

УДК: 543.555, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.3.312689>

НОВИЙ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ВМІСТУ КРЕАТИНІНУ

В. А. Бахмат^{1,2}, В. М. Архипова¹, О. О. Солдаткін,^{1,3} С. В. Дзядевич^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, 03143,
вул. Заболотного-150, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01601,
вул. Володимирська 60, м. Київ, Україна

³Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського», 03056, проспект Берестейський 37, м. Київ, Україна
veronikab2406@gmail.com; avalka@yahoo.com;
alex_sold@yahoo.com; dzyad@yahoo.com

НОВИЙ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ВМІСТУ КРЕАТИНІНУ

В. А. Бахмат, В. М. Архипова, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Анотація. В роботі розроблено новий електрохімічний біосенсор на основі креатиніндеімінази для визначення концентрації креатиніну в біологічних зразках. Підібрано оптимальну методику іммобілізації біоселективних елементів на поверхні електродів, а саме ковалентне зв'язування креатиніндеімінази у БСА матриці за допомогою глутарового альдегіду. Біосенсори, виготовлені даним чином, характеризувались найвищою чутливістю до креатиніну та високою відтворюваністю виготовлення біомембран. Вони демонстрували низьку мінімальну границю визначення креатиніну, високу стабільність сигналів (RSD = 3%), значну стабільність при зберіганні та широкий лінійний діапазон визначення, що включає в себе можливість виявлення в біологічних рідинах концентрацій креатиніну в нормі та при патологіях. В роботі досліджено вплив параметрів робочого розчину, таких як іонна сила, буферна ємність, рН та вміст білку, на роботу розробленого біосенсора.

Основні аналітичні характеристики запропонованого в роботі електрохімічного біосенсора свідчать про потенційну можливість його використання для моніторингу концентрації креатиніну у біологічних зразках.

Ключові слова: електрохімічний аналіз, біосенсор, концентрація креатиніну, креатиніндеіміназа, іммобілізація ферменту, ферментативний аналіз.

A NOVEL ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON CREATININE DEIMINASE FOR CREATININE ANALYSIS

V. A. Bakhmat, V. M. Arkhypova, O. O. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Abstract. This work presents the development of a new electrochemical biosensor based on creatinine deiminase for the determination of creatinine concentration in biological samples.

© В. А. Бахмат, В. М. Архипова, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич, 2024

The optimal method for immobilizing bioselective elements on the electrode surface was selected, specifically the covalent binding of creatinine deiminase in a BSA matrix using glutaraldehyde. The biosensors prepared in this way exhibited the highest sensitivity to creatinine and high reproducibility in the fabrication of biomembranes. The biosensor demonstrated a low limit of detection of creatinine, high signal stability (RSD = 3%), significant storage stability, and a wide linear range, enabling the detection of both normal and pathological creatinine concentrations in biological fluids. The study also investigated the influence of working solution parameters, such as ionic strength, buffer capacity, pH, and protein content, on the biosensor's performance.

The main analytical characteristics of the proposed electrochemical biosensor indicate its potential use for monitoring creatinine concentration in biological samples.

Keywords: electrochemical analysis, biosensor, creatinine concentration, creatinine deiminase, enzyme immobilization, enzymatic analysis

ВСТУП

Креатинін — це кінцевий продукт обміну білків в організмі, що утворюється в результаті перетравлення білків з їжі та м'язового метаболізму. Він виводиться з організму через нирки разом з сечею. Креатинін є важливим біомаркером для оцінки функції нирок та виявлення різних захворювань нирок. В нормі невеликі концентрації креатиніну постійно присутні в крові, а підвищений рівень креатиніну в сироватці крові, як і зниження його концентрацій в сечі може свідчити про порушення функції нирок, таких як ниркова недостатність, ускладнення діабетичної нефропатії чи хронічна хвороба нирок. Вимірювання концентрації креатиніну дозволяє оцінити ефективність фільтрації нирок та визначити швидкість клубочкової фільтрації, що є ключовим показником для визначення стадії захворювання та обрання протоколів подальшого лікування. Відповідно, швидка, надійна та проста процедура діагностики рівня креатиніну у біологічних рідинах є надзвичайно важливою, адже хвороби нирок широко поширені та небезпечні [1-3].

До прикладу, хронічна хвороба нирок є суттєвим чинником загальних витрат на охорону здоров'я в Сполучених Штатах, Азії, Європі та Латинській Америці [4]. Загалом у світі в 2017 році кількість осіб з хронічною хворобою нирок на усіх стадіях досягла майже 700 мільйонів, що перевищує кількість людей, які страждають на діабет, остеоартрит, астму або депресивні розлади. Діагностована хронічна хвороба нирок призвела до 1,2 мільйона смер-

тей у 2017 році, і за прогнозами, до 2040 року цей показник може зрости до 2,2 мільйона при позитивному розрахунку і до 4,0 мільйонів при найгіршому сценарії [5]. Така масштабна проблема вимагає рішучих дій у сфері скринінгу, профілактики та лікування хвороб нирок. Тому актуальним напрямком є розробка нових загальнодоступних, точних, експрес методів детекції креатиніну.

На сьогоднішній день для кількісного визначення креатиніну розроблено ряд методів: вискоєфективна рідинна хроматографія [6], газова хромато-мас-спектрометрія [7], капілярний зонний електрофорез [8], колориметрія [9] тощо. Ці методи є високочутливими та вибірконими, але потребують відносно дорогого обладнання, висококваліфікованого персоналу, складних операційних процедур та тривалого часу для визначення. Порівняно з традиційними методами аналізу добре налаштований біосенсорний підхід може мати ряд важливих переваг, таких як простота процедури визначення, швидкість діагностики, низька собівартість аналізу, висока чутливість, селективність та стабільність методики, завдяки застосуванню ферментів та/або інших високоспецифічних речовин в якості розпізнавальних елементів.

На сьогодні описано кілька біосенсорних розробок для детекції креатиніну, в більшості випадків вони створені з використанням електродів, а саме потенціометричних та амперометричних [10-13]. Описані розробки показують потенційну перспективу у впровадженні біосенсорних експрес-методів

у клінічну діагностику захворювань нирок, проте вони мають ряд недоліків, що обмежують їхнє використання для кількісної детекції креатиніну: недостатньо низька межа та відносно короткий лінійний діапазон визначення креатиніну, достатньо тривалий час одного аналізу. Крім того, вартість аналізу хоч і нижча за традиційні методики, але ще достатньо висока, за рахунок модифікацій біоселективних елементів описаних біосенсорів сторонніми сполуками, такими як наночастинки тощо.

Проаналізувавши недоліки, переваги та особливості потенціометричних та амперометричних біосенсорів можна стверджувати, що розробка нового кондуктометричного ферментного біосенсора для аналізу концентрації креатиніну лишається актуальною, оскільки значно здешевить собівартість аналізу та зменшить час визначення концентрації креатиніну.

Кондуктометричні біосенсори у порівнянні з іншими видами біосенсорів мають ряд важливих переваг, а саме не потребують використання електроду порівняння, нечутливі до світла, можуть бути мініатюризовані та легко інтегровані за допомогою дешевої стандартної технології тонких плівок. Самі електроди для кондуктометричних вимірювань є значно дешевшими, що дозволяє зробити кондуктометричні вимірювання більш економічно вигідними. Принцип роботи кондуктометричних біосенсорів полягає у вимірюванні зміни провідності приелектродного шару розчину, оскільки в ході ферментативної реакції при взаємодії ферменту з аналітом утворюються певні іони [14].

В даній роботі представлено розробку та оптимізацію нового кондуктометричного біосенсора для кількісного визначення креатиніну у біологічних зразках.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріали та реактиви

Для створення біоселективного елементу біосенсора було використано: креатиніндеїміназу отриману із *Streptomyces sp.*, ліофільно висушену, з активністю 19 од. акт. мг⁻¹, бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V)

та 25% водний розчин глутарового альдегіду, отримані від фірми Sigma-Aldrich Chemie (США), PVA/SbQ фірми Toyo Gosei Kogyo Co.Ltd (Японія), гліцерин фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Як стоковий розчин субстрату використовували 500 мМ креатинін фірми Sigma-Aldrich Chemie (США). Для виготовлення буферного розчину використовували КН₂Р₀₄, та NaOH, отримані від фірми Merck (Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.» та «ч.д.а.».

Конструкція кондуктометричних перетворювачів

В роботі, для створення біосенсорів на основі креатиніндеїмінази, використовувалися кондуктометричні перетворювачі, детальний опис яких наведено у попередній роботі [15]. Перетворювачі були виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна). Вони мають компактний розмір 5 мм × 30 мм та складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлених методом фотолітографії та термовакuumним напиленням шару золота на непровідну основу із ситалу. Кожна така електродна система складається із 20 пар гребінчастих електродів із загальною площею чутливої поверхні близько 2 мм².

Схема вимірювальної установки

В роботі для проведення біосенсорних вимірювань використовувався портативний кондуктометричний прилад «МХР-3-Conductometer», який був розроблений та виготовлений в Інституті електродинаміки НАН України [16]. Детальний опис загальної схеми вимірювальної системи з кондуктометричним приладом, що була використана в даній роботі, представлено в попередній роботі [15]. Біосенсор занурюють у відкриту скляну вимірювальну комірку об'ємом 2 мл, заповнену фосфатним буферним розчином, куди вноситься субстрат. Завдяки використанню магнітного перемішувача забезпечується однорідність

робочого розчину та концентрацій субстратів у ньому на всіх етапах вимірювань. Біосенсор фіксується за допомогою спеціального контактуючого пристрою, що підключений до кондуктометричного портативного вимірювального приладу «МХР-3-Conductometer». В свою чергу, вимірювальний прилад підключається до персонального комп'ютера та має спеціально розроблене програмне забезпечення, яке дає можливість візуалізувати сигнали біосенсора та зберігати історію проведених вимірювань.

Виготовлення біоселективних елементів

Біоселективні елементи створювали шляхом коїмобілізації креатиніндеїмінази та бичачого сироваткового альбуміну (БСА) за допомогою таких методик: 1) ковалентне зшивання в краплі 1% глутарового альдегіду (ГА); 2) ковалентне зшивання в насичених парах ГА; 3) фотополімеризація з 20% фотополімером PVA/SbQ, що змішуються безпосередньо перед іммобілізацією; 4) фотополімеризація із задалегідь змішаними креатиніндеїміназою і 10% PVA/SbQ.

Суміш для ферментної мембрани створювалася з вмістом 10% креатиніндеїмінази і 5% БСА, яка була розчинена в 20 мМ фосфатному буферному розчині з рН 6,5, що містить 10% гліцерину. Суміш для референтної мембрани готували за такою ж методикою без додавання ферменту, використовуючи 10% БСА.

Процес створення біоселективних мембран різними методиками відбувався наступним чином. При іммобілізації в краплі глутарового альдегіду, готові розчини для ферментної та референтної мембрани змішували з 1% водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1 безпосередньо перед нанесенням сумішей на електроди. Об'єм нанесеної на поверхню електрода мембрани становив близько 0,1 мкл. Після нанесення, датчики залишали за кімнатної температури на 20 хв.

При іммобілізації в парах глутарового альдегіду, розчини для ферментної та референтної мембрани наносили безпосередньо на поверхню кондуктометричних електродів і далі датчики розміщували в ексикаторі з на-

сиченими парами глутарового альдегіду на 20 хв, після чого датчики залишали на повітрі за кімнатної температури на 10 хв до повного висихання.

Для проведення іммобілізації методом фотополімеризації запропоновано 2 методики: перша - з попереднім змішуванням ферменту і фотополімеру PVA/SbQ з подальшим зберіганням за температури -18°C до проведення процесу фотополімеризації та друга - на основі змішування розчинів ферменту і фотополімеру PVA/SbQ безпосередньо перед нанесенням на електроди та проведенням процесу фотополімеризації.

В першій методиці, для створення суміші з подальшим зберіганням, розчини для ферментної та референтної мембрани змішували з 10% водним фотополімером PVA/SbQ у співвідношенні 1:1, ретельно перемішували та зберігали в темному місці за температури -18°C . Безпосередньо перед іммобілізацією суміші розморожували, наносили на поверхню кондуктометричних електродів та розміщували датчики під УФ-опромінення в систему Bio-Link BLX-365 (доза – 20 Дж/м^2 , довжина хвилі – 365 нм) на 15 хв, після опромінення датчики залишали на повітрі за кімнатної температури на 5 хв до повного висихання мембран.

В другій методиці, розчини для ферментної та референтної мембрани змішували з 20% водним фотополімером PVA/SbQ у співвідношенні 1:1 безпосередньо перед нанесенням на електроди, далі розміщували датчики під УФ-опромінення в систему Bio-Link BLX-365 (доза – 20 Дж/м^2 , довжина хвилі – 365 нм) на 15 хв, після опромінення датчики залишали на повітрі за кімнатної температури на 5 хв до повного висихання мембран.

Перед початком проведення експериментів всі біосенсори з нанесеними мембранами протягом 5 хв промивали у 5 мМ фосфатному буферному розчині з рН 7,4, в якому і проводились подальші дослідження.

Методика проведення біосенсорних вимірювань

Вимірювання проводили при денному світлі за кімнатної температури (близько 25°C)

у 5 мМ фосфатному буферному розчині рН 7,4 у відкритій скляній комірці об'ємом 2 мл з постійним інтенсивним перемішуванням, що забезпечувалося за допомогою магнітної мішалки. Концентрацію субстрату в комірці задавали додаванням порцій стандартних концентрованих розчинів субстрату до фосфатного буферного розчину у вимірювальній комірці. Дослідження проводили як мінімум з трикратним повторенням.

Початково біосенсор поміщали у вимірювальну комірку, заповнену буферним розчином, і починалась відмивка до стабілізації базової лінії. Після отримання стабільного початкового сигналу (базової лінії) протягом 30-60 с до комірки додавали певну аліквоту стандартного концентрованого розчину субстрату (креатиніну), повний відгук досягався за 20-30 с. Диференціальний вихідний сигнал кондуктометричного перетворювача між двома парами гребінчастих електродів з нанесеними ферментною та референтною мембранами реєстрували за допомогою портативного пристрою "МХР3-Conductometer". Змінюючи концентрацію креатиніну у вимірювальній комірці отримували залежність сигналу біосенсора від концентрації внесеного в комірку субстрату. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливанням температури чи рН розчину нівелювалися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань, тобто вимірювалась різниця сигналів з двох пар електродів з ферментною та референтною мембраною, розташованих на одному перетворювачі. Всі розрахунки проводились в програмі OriginLab OriginPro 8.5

Результати та обговорення

Принцип функціонування біосенсора на основі КД

В основі роботи біосенсора на основі креатиніндеїмінази для аналізу концентрації креатиніну лежить наступна реакція ферментативного розщеплення креатиніну:

Креатиніндеїміназа

Креатинін + H₂O + H⁺ → N-метилгідантоїн + NH₄⁺

При внесенні певної аліквоти креатиніну в комірку з біосенсором, даний субстрат вступає в описану вище ферментативну реакцію з креатиніндеїміназою, іммобілізованою на поверхні золотих електродів. В процесі проходження ферментативної реакції при каталітичній дії креатиніндеїмінази відбувається розщеплення креатиніну, утворюється додатковий амоній (NH₄⁺) та поглинаються протони (H⁺) [17]. Це змінює провідність розчину в приелектродному просторі, що реєструється за допомогою кондуктометричного перетворювача та приладу «МХР-3-Conductometer», і за допомогою відповідного програмного забезпечення візуалізується на екрані комп'ютера.

Вибір оптимальної методики іммобілізації КД

Першим етапом при розробці будь яких ферментних біосенсорів є вибір оптимальної методики іммобілізації біоселективних елементів на електрохімічних перетворювачах. Оскільки саме цей етап є одним з найбільш важливих для забезпечення найкращої роботи біосенсора з максимально ефективним визначенням аналіту, тому на початковому етапі нашої роботи, було порівняно біосенсиори на основі різних методик іммобілізації КД: №1 – ковалентне зшивання в краплі 1% глутарового альдегіду (ГА); №2 – ковалентне зшивання в насичених парах ГА; №3 – фотополімеризація з 20% фотополімером PVA/SbQ, що зміщується з ферментом безпосередньо перед іммобілізацією; №4 – фотополімеризація із заздалегідь змішаними креатиніндеїміназою і 10% PVA/SbQ. Для порівняння було побудовано калібрувальні криві різних варіантів біосенсорів (рис. 1) та досліджено їх основні аналітичні характеристики.

З графіку видно, що лінійний діапазон визначення креатиніну за використання методики іммобілізації № 1 становить 0,005-1 мМ, за методики № 2 – 0,0125-0,9 мМ, методики № 3 – 0,02-1 мМ та №4 – 0,05-0,8 мМ. Біосенсиори виготовлені шляхом ковалентного зшивання ферменту з допомогою ГА (методики № 1 та № 2) показують достатньо широкий динамічний діапазон визначення креатиніну.

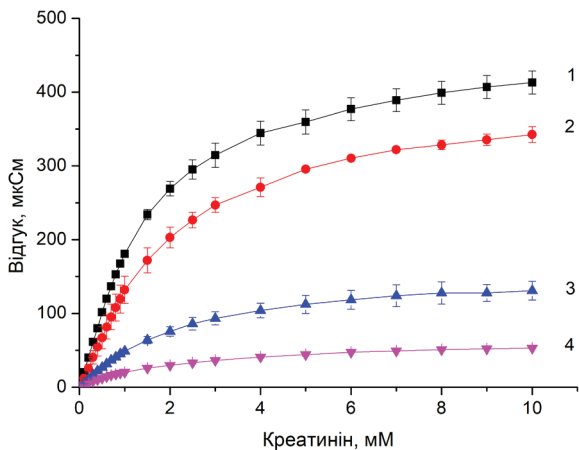


Рис. 1. Калібрувальні криві залежності величини відгуку біосенсора від концентрації креатиніну отримані за різних методик № 1-4 іммобілізації креатиніндеїмінази. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

В той же час при іммобілізації методикою № 2 біосенсор має найнижчу межу детекції креатиніну з представлених методик. Біосенсори, виготовлені за використання методик іммобілізації № 3 та № 4, мають недостатню чутливість до креатиніну, для аналізу його концентрацій в біологічних зразках.

Для якісного аналізу біологічних зразків та масового виробництва біосенсорів відтворюваність виготовлення біосенсорних мембран є ключовою характеристикою. Тому наступним етапом вибору подальшої методики іммобілізації КД стало дослідження відтворюваності їхнього приготування. Дослідження здійснювали шляхом проведення послідовних іммобілізацій біоселективних елементів з використанням методик №№ 1-4 на одному кондуктометричному перетворювачі. Отримані після іммобілізації біосенсори тестували на чутливість до креатиніну, а саме отримували відгуки біосенсорів на 5 мМ креатинін. Результати порівняння відтворюваності виготовлення біоселективних мембран біосенсорів з використанням різних методик іммобілізації наведено на рис. 2.

Як видно з результатів експерименту, біосенсори на основі креатиніндеїмінази, іммобілізованої в 1% розчині ГА (методика №1), характеризуються високою відтворюваністю

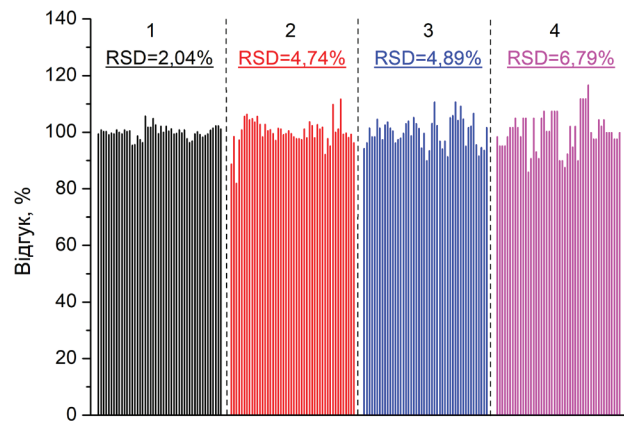


Рис. 2. Відтворюваність приготування біоселективних елементів біосенсора на основі креатиніндеїмінази, отримані за різних методик іммобілізації ферменту на поверхні перетворювача №№ 1-4. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Концентрація креатиніну в комірі – 5 мМ.

виготовлення біоселективних мембран. Відносне стандартне відхилення становить 2%, що є найкращим показником серед представлених методик.

Отже, враховуючі вищенаведені результати, для подальшої розробки використовували біоселективні елементи, виготовлені шляхом ковалентного зшивання ферменту за допомогою 1% розчину ГА (методика №1).

Дослідження впливу параметрів розчину на роботу кондуктометричного біосенсора на основі КД

Функціонування кондуктометричних біосенсорів доволі сильно залежить від властивостей розчину, в якому проводяться вимірювання. Відомо, що біологічні зразки можуть містити різні електроактивні сполуки і характеризуватися значною іонною силою, оскільки в них можуть бути присутні іони калію, натрію, магнію тощо, а також іони органічних і неорганічних кислот. Тому в рамках розробки кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації креатиніну в біологічних зразках необхідно було дослідити вплив іонної сили розчину на роботу запропонованого біосенсора. Відповідно, було проведено тестування роботи біосенсора в середовищах з різною іонною силою. Як джерело іонів було викорис-

тано 2 М розчин NaCl, аліквоти якого додавали до вимірювальної комірки з робочим буферним розчином для досягнення різних концентрацій (до 100 мМ), що імітувало роботу біосенсора в буферах з різною іонною силою. В рамках тестування роботи біосенсора, отримували відгуки на 5 мМ креатинін. Результати дослідження представлено на рис. 3.

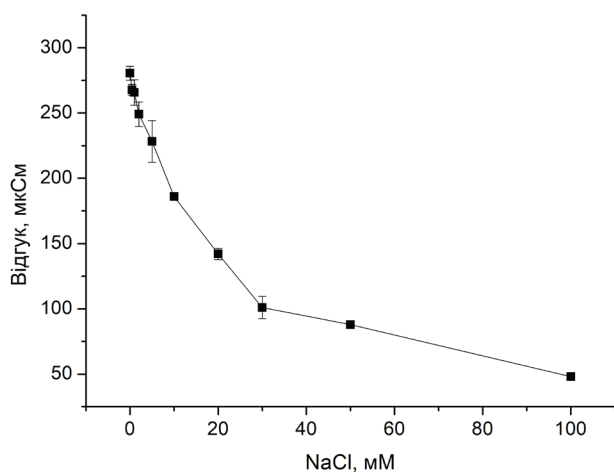


Рис. 3. Залежність величини відгуків біосенсора від іонної сили робочого буферного розчину. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Концентрація креатиніну в комірці – 5 мМ.

Аналізуючи отримані на рис. 3 результати, спостерігаємо експонентну залежність величини відгуку сенсора від іонної сили робочого розчину (концентрації NaCl). Встановлено, що зі зростанням іонної сили відгук на креатинін зменшується. Така залежність є типовою для кондуктометричних біосенсорів, оскільки зі збільшенням іонної сили відбувається зростання фонові провідності розчину, що впливає на величину відгуку. Тому в майбутньому при роботі з біологічними зразками важливо контролювати іонну силу розчинів.

Наступним параметром, який важливо перевірити при розробці кондуктометричного біосенсора, є буферна ємність, оскільки концентрація компонентів робочого буферу також може суттєво впливати на функціонування біосенсора. Відповідно, було досліджено вплив зміни буферної ємності робочого буферного розчину на величину відгуків біосенсора.

Відгуки біосенсора були отримані при різних концентраціях робочого фосфатного буферу у діапазоні від 1 до 50 мМ. Результати експерименту наведено на рисунку 4.

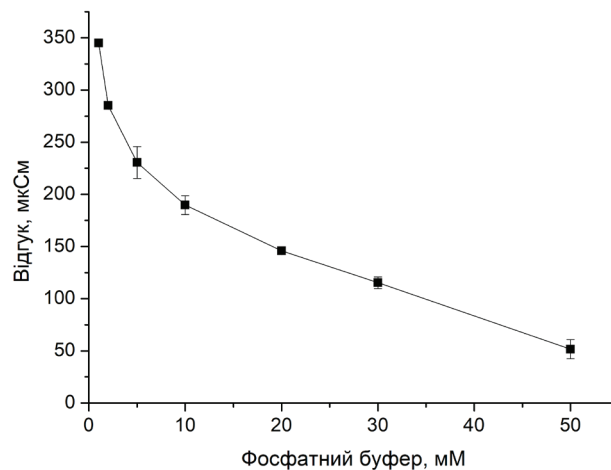


Рис. 4. Залежність величини відгуків біосенсора від буферної ємності робочого буферного розчину. Вимірювання проводили в фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Концентрація креатиніну в комірці – 5 мМ.

З отриманого графіку видно, що найбільші відгуки біосенсора було отримано при найменшій буферній ємності (концентрація буферу 1 та 2,5 мМ). За концентрацій буферного розчину від 5 мМ до 50 мМ спостерігається майже лінійна залежність зменшення величини відгуків біосенсора при підвищенні буферної ємності. Проте низька концентрація солей у буферному розчині (до 5 мМ) не може забезпечити достатню буферну ємність задля виконання всіх властивостей буферного розчину, у зв'язку з цим для подальших досліджень було обрано 5 мМ фосфатний буфер.

Черговим параметром, що є значущим при роботі з біологічними зразками, є концентрація білку в робочій комірці, оскільки біологічні рідини багаті на різноманітні білки, що може негативно вплинути на біосенсорний відгук. Тому було досліджено вплив присутності білку (БСА) в концентрації від 0,1 до 5% в робочому буферному розчині на функціонування кондуктометричного біосенсора на основі КД. Концентрації білку від 0,1 до 5% для проведення експерименту було обрано з

урахуванням розведення реального зразку під час біосенсорного аналізу. Отримані результати представлено на рис. 5.

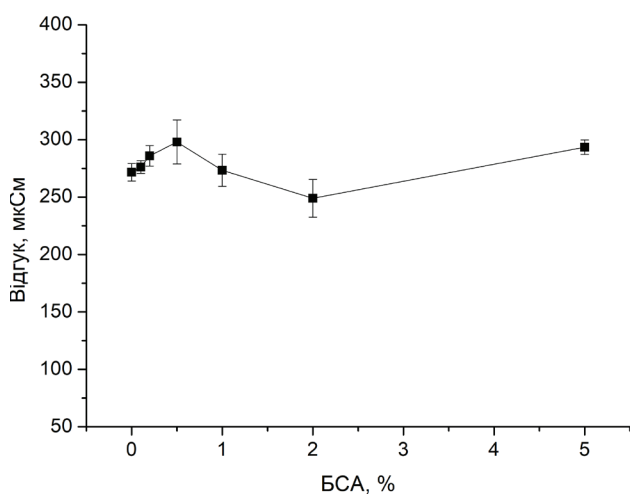


Рис. 5. Залежність величини відгуків біосенсора від концентрації БСА у робочому буферному розчині. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Концентрація креатиніну в комірі – 5 мМ.

Як видно з отриманого графіку, присутність доданого білку не впливає значним чином на величину відгуку біосенсора. При низьких концентраціях (до 0,5%) спостерігається незначне підвищення відгуку, що можна пояснити вирівнюванням білкового балансу в мембранах. Отже, виходячи з отриманих результатів, розроблений біосенсор можна потенційно використовувати для аналізу біологічних зразків, зокрема тих, що містять високі концентрації білків.

Відомо, що будь який нативний фермент має свій рН-оптимум функціонування, що може змінюватися після його іммобілізації. Відповідно, було вирішено провести дослідження залежності величини відгуків розробленого біосенсора на основі КД від рівня рН робочого буферного розчину. Відгуки біосенсора на 5 мМ креатинін були отримані для 5 мМ фосфатного буферу в діапазоні рН від 6 до 8. Результати експерименту наведено на рис. 6.

З отриманих результатів видно, що біосенсор на основі іммобілізованої КД можна використовувати для проведення біосенсорних вимірювань в широкому діапазоні рН (6-7,4).

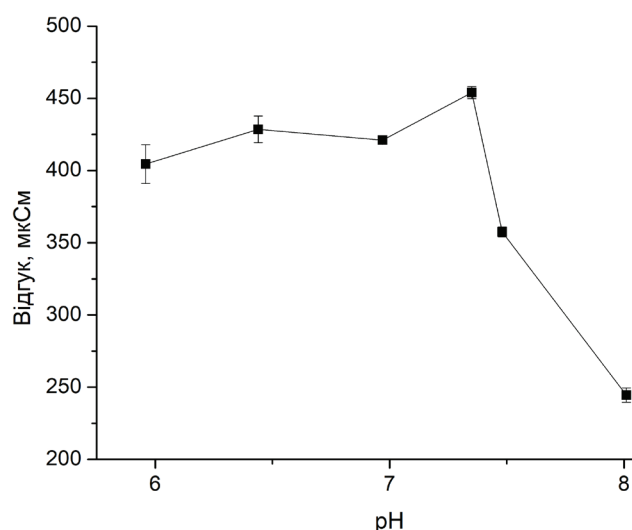


Рис. 6. Залежність величини відгуків біосенсора від рН робочого буферного розчину. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині. Концентрація креатиніну в комірі – 5 мМ.

В той же час найвищі відгуки біосенсора на основі КД спостерігались при роботі біосенсора у фосфатному буфері рН 7,4, що є оптимальним і буде використовуватись для проведення подальших досліджень.

Аналіз основних аналітичних характеристик розробленого біосенсора на основі КД

На наступному етапі розробки біосенсора для визначення концентрації креатиніну було досліджено основні аналітичні характеристики запропонованого біосенсора. Для дослідження цих параметрів аналізуються типові відгуки та калібрувальні криві біосенсора після усіх оптимізацій та адаптацій, як конструкції так і умов його функціонування (Рис. 7).

Встановлено, що мінімальна межа визначення креатиніну становила 5 мкМ, лінійний діапазон роботи був від 5 мкМ до 1 мМ креатиніну, чутливість – 172 ± 32 мкСм/мМ. Шум базової лінії при проведенні аналізу становить $0,4 \pm 0,2$ мкСм, дрейф базової лінії за одну хвилину – $1,0 \pm 0,5$ мкСм. 100% величини відгука після внесення креатиніну досягається за 25 ± 3 с, а час повного аналізу з реєстрацією базової лінії, її стабілізації та отримання самого відгуку становить 90 ± 30 с.

Проаналізувавши аналітичні характеристики розробленого кондуктометричного

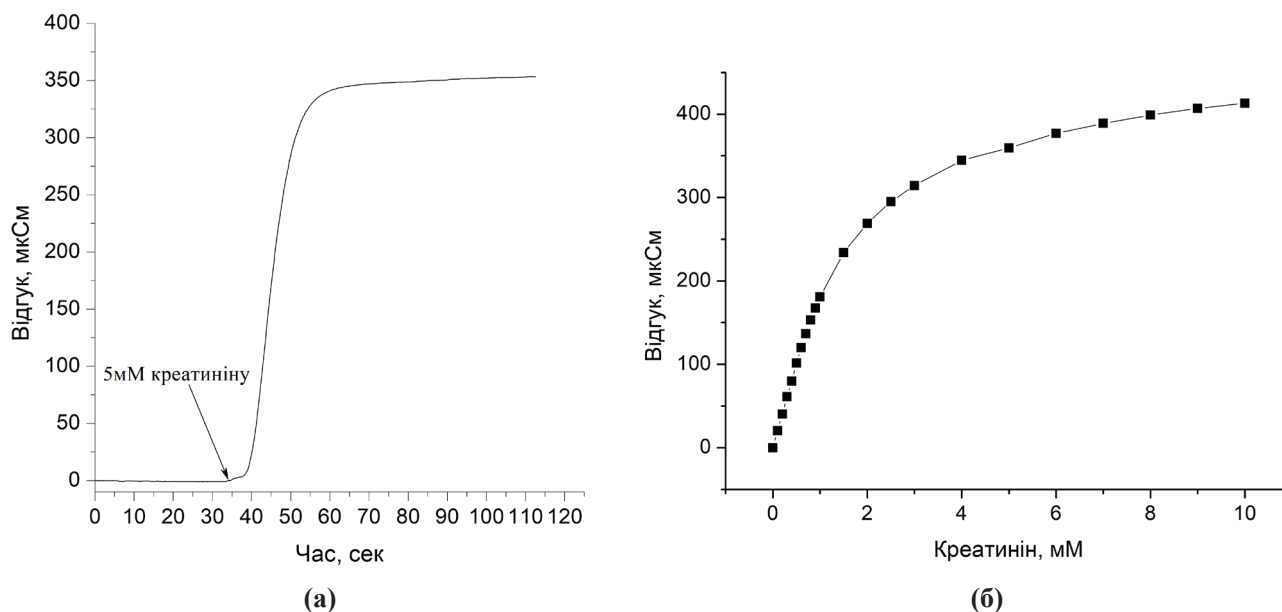


Рис. 7. Типовий відгук біосенсора на основі креатиніндеїмінази для аналізу концентрації креатиніну (а) та калібрувальна крива залежності величини відгуку біосенсора креатиніндеїмінази від концентрації креатиніну (б). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

біосенсора з'ясували, що широкий лінійний діапазон та висока чутливість біосенсора дозволяє вимірювати креатинін в крові в нормі, яка становить 0,6 – 1,1 мг/дл (53 – 97,3 мкМ) та визначати підвищені рівні креатиніну при різноманітних хворобах нирок ($7,19 \pm 4,77$ мг/дл ($635.7 \pm 421,8$ мкМ)), а також вимірювати концентрацію креатиніну в сечі, при попередньому розведенні зразку, в нормі 28 – 259 мг/дл (2476 – 19187 мкМ), та знижені його концентрації, що спостерігається при проблемах з нирками [18, 19]. При цьому швидкість аналізу дозволяє більш оперативно проводити клінічні дослідження та реагувати на погіршення стану пацієнтів порівняно з традиційними методами кількісного визначення креатиніну.

Вивчення стабільності функціонування розробленого біосенсора на основі КД

Окрім наведених вище характеристик, в роботі було досліджено стабільність роботи біосенсора протягом дня та при довготривалому зберіганні. Відтворюваність відгуків біосенсора при безперервній роботі є одним із основних показників якості його функціонування. Для проведення точних вимірювань концентрацій креатиніну відгуки біосенсора повинні бути майже ідентичні (мати достатньо

низьку похибку вимірювання). Тому було досліджено відтворюваність відгуків біосенсора впродовж декількох годин безперервної роботи, отримані результати наведені на рис. 7. Одне вимірювання займало близько 2 хв, проміжок між вимірюваннями складав близько 3 хв, за цей час біосенсори відмивали від субстрату, кожну хвилину змінюючи робочий буферний розчин.

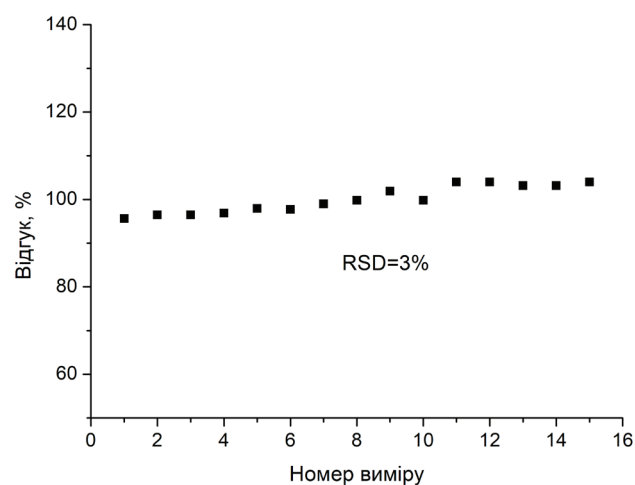


Рис. 8. Відтворюваність відгуків біосенсора на основі креатиніндеїмінази протягом 2-х годин безперервної роботи. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Концентрація креатиніну в комірці – 5 мМ.

З результатів експерименту видно, що біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналу, відносне стандартне відхилення відгуків на креатинін становило не більше 3%, що свідчить про придатність розробленого біосенсора для проведення точних вимірювань концентрацій креатиніну в реальних зразках.

Задля оптимізації детекції креатиніну та автоматизації процесу використання розроблених біосенсорів на практиці було проведено ряд дослідів по вивченню можливості їх довгострокового зберігання (Рис. 8). В перший день експерименту було виготовлено нові біосенсори на основі креатиніндеїмінази та перевірена їх чутливість до 5 мМ креатиніну (що прийнято за 100% початкової активності біосенсора). Подальші виміри чутливості біосенсора до креатиніну проводились в певний проміжок часу (раз у 7-30 днів). Біосенсор між вимірюваннями зберігався в сухому стані за температури +4 °С. Результати зміни активності біоселективних мембран біосенсора протягом зберігання наведено на рис. 9.

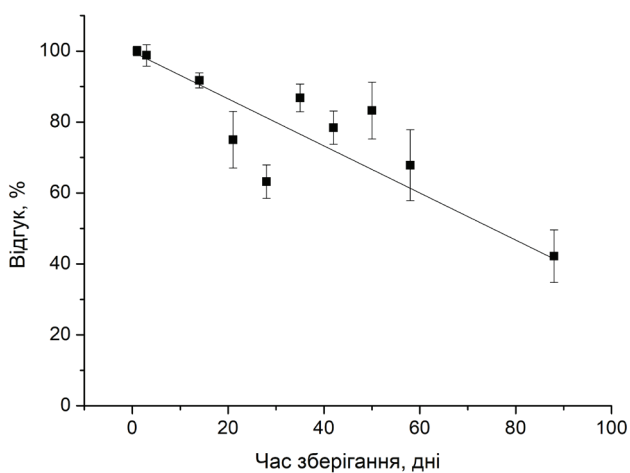


Рис. 9. Дослідження стабільності біосенсора на основі КД при зберіганні в сухому стані за температури +4 °С. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Концентрація креатиніну в комірі – 5 мМ.

Як видно з отриманого графіку розроблений біосенсор зберігав 70% активності через 60 днів зберігання та близько 50% через 90 днів. Це свідчить про можливість вико-

ристання біосенсора для вимірювання креатиніну протягом 2 місяців за умови додаткового калібрування по кільком концентраціям креатиніну. Отже, розроблений біосенсор на основі креатиніндеїмінази може бути перспективним для застосування в кількісному визначенні концентрацій креатиніну в біологічних зразках.

Висновки

В ході проведеної роботи було розроблено новий біосенсор на основі креатиніндеїмінази для визначення концентрацій креатиніну. Було проведено вибір оптимальної методики іммобілізації ферменту та оптимізовано процедуру нанесення біоселективного елементу. Показано, що ковалентне зшивання ферменту в 1% розчині глутарового альдегіду призводило до створення біосенсорів, що характеризувались найвищою чутливістю до креатиніну та найкращою відтворюваністю виготовлення біомембран.

Також в роботі було досліджено вплив параметрів робочого розчину, таких як іонна сила, буферна ємність та вміст білку в розчині, на роботу запропонованого біосенсора на основі КД.

Показано, що розроблений біосенсор підходить для аналізу біологічних зразків з високим вмісту білку, таких як сироватка крові. Перевірено основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора на основі КД, а саме чутливість до субстрату (172 ± 32 мкСм/мМ), лінійний діапазон визначення (0,005-1мМ), мінімальна границя визначення (5 мкМ) креатиніну тощо. Досліджено стабільність роботи та зберігання розробленого біосенсора. Показано, що біосенсор характеризується високою відтворюваністю сигналу ($RSD = 3\%$) та може зберігатись за при температурі +4 °С більше 3 місяців (втрата активності менше 50%).

Розроблений біосенсор на основі КД показав високу потенційну можливість його застосування для аналізу концентрацій креатиніну в складних багатоконпонентних біологічних зразках.

Подяки

Роботу частково виконано за підтримки Національного фонду досліджень України в рамках конкурсу проектів НДР «Наука для безпеки і сталого розвитку України» (проект № 2021.01/0010) та фонду Саймонс (США) (грант № 1290589).

Список використаної літератури

[1].A. C. Webster, E. V. Nagler, R. L. Morton, P. Masson. Chronic kidney disease. *The lancet*, 389(10075), 1238–1252 (2017).

[2].J. A. Kellum, F. E. Sileanu, R. Murugan, N. Lucko, A. D. Shaw, G. Clermont. Classifying AKI by urine output versus serum creatinine level. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(9), 2231–2238 (2015).

[3].A. S. Levey, S. M. Titan, N. R. Powe, J. Coresh, L. A. Inker. Kidney disease, race, and GFR estimation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 15(8), 1203–1212 (2020).

[4].M. Z. Bidin, A. M. Shah, J. Stanslas, C. L. T. Seong. Blood and urine biomarkers in chronic kidney disease: An update. *Clinica chimica acta*, 495, 239–250 (2019).

[5].B. Bikbov, C. A. Purcell, A. S. Levey, M. Smith, A. Abdoli, M. Abebe, M. O. Owolabi. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The lancet*, 395(10225), 709–733 (2020).

[6].P. S. Yuen, S. R. Dunn, T. Miyaji, H. Yasuda, K. Sharma, R. A. Star. A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(6), F1116-F1119 (2004).

[7].D. Tsikas, A. Wolf, A. Mitschke, F. M. Gutzki, W. Will, M. Bader. GC–MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: inter-laboratory comparison in urine with Jaffé, HPLC and enzymatic assays. *Journal of Chromatography B*, 878(27), 2582–2592 (2010).

[8].E. Liotta, R. Gottardo, L. Bonizzato, J. P. Pascali, A. Bertaso, F. Tagliaro. Rapid and

direct determination of creatinine in urine using capillary zone electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, 409(1–2), 52–55 (2009).

[9].J. Sittiwong, F. Unob. Paper-based platform for urinary creatinine detection. *Analytical Sciences*, 32(6), 639–643 (2016).

[10].N. Ye. Stasyuk, G. Z. Gayda, A. E. Zakalskiy, L. R. Fayura, O. M. Zakalska, A. A. Sibirny, M. Nisnevitch, M. V. Gonchar. Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn (Hg) S nanoparticles, *Talanta* 238 (1), 122996 (2022).

[11].O. A. Zinchenko, S. V. Marchenko, T. A. Sergeyeva, A. L. Kukla, A. S. Pavlyuchenko, E. K. Krasyuk, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya. Application of creatinine-sensitive biosensor for hemodialysis control. *Biosens. Bioelectron.*, 35, 466–469 (2012).

[12].N. Stasyuk, A. Zakalskiy, W. Nogala, S. Gawinkowski, T. Ratajczyk, M. Bonarowska, O. Demkiv, O. Zakalska, M. Gonchar. A reagentless amperometric biosensor for creatinine assay based on recombinant creatinine deiminase and N-methylhydantoin-sensitive CoCu nanocomposite. *Sensors Actuators B*, 393, 134276 (2023).

[13].S. V. Marchenko, I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, A. P. Soldatkin. Potentiometric biosensor system based on recombinant urease and creatinine deiminase for urea and creatinine determination in blood dialysate and serum. *Electroanalysis*, 27(7), 1699–1706 (2015).

[14].S. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault. Conductometric biosensors. In *Biological Identification*. Woodhead Publishing. pp. 153–193 (2014).

[15].O. O. Soldatkin, K. V. Stepurska, V. M. Arkhypova, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya, F. Lagarde, S. V. Dzyadevych. Conductometric enzyme biosensor for patulin determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239, 1010–1015 (2017).

[16].V. G. Melnyk, A. D. Vasylenko, L. N. Semenycheva, O. V. Slitskiy, O. Y. Saiapina, S. V. Dzyadevych. Solutions for enhancement of sensitivity and metrological reliability of conductometric biosensor systems. *Engineering Research Express*, 3(4), 045008 (2021).

[17].T. Hemalatha, T. Umamaheswari, G. Krithiga, P. Sankaranarayanan, R. Puvanakrishnan, Enzymes in clinical medicine: an overview. NISCAIR-CSIR. 51(10), 777–788 (2013).

[18].D. Pandya, A.K. Nagrajappa, K.S. Ravi. Assessment and correlation of urea and creatinine levels in saliva and serum of patients with chronic kidney disease, diabetes and hypertension – a

research study. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 10(10), ZC58. (2016).

[19].C. J. Saatkamp, M. L. de Almeida, J. A. M. Bispo, A. L. B. Pinheiro, A. B. Fernandes, Jr, L. Silveira. Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. Journal of biomedical optics, 21(3), 037001–037001 (2016).

Стаття надійшла до редакції 25.08.2024 р.

UDC: 543.555, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.3.312689>

A NOVEL ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON CREATININE DEIMINASE FOR CREATININE ANALYSIS

V. A. Bakhmat^{1,2}, V. M. Arkhypova¹, O. O. Soldatkin^{1,3}, S. V. Dzyadevych^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, 03143, 150 Zabolotnogo Street, Kyiv, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, 01601, 60 Volodymyrska Street Kyiv, Ukraine

³National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”, 03056, 37 Prospect Beresteyskiy, Kyiv, Ukraine

veronikab2406@gmail.com; avalka@yahoo.com; alex_sold@yahoo.com; dzyad@yahoo.com

Summary

Creatinine is an important biomarker for assessing kidney function and detecting various pathological changes in the human body. Compared to traditional analytical methods that require relatively expensive equipment, highly qualified personnel, complex operational procedures, and a long time to detect creatinine content, a well-designed biosensor approach offers several key advantages. These include a simple and rapid detection procedure, low analysis cost, high sensitivity, and selectivity of the method due to the use of enzymes and/or other highly specific substances as recognition elements. Therefore, this study developed a new electrochemical biosensor based on creatinine deiminase for highly sensitive determination of creatinine concentration.

The study explored different immobilization methods for creatinine deiminase. The chosen immobilization method, which employed covalent binding of the enzyme in a glutaraldehyde solution, provided the best sensitivity to creatinine and membrane fabrication stability. Several experiments were conducted to investigate the impact of working solution parameters, such as ionic strength, buffer capacity, pH, and protein content, on the biosensor's performance. It was demonstrated that the biosensor could be used for biological samples with high protein content. The biosensor exhibited high operational stability during the day (RSD = 3%) and significant storage stability (losing only 30% of its baseline activity after 2 months at +4 °C). The main analytical characteristics of the developed biosensor were also analyzed. The wide linear range and high sensitivity of the biosensor allow for the measurement of creatinine concentration under both normal and pathological conditions associated with various kidney diseases.

Therefore, the developed electrochemical biosensor based on creatinine deiminase has potential applicability for monitoring creatinine concentration in biological samples.

Keywords: electrochemical analysis, biosensor, creatinine concentration, creatinine deiminase, enzyme immobilization, enzymatic analysis

УДК: 543.555, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.3.312689>

НОВИЙ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ВМІСТУ КРЕАТИНІНУ

В. А. Бахмат^{1,2}, В. М. Архипова¹, О. О. Солдаткін,^{1,3} С. В. Дзядевич^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, 03143,
вул. Заболотного 150, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01601,
вул. Володимирська 60, м. Київ, Україна

³Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського», 03056, проспект Берестейський 37, м. Київ, Україна
veronikab2406@gmail.com; avalka@yahoo.com; alex_sold@yahoo.com; dzyad@yahoo.com

Реферат

Креатинін є важливим біомаркером для оцінки функціонування нирок та виявлення різноманітних патологічних змін в організмі людини. Порівняно з традиційними методами аналізу, які потребують відносно дорогого обладнання, висококваліфікованого персоналу, складних операційних процедур та тривалого часу для виявлення вмісту креатиніну, добре налаштований біосенсорний підхід може мати ряд важливих переваг, таких як проста та швидка процедура визначення, низька собівартість аналізу, висока чутливість та селективність методики завдяки застосуванню ферментів та/або інших високоспецифічних речовин в якості розпізнавальних елементів. Тому запропоновано новий електрохімічний біосенсор на основі креатиніндеїмінази для високочутливого визначення концентрації креатиніну.

В роботі досліджено різні методики іммобілізації креатиніндеїмінази. В результаті досліджень обрано методику іммобілізації, при застосуванні якої біосенсор характеризувався найкращою чутливістю до креатиніну та стабільністю виготовлення мембран, а саме ковалентне зв'язування ферменту в 1% розчині глутарового альдегіду. Проведено ряд досліджень впливу параметрів робочого розчину, таких як іонна сила, буферна ємність, рН та вміст білку, на функціонування біосенсора. Доведено, що біосенсор можна застосовувати для біологічних зразків, що містять високий вміст білку. Біосенсор характеризувався високою стабільністю роботи протягом дня (RSD = 3%) та значною стабільністю при зберіганні (при $t = +4$ °C впродовж 2 місяців втратив лише 30% базової активності). Також проаналізовано основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора. Виявлено, що широкий лінійний діапазон та висока чутливість біосенсора дозволяє вимірювати концентрацію креатиніну за норми та патології при різноманітних хворобах нирок.

Отже, розроблений електрохімічний біосенсор на основі креатиніндеїмінази потенційно можливо застосовувати для моніторингу концентрації креатиніну у біологічних зразках.

Ключові слова: електрохімічний аналіз, біосенсор, концентрація креатиніну, креатиніндеїміназа, іммобілізація ферменту, ферментативний аналіз