oxidase on poly[1-(2-carboxyethyl)pyrrole] film for glucose sensing*. *Polymer*, 1998. **39**: p. 2079-2082.
105. Jiang H., Zhang A., Sun Y., Ru X., Ge D., and Shi W., *Poly (1-(2-carboxyethyl) pyrrole/polypyrrole composite nanowires for glucose biosensor*. *Electrochimica Acta*, 2012. **70**: p. 278-285.
106. Reiter S., Habermüller K., and Schuhmann W., *A reagentless glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped into osmium-complex modified polypyrrole films*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001. **79**(2-3): p. 150-156.
107. German N., Kausaite-Minkstimiene A., Ramanavicius A., Semashko T., Mikhailova R., and Ramanaviciene A., *The use of different glucose oxidases for the development of an amperometric reagentless glucose biosensor based on gold nanoparticles covered by polypyrrole*. *Electrochimica Acta*, 2015. **169**: p. 326-333.
108. Luo X.L., Xu J.J., Du Y., and Chen H.Y., *A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition*. *Analytical Biochemistry*, 2004. **15**(334(2)): p. 284-289.
109. Galal A., Atta N.F., and Ekram H., *Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles—Towards selective electrochemical sensors*. *Talanta*, 2012. **93**: p. 264-273.
110. Ramanavicius A., Kausaite A., and Ramanaviciene A., *Self-encapsulation of oxidases as a basic approach to tune the upper detection limit of amperometric biosensors*. *Analyst*, 2008. **8**(133): p. 1083–1089.
111. Takashima R.W. and Kaneto K., *Amperometric Phenol biosensor based pyrrole-copolymer film*. *Sensors and Actuators B*, 2004. **102**: p. 271-277.



112. Chen W., Li C.M., Chen P., and Sun C.Q., *Electrosynthesis and characterization of polypyrrole/Au nanocomposite*. *Electrochimica Acta*, 2007. **52** p. 2845-2849.
113. Qin J., Jo D.G., Cho M., and Lee Y., *Monitoring of early diagnosis of Alzheimer's disease using the cellular prion protein and poly(pyrrole-2-carboxylic acid) modified electrode*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018. **113**: p. 82-87.
114. Yuqing M., Jianrong C., and Xiaohua W., *Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors*. *Trends in Biotechnology*, 2004. **22**: p. 227-231.
115. Wang X. and Uchiyama S., *Polymers for Biosensors Construction*. *State of the Art in Biosensors-General Aspects*, 2013.
116. Ciftci H., Oztekin Y., Tamer U., Ramanaviciene A., and Ramanavicius A., *Electrochemical biosensor based on glucose oxidase encapsulated within enzymatically synthesized poly(1,10-phenanthroline-5,6-dione)*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. **123**: p. 685-691.
117. Ferreira V.C. and Monteiro O.C., *Synthesis and properties of Polythionine/Co-doped titanatenanotubes hybrid materials*. *Electrochimica Acta*, 2013. **113**: p. 817- 824.
118. Yang W.W., Wang J.X., Zhao S., Sun Y.Y., and Sun C.Q., *Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment*. *Electrochemistry Communications*, 2006. **8**: p. 665-672.
119. Hendry S.P., Cardosi M.F., Turner A.P.F., and Neuse E.W., *Polyferrocenes as mediators in amperometric biosensors for glucose*. *Analytica Chimica Acta*, 1993. **281**: p. 453-459.
120. Malel E. and Mandler D., *Direct Electron Transfer between Glucose Oxidase and Gold Nanoparticles; When Size Matters*. *ChemElectroChem*, 2019. **6**: p. 147-154.
121. German N., Ramanavicius A., Voronovic J., and Ramanaviciene A., *Glucose biosensor based on glucose oxidase and gold nanoparticles of different size covered by polypyrrole layer*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2012. **413**: p. 224-230.
122. German N., Ramanavicius A., and Ramanaviciene A., *Amperometric Glucose Biosensor Based on Electrochemically Deposited Gold Nanoparticles Covered by Polypyrrole*. *Electroanalysis*, 2017. **29**: p. 1267 - 1277.
123. Senel M., *Simple method for preparing glucose biosensor based on in-situ polypyrrole cross-linked chitosan/glucose oxidase/gold bionanocomposite film*. *Materials Science and Engineering C*, 2015. **48**: p. 287-293.

## PADĖKA

Dėkoju savo darbo mokslinei vadovei doc. dr Astai Kaušaitė-Minkštimienei už suteiktą pagalbą ir žinias, atliekant tyrimus doktorantūros studijų metu ir rengiant disertacinį darbą.

Dėkoju visiems Vilniaus Universiteto Chemijos ir geomokslų fakulteto kolegoms už visokeriopą pagalbą, paramą ir draugiškumą. Nuoširdžiai dėkoju NanoTechno laboratorijos kolegoms už pagalbą ir patarimus.

Dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už finansinę paramą.

Ir galiausiai dėkoju artimiesiems ir draugams, be kurių paramos šio darbo nebūtų.

## UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius

El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)

Tiražas 15 egz.

84