

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 547.495.9, 543.92, 543.066

РОЗРОБКА КРЕАТИНІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ МЕДИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

*С. В. Марченко, О. А. Назаренко, О. Л. Кукла¹, О. С. Павлюченко¹,
Е. К. Красюк², О. П. Солдаткін*

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
03143, Київ, вул. Заболотного 150, тел/факс. 526 43 97

¹Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України,
03028, Київ, просп. Науки, 41;

²Київська клінічна лікарня №3,
Київський міський науково-практичний центр нефрології та гемодіалізу,
Київ, вул. П. Запорожця, 26
e-mail: helen_nazarenko@yahoo.com

РОЗРОБКА КРЕАТИНІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ МЕДИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

С. В. Марченко, О. А. Назаренко, О. Л. Кукла, О. С. Павлюченко, Е. К. Красюк, О. П. Солдаткін

Анотація. Розроблено високочутливий селективний біосенсор на основі іммобілізованої креатиніндеїмінази (КФ 3.5.4.21) та рН-чутливих польових транзисторів для on-line визначення креатиніну в діалізаті. Оптимізовано умови створення біоселективного елемента та підібрано оптимальні умови проведення аналізу креатиніну у модельних та реальних зразках. Отриманий ферментний біосенсор характеризується експресністю аналізу, високою чутливістю, селективністю та відтворюваністю сигналів.

Ключові слова: біосенсор, рН-чутливі польові транзистори, іммобілізована креатиніндеїміназа, аналіз креатиніну, діалізна рідина

DEVELOPMENT OF CREATININE-SENSITIVE BIOSENSOR FOR MEDICAL APPLICATION

S. V. Marchenko, O. A. Nazarenko, O. L. Kukla, O. S. Pavluchenko, E. K. Krasjuk, O. P. Soldatkin

Abstract. A highly-sensitive biosensor based on immobilized creatininedeiminase (EC 3.5.4.21) and pH-sensitive field effect transistors was developed for creatinine detection in dialysis fluid. The conditions of the enzyme immobilization as well as conditions of creatinine detection in both model and real samples were optimized. Under optimized conditions, the enzyme biosensor is capable of express analysis of creatinine and characterized with high sensitivity, selectivity, and reproducibility.

Keywords: biosensor, pH-sensitive field-effect transistors, immobilized creatinine deiminase, creatinine analysis, dialysis

РАЗРАБОТКА КРЕАТИНИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

С. В. Марченко, Е. А. Назаренко, А. Л. Кукла, А. С. Павлюченко, Э. К. Красюк, А. П. Солдаткин

Аннотация. Разработан высокочувствительный селективный биосенсор на основе иммобилизированной креатининдеиминазы (КФ 3.5.4.21) и рН-чувствительных полевых транзисторов для on-line определения креатинина в диализной жидкости. Оптимизированы условия проведения анализа креатинина в модельных и реальных образцах. Полученный ферментный биосенсор характеризуется экспрессностью анализа, высокой чувствительностью, селективностью и воспроизведением сигналов.

Ключевые слова: биосенсор, рН-чувствительные полевые транзисторы, иммобилизованная креатининдеиминаза, анализ креатинина, диализная жидкость

Послаблення функції нирок та, як наслідок, накопичення токсичних речовин білкового метаболізму в організмі людини є небезпечним для здоров'я. У цьому випадку очищення крові штучною ниркою є ефективною терапією для збереження життя [1]. В процесі діалізу крові вимивається більшість токсичних речовин, однією з яких є креатинін — головний маркер ниркової хвороби. Цей метаболіт належить до фракції залишкового азоту крові, його концентрація у сироватці крові відносно постійна і використовується у повсякденній клінічній практиці як для встановлення діагнозу, так і для контролю перебігу ниркових захворювань [2]. Виведення надлишку креатиніну з організму людини за допомогою штучної нирки потребує постійного контролю концентрації креатиніну, що вимивається, оскільки від цього залежить тривалість процедури діалізу, а відповідно — кількість витрачених матеріалів та час перебування пацієнта за дискомфортних умов гемодіалізу.

Для визначення концентрації креатиніну існують такі методи. Перш за все, це колориметричний метод на основі реакції Яффе, що запропонований у 1886 році і полягає у взаємодії креатиніну з пікриновою кислотою у лужному середовищі з утворенням таутомеру пікрату креатиніну помаранчевого кольору [3]. Цей метод застосовується і сьогодні, але головний його недолік — це низька специфічність. Пов'язані з цим проблеми спонукали науковців до пошуку більш специфічних методів. Для визначення креатиніну розроблено також ряд інструментальних методів. Це високоефективна рідинна

хроматографія [4-7], іонна хроматографія [8-9], міцелярна електрокінетична хроматографія [10-12], хроматографічний метод із застосуванням флуоресцентних індикаторів [13], капілярний електрофорез [14], капілярний зональний електрофорез [15-18], капілярний ізотахофорез [19], тандемна мас-спектрометрія [20]. Проте всі ці методи досить складні й непридатні для вимірювання концентрацій креатиніну в режимі реального часу.

На сьогодні для on-line визначення існують тільки біосенсорні методи [21-24]. Основною відмінністю цих методів від традиційних підходів інструментального аналізу є орієнтація на проведення кількісного та/чи якісного аналізу у масштабі реального часу з мінімальною додатковою обробкою зразків. Попри те, що розроблено деякі біосенсорні методи і запропоновано різні види попередньої обробки зразків, точне визначення концентрації креатиніну в біологічних рідинах залишається проблематичним. Головним недоліком біосенсорних пристроїв на основі рН-чутливих польових транзисторів є вплив ендogenous NH_4^+ на результати аналізу, а у випадку амперометричних біосенсорів — це наявність складної триферментної системи, внаслідок роботи якої запускається каскад трьох реакцій, що може спричинити велику похибку визначення креатиніну через низьку селективність аналізу.

Тому головною метою цієї роботи є розробка потенціометричного креатинін-чутливого селективного біосенсора для on-line визначення метаболіту креатиніну в діалізній рідині в процесі гемодіалізу.

Матеріали та методи

Матеріали

У роботі використовували препарат ферменту креатиніндеімінази (КФ 3.5.4.21) з активністю 36 од. акт./мг білка, бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 25% розчин глютарового альдегіду (ГА) фірми “Sigma-Aldrich Chimie”. Як субстрат використовували креатинін виробництва “Sigma-Aldrich Chimie”. Робочим буферним розчином був фосфатний буфер (NaH_2PO_4 - NaOH), рН 7,4 фірми “Merck”, виключаючи визначення залежності відгуків біосенсора від рН, де використовувався “полімікс” буфер. Останній готували із суміші реагентів: NaH_2PO_4 , тетраборату натрію, Tris-HCl , KCl , NaOH та лимонної кислоти. Реактиви для приготування “полімікс” буфера були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти “х.ч.” та “ч.д.а.”

Бікарбонатна діалізна рідина для дослідів на вміст креатиніну була отримана у Київському міському науково-практичному центрі нефрології та гемодіалізу.

Виготовлення біоселективних мембран

Для виготовлення робочого біоселективного елемента біосенсора на основі креатиніндеімінази готували розчин з вмістом: 8% креатиніндеіміназа + 8% 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 16%. Отримані розчини негайно наносили на робочі поверхні рН-чутливих польових транзисторів до повного їх покриття, це потребувало близько 0,1 мкл кожного розчину. Всі мембрани були з однаковим кінцевим вмістом білка. Іммобілізацію ферменту проводили в насичених парах 25% розчину ГА [25]. Потім мембрани висушували протягом 15–20 хв у повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи мембрани відмивали робочим буферним розчином від надлишку незв’язаного ГА.

Сенсорні елементи на основі рН-чутливих польових транзисторів

Для отримання високої надійності та стабільності сенсорних елементів була використана р-канальна МОН-технологія на кремнієвих підкладках КЕФ-4,5 <100> з формуванням підзатворного діелектричного шару з термічно окисленої плівки SiO_2 завтовшки 50 нм та осадженої в реакторі зниженого тиску плівки Si_3N_4 завтовшки 50–70 нм. Затвор виконано зигзагоподібним з відношенням його довжини до ширини, рівним 100, що забезпечує достатньо високий коефіцієнт підсилення р-канальних транзисторів. Контакти до стоку та витоку транзисторів сформовані за допомогою протяжних дифузійних шин, вкритих шаром діелектрика, що виведені на край кристалу, де проводиться їх розварювання та герметизація.

На базі вказаних сенсорних елементів були виготовлені кремнієві чипи інтегральних рН-ПТ на НВО “Квазар”, м. Київ. За допомогою цієї системи можна 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.

Вимірювання відгуку рН-ПТ відбувалося за допомогою схеми підтримання постійної величини струму в каналі транзистора, при цьому вихідний сигнал автоматично відслідковував зміну потенціалу поблизу затвора транзистора. Порогова напруга для всіх рН-ПТ була близько -2,5 В. Вимірювання проводились за таких умов: струм каналу близько 20 мкА, напруга стік-витік близько 1 В, підкладка під нульовим потенціалом.

Детальний опис топології, дизайну та сенсорної електроніки використаних рН-ПТ елементів наведено в роботі [26].

Методика вимірювання креатиніну в модельному робочому буфері

Модельні дослідження проводились, в основному, в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури у відкритому об’ємі з інтенсивним перемішуванням, за виключенням визначення залежності відгуку від рН, де використовувався “полімікс” буфер. Перед

роботою біосенсори вимочували деякий час у буферному розчині до отримання стабільного вихідного базового сигналу. Концентрації субстрату змінювали додаванням певних аліквот концентрованих розчинів. Сигнал від польового транзистора з неактивною мембраною, розташованого на тому ж кристалі, віднімався від сигналу, отриманого з транзистора з активною біоселективною мембраною.

Методика вимірювання креатиніну в зразках діалізату

Для дослідження були використані проби діалізної рідини хворих на ниркову недостатність. Вимірювання концентрацій креатиніну проводилися за кімнатної температури у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням. Біосенсори перед вимірюванням деякий час вимочували в діалізній рідині до отримання стабільного вихідного базового сигналу.

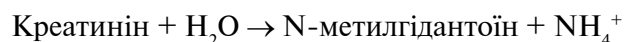
Принцип методу полягає в тому, що спочатку отримується відгук біосенсора в дослідному зразку з невідомою концентрацією креатиніну, потім до електрохімічної комірки додаються певні аліквоти концентрованого вихідного розчину креатиніну і отримуються відповідні відгуки біосенсора. На основі отриманих даних будується калібрувальна крива, лінійна екстраполяція якої перетинає вісь концентрацій (X) у точці, яка відповідає концентрації креатиніну в досліджуваному зразку.

Для визначення концентрації креатиніну в діалізаті хворого до комірки, де містилася діалізна рідина (яка не мала контакту з кров'ю пацієнта) об'ємом 5 мл, додавали пробу діалізату хворого (вносили 1 мл проби, що призводило до 6-кратного розведення діалізату). Після отримання відгуку на внесення діалізату (час відгуку близько 2 хв) додавали аліквоти концентрованого розчину креатиніну та будували калібрувальну криву, за допомогою якої визначали невідому концентрацію креатиніну в пробі, використовуючи метод стандартних додавань [27].

Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали потрібною зміною діалізної рідини протягом п'яти хвилин для стабілізації вихідного базового сигналу.

Результати та їх обговорення

Принцип роботи креатинін-чутливого біосенсора базується на реакції гідролізу креатиніну, що каталізується креатиніндеїміназою:



Зміна рН, індукована гідролізом креатиніну і пропорційна концентрації субстрату в аналізованому розчині, реєструється розробленим біосенсором на основі рН-чутливих польових транзисторів [26].

Калібрувальні криві біосенсорного визначення креатиніну залежно від часу іммобілізації ферменту представлені на Рис. 1. Біосенсор з креатиніндеїміназою, іммобілізованою впродовж 15 і 25 хв, демонстрував швидкий відгук на додавання креатиніну — протягом 1,5- 2 хв. Сенсор з креатиніндеїміназою, іммобілізованою 15 хв, характеризувався найбільшою чутливістю. Але було з'ясовано, що такий час іммобілізації недостатній для тривалого фіксування ензиму на поверхні перетворювача — спостерігалось вимивання ферменту протягом шести годин. Збільшення часу іммобілізації ферменту до 25 хв спричиняло деяке зменшення чутливості біосенсора (відгуки все ще залишалися достатньо великими, відповідно, зберігалась і досить висока чутливість), але забезпечувало оптимальну “пришивку” ферменту на поверхні перетворювача. Час іммобілізації 35 хв сприяв сильному “зашиванню” молекул креатиніндеїмінази, що призводило до дуже низької чутливості біосенсора. Отже, виходячи з аналізу отриманих даних, у подальшому час іммобілізації ферменту 25 хв був обраний як оптимальний.

Як відомо, кожен фермент має свій рН оптимум. рН-оптимум деяких ферментів після їхньої іммобілізації може змінюватись, зсуваючись у лужну чи кислу область. Це може бути пов'язане, насамперед, зі зміною конформації іммобілізованого ферменту та перерозподілом зарядів у системі фермент-БСА. Тому наступним завданням було знайти оптимальний рН буферного розчину для роботи іммобілізованої креатиніндеїмінази. Відомо, що однокомпонентний буферний розчин змінює буферну ємність при зміні його рН [28]. Тому, щоб уникнути додаткових впливів буферних ємностей на величину відгуків, було досліджено залежність відгуку біосенсора від рН “полімікс” буфера, який характеризується однаковою буферною ємністю в широкому діапазоні значень рН —

від 4 до 12 [29]. Графік рН-залежності сигналу біосенсора на внесення субстрату мав типову дзвоноподібну форму (Рис. 2):

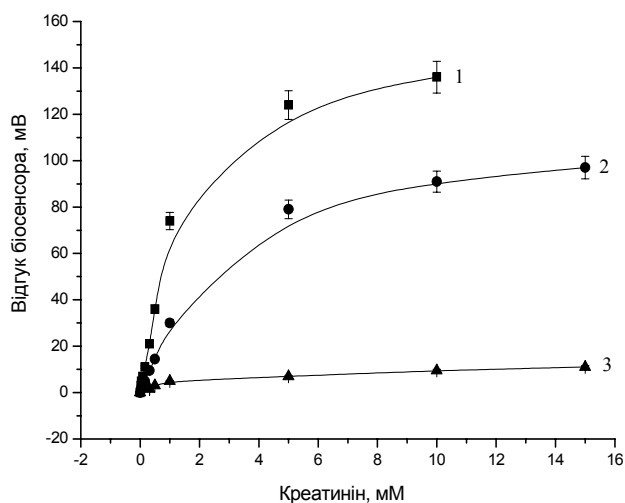


Рис. 1. Калібрувальні криві біосенсорного визначення концентрацій креатиніну. Біоселективні мембрани отримані за різної тривалості іммобілізації ферменту у насичених парах ГА: 1) 15 хв; 2) 25 хв; 3) 35 хв. Експеримент був проведений у 5мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури

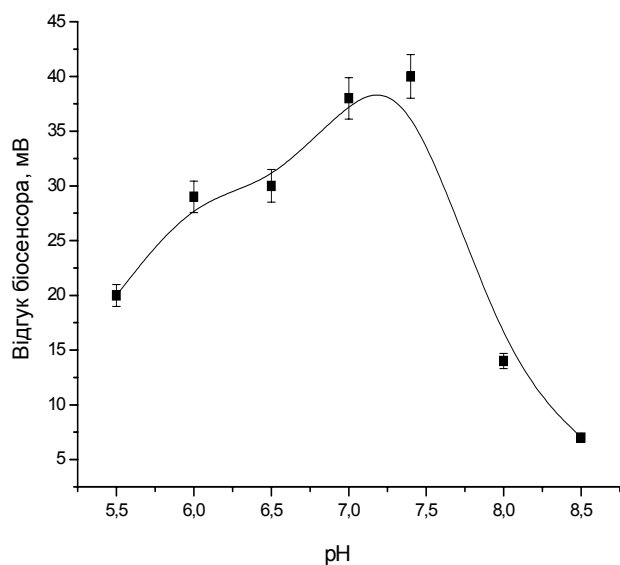


Рис. 2. Залежність відгуку біоселективного елементу біосенсора на основі креатиніндеїмінази від рН “полімікс” буфера. Експеримент був проведений в “полімікс” буфері (2,5мМ NaH_2PO_4 ; 2,5мМ тетраборату натрію; 2,5мМ Трис- HCl ; 2,5мМ KCl ; 2,5мМ NaOH та 2,5мМ лимонної кислоти) за кімнатної температури, концентрація субстрату становила 2,5 мМ

Оптимальні значення рН буферного розчину для роботи біосенсора з іммобілізованою креатиніндеїміназою знаходились в діапазоні рН 7,0 — 7,5.

Важливим параметром для потенціометричних вимірювань є також буферна ємність та іонна сила аналізованого зразка. Було досліджено вплив різних концентрацій робочого буфера на відгуки біосенсора (Рис. 3). З графіка видно, що збільшення концентрації фосфатного буфера від 2,5 до 10 мМ спричиняє зменшення вихідного сигналу в 2 — 3 рази. Ця ситуація є звичайною для потенціометричних сенсорів і може бути пояснена асоціацією протонів або гідроксид-іонів з дисоційованими частинками буфера. Таким чином, чим вищою є концентрація робочого буфера і його буферна ємність, тим менший зсув рН, а відповідно — менший відгук біосенсора і чутливість біосенсорного визначення.

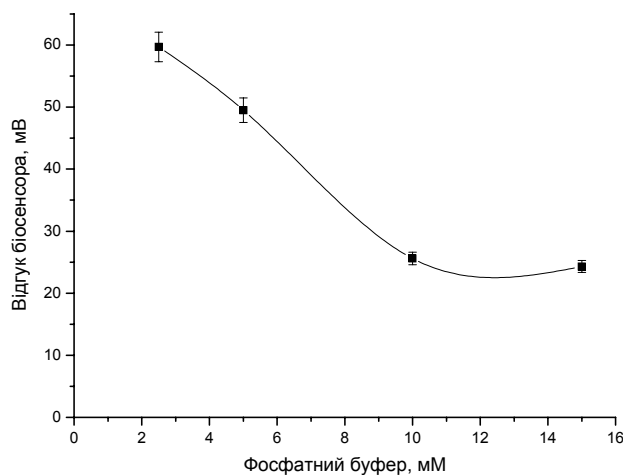


Рис. 3. Залежність відгуку біосенсора на основі креатиніндеїмінази від концентрації фосфатного буферного розчину. Експеримент був проведений у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури. Концентрація субстрату становила 2,5 мМ

Необхідно зазначити, що при зміні концентрації буфера змінюється не лише буферна ємність, а й іонна сила розчину. Щоб перевірити, що саме є причиною зменшення відгуків біосенсора при зміні концентрації буфера (зміна іонної сили чи буферної ємності), було проведено вимірювання величини відгуку біосенсора на внесення 1 мМ креатиніну залежно від концентрації NaCl , тобто — лише від зміни іонної сили робочого буфера (концентрація NaCl змінювалась від 10 до 160 мМ) (Рис. 4):

При концентрації NaCl 40 мМ відгук на внесення субстрату знизився на 30 % порівняно з вихідним сигналом, тобто під впливом підвищеної іонної сили відгук креатиніндеїміназного біосенсора знижується. Подальше збільшення концентрації хлориду натрію не впливає на

відгук біосенсора. Виявлену закономірність необхідно враховувати при роботі з реальними зразками.

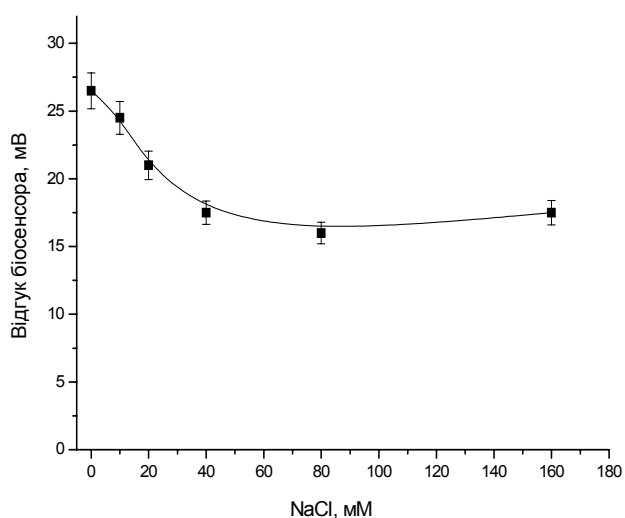


Рис. 4. Залежність величини відгуку біосенсора від іонної сили робочого буферного розчину. Експеримент був проведений у 5мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури. Концентрація креатиніну становила 1 мМ

При визначенні межі чутливості біосенсора в модельному фосфатному буфері встановлено (Рис. 5), що найменша концентрація креатиніну, що може бути визначена за допомогою розробленого біосенсора, становить 20 мкМ. Така чутливість є достатньою як для визначення креатиніну в діалізаті хворих людей при гемодіалізі, так і для контролю концентрації креатиніну в крові і хворих, і здорових людей (нормальна концентрація креатиніну крові здорової людини 35-140 мкМ, у хворих на ниркову недостатність цей показник може перевищувати 1000 мкМ) [2, 31].

Для аналізу реальних зразків, що містять багато компонентів, важливою характеристикою є селективність чутливого елемента біосенсора. Відомо [2], що креатиніндаміназа не чутлива до таких речовин, як креатин, сечовина, аргінін, гуанідин, цитозин монофосфат. Крім того, у роботі [30] показано, що потенціометричний біосенсор на основі іммобілізованої креатиніндамінази характеризувався досить високим рівнем селективності та специфічності. Біосенсорних відгуків не було виявлено на такі речовини, як саркозин, глюкоза та сечовина у концентраціях, які характерні для крові, і відгук біосенсора на креатинін залишався незмінним при додаванні суміші цих речовин.

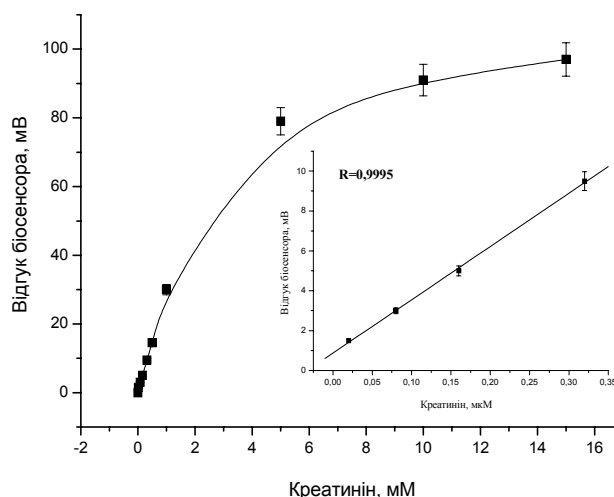


Рис. 5. Залежність величини відгуку креатинінового біосенсора від концентрації субстрату. Експеримент був проведений у 5мМ фосфатному буфері, рН 7,4 за кімнатної температури

Однією з найважливіших характеристик біосенсорів є відтворюваність сигналів. Щоб дослідити цю характеристику, впродовж одного робочого дня з інтервалом 50 хв реєстрували відгуки біосенсора на одну й ту ж саму концентрацію креатиніну (1 мМ), при цьому поверхня перетворювача з іммобілізованою креатиніндаміназою весь час між вимірюваннями залишалась в робочому буферному розчині. З Рис. 6 видно, що біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналів. Відносне стандартне відхилення відгуків не перевищувало 5%. Цей тест свідчить, що розроблений біосенсор можна використовувати для визначення креатиніну в діалізній рідині в процесі гемодіалізу (одна процедура гемодіалізу триває 3-4 години).

Розроблений біосенсор був випробований в аналізі концентрацій креатиніну в реальних зразках — діалізаті хворого на ниркову недостатність. Діалізана рідина хворого чоловічої статі на ниркову недостатність була відібрана з апарату штучної нирки наприкінці третьої години проведення процедури діалізу.

На Рис. 7 представлено калібрувальну криву визначення концентрації креатиніну, яку було отримано методом стандартних додавань (описаний в розділі “Матеріали та методи”). Як можна бачити з наведеного графіка (Рис. 7), лінійний діапазон визначення концентрації креатиніну в діалізній рідині не відрізняється від такого в модельному фосфатному буфері (Рис. 5).

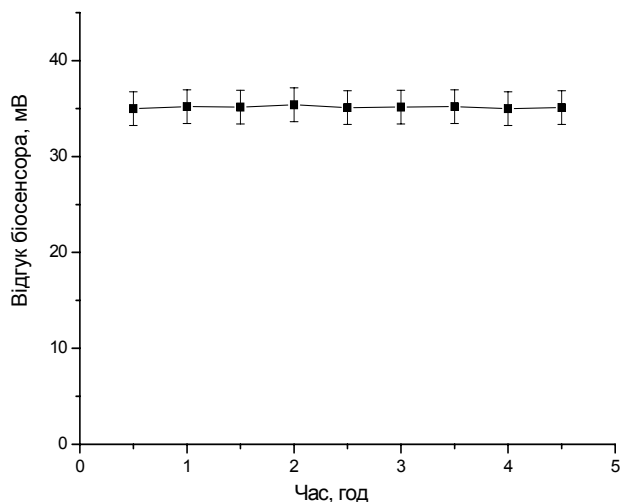


Рис. 6. Операційна стабільність відгуків біоселективного елементу біосенсора на основі креатинін-деїмінази. Експеримент був проведений у 5ММ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури. Концентрація субстрату становила 1 мМ

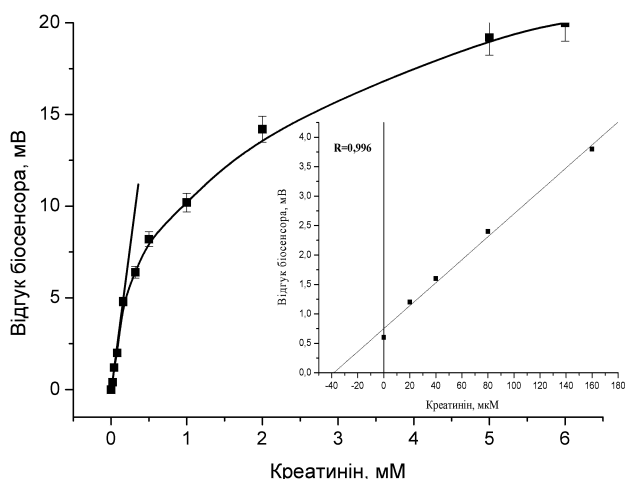


Рис. 7. Калібрувальна крива визначення концентрації креатиніну за допомогою біосенсора на основі креатинін-деїмінази, отримана в бікарбонатному діалізаті. Експеримент був проведений за кімнатної температури

Лінійна апроксимація калібрувальної прямої та її екстраполяція на вісь Х відсікає відрізок, що відповідає концентрації 36,6 мкМ. Таким чином, невідома концентрація креатиніну в досліджуваному зразку (діалізат після третьої години гемодіалізу) із врахуванням розведення в шість разів становить 220 мкМ. Цей показник не відповідає нормі і процедура гемодіалізу потребує продовження.

Висновки

Розроблено креатинін-чутливий селективний ферментний біосенсор на основі іммобілізованої креатинін-деїмінази як біоселективного елементу та рН-чутливого польового транзистора як фізичного перетворювача біохімічного сигналу біосенсора в електричний. Межа чутливості креатинінового біосенсора становить 20 мкМ, що цілком достатньо як для визначення креатиніну в діалізаті хворих на ниркову недостатність пацієнтів, так і при контролі рівня креатиніну в сироватці крові та сечі в нормі та при патології під час масових досліджень.

Автори висловлюють щире подяку працівникам Київського міського науково-практичного центру нефрології та гемодіалізу за допомогу та надання зразків діалізату.

Частина роботи виконана завдяки фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми “Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб” проекту УНТЦ 4591.

Список літератури

1. Koncki R., Analytical aspects of hemodialysis // Trends in Anal. Chemistry. — 2008. — Vol.27. — №4. — P. 304-314.
2. Wyss M., Kaddurah-Daouk R., Creatine and creatinine metabolism // Physiological Reviews. — 2000. — Vol. 80. — № 3. — P.1107-1213.
3. 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.
4. Dobberpuhl Mo Y., Dash A.K. A simple HPLC method with pulsed EC detection for the analysis of creatine // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2003. — V.32, N1. — P. 125-132.
5. Meràs 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, N2. — P. 201-209.
6. George S.K., Dipu M.T., Mehra U.R., et. al. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine // J. of Chromat. B. — 2006. — V.832, N1. — P. 134-137.
7. 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, N1. — P. 43-57.

8. 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, N1-2. — P.297-302.
9. 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 // *J. of Chromatography A.* — 2005. — V.1085, N1. — P. 110-116.
10. Burke D.G., MacLean P.G., Walker R.A., et. al. Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. B.* — 1999. — V.732, N7. — P. 479-485.
11. Tran T.C., Huq T.A., Kantes H.L., et. al. Determination of creatinine and other uremic toxins in human blood sera with micellar electrokinetic capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. B.* — 1997. — V.690, N8. — P. 35-42.
12. Poboży E., Radomska A., Koncki R., Głąb S. Determination of Dialysate Creatinine by Micellar Electrokinetic Chromatography // *J. of Chromatography B.* — 2003. — V.789. P. 417-424.
13. 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, N9. — P. 283-291.
14. 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. *Journal of Chromatography* // *J. of Chromatography A.* — 2007. — V.1171. P. 140-143
15. 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, N5 P. 704-708.
16. 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, N1. — P. 53-59.
17. Rodrigues J., Berzas J.J., Castañeda G et. al. Very fast and direct capillary zone electrophoresis method for the determination of creatinine and creatine in human urine // *Anal. Acta.* — 2004. — V.521, N1. — P.53-59
18. Zinellu A., Caria M.A., Tavera C., et. al. Plasma creatinine and creatine quantification by capillary electrophoresis diode array detector // *Annal. Biochem.* — 2005. — V.342, N2 P. 186-193.
19. Kvasnička F., Voldřich M. Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products // *Electrophoresis.* — 2000. — V.21. P. 2848-2850.
20. Huškova R., Chrastina P., Adam T., Schneiderka P. Determination of creatinine in urine by tandem mass spectrometry // *Clinica Chimica Acta.* — 2004. — V.350. P. 99-106
21. Radomska A., Koncki R., Pyrzyńska K., Głąb S. Bioanalytical system for control of hemodialysis treatment based on potentiometric biosensors for urea and creatinine // *Analitica Chem. Acta.* — 2004. — Vol. 523. — P.193-200.
22. Poboży E., Radomska A., Koncki R., Głąb S. Determination of dialysate creatinine by micellar electrokinetic chromatography // *Journal of Chromat. B.* — 2003. — Vol. 789. — P.417-424.
23. Premanode B., Toumazou C. A novel, low power biosensor for real time monitoring of creatinine and urea in peritoneal dialysis // *Sensoeer and Actuators B.* — 2007. — Vol.120. — P. 732-735.
24. Tombach B., Schneider J., Matzkies F., Schaefer R. M., Chemnitius G. C. Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients // *Clinica Chim. Acta.* — 2001. — Vol.312. — P. 129-134.
25. O.M. Shuvailo, O.O. Soldatkin, A. Lefebvre, R. Cespuaglio, A.P. Soldatkin. Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate // *Analitica Chimia Acta.* — 2006. — Vol.573. — P. 110 — 116.
26. 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.
27. Алесковский В.Б., Бардин В.В., Бойчинова Е.С. и др. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство—Л.: Химия, 1988. — 376 с.
28. Дзядевич С.В. Биосенсоры на основе ионоселективных полевых транзисторов: теория, технология, практика. — 2004. — Т.20. — № 1 — 2. — с.7 — 14.
29. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии—М. — Химия, 1967. — 390с.
30. Soldatkin A. P., Montoriol J., Sant W., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. — Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane // *Talanta.* — 2002. — Vol. 23. — P. 795 — 802.
31. Radomska A., Bodenzac E., Głąb S., Koncki R. — Creatinine biosensors based on ammonium ion selective electrode and its application in flow — injection analysis // *Talanta.* — 2004. — Vol. 64. — P.603 — 608.