

УДК 543.554.2:577.152.3:547.495.9

БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ ТА рН-ЧУТЛИВОГО ПОЛЬОВОГО ТРАНЗИСТОРА ДЛЯ АНАЛІЗУ КРЕАТИНІНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

С. В. Марченко¹О. А. Зінченко¹Л. С. Поляков²А. М. Герешко³С. В. Дзядевич¹О. П. Солдаткін¹¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ²Навчально-науковий центр «Інститут біології»
КНУ імені Тараса Шевченка, Україна³Національний університет харчових технологій, Київ, УкраїнаE-mail: svmarchenkosv@ukr.net

Отримано 12.06.2013

Креатинін — один із найважливіших аналітів у сучасному клінічному аналізі. Визначення цього метаболіту в різних фізіологічних рідинах організму є суттєвим для оцінювання ниркової, м'язової та тиреоїдної дисфункції. Креатинін є загальноприйнятним діагностичним показником функції нирок, рівень якого слід контролювати під час процедури гемодіалізу. Експерименти було проведено з використанням потенціометричного методу вимірювань. Біочутливий елемент для визначення креатиніну було створено на основі високоселективного ензиму креатиніндеімінази. Імобілізацію ензиму на поверхню рН-чутливого польового транзистора здійснювали за допомогою фотополімеру. У результаті експериментальних досліджень було створено біоселективний елемент біосенсора на основі креатиніндеімінази. Оптимізовано основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора, визначено оптимальні умови для досліджень з реальними зразками. Показано, що біосенсор на основі креатиніндеімінази є стабільним, його відгуки відтворювані, а діапазон лінійності — 0–2 мМ з мінімальною межею визначення 0,02 мМ. Проведено кількісне оцінювання вмісту креатиніну в сироватці крові та порівняльний аналіз даних біосенсорного визначення з контрольним методом (показано високу кореляцію — $R = 0,96$). Розроблений потенціометричний біосенсор на основі рН-чутливого польового транзистора та іммобілізованої креатиніндеімінази, перевагою якого є висока чутливість та селективність, можна застосовувати для кількісного визначення вмісту креатиніну в сироватці крові хворих на ниркову недостатність, а також для контролю ефективності процедури гемодіалізу.

Ключові слова: креатинін, ниркова недостатність, біосенсор, креатиніндеіміназа, рН-чутливий польовий транзистор.

Креатинін — один із компонентів крові людини, що належить до фракції залишкового азоту і вважається важливим діагностичним показником функції нирок, щитоподібної залози та м'язів [1]. Рівень креатиніну в сироватці крові й сечі використовують у клінічній діагностиці як параметр м'язового ушкодження та як головний маркер різних ниркових захворювань.

Фізіологічна концентрація креатиніну в крові лежить у межах 40–150 мкмоль/л, залежно від віку та статі, але за патологічних умов, зокрема при м'язових порушеннях та нирковій дисфункції, може збільшуватись до 1 000 мкмоль/л і вище [2]. За

концентрації креатиніну, що перевищує 140 мкмоль/л, хворому слід призначити додаткові клінічні дослідження, а якщо концентрація вища, ніж 530 мкмоль/л, це є ознакою ниркової недостатності [3].

У рутинній клінічній практиці для визначення креатиніну досить часто застосовують колориметричний метод на основі реакції Яффе, що був запропонований у 1886 р. і ґрунтується на взаємодії креатиніну з пікриновою кислотою в лужному середовищі з утворенням таутомера пікрату креатиніну помаранчевого кольору [4]. Цим методом послуговуються і сьогодні, але головний його недолік — низька специфічність.

Також для моніторингу концентрації креатиніну використовують і такі методи, як високоефективна рідинна хроматографія [5–8], іонна хроматографія [9, 10], міцелярна електрокінетична хроматографія [11–13], хроматографічний метод із застосуванням флуоресцентних індикаторів [14], капілярний електрофорез [15], капілярний зональний електрофорез [16–19], капілярний ізотахофорез [20], тандемна мас-спектрометрія [21]. Однак ці методи потребують значних затрат часу, довготривалої та складної підготовки проб, дорогих реактивів, висококваліфікованого персоналу та найголовніший недолік — неможливість вимірювання в режимі реального часу.

З метою вирішення деяких вищезазначених недоліків для визначення креатиніну було запропоновано біосенсорні методи. Аналіз літератури показує, що розширення сфери застосування біосенсорів на сьогодні зумовлено не тільки високою чутливістю цих систем, але й тим, що біосенсор, як правило, містить весь набір реагентів, необхідних для встановлення концентрації аналіту, і дає змогу звести процедуру аналізу до одного етапу. У даному разі можна говорити про збільшення швидкості та своєрідну автоматизацію процесу аналізу.

Відомі амперометричні, потенціометричні та оптичні біосенсори для визначення креатиніну. Кожен тип біосенсорів має свої переваги та недоліки. При розробленні як амперометричних, так і потенціометричних систем важливими є декілька параметрів: чутливість, діапазон вимірювання, операційна стабільність, стабільність під час зберігання та відсутність впливу інтерферуючих речовин.

Деякі потенціометричні біосенсори базуються на детекції амонію, що є продуктом креатиніну в результаті ензиматичного гідролізу креатиніндаїміназою [3, 22]. Ці біосенсори привертають увагу, оскільки складаються з простого газочутливого електрода та єдиної ензиматичної реакції. Головним недоліком таких пристроїв є вплив ендогенного NH_4^+ на результати аналізу, а в разі амперометричних біосенсорів — наявність складної триензимної системи, під час роботи якої запускається каскад трьох реакцій, що може спричинити велику похибку визначення креатиніну через низьку селективність аналізу [3, 23].

Тому було поставлено мету: розробити потенціометричний біосенсор на основі рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ) та іммобілізованої креатиніндаїмінази і вико-

ристати його для кількісного визначення креатиніну в сироватці крові хворих на ниркову недостатність.

Матеріали і методи

У роботі застосовували препарат ензиму креатиніндаїмінази (КФ 3.5.4.21) з активністю 36 ОА/мг протеїну, бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та креатинін виробництва Sigma-Aldrich Chimie. Робочим буферним розчином слугував фосфатний буфер ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$), рН 7,4, фірми Merck. Під час виготовлення робочих біоселективних елементів для стабілізації біоселективних мембран використовували ДЕАЕ-декстран фірми Fluka Biochemica та D-лактитол фірми Fluka. Для іммобілізації креатиніндаїмінази застосовували фотополімер полі(вініл)алкоголь, що містить стирилпіридин (PVA/SbQ, Toyo Gosei Kogyo Co.Ltd, Японія).

Сироватку крові для дослідів на вміст креатиніну було одержано в Київському міському науково-практичному центрі нефрології та гемодіалізу.

Сенсорні елементи на основі рН-чутливих польових транзисторів. У роботі використовували сенсорні чипи з диференційною парою рН-чутливих польових транзисторів, виготовлені в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України. Розроблена топологія передбачала розміщення двох ідентичних р-канальних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8x8 мм [24]. Для усунення можливості утворення паразитного каналу провідності між обома транзисторами кристал містив захисну роздільну n+-ділянку завширшки 50 мкм. Контакти до стоку й витоку кожного із транзисторних елементів було сформовано протяжними p+-дифузійними шинами, виведеними на край чипу разом із контактом до n-підкладки.

Іонселективні властивості транзисторів були зумовлені рН-чутливим діелектричним шаром Si_3N_4 , нанесеним на їхню затворну ділянку. Величина рН-чутливості сенсорних елементів становила близько 40 мВ/рН, що за наявної крутизни перехідної вольтамперної характеристики транзистора в межах 400–500 мкА/В забезпечувало рН-чутливість струму в каналі порядку 15–20 мкА/рН.

Відгук рН-ПТ оцінювали за допомогою схеми прямого вимірювання струму в каналі польового транзистора з активним навантаженням. Порогова напруга для використо-

уваних рН-ПТ становила близько $-2,5$ В. Вимірювання проводили за таких умов: сила струму каналу — близько 500 мкА, напруга «стік-вітік» — близько 2 В, підкладку з'єднано зі стоком [25].

За допомогою розроблених сенсорних електродів можна ефективно проводити вимірювання в диференційному режимі, коли один із транзисторів використовують як референтний, а на затвор іншого наносять чутливу біоселективну мембрану. Це дає змогу істотно послабити вплив таких факторів, як коливання температури, рН, іонної сили розчину, світла і електромагнітних ефектів на результати вимірювань.

Виготовлення біоселективних мембран. Біоселективну мембрану на основі креатиніндаїмінази формували на поверхні одного з пари рН-чутливих рН-ПТ фотополімеризацією в PVA/SbQ. На інший рН-ПТ наносили референтну мембрану. Для цього готували 66% -й розчин PVA/SbQ в 20 мМ калійфосфатному буфері, що містив 10% -й гліцерол, рН 7,4. Далі безпосередньо перед нанесенням на робочу поверхню перетворювача змішували розчин креатиніндаїмінази (20% -на креатиніндаїміназа + 4% -й лактитол + 0,4% -й DEAE-декстран) із розчином PVA/SbQ у співвідношенні 1:1 та ретельно перемішували для одержання гомогенного розчину. Суміш для приготування референтної мембрани готували так само, але замість ензиму брали БСА. Розчини за допомогою мікропіпетки Eppendorf (0,1–2,5 мкл) наносили на робочі поверхні рН-ПТ до повного їх покриття. Сенсорний чип з нанесеними мембранами вміщували під ультрафіолетову лампу КФ-4М інтенсивністю $3,4$ В/м² на відстані 10 см від біосенсора для формування біоселективних мембран на 20–30 хв.

Формування додаткових мембран. Для формування додаткових мембран використовували позитивно заряджений полімер полі(4-вінілпіридин-костерин) — ПВП. Готували 1% -й спиртовий розчин цього полімеру.

Додаткові мембрани застосовували під час роботи з реальними зразками для зменшення негативного впливу компонентів крові на відгук біосенсора. Так, 0,1 мкл ПВП наносили поверх мембрани на основі креатиніндаїмінази, а також на відповідну референтну мембрану. Після таких маніпуляцій біосенсори витримували 15–20 хв на повітрі до повного висихання додаткових мембран і вміщували в робочу комірку з 5 мМ фосфатним буфером (рН 7,4) до стабілізації базового сигналу.

Вимірювання креатиніну в модельному робочому буфері. Модельні дослідження проводили, в основному, в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням. Перед роботою біосенсори вимочували деякий час у буферному розчині до отримання стабільного вихідного базового сигналу. Концентрацію субстрату змінювали, додаючи певні аліквоти концентрованих розчинів. Сигнал від польового транзистора з неактивною мембраною, розташованого на тому самому кристалі, віднімали від сигналу, одержаного з транзистора з активною біоселективною мембраною.

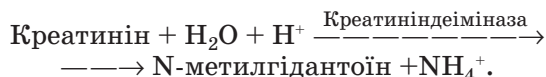
Вимірювання креатиніну в зразках сироватки крові. Для визначення концентрацій креатиніну в пробах сироватки крові застосовували два методи: класичний біосенсорний за калібрувальною кривою та стандартних додавань.

Процедура визначення невідомої концентрації креатиніну в сироватці крові за умови використання першого методу була такою. Спочатку знімали залежність відгуків біосенсора від концентрації креатиніну та будували калібрувальну криву. Потім до електрохімічної комірки об'ємом 1,5 мл додавали певну концентрацію креатиніну, отримували відгук, а після відмивання вносили 150 мкл сироватки з урахуванням загального об'єму комірки, що зумовлювало кінцеве розведення зразка в 10 разів. Одержаний відгук на певну концентрацію креатиніну використовували для оцінювання стабільності біосенсора (у разі повторного використання сенсорного чипу). За величиною відгуку, отриманого на внесення реального зразка, та калібрувальною кривою визначали вміст креатиніну в пробі. Кількість вимірювань концентрації креатиніну в кожній із 10 проб сироватки крові — 5 разів, $P < 0,05$.

Принцип методу стандартних додавань полягає в тому, що спочатку одержують відгук біосенсора на внесення в електрохімічну комірку зразка з невідомою концентрацією креатиніну, а потім додають певні аліквоти концентрованого вихідного розчину з відомою концентрацією креатиніну і одержують відповідні відгуки біосенсора. На основі отриманих даних будують калібрувальну криву, лінійна екстраполяція якої перетинає вісь концентрацій (X) у точці, яка відповідає концентрації креатиніну в досліджуваному зразку [26].

Результати та обговорення

В основі роботи біоселективного елемента біосенсора на основі креатиніндаїмінази лежить реакція ензиматичного гідролізу креатиніну:



У результаті ензиматичної реакції відбувається зміна рН, індукована гідролізом креатиніну, що пропорційна концентрації субстрату в аналізованому розчині й реєструється за допомогою рН-ПТ.

Здійснюючи аналіз креатиніну в модельному буферному розчині, одержали типову калібрувальну криву з лінійним діапазоном від 0 до 2 мМ (рис. 1). Такого лінійного діапазону було цілком достатньо для визначення креатиніну в сироватці крові хворих на ниркову недостатність, де концентрація останнього сягає 1 мМ.

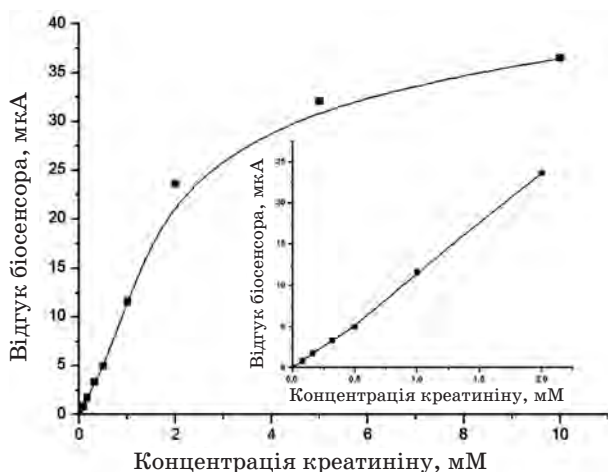


Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення концентрації креатиніну: вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури

Відомо, що сироватка крові є досить складним об'єктом для аналізу. Кров — багаторівнева буферна система, рН якої становить 7,37–7,44 із середньою величиною 7,4. До складу крові входять протеїни та непротеїнові азотисті компоненти, вуглеводи, жири, ліпіди, амінокислоти, електроліти, клітини, ензими, ліпопротеїди тощо [27]. Враховуючи вищевказане, вважали за доцільне дослідити вплив реальних зразків сироватки крові, які містили чи не містили креатинін, на відгук біосенсора. Для одержання необхідних проб сироватки крові без

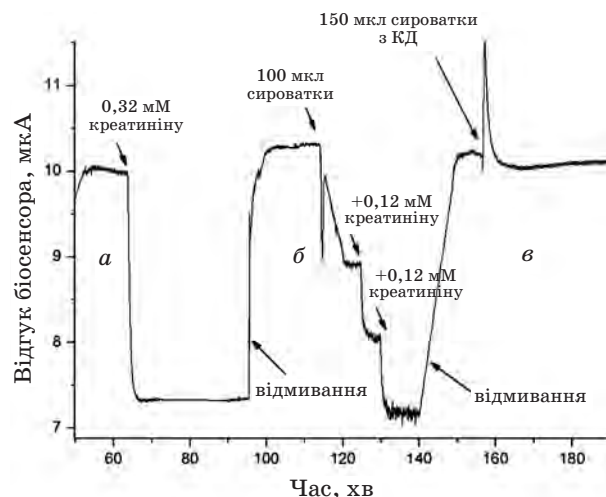


Рис. 2. Типові відгуки біосенсора на внесення у вимірювальну комірку субстрату та аліквоти сироватки крові без і з креатиніндаїміназою: вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури

вмісту креатиніну додавали певну кількість ензиму креатиніндаїмінази (КД) та інкубували близько 1 год, обережно перемішуючи час від часу, щоб видалити ендogenous креатинін. Далі таку пробу, в якій вже не було креатиніну, вносили у вимірювальну комірку й одержували відгуки.

Як видно з рис. 2, додавання аліквоти концентрованого розчину субстрату креатиніну до кінцевої концентрації 0,32 мМ спричинювало виникнення відгуку біосенсора (а). Після відмивання внесення аліквоти сироватки крові, що містила креатинін, також викликало відгук біосенсора, аналогічний за формою до відгуку на модельний розчин креатиніну (б). Подальше внесення субстрату в суміш, яка містила аліквоту сироватки, спричинювало сигнал біосенсора, пропорційний внесеній кількості модельного розчину субстрату, тимчасом як додавання сироватки крові, попередньо інкубованої з ензимом для видалення креатиніну, призводило до стрибка сигналу, який повертався на базову лінію через відсутність креатиніну в зразку (в). Наведені результати свідчать про те, що сироватка крові хворих на ниркову недостатність за розведення 1:10 зумовлює лише перехідний неспецифічний відгук, який фактично не впливає на біосенсорне визначення креатиніну, а розроблений біосенсор на основі КД є високоселективним.

Наступний етап досліджень полягав у визначенні концентрації креатиніну в зразках сироватки крові хворих на ниркову недостатність. Для встановлення концен-

трації креатиніну в пробах було застосовано класичний біосенсорний метод за калібрувальною кривою та метод стандартних додавань.

Результати біосенсорного визначення двома способами добре корелювали між собою (рис. 3).

Таким чином, обидва методи біосенсорного визначення креатиніну можуть бути використані для on-line-вимірювань вищевказаного метаболіту в клінічних лабораторіях. Однак слід зазначити, що в разі засто-

сування методу стандартних додавань збільшується час визначення креатиніну в пробі.

Дані біосенсорного визначення креатиніну порівнювали з результатами колориметричного методу на основі реакції Яффе, що його було проведено двома незалежними лабораторіями.

З рис. 4 та розрахованих коефіцієнтів кореляції видно, що краще корелюють дані, отримані за допомогою біосенсора та методу Яффе, виконаного лабораторією Сінево, $R=0,96$, що може бути пов'язано

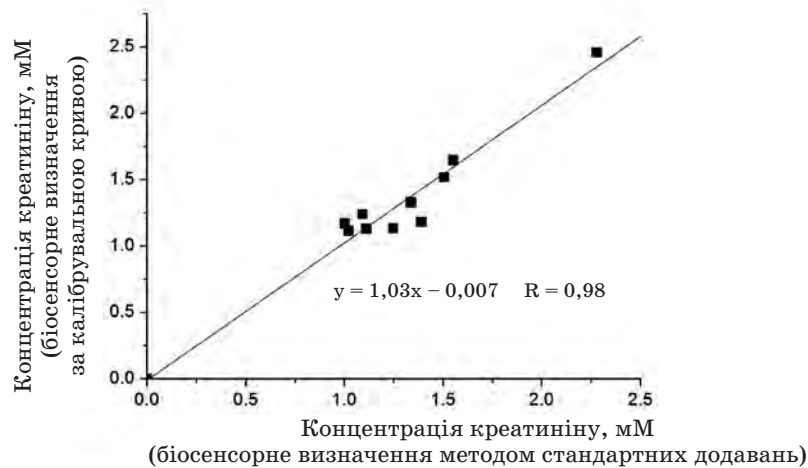


Рис. 3. Кореляція даних біосенсорного визначення вмісту креатиніну в сироватці крові двома способами: за калібрувальною кривою та методом стандартних додавань: вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури. Кінцеве розведення проби становило 1:10

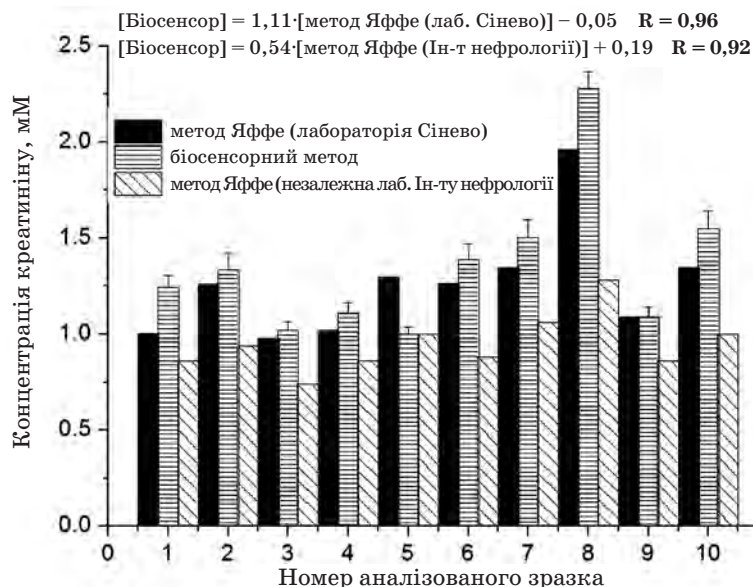


Рис. 4. Порівняння даних визначення креатиніну в зразках сироватки крові, отриманих за допомогою біосенсорного методу ($n = 5$, $P < 0,05$), та двох контрольних: спектрофотометричний метод Яффе (лабораторія Сінево та лабораторія Інституту нефрології НАМН України)

з використанням більш дорогих комерційних стандартизованих наборів та високою кваліфікацією персоналу лабораторії. У разі ж дослідження кореляції даних біосенсорного визначення та колориметричного методу Яффе, проведеного в лабораторії Інституту нефрології НАМН України, отримали коефіцієнт кореляції $R = 0,92$, що свідчить про дещо нижчу кореляцію.

Окрім того, було досліджено одну з найважливіших аналітичних характеристик роботи біосенсора — відтворюваність відгуків, а відповідно, точність визначення концентрації креатиніну в реальних зразках. Для дослідження цього робочого параметра впродовж одного робочого дня з інтервалом 30 хв вимірювали відгук на додавання 150 мкл сироватки крові.

Як можна побачити з рис. 5, біосенсор демонстрував високий рівень відтворюваності сигналу. Стандартне відхилення не перевищувало 5%.

Отже, за допомогою біосенсора на основі рН-ПТ та іммобілізованої КД було проведено кількісний аналіз концентрацій креатиніну

в реальних зразках. Вимірювання концентрацій креатиніну проводили двома способами — за калібрувальною кривою та методом стандартних додавань. Було показано, що обидва способи біосенсорного визначення креатиніну можуть бути використані, оскільки коефіцієнт кореляції між ними становив $R = 0,98$.

Окрім того, дані біосенсорного аналізу креатиніну порівнювали з результатами класичного методу на основі реакції Яффе, проведеного двома незалежними лабораторіями. В обох випадках біосенсорний метод добре корелював з традиційним методом — $R = 0,96$ (лабораторія Сінево), $R = 0,92$ (лабораторія Інституту нефрології НАМН України).

Під час роботи із сироваткою крові хворих на ниркову недостатність біосенсор демонстрував високу відтворюваність сигналу. Стандартне відхилення становило 3,5%.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб».

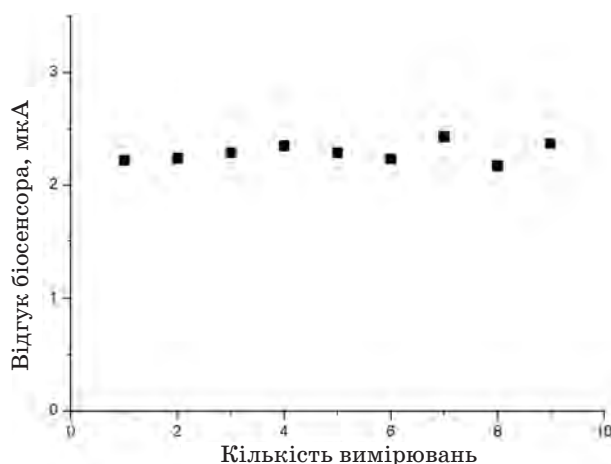


Рис. 5. Відтворюваність відгуків біосенсора на додавання сироватки крові (розведення 1:10): вимірювання проведено в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури

ЛІТЕРАТУРА

1. Sant W., Pourciel-Gouzy M. L., Launay J. Development of a creatinine-sensitive sensor for medical analysis // *Sens. Actuators B.* — 2002. — V. 103. — P. 260–264.
2. Pandey P. C., Mishra A. P. Novel potentiometric sensing of creatinine // *Ibid.* — 2004. — V. 99. — P. 230–235.
3. Killard A., Smyth M. Creatinine biosensors: principles and designs // *Tibtech.* — 2000. — V. 18. — P. 433–437.
4. Jaffe M. Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt. und über eine neue Reaktion des Kreatinins // *Z. Physiol. Chem.* — 1886. — V. 10. — P. 391–400.
5. Dobberpuhl Mo Y., Dash A. K. A simple HPLC method with pulsed EC detection for the analysis of creatine // *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* — 2003. — V. 32, N 1. — P. 125–132.

6. *Merás I. D., Mansilla A. E., Gymes J. R.* Determination of methotrexate, several pteridines, and creatinine in human urine, previous oxidation with potassium permanganate, using HPLC with photometric and fluorimetric serial detection // *Anal. Biochem.* — 2005. — V. 346, N 2. — P. 201–209.
7. *George S. K., Dipu M. T., Mehra U. R.* Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine // *J. Chromat. B.* — 2006. — V. 832, N 1. — P. 134–137.
8. *Samanidou V. F., Metaxa A. S., Paradoyannis I. N.* Direct simultaneous determination of uremic toxins: Creatine, creatinine, uric acid, and xanthine in human biofluids by HPLC // *J. Liq. Chromatogr. A.* — 2002. — V. 25, N 1. — P. 43–57.
9. *Yokoyama Y., Horikoshi S., Takahashi T., Sato H.* A Low-capacity cation-exchange chromatography of ultraviolet-absorbing urinary basic metabolites using a reversed-phase column coated with hexadecylsulfonate // *J. Chromatogr. A.* — 2000. — V. 886, N 1–2. — P. 297–302.
10. *Yokoyama Y., Tsuji S., Sato H.* Simultaneous determination of creatinine, creatine, and UV-absorbing amino acids using dual-mode gradient low-capacity cation-exchange chromatography // *Ibid.* — 2005. — V. 1085, N 1. — P. 110–116.
11. *Burke D. G., MacLean P. G., Walker R. A.* Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. B.* — 1999. — V. 732, N 7. — P. 479–485.
12. *Tran T. C., Huq T. A., Kantes H. L.* Determination of creatinine and other uremic toxins in human blood sera with micellar electrokinetic capillary electrophoresis // *Ibid.* — 1997. — V. 690, N 8. — P. 35–42.
13. *Pobo y E., Radomska A., Koncki R., G b S.* Determination of dialysate creatinine by micellar electrokinetic chromatography // *Ibid.* — 2003. — V. 789. — P. 417–424.
14. *Yao T., Kotegawa K.* Simultaneous flow-injection assay of creatinine and creatine in serum by the combined use of a 16-way switching valve, some specific enzyme reactors and a highly selective hydrogen peroxide electrode // *Anal. Chem. Acta.* — 2002. — V. 462, N 9. — P. 283–291.
15. *Costa A. C. O., Costa J. L., Tonin F. G. et al.* Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples // *J. Chromatogr. A.* — 2007. — V. 1171. — P. 140–143.
16. *Zinellu A., Sotgia S., Zinellu E. et al.* Assay for the simultaneous determination of guanidinoacetic acid, creatinine and creatine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV-detection // *J. Sep. Sci.* — 2006. — V. 29, N 5. — P. 704–708.
17. *Tuma P., Samcova E., Balinova P.* Determination of 3-methylhistidine and 1-methylhistidine in untreated urine samples by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. B.* — 2005. — V. 821, N 1. — P. 53–59.
18. *Rodrigues J., Berzas J. J., Casta eda G.* Very fast and direct capillary zone electrophoresis method for the determination of creatinine and creatine in human urine // *Anal. Acta.* — 2004. — V. 521, N 1. — P. 53–59.
19. *Zinellu A., Caria M. A., Tavera C.* Plasma creatinine and creatine quantification by capillary electrophoresis diode array detector // *Anal. Biochem.* — 2005. — V. 342, N 2. — P. 186–193.
20. *Kvasnička F., Voldřich M.* Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products // *Electrophoresis.* — 2000. — V. 21. — P. 2848–2850.
21. *Hušková R., Chrastina P., Adam T., Schneiderka P.* Determination of creatinine in urine by tandem mass spectrometry // *Clin. Chim. Acta.* — 2004. — V. 350. — P. 99–106.
22. *Satoh W., Hosono H., Yokomaku H. et al.* Integrated Electrochemical Analysis System with Microfluidic and Sensing Functions // *Sensor.* — 2008. — V. 8. — P. 1111–1127.
23. *Hsiue G., Lu P., Chen J.* Multienzyme-immobilized modified polypropylene membrane for an amperometric creatinine biosensor // *J. Appl. Polym. Sci.* — 2004. — V. 92. — P. 3126–3134.
24. *Kukla O., Pavluchenko O., Goltvyanskii Yu. et al.* Sensor arrays based on differential ISFET elements for monitoring toxic substances of natural and artificial origin // *Sensor Electr. Microsyst. Technol.* — 2008. — V. 2. — P. 58–68.
25. *Pavluchenko A., Kukla A., Goltvyanskii Yu. et al.* Study of stability of characteristics of pH-sensitive field-effect transistors // *Optoelectr. Semicond. Techn.* — 2010. — V. 45. — P. 90–99.
26. *Otto M.* Modern methods of analytical chemistry / Ed. Garmash A. V. — M.: Technoshpere. — 2003. — V. 1. — P. 36.
27. *Berezov T., Korovkin B.* Biological chemistry. — M: Medicine, 1998. — P. 567–591.

**БИОСЕНСОР
НА ОСНОВЕ КРЕАТИНИНДЕИМИНАЗЫ
И pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ПОЛЕВОГО
ТРАНЗИСТОРА ДЛЯ АНАЛИЗА
КРЕАТИНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

*С. В. Марченко¹, А. А. Зинченко¹,
Л. С. Поляков², А. Н. Герешко³,
С. В. Дзядевич¹, А. П. Солдаткин¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Учебно-научный центр «Институт биологии»
КГУ имени Тараса Шевченко

³Национальный университет
пищевых технологий, Киев

E-mail:svmarchenkosc@ukr.net

Креатинин — один из важнейших аналитов в современном клиническом анализе. Определение этого метаболита в различных физиологических жидкостях организма является существенным для оценки почечной, мышечной и тиреоидной дисфункции. Креатинин считается общепринятым диагностическим показателем функции почек, уровень которого необходимо контролировать во время процедуры гемодиализа. Эксперименты были проведены с использованием потенциометрического метода измерений. Биочувствительный элемент для определения креатинина был создан на основе высокоселективного фермента креатининдеиминазы. Имобилизацию фермента на поверхность pH-чувствительного полевого транзистора осуществляли с помощью фотополимера. В результате экспериментальных исследований был создан биоселективный элемент биосенсора на основе креатининдеиминазы. Оптимизированы основные аналитические характеристики разработанного биосенсора, определены оптимальные условия для исследований с реальными образцами. Показано, что биосенсор на основе креатининдеиминазы стабилен, его отклики воспроизводимы, а диапазон линейности находится в границах 0–2 мМ с минимальной границей определения 0,02 мМ. Проведены количественное определение содержания креатинина в сыворотке крови и сравнительный анализ данных биосенсорного определения с контрольным методом (показана высокая корреляция — $R = 0,96$). Разработанный потенциометрический биосенсор на основе pH-чувствительного полевого транзистора и иммобилизованной креатининдеиминазы, преимуществом которого является высокая чувствительность и селективность, можно применять для количественной оценки содержания креатинина в сыворотке крови больных с почечной недостаточностью, а также для контроля эффективности процедуры гемодиализа.

Ключевые слова: креатинин, почечная недостаточность, биосенсор, креатининдеиминаза, pH-чувствительный полевой транзистор.

**BIOSENSOR BASED
ON CREATININE DEIMINASE
AND pH-SENSITIVE FIELD-EFFECT
TRANSISTOR FOR CREATININE
ANALYSIS IN BLOOD SERUM**

*S. V. Marchenko¹, O. A. Zinchenko¹,
L. S. Poliakov², A. M. Gereshko³,
S. V. Dzyadevych¹, O. P. Soldatkin¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv,
Ukraine

²Educational and Scientific Centre «Institute
of Biology» of Kyiv National Shevchenko
University, Ukraine

³National University of Food Technologies,
Kyiv, Ukraine

E-mail:svmarchenkosc@ukr.net

Creatinine is one of the most important analytes in up-to-date clinical analysis. Detection of this metabolite in different physiological body fluids is helpful for the estimation of kidney, muscle, and thyroid disorders. Creatinine is a marker of renal glomerular filtration and is commonly considered as a diagnostic characteristic of the kidney function, the level of which should be controlled to assess the hemodialysis procedure. The experiments were carried out by potentiometric measuring method. A biosensitive element for creatinine detection was created on the basis of highly selective enzyme creatinine deiminase. The enzyme immobilization onto the surface of pH-sensitive field-effect transistor was performed using photopolymer. The creatinine deiminase-based bioselective element was developed. The main analytical characteristics of the developed biosensor were optimized, optimal conditions for the experiments with real samples were found. It was shown that biosensor based on creatinine deiminase is stable. The responses of biosensor were reproducible and liner range was from 0 to 2 mM with detection limit 0,02 mM. Quantitative determination of creatinine concentration in blood serum was elaborated; the data of biosensor measurement were compared with those obtained by the control method, high correlation was shown $R = 0,96$. A biosensor based on pH-sensitive field-effect transistor and immobilized creatinine deiminase, advantageous for its high sensitivity and selectivity, might be utilized for the quantitative evaluation of creatinine concentration in blood serum of the patients with renal failure as well as for monitoring hemodialysis efficiency.

Key words: creatinine, renal failure, biosensor, creatinine deiminase, pH-sensitive field-effect transistor.