

УДК 547.495.9+577.151.3+543.067+544.165

КРЕАТИНІН ТА МЕТОДИ ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ

О. А. Назаренко
Т. А. Сергєєва
О. П. Солдаткін

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

E-mail: helen_nazarenko@yahoo.com

Визначення концентрацій креатиніну в біологічних рідинах набуває дедалі більшої актуальності як клінічний тест. Цей аналіз використовується для оцінки ниркової недостатності та дисфункції м'язів. На сьогодні існує велика кількість методів визначення креатиніну, однак тільки деякі можуть бути використані для біомедичного аналізу. Традиційним методом аналізу креатиніну є колориметричний метод на основі реакції Яффе. Основним недоліком його є залежність від концентрації присутніх у біологічних рідинах інтерферентів, що значною мірою завищує результати аналізу. Одними з найперспективніших методів визначення метаболітів на сьогодні є біосенсорні методи аналізу, перевагами яких є мінімальні витрати реактивів, специфічність, відсутність високоякісного обладнання та експресність аналізу.

Ключові слова: креатинін, аналіз, біосенсори, молекулярно-імпринтовані полімери.

Креатинін (1-метилглікоціамідин) — один із кінцевих продуктів азотистого обміну всіх хребетних та людини. В організмі креатинін утворюється з креатину внаслідок азотистого обміну з аргініну, гліцину та метіоніну. Синтез креатиніну відбувається двоетапно: спочатку в результаті перенесення амідної групи з аргініну на гліцин утворюється гуанідиноцтова кислота (у нирках та підшлунковій залозі ця реакція каталізується ензимом гліцинамідинотрансферазою), а потім відбувається метилювання гуанідиноцтової кислоти в печінці та підшлунковій залозі за участю S-аденозинметіоніну, що каталізується гуанідинацетатметилтрансферазою. З печінки та підшлункової залози креатин з током крові потрапляє в інші органи. Приблизно 2% усього креатину неензиматичним шляхом (унаслідок неензиматичної деградації) перетворюється на креатинін та виводиться із сечею. У скелетних м'язах та тканині головного мозку в результаті зворотної реакції перенесення фосфорильної групи АТФ на креатин утворюється креатинфосфат — високоенергійна сполука, що виконує роль донора енергії, необхідної для здійснення м'язового скорочення, активного транспорту іонів у нервовій тканині та ін. Ця реакція каталізується ензимом креатинкіназою (креатинфосфокіназою), численні форми якої присутні у різних тканинах [1].

Креатинін — безпорогова речовина, він виділяється із сечею, а рівень його вмісту в сечі та сироватці крові зумовлюється в ос-

новному м'язовою масою та видільною здатністю нирок. Тому збільшення рівня креатиніну, як правило, свідчить про зниження функціональної активності нирок. Визначення концентрації креатиніну в крові та сечі використовують для розрахунку величини клубочкової фільтрації та оцінки функції нирок (проба Реберга). Окрім цього вміст креатиніну в лабораторній практиці є одним з біохімічних показників для діагностики гіперазотемії та гіпертиреозу. Рівень креатиніну збільшується після застосування деяких медичних препаратів, у разі зневоднювання організму, після механічних та операційних ушкоджень м'язів. Зниження рівня креатиніну в крові відбувається під час голодування, вегетаріанської дієти, при зниженні м'язової маси у період вагітності та після вживання кортикостероїдів. Визначаючи креатинін, слід ураховувати, що в організмі крім ендогенного є ще екзогенний креатинін, який надходить з м'ясною їжею.

На сьогодні існує декілька методів для визначення креатиніну серед інших метаболітів у біологічних рідинах. Ці методи можна умовно поділити на три основні групи. До першої групи належать колориметричні методи на основі реакції Яффе, що запропонована у 1886 р. і полягає у взаємодії креатиніну з пікриновою кислотою у лужному середовищі з утворенням таутомеру пікрату креатиніну помаранчевого кольору [2]. У клінічну практику цю реакцію ввів О. Фолін у 1904 р. [3]. Завдяки простоті

виконання її широко використовують і сьогодні. На жаль, реакція Яффе є низькоспецифічною у разі проведення аналізу в біологічних рідинах, оскільки пікринова кислота взаємодіє з більш ніж 20% некреатинінових хромогенів (протеїнами, глюкозою, ацетоном, білірубіном, цефалоспоринами, ацетоцтовою та піровіноградною кислотами тощо) з утворенням сполук, які поглинають у тій самій ділянці, що й пікрат креатиніну. Загалом кожна речовина, що має активну метильну групу, може реагувати з пікратом [4–5]. У реакцію з лужним пікратом може вступати також низка лікарських препаратів (аспірин, ампіцилін, фуросемід, антибіотики цефалоспоринового ряду та ін.), а також антикоагулянти (ЕДТА, гепарин, цитрат, оксалат). Це спричинило пошук численних модифікацій, спрямованих на підвищення специфічності методу Яффе.

Тривалий час для підвищення специфічності підбирали такі умови, за яких вплив різних інтерферуючих речовин на формування комплексу «креатинін–пікрат» був би мінімальним або кількість їх можна було б точно оцінити. Для цього використовували такі прийоми: визначали поглинання різних інтерферуючих речовин після розщеплення креатиніну мікроорганізмами *Corynebacterium ureafaciens*; виводили подібні сполуки із реакційного середовища з використанням різних адсорбентів; виділяли креатинін із досліджуваного матеріалу та проводили кольорову реакцію; визначаючи креатинін, білки плазми або сироватки осаджували вольфраматом натрію, трихлороцтовою або пікриною кислотами, що вважалися більш специфічними осаджувачами, однак це не усувало повністю інтерференцію з іншими речовинами і не забезпечувало правильних результатів. Для зв'язування глюкози та аскорбінової кислоти у реакційній суміші використовували солі борної кислоти [6].

Ще одним прикладом підвищення специфічності способу визначення креатиніну є метод, що ґрунтується на принципі Слота, згідно з яким пікрат креатиніну знебарвлюється у лужному середовищі. Реакцію досліджуваного зразка з пікриною кислотою проводять послідовно у лужному та кислому середовищах, при цьому у лужному середовищі утворюються комплекси помаранчевого кольору як з креатиніном, так і з вищезгадуваними інтерферуючими речовинами. Однак у кислому середовищі знебарвлюється тільки пікрат креатиніну. Визначення концентрації креатиніну підра-

ховують за різницею оптичної густини розчину в лужному та кислому середовищах, яка пропорційна концентрації креатиніну [7].

Проблеми, що пов'язані з невисокою специфічністю реакції Яффе, спонукали науковців до пошуку інших методів. Для визначення креатиніну розроблено низку інструментальних методів, які ми віднесемо до другої групи методів. Передусім — це високоефективна рідинна хроматографія [8–10, 25], іонна хроматографія [11–12], міцелярна електрокінетична хроматографія [13–14, 16], хроматографічний метод із застосуванням флюоресцентних індикаторів [15], капілярний електрофорез [17], капілярний зональний електрофорез [18–21], капілярний ізатахофорез [22], тандемна мас-спектрометрія [23].

Більшість класичних методів мають суттєві недоліки, такі як необхідність попереднього оброблення зразків і потреба в дорогому обладнанні, у деяких випадках для них характерна недостатня селективність. Окрім цього деякі методи (наприклад, високоефективну рідинну хроматографію [24]) застосовують у поєднанні з методом на основі реакції Яффе, що збільшує похибку під час визначення креатиніну. Найбільш перспективним із класичних вищезазначених методів видається капілярний електрофорез (КЕФ). Інтенсивний розвиток методу розпочався у 80-х роках минулого сторіччя і був зумовлений появою капілярів з малим внутрішнім діаметром та переходом до прямого спектрофотометричного детектування досліджуваних компонентів безпосередньо у капілярі [25]. Метод базується на розділенні компонентів складної суміші у кварцевому капілярі під дією прикладеного електричного поля. У поєднанні з високочутливим УФ-детектуванням безпосередньо в капілярі КЕФ є потужним та відносно простим засобом для дослідження метаболітів у біологічних рідинах. Основними його перевагами є висока роздільна здатність, експресність, мінімальні витрати реактивів, використання малих об'ємів зразків та низька, порівняно з хроматографічними колонками, вартість капілярів. Однак широке впровадження КЕФ для аналізу креатиніну обмежується низкою факторів, головним серед яких є висока вартість детекторів.

Окрім розповсюджених методів для визначення креатиніну дедалі частіше використовують біосенсорні пристрої, які належать до третьої групи методів. На сьогодні розроблено ряд ензиматичних методів визначення

креатиніну, які є більш специфічними та безпечними порівняно з реакцією Яффе, оскільки унеможливають використання агресивних реагентів (зокрема вибухонебезпечної пікринової кислоти). Аналіз літературних джерел свідчить, що розширення сфери застосування біосенсорів на сьогодні зумовлено не лише високою чутливістю цих систем, але й тим, що біосенсор, як правило, містить весь набір реагентів, потрібних для визначення концентрації аналізованої речовини, а це дозволяє звести процедуру аналізу до одного етапу. В даному разі можна говорити про своєрідну автоматизацію аналізу. В останні роки спостерігається швидке поширення біосенсорних методів визначення в різних галузях використання біосенсорів, особливо в екології та медицині. У медицині біосенсори застосовують у разі біохімічного скринінгу рідких середовищ організму під час масових досліджень, для безперервного (on-line) моніторингу фізіологічних параметрів хворих. Спектрофотометричні та хроматографічні методи, що їх традиційно використовують у клініці для визначення органічних речовин, зокрема креатиніну, малопридатні для вимірювання on-line. Цим зумовлені інтенсивні дослідження з розроблення біосенсорів для визначення фізіологічно значущих сполук у реальному часі (протягом хвилин). Такі датчики можна застосовувати для безперервного контролю основних біохімічних показників рідких середовищ організму.

На сьогодні існують амперометричні, потенціометричні та оптичні біосенсори для визначення креатиніну. Кожен тип біосенсорів має свої переваги та недоліки. При розробленні як амперометричних, так і потенціометричних систем важливими є декілька параметрів: визначення чутливості, діапазон вимірювання, операційна стабільність, стабільність в умовах зберігання та відсутність впливу інтерферуючих речовин. Розроблені на цей час біосенсорні методи визначення креатиніну та основні робочі характеристики їх наведено в таблиці.

У 1983 р. Tsuchida and Yoda [26] запропонували перший амперометричний ензиматичний електрод для визначення креатиніну в сироватці крові з використанням триензиматичної системи, що забезпечує каскад реакцій каталітичного перетворення креатиніну на креатин (креатинінамідогідролаза або креатиніназа), креатину на саркозин (креатинамідногідролаза або креатиназа) та саркозину на гліцин та пероксид водню (саркозиноксидаза). У результаті ро-

боти триензиматичної системи утворювався пероксид водню, який визначали за електроокисненням при потенціалі 0,65V проти Ag/AgCl референтного електроду. Ензими було іммобілізовано за допомогою глутарового альдегіду у білковій матриці; цей метод іммобілізації уперше описали Tran-Minh and Broun [27]. Пізніше Madaras and Buck розробили мініатюризований амперометричний біосенсор для визначення креатиніну сироватки, використовуючи згадану вище триензиматичну систему та застосовуючи при цьому електрополімеризовану біоселективну мембрану з вибірковою проникністю для підвищення селективності [28]. Внутрішню мембрану полі-(1,3-діамінобензол) було розташовано безпосередньо на поверхні електроду для мінімізації інтерференції звичайних компонентів сироватки (наприклад, аскорбінової та сечової кислот), які також окиснюються при потенціалі 0,65V. Іммобілізація ензимів, що входять до складу триензиматичної системи, здійснювалась у шарі полі-(1,3-діамінобензолу) утворенням зв'язків із молекулами бичачого сироваткового альбуміну (BCA) та глутаровим альдегідом. Schneider та співавт. застосовували для створення креатинчутливого біосенсора подібну триензиматичну систему, що була іммобілізована з використанням гідрогелю на основі полі(карбоніл)сульфонату [29].

Слід зазначити, що застосування триензиматичної системи уповільнює розроблення цього пристрою, а використання трьох ензимів зумовлює часткову втрату чутливості. Крім цього креатин та саркозин є сильними інтерферентами під час визначення креатиніну цією системою.

Перший потенціометричний біосенсор для визначення креатиніну на основі амонійчутливого електроду та іммобілізованого ензиму було запропоновано у 1976 р. Meyerhoff, Rechnitz [30]. Згодом Guilbault та Coulet [31] запропонували схожу систему, але з поліпшеною операційною стабільністю та стабільністю під час зберігання. Однак жодна з цих систем не мала достатньої чутливості в процесі визначення креатиніну, а їхня стабільність при зберіганні залишалась недостатньою для комерційного впровадження.

На сьогодні найбільший інтерес становить ензиматичний метод з використанням іммобілізованої креатиніндеїмінази (креатинініміногідролази), що каталізує розщеплення креатиніну до іона амонію та N-метилгідантоїну. Ця система має велику

перевагу — використання тільки одного ензиму, що значно спрощує створення біосенсора. Разом із тим відсутня інтерференція з боку креатину та інших метаболітів, присутніх у біологічних зразках. Недоліком такого біосенсора є чутливість до ендogenous та екзогенного аміаку у зразках крові, та, що є значно суттєвішим, — у сечі. У такому разі виникає потреба в проведенні допоміжних реакцій, що дозволяють вивести з реакції іони амонію. Нещодавно Shih, Huang [32] запропонували використання термооброблених залужених зразків: така попередня обробка не впливає на креатинін. На нашу думку, попередня обробка зразків є небажаною, оскільки ускладнює аналіз та віддаляє дослідників від концепції простоти аналізу, яка є фундаментальною при розробленні біосенсорів.

Вирішення проблеми чутливості до ендogenous та екзогенного аміаку описано в роботах Soldatkin et al. [33, 34], де як перетворювач використовували рН-чутливий польовий транзистор, а як чутливий елемент — креатиніндеїміназу. У разі застосування такого біосенсора відсутня інтерференція з боку креатину та інших метаболітів, включаючи аміак, присутніх у біологічних зразках.

Креатинін може також бути визначений за допомогою оптичних сенсорів [35, 36]. Зазвичай це потребує розроблення флюоресцентних перетворювачів, специфічних до різних метаболітів. У випадку визначення креатиніну оптичний сенсор може поєднуватись з креатиніндеїміназою, що каталізує гідроліз креатиніну з утворенням амонію, який і тестується оптичним перетворювачем. Визначення амонію потребує амонійспецифічного іонофора, поєданого з хромофором, який змінює спектр абсорбції під час протонізації. Такий сенсор дорогий та складний, оскільки для визначення амонію потрібен протонізований рН-чутливий індикатор, який би змінював абсорбцію чи спектр флюоресценції протягом депротонізації. Окрім того, при цьому виникає також проблема зі швидкістю протонізації амонію за фізіологічного рН; рК амонію становить 9,3, а за такого значення рН втрачається ензимна активність.

Світлопроникні гідрофобні полімери, що проникні для аналіту, використовують у поєднанні з оптичними сенсорами, якщо аналізом слугує пара або газ. Складнощі виникають у разі застосування гідрофобних полімерів з декількома флюоресцентними барвниками. Сенсор для амонію потребує

протонізованого індикатора. Проте часто виникає проблема, коли поліаніонний рН-індикатор (найбільш вживаний протонізований індикатор) у поєднанні з гідрофобною мембраною не продукує активованого флюорофору [36].

На цей час відомо багато індикаторів креатиніну, використовуваних у процесі розроблення оптичних сенсорів, однак більшість із них мають проблеми, пов'язані з інтерференцією CO₂, низьку чутливість, повільний час відгуку та низьку відтворюваність.

Останнім часом значну увагу дослідників, які працюють у галузі новітніх біотехнологій, привернуло створення штучних аналогів ензимів, біологічних рецепторів та антитіл і застосування їх для розроблення нового покоління біосенсорних пристроїв. Значного поширення для синтезу таких матеріалів набув метод молекулярного імпринтингу [37–39], який передбачає синтез сітчастих полімерів за присутності молекул-матриць (вони водночас є аналітами). Подальша екстракція матричних молекул з полімерної сітки зумовлює утворення в ній комплементарних каверн, що здатні до повторного селективного зв'язування матричних молекул [37].

На сьогодні опубліковано низку робіт щодо синтезу молекулярно-імпринтованих полімерів, здатних до селективного розпізнавання креатиніну [40–53].

Перша робота, присвячена синтезу молекулярно-імпринтованого полімеру для розпізнавання креатиніну, вийшла друком в 1997 р. [40]. Реакцію полімеризації ініціювали за допомогою γ -опромінення. Як функціональні мономери для синтезу молекулярно-імпринтованих полімерів були застосовані метакрилова кислота, N-вінілпіридин та стирол, здатні утворювати нековалентні зв'язки з креатиніном. Автори продемонстрували, що природа функціонального мономера має суттєвий вплив на селективність синтезованого полімеру. Молекулярно-імпринтовані полімери з оптимізованою композицією були здатні до адсорбції креатиніну, тимчасом як адсорбція креатину — його близького структурного аналога — була незначною. На жаль, авторами наведено лише дані з адсорбції аналітів на селективних полімерах. Незважаючи на показану можливість регенерації та багаторазового використання селективних полімерів, дослідження не було продовжено, а синтезовані авторами матеріали не застосовано для розроблення аналітичних методів визначення креатиніну.

Цікаві дані з розроблення флуоресцентного методу визначення креатиніну одержано S. Subramanyam та співавт. [41]. Перевагою цієї роботи порівняно з аналогічними є те, що автори синтезували полімер, здатний не тільки до селективного розпізнавання креатиніну, але й до генерації сигналу, який є пропорційним концентрації аналіту та може бути зареєстрований. Із цією метою використали здатність гемітіоацеталу, утвореного в результаті взаємодії алілмеркаптани з *o*-фталеvim діальдегідом, реагувати з первинними амінами з утворенням флуоресцентного ізоіндольного комплексу. Гемітіоацеталь може бути включений у густозшиті полімерні сітки, утворені з використанням традиційних у молекулярному імпринтингу біфункціональних зшивних агентів. При цьому отриманий у такий спосіб полімер здатен до зв'язування первинних амінів, як і мономер, застосований під час його синтезу. Оскільки креатинін незворотно зв'язується з полімером на основі гемітіоацеталу, автори запропонували застосовувати як матричну молекулу метильований аналог креатиніну, який можна видалити з повністю сформованої полімерної сітки. Це уможливило формування у структурі полімеру селективних сайтів, здатних до розпізнавання креатиніну. Композицію креатинін-імпринтованих полімерів було оптимізовано за допомогою методу комп'ютерного моделювання. Автори показали можливість визначення креатиніну в межах 25–120 мкМ. Було продемонстровано незначну перехресну реактивність синтезованих полімерів щодо креатину, фенілаланіну, тирозину та триптофану.

Tsai та Syu [42] синтезували полімер для селективного розпізнавання креатиніну в суміші його з креатином, *N*-гідроксисукцинімідом та 2-піролідіном. Креатинін-селективний молекулярно-імпринтований полімер є кополімером 4-вінілпіридину та дивінілбензолу. Функціональним мономером, що утворює нековалентні зв'язки з креатиніном, у даному разі виступає 4-вінілпіридин, тоді як дивінілбензол застосовується як біфункціональний зшивний агент, що надає жорсткості полімерній сітці й відповідає за збереження просторової структури селективних сайтів зв'язування, яка необхідна для подальшої взаємодії з креатиніном. Здатність полімеру селективно розпізнавати креатинін аналізували за допомогою методу твердофазного ядерного магнітного резонансу.

Тими ж самими авторами запропоновано застосування β -циклодекстрину як функціо-

нального мономеру, здатного утворювати комплекс з креатиніном. Епіхлорогідрин було застосовано у цій схемі полімеризації як зшивний агент. Автори дослідили механізм зв'язування креатиніну з полімером на основі β -циклодекстрину і показали, що взаємодія відбувається завдяки утворенню нековалентних зв'язків між гідроксигрупами β -циклодекстрину та креатиніном, а також частково через стереоселективність молекулярно-імпринтованих сайтів. Важливою особливістю синтезованого полімеру була його здатність селективно адсорбувати креатинін із суміші з креатином, що є його близьким структурним аналогом [43]. Роботу в цьому напрямі було продовжено та показано можливість селективної адсорбції креатиніну з реальних біологічних зразків (сироватки крові людини) [44]. Недоліками цих робіт, як і більшості досліджень такого типу, є висока вартість обладнання, що застосовується для реєстрації взаємодії креатиніну із синтетичними рецепторами.

З опублікованих на сьогодні робіт зі створення синтетичних аналогів біологічних рецепторів, здатних до розпізнавання креатиніну, лише кілька містять дані з інтеграції таких рецепторів у складі сенсорних пристроїв для визначення цього метаболіту [45–47].

Це зумовлено кількома основними причинами. Незважаючи на прогрес у галузі розробки сенсорів із застосуванням молекулярно-імпринтованих полімерів [48], найбільшою проблемою залишається детекція власне події зв'язування молекулярно-імпринтованого полімеру з відповідним аналітом та перетворення сигналу на форму, яку можна реєструвати за допомогою наявних аналітичних методів.

Найпоширенішим методом інтеграції молекулярно-імпринтованих полімерів (МІП) з чутливими елементами сенсорних пристроїв є покриття електродів розчином полімеру в органічному розчиннику методом центрифугування. На жаль, більшість із розроблених у такий спосіб електрохімічних сенсорних пристроїв на основі твердих електродів із застосуванням МІПів мають ряд суттєвих недоліків: високий фоновий сигнал під час аналізу реальних зразків, зумовлений присутністю інтерферуючих речовин; поступове забруднення поверхні електроду складовими реальних зразків, які окиснюються за умов проведення аналізу, зниження в результаті цього величини корисного сигналу, а також вузький лінійний динамічний діапазон таких пристроїв,

пов'язаний із швидким насиченням доступних молекулярно-імпринтованих сайтів [49]. До загальних недоліків сенсорних пристроїв на основі МПІв належить також повільна дифузія і, як наслідок, повільна кінетика сенсорних відгуків.

До найбільш перспективних розробок у цій галузі слід віднести роботи Lakshmi та співавт., а також Delaney та співавторів. Авторам вдалося подолати проблеми, пов'язані з повільною кінетикою сенсорних відгуків шляхом використання моношарів МПІв, адсорбованих на поверхні ртутного капуючого електрода, та тонких шарів МПІв, отриманих на поверхні золотих електродів методом прищепленої полімеризації відповідно [50–53].

Досить ефективним під час розроблення електрохімічних сенсорних пристроїв для визначення креатиніну на основі МПІв виявилось застосування ртутних капуючих електродів, запропоноване в роботах [45, 50]. Такі електроди мають практично бездефектну атомарно рівну поверхню з незначною питомою площею. На основі ртутного капуючого електрода Lakshmi та співавтори розробили високочутливий та високоселективний сенсор для визначення креатиніну на основі [полі(меламін-ко-хлоранілової)] молекулярно-імпринтованої полімерної плівки. Межа визначення креатиніну в крові людини за допомогою такого сенсора — 1,49 нг/мл. Сенсор демонстрував високу селективність: не спостерігалось жодних відгуків креатинінселективних сенсорів на NaCl, креатин, глюкозу, фенілаланін, гістидин та цитозин. Незначна перехресна реактивність мала місце лише у випадку тирозину та гістидину.

На особливу увагу заслуговує також робота Delaney та ін., де наведено дані з розроблення емнісного сенсора для визначення креатиніну [52]. Чутливим елементом такого сенсора є молекулярно-імпринтований кополімер 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонової кислоти (функціонального мономеру) та N,N'-метилєнбісакриламід (зшивного агента), що синтезований методом УФ-ініційованої прищепленої полімеризації на поверхні золотих електродів. Зв'язування креатиніну з поверхнею такого сенсора призводило до зменшення ємності електрода, що було пропорційне його концентрації в аналізованому зразку. Синтетичні

рецептори у складі сенсора були високоселективними: не спостерігали жодних змін ємності сенсора у відповідь на додавання NaCl, креатину, сечовини та глюкози. Межа визначення креатиніну за допомогою цього сенсора становила 10 мкМ, що є оптимальним для застосування таких пристроїв у медицині [53–61].

Таким чином, застосування МПІв у сенсорній технології дозволяє уникнути деяких проблем біосенсорного визначення: такі пристрої характеризуються високою селективністю, яка властива біомолекулам, та високою стабільністю синтетичних полімерів у зовнішньому середовищі, а також невисокою вартістю. Крім того, комбінування молекулярно-імпринтованих полімерів з біосенсорними технологіями може дозволити отримувати гібридні прилади з оптимальними аналітичними характеристиками.

Проведений аналіз літератури, присвячений методам визначення креатиніну, свідчить про те, що на сьогодні більшість методичних проблем, пов'язаних з його визначенням за допомогою хімічних та ензиматичних методів, розв'язано. Референтні інтервали у разі використання більш специфічних ензиматичних методів зазвичай нижчі порівняно з методами, що базуються на реакції Яффе.

На основі вищевикладеного можна зробити висновок, що найбільш перспективними аналітичними методами визначення креатиніну в біологічних рідинах у повсякденній лабораторній практиці можуть бути біосенсорні методи, що ґрунтуються на використанні як природних ензимів, так і штучних аналогів біологічних рецепторів, здатних до селективного розпізнавання цього метаболіту. Основними перевагами біосенсорних методів є малі витрати реактивів, відсутність високовартісного обладнання, експресність аналізу та можливість проведення його в режимі реального часу.

Автори щиро вдячні за фінансову підтримку Національній академії наук України (програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб» та «Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини»).

Біосенсорні методи визначення креатиніну та їхні основні робочі характеристики

Тип перетворювача та ензиматична система	Межа визначення	Інтерферуючі речовини	Стабільність під час зберігання	Посилання
<i>Амперометричні</i>				
Кисневий електрод за Кларком. Коїммобілізовані кретиніназа, креатиназа та саркозиноксидаза	0,02 мМ	L-аскорбат, урат	Не досліджено	55
Амперометрична проточна комірка. Коїммобілізовані креатинамідиногідролаза з саркозиноксидазою та саркозиноксидаза з каталазою	1μМ	Саркозин, креатин	60% активності після трьох тижнів роботи	15
Платиновий електрод. Коїммобілізовані кретиніназа, креатиназа та саркозиноксидаза	4,5μМ	Саркозин, креатин	Не досліджено	56
Мікроланарний платиновий електрод. Коїммобілізовані кретиніназа, креатиназа та саркозиноксидаза	1μМ	Саркозин, креатин Аскорбінова кислота, сечова кислота	Не досліджено	57
Коїммобілізовані креатинамідиногідролаза, креатинамідиногідролаза та саркозиноксидаза	–	Не досліджено	6–8 днів	58
<i>Потенціометричні</i>				
pH-чутливі польові транзистори (pH-ПТ)	–	Не досліджено	6 місяців	59
Іончутливий ПТ/креатиніндеїміназа у BSA мембрані	10 μМ	Немає	6 місяців	33
Іончутливий ПТ/креатиніндеїміназа у PVA/SbQ мембрані	20 μМ	Немає	6 місяців	34
Амонійний/амонієвий електрод, креатиніндеїміназа	20μМ	NO	70% активності після 10 тижнів роботи	60
Біензиматичний реактор та потенціометричний біосенсор на основі уреаз. Коїммобілізовані кретиніназа та креатиназа, уреаз	100μ	Не досліджено	1 місяць для біензиматичної системи та 2 місяці для уреаз	61
<i>Оптичні</i>				
Оптичний біосенсор на основі інкапсульованих креатиніндеїмінази, гідролази та оксидоредуктази	50μМ	Невеликий вплив суміші субстратів: сечовини, глюкози, сечової кислоти	3 тижні	62

ЛІТЕРАТУРА

1. Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В. Биохимические исследования в клинике. — Л., 1981. — 68 с.
2. Jaffe M. Uber den Niederschlag, welchen Pikrinsaure in normalem Harn erzeugt. und uber eine neue Reaktion des Kreatinins // Z. Physiol. Chem. — 1886. — V. 10. — P. 391–400.
3. Folin O. On the determination of creatinine and creatine in blood and tissues // J. Biol. Chem. — 1914. — V. 17. — P. 475–481.
4. Wahlefeld A. W., Siedel J. Methods in Enzymatic Analysis. — Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1985. — P. 488.
5. Lamb E. J., Wood J., Stowe H. J. et. al. Susceptibility of glomerular filtration rate estimations to variations in creatinine methodology: a study in older patients // Ann. Clin. Biochem. — 2005. — V. 42. — P. 11–18.
6. Heinegard D., Tiderström G. Determination of serum creatinine by direct colorimetric method // Clin. Chem. Acta. — 1973. — V. 43. — P. 305–310.
7. Мошкин А. В., Долгов В. В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. — М.: Медиздат, 2004. — 192 с.

8. *Dobberpuhl Mo Y., Dash A.K.* A simple HPLC method with pulsed EC detection for the analysis of creatine // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* — 2003. — V. 32, N1. — P. 125–132.
9. *Meraas I.D., Mansilla A.E., Goomes J.R.* Determination of methotrexate, several pteridines, and creatinine in human urine, previous oxidation with potassium permanganate, using HPLC with photometric and fluorimetric serial detection // *Anal. Biochem.* — 2005. — V. 346, N2. — P. 201–209.
10. *George S.K., Dipu M.T., Mehra U.R. et. al.* Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine // *J. Chromatogr. B.* — 2006. — V. 832, N1. — P. 134–137.
11. *Yokoyama Y., Horikoshi S., Takahashi T., Sato H.* A Low-capacity cation-exchange chromatography of ultraviolet-absorbing urinary basic metabolites using a reversed-phase column coated with hexadecylsulfonate // *J. Chromatogr. A.* — 2000. — V. 886, N1–2. — P. 297–302.
12. *Yokoyama Y., Tsuji S., Sato H.* Simultaneous determination of creatinine, creatine, and UV-absorbing amino acids using dual-mode gradient low-capacity cation-exchange chromatography // *Ibid.* — 2005. — V. 1085, N1. — P. 110–116.
13. *Burke D.G., MacLean P.G., Walker R.A. et. al.* Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. B.* — 1999. — V. 732, N7. — P. 479–485.
14. *Tran T.C., Huq T.A., Kantes H.L. et. al.* Determination of creatinine and other uremic toxins in human blood sera with micellar electrokinetic capillary electrophoresis // *Ibid.* — 1997. — V. 690, N8. — P. 35–42.
15. *Yao T., Kotegawa K.* Simultaneous flow-injection assay of creatinine and creatine in serum by the combined use of a 16-way switching valve, some specific enzyme reactors and a highly selective hydrogen peroxide electrode // *Anal. Chem. Acta.* — 2002. — V. 462, N9. — P. 283–291.
16. *Pobozzy E., Radomska A., Koncki R., Gllaab S.* Determination of Dialysate Creatinine by Micellar Electrokinetic Chromatography // *J. Chromatogr. B.* — 2003. — V. 789. — P. 417–424.
17. *Costa A.C.O., Costa J.L., Tonin F.G. et. al.* Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. // *J. Chromatogr. A.* — 2007. — V. 1171. — P. 140–143.
18. *Zinellu A., Sotgia S., Zinellu E. et. al.* Assay for the simultaneous determination of guanidinoacetic acid, creatinine and creatine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV-detection // *J. Sep. Sci.* — 2006. — V. 29, N5. — P. 704–708.
19. *Tuma P., Samcova E., Balinova P.* Determination of 3-methylhistidine and 1-methylhistidine in untreated urine samples by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. B.* — 2005. — V. 821, N1. — P. 53–59.
20. *Rodrigues J., Berzas J.J., Castaneda G et. al.* Very fast and direct capillary zone electrophoresis method for the determination of creatinine and creatine in human urine // *Anal. Acta.* — 2004. — V. 521, N1. — P. 53–59.
21. *Zinellu A., Caria M.A., Tavera C. et. al.* Plasma creatinine and creatine quantification by capillary electrophoresis diode array detector // *Annal. Biochem.* — 2005. — V. 342, N2. — P. 186–193.
22. *Kvasniccka F., Voldrrich M.* Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products // *Electrophoresis.* — 2000. — V. 21. — P. 2848–2850.
23. *Husskova R., Chrastina P., Adam T., Schneiderka P.* Determination of creatinine in urine by tandem mass spectrometry // *Clin. Chim. Acta.* — 2004. — V. 350. — P. 99–106.
24. *Samanidou V.F., Metaxa A.S., Paradoyannis I.N.* Direct simultaneous determination of uremic toxins: Creatine, creatinine, uric acid, and xanthine in human biofluids by HPLC // *J. Liq. Chromatogr. A.* — 2002. — V. 25, N1. — P. 43–57.
25. *Timerbaev A.R.* Element speciation analysis by capillary electrophoresis // *Talanta.* — 2000. — V. 52, N4. — P. 573–606.
26. *Tsuchida T., Yoda K.* Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum // *Clin. Chem.* — 1983. — V. 29. — P. 51–55.
27. *Tran-Minh C., Broun G.* Construction and study of electrodes using cross-linked enzymes // *Anal. Chem.* — 1975. — V. 47, N8. — P. 1359.
28. *Madaras M.B., Buck R.P.* Miniaturized biosensors employing electropolymerized permselective films and their use for creatinine assays in human serum // *Ibid.* — 1996. — V. 68. — P. 3832–3839.
29. *Schneider J., Gruendig B., Renneberg R. et. al.* Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine / creatinine amperometric biosensing // *Anal. Chim. Acta.* — 1996. — V. 325. — P. 161–167.
30. *Meyerhoff M., Rechnitz G.A.* An activated enzyme electrode for creatinine // *Ibid.* — 1976. — V. 85, N2. — P. 277–285.
31. *Guilbault G.G., Coulet P.R.* Creatinine-selective enzyme electrodes // *Ibid.* — 1983. — V. 152. — P. 223–228.

32. *Shih Y.-T., Huang H.-J.* A creatinine deiminase modified polyaniline electrode for creatinine analysis // *Ibid.* — 1999. — V. 392, N2–3. — P. 143–150.
33. *Soldatkin A. P., Montoriol J., Sant W. et al.* Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane // *Talanta.* — 2002. — V. 58. — P. 351–357.
34. *Soldatkin A. P., Montoriol J., Sant W. et al.* Development of potentiometric creatinine-sensitive biosensor based on ISFET and creatinine deiminase immobilised in PVA/SbQ photopolymeric membrane // *Materials Science and Engineering.* — 2002. — V. 21, N1–2. — P. 75–79.
35. *Pat. WO/1999/007881.* Fluorescent polymeric sensor for the detection of creatinine/ Munkholm Christiane. Publication Date 18.02.1999.
36. *Rhines T. D., Arnold M. A.* Determination of ammonia in untreated serum with a fiber-optic ammonia gas sensor // *Anal. Chim. Acta.* — 1990. — V. 231, N2. — P. 231–235.
37. *Wulff G.* Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates — A way towards artificial antibodies // *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* — 1995. — V. 34, N17. — P. 1812–1835.
38. *Mayes A. G., Whitcombe M. J.* Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers // *Advanced Drug Deliv. Rev.* — 2005. — V. 57, N12. — P. 1742–1778.
39. *Spivak D. A.* Shape selectivity versus functional group pre-organization in molecularly imprinted polymers // *Ibid.* — 2005. — V. 57, N12. — P. 1779–1794.
40. *Sreenivasan K., Sivakumar R.* Interaction of molecularly-imprinted polymers with creatinine // *J. Appl. Polym. Sci.* — 1997. — V. 66. — P. 2539–2542.
41. *Subramanyam S., Piletsky S.A., Piletska E.V. et al.* «Bite-and-switch» approach using computationally designed molecularly imprinted polymers for sensing of creatinine // *Biosens. and Bioelect.* — 2001. — V.16. — P. 631–637.
42. *Tsai H.-A., Syu M.-J.* Synthesis and characterization of creatinine imprinted poly(4-vinylpyridine-co-divinylbenzene) as specific recognition receptor // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — V. 539. — P. 107–116.
43. *Tsai H.-A., Syu M.-J.* Synthesis of creatinine-imprinted poly(β -cyclodextrin) for the specific binding of creatinine // *Biomaterials.* — 2005. — V. 26. — P. 2759–2766.
44. *Hsieh R.-Y., Tsai H.-A., Syu M.-J.* Designing a molecularly imprinted polymer as an artificial receptor for the specific recognition of creatinine in serums // *Ibid.* — 2006. — V. 27. — P. 2083–2089.
45. *Lakshmi D., Prasad B. B., Sharma P. S.* Creatinine sensor based on a molecularly imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode. // *Talanta.* — 2006. — V. 70, N2. — P. 272–280.
46. *Delaney T. P., Mirsky V. M., Wolfbeis O. S.* Capacitive creatinine sensor based on photografted molecularly imprinted polymer // *Electroanalysis.* — 2002. — V. 3. — P. 221–224.
47. *Delaney T. L., Zimin D., Rahm M. et al.* Capacitive detection in ultrathin chemosensors prepared by molecularly imprinted grafting photopolymerization // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, N8. — P. 3220–3225.
48. *Alexander C., Andersson H. S., Andersson L. I. et al.* Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003 // *J. Mol. Recogn.* — 2006. — V. 19. — P. 106–137.
49. *Kriz D., Ansell R.J.* // *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry.* — 2001. — V. 23. — P. 417–440.
50. *Prasad B.B., Lakshmi D.* Barbituric Acid Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer-Modified Hanging Mercury Drop Electrode // *Electroanalysis.* — 2005. — V. 17, N14. — P. 1260–1268.
51. *Lakshmi D., Sharma P. S., Prasad B. B.* Development of uric acid sensor based on molecularly imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode // *Electroanalysis.* — 2006. — V. 18, N9. — P. 918–927.
52. *Delaney T. P., Mirsky V. M., Wolfbeis O. S.* Capacitive creatinine sensor based on photografted molecularly imprinted polymer // *Electroanalysis.* — 2002. — V. 3. — P. 221–224.
53. *Delaney T.L., Zimin D., Rahm M. et al.* Capacitive detection in ultrathin chemosensors prepared by molecularly imprinted grafting photopolymerization // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, N8. — P. 3220–3225.
54. *Suzuki H., Arakawa H., Karube I.* Fabrication of a sensing module using micro-machined biosensors // *Biosens. and Bioelektr.* — 2001. — V. 16. — P. 725–733.
55. *Walsh D.A., Dempsey E.* Comparison of electrochemical, electrophoretic and spectrophotometric methods for creatinine determination in biological fluids // *Anal. Chims Acta.* — 2002. — V. 459, N2. — P. 187–198.
56. *Lee H.-L., Chen S.-C.* Microchip capillary electrophoresis with electrochemical detector for precolumn enzymatic analysis of glucose, creatinine, uric acid and ascorbic acid in urine and serum // *Talanta.* — 2004. — V. 64, N3. — P. 750–757.

57. *Berberich J. A., Chan A., Boden M. et. al.* A stable three-enzyme creatinine biosensor. 3. of creatinine amidohydrolase and sensor development // *Acta Biomater.* — 2005. — V. 1, N2. — P. 193–199.
58. *Radomska A., Koncki R., Gllaab S., Parzynnska K.* Bioanalytical system for control of hemodialysis treatment based on potentiometric biosensors for urea and creatinine // *Anal. Chim. Acta.* — 2004. — V. 523. — P. 193–200.
59. *Radomska A., Bodenszac E., Gllaab S., Koncki R.* Creatinine Biosensor Based on Ammonium Ion Selective Electrode and Its Application in Flow-injection Analysis // *Talanta.* — 2004. — V. 64. — P. 603–608.
60. *Pandey P.C., Mishra A.P.* Novel potentiometric sensing of creatinine // *Sensors and Actuators B.* — 2004. — V. 99, N2–3. — P. 230–235.
61. *Tsai H-C., Doong R-A.* Simultaneous determination of renal clinical analytes using hydrolase- and oxidase-encapsulated optical array biosensors // *Analytica Biochemistry.* — 2004. — V. 334, N1. — P. 183–192.

КРЕАТИНИН И МЕТОДЫ ЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

*Е. А. Назаренко
Т. А. Сергеева
А. П. Солдаткин*

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев

E-mail: helen_nazarenko@yahoo.com

Определение концентраций креатинина в биологических жидкостях приобретает все большую актуальность как клинический тест. Этот анализ используется для оценки почечной недостаточности и дисфункции мышц.

Ныне существует большое количество методов определения креатинина, однако только некоторые могут быть использованы для биомедицинского анализа. Традиционным методом анализа креатинина является колориметрический метод на основе реакции Яффе. Основной недостаток этого метода — зависимость от концентрации присутствующих в биологических жидкостях интерферентов, что значительно завышает результаты анализа. Одними из наиболее перспективных методов определения метаболитов являются биосенсорные. Преимущества этих методов — минимальные расходы реактивов, специфичность, отсутствие дорогостоящего оборудования, экспрессность анализа.

Ключевые слова: креатинин, анализ, биосенсоры, молекулярно-импринтированные полимеры.

CREATININE AND METHODS OF ITS DETERMINATION

*O. A. Nazarenko
T. A. Sergeyeva
O. P. Soldatkin*

Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: helen_nazarenko@yahoo.com

Determination of creatinine concentrations in biological fluids is an increasingly important clinical test. This analyte is used for evaluation of renal function and muscle damage. Today there are plenty of methods of creatinine detection, however only some of them could be used for the biomedical analysis. The colorimetric method based on Jaffe reaction is the most widely used one for the creatinine analysis. The main disadvantage of this method is dependence on the presence of possible interferents that are present in the biological samples. This leads to the increased amount of pseudo-positive results. Special attention in the review is paid to the most effective methods of the metabolite detection (enzyme- and synthetic receptor-based biosensors). The advantages of these methods are small volumes of the analyzed samples, specificity, inexpensive equipment and fast time of analysis.

Key words: creatinine, analysis, biosensors, molecularly-imprinted polymers.