

УДК 643.554, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.3.339803>

НОВИЙ КРЕАТИНІН-ЧУТЛИВИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ АДСОРБОВАНОЇ НА СИЛІКАЛІТІ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ

*Світлана Марченко*¹, <https://orcid.org/0000-0002-4682-1993>

Олександр Солдаткін^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-2362-5487>

*Берна Озансой Касан*³, <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=55241223700>

*Буржу Аката Курч*³, <https://orcid.org/0000-0002-4337-5537>

Сергій Дзядевич^{1,4}, <https://orcid.org/0000-0003-2915-716X>

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

² Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського,
просп. Берестейський, 37, м. Київ, 03056, Україна

³ Близькосхідний технічний університет,

б-р Ісмета Іненю, м. Анкара, 06800, Туреччина

⁴ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01003, Україна

e-mail: svmarchenkosv@ukr.net, soldatkinsasha@gmail.com,
bernaozansoy@gmail.com, akata@metu.edu.tr, dzyad@yahoo.com

Анотація. В роботі описано розробку та адаптацію нового креатинін-чутливого біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої креатиніндеїмінази, адсорбованої на електродах, модифікованих силікалітом. З метою аналізу перспективності нового біосенсора, більшість аналітичних характеристик аналізувались у порівнянні з біосенсором на основі традиційного методу іммобілізації ензиму. Як метод порівняння було використано ковалентну зшивку креатиніндеїмінази в насичених парах глутарового альдегіду.

Показано, що адсорбція на силікаліті значно покращує основні аналітичні параметри біосенсора порівняно з методом контролю. Також в роботі досліджено відтворюваність сигналів запропонованого біосенсора та стабільність його при зберіганні з використанням оптимізованого складу буферу з додаванням стабілізаторів та консервантів. Перевірено вплив різних концентрацій хлориду натрію та білку (як найбільш впливових складових сироватки крові) на роботу нового креатинін-чутливого біосенсора.

Розроблений та адаптований в роботі біосенсор на основі креатиніндеїмінази, адсорбованої на силікаліті, є ефективним для кількісної детекції креатиніну в реальних біологічних зразках хворих на ниркову недостатність, таких як сироватка крові та діалізна рідина.

Ключові слова: креатинін, ниркова недостатність, медична діагностика, потенціометрія, біосенсор, силікаліт, цеоліти

Вступ

У процесі проектування та розробки біосенсорів, іммобілізація є одним із найбільш важливих компонентів дослідження. Іммобілізація – це включення або фіксація біоматеріалу на/або всередині матриці, що запобігає вивільненню біокомпонентів, але є достатньо проникною, щоб забезпечити дифузію субстратів та продуктів [1]. Вона є вирішальним кроком у розробці надійних біосенсорів, які можуть витримувати багаторазове застосування та демонструвати тривалий термін зберігання, високу чутливість та селективність до субстратів, короткий час відгуку та високу відтворюваність результатів аналізу [2].

Серед основних методів іммобілізації можна виділити такі як адсорбція, фізичне захоплення, ковалентне зв'язування та зшивання [3]. Найбільш перспективним, на нашу думку, є метод адсорбції, оскільки при цьому не використовуються додаткові хімічні речовини, він є недорогим, простим і не має негативного впливу на активність ензимів [4]. Під час процедури адсорбції ензим або інший біологічний матеріал фізично фіксується на попередньо підготовлений матеріал носія, використовуючи гідрофільно-гідрофобні, ван-дер-ваальсові, водневі зв'язки та/або іонні взаємодії [5]. При адсорбції ензим або наноситься безпосередньо на поверхню носія, або носій повністю занурюється в розчин ензиму. Носію дають час висохнути, а незв'язані частки ензиму змивають з поверхні дистильованою водою або буферним розчином.

Перспективними агентами для адсорбції можуть виступати цеоліти. Цеоліти – це мінерали водної алюмосилікатної групи лужних та лужноземельних металів, що мають складну тривимірну ґратку та високовпорядковану структуру [6]. Вони можуть бути як природними, так і штучно синтезованими. Хімічний склад цеолітів можна представити формулою: $Mx/n \cdot [(AlO_2)_x \cdot (SiO_2)_y] \cdot zH_2O$, де M – катіони валентності n (зазвичай Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+}), z – кількість адсорбованих молекул води, а співвідношення u/x може змінюватися в широких межах від 1 – для низькокремне-

земистих цеолітів A та X , до ∞ – для кристалічних силікатів. Для останніх концентрація катіонів близька до нуля.

Перспективними характеристиками цеолітів є низька вартість їх видобутку, доступність у великих кількостях, регульовані поверхневі властивості, механічна та хімічна стійкість. Вони стабільні у вологих та сухих умовах і стійкі до мікроорганізмів. Важливою характеристикою цеолітів є співвідношення Si/Al [7], яке можна змінювати, таким чином варіюючи заряд і гідрофобність цеоліту, кількість і розмір пор. Ці властивості роблять цеоліт важливим матеріалом у нафтохімії, екології, сільському господарстві, медицині та багатьох інших галузях. Сьогодні цеоліти представляють інтерес для іммобілізації білка [8] і особливо різних ензимів завдяки великій площі поверхні, жорстким і добре визначеним пористим структурам, термостабільності та гідрофільності [9]. Адсорбція ензимів на цеолітах – це м'який та нетоксичний метод іммобілізації, який дозволяє зберегти активність та біодоступність ферментів в складі біосенсорів.

Наразі розроблено низку біосенсорів на основі різних типів цеолітів з використанням різних ензимних систем: уреази [10-15], глюкозооксидази [16-18], ацетилхолінестерази [19], бутирилхолінестерази [20, 21], інвертази/мутаротази/глюкозооксидази [22], тощо.

Мета цієї роботи полягала в розробці креатинін-чутливого біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ) з використанням силікату в якості адсорбенту для іммобілізації креатиніндеімінази (КД), оскільки розробка нового методу експрес-аналізу концентрації креатиніну має життєво важливе значення для медичної діагностики багатьох ниркових захворювань. Відомо, що саме креатинін є маркером швидкості клубочкової фільтрації нирок [23, 24] і вважається загальним діагностичним показником функції нирок. Крім того, визначення концентрації креатиніну є важливим при діабетичній нефропатії, гострому інфаркті міокарда та для моніторингу пацієнтів на гемодіалізі [25].

Тому ця робота була зосереджена на застосуванні силікаліту (один з найбільш вивчених цеолітів, відомий своєю високою адсорбційною здатністю, гідрофобною та органофільною селективністю) для створення нового потенціометричного біосенсора з метою точного і селективного аналізу креатиніну в біологічних рідинах.

Матеріали і методи

У роботі використовували наступні реактиви: препарат ензиму креатиніндеімінзи (КД) (КФ 3.5.4.21) мікробіального походження з активністю 36 од.акт./мг білку фірми Sigma-Aldrich (Японія), бичачий сироватковий альбумін (БСА) фракція V, 25 % водний розчин плутарового альдегіду (ГА) фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Як стабілізатори КД використовували високомолекулярний спирт лактітол від Fluka (Швейцарія) та ДЕ-АЕ-декстран від Fluka Biochemica (Франція); останній також забезпечує утримання молекул ензиму у мембрані та запобігає їх вимиванню. Як субстрат використовували креатинін виробництва Sigma-Aldrich (Німеччина). Робочий фосфатний буфер (KH_2PO_4 -NaOH), pH 7,4, був приготовлений з реагентів вітчизняного виробництва, що мали ступінь чистоти х.ч. та ч.д.а.

Сенсорні елементи на основі pH-ПТ

В роботі використовували сенсорні чипи з диференційною парою pH-ПТ, виготовлені в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова. Розроблена топологія передбачала розміщення двох ідентичних *p*-канальних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8x8 мм [26]. 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 *p*⁺-дифузійними шинами, виведеними на край чипу разом із контактом до *n*-підкладки.

Іон-селективні властивості транзисторів були обумовлені шаром Si_3N_4 , нанесеного на їх підзатворну область. pH-чутливість елементів становила близько 25 – 50 мкА/pH, залежно від серії виробництва. Більш детально з конструкцією сенсорів, вимірювальним приладом та їх характеристиками можна ознайомитись у наших попередніх роботах [27, 28].

Синтез і характеристика силікаліту

Для синтезу силікаліту ми використовували 1ТРАОН:4ТЕОС:350× H_2O . Тетраетоксисилан (ТЕОС, 95%) використовувався як джерело кремнезему, гідроксид тетрапропіламонію (ТРАОН, 25%) – як шаблон. Прозорий гомогенний розчин було отримано шляхом гідролізу ТЕОС розчином ТРАОН при перемішуванні за кімнатної температури протягом 6 годин. Потім отриманий розчин витримували в печі протягом 18 годин при 125 °С.

Матеріал, який не прореагував, видаляли з розчину центрифугуванням, промивали деіонізованою водою та сушили при 80 °С. Отримані частинки силікаліту аналізували за допомогою скануючого електронного мікроскопа (СЕМ) (рис. 1).

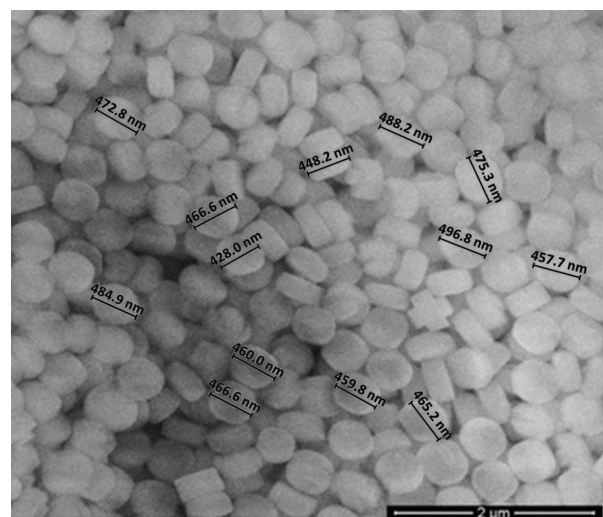


Рис. 1. Вигляд частинок силікаліту за результатами СЕМ.

Враховуючи результати, отримані за допомогою СЕМ (рис. 1), було виявлено, що частинки силікаліту, використані під час розробки

біосенсора для визначення креатиніну, мали розмір приблизно 470 нм.

Модифікація рН-ПТ силікалітом

Шар силікаліту на поверхні перетворювача формували методом крапельного нанесення. В роботі ми використовували 10 % розчин силікаліту в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Суспензія силікаліту занурювалась в ультразвукову баню на 30 хв, далі 0,2 мкл гомогенізованого розчину наносили на обидві активні зони рН-ПТ; після цього їх нагрівали при 120°C протягом 15 хвилин. Перед нанесенням біомембран, модифіковані силікалітом рН-ПТ охолоджували до кімнатної температури та декілька разів промивали робочим буферним розчином, щоб позбутися від незв'язаних частинок, після чого знову висушували.

Імобілізація креатиніндеімінази методом адсорбції

Для виготовлення робочої ензимної мембрани використовували 10% розчин КД у 20 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) з 10% гліцерином, 4% лактітолу, 0,4% DEAE-декстрану та 10 % БСА. Для приготування референтної мембрани використовували ті ж компоненти, але замість розчину ензиму брали 10% розчин БСА. Краплю розчину ензиму (0,16 мкл) наносили на робочу поверхню рН-ПТ, модифіковану силікалітом, краплю розчину БСА (0,16 мкл) – на іншу робочу поверхню рН-ПТ (мембрана порівняння).

Після імобілізації перетворювачі сушили на повітрі протягом 30 хвилин, потім промивали від незв'язаних компонентів у робочому буфері протягом 20 хвилин.

Імобілізація креатиніндеімінази в парах ГА

З метою контролю результатів розробки та функціонування біосенсора на основі адсорбованої КД на силікаліті, було виготовлено додатковий біосенсор на основі КД, імобілізованої традиційною методикою. Відповідно, іншою процедурою була імобілізація КД

у насичених парах ГА. У цьому випадку для отримання біоселективних мембран використовували розчин 10% КД, 10% БСА, 10% гліцерину, 4% лактітолу та 0,4% DEAE-декстрану у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4. Розчин для референтної мембрани готували таким самим чином, за винятком того, що КД замінили на БСА. Після нанесення обох розчинів (по 0,1 мкл кожного) на робочі поверхні рН-ПТ (не модифіковані силікалітом), потенціометричні перетворювачі поміщали в насичені пари ГА на 10–20 хвилин, а потім сушили на повітрі протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Далі перетворювачі занурювали в робочий буфер на 20–30 хвилин для змивання незв'язаного ензиму, надлишку ГА та інших компонентів.

Процедура біосенсорного вимірювання

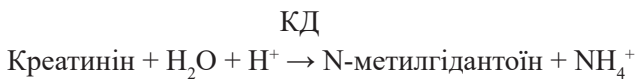
Вимірювання проводили в 5 мМ калій-фосфатному буферному розчині (KH_2PO_4 -NaOH), рН 7,4, при інтенсивному перемішуванні за кімнатної температури. Біосенсор та електрод порівняння Ag/AgCl поміщали у відкриту вимірювальну комірку об'ємом 1,5 мл, що була виготовлена за нашими рекомендаціями колегами із Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова. Більш детально з конструкцією вимірювальної комірки та схемою аналізу можна ознайомитись у попередніх роботах [27].

Концентрацію креатиніну в робочій комірці задавали шляхом додавання аліквот концентрованого стокового розчину. Значення відгуків біосенсора розраховували після досягнення стаціонарного стану. Після отримання кожного відгуку біосенсор промивали від продуктів реакції шляхом зміни робочого буфера (3 рази з інтервалом у 2 хвилини). Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та прикладеної напруги, компенсувалися за допомогою диференційного режиму, тобто вимірювання різниці між сигналами від двох рН-ПТ електродів (з ензимною та референтною мембранами), розміщених на одному перетворювачі. Всі експерименти проводилися щонайменше в трьох серіях.

Результати і обговорення

Аналітичні характеристики креатинін-чутливого біосенсора

Принцип роботи потенціометричного біосенсора на основі КД адсорбованої на силікаліті, ґрунтується на ензиматичній реакції, представлений рівнянням:



Зміни рН, викликані гідролізом креатиніну, пропорційні концентраціям субстрату у досліджуваному розчині та реєструються рН-ПТ, на яких розміщена відповідна ензимна мембрана.

З метою оцінки ефективності нового методу іммобілізації КД при створенні нових креатинін-чутливих біосенсорів, протягом перших стадій розробки та вивчення їх аналітичних параметрів, було приготовлено серії біосенсорів двох типів. Перший на основі адсорбції ензиму на поверхні перетворювача вкритого шаром силікаліту, а другий на основі традиційної методики іммобілізації ензиму в парах ГА. Ідея дослідження полягала в порівнянні основних аналітичних характеристик біосенсорів з використанням різних методик іммобілізації. Відповідно для обох типів біосенсорів були побудовані калібрувальні криві визначення креатиніну в робочому буферному розчині (рис. 2).

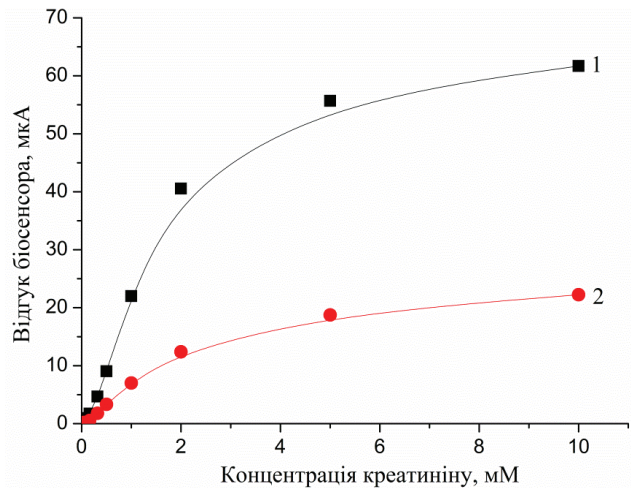


Рис. 2. Калібрувальні криві креатинін-чутливого біосенсора: адсорбція на силікаліті (1) та ковалентна зшивка в парах ГА (2). Вимірювання проведені в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури.

Показано, що використання методу адсорбції ензиму на електроді, модифікованому силікалітом, дозволяє підвищити чутливість до креатиніну в 2-3 рази, зменшити час відгуку і час регенерації в 3-4 рази та в 2 рази знизити мінімальну межу визначення (Таблиця 1), порівняно з біосенсором на основі ковалентної зшивки ензиму в парах ГА. Лінійний динамічний діапазон при цьому залишався однаковим для обох варіантів біосенсорів і становив від 0 до 2 мМ.

Таким чином, метод іммобілізації КД шляхом адсорбції на модифікованих силікалітом

Табл. 1

Основні аналітичні характеристики креатинін-чутливого біосенсора за різних методів іммобілізації

Основні параметри	Ковалентна зшивка КД в парах ГА	Адсорбція КД на силікаліті
Мінімальна межа визначення, μM	$10 \pm 0,5$	$5 \pm 0,2$
Час відгуку, с	$240 \pm 9,2$	$90 \pm 4,3$
Час регенерації, с	$300 \pm 16,5$	$80 \pm 5,4$
Чутливість біосенсора, $\mu\text{A}/\text{mM}$	$6,7 \pm 0,2$	$18,06 \pm 0,5$
Лінійний діапазон, μM	0 - 2000	0 - 2000

електродах був обраний як найбільш доцільний для створення біосенсора, з цієї причини подальше дослідження проводилося з використанням лише мембрани на основі адсорбції КД на силікаліті.

Стабільність біосенсора за умов безперервної роботи та при зберіганні

Відомо, що відтворюваність сигналу та стабільність при зберіганні є одними з найважливіших робочих характеристик будь-якого

біосенсора. Тому необхідно було перевірити ці параметри для біосенсора на основі нового методу іммобілізації, а саме адсорбції КД на силікаліті. Щоб дослідити відтворюваність роботи біосенсора, ми протягом одного робочого дня реєстрували сигнали на додавання 1 мМ креатиніну з інтервалом 30 хв. В проміжках між вимірюванням, креатинін-чутливий біосенсор знаходився в буферному розчині при постійному перемішуванні. Як можна бачити з рис. 3, досліджуваний біосенсор вирізнявся високою відтворюваністю сигналів, оскільки відносне стандартне відхилення не перевищувало 5%, а було рівним 2,6 %. Цей тест є свідченням того, що розроблений біосенсор можна застосовувати для аналізу реальних зразків, таких як сироватка крові або діалізна рідина хворих на ниркову недостатність.

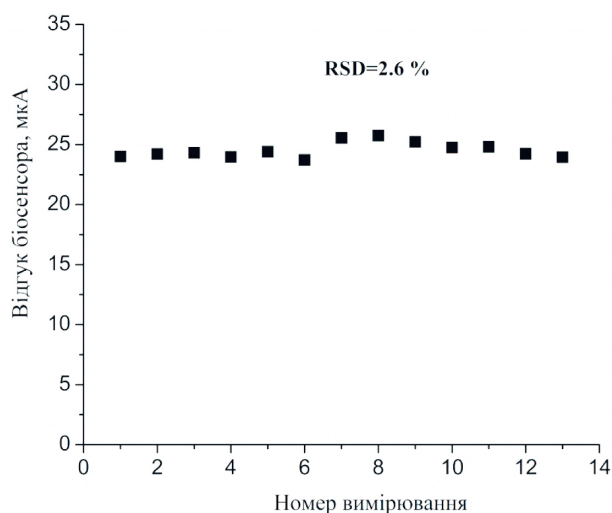


Рис. 3. Відтворюваність роботи креатинін-чутливого біосенсора. Вимірювання проводились в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури. Концентрація креатиніну становила 1 мМ.

Для дослідження стабільності при зберіганні використовували спеціальний буфер з додаванням стабілізаторів та консервантів (10 мМ фосфатний буфер рН 7,4 + 1 мМ ЕДТА + 1 мМ дитіотриетол + 0,1 % NaN_3). Під час усього експерименту, біосенсиори зберігали в такому буфері при +4 °С. В перший день після адсорбції ензимної та референтної мембран на поверхні перетворювача вкритого шаром силікаліту було отримано відгуки біосенсорів

на 1 мМ креатиніну. Величину цих відгуків біосенсора з початковою активністю було прийнято за 100 %. Подальші виміри проводились через певний проміжок часу. Було показано, що після більше року зберігання активність КД, адсорбованої на силікаліті знизилась лише на 43 % (рис. 4). Даний показник є дуже високим, оскільки відомо, що КД відноситься до нестабільних ензимів. На довготривалі зберігання мембран могло вплинути використання силікаліту, як носія при іммобілізації, оскільки відома висока толерантність цеолітів до мікроорганізмів.

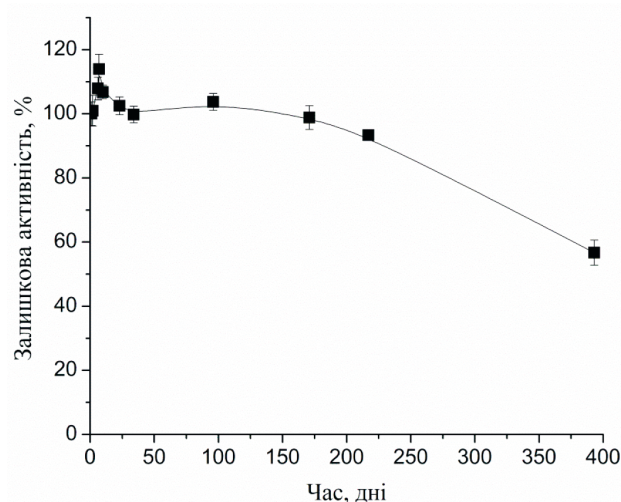


Рис. 4. Стабільність креатинін-чутливого біосенсора при зберіганні у буфері при +4 °С. Вимірювання проведені в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури. Концентрація креатиніну складала 1 мМ.

Оптимізація роботи біосенсора для аналізу реальних зразків

Наступне завдання полягало в підготовці розробленого біосенсора для подальшої роботи з реальними біологічними зразками, а саме з сироваткою крові хворих на ниркову недостатність, де концентрація креатиніну становить ~ 1000 мкМ. Оскільки сироватка крові є багатокомпонентною матрицею, аналіз її зразків є досить складним. Сироватка крові містить кілька буферних систем, амінокислоти, електроліти, вуглеводи, ензими, ліпопротеїни, білки тощо. Особливо висока концентрація хлориду натрію 137-144 мМ і білку, що в середньому складає

7,5 %. Зважаючи на вищенаведені обставини, ми дослідили як змінюється відгук біосенсора на 1 мМ креатиніну при зміні концентрації хлориду натрію в межах від 0 до 200 мМ. Показано, що в даному діапазоні концентрацій відгук зменшується на 7 %. Оскільки планувалося використовувати розведення сироватки крові у 20 разів під час біосенсорного аналізу, а вимірювання проводяться в диференційному режимі, то впливом NaCl можна було взагалі знехтувати (рис. 5).

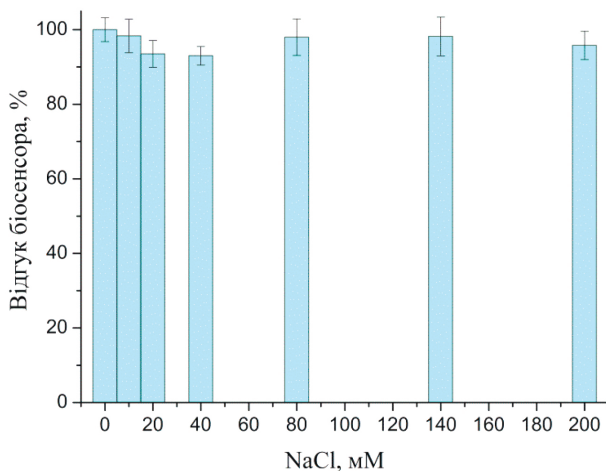


Рис. 5. Залежність величини відгуків креатинін-чутливого біосенсора на основі КД, адсорбованої на силікаліті, від концентрації хлориду натрію. Вимірювання проведені в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури. Концентрація субстрату становила 1 мМ.

Також відомо, що при роботі біосенсорів з реальними біологічними рідинами, параметром, що може негативно впливати на точність та селективність аналізу, є наявність в розчинах високих концентрацій білку. Тому потрібно було дослідити вплив цього параметру на функціонування розробленого біосенсора. Відповідно, до робочої комірки з біосенсором додавали БСА в концентраціях від 0,1 до 1 %, враховуючи можливості розведення сироватки крові (10-20 разів) та оцінювали як зміниться сигнал біосенсора на 1 мМ креатиніну (рис. 6). Аналізуючи результати експерименту встановлено, що біосенсорного сигналу на внесення БСА не спостерігалось, і не було виявлено істотного впливу БСА на відгуки та калібруваль-

ні криві креатинін-чутливого біосенсора на основі КД, адсорбованої на силікаліті.

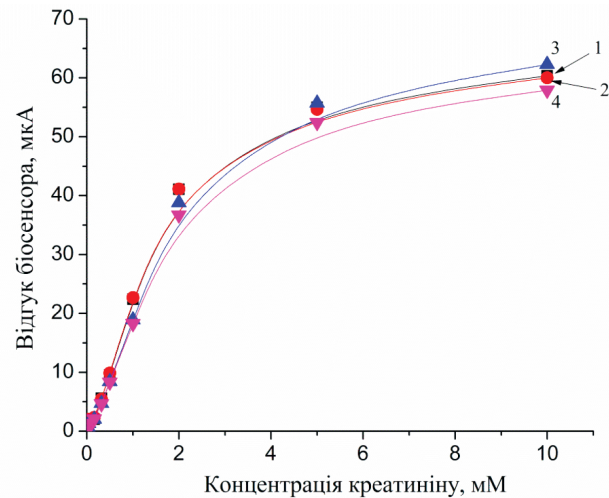


Рис. 6. Калібрувальні криві креатинін-чутливого біосенсора на основі КД, адсорбованої на силікаліті, у присутності різних концентрацій білку в аналізованому розчині: 0% (1), 0,1 % (2), 0,5% (3) і 1% (4). Вимірювання проведені в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН, 7,4 за кімнатної температури.

Отже, присутність високомолекулярної фракції БСА у робочому буфері у концентраціях, що можуть бути присутні в реальних біологічних рідинах (з врахуванням розведення) не призводить до виникнення неспецифічного відгуку та майже не впливає на величину відгуку біосенсора.

Розроблений біосенсор на основі КД, адсорбованої на силікаліті, характеризується відмінними аналітичними характеристиками, є високостабільним при зберіганні та селективним до цільового субстрату відносно найбільш впливових інтерферентів крові. Відповідно, в подальшому, він може з успіхом використовуватись при аналізі сироватки крові/діалізної рідини пацієнтів із захворюванням нирок.

Висновки

В даній роботі розроблено новий високочутливий потенціометричний біосенсор для визначення концентрації креатиніну. Вивчено можливість ефективної адсорбції КД на поверхні силікаліту для створення даного

біосенсора. Процедура іммобілізації ензиму є простою, швидкою та нетоксичною. Досліджено та визначено оптимальні умови адсорбції КД на силікаліті. Проведено порівняльний аналіз аналітичних характеристик біосенсорів, розроблених двома методами іммобілізації: ковалентна зшивка в парах ГА та адсорбція на силікаліті. Було показано, що креатинін-чутливий біосенсор, створений методом ковалентної зшивки ензиму в парах ГА в 3 рази менш чутливий до креатиніну, має довший час відгуків (в 3-4 рази) та в два рази більшу мінімальну межу визначення, порівняно з біосенсором на основі КД, адсорбованої на шарі силікаліту. Діапазон виявлення креатиніну розробленим біосенсором було визначено як 0,005 – 2 мМ. Створений біосенсор на основі адсорбованої КД характеризувався відмінною відтворюваністю сигналів ($RSD=2,6\%$) та стабільністю при зберіганні (близько 13 місяців). Встановлено, що хлорид натрію в концентраціях від 0 до 200 мМ та БСА в концентраціях від 0,1 % до 1 % не чинять суттєвого впливу на відгуки розроблено біосенсора. Ця обставина має вирішальне значення для подальших аналізів креатиніну в сироватці крові/діалізній рідині хворих.

Отже, потенціометричний біосенсор на основі рН-ПТ, модифікованого силікалітом та КД, іммобілізованої методом адсорбції, може бути використаний як діагностичний прилад для кількісної детекції креатиніну у хворих з нирковою недостатністю.

Список використаної літератури

- [1]. Sirisha V. L., Jain A, Amita Jain A. Chapter Nine – Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes // *Advances in Food and Nutrition Research*, 2016, 79, p. 179-211.
- [2]. Swamy N. K., Sandeep S., Santhosh A. S. Enzyme Immobilization Methods and Role of Conductive Polymers in Fabrication of Enzymatic Biosensors // *Indian J. Adv. Chem. Sci.*, 2017, 2, p. 1-5.
- [3]. Imam H. T., Marr P. C., Marr A. C. Enzyme Entrapment, Biocatalyst Immobilization without Covalent Attachment // *Green Chem.*, 2021, 23, p. 4980-5005.
- [4]. Bernard A., Coordonnier M., LeBeault J. M. Ddc Fermentation Process Control // *Annu. Meet. Am. Inst. Chem. Eng.*, 1982, p. 103-125.
- [5]. Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B. Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review // *Adsorption*, 2014, 20, p. 801-821.
- [6]. Valdes M. G., Perez-Cordoves A. I., Diaz-Garcia M. E. Zeolites and zeolite-based materials in analytical chemistry // *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25, p. 24-30.
- [7]. Tavolaro A., Tavolaro P., Drioli E. Zeolite inorganic supports for BSA immobilization: Comparative study of several zeolite crystals and composite membranes // *Colloids Surf., B: Biointerfaces*, 2007, 55, p. 67-76.
- [8]. Wu J., Li X., Yan Y., Hu Y., Zhang Y., Tang Y. Protein adsorption onto nanozeolite: Effect of micropore openings // *J. Coll. Interface Sci.*, 2013, 406, p. 130-138.
- [9]. Kaur B., Srivastava R. Synthesis of ionic liquids coated nanocrystalline zeolite materials and their application in the simultaneous determination of adenine, cytosine, guanine, and thymine // *Electrochim. Acta*, 2014, 133, p. 428-439.
- [10]. Shelyakina M. K., Soldatkin O. O., Arkhypova V. M., Kasap B. O., Akata B., Dzyadevych S. V. Study of zeolite influence on analytical characteristics of urea biosensor based on ion-selective field-effect transistors // *Nanoscale Res Lett.*, 2014, 9, p. 124-132.
- [11]. Soldatkin O. O., Kucherenko I. S., Marchenko S. V., Kasap B. O., Akata B., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Application of enzyme/zeolite sensor for urea analysis in serum // *Mater. Sci. Eng., C*, 2014, 42, p. 155-160.
- [12]. Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Kasap B., Ozturk S., Akata B., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Elaboration of urease adsorption on silicalite for biosensor creation // *Electroanalysis*, 2012, 24, p. 1380-1385.
- [13]. Soldatkin O. O., Soy E., Errachid A., Jaffrezic-Renault N., Akata B., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Influence of composition of zeolite/enzyme nanobiocomposites on analytical characteristics of urea biosensor based on

- ionselective field-effect transistors // *Sens. Lett.*, 2011, 9, p. 2320-2326.
- [14]. Soldatkin O. O., Kucherenko I. S., Shelyakina M. K., Soy E., Kirdeciler K., Ozturk S., Jaffrezic-Renault N., Akata B., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Application of different zeolites for improvement of the characteristics of a pH-FET biosensor based on immobilized urease // *Electroanalysis*, 2013, 25, p. 468-474.
- [15]. Hamlaoui M. L., Reybier K., Marrakchi M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Kherrat R., Walcarius A. Development of a urea biosensor based on a polymeric membrane including zeolite // *Anal. Chim. Acta*, 2002, 466, p. 39-45.
- [16]. Pyeshkova V. N., Dudchenko O. Y., Soldatkin O. O., Kucherenko I. S., Kasap B. O., Akata B., Dzyadevych S. V. Application of silicalite for improvement of enzyme adsorption on the stainless steel electrodes // *Biopolym. Cell*, 2014, 30, p. 462-468.
- [17]. Nenkova R., Wu J., Zhang Y., Godjevargova T. Influence of different nanozeolite particles on the sensitivity of a glucose biosensor // *Anal Biochem.*, 2013, 439, p. 65-72.
- [18]. Soldatkin O. O., Ozansoy Kasap B., Akata Kurc B., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V., El'skaya A. V. Elaboration of new method of enzyme adsorption on silicalite and nano beta zeolite for amperometric biosensor creation // *Biopolymers and cell*, 2014, 30, p. 291-298.
- [19]. Kucherenko I., Soldatkin O., Kasap B. O., Kirdeciler S. K., Akata B., Jaffrezic-Renault N., Soldatkin A., Lagarde F., Dzyadevych S. Nanosized zeolites as a perspective material for conductometric biosensor creation // *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, 10, p. 209-217.
- [20]. Soy E., Arkhypova V., Soldatkin O., Shelyakina M., Dzyadevych S., Warzywoda J., Sacco A., Akata B. Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals // *Mater. Sci. Eng. C*, 2012, 32, p. 1835-1842.
- [21]. Soy E., Galioglu S., Soldatkin O. O., Dzyadevych S. V., Warzywoda J., Sacco A., Akata B. Direct evidence of advantage of using nano-sized zeolite Beta for ISFET-based biosensor construction // *J. Nanopart Res.*, 2013, 15, p. 1645.
- [22]. Soldatkin O. O., Peshkova V. M., Saiapina O. Y., Kucherenko I. S., Dudchenko OY, Melnyk V. G., Vasylenko O. D., Semenycheva L. M., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose // *Talanta*, 2013, 115, p. 200-207.
- [23]. Sant W., Pourciel-Gouzy M. L., Launay J., Conto T., Colin R., Martinez A., Temple-Boyer P. Development of a creatinine-sensitive sensor for medical analysis // *Sens. Actuators, B*, 2002, 103, p. 260-264.
- [24]. Jurkiewicz M., Alegret S., Almirall J., García M., Fàbregas E. . Development of a bi-parametric bioanalyser for creatinine and urea. Validation of the determination of biochemical parameters associated with hemodialysis // *Analyst.*, 1998, 123, p. 1321-1327.
- [25]. Koncki R. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis // *Anal. Chim. Acta*, 2007, 599, p. 7-15.
- [26]. Kukla A. L., Pavluchenko A. S., Goltvjanskyi Yu. V., Soldatkin A. A., Arkhypova V. M., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Sensor arrays based on the differential ISFET elements for monitoring of toxic substances of natural and artificial origin // *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 2008, 2, p. 58-68. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2008.2.114446>.
- [27]. Kukla O. L., Marchenko S. V., Zinchenko O. A., Pavluchenko O. S., Kukla O. M., Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P. Biosensor measurement of urea concentration in human blood serum // *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2012, 68, p. 147-151.
- [28]. Marchenko S. V., Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Soldatkin A. P. Potentiometric biosensor system based on recombinant urease and creatinine deiminase for urea and creatinine determination in blood dialysate and serum // *Electroanalysis*, 2015, 27, p. 1699-1706.

Стаття надійшла до редакції 07.09.2025 р.

UDC 643.554, 577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.3.339803>

A NEW CREATININE-SENSITIVE BIOSENSOR BASED ON CREATININE DEIMINASE ADSORBED ON SILICALITE

*Svitlana Marchenko¹, Oleksandr Soldatkin^{1,2}, Berna Ozansoy Kasap³,
Burcu Akata Kurç³, Sergiy Dzyadevych^{1,4}*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU,
150 Akademika Zabolotnoho St, Kyiv, 03680, Ukraine

²National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”,
37 Beresteyskyi Ave, Kyiv, 03056, Ukraine

³Middle East Technical University,
İsmet İnönü Blvd, Ankara, 06800, Turkey

⁴Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64 Volodymyrska St, Kyiv, 01003, Ukraine

e-mail: svmarchenkosv@ukr.net, soldatkinsasha@gmail.com,
bernaozansoy@gmail.com, akata@metu.edu.tr, dzyad@yahoo.com

Abstract. The work describes the development and adaptation of a new creatinine-sensitive biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors and immobilized creatinine deiminase adsorbed on silicalite-modified electrodes. In order to analyze the potential of the new biosensor, most of the analytical characteristics were analyzed in comparison with the biosensor based on the traditional enzyme immobilization method. Covalent crosslinking of creatinine deiminase in saturated glutaraldehyde vapors was used as a comparison method.

It has been shown that adsorption on silicalite significantly improves the main analytical parameters of the biosensor, compared to the control method. Also in the work, the reproducibility of the signals of the proposed biosensor and its stability during storage using an optimized buffer composition with the addition of stabilizers and preservatives were investigated. The effect of different concentrations of sodium chloride and protein (as the most influential components of blood serum) on the performance of a new creatinine-sensitive biosensor was tested.

The developed and adapted biosensor based on creatinine deiminase adsorbed on silicalite is effective for quantitative detection of creatinine in real biological samples of patients with renal failure, such as blood serum and dialysis fluid.

Keywords: creatinine, renal failure, medical diagnostics, potentiometry, biosensor, silicalite, zeolites