

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПОЛІАМІНІВ СПЕРМІНУ, СПЕРМІДИНУ ТА ПУТРЕСЦИНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОБІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ППР У МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНАХ

У статті представлено результати досліджень з розробки імунобіосенсорної тест-системи для експресної детекції поліамінів у клітинах раку грудної залози. Наявність та концентрацію поліамінів визначали за допомогою аналітичного приладу – імунобіосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР), за принципом постановки імунної реакції «антиген-антитіло» в режимі реального часу. Для аналізу використовували різні алгоритми для оптимізації процесу аналізу та підвищення чутливості біосенсорної тест-системи. У процесі дослідження було визначено, що мінімальною концентрацією поліамінів сперміну, спермідину та путресцину в розчині, яка може бути визначена біосенсором, є 100 нг/мл. Лінійний діапазон концентрацій перебуває в межах 100–1000 нг/мл. Також було виявлено підвищену чутливість біосенсорної тест-системи до сперміну. Найефективнішим було визнано прямий алгоритм аналізу, за якого чутливість біосенсорної тест-системи була оптимальною.

Ключові слова: поліаміни, антитіло, антиген, поверхневий плазмовий резонанс, рак грудної залози, спермін, спермідин, путресцин, біосенсор.

Вступ

Найпоширенішим серед усіх видів раку є рак грудної залози, особливо він поширений у жінок старшого і похилого віку. 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 варіанта лікування. Рак грудної залози – системне захворювання, яке передовсім пов'язане з дисфункцією імунної системи людини [1]. Ріст пухлини переважно зумовлений системними порушеннями клітинного і гуморального імунітету з превалюванням таких процесів, як: активація клітин-супресорів, підвищення рівня інгібуючих процесів у крові, пригнічення ендокринної функції тимуса, посилення глюкокортикоїдної функції коркової речовини надниркових залоз [2]. Протягом 10 останніх років дослідники в галузі імунології та імунотерапії досягли значних успіхів у дослідженні раку грудної залози. Так, для діагностики різних видів раку широко використовують методи, які базуються на детекції біомаркерів – молекул, специфічних до певних типів клітин. На сьогодні такими методами є метод імуноферментного аналізу, де виявлення відбувається за

допомогою специфічних антитіл та ферментної мітки; полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в режимі реального часу для виявлення нуклеотидних послідовностей генів, які кодують той чи інший специфічний для цього захворювання білок [3]. Однак сьогодні вже є методики, значно простіші у використанні, дешевші та точніші за згадані вище. Наприклад, доволі перспективним вважається використання імуносенсорів, які можуть детектувати специфічні молекули в дуже низьких концентраціях, використовуючи специфічні антитіла до маркерів, характерних для певних видів раку. Розроблення методик із використанням імуносенсорів дасть змогу значно полегшити діагностику різних типів раку, особливо на ранніх стадіях захворювання. Для ранньої діагностики застосовують методи оцінки ефективності лікування злоякісних пухлин, виявлення метастазування, визначення речовин, рівень яких так чи інакше пов'язаний з наявністю у хворого онкологічного захворювання – так званих пухлинних маркерів [4].

Аналіз літературних даних

Досвід використання онкомаркерів у діагностиці показав, що впровадження їх у медичну практику значно підвищує ефективність роботи. Онкологічні маркери – продукти метаболізму

неопластичних клітин, які можуть бути досить специфічними для пухлини одного типу і з'являтися в разі наявності онкологічного захворювання. У здорових людей ці сполуки зазвичай відсутні або визначаються в незначних кількостях. Аномальна експресія генів, яка спостерігається в пухлинних клітинах, призводить до порушень таких основних процесів, як диференціація та проліферація. У таких клітинах також відбувається зміна метаболізму, яка супроводжується синтезом певних сполук. Від сполук, які продукуються нормальними клітинами, вони відрізняються якісно або кількісно [5]. Всі маркери поділяються на маркери, які продукуються і секретуються в біологічних рідинах організму виключно пухлинними клітинами (пухлиноасоційовані маркери), і маркери, продукція і секреція яких є результатом метаболічних порушень, викликаних онкологічним захворюванням [6]. Також вони можуть бути специфічними і неспецифічними. Рівень пухлинних маркерів залежить від багатьох факторів, зокрема від властивостей пухлини, проведеного лікування і біохімічних особливостей самого маркера. У хворих з неонкологічною патологією рівень маркерів зазвичай не перевищує нормальних значень. Але слід враховувати можливість неспецифічного підвищення їхнього рівня. Зокрема, він може підвищуватися при таких патологічних процесах, як запальні захворювання печінки, підшлункової залози, легень, а також в інших тканинах та органах. У сучасній онкологічній практиці дослідження пухлинних маркерів проводять для скринінгу онкологічної патології, оцінювання поширеності процесу (як допоміжний критерій), діагностики рецидивів і метастазів та оцінювання ефективності лікування [7].

Структура та властивості поліамінів

Поліаміни пов'язані з різними біологічними процесами [8]. Це активні біогенні аміни, які беруть участь у низці основних клітинних функцій, зокрема рості клітин, проліферації та диференціюванні, а також клітинних механізмів, які регулюють відповідь клітин на подразники. Путресцин, спермідин і спермін мають протизапальні та антиоксидантні властивості, а отже, можуть бути залучені до захисту клітин організму при старінні та захворюванні. Таким чином, показано, що поліаміни збільшують тривалість життя. З іншого боку, поліаміни при високих концентраціях також можуть бути токсичними для клітин та можуть сприяти загибелі клітин, головним чином за допомогою окислювальних механізмів. У зв'язку

з цим поліаміни є важливими клінічними і біохімічними маркерами для злоякісних новоутворень. Уперше це було показано в сечі хворих на рак, де поліаміни присутні на більш високому рівні, ніж у здорових пацієнтів [9].

За отриманими даними, рівень основних біогенних поліамінів у здорових людей перебуває на рівні наномолярних концентрацій (у середньому 4–5 нМ). Так, концентрація сперміну в крові здорових чоловіків становить $5,40 \pm 1,23$ нМ/мл, а в жінок – $7,07 \pm 1,03$ нМ/мл, спермідину – $7,54 \pm 1,32$ нМ/мл у чоловіків та $9,95 \pm 1,11$ нМ/мл у жінок, а путресцину $6,02 \pm 1,15$ нМ/мл у чоловіків та $8,32 \pm 1,20$ нМ/мл у жінок. За останніми даними, концентрацію поліамінів також визначали в слині [10]. Так, у здорових людей рівень сперміну, спермідину та путресцину в слині становить 0,5 нМ/мл і також може використовуватися як діагностичний показник [11].

Поліаміни як пухлинні маркери

Більшість видів раку грудної залози легко діагностувати за допомогою мікроскопічного аналізу біопсії. У той час як методи скринінгу є корисними для ранньої діагностики раку, подальше тестування є необхідним для визначення стану захворювання. Нині застосовується цілий ряд скринінгових тестів, зокрема клінічних, а також мамографії. Проте жінки здебільшого не бажають проходити ці види тестування через сором'язливість, витрати часу і високу вартість. Отже, пошук нового простого, зручного та дешевого способу скринінгу є вкрай потрібним. Існує багато різних пухлинних маркерів, які вказують на конкретний процес захворювання. Саме вони використовуються в онкології, щоб допомогти визначити наявність раку. Концентрація пухлинних маркерів, як-от раковий ембріональний антиген (PEA) та раковий антиген CA15-3, значно зросла в пацієнтів з раком грудної залози. Однак підвищений рівень пухлинних маркерів також може бути викликаний іншими чинниками. Ці маркери можуть бути макромолекулярними сполуками, як-от ферменти та глікопротеїни. Поліаміни натомість є низькомолекулярними сполуками, які можуть бути пов'язані з підвищенням проліферативної активності клітин пухлини, про що свідчить підвищення біосинтезу і накопичення поліамінів. Таким чином, концентрація поліамінів, як-от спермін і спермідин чи путресцин, збільшується в плазмі крові та сечі [12]. Тому поліаміни можуть бути важливими біохімічними ознаками пухлини.

Імуноаналіз поліамінів

Існують такі методи імуноаналізу, які використовуються для визначення поліамінів: радіоімунний аналіз (РІА) та імуноферментний аналіз (ІФА) [13]. Обидва методи забезпечують високу чутливість, потребують малих зразків тканин і дають змогу аналізувати кілька зразків одночасно. Крім того, немає потреби дериватизації зразків. Проте основною проблемою є специфічність антитіл, а також небезпека застосування радіоактивних речовин при використанні РІА. Перші зусилля, спрямовані на вироблення антитіл до сперміну, призвели до синтезу антитіл, які мають низьку специфічність до сперміну і мали високу швидкість перехресної реакції зі спермідином [14]. При використанні ІФА, в якому були використані антитіла проти сперміну і спермідину, було отримано дані, що свідчили про низьку специфічність антитіл та малу ефективність цієї методики [15]. Недоліками обох методів є довготривалість проведення аналізу та неможливість його виконання в польових умовах.

Матеріали і методи

Матеріалами для дослідження були високоспецифічні сироватки (ab 7318 та ab 26975), отримані шляхом імунізації кролів (надала компанія Abscam (Кембридж, Англія)), проти поліамінів сперміну та спермідину (Sigma-Aldrich, США), а також сироватка (ABIN5014236), отримана аналогічним до попередніх сироваток шляхом (компанія antibodies-online, США), проти путресцину (Sigma-Aldrich, США). Поліаміни надав Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького. Як аналітичний прилад було використано біосенсор «Плазмонтест», який є оптичним пристроєм, який працює на основі явища ППР, оснащений датчиком із роздільною здатністю 2048 пікселів, який підключається безпосередньо до комп'ютера і реєструє та обробляє прийнятий оптичний сигнал. Пристрій розроблено в Інституті кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України.

Процедура іммобілізації

За допомогою імунобіосенсора реєстрували взаємодію антиген-антитіло в режимі реального часу. Особливістю імуносенсора «Плазмонтест» є те, що чутливий шар формується на скляній пластинці, поверхня якої покрита 1–2 нм адгезивним шаром ніобію та 50 нм плівкою золота, що забезпечує виникнення ППР. При падінні

плоскополяризованого лазерного променя на поверхню шару золота, при визначеному (критичному) куті, виникає явище ППР, яке з'являється при виникненні осциляції щільності зарядів на межі між двома середовищами з металом та діелектриком. Частина енергії променя витрачається на осциляцію, і тому інтенсивність віддзеркаленого променя, при визначеному (критичному) куті, зменшується, а кут віддзеркалення є сталою характеристикою конкретного стану трансдюсера. При іммобілізації антитіл на поверхню золота критичний кут, при якому виникає ППР, змінюється і величина зсуву кута перебуває в прямій залежності від концентрації реагенту, який визначається. Зазвичай чутливість визначення ряду біологічних аналітів перебуває на рівні 5 нг/мл. При перевищенні критичного кута плоско-поляризованого променя світла, за найвищого значення коефіцієнта заломлення, відбувається повне внутрішнє віддзеркалення. За цих умов, у поверхневих плазмонних поляритонах, спостерігають обумовлений перекачуванням енергії випромінювання, резонансний мінімум залежності інтенсивності відбиття випромінювання від кута падіння лазерного променя на плівку золота. Взаємодія специфічних антитіл із відповідними імуногенами (в нашому випадку поліамінами) реєструється за зміною кута відбиття, за типом зазначеної вище залежності, що обумовлює можливість моніторингу процесу зв'язування антигену з антитілом і, в решті-решт, обумовлює високу чутливість при визначенні рівня антигена, а отже, і можливість ранньої та статистично достовірної діагностики концентрації поліамінів у клітині. Згідно з останніми літературними даними, іммобілізація антитіл на чисту поверхню золота не є достатньо ефективною для розпізнавання антигенів, оскільки специфічні сайти зв'язування можуть блокуватися внаслідок того, що антитіла хаотично зв'язуються з поверхнею трансдюсера. Таким чином, рекомендується попередня модифікація поверхні перетворювача за допомогою різних речовин, які забезпечують сайт-специфічне зв'язування антитіл. У таких випадках активність антитіл може збільшуватися до 70 % [16; 17].

Процедура аналізу з використанням біосенсора на основі ППР

Отже, підготовку робочої поверхні біосенсора було виконано таким чином. Спочатку ми покривали золоту поверхню трансдюсера поліелектролітною гідрофобною плівкою з поліаліламінігідрохлориду (ПАГ) в концентрації 1 мг/мл, потім іммобілізували на поверхні трансдюсера білок А,

отриманий з *Staphylococcus aureus* у концентрації 1 мг/мл. Після нанесення білка А на поверхню трансдюсера адсорбували поліклональні антитіла, специфічні до сперміну, спермідину і путресцину, потім наносили бичачий сироватковий альбумін (БСА) для блокування можливих вільних ділянок на золотій поверхні в концентрації 1 мг/мл. Нанесення БСА майже не змінило величину резонансного кута, що може свідчити про відсутність на робочій поверхні імуносенсора вільних місць для зв'язування, а концентрація антитіл була достатньою для створення максимально щільного шару. Наступним етапом експерименту було нанесення розчинів різних концентрацій поліамінів сперміну, спермідину та путресцину. З основного розчину ми підготували робочі розчини різної концентрації поліамінів – від 5 до 1000 нг/мл. Час експозиції кожного зразка був у межах від 5 до 10 хв за температури 25 °С. Після нанесення кожного зі зразків поліамінів спостерігали зміну резонансного кута. На кожному етапі промивали комірки фізіологічним розчином. Після цього було створено та проаналізовано калібрувальні криві.

Визначення оптимального алгоритму аналізу

Оскільки аналізовані поліаміни імунологічно є гаптенами, серед різних алгоритмів аналізу використовувались три. Перший – «прямий», коли іммобілізоване специфічне антитіло безпосередньо взаємодіє з антигеном (рис. 1). У цьому методі іммобілізували специфічні антитіла безпосередньо на поверхні трансдюсера лише за рахунок фізичної сорбції та модифікації поверхні за допомогою ПАГ, білка А та БСА, після чого почали вимірювати резонансний кут для визначення оптимальної концентрації поліамінів.

Другий – «до насичення», за якого попередньо іммобілізовані специфічні антитіла до сперміну, спермідину та путресцину кон'югували з вільними поліамінами, а потім із поліамінами, кон'югованими з БСА. Останню процедуру виконано за допомогою глутаральдегіду (рис. 2).

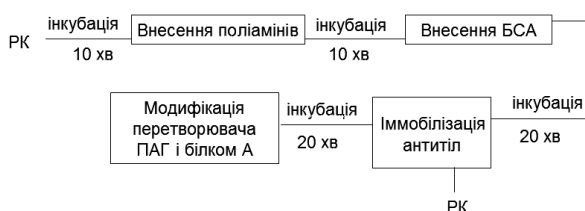


Рис. 1. Прямий алгоритм аналізу поліамінів:
РК – резонансний кут, ПАГ – поліаліламінігдрохлорид,
БСА – бичачий сироватковий альбумін

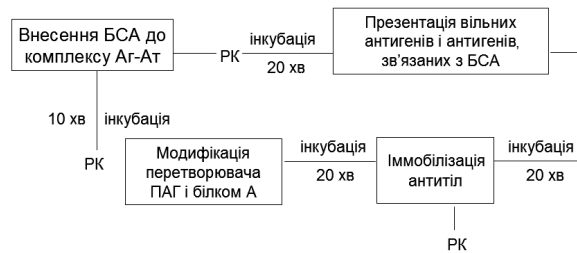


Рис. 2. Алгоритм аналізу поліамінів «до насичення»:
РК – резонансний кут, ПАГ – поліаліламінігдрохлорид,
БСА – бичачий сироватковий альбумін

Третій алгоритм аналізу – конкурентний. Використовуючи конкурентний алгоритм аналізу, було кон'юговано досліджувані поліаміни з БСА (за допомогою глутаральдегіду), іммобілізованого на поверхні трансдюсера. Потім було додано суміш вільних поліамінів і антитіл до такого специфічного шару (рис. 3).

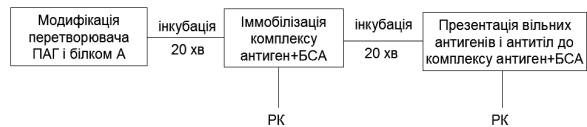


Рис. 3. Прямий алгоритм аналізу поліамінів:
РК – резонансний кут, ПАГ – поліаліламінігдрохлорид,
БСА – бичачий сироватковий альбумін

Результати та обговорення

Спочатку ми визначали чутливість біосенсора за допомогою ряду концентрацій розчинів поліамінів від 5 до 1000 нг/мл. Також ми використовували різні алгоритми аналізу для оптимізації процедури аналізу. Згідно з отриманими даними, можна стверджувати, що діапазон чутливості для нашого біосенсора для сперміну, спермідину та путресцину становить від 100 нг/мл до 1000 нг/мл, а мінімальна концентрація, за якої ми бачимо чіткий відгук біосенсора, становить близько 100 нг/мл (див. табл.).

Найбільший зсув резонансного кута ми могли спостерігати при прямому та конкурентному алгоритмі аналізу, тому що зсув резонансного кута за мінімальної концентрації в 100 нг/мл, за якої ми можемо виявити чіткий сигнал зміни резонансного кута, становить 0,090° у сперміну, 0,055° у спермідину та 0,030° у путресцину. При конкурентному алгоритмі аналізу хоча відхилення резонансного кута є меншим, ніж при прямому алгоритмі аналізу, відхилення є більшим, ніж при алгоритмі «до насичення», і при концентрації 100 нг/мл становить 0,080° у сперміну, 0,045° у спермідину та 0,040° у путресцину. Також, згідно з отриманими даними, можна спостерігати, що

Таблиця. Визначення оптимальної концентрації поліамінів сперміну, спермідину та путресцину завдяки аналізу відхилення резонансного кута

Концентрація, нг/мл	спермін	спермідин	путресцин	спермін	спермідин	путресцин	спермін	спермідин	путресцин
	прямий			до насичення			конкурентний		
зміни резонансного кута, град. °									
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
10	0,015	0,012	0,010	0,007	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
25	0,030	0,024	0,015	0,015	0,015	0,015	0,025	0,020	0,020
50	0,045	0,040	0,020	0,025	0,025	0,020	0,050	0,030	0,030
100	0,090	0,055	0,030	0,050	0,035	0,030	0,080	0,045	0,040
150	0,175	0,075	0,050	0,075	0,045	0,040	0,140	0,060	0,060
200	0,260	0,095	0,070	0,100	0,060	0,060	0,200	0,080	0,080
250	0,350	0,120	0,090	0,125	0,075	0,080	0,260	0,100	0,100
500	0,450	0,150	0,110	0,160	0,090	0,100	0,320	0,130	0,120
1000	0,550	0,190	0,130	0,200	0,120	0,110	0,380	0,160	0,140

відхилення резонансного кута при аналізі сперміну є найбільшим у порівнянні з іншими поліамінами, що може бути пов'язане з високою спорідненістю антитіл до цих поліамінів. Крім того, можна виявити, що в діапазоні концентрацій від 100 до 1000 нг/мл найбільшу ефективність демонструє прямий алгоритм аналізу, оскільки відхилення резонансного кута при аналізі всіх поліамінів є найбільшим у порівнянні з іншими алгоритмами аналізу (рис. 4, рис. 5, рис. 6). Отже, можна сказати,

що розроблена біосенсорна тест-система може детектувати як наявність поліамінів, так і кількість поліамінів у розчині, що може бути використано в подальших дослідженнях для розроблення повноцінної методики для діагностики раку грудної залози на ранній стадії захворювання. Також цей метод аналізу може бути досить швидким, якщо зробити попередню модифікацію поверхні перетворювача перед початком аналізу. У цих умовах уся процедура аналізу може бути виконана за 20 хвилин.

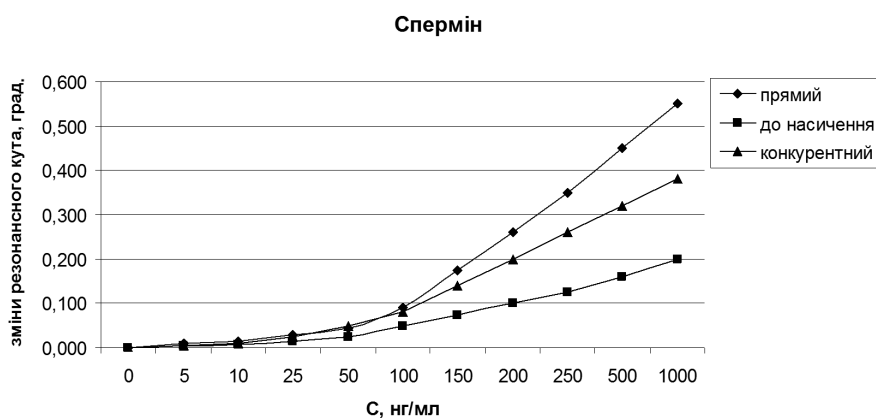


Рис. 4. Визначення оптимальної концентрації сперміну

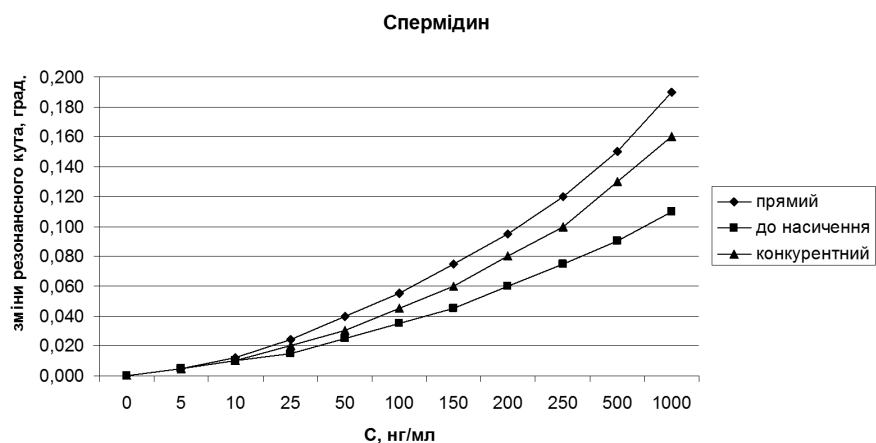


Рис. 5. Визначення оптимальної концентрації спермідину

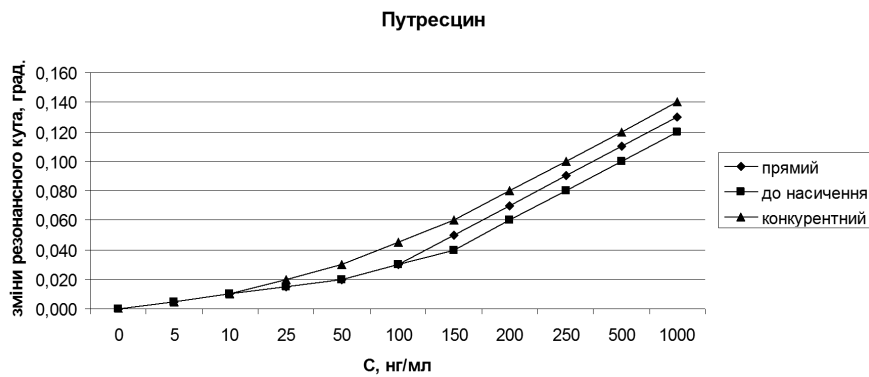


Рис. 6. Визначення оптимальної концентрації путресцину

Висновки

Згідно з отриманими результатами, ми зробили такі висновки. Серед усіх використаних алгоритмів аналізу найвищу ефективність показав прямий алгоритм аналізу, за якого специфічні антитіла та поліаміни іммобілізували безпосередньо на поверхні перетворювача без додаткової модифікації поліамінів (зсув резонансного кута при концентрації в 1000 нг/мл у сперміну становить 0,550°, у спермідину – 0,190°, а в путресцину – 0,130°). У разі використання алгоритму аналізу «до насичення» було отримано значно менші значення зсуву резонансного кута (зсув резонансного кута при концентрації в 1000 нг/мл у сперміну становить 0,200°, у спермідину – 0,120°, а в путресцину – 0,110°). Застосування конкурентного алгоритму аналізу з одночасним включенням проміжного шару з ПАГ сприяло подальшому підвищенню рівня детермінації поліамінів, оскільки при його застосуванні було отримано кращі результати, ніж при використанні алгоритму аналізу «до насичення», але гірші за прямий алгоритм аналізу (зсув резонансного кута при концентрації в 1000 нг/мл у сперміну становить 0,380°, у спермідину – 0,160°, а в путресцину – 0,140°).

Лінійний діапазон чутливості визначення поліамінів перебуває в межах 100–1000 нг/мл. Порівняння чутливості імунобіосенсорного аналізу поліамінів з даними методу ІФА в літературі дає змогу зробити висновок, що розроблений новий підхід міг би забезпечити контроль поліамінів відповідно до практичних вимог у діагностиці за відповідної чутливості. Оскільки загальний час біосенсорного аналізу становить приблизно 30–40 хв, його можна скоротити до 10–20 хв, якщо поверхню трансдюсера буде попередньо модифіковано ПАГ та білком А. Означені переваги роблять цей метод аналізу значно дешевшим і ефективнішим, ніж ІФА. Наступні наші дослідження будуть спрямовані на вирішення таких питань: 1) виявлення специфічності та чутливості біосенсора на основі ППР до поліамінів у таких біологічних рідинах, як сироватка крові та сеча; 2) пошук оптимальних способів екстракції поліамінів із деяких типів тканин для кількісного визначення цих аналітів за допомогою імунобіосенсора; 3) порівняння ефективності визначення зазначених вище поліамінів (у таких тканинах і рідинах організму, як сироватка крові, сеча та тканини пухлини) з традиційними підходами, що застосовуються на практиці.

Список літератури

- Грибач С. М. Клініко-біологічні особливості перебігу раку молочної залози у хворих похилого віку / С. М. Грибач, Н. В. Бородай, В. Ф. Чехун // Онкологія. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 260–265.
- Маєвський О. Є. Рак молочної залози. Сучасні методи діагностики з використанням онкомаркерів, специфічна імунотерапія / О. Є. Маєвський // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2014. – Т. 18, № 2. – С. 635–640.
- Осинський С. П. Метаболічне мікрооточення пухлинних клітин / С. П. Осинський // Онкологія : вибрані лекції для студентів і лікарів / за ред. В. Ф. Чехуна. – Київ : Здоров'я України, 2010. – С. 197–218.
- Сергеева Н. С. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии / Н. С. Сергеева, Н. В. Маршутина // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 147–154.
- Білінський Б. Т. Еволюція клінічних підходів до проблеми раку грудної залози на фоні прогресу онкологічної науки / Б. Т. Білінський // Онкологія. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 282–285.
- Щербіна О. В. Пухлинні маркери: роль у клінічній практиці / О. В. Щербіна // Онкологія. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 269–273.
- Яценко Л. Д. Роль биомаркеров в патогенезе злокачественных образований / Л. Д. Яценко // Мир медицины и биологии. – 2014. – Т. 10, № 1 (43). – С. 192–195.
- Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools / A. Gugliucci // Clinica chimica acta. – 2004. – Vol. 344, no. 1. – P. 23–35.
- Minois N. Polyamines in aging and disease / N. Minois, D. Carmona-Gutierrez, F. Madeo // Aging (Albany NY). – 2011. – Vol. 3, no. 8. – P. 716.
- Takayama T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography

- with tandem mass spectrometry / T. Takayama, H. Tsutsui, I. Shimizu [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2016. – Vol. 452. – P. 18–26.
11. Воронихина Л. Д. Содержание полиаминов в крови здоровых людей / Л. Д. Воронихина, В. Т. Демьянова, С. А. Ситников // *Вопросы медицинской химии*. – 1986. – Т. 32, № 2. – С. 43–45.
 12. Lee S. H. Estrogens and polyamines in breast cancer: their profiles and values in disease staging / S. H. Lee, S. O. Kim, H. Lee, B. C. Chung // *Cancer letters*. – 1998. – Vol. 133, no. 1. – P. 47–56.
 13. Hiramatsu K. Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system that can replace HPLC analysis for the determination of N1, N12-diacetylspermine in human urine / K. Hiramatsu, H. Miura, S. Kamei [et al.] // *The Journal of Biochemistry*. – 1998. – Vol. 124, no. 1. – P. 231–236.
 14. Bartos D. Direct determination of polyamines in human serum by radioimmunoassay / D. Bartos, R. A. Campbell, F. Bartos, D. P. Grettie // *Cancer research*. – 1975. – Vol. 35, no. 8. – P. 2056–2060.
 15. Fujiwara K. Preparation of polyamine antibody and its use in enzyme immunoassay of spermine and spermidine with β -D-galactosidase as a label / K. Fujiwara, H. Asada, T. Kitagawa [et al.] // *Journal of immunological methods*. – 1983. – Vol. 61, no. 2. – P. 217–226.
 16. Qi C. Label-free Biosensors for Health Applications / C. Qi, G. Gao, G. Jin // *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity* / ed. by Pier Andrea Serra. – InTech, 2011. – P. 165–169.
 17. Starodub N. F. Efficiency of biosensors in environmental monitoring / N. F. Starodub // *Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants*. – Boca Raton, London, New York : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2013. – P. 515–560.

M. Prylutskyi, M. Starodub

EVALUATION OF THE CONCENTRATION OF POLYAMINES OF SPERMINE, SPERMIDINE, AND PUTRESCINE WITH SPR IMMUNE BIOSENSOR

The article presents the results of research on the development of the immune biosensor test system for the express detection of polyamines in the breast cancer cells. The presence and concentration of polyamines were determined analytically, with an immunobiosensor based on the surface plasmon resonance (SPR), using “antigen-antibody” reaction in real time. Various algorithms of analysis were used to optimize the analysis process and increase the sensitivity of the biosensor test system. The study determined that the minimum concentration of spermine, spermidine, and putrescine in a solution that can be determined by a biosensor is 100 ng per ml. The linear range of concentrations is within 100–1000 ng per ml. A higher level of sensitivity of the biosensor test system to spermine was also detected. The most effective algorithm for analysis proved to be a straightforward algorithm for which the sensitivity of the biosensor test system was optimal in the polyamines analysis.

Keywords: polyamines, antibody, antigen, surface plasmon resonance, breast cancer, spermine, spermidine, putrescine, biosensor.

Матеріал надійшов 14.09.2017