

# Badania stabilności w czasie i pod wpływem pola elektromagnetycznego roztworów komponentu sieciującego warstw receptorowych biosensorów

Aleksandra Kłós-Witkowska, Vasyl Martsenyuk

Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Informatyki i Automatyki, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała, Polska

Andriy Sverstiuk

Ternopil State Medical University, Ternopil 46001, Ukraina

**Streszczenie:** W prezentowanej pracy zostały przedstawione wyniki badań stabilności w czasie i pod wpływem czynnika (promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali  $\lambda = 660$  nm) komponentu sieciującego warstw receptorowych biosensorów. Wykazano przyspieszone zmiany konformacyjne (przyspieszoną denaturację) pod wpływem czynnika zewnętrznego. Zauważono, że w badanym czasie (12 dni) największe zmiany stabilności następują między czwartym a ósmym dniem.

**Słowa kluczowe:** stabilność, biosensor, warstwa receptorowa

## 1. Wprowadzenie

Wśród parametrów wpływających na pracę biosensorów należy uwzględnić ich stabilność. Problem ten jest ważny, ponieważ stabilność parametrów biosensora przekłada się na możliwy okres jego użytkowania.

Według definicji przyjętej przez IUPAC (ang. *International Union of Pure Applied Chemistry*), biosensor jest samowystarczającym, zintegrowanym urządzeniem, które dostarcza specyficznych ilościowych lub półilościowych informacji analitycznych za pomocą składników umieszczonych w bezpośrednim kontakcie z elementem przetwarzającym [1]. W wyniku wzrostu zainteresowania firm medycznych biosensorami na rynek został wprowadzony biosensor do pomiaru glukozy we krwi firmy MediSense ExacTech, w późniejszym okresie immunosensor firmy Pharmacia BIACore, a następnie firma i-Stat rozpoczęła produkcję miniaturowanych biosensorów służących do pomiaru parametrów krwi. Następnie na rynek wprowadzono biosensor Glucocard. Pojawiły się również próby wszczepienia biosensora do organizmu żywego [2].

Stabilność w aspekcie biosensorów jest tematem często podejmowanym przez grupy badawcze. Problem ten jest aktualny i niewątpliwie taki pozostanie też w przyszłości. W bazie Web of Science po wpisaniu słów kluczowych „biosensor stability” uka-

zały się w 2018 r. tylko 749 artykuły. Świadczy to, że temat wciąż wpisuje się w trendy naukowe.

W matrycy biosensora aktywny materiał biologiczny jest unieruchamiany [3]. Powszechnie stosuje się kilka metod immobilizacji. Wśród nich wymienić można pułapkowanie, wytwarzanie wiązań kowalencyjnych, absorpcję, kapsułkowanie, aż w końcu sieciowanie [4].

Przeprowadzone badania dotyczyły komponentu sieciującego warstwy receptorowej biosensorów. Komponentem tym jest albumina surowicy bydlęcej BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*). Wśród badanych metod immobilizacji metoda sieciowania albuminą surowicy bydlęcej przewyższa inne metody pod względem czułości, granicy wykrywalności, czasu reakcji oraz stabilności operacyjnej i termicznej [5]. Użyty w badaniach komponent sieciujący warstwy receptorowej biosensorów jest powszechnie stosowany przy projektowaniu nowych testów immunochemicznych [6]. Określa również standard białek na szklanych podłożach pokrytych środkiem powierzchniowo czynnym, zatopionych w elektrodach indowo-cynowo-tlenkowych (ITO) [7].

Ze względu na to, że badana substancja jest powszechnie wykorzystywana w farmakokinetyce i farmakodynamice nowych leków [8], jej zmiany konformacyjne pod wpływem czynników zewnętrznych były już przedmiotem badań [9], aczkolwiek badania zmian konformacyjnych wywołanych wpływem promieniowania elektromagnetycznego o długości fali  $\lambda = 660$  nm i czasie ekspozycji 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min i monitorowanie zmian konformacyjnych wywołanych czynnikiem zewnętrznym w ciągu 12 kolejnych dni są nowe. Celem przeprowadzonych doświadczeń było zbadanie stabilności BSA (Bovine Serum Albumin) pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego o długości fali  $\lambda = 660$  nm oraz monitorowanie zmian zachodzących w napromienianej proteinie w funkcji czasu. Wyniki badań mogą być wykorzystane podczas konstrukcji biosensorów.

### Autor korespondujący:

Aleksandra Kłós-Witkowska, awitkowska@ath.bielsko.pl

### Artykuł recenzowany

nadesłany 23.10.2019 r., przyjęty do druku 20.12.2019 r.



Zezwala się na korzystanie z artykułu na warunkach licencji Creative Commons Uznanie autorstwa 3.0

## 2. Materiał i metoda badawcza

Badaniom poddano wodne roztwory BSA o stężeniu 2 mg/ml. Materiał badawczy w postaci ciała stałego – skryształizowany i liofilizowany proszek (czystość 99%, lot: SLBK3063V) firmy Sigma Aldrich. Wybór stężenia BSA 2 mg/ml był konsekwencją już wcześniej prowadzonych badań [10, 11].

Eksperyment wykonano w trzech niezależnych seriach pomiarowych. Roztwory poddawano ekspozycji na pole elektromagnetyczne o długości fali  $\lambda = 660$  nm w czasie ekspozycji: 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min. Następnie za pomocą dwuwiązkowego spektrofotometru UV/Vis (Halo DB-20 R) firmy Dynamica badano widma absorpcyjne wodnych roztworów BSA w zakresie 220–350 nm. Zakres widma został dobrany w taki sposób, aby było możliwe śledzenie zmian w piku absorpcyjnym 277 nm, pochodzącym od występujących w badanej proteinie rezyduów aromatycznych, takich jak: tryptofan (Trp), tyrozyna (Tyr) oraz Fenylalanina (Phe) [12]. Badania były przeprowadzone dla wodnych roztworów BSA, ponieważ to one umożliwiają lepsze zrozumienie fizyko-chemicznych właściwości badanej substancji [13].

Przy użyciu specjalnie skonstruowanego stanowiska pomiarowego zawierającego: źródło pola elektromagnetycznego, analizator widma z sondą pola bliskiego oraz skaner model RSE321 wyposażony w robota z możliwością wykonywania ruchów w płaszczyźnie XYZ oraz komputer, otrzymano rozkład dystrybucji pola elektromagnetycznego, będącego źródłem promieniowania.

Ekspozycji roztworów BSA na pole elektromagnetyczne dokonywano w dniu eksperymentu oznaczonym jako (0). Następnie kolejno w 12 dniach dokonywano pomiaru absorpcji próbek promieniowanych (w różnym czasie) oraz próbki kontrolnej – bez promieniowania. Innymi słowy w dniu pierwszym wykonano widma UV/Vis dla:

- próbki kontrolnej,
- próbki ekspozowanej na promieniowanie 10 min,
- próbki ekspozowanej na promieniowanie 20 min,
- próbki ekspozowanej na promieniowanie 30 min,
- próbki ekspozowanej na promieniowanie 40 min,
- próbki ekspozowanej na promieniowanie 50 min,
- próbki ekspozowanej na promieniowanie 60 min.

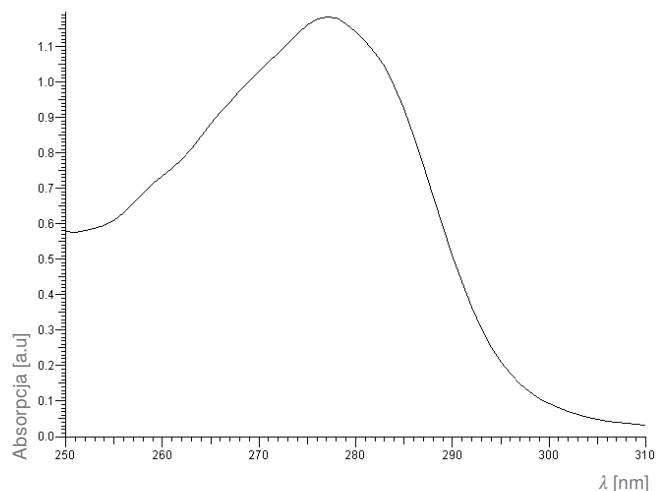
Podobną procedurę badawczą przeprowadzono w kolejnych dniach – aż do dwunastego dnia.

## 3. Rezultaty i dyskusja

Na rysunku 1 przedstawiono rozkład pola elektromagnetycznego, którym został napromieniowany komponent warstwy receptorowej biosensorów. Dystrybucja pola została przedstawiona za pomocą kolorów: żółtego, czerwonego, fioletowego. Każdy z nich obrazuje amplitudę sygnału. Kolorowi żółtemu odpowiada sygnał o amplitudzie (39,79–39,61 dBuV), czerwonemu (39,62–38,80 dBuV), fioletowemu (38,81–38,71 dBuV). Widać, że dystrybucja jest niemalże na całej badanej płaszczyźnie równomierna, aczkolwiek jak pokazuje scan można dostrzec nieznaczne (1 dBuV) różnice w amplitudzie aplikowanego sygnału (zabarwione na kolor fioletowy). Niemniej jednak tak mała różnica w amplitudzie nie wpływa znacząco na efekty spowodowane napromienianiem badanego komponentu warstwy receptorowej biosensorów.

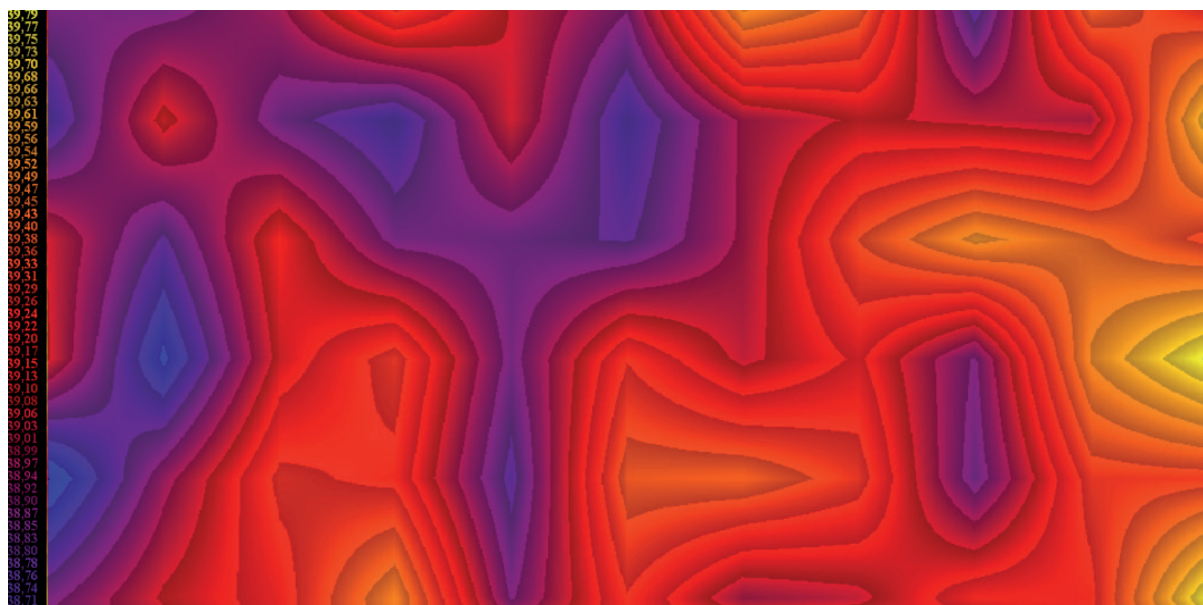
Pojawiająca się różnica amplitudy może być spowodowana efektami odbiciowymi pola elektromagnetycznego. Fala elektromagnetyczna może być przez ośrodek materialny przepuszczana, odbita, ugięta lub pochłonięta [12], co tłumaczy powstały efekt.

Na rysunku 2 przedstawiono przykładowe widmo w zakresie (250–310 nm) uzyskane za pomocą spektroskopii UV/Vis bada-



Rys. 2. Przykładowe widmo UV/Vis wodnych roztworów BSA (2 mg/mL) [10]

Fig. 2. Example spectrum of UV/Vis aqueous solutions BSA (2 mg/mL)



Rys. 1. Scan pola elektromagnetycznego ( $\lambda = 660$  nm), którym został napromieniowany komponent warstwy receptorowej

Fig. 1. Scan of electromagnetic field ( $\lambda = 660$  nm), which has been used to irradiate the receptor layer component

nego komponentu warstw receptorowych biosensorów. Na osi x znajduje się długość fali, na osi y umieszczona jest absorpcja. Obserwowany pik absorpcyjny pojawiający się w 277 nm pochodzi od występujących w badanym komponencie, aminokwasów aromatycznych takich jak tyrozyna (Tyr), fenyloalanina (Phe) i tryptofan (Thr). Śledzone zmiany konformacyjne są monitorowane na podstawie zmian wartości absorpcji.

Na rysunku 3 przedstawiono przykładowe względne zmiany absorpcyjne w czasie 12 dni dla próbki referencyjnej oraz dla próbek poddanych ekspozycji na promieniowanie:

An – pomiar absorpcji w n-tym dniu,

A1 – pomiar absorpcji w pierwszym dniu trwania eksperymentu.

Przykładowo, dla drugiego dnia trwania eksperymentu i próbki promieniowanej przez 10 minut:

An – pomiar absorpcji w drugim dniu eksperymentu dla próbki promieniowanej 10 min,

A1 – pomiar absorpcji w pierwszym dniu eksperymentu dla próbki promieniowanej 10 min.

Otrzymana względna wielkość jest wyrażona w procentach. Podobne analizy zostały wykonane dla ekspozycji w czasie 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min. Zestawienie wykonanych analiz prezentowane jest tabeli 1.

Jak widać na rysunku (rys. 3.) oraz analizując dane (tab. 1.) wraz z upływem czasu obserwowany jest względny wzrost amplitudy sygnału. Czyli wraz ze starzeniem się badanej substancji względna amplituda rośnie zarówno dla próbek promieniowanych jak i dla próbek referencyjnych. Obserwowana zmiana jest konsekwencją zmian konformacyjnych zachodzących w badanym komponencie warstwy receptorowej.

Wraz z upływem czasu ulega zmianie konformacja białka. Efekt ten można interpretować jako wzrost konformacji helisy i zmniejszenie struktury arkusza beta, co prowadzi do utraty szkieletu białka. Obserwowany efekt może wskazywać, że fragmentacja i agregacja badanego komponentu sieciującego warstw receptorowych biosensorów mogą wystąpić z czasem.

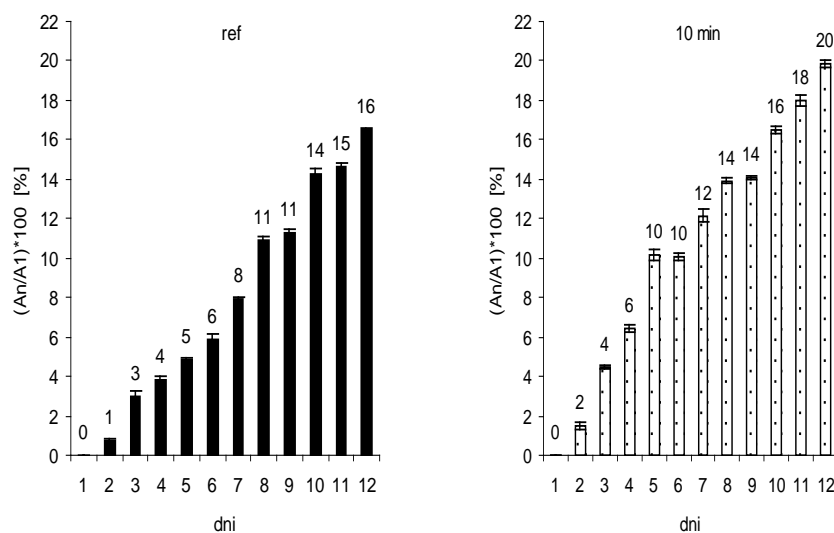
Zmiana odległości w łańcuchu polipeptydowym skutkuje zmianą siły oddziaływania między aminokwasami. Efekt ten może z czasem doprowadzić do denaturacji badanej substancji. Podczas tego procesu trzeciorzędowa struktura BSA zostaje zakłócona, co będzie powodowało utratę aktywności biologicznej badanego komponentu sieciującego warstwy receptorowej. Dokonując porównania próbek referencyjnych z napromieniowanymi można zauważyć, że większe zmiany zaobserwowano dla substancji poddanej ekspozycji na pole elektromagnetyczne.

Biorąc pod uwagę wpływ czynnika zewnętrznego na zmiany zachodzące w badanym komponencie sieciującym w kolejnych dniach trwania eksperymentu, można powiedzieć, że ekspozycja na czynnik przyspiesza zmiany konformacyjne zachodzące wraz z upływem czasu, czyli sprzyja procesowi denaturacji.

Dodatkowo, względne zmiany absorpcyjne w czasie 12 dni przeanalizowano w oparciu o fitowanie funkcją liniową ( $y = ax + c$ ), gdzie współczynnik  $a$  decyduje o dynamice zachodzących zmian.

Rysunek 4 przedstawia przykładowe względne zmiany absorpcyjne w czasie 12 dni dla komponentu warstwy receptorowej eksponowanego na pole elektromagnetyczne w czasie 20 min. Widać, że współczynnik  $a$  jest większy dla komponentu sieciującego warstwy receptorowej biosensora poddanego ekspozycji na pole niż dla kontroli. Świadczy to o większej dynamice zmian konformacyjnych przebiegających w substancji napromienowanej.

Podobne analizy zostały wykonane dla komponentu sieciującego warstwy receptorowej biosensora promieniowanych 10 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min. Współczynniki te wyniosły odpowiednio: 1,76; 1,81; 1,65; 1,62; 1,60.



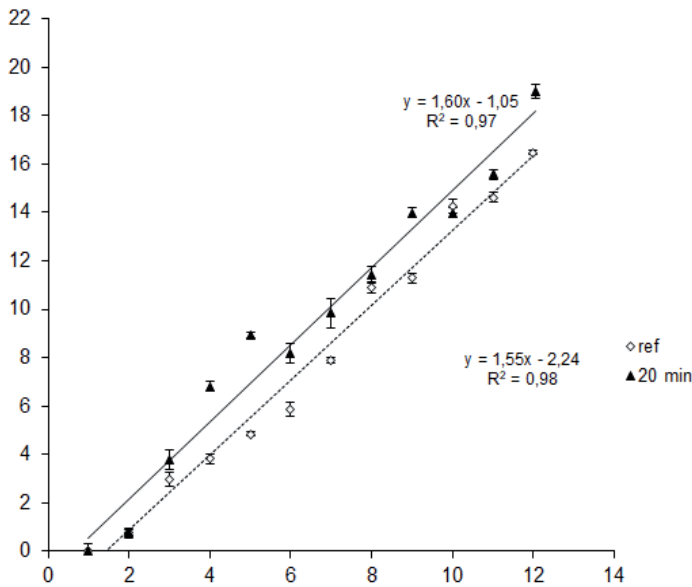
Rys. 3. Względne zmiany absorpcyjne w czasie 12 dni dla próbki referencyjnej oraz dla próbek poddanych 10 min ekspozycji na promieniowanie elektromagnetyczne

Fig. 3. Relative absorption changes over 12 days for reference sample (a) and for samples exposed to 10 min exposure to electromagnetic radiation (b)

Tab. 1. Względne zmiany absorpcji pod wpływem ekspozycji na pole elektromagnetyczne w czasie 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min

Tab. 1. Relative changes in absorption over time due to electromagnetic field exposition during 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min

(An/A <sub>1</sub> )*100 [%]					
dni	20 min	30min	40min	50min	60min
2	1 ± 0,2	0 ± 0,1	1 ± 0,1	1 ± 0,1	1 ± 0,1
3	4 ± 0,4	4 ± 0,1	4 ± 0,2	4 ± 0,2	4 ± 0,1
4	7 ± 0,2	4 ± 0,1	4 ± 0,5	4 ± 0,3	4 ± 0,1
5	9 ± 0,1	8 ± 0,2	5 ± 0,3	6 ± 0,2	7 ± 0,1
6	8 ± 0,4	8 ± 0,5	8 ± 0,3	8 ± 0,1	8 ± 0,3
7	10 ± 0,6	11 ± 0,3	10 ± 0,4	10 ± 0,1	9 ± 0,4
8	11 ± 0,3	12 ± 0,2	12 ± 0,3	12 ± 0,3	12 ± 0,3
9	14 ± 0,2	13 ± 0,3	12 ± 0,3	12 ± 0,6	12 ± 0,1
10	14 ± 0,2	17 ± 0,2	15 ± 0,2	14 ± 0,3	14 ± 0
11	16 ± 0,2	17 ± 0,1	16 ± 0,1	16 ± 0,2	16 ± 0,3
12	19 ± 0,3	19 ± 0,2	18 ± 0,2	18 ± 0,1	18 ± 0,2



**Rys. 4.** Względne zmiany absorpcyjne w czasie 12 dni, fitowane funkcją liniową dla próbki referencyjnej oraz dla próbki poddanej 20 min ekspozycji na promieniowanie elektromagnetyczne  
 Fig. 4. Relative absorption changes over 12 days, fitted with a linear function for the reference sample and for the sample exposed to 20 min radiation

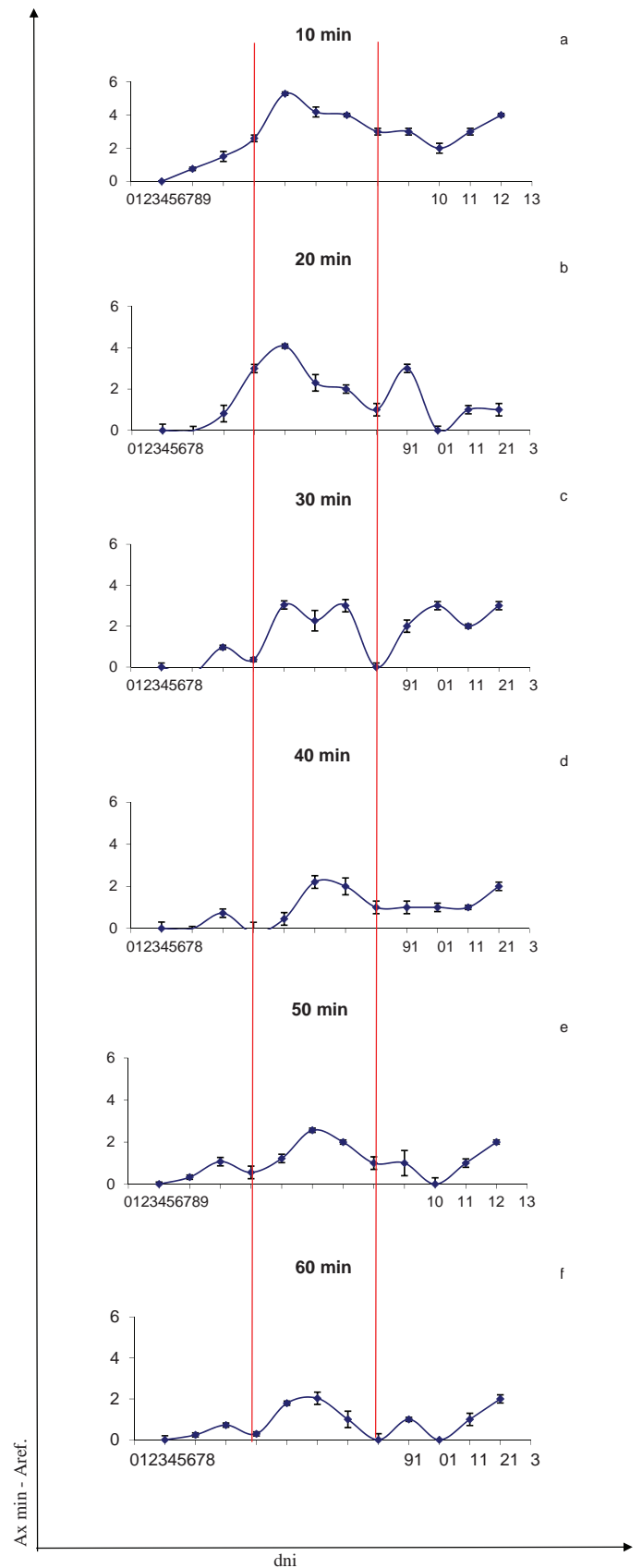
Jak widać, wszystkie współczynniki mają większą wartość niż współczynnik  $a$  dla próbki referencyjnej, co ponownie potwierdza fakt, że zmiany konformacyjne zachodzące w komponente sieciującym warstwy receptorowej zachodzą szybciej dla próbek ekspozycyjnych na pole elektromagnetyczne o długości fali  $\lambda = 660 \text{ nm}$  niż dla substancji kontrolnej (bez promieniowania).

Kolejnym rozważanym problemem badawczym, na który starano się znaleźć odpowiedź było pytanie: Jak zmienia się stabilność komponentu warstw receptorowych w czasie i w jaki sposób można oszacować wielkość tych zmian. W tym celu przeprowadzono analizy bazujące na różnicach między próbką promieniowaną  $A_{x_{\min}}$  a próbką kontrolną  $A_{\text{ref}}$ . Wynik wyrażono w procentach (rys. 5). Na podstawie przeprowadzonych analiz można dostrzec, że występują różnice w badanym komponente sieciującym między próbkami ekspozycyjnymi na promieniowanie a próbkami referencyjnymi. Dla próbek ekspozycyjnych na promieniowanie przez 10 min różnice osiągają maksymalną wartość 5%, odpowiednio dla 20 min ekspozycji – 4%, 30 min – 3%, 40 min – 2%, 50 min – 3%, 60 min – 2%. Ponadto zaobserwowano, że zmiany stabilności są najbardziej widoczne między czwartym a ósmym dniem.

#### 4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania stabilności w czasie i pod wpływem czynnika komponentu sieciującego warstw receptorowych biosensorów, wykazały wpływ promieniowania elektromagnetycznego o długości fali  $\lambda = 660 \text{ nm}$  i czasie ekspozycji 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min na stabilność badanej substancji.

Wykazano przyspieszoną denaturację pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego o długości fali  $\lambda = 660 \text{ nm}$ . Przeanalizowano szybkość zachodzących zmian. Zauważono, że największe różnice w stabilności badanego komponentu warstw receptorowych biosensora występują między czwartym a ósmym dniem.



**Rys. 5.** Procentowe różnice między próbką kontrolną a promieniowaną dla ekspozycji (10–60 min) w czasie 12 dni z zaznaczeniem okien niestabilności  
 Fig. 5. Percentage differences between the control and radiated samples for exposure (10–60 min) during 12 days with the window showing instability

## Bibliografia

1. Kłos-Witkowska A., *Biosensory*, „Pomiary Automatyka Robotyka”, R. 19, Nr 3, 2015, 37–40, DOI: 10.14313/PAR\_217/37.
2. Kłos-Witkowska A., *Ewolucja i rozwój biosensorów – problemy i perspektywy*. „Pomiary Automatyka Kontrola”, R. 60, Nr 12, 2014, 1178–1180.
3. Mosińska L., Fabisiak K., Paprocki K., Kowalska M., Popielarski P., Szybowicz M., Stasiak A., *Diament jako materiał przetwórczy do produkcji biosensorów*. „Przemysł Chemiczny”, R. 92, Nr 6, 2013, 919–923.
4. Shrishna N., Jain A., Jain A., *Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes*. “Advances in food and nutrition research”, No. 79, 2016, 179–211, DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.07.004.
5. Sarika C., Rekha K., Narasimha Murthy B., *Studies on enhancing operational stability of a reusable laccase-based biosensor probe for detection of ortho-substituted phenolic derivatives*. “3 Biotech”, No. 5, 2015, 911–924. DOI: 10.1007/s13205-015-0292-7.
6. Ertürk G., Berillo D., Hedström M., Mattiasson B., *Micro-contact-BSA imprinted capacitive biosensor for real-time, sensitive and selective detection of BSA*. “Biotechnology Report”, Vol. 3, 2015, 65–72, DOI: 10.1016/j.btre.2014.06.006.
7. Lin CH., Lee M., LEE W., *Bovine serum albumin detection and quantitation based on capacitance measurements of liquid crystals*, “Applied Physics Letters”, Vol. 109, No. 3, 2016, DOI: 10.1063/1.4962169.
8. Yu J., Chen Y., Xiong L., Zhang X., Zheng Y., *Conductance Changes in Bovine Serum Albumin Caused by Drug-Binding Triggered Structural Transitions*, “Materials” (Basel). 12(7), 1022, DOI: 10.3390/ma12071022.
9. Takeda K., Wada A., Yamamoto K., Moriyama Y., Aoki K., *Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment*, “Journal of Protein Chemistry”, 8(5), 1989, 653–659.
10. Kłos-Witkowska A., Akhmetov B., Zhumangalieva N., Karpinskyi V., Gancarczyk T., *Bovine Serum Albumin stability in the context of biosensors*, ICCAS 2016: 16<sup>th</sup> International Conference on Control, Automation and Systems. Korea, 2016; 976–980, DOI: 10.1109/ICCAS.2016.7832427.
11. Kłos-Witkowska A., Martsenyuk V., *Study of improvement of biosensor matrix stability*. *Engineer of the XXI Century*. Editors names: S. Zawiślak, J. Rysiński. Springer book: Chapter 13, 2020, 153–161, DOI: 10.1007/978-3-030-13321-4\_13.
12. Hongliang X., Nannan Y., Haoran X., Tiansh W., Guiying L., Zhengqiang L., *Characterization of the Interaction between Eupatorin and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Modeling Methods*. “International Journal of Molecular Sciences”, Vol. 14, 2013, 14185–14203, DOI: 10.3390/ijms140714185.
13. Michnik A., Michalik K., Drzazga Z., *Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin*, “Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology”, Vol. 90, 2008, 170–178, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2007.12.007.
14. Polk C., Postow E., *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, Third Edition – 2 Volume Set, 1995 by CRC Press.

## Stability Studies over Time and Under the Influence of Electromagnetic Field on Cross Linking Component Solution of Biosensor Receptor Layers

**Summary:** The manuscript presents the research on stability over time and under the influence of the factor (electromagnetic radiation with wavelength  $\lambda = 660$  nm) on crosslinking component of biosensor receptor layers. Accelerated conformational changes (fast denaturization) under the influence of an external factor have been shown. It was noticed that in the examined time (12 days) the biggest changes of stability occur between the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> day.

**Keywords:** stability, biosensor, receptor layer

### dr Aleksandra Kłos-Witkowska

awitkowska@ath.bielsko.pl

ORCID: 0000-0003-2319-5974

Adiunkt w Katedrze Informatyki i Automatyki na Wydziale Budowy Maszyn i Informatyki Akademii Techniczno-Humanistycznej w Bielsku-Białej. Zainteresowania naukowe: sensory i biosensory.



### prof. dr hab. Vasyl Martsenyuk

vmartsenyuk@ath.bielsko.pl

ORCID: 0000-0001-5622-1038

Profesor w Katedrze Informatyki i Automatyki na Wydziale Budowy Maszyn i Informatyki Akademii Techniczno-Humanistycznej w Bielsku-Białej. Zainteresowania naukowe: biosensor, systemy dynamiczne, informatyka medyczna.



### dr Andriy Sverstiuk

sverstyuk@tdmu.edu.ua

ORCID: 0000-0001-8644-0776

Adiunkt na Wydziale Informatyki Medycznej, Horbachevsky Ternopil National Medical University. Zainteresowania naukowe: biosensory, informatyka medyczna.

