

## ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ІМУНОБІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ЗОЛОТА ТА НАНОЧАСТИНОК ZnO ЗА АНАЛІЗУ РІВНІВ СПЕРМІНУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН *IN VITRO*

---

---

**М. П. ПРИЛУЦЬКИЙ**, провідний спеціаліст кафедри лабораторної  
діагностики біологічних систем  
E-mail: prilutskiy.maxim@gmail.com

Національний університет «Києво-Могилянська Академія», Київ, Україна

**М. Ф. СТАРОДУБ**, завідувач кафедри молекулярної біології, мікробіології  
та біобезпеки, доктор біологічних наук, професор  
E-mail: nfstarodub@gmail.com

**М. І. ФЕДЕЛЕШ-ГЛАДИНЕЦЬ**, кандидат сільськогосподарських наук,  
доцент кафедри молекулярної біології, мікробіології  
та біобезпеки

E-mail: fedelesh@nubip.edu.ua

Національний університет біоресурсів і природокористування,  
Київ, Україна

**Анотація.** Для діагностики онкологічних захворювань необхідною є розробка новітніх методів, спрямованих передусім на швидкість, точність, мобільність та низьку вартість. Як такі методи можуть виступати розробка і використання імунобіосенсорів для аналізу низькомолекулярних маркерів онкологічних захворювань. Такими маркерами можуть виступати поліаміни – низькомолекулярні речовини присутні у клітинах живих організмів і здатні впливати на широке коло клітинних функцій, однією з яких є проліферація. Підвищені рівні поліамінів нерідко можуть бути ознакою початку процесу малігнізації клітин, а отже можуть бути використані, як маркер для діагностики онкологічних захворювань. Імунобіосенсори ж, володіючи певними фізичними й біологічними властивостями, здатні специфічно взаємодіяти із відповідними антигенами і виявляти їх у розчині чи біологічних рідинах. У даній статті представлені результати досліджень з порівняння ефективності аналітичних можливостей імунобіосенсорів із різним типом перетворювача, а саме перетворювача, покритого частинками золота, та такого, який покритий наночастинками оксиду цинку. Визначено, що біосенсор вкритий частинками золота здатен краще виявляти наявність та концентрацію поліамінів як у розчині, так і в суспензії клітин раку молочної залози MCF-7, і саме він здатен виявляти спермін в концентраціях від 5 до 100 нг/мл і в концентрації клітин MCF-7 від 100 до 500 кл/мл.

**Ключові слова:** поліаміни, спермін, біосенсори, наночастинки, перетворювач

### **Актуальність.**

Рак є однією з провідних причин смерті в усьому світі. Смертність від раку може бути знижена, якщо його почнуть діагностувати та лікувати на ранніх стадіях. Отже, прогностичні біомаркери, зареєстровані в ході трансформації клітин, можуть слугувати потенційними діагностичними й терапевтичними засобами. Як такі прогностичні маркери дуже перспективно виглядають поліаміни. Найпоширенішим серед усіх видів раку є рак молочної залози, особливо він поширений у жінок старшого і похилого віку [1]. Це обумовлює актуальність розроблення нових і вдосконалення наявних методів діагностики цієї патології. Надзвичайна складність канцерогенезу і труднощі раннього виявлення захворювання ставлять завдання першорядної важливості – вибір оптимального варіанту діагностики.

### **Аналіз останніх досліджень та публікацій.**

Діагностика раку на ранній стадії розвитку є необхідною умовою ефективності лікування для контролю його прогресування і зниження рівня смертності. Біомаркери є корисними кандидатами для діагностики захворювання, моніторингу прогресування захворювання та наступного прогнозу у відповідь на терапевтичні втручання [3].

Протягом останнього десятиліття зростає інтерес до аналізу різних біологічних рідин для ідентифікації панелей біомаркерів раку. Деякі підходи, такі як аналізи на основі мас-спектрометрії, профілювання на основі гелю і дослідження масивів білків і антитіл, швидко розвиваються як прогресивні

платформи для виявлення біомаркерів і покращують наше розуміння біологічних процесів на функціональному рівні. Однак обмежений динамічний діапазон і низька чутливість є основними проблемами для більшості теперішніх підходів[4].

Більш того, точна діагностика складних захворювань, таких як рак, вимагає одночасного виявлення декількох біомаркерів, обумовлюючи необхідність високопродуктивної діагностичної платформи. Оптичні біосенсиори на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) є одними з найперспективніших чутливих елементів для вивчення молекулярних взаємодій, кінетики зв'язування в реальному часі та поверхневих характеристик молекул. ППР виникає, коли енергія з монохроматичного променя світла падає на межі розділу метал-діелектрик за певного кута відбиття і перетворюється в електромагнітну енергію, що призводить до генерації згасаючої хвилі [2].

Інтенсивність ППР залежить від багатьох факторів, включаючи властивості металевого шару, кут ППР, довжину хвилі падаючого світла, показник заломлення в площині метал-діелектрик тощо, для виявлення дуже низьких концентрацій вмісту біомаркерів у складних біологічних рідинах і потребує подальшого вивчення. [9]

Поліаміни необхідні для нормального росту і розвитку клітин в еукаріотів. У нормальних фізіологічних умовах концентрація внутрішньоклітинних поліамінів жорстко регулюється через динамічну мережу біосинтетичних і катаболічних ферментів і транспортну систему. Внутрішньоклітинна концентрація поліамінів підтримується в чітко визначених ме-

жах. У малігнізованих же клітинах, часто можна спостерігати порушення цих меж [5].

Підвищені рівні поліамінів можуть бути пов'язані з раком молочної залози, товстої кишки, легенів, передміхурової залози та шкіри, а також спостерігається зміна активності ферментів, що обмежують швидкість як біосинтезу, так і катаболізму поліамінів. Беручи до уваги зв'язок пухлин із високим рівнем поліамінів, вони є перспективною мішенню діагностики та лікування [9]. Оскільки поліаміни незамінні для росту клітин, підвищена доступність поліамінів підвищує ріст клітин [11].

Ракові клітини володіють підвищеною здатністю до синтезу поліамінів пов'язаних із продукцією протеїназ, таких як серинова протеїназа, матриксні металопротеїнази, катепсина та активатор плазміногену, які можуть розкласти навколишні тканини [6].

Хоча ракові тканини продукують фактори росту судин, їх нерегульований ріст індукує гіпоксію, яка, у свою чергу, посилює поглинання поліамінів раковими клітинами для подальшого збільшення міграції клітин і придушення експресії CD44 (Cluster differentiation 44, глікопротеїн, рецептор гіалуронової кислоти). Збільшення поглинання поліамінів імунними клітинами також призводить до зниження продукції цитокінів, необхідної для протипухлинної активності, і знижує експресію молекул адгезії, залучених до протипухлинного імунітету, таких як CD11a (Cluster differentiation 11a, інтегрин-альфа, мембранний білок) і CD56 (Cluster differentiation 56, мембранний білок). Імунні клітини в середовищі з підвищеними рівнями поліамінів втрачають протипухлинну

імунну функцію, таку як активність лімфокінів. Недавні дослідження показали, що підвищена доступність поліамінів підвищує здатність ракових клітин метастазувати в нові тканини, зменшуючи протипухлинну функцію імунних клітин [8].

Вміст поліамінів у крові здорових людей знаходиться на рівні 10,1 нмоль/мл (діапазон 8-12,5). Середнє значення для сперміну становить 4 нмоль/мл (діапазон 3-3 ммоль / мл) [7].

**Мета дослідження.** порівняти ефективність визначення поліамінів біосенсорами з різним типом перетворювачів у модельних розчинах та в культурі клітин в умовах *in vitro*.

### **Матеріали і методи дослідження.**

Для дослідження використовувалися високоспецифічні сироватки проти сперміну та спермідину (Abscam, Кембридж, Англія), розчини поліамінів сперміну (Abscam, Кембридж, Англія), а також клітинна лінія MCF-7, яка була отримана в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького. В якості аналітичного пристрою використовувався оптичний біосенсорний прилад «Plasmontest» на основі явища ППР, обладнане датчиком із роздільною здатністю 2048 пікселів і підключеним безпосередньо до комп'ютера для реєстрації і обробки прийнятого сигналу.

Для аналізу використовували пластинки з розчином ZnO, а також пластинки з нанесеним шаром золота (50 нм) на яку наносили розчин білку А в об'ємі 5 мкл і концентрації 20 мкг/мл. Після чого інкубували білок А отриманий із бактерії *Staphylococcus aureus* на поверхні пластинок про-

тягом 40 хв, після чого промивали їх 0,85 % розчином NaCl. Інкубацію проводили в скляній або пластиковій чашці Петрі, на дні якої розміщували фільтрувальний папір, змочений водою, на нього клали спочатку алюмінієву підкладку, а потім пластинку. Чашку Петрі поміщали у холодильну камеру за температури +4 °С. Після модифікації пластинки розчином білка А, на її поверхню наносили розчин специфічних антитіл і проводили інкубацію протягом 40 хв із подальшою промивкою 0,85 % розчином NaCl. Наступним етапом було нанесення на поверхню пластинки розчину БСА в об'ємі 5 мкл і концентрації 10 мкг/мл та інкубація протягом 20 хв із подальшою промивкою 0,85 % розчином NaCl.

Суспензію культури клітин раку молочної залози MCF-7 готували у концентраціях від 100 до 100000 кл/мл в 0,85 % NaCl. Розчин сперміну готували у концентраціях від 10 до 100 нг/мл в 0,85 % NaCl. Використання розчинів сперміну необхідне для перевірки порогу чутливості імунобіосенсора та визначення оптимальної концентрації поліамінів. Використання суспензії культури клітин MCF-7 є необхідним для визначення наявності та концентрації поліамінів у клітинах раку та порівняння зі стандартними концентраціями поліамінів у клітинах.

Далі пластинку промивали дистильованою водою і висушували за кімнатної температури. Інші операції виконували як зазначено вище.

Вимірювання проводили шляхом перенесення модифікованої скляної пластинки у камеру біосенсорного пристрою «Плазмонтест». В камеру поміщали речовини в об'ємі 20 мкл. Спочатку в камеру вносили 0,85% розчин NaCl для калібрування прила-

ду. Вимірювання здійснювали протягом 2-3 хв. Надалі почергово вносили концентрації досліджуваних речовин. Після закінчення вимірювань кожної окремої концентрації проводили промивку камери 0,85 % розчином NaCl. Отримані дані аналізували за кількістю одиниць люмінесценції або кута відбиття лазерного променя, які реєструвалися приладом, і передавалися на комп'ютер. Прилади реєструють кут відбиття лазерного променя в залежності від концентрації та молекулярної ваги речовин, кон'югованих на їх поверхні.

Аналіз даних виконано в програмі Excel 2016. Пораховано стандартну похибку. Також проведено однофакторний дисперсний аналіз ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

### **Результати дослідження та їх обговорення.**

У результаті проведених досліджень можна спостерігати що біосенсор, як на основі наночастинок ZnO так і золота здатний визначати як поліаміни сперміну у розчині в різних концентраціях, так і суспензії культури клітин лінії раку молочної залози людини MCF-7. Сенсорограми отриманих даних дозволяють спостерігати поступове збільшення концентрації сперміну як в розчині, так і в суспензії культури клітин. Можна спостерігати, що діапазон чутливості визначений біосенсором знаходиться в межах від 5 до 1000 нг/мл для сперміну і від 100 до 100 000 кл/мл для суспензії клітин MCF-7 (рис. 1, 2).

У результаті аналізу отриманих даних можна визначити, що концентрації сперміну від 5 до 100 нг/мл краще визначається біосенсором, де як перетворювач сигналу використо-

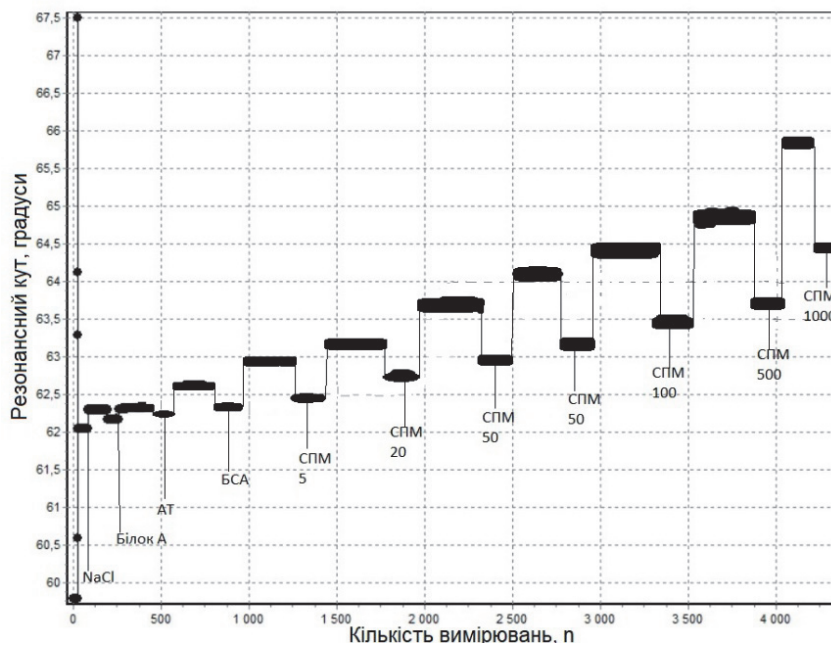


Рис. 1. Сенсорграма зсуву резонансного кута в залежності від концентрації сперміну

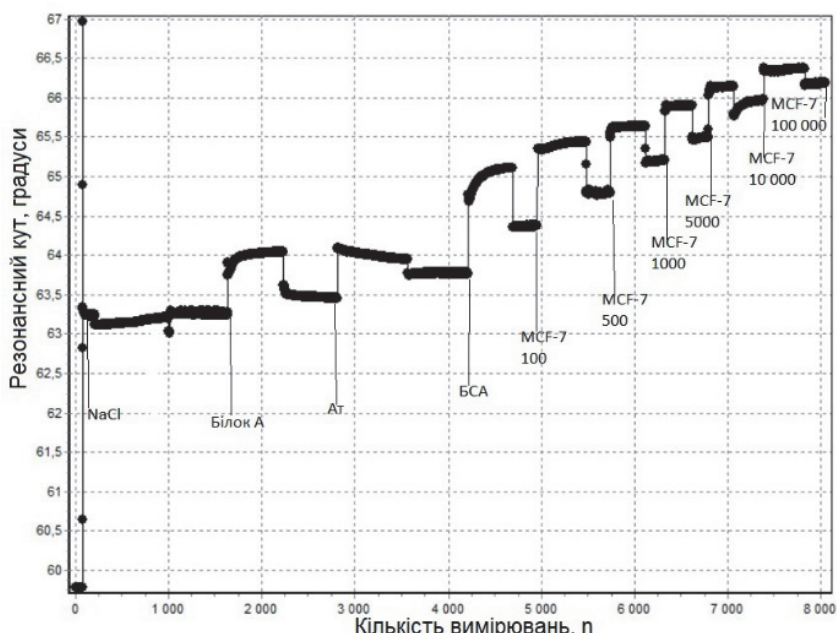
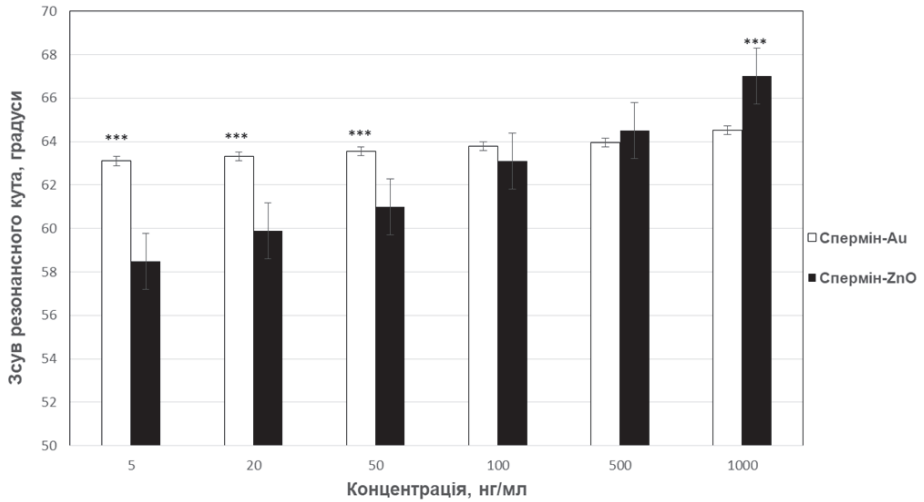
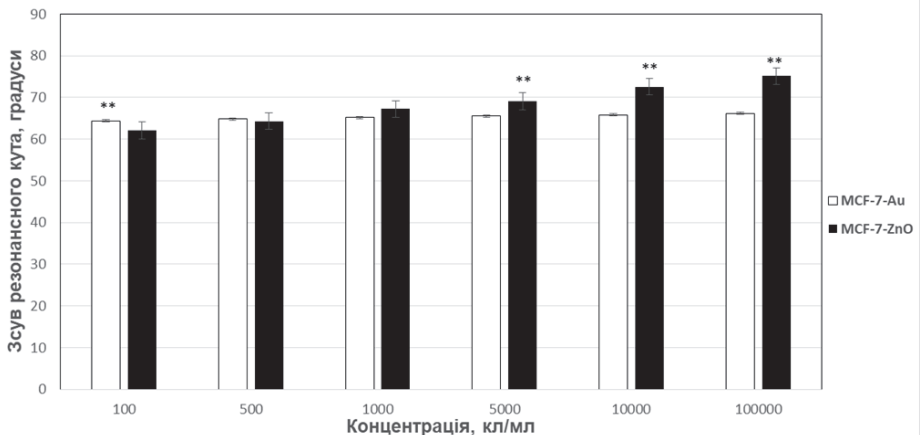


Рис. 2. Сенсорграма зсуву резонансного кута в залежності від концентрації клітин MCF-7



**Рис. 3.** Порівняння ефективності визначення поліамінів біосенсорами на основі золота та наночастинок ZnO для визначення концентрації сперміну в розчині. Різниця між групами достовірна (\*\*\*) – рівень значущості  $p < 0,001$ ,  $n = 6$ ).



**Рис. 4.** Порівняння ефективності визначення поліамінів біосенсорів на основі золота та наночастинок ZnO. Різниця між групами достовірна (\*\* – рівень значущості  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

ується пластинка із золотим напленням. Зсув резонансного кута знаходиться в діапазоні від  $63,11 \pm 0,043$  до  $63,56 \pm 0,049$  градусів, що відповідає концентраціям від 5 до 100 нг/мл і чіткіше від відгуку у разі використан-

ня пластинки з наночастинками ZnO у 1,04-1,10 разів. За концентрації від 500 до 1000 нг/мл можна спостерігати чіткіший відгук у біосенсора з пластинкою, обробленою наночастинками ZnO де відгук біосенсора знахо-

диться в межах від  $64,50 \pm 0,0055$  до  $67,10 \pm 0,0063$  і визначає наявність та концентрацію поліамінів у  $0,96\text{--}0,99$  раза чіткіше (рис. 3).

Під час аналізу ефективності визначення поліамінів у суспензії клітин MCF-7 дослідили, що біосенсор на основі частинок золота визначає наявність поліамінів краще в меншій кількості клітин в діапазоні від 100 до 500 кл/мл і знаходиться в діапазоні від  $64,38 \pm 0,050$  до  $64,82 \pm 0,057$  градусів, що більше у порівнянні з відгуком біосенсора на пластинці з наночастинками ZnO в 1,03–1,05 рази.

Надалі, за зростання кількості клітин спостерігали підвищення чіткості відгуку на пластинці з наночастинками ZnO в діапазоні концентрацій від 1000 до 100 000 кл/мл у 1,10–1,13 раза у порівнянні з біосенсором на пластинці, вкритій шаром золота. (рис. 4). Зсув резонансного кута знаходиться в межах від  $67,20 \pm 0,0069$  до  $75,14 \pm 0,0078$  градусів.

### **Висновки і перспективи.**

Проаналізувавши отримані результати можна сказати, що біосенсор на основі частинок золота показав кращі результати щодо здатності визначати наявність та концентрацію поліамінів у порівнянні з біосенсором на основі наночастинок ZnO як у розчині, так і в суспензії клітин раку молочної залози MCF-7. Тому рекомендованим є надалі застосування біосенсора з перетворювачем, вкритим частинками золота, оскільки саме він здатен виявляти спермін краще в концентраціях від 5 до 100 нг/мл і в концентрації клітин MCF-7 від 100 до 500 кл/мл.

**Подяки.** Прилад “Plasmontest” було люб’язно надано Інститутом кібернетики ім. Глушкова НАН Украї-

ни (Київ, Україна). Зразки сироватки крові були надані діагностичною лабораторією «Альфа-лабсервіс» (Харків, Україна).

### **References**

1. Casero, J. R., Murray, T. S., Pegg, A. E. (2018). Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 18(9), 681–695. doi:10.1038/s41568-018-0050-3
2. Casero R. A (2006). Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 6, 373–390. doi:10.1038/nrd2243.
3. Çelik, V. K. Kapançık S., Kaçan T., Kaçan S. B., Kılıçgün H (2017). Serum levels of polyamine synthesis enzymes increase in diabetic patients with breast cancer. *Endocrine Connections*. 6(8). 574–579. doi:10.1530/EC-17-0137.
4. Criss, W. E. A review of polyamines and cancer (2003). *Turkish Journal of Medical Sciences*. 33 (4), 195–205.
5. Gerner, E.W. Meyskens F. L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews. Cancer*. 4, 781–789. doi:10.1038/nrc1454.
6. Guerra, G. P., Rubin, M. A., Mello, C. F. (2016). Modulation of learning and memory by natural polyamines. *Pharmacological research*. 112, 99–118. doi:10.1016/j.phrs.2016.03.023.
7. Levêque, J. Foucher F., Bansard R. Havouis R., Grall J-Y., Moulinoux J-P (2000). Polyamine profiles in tumor, normal tissue of the homologous breast, blood, and urine of breast cancer sufferers. *Breast Cancer Research and Treatment*. 60 (2), 99–105. doi:10.1023/A:1006319818530.
8. Nowotarski, S. L. Woster P. M., Casero R. A. (2013) Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Reviews in Molecular Medi-*

- cine. 15 (3), 1–21. doi:10.1017/erm.2013.3.
9. Reddy, P. J., Sadhu, S., Ray, S., Srivastava S. (2012). Cancer Biomarker Detection by Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Clinics in Laboratory Medicine*. 32(1), 47–72. doi:10.1016/j.cll.2011.11.002.
10. Soda K. (2011) The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 30 (1), 95–100. doi:10.1186/1756-9966-30-95.
11. Thomas, T., Thomas, T. J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 7(2), 113–126. doi:10.1111/j.1582-4934.2003.tb00210.x
- 

**M. P. Prylutskyi, M. F Starodub, M. I. Fedelesh-Gladynets (2019). COMPARISON OF EFFICIENCY OF IMMUNOBIOSENSORS BASED ON GOLD AND ZNO NANOPARTICLES FOR ANALYSIS OF SPERMINE LEVELS IN INVITRO CELL CULTURE BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 10(3): 36–43.**

<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/13078>.

**Abstract.** Nowadays, for diagnostics of oncological diseases, it is necessary to develop the newest methods, aimed primarily at fast, accurate, mobile and low cost analysis. The extraordinary complexity of carcinogenesis and the difficulties of early detection of the disease pose a primary concern - the choice of an optimal diagnostic methods. Such methods may include the development and use of immunobiosensors for the analysis of low molecular weight markers of cancer. In a role of such markers could become polyamines which are low molecular weight substances presented in cells of living organisms and can affect a wide range of cellular functions, one of which is proliferation. Increased levels of polyamines can often be a sign of the beginning of the process of malignancy, and therefore can be used as a markers for the diagnostics of oncological diseases. Immunobiosensors possess certain physical and biological properties, and are capable to interact with the specific antigens and detect them in biological fluids. This article presents the results of studies pointed on the comparison of the effectiveness of analytical capabilities of immunobiosensors with different types of transducers, namely, a transducer covered with particles of gold, and that is covered with zinc oxide nanoparticles. The obtained data allow to observe a gradual increase in the concentration of polyamines, both in solution and in suspension of cells. It has been determined that the biosensor which was covered with gold particles detected the presence and concentration of polyamines, both in solution and in the suspension of MCF-7 breast cancer cells better comparing with zinc oxide transducer, and capable to detect spermine in concentrations ranging from 5 to 100 ng/ml and in the concentration of MCF-7 cells from 100 to 500 cells/ml.

**Keywords:** polyamines, spermine, biosensors, nanoparticles, transducer

---