

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.554

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136888>

МУЛЬТИБІОСЕНСОРНА СИСТЕМА НА ОСНОВІ pH-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ, КРЕАТИНІНУ ТА СЕЧОВИНИ

*О. О. Солдаткін^{1,2}, С. В. Марченко¹, О. Л. Кукла³, О. С. Павлюченко³, С. В. Дзядевич^{1,2},
О. П. Солдаткін^{1,2}*

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

³Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України, просп. Науки, 41, 03028,
м. Київ, Україна

e-mail: alex_sold@yahoo.com, svmarchenkosv@ukr.net, kukla@isp.kiev.ua, pavluchenko@isp.kiev.ua, dzyad@yahoo.com, a_soldatkin@yahoo.com

МУЛЬТИБІОСЕНСОРНА СИСТЕМА НА ОСНОВІ pH-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ, КРЕАТИНІНУ ТА СЕЧОВИНИ

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

Анотація. В роботі розроблено мультібіосенсорну систему для одночасного визначення концентрацій глюкози, сечовини та креатиніну. Для створення біоселективних елементів використовували глюкозооксидазу, рекомбінантну уреазу та креатиніндеаміназу, кожна з яких була іммобілізована ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні pH-чутливих польових транзисторів. В рамках розробки було перевірено можливість одночасної роботи усіх біоселективних елементів в складі мультібіосенсорної

системи. Лінійний діапазон для визначення сечовини знаходився в межах від 0,5 до 10 мМ, для креатиніну – від 0,08 до 2 мМ, для глюкози – від 0,08 до 1 мМ, що є цілком достатньо для одночасного визначення вищевказаних метаболітів в сироватці крові хворих на ниркову недостатність в умовах єдиного розведення проби. Також було перевірено наявність перехресного впливу субстратів на величину відгуку для окремих біоселективних елементів, та доведено можливість їх одночасної роботи. Показано, що мультибіосенсорна система характеризується доброю відтворюваністю відгуків при безперервній роботі впродовж одного робочого дня. Розроблену систему було використано для аналізу глюкози, сечовини та креатиніну в сироватці крові хворих на ниркову недостатність. Отримані результати підтверджують діагноз хворих на ниркову недостатність і доводять перспективність даної розробки для використання в медичній діагностиці.

Ключові слова: сечовина, глюкоза, креатинін, біосенсор, мультибіосенсорна система, рН-чутливий польовий транзистор, сироватка крові

MULTIBIOSENSOR SYSTEM BASED ON pH-SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTORS FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF GLUCOSE, CREATININE AND UREA

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

Abstract. In this work, the multibiosensor system was developed for the simultaneous determination of glucose, urea and creatinine concentrations. To prepare bioselective elements we used glucose oxidase, recombinant urease, and creatinine deiminase, which were immobilized on the surface of pH-sensitive field-effect transistors by covalent cross-linking with bovine serum albumin using glutaraldehyde. In the frame of research, the possibility of simultaneous function of all bioselective elements in the multibiosensor system was checked. The linear ranges of determination were: urea 0.5 - 10 mM, creatinine - 0.08 - 2 mM, glucose - 0.08 - 1 mM. These values were adequate for the simultaneous determination (the same dilution of sample) of the above metabolites in the blood serum of patients with renal insufficiency.

The bioselective elements were separately checked for the presence of substrates cross-effect, and a possibility of their simultaneous work was proven from this viewpoint as well. It was shown that the multibiosensor system is characterized by good reproducibility of responses during continuous operation over one working day. The developed system was tested for evaluation of glucose, urea and creatinine concentrations in the blood serum of patients with renal insufficiency. The obtained results confirmed the optimistic prospects of the developed multibiosensor assay.

Keywords: Urea, glucose, creatinine, biosensor, multibiosensor system, pH-sensitive field effect transistor, blood serum

МУЛЬТИБИОСЕНСОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛЕВЫХ ТРАНЗИСТОРОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ, КРЕАТИНИНА И МОЧЕВИНЫ

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

Аннотация. В работе разработано мультбиосенсорную систему для одновременного определения концентраций глюкозы, мочевины и креатинина. Для создания биоселективных элементов использовали глюкозооксидазу, рекомбинантную уреазу и креатининдеаминазу, каждая из которых была иммобилизованная ковалентной сшивкой глутаровым альдегидом с бычьим сывороточным альбумином на поверхности pH-чувствительных полевых транзисторов. В рамках исследования была проверена возможность одновременной работы всех биоселективных элементов в составе мультбиосенсорной системы. Линейный диапазон определения мочевины находился в пределах от 0,5 до 10 мМ, для креатинина - от 0,08 до 2 мМ, для глюкозы - от 0,08 до 1 мМ, что было вполне достаточно для одновременного определения вышеуказанных метаболитов в сыворотке крови больных почечной недостаточностью в условиях единого разведения пробы. Также было проверено наличие перекрестного влияния субстратов на величину отклика для отдельных биоселективных элементов, и доказана возможность их одновременной работы. Показано, что мультбиосенсорная система характеризуется хорошей воспроизводимостью откликов при непрерывной работе в течение одного рабочего дня. Разработанную систему было использовано для анализа глюкозы, мочевины и креатинина в сыворотке крови больных с почечной недостаточностью. Полученные результаты подтверждают диагноз больных с почечной недостаточностью и подтверждают перспективность данной разработки для применения в медицинской диагностике.

Ключевые слова: мочевина, глюкоза, креатинин, биосенсор, мультбиосенсорная система, pH-чувствительный полевой транзистор, сыворотка крови

1. ВСТУП

Широка розповсюдженість цукрового діабету (ЦД) в усьому світі призвела до стрімкого збільшення числа пацієнтів з хронічними діабетичними ускладненнями, серед яких діабетичне враження нирок – діабетична нефропатія (ДН). Терміном “діабетична нефропатія” визначають хронічне ускладнення ЦД, яке відмічають в одній третій хворих. Захворювання характеризується специфічним враженням ниркової паренхіми, що призводить до формуванням вузликового чи дифузного гломерулосклерозу. Частота розвитку ДН коливається від 25 до 40 % при ЦД 1 типу і від 12 до 26 % при ЦД 2 типу [1-3]. В США і Японії ДН займає перше місце за розповсюдженням серед всіх захворювань нирок (35-40%). В країнах Європи хворі на ДН

складають 20 – 25 % кількості пацієнтів, що потребують гемодіалізу [4].

Значною проблемою у хворих на ЦД є контроль глікемії. Негативними є як високі, так і низькі концентрації глюкози. Особливо небезпечною є гіпоглікемія, що може розвиватися під час процедури гемодіалізу, внаслідок видалення глюкози із кровотоку. Використання глюкозовмісних розчинів, постійний моніторинг рівня глюкози в крові під час сеансів рекомендовані для зниження ризику розвитку гіпоглікемічних станів у хворих на цукровий діабет, які перебувають в умовах хронічного гемодіалізу [5, 6]. Крім того, для контролю ефективності процедури гемодіалізу та для зменшення часу перебування пацієнта в незручних умовах, необхідний постійний контроль основних уремічних токсинів – сечовини та креатиніну [7-9].

В сучасній лабораторній діагностиці для кількісного аналізу зазначених метаболітів існують колориметричні методи аналізу. Наприклад, для колориметричного визначення глюкози використовують кольорові реакції між глюкозою та концентрованою сірчаною кислотою; глюкозою, концентрованою сірчаною кислотою і антроном чи α -нафтолом, чи тимолом, або ж хромотроповою кислотою. Для сечовини колориметричними реагентами є диацетилмонооксим, фталальдегід, нафтилетилендіамін, хромотропова кислота [10]. Найпоширенішим колориметричним визначенням креатиніну є реакція Яффе з використанням пікринової кислоти [11 - 13]. Проте, наведені методи є досить складними у використанні: необхідний контроль температури, рН, що значно сповільнює аналіз, крім того існує велика кількість інтерферуючих речовин, взаємодія з якими призводить до хибних результатів. Необхідно проводити додаткову обробку біозразків: адсорбцію, екстракцію, діаліз, депротеїнізацію, використовувати ферменти, щоб видалити інтерферуючі речовини. Деякі речовини, що використовують в кольорових реакціях є дуже токсичними, деякі вибухонебезпечними. Даний шлях призводить до зниження точності та підвищення вартості аналізу зазначених метаболітів.

Окрім колориметричного визначення концентрацій глюкози, сечовини та креатиніну існує друга група більш специфічних методів, які ґрунтуються на ферментативних реакціях з колориметричною детекцією. Для глюкози відомі найпоширеніші два методи: глюкозооксидазний та гексокіназний. Для сечовини всі сучасні ферментативні методи ґрунтуються на використанні ферменту уреазу. Метод складається з двох етапів. На першому при гідролізі сечовини утворюється іон амонію, концентрацію якого (другий етап) визначають з використанням послідовних ферментативних реакцій, потенціометричних методів чи технології “сухої хімії” [14]. У ферментативних колориметричних методах визначення креатиніну використовують креатиніназу, що каталізує гідроліз креатиніну до креатину, який потім визначають в креатинкіназній реакції. Ферментативні оптичні методи є специфічними і чутливими, але їх застосування для визначен-

ня концентрацій глюкози, сечовини і креатиніну обмежене нестійкістю ферментів при зберіганні та експлуатації, складністю методики аналізу, а також високою вартістю обладнання і затратних матеріалів, крім того необхідна наявність висококваліфікованого персоналу. До того ж, недоліком є неможливість одночасного аналізу всіх трьох метаболітів (глюкоза, сечовина та креатинін) в польових умовах.

На сьогоднішній день існує декілька мультибіосенсорних систем для аналізу сечовини, креатиніну та глюкози [15, 16]. В основі роботи першої системи лежать EIS-сенсори, в процесі іммобілізації використовують мікросферний альгінат в якості носіїв ферментів [15]. Описана мультибіосенсорна система дуже складна в виробництві та проведенні аналізу. Сама сенсорна система громіздка за рахунок використання багат шарового принципу конструкції. Друга мультибіосенсорна система працює з використанням амперометричного методу аналізу, що свідчить про погану селективність аналізу відносно електроактивних речовин [16]. Крім того, дана мультибіосенсорна система характеризується вузьким лінійним діапазоном визначення креатиніну, глюкози, сечовини в діапазонах 0,2-5; 0,2-10; і 0,5-20 мМ відповідно. Крім того, система була слабо відтворювана.

Дана робота присвячена створенню такої мультибіосенсорної системи для аналізу глюкози, креатиніну та сечовини, яка б дозволила з урахуванням недоліків відомих біосенсорних розробок визначати концентрації глюкози, креатиніну та сечовини в зразках сироватки крові.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. МАТЕРІАЛИ

В роботі використовували ферменти: рекомбінантна уреазу (РУ) з *E. coli* (КФ 3.5.1.5) з активністю 150 од.акт./мг виробництва фірми “Usbiological” (США), глюкозооксидаза (ГОД) з *Penicillium vitale* (КФ 1.1.3.4) з активністю 130 од.акт./мг, фірми «Діагностикум» (Україна), креатиніндеїміназа (КД) із мікроорганізмів (КФ 3.5.4.21) з активністю 41 од.акт./мг білка, фірми “Sigma-Aldrich Chemie GmbH”. Як субстрати використовували: сечовина та

креатинін “Sigma-Aldrich Chemie GmbH” (Німеччина), D-глюкоза, виробник Helicon (Росія). Інші компоненти біоселективних елементів: сироватковий альбумін бика (БСА) фракція V, 25 % водний розчин глутарового альдегіду (ГА) та гліцерин були фірми „Sigma-Aldrich Chimie” (Німеччина). Як робочий буфер використовували фосфатний розчин (KH_2PO_4 -NaOH) виробництва фірми «Merck» (Німеччина). Інші, використані в роботі реактиви, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти “х.ч.” та “ч.д.а.”

Сироватка крові хворих на ниркову недостатність для визначення вмісту сечовини, креатиніну та глюкози була люб’язно надана Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу.

2.2. СЕНСОРНІ ЕЛЕМЕНТИ НА ОСНОВІ рН-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ

В роботі використовували сенсорні чипи з диференційною парою рН-чутливих польових транзисторів, виготовлені в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова. Розроблена топологія передбачала розміщення двох ідентичних р-канальних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8x8 мм [17]. Для усунення можливості утворення паразитного каналу провідності між обома транзисторами кристал містив захисну роздільну n^+ -область шириною 50 мкм. Контакти до стоку й витоку кожного із транзисторних елементів були сформовані протяжними r^+ -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.

Іон-селективні властивості транзисторів були обумовлені шаром Si_3N_4 , нанесеного на їх підзатворну область. рН-чутливість елементів становила близько 25 - 50 мкА/рН, залежно від серії виробництва. Загальний вигляд рН-чутливих польових транзисторів представлений на Рис. 1.

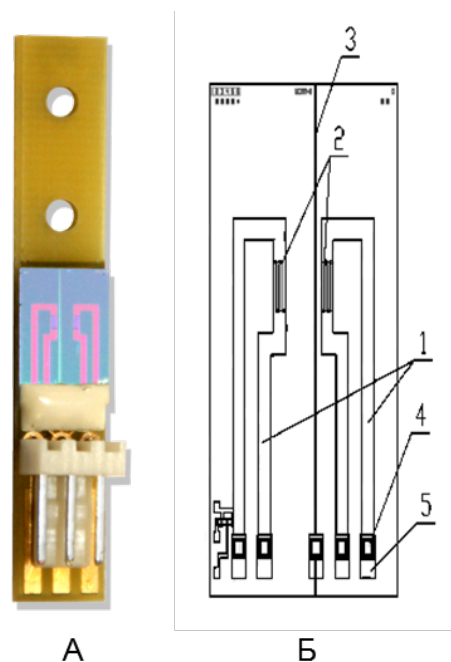


Рис. 1. Зовнішній вигляд (А) та схематичне зображення (Б) рН-чутливого польового транзистора: 1) r^+ - дифузійні шини від областей стоку і витоку кожного із транзисторів; 2) зигзагоподібні області затворів із діелектричним шаром $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$; 3) захисна n^+ - область з контактом до n -підкладки; 4) області травлення контактних вікон; 5) алюмінієві контактні області до транзисторних виходів.

2.3. КОНСТРУКЦІЯ ВИМІРЮВАЛЬНОЇ КОМІРКИ

У роботі використовували уніфіковану вимірювальну кювету розбірного типу, сконструйовану в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Вона представляє собою модульну систему, що складається з ІСПТ-електроду, системи підготовки і подавання проби, які конструктивно розділені й оформлені у вигляді блоків, що сполучаються між собою. На металеву основу встановлюється і закріплюється друкована плата з кристалом сенсора, на поверхні якої фіксується фторопластовий зйомний пробоприймач з силіконовим ущільненням (рис. 2).

Така модульна конструкція вимірювальної кювети дозволяє використовувати її у різних схемах вимірювань. При зміні конфігурації сенсорної системи (непроточної на проточну й навпаки, одноканальної на багатоканальну) змінюється лише конструкція пробоприймача, решта ж частин вимірювальної кювети залишаються незмінними.

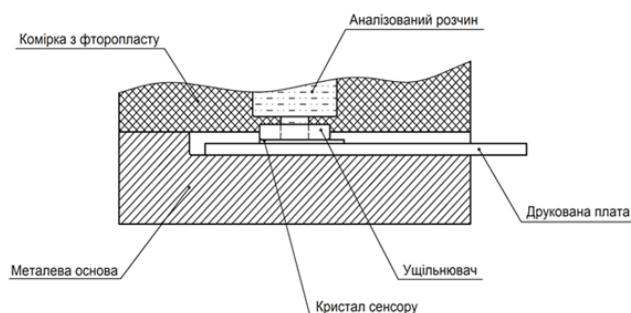


Рис. 2. Схематичне зображення робочої вимірювальної комірки.

Отже, як було підкреслено вище, можливе використання багатоканального режиму, який дозволяє визначати декілька метаболітів одночасно. Для організації одночасної роботи з великою кількістю вимірювальних каналів передбачена можливість об'єднання декількох елементів вимірювальної системи за допомогою кільцевої послідовної шини. Датчики в багатоканальному режимі можуть бути розміщені, як в окремих пробоприймачах для одночасного аналізу різних між собою проб, так і в загальному пробоприймачі для одночасного аналізу однієї проби декількома датчиками. Аналого-цифровий прилад було сконструйовано таким чином, що між одноканальним та багатоканальним режимами роботи відсутні будь-які відмінності, як на апаратному (окрім механічних особливостей підключення), так і на програмному рівнях. На рис. 3 представлений загальний вигляд вимірювальної комірки інжекційного типу для роботи 4-х потенціометричних перетворювачів.

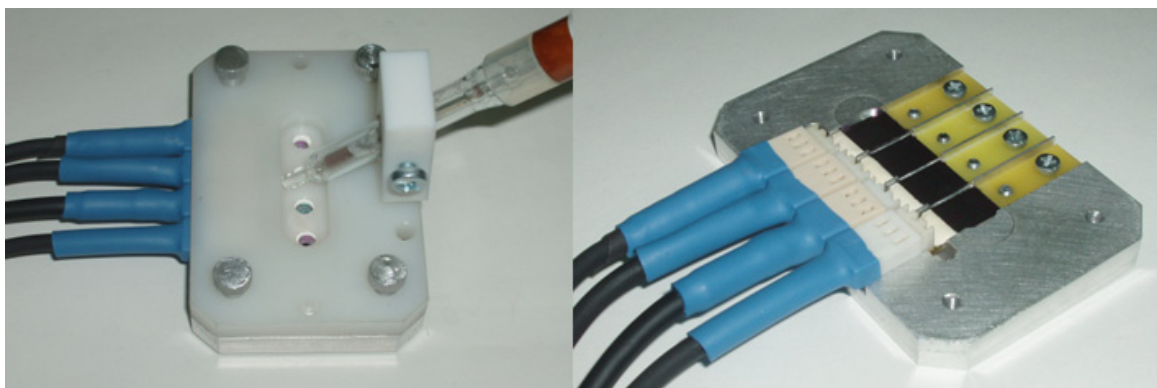


Рис. 3. Загальний вигляд вимірювальної комірки інжекційного типу для проведення вимірювань за допомогою рН-чутливих польових транзисторів для чотирьох каналного режиму.

2.4. ПРОЦЕДУРА ВИГОТОВЛЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Для виготовлення біоселективних елементів на основі ферментів готували розчин з вмістом: 10% ферменту + 10% БСА. Наважки ферменту та БСА 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 референтних мембран готували таким же чином, але замість ферментів брали БСА, кінцева концентрація якого становила 20%. Перед нанесенням, робочі поверхні перетворювачів знежирювали етанолом та промивали дистильованою водою. Отримані розчини за допомогою мікропіпетки "Eppendorf" об'ємом 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 на 20 – 30 хв. за кімнатної температури. Після парів ГА біоселективні мембрани висушували протягом 15–20 хв. на повітрі. Далі мембрани відмивались в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів.

2.5. МЕТОДИКА ВИМІРЮВАННЯ

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4, за кімнатної температури у багатоканальній вимірювальній кюветі з інтенсивним перемішуванням.

Концентрацію відповідних субстратів, або їх суміші, змінювали, додаючи певні аліквоти вихідних концентрованих розчинів. Після отримання сигналів мультибіосенсорну систему відмивали, змінюючи робочий буфер мінімум 3 рази до повернення сигналу на базову лінію.

При вимірюванні глюкози, сечовини та креатиніну у сироватці крові хворих за допомогою мультибіосенсорної системи кінцеве розведення проб у комірці складало 1:10. Для розрахунку абсолютних величин концентрацій сечовини та креатиніну в пробах використовували два методи біосенсорного визначення за калібрувальною кривою та методом стандартних додавань [18].

Усі дослідження проводились у 3-5 повторностях.

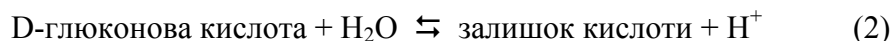
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В основі роботи потенціометричного мультибіосенсора для одночасного визначення сечовини, креатиніну та глюкози лежать наступні ферментативні реакції:

Глюкозооксидаза



↓



Рекомбінантна уреаза



Креатиніндеїміназа



ціометричного мультибіосенсора було цілком достатньо для визначення вищевказаних метаболітів в сироватці крові хворих на ниркову недостатність.

Оскільки матриця з біоселективними елементами потенціометричного мультибіосен-

В ході ферментативних реакцій (1-4) відбувається поглинання або утворення протонів, що призводить до зміни рН та відповідно, виникнення сигналу, який ми і реєструємо за допомогою рН-чутливих польових транзисторів.

Під час перевірки працездатності мультибіосенсорної системи при одночасному вимірюванні глюкози, сечовини та креатиніну в модельних буферних розчинах були отримані залежності величини відгуків усіх трьох біосенсорів на додавання у вимірювальну комірку суміші субстратів, представлені на рис.4. Після цього було побудовані калібрувальні криві визначення відповідного субстрату за допомогою мультибіосенсорної системи (рис. 5).

Як можна бачити з наведеного графіка (рис. 4), за допомогою розробленого мультибіосенсора були отримані типові кінетичні криві залежності відгуків від концентрації субстратів. При цьому лінійний діапазон для визначення сечовини знаходився в межах від 0,5 до 10 мМ, для креатиніну – від 0,08 до 2 мМ, для глюкози – від 0,08 до 1 мМ. Таких лінійних діапазонів біоселективних елементів потен-

сора повинна працювати в одному і тому ж середовищі та за однакових умов, то необхідно було перевірити наявність перехресного впливу субстратів на величину відгуку для окремих біоселективних елементів. Для цього, в мультирежимі було отримано відгуки

усіх трьох біосенсорів на додавання у вимірювальну комірку окремо спочатку глюкози, потім сечовини, а потім креатиніну. Реальний вигляд відгуків, що були отримані в усіх трьох експериментах приведено на рис.6.

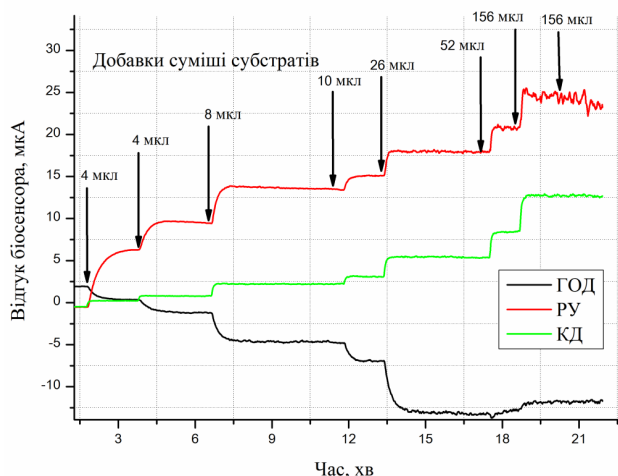


Рис. 4. Реальні відгуки мультибіосенсорної системи на додавання суміші субстратів: 40 мМ глюкози, 250 мМ сечовини та 40 мМ креатиніну. Вимірювання проведені в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4, за кімнатної температури.

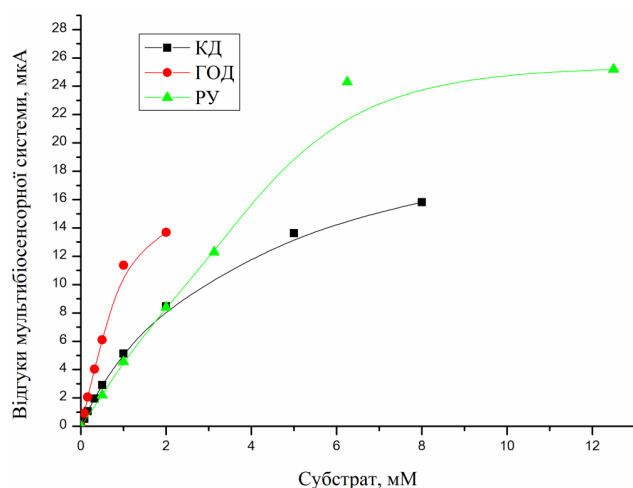


Рис. 5. Калібрувальні криві залежності відгуків мультибіосенсора від концентрацій глюкози, сечовини та креатиніну. Вимірювання проведені в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4, за кімнатної температури.

В табл. 1 представлено результати попереднього експериментального дослідження, які підтверджують, що біоселективні елементи потенціометричної мультибіосенсорної системи на основі ГОД, КД, РУ були високоселек-

тивними по відношенню до своїх субстратів: глюкози, креатиніну та сечовини відповідно. Наведені в таблиці результати перехресного впливу специфічних субстратів на відгуки сенсорних елементів мультибіосенсора є дуже важливими показниками для оцінки цих субстратів в реальних біологічних зразках.

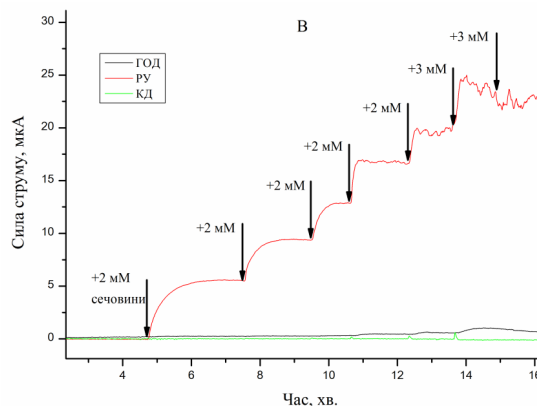
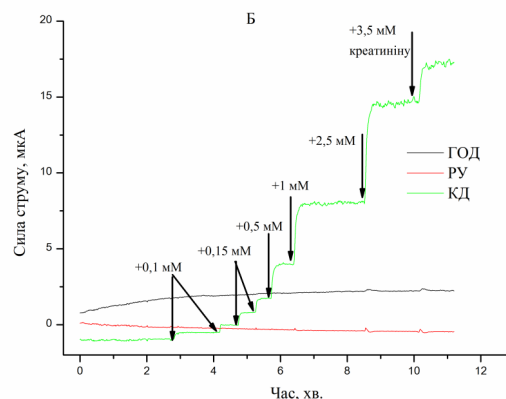
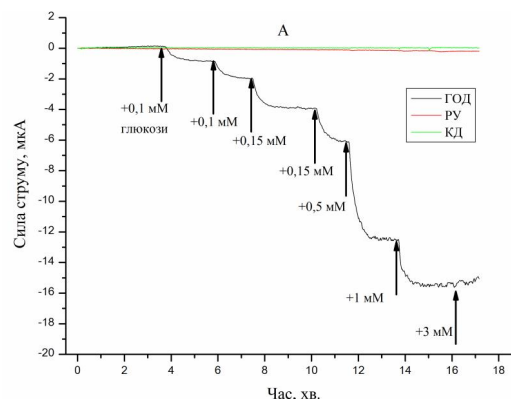


Рис. 6. Реальні відгуки трьох біосенсорів в складі мультибіосенсорної системи на додавання у вимірювальну комірку глюкози (А), креатиніну (Б) та сечовини (В). Вимірювання проведені в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4, за кімнатної температури.

Таблиця 1

Вплив окремих субстратів та їх суміші на відгуки біоселективних елементів потенціометричного мультибіосенсора

Ферментна система	0,5 мМ глюкоза	3 мМ сечовина	0,5 мМ креатинін	Суміш субстратів
РУ	0%	100%	0%	100%
КД	0%	0%	100%	100%
ГОД	100%	0%	0%	100%
БСА	0%	0%	0%	0%

Варто зазначити, що однією з найважливіших характеристик роботи біосенсора є відтворюваність відгуків при додаванні однієї і тієї ж концентрації субстрату через певний проміжок часу. Для перевірки цієї робочої характеристики мультибіосенсорної системи ми протягом одного робочого дня з інтервалом 30 хв. отримували відгуки на одну і ту ж суміш субстратів з такими кінцевими концентраціями: 3 мМ сечовини, 0,5 мМ креатиніну та 0,5 мМ глюкози. Вибрані для дослідження концентрації аналітів знаходились на відрізках лінійних діапазонів калібрувальних кривих мультибіосенсора. Впродовж експерименту вся матриця рН-чутливих польових транзисторів з іммобілізованими на них ферментами залишалась у робочому буферному розчині за кімнатної температури при постійному перемішуванні робочого розчину (рис. 7).

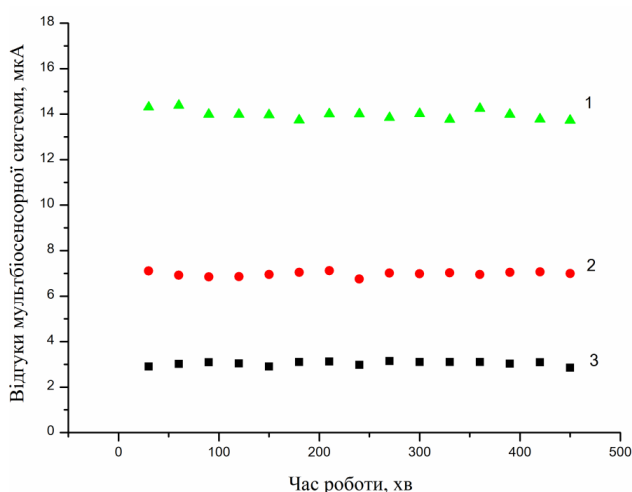


Рис. 7. Відтворюваність мультибіосенсорної системи протягом одного робочого дня. Концентрація субстратів в суміші: 3 мМ сечовина (1), 0,5 мМ креатинін (2) та 0,5 мМ глюкоза (3). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Усі отримані в попередніх експериментах результати свідчили про можливість використання розробленої мультибіосенсорної системи для аналізу глюкози, сечовини та креатиніну в реальних біологічних зразках. Тому наступним нашим завданням була апробація розробленої потенціометричної мультибіосенсорної системи при визначенні концентрацій сечовини, креатиніну та глюкози в сироватці крові хворих на ниркову недостатність. Отримані результати наведено в табл. 2. Висока концентрація сечовини в пробах підтверджує діагноз про наявність у пацієнтів ниркової недостатності. Але в пробі № 4 було також сильне перевищення концентрації глюкози, що дає підстави для подальшої діагностики щодо наявності у пацієнта цукрового діабету.

Таблиця 2

Результати біосенсорного аналізу концентрацій сечовини, глюкози та креатиніну в сироватці крові хворих на ниркову недостатність

№ проби	Концентрація сечовини, мМ	Концентрація креатиніну, мМ	Концентрація глюкози, мМ
1	33 ± 0,99	1,6 ± 0,07	5,8 ± 0,17
2	28,32 ± 1,13	1,79 ± 0,03	1,32 ± 0,05
3	26,79 ± 0,86	1,68 ± 0,03	4,38 ± 0,15
4	25,5 ± 0,71	0,38 ± 0,009	15 ± 0,54
5	31,61 ± 1,17	1,3 ± 0,022	5,78 ± 0,3

4. ВИСНОВКИ

В даному дослідженні було розроблено мультибіосенсорну систему на основі рН-чутливих

польових транзисторів та іммобілізованих ферментів глюкозооксидази, рекомбінантної уреазі та креатиніндаміннази. Перевірено чутливість мультибіосенсорної системи до різних концентрацій глюкози, сечовини та креатиніну та визначено лінійні діапазони їх визначення. Показано відсутність перехресного впливу усіх субстратів на різні ферментні системи. Проведено апробацію системи при роботі з сироваткою крові.

Запропонована розробка, за умов відповідної адаптації, може використовуватись для кількісного вимірювання концентрацій глюкози, креатиніну та сечовини у крові хворих на цукровий діабет, що ускладнений нирковою недостатністю або ж для контролю ефективності гемодіалізу у пацієнтів з хронічною хворобою нирок на термінальній стадії.

ПОДЯКА

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1]. A. Yu. Babenko, V. K. Bayrasheva, Diabetic Nephropathy // *Medical Sonnet*, 7, pp. 32–43 (2015).
- [2]. V. G. Kajarian, N. I. Kapshitar, P. P. Bidzil, A. O. Solovyuk, Estimation of the efficacy of sulose doses of II-stage diabetes nephropathy in patients with type 2 diabetes // *Zaporozhye Medical Journal* 4(79), pp. 85-89 (2013).
- [3]. V. G. Maidannik, E. A. Burlaka, Status of metabolic-hypoxic disorders in diabetic nephropathy in children // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry* 4, pp. 47–55 (2015).
- [4]. S. V. Gautier, Type 1 diabetes mellitus, diabetic nephropathy: transplantology possibilities // *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences* 1, pp. 54–60 (2012).
- [5]. N. Noritsugu Wada, K. Mori, C. Nakagawa, J. Sawa, Y. Kumeda, T. Shoji, M. Emoto, M. Masaaki Inaba, Improved Glycemic Control with Teneligliptin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus on Hemodialysis: Evaluation by Continuous Glucose Monitoring // *Journal of Diabetes and its Complications* 29, pp. 1310–1313 (2015).
- [6]. M. Abea, T. Higuchib, M. Moriuchia, M. Okamura, R. Tei, C. Naguraa, H. Takashima, F. Kikuchic, H. Tomitad, K. Okada, Efficacy and safety of saxagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in hemodialysis patients with diabetic nephropathy: A randomized open-label prospective trial // *Diabetes Research and Clinical Practice* 116, pp. 244–252 (2016).
- [7]. A. Radomska, R. Koncki, K. Pyrzyńska et al. Bioanalytical system for control of hemodialysis treatment based on potentiometric biosensor for urea and creatinine // *Analytica Chimica Acta* 523, pp. 193–200 (2004).
- [8]. M. Gutierrez, S. Alegret, M. del Valle Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples // *Biosensors and Bioelectronics* 23, pp. 795–802 (2008).
- [9]. P. Pookaiyaudom, P. Seelanan, F. J. Lidgey et al. Measurement of urea, creatinine and urea to creatinine ratio using enzyme based chemical current conveyor (CCCII+) // *Sensors and Actuators B*. 153, pp. 453–459 (2011).
- [10]. M. Jurkiewicz, S. Alegret, J. Almirall, M. García, E. Fàbregas, Development of a biparametric bioanalyser for creatinine and urea. Validation of the determination of biochemical parameters associated with hemodialysis // *Analyst* 123, pp. 1321–1327 (1998).
- [11]. M. Jaffe, Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins // *Zeitschrift für physiologische Chemie* 10, pp. 391–400 (1886).
- [12]. G. F. Khan, W. Wernet, A highly sensitive amperometric creatinine sensor // *Analytica Chimica Acta* 351, pp. 151-158 (1997).
- [13]. A. J. Killard, S. M. Smyth Creatinine biosensors: principles and designs // *Trends in Biotechnology* 18(10), pp. 433–437 (2000).
- [14]. http://www.terramedica.spb.ru/1d4_2007/slepushiva.htm.
- [15]. Y.-H. Lin, S.-H. Wang, M.-H. Wu, T.-M. Pan, C.-S. Lai, J.-D. Luo, C. C. Chiou,

Integrating solid-state sensor and microfluidic devices for glucose, urea and creatinine detection based on enzyme-carrying alginate microbeads // *Biosensors and Bioelectronics* 43, pp. 328–335 (2013).

[16]. C.-S. Rui, H.-I. Ogawa, K. Sonomoto, Y. Kato Multifunctional flow-injection biosensor for the simultaneous measurement of creatinine, glucose and urea // *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, pp. 191–194 (1993).

[17]. A. L. Kukla, A. S. Pavluchenko, Yu. V. Goltvjanskyi, A. A. Soldatkin, V. M.

Arkhypova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, Sensor arrays based on the differential isfet elements for monitoring of toxic substances of natural and artificial origin // *Sensor Electronics and Microsystem* 2, pp. 58–68 (2008).

[18]. Otto M. *Sovremennyye metody analiticheskoy khimii*, M: Tekhnosfera, 412 s. (2003).

Стаття надійшла до редакції 08.05.2018 р.

UDC: 543.06 + 577.15 + 543.554

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136888>

MULTIBIOSENSOR SYSTEM BASED ON pH-SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTORS FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF GLUCOSE, CREATININE AND UREA

O. O. Soldatkin^{1,2}, S. V. Marchenko¹, A. L. Kukla³, A. S. Pavluchenko³, S. V. Dzyadevych^{1,2}, A. P. Soldatkin^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Zabolotnogo Str., Kyiv, 150, 03148, Ukraine.

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska Str. Kyiv, 64, 01003, Ukraine.

³Institute of Semiconductor Physics NAS of Ukraine, av. Nauki, Kyiv, 41, 03028, Ukraine.

Summary

Aim: The development of a multibiosensor system based on pH-sensitive field-effect transistors for the simultaneous determination of glucose, creatinine and urea.

Methods. When creating bioselective elements of the multibiosensor system, glucose oxidase, recombinant urease, and creatinine deaminase were used. Each enzyme was immobilized on the surface of corresponding pH-sensitive field-effect transistor by covalent cross-linking with bovine serum albumin using glutaraldehyde. In the course of enzymatic reactions, the absorption or formation of protons occurs, which results in the pH change and appearance of the signal on corresponding pH-sensitive field-effect transistor.

Results. The possibility of simultaneous operation of all bioselective elements of the multibiosensor system was checked. The linear ranges of the determination were: for urea - 0.5 - 10 mM, for creatinine - 0.08 - 2 mM, for glucose - 0.08 - 1 mM. These values were adequate for the simultaneous determination (the only dilution of the sample) of the above metabolites in the blood serum of patients with renal insufficiency. The presence of cross-effect of substrates for individual bio-selective elements was also checked, and the possibility of their simultaneous operation was proven. It was shown that the multibiosensor system is characterized by good reproducibility of responses at continuous work over one working day. The developed system was used to analyze glucose, urea and creatinine in the

blood serum of patients with renal failure. The obtained results confirmed the optimistic prospects of the developed multibiosensor assay.

Conclusions. A multibiosensor system based on pH-sensitive field-effect transistors was developed for simultaneous determination of glucose, creatinine and urea. It is proven that this device is promising to measure and control the concentrations of glucose, creatinine and urea in the blood serum of patients with renal insufficiency.

Keywords: Urea, glucose, creatinine, biosensor, multibiosensor system, pH-sensitive field effect transistor, blood serum

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.554

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136888>

МУЛЬТИБІОСЕНСОРНА СИСТЕМА НА ОСНОВІ pH-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ, КРЕАТИНІНУ ТА СЕЧОВИНИ

*О. О. Солдаткін^{1,2}, С. В. Марченко¹, О. Л. Кукла³, О. С. Павлюченко³, С. В. Дзядевич^{1,2},
О. П. Солдаткін^{1,2}*

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

³Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова НАН України, просп. Науки, 41, 03028,
м. Київ, Україна

Реферат

Мета: створення мультибіосенсорної системи на основі pH-чутливих польових транзисторів для одночасного визначення глюкози, креатиніну та сечовини.

Методи дослідження. При створенні біоселективних елементів мультибіосенсорної системи використовували глюкозооксидазу, рекомбінантну уреазу та креатиніндеаміназу. Кожен фермент було іммобілізовано ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні pH-чутливого польового транзистора. В ході кожної з ферментативних реакцій відбувається поглинання або утворення протонів, що призводить до зміни pH та відповідно, виникнення сигналу, який реєструється за допомогою pH-чутливих польових транзисторів.

Результати дослідження. Перевірена можливість одночасної роботи усіх біоселективних елементів в складі мультибіосенсорної системи. Лінійний діапазон для визначення сечовини знаходився в межах від 0,5 до 10 мМ, для креатиніну – від 0,08 до 2 мМ, для глюкози – від 0,08 до 1 мМ. Таких лінійних діапазонів було цілком достатньо для одночасного визначення (єдиного розведення проби) вищевказаних метаболітів в сироватці крові хворих на ниркову недостатність. Також було перевірено наявність перехресного впливу за субстратами для окремих біоселективних елементів, та доведено можливість їх одночасної роботи. Показано, що мультибіосенсорна система характеризується доброю відтворюваністю відгуків при безперерв-

ній роботі впродовж одного робочого дня. Розроблену систему було використано для аналізу глюкози, сечовини та креатиніну в сироватці крові хворих на ниркову недостатність. Отримані результати підтверджують діагноз хворих на ниркову недостатність і доводять перспективність даної розробки.

Висновки. Розроблено мультибіосенсорну систему на основі рН-чутливих польових транзисторів для одночасного визначення глюкози, креатиніну та сечовини. Доведено, що подальшому її можна використати для вимірювання та контролю концентрацій глюкози, креатиніну та сечовини в сироватці хворих на ниркову недостатність.

Ключові слова: сечовина, глюкоза, креатинін, біосенсор, мультибіосенсорна система, рН-чутливий польовий транзистор, сироватка крові