

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 547.495.2, 543.92, 543.066

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ СЕЧОВИНИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЛЮДИНИ

*С.В. Марченко, О.А. Зінченко, О.Л. Кукла¹, О.С. Павлюченко¹,
С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін*

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
03143, Київ, вул. Заболотного 150, тел/факс. 526 43 97, e-mail: svmarchenkosv@ukr.net
¹Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, 03028,
Київ, просп. Науки, 41*

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ СЕЧОВИНИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЛЮДИНИ

*С.В. Марченко, О.А. Зінченко, О.Л. Кукла, О.С. Павлюченко,
С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін*

Анотація. В роботі продемонстровано застосування високочутливого та селективного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої уреазу для визначення сечовини. Оптимізовано основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора, визначено оптимальні умови для проведення досліджень з реальними зразками крові. Показано принципову можливість використання уреазного біосенсора для визначення вмісту сечовини в сироватці крові хворих на ниркову недостатність.

Ключові слова: сечовина, біосенсор, уреазу, рН-чутливий польовий транзистор, кров

OPTIMIZATION OF BIOSENSOR DETERMINATION OF UREA CONCENTRATION IN HUMAN BLOOD

*S.V. Marchenko, O.A. Zinchenko, O.L. Kukla, O.S. Pavluchenko,
S.V. Dzyadevych, O.P. Soldatkin*

Abstract. An application of the highly sensitive and selective biosensor based on pH-sensitive field-effect transistor and immobilized urease for urea analysis was demonstrated in this work. The main analytical characteristics of the biosensor developed were determined; the conditions of urea measurement in real samples of blood were optimized. A conceptual possibility of application of the biosensor for detection of urea concentration in blood serum of patients suffering from renal insufficiency was shown.

Keywords: urea, biosensor, urease, pH-sensitive field-effect transistor, blood

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСЕНСОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

*С.В. Марченко, Е.А. Зинченко, А.Л. Кукла, А.С. Павлюченко,
С.В. Дзядевич, А.П. Солдаткин*

Аннотация. В работе продемонстрировано применение высокочувствительного и селективного биосенсора на основе рН-чувствительных полевых транзисторов и иммобилизированной уреазы для определения мочевины. Оптимизированы основные аналитические характеристики разработанного биосенсора, определены оптимальные условия для проведения исследований с реальными образцами крови. Показано принципиальную возможность использования уреазного биосенсора для определения содержания мочевины в сыворотке крови больных почечной недостаточностью.

Ключевые слова: мочевина, биосенсор, уреазы, рН-чувствительный полевой транзистор, кровь

Вступ

Вирішення питань, пов'язаних з охороною здоров'я населення і ранньою діагностикою захворювань потребує розвитку нових та ефективних методів визначення компонентів біологічних рідин – маркерів функціонування органів та систем органів людського організму. Такі вимоги, насамперед, обумовлені розвитком практичної медицини і біотехнології. Ці галузі потребують розробки та створення нових систем діагностики, що поєднували б в собі високу специфічність, чутливість, експресність та були здатні до мініатюризації. Ці потреби можуть бути повністю реалізовані з використанням біосенсорних приладів, які об'єднують в собі передові досягнення в розвитку біології, фізики, мікроелектроніки. Потенціометричні сенсорні елементи на основі іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ) є дуже перспективними з точки зору побудови мультисенсорних систем для хімічного, медичного та екологічного моніторингу, оскільки вони мають високу чутливість, швидкодію, малі розміри, сумісні зі стандартними мікроелектронними технологіями та придатні для масового виробництва [1 - 3].

Дедалі ширших перспектив розвитку набувають біосенсори в медицині, особливо вони необхідні для контролю вмісту сечовини в сироватці крові у хворих на ниркову недостатність. Саме сечовина є тією біомолекулою, моніторинг якої надає інформацію про стан нирок [4], і при ранній діагностиці забезпечує своєчасному наданню медичної допомоги та зменшує розвиток хронічної чи тяжкої форм захворювання. Визначення концентрації сечовини в сироватці крові є одним з найпоширеніших тестів в клінічній лабораторній діагностиці [5, 6].

Сечовина – кінцевий та головний продукт обміну білків, її рівень дає інформацію про стан системи травлення в цілому. Крім того, цей метаболіт виступає маркером широкого спектру низько- та середньомолекулярних токсичних речовин, що акумулюються у хворих з порушеною нирковою функцією, а також являється діагностичним показником функції печінки [7-9]. Утворення сечовини відбувається в печінці завдяки функціонуванню так званого орнітинового циклу сечоутворення Кребса [10]. Даний цикл являє собою послідовність ферментативних реакцій, в результаті яких із діоксиду вуглецю та аміаку, що утворюється в ході дезамінування амінокислот, відбувається синтез сечовини.

Через кров сечовина потрапляє до нирок і виводиться із сечею. Знижений рівень сечовини в крові спостерігається дуже рідко і свідчить про тяжку хворобу печінки або ж про недостатнє вживання (всмоктування) білків. Дуже високий рівень сечовини є причиною тяжкої дисфункції нирок, названої синдромом уремії. Фізіологічна концентрація сечовини у крові знаходиться в межах 2,5 – 8,6 мМ, залежно від режиму харчування. Значне зростання концентрації сечовини відбувається під час хронічної та гострої форм ниркової недостатності (50 – 70 та 120 – 150 мМ, відповідно) [11]. При концентрації сечовини понад 30 мМ [12, 7] хворому необхідно проводити процедуру гемодіалізу.

В сучасній лабораторній діагностиці для моніторингу захворювань нирок використовують “прямі” хімічні методи, найчастіше реакція Фенрона або диацетилмонооксимний метод [13], та ферментативні методи. Останні ґрунтуються на використанні ферменту уреазы, яка розщеплює

сечовину до вуглекислого газу та аміаку, а вже концентрацію аміаку визначають колориметрично. Або ж використовують каскади ферментативних перетворень, де на першій стадії за участю уреазу утворюється аміак, а далі інші ферменти, наприклад, глутаматдегідрогеназа, за участю кофермента НАДН₂, кетоглутарату та АТФ каталізує утворення глютамінової кислоти і АДФ.

В даному випадку контролюють зменшення поглинання при 340 нм, що викликано утворенням аміаку. Але слід зауважити, що всі ці методи в кінцевому результаті пов'язані з утворенням кольорового комплексу, інтенсивність забарвлення якого визначає чутливість методу. А оскільки, забарвлення комплексу, що аналізується, змінюється з часом, то це, в свою чергу, вносить суттєву похибку в аналіз [14]. Крім того, вказані вище методи складні у використанні в зв'язку з цілим комплексом реакцій, на якому ґрунтується аналіз, потребують попередньої пробопідготовки, непридатні для on-line вимірювань. Для вирішення даних проблем необхідно створити чутливі і селективні методи для експрес-діагностики ниркової недостатності.

Висока чутливість і селективність, оперативність отримання результатів, можливість роботи в польових умовах, відносна простота [15], придатність для on-line вимірювань дозволяють запропонувати для визначення сечовини біосенсорний метод на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої уреазу.

Матеріали і методи

Матеріали

В роботі використовували фермент уреазу з бобів сої (КФ 3.5.1.5) з активністю 66,3 од.акт./мг виробництва фірми "Fluka" (Швейцарія), сироватковий альбумін бика фракція V виробництва фірми "Sigma" (Німеччина), 25 % розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми „Sigma-Aldrich Chimie”, сечовина фірми "Sigma" (США). Робочим буферним розчином був фосфатний буфер (KH₂PO₄-NaOH), рН 7,4 фірми «Helicon» (Москва, Росія). Інші, використані в роботі реактиви, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти "х.ч." та "ч.д.а."

Сироватка крові для досліджень на вміст сечовини була люб'язно надана Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу.

Будова перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів

В роботі використовували сенсорні чипи з диференційною парою рН-чутливих польових транзисторів. Розроблена топологія передбачала розміщення двох ідентичних р-канальних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8x8 мм [1]. Для усунення можливості утворення паразитного каналу провідності між обома транзисторами кристал містив захисну роздільну p⁺-область шириною 50 мкм. Контакти до стоку й витоку кожного із транзисторних елементів були сформовані протяжними p⁺-дифузійними шинами, виведеними на край чипу разом із контактом до n-підкладки. Чип включав також два додаткові МОН-транзистори з виведеними контактними площинами, по структурі аналогічними сенсорним елементам, але з металевим затвором. Останні призначені для тестування електричних параметрів виготовлених структур без необхідності забезпечувати контакт кристалу з розчином електроліту.

Загальний вигляд рН-чутливих польових транзисторів представлений на Рис. 1.

Для виготовлення ІСПТ-структур використовувались стандартні операції кремнієвої МОН-технології. Поперечний розріз р-канальної структури показаний на Рис. 2а. В якості підкладки використовувались кремнієві пластини n-типу КЕФ 4,5 <100> з концентрацією домішок 10¹⁵ см⁻³. На поверхні за рахунок термічного окислення в потоці вологого кисню за температури 1100 °С отримували шар SiO₂ товщиною 0,65 мкм. В процесі двохстадійної дифузії товщина SiO₂ збільшувалась до 0,8 мкм. Р-n-перехід областей стоку і витоку глибиною 4 мкм забезпечував величину пробивної напруги

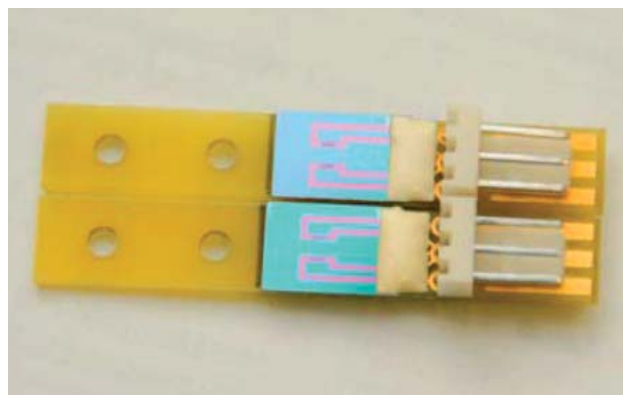


Рис. 1. Загальний вигляд сенсорних електродів на основі рН-чутливих польових транзисторів

не менше 40 В [16]. Двохшаровий підзатворний діелектрик складався із шарів оксиду і нітриду кремнію товщиною 50 нм кожний. Зигзагоподібна геометрія затворної області транзистора з відношення довжини каналу до його ширини, рівним 100, забезпечувала достатньо високий коефіцієнт підсилення р-канальних транзисторів.

Іон-селективні властивості транзисторів обумовлені рН-чутливим діелектричним шаром Si_3N_4 , нанесеним на їх затворну область. Величина рН-чутливості сенсорних елементів становила близько 40 мВ/рН, що при наявній крутизні перехідної вольт-амперної характеристики транзистора в межах 400-500 мкА/В забезпечувало рН-чутливість струму каналу порядку 15-20 мкА/рН.

Вимірювання відгуку рН-ПТ відбувалося за допомогою схеми прямого вимірювання струму в каналі польового транзистора з активним навантаженням. Порогова напруга для використовуваних рН-ПТ була близько -2,5 В. Вимірювання проводились за умов: струм каналу близько 500 мкА, напруга стік-витік близько 2 В, підкладка з'єднана із стоком [17] (Рис. 2б).

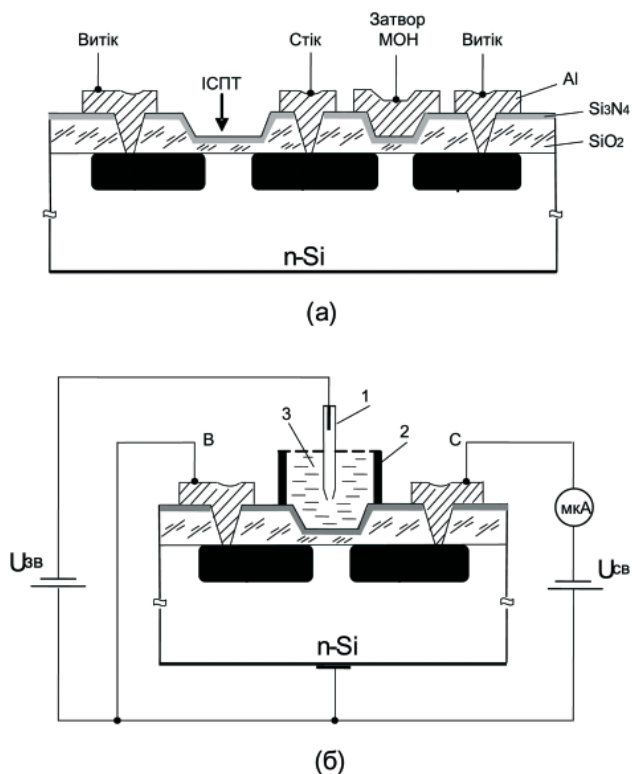


Рис. 2. Поперечний розріз кремнієвої структури, на якому сформовані ІСПТ і МОП транзистори (а), а також схема підключення ІСПТ для проведення вимірювань (б): 1 – електрод порівняння, 2 – електрохімічна комірка, 3 – розчин

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

Виготовлення біоселективних мембран на поверхнях рН-ПТ

Для виготовлення робочої біоселективної мембрани на основі уреазу за основу було взято метод, розроблений в нашій лабораторії [18]. Для цього готували розчин з вмістом: 10 % уреазу + 10 % БСА. Наважки ферменту розчиняли у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 з 10% гліцерином, який використовувався для стабілізації ферменту при іммобілізації та для запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали БСА, кінцева концентрація якого становила 20 %. Перед нанесенням робочі поверхні перетворювачів знежирювали етанолом та промивали дистильованою водою. Отримані розчини за допомогою мікропіпетки "Eppendorf" 0,1-2,5 мкл наносили на робочі поверхні рН-ПТ до повного їх покриття. Всі мембрани були з однаковим кінцевим вмістом білку. Для полімеризації мембран датчики поміщали в атмосферу насичених парів ГА. Потім мембрани висушували протягом 15-20 хв. на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи мембрани відмивали робочим буферним розчином від надлишку нез'язаного ГА до стабілізації базового сигналу.

Визначення вмісту сечовини у модельних розчинах

Визначення концентрації сечовини в модельних розчинах проводили в 5 мМ калій-фосфатному буферному розчині, рН 7,4 за кімнатної температури. Використовувалась робоча комірка відкритого типу об'ємом 1,5 мл з інтенсивним перемішуванням. Перед початком роботи датчики з іммобілізованими мембранами деякий час (приблизно 20-30 хв.) відмивали від надлишків нез'язаного ГА до стабілізації базової лінії. Кон-

центрацію субстрату змінювали, додаючи певні аліквоти вихідного концентрованого розчину. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали від продукту, змінюючи робочий буфер мінімум 3 рази кожні 2 хв.

Визначення вмісту сечовини в сироватці крові

Аналіз сечовини проводили в 10 пробах сироватки крові хворих на ниркову недостатність. Вимірювання за допомогою потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої уреазі проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням. Визначення концентрації сечовини в аналізованих зразках здійснювали за калібрувальною кривою. Перед вимірюванням пробу сироватки крові розводили в два рази робочим буфером, а потім 6 мкл суміші вносили до вимірювальної комірки об'ємом 1,5 мл. В результаті, кінцеве розведення сироватки крові в робочій комірці становило 500 разів.

Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Контрольне визначення концентрації сечовини в сироватці крові проводили за допомогою класичного спектрофотометричного методу на основі діацетилмонооксимної реакції [13] та з використанням ферментної системи з уреазою та пероксидазою [14].

Результати та обговорення

Біосенсор було розроблено на основі рН-чутливих польових транзисторів та ферменту уреазі [19, 20]. При аналізі сечовини біосенсорним методом сечовина потрапляє в біоселективну мембрану біосенсора та в результаті ферментативного гідролізу розщеплюється до двох іонів амонію та іону бікарбонату [5, 11, 12]:

Уреаза



В ході ферментативної реакції відбувається поглинання протонів з розчину, що призводить до збільшення рН робочого буферного розчину в біоселективній мембрані над робочим рН-ПТ, що, власне, і є причиною виникнення сигналу потенціометричного біосенсора.

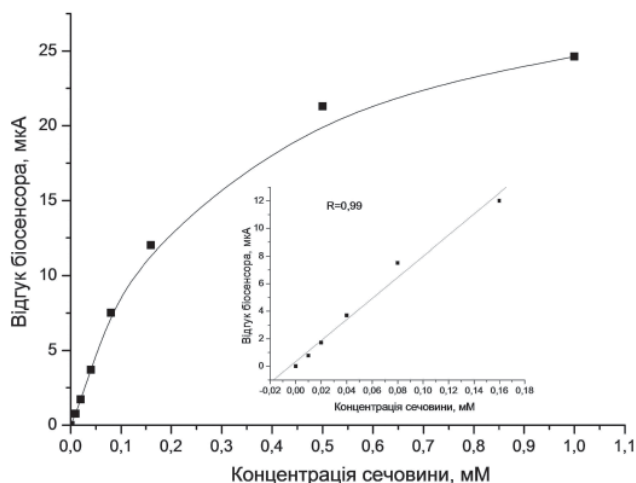


Рис. 3. Калібрувальна крива визначення концентрації сечовини в модельному розчині. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури

При визначенні концентрації сечовини в модельних розчинах уреазний біосенсор демонстрував типову кінетику ферментативної реакції. Отримана калібрувальна крива визначення концентрації сечовини була лінійною в діапазоні концентрацій від 0,02 до 0,16 мМ (Рис. 3). Мінімальна концентрація сечовини, що може бути визначена розробленим біосенсором співпадала з нижньою межею лінійного діапазону визначення.

Було досліджено аналітичні характеристики біосенсора при роботі з модельними зразками. Біосенсор характеризувався високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналів, стабільністю при зберіганні [19] (крім того, наші нові не представлені дані). Лінійний діапазон визначення сечовини був достатнім для роботи з сироваткою крові хворих на ниркову недостатність при розведенні в 500 разів.

При роботі з сироваткою крові слід враховувати велику кількість речовин, що можуть стати причиною виникнення неспецифічного сигналу. Це можуть бути білки, чи інші низькомолекулярні компоненти крові. Тому важливим завданням було дослідити такий вплив на відгук біосенсора. До проби сироватки крові додавали певну кількість ферменту уреазі та інкубували близько години, обережно перемішуючи час від часу, щоб видалити ендогенну сечовину. Далі таку пробу, в якій вже не було сечовини, додавали у вимірювальну комірку.

Як можна бачити з Рис. 4 додавання аліквоти сироватки крові спричиняло виникнення відгуку біосенсора, аналогічного відгуку на чисту сечо-

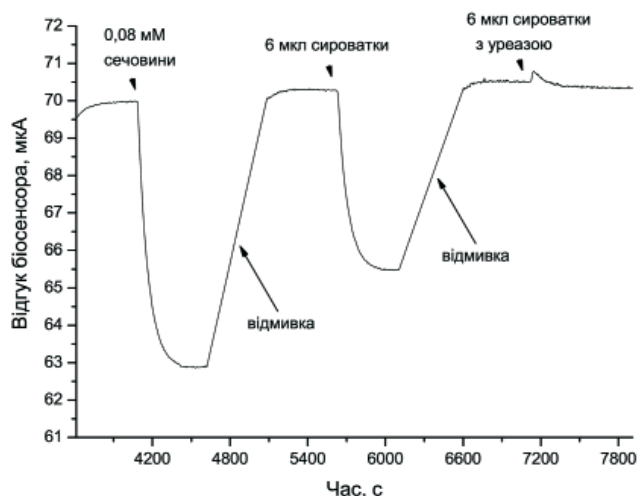


Рис. 4. Відгуки біосенсора на внесення субстрату, аліквоти сироватки крові без та з уреазою у вимірювальну комірку. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури

вину. Тоді ж як додавання сироватки крові інкубованої з ферментом призводило до незначного стрибку сигналу, який повертався на базову лінію за рахунок відсутності сечовини в зразку. Наведені результати свідчать про те, що сироватка крові хворих на ниркову недостатність при розведенні в 500 разів фактично не викликає неспецифічного відгуку, а розроблений уреазний біосенсор є високоселективним до сечовини.

Наступним етапом дослідження було перевірити вплив білку (відомо, що в крові здорової людини міститься 7,5 % білку) на відгук біосенсора. Для дослідження в робочий буфер додавали сироватковий альбумін бика у кінцевих концентраціях 0,02 та 1 %. На Рис. 5 представлені калібрувальні криві визначення сечовини за різних концентрацій білку.

Із отриманих даних (Рис. 4 та 5) можна зробити висновок, що присутність високомолекулярної фракції (білку) в буфері у концентраціях з врахуванням розведення не призводить до виникнення значного неспецифічного відгуку та майже не впливає на його величину.

Таким чином, змодельовані компоненти крові майже не впливають на відгук уреазного біосенсора. Тому наступним етапом дослідження було визначення вмісту сечовини в сироватці крові хворих на ниркову недостатність. Для визначення концентрації сечовини в пробах було застосовано класичний біосенсорний метод за калібрувальною кривою. Вимірювання проводили в 10 зразках сироватки крові з розведенням у 500

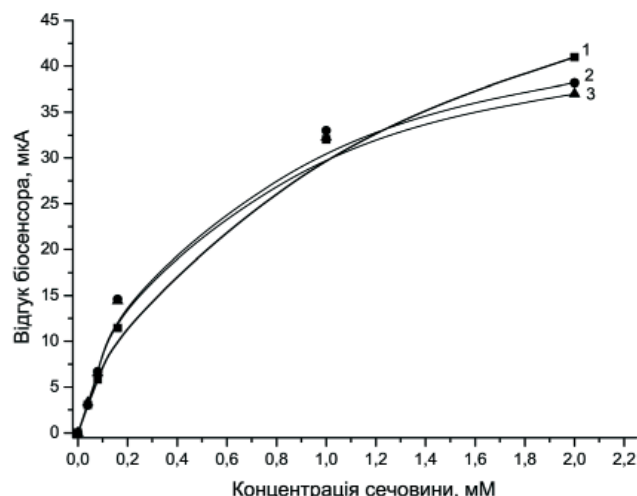


Рис. 5. Калібрувальні криві визначення сечовини за різних концентрацій білку: 1) 5 мМ фосфатний буфер, рН 7,4; 2) 5 мМ фосфатний буфер, рН 7,4 + 0,02 % БСА; 3) 5 мМ фосфатний буфер, рН 7,4 + 1 % БСА

разів. В якості робочого буферу використовували 5 мМ фосфатний буфер, рН 7,4. Перед кожним визначенням концентрацій сечовини в сироватці крові проводили оцінку величини відгуку на 0,04 мМ концентрацію модельного розчину сечовини, щоб була можливість постійного підкалібрування біосенсора.

До електрохімічної комірки об'ємом 1,5 мл додавали відому концентрацію сечовини, а потім після відмивки 6 мкл суміші (сироватка крові + буфер у співвідношенні 1:1), що призводило до кінцевого розведення сироватки в 500 разів. Порівняння величин отриманих відгуків на відому концентрацію сечовини та пробу сироватки крові дозволяло оцінювати вміст сечовини в останній. Відгук на чисту сечовину був показником стабільної роботи біосенсора.

На Рис. 7 представлено порівняльні результати аналізу, отримані за допомогою різних методів. З рисунку та розрахованого коефіцієнту кореляції видно, що краще корелюють дані, отримані за допомогою біосенсора та з використанням ферментної системи Уреаза/Пероксидаза, $R=0,92$, що може бути пов'язаним з використанням в обох випадках ферментативних реакцій в основі методів. У випадку ж хімічного аналізу на основі діацетилмонооксимної реакції основним недоліком є світлочутливість комплексу, який утворюється, і впливає на результати аналізу, про що і може свідчити коефіцієнт кореляції $R=0,76$.

Однією з найважливіших характеристик біосенсора є відтворюваність сигналу, яку досліджу-

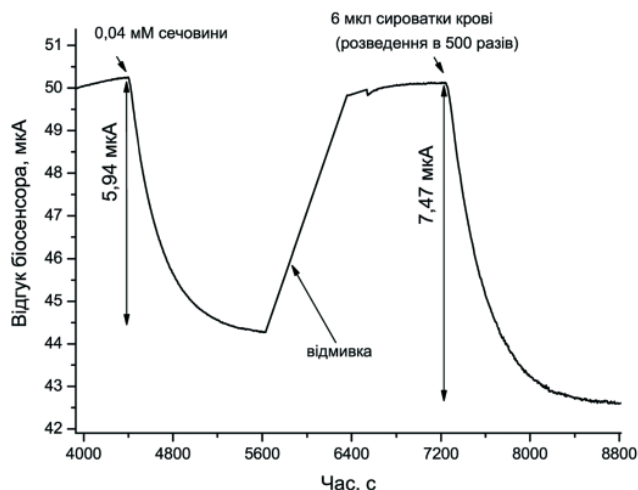


Рис. 6. Процедура визначення невідомої концентрації сечовини в сироватці крові хворого на ниркову недостатність. Вимірювання проводили в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури

вали як в умовах визначення сечовини в модельних розчинах, так і в реальних зразках сироватки крові. Для дослідження цього робочого параметру, впродовж одного робочого дня з інтервалом 30 хв. вимірювали відгук на одну і ту ж концентрацію субстрату 0,08 мМ сечовина у випадку модельних розчинів, і 6 мкл суміші (сироватка крові + буфер) у випадку реальних проб. Як можна бачити з Рис. 8, біосенсор в обох варіантах демонстрував високий рівень відтворюваності сигналів.

Також було вивчено стабільність уреазного біосенсора при зберіганні в сухому стані за температури + 4 °С. Майже щодня сенсор використовували для аналізу сечовини в сироватці крові (1-3 аналізи). Тому, власне, це був не чистий тест на стабільність при зберіганні, а змішаний тест на стабільність при зберіганні та стабільність при багаторазовому використанні. Для перевірки активності ферменту в біоселективній мембрані після роботи з реальними зразками біосенсор повністю відмивали робочим буфером та вимірювали відгуки на 1 мМ сечовину, і вони не відрізнялись від таких, отриманих до роботи зі зразками сироватки крові. Тобто можна підсумувати, що кров не впливає на роботу сенсора в цілому. Як видно з Рис. 9, при такому режимі роботи, протягом двох тижнів сенсор залишався стабільним, далі його активність різко падає, що можна пояснити різними причинами: забивання мембран білком крові, вимивання ферменту з мембрани, чи інгібіторним впливом інших компонентів крові. Але такий алгоритм зберігання біосенсорів не передбачений,

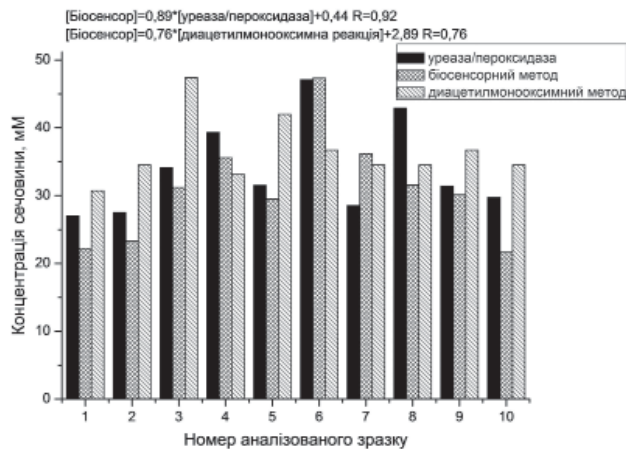


Рис. 7. Порівняння даних, отриманих за допомогою різних методів

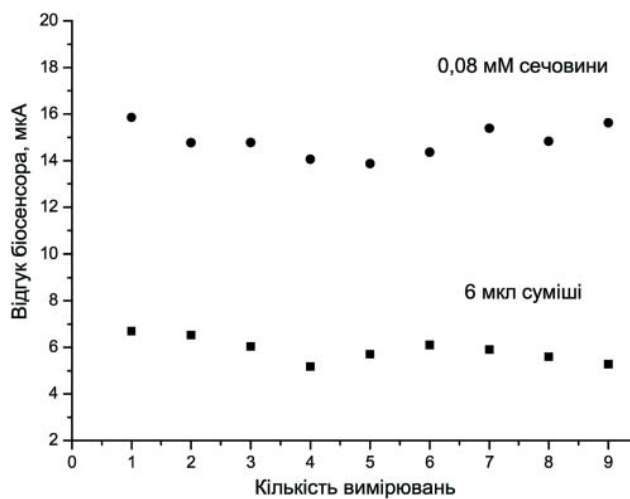


Рис. 8. Результати дослідження відтворюваності сигналів біосенсора при визначенні сечовини в модельних розчинах та зразках сироватки крові. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури

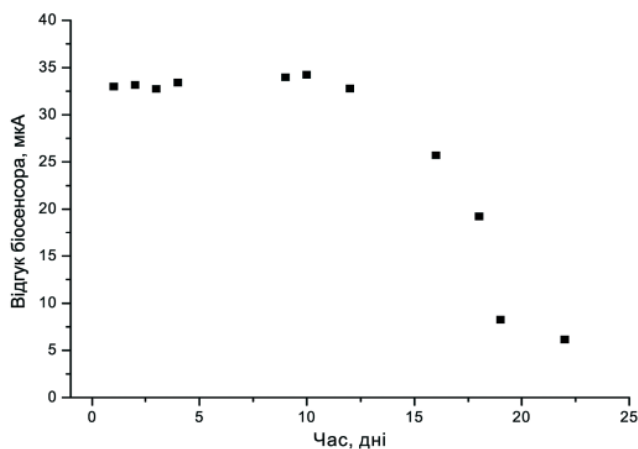


Рис. 9. Залежність величини відгуку уреазного біосенсора від часу зберігання у сухому стані за температури + 4 °С

тому можна сподіватися, що реальна стабільність уреазних біосенсорів значно вища.

Таким чином, у ході роботи було відпрацьовано методику визначення вмісту сечовини у сироватці крові хворих на ниркову недостатність за допомогою розробленого потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої в парах ГА уреазі. Не зважаючи на багатокомпонентний склад крові, було показано, що це майже не впливає на відгук біосенсора. Такий феномен, можна пояснити тим, що біозразки розводили в 500 разів і в роботі використовувався диференційний режим вимірювання.

Було вивчено відтворюваність відгуків біосенсора та досліджено його стабільність при зберіганні за умов щоденної роботи зі зразками сироватки крові.

За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрацій сечовини в 10 зразках сироватки крові хворих. Дані, отримані уреазним біосенсором порівнювали з двома контрольними методами. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою біосенсора, із даними з використанням ферментної системи Уреаза/Пероксидаза, коефіцієнт кореляції $R=0,92$.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми “Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб”.

Література

1. Кукла О.Л., Павлюченко О.С., Голтвянський Ю.В., Солдаткін О.О., Архипова В.М., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П., Сенсорні масиви на основі диференційних ІСПТ елементів для моніторингу токсичних речовин природного та штучного походження // Сенсорна мікроелектроніка та мікросистемні технології. – 2008. – 2.- С. 58 – 68.
2. Архипова В.М., Дзядевич С.В., Єфімов Д.А., Солдаткін О.П., Вивчення можливостей практичного застосування потенціометричних біосенсорів для аналізу глюкози в крові людини // Сенсорна мікроелектроніка та мікросистемні технології. – 2009. – 1.- С. 42 – 49.
3. Sant W., Pourciel M.L., Launay J., T. Do Conto, Martinez A., Temple-Boyer P., Development of chemical field effect transistors for the detection of urea // Sensor and Actuators B. – 2003. – Vol.95. – P. 309 – 314.
4. Kuralay F., Özyörük H., Yildiz A., Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film // Sensor and Actuators B. – 2006. – Vol.114. – P. 500 – 506.
5. Melo de J.V., Soldatkin A.P., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Cosnier S., Use of competitive inhibition for driving sensitivity and dynamic range of urea ENFETs // Biosensors and Bioelectronics. – 2003. - № 18. – P. 345 – 351.
6. Sahney R., Puri B.K., Anand S., Enzyme coated glass pH-electrode: Its fabrication and application in the determination of urea in blood samples // Analytica Chimica Acta. – 2005. – Vol. 542. – P. 157 – 161.
7. Chen J.C., Chou J.C., Sun T.P., Hsiung S.K., Portable urea biosensor based on the extended-gate field effect transistor // Sensor and Actuators B. – 2003. – Vol. 91. – P. 180 – 186.
8. Yoneyama K., Fujino Y., Osaka T., Satoh I., Amperometric sensing system for the detection of urea by a combination of the pH-stat method and flow injection analysis // Sensor and Actuators B. – 2001. – Vol.76. – P. 152 – 157.
9. Gutiérrez M., Alegret S., del Valle M., Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples // Biosensor and Bioelectronics. – 2008. – Vol.23. – P. 795 – 802.
10. Березов Т.Т., Коровин Б.Ф., Биологическая химия. – М: Медицина, 1998.- С. 448 – 451.
11. Koncki R., Recent development in potentiometric biosensors for biomedical analysis // Analytica Chimica Acta. – 2007. – Vol. 599. – P. 7 – 15.
12. Dhawan G., Sumana G., Malhotra B.D., Recent development in urea biosensors // Biochemical Engineering Journal. – 2009.- Vol. 44. – P. 42 – 52.
13. Fearon W.R., The carbamide diacetyl reaction: a test for citrulline // Biochem. J. – 1939. – Vol. 33. – P. 902 – 907.
14. http://www.terramedica.spb.ru/1d4_2007/slepushiva.htm
15. Boubriak O.A., Soldatkin A.P., Starodub N.F., Sandrovsky A.K., El'skaya A.V., Determination of urea in blood serum by a urease biosensor based on an ion-sensitive field-effect transistor // Sensor and Actuators B. – 1995. – Vol.26 – 27. – P. 429 – 431.
16. Кукла А.Л., Павлюченко А.С., Голтвянский Ю.В., Ширшов Ю.М., Многоэлементные сенсорные массивы на основе интегральных

- кремниевых ионоселективных полевых транзисторов для систем химического мониторинга // Оптоэлектроника и полупроводниковая техника. – 2007. – Вып.42. - С. 72-79.
17. Павлюченко А.С., Кукла А.Л., Голтвянский Ю.В., Архипова В.М., Дзядевич С.В., Солдаткин А.П., Исследование стабильности характеристик рН-чувствительных полевых транзисторов // Оптоэлектроника и полупроводниковая техника. - 2010. - Вып.45. - С. 90-99.
 18. Dzyadevych S.V., Arkhypova V.N., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.-M., El'skaya A.V., Soldatkin A.P., Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilized cholinesterases // *Electroanalysis*. – 2004. – Vol.16. – P. 1873 – 1882.
 19. Бубряк О.А., Хусточка Л.Н., Солдаткин А.П., Стародуб Н.Ф., Исследование иммобилизации и свойств уреазы с целью создания биосенсора на основе полупроводниковых структур // Укр. биохим. журн. – 1992. – Т.64, № 1. – С. 66 – 71.
 20. Солдаткин А.П., Бубряк О.А., Стародуб Н.Ф., Ельская А.В., Сандровский А.К., Шульга А.А., Стриха В.И., Уреазный биосенсор на полевом транзисторе. Особенности конструкции и характеристики работы в модельных условиях // *Электрохимия*. – 1993. – Т.29, № 3. – С. 315 – 319.