

OZNACZANIE CZYNNIKA MARTWICY NOWOTWORÓW (TNF α) ZA POMOCĄ MIKROWAGI KWARCOWEJ

DETECTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF α) BY USING THE QUARTZ MICROBALANCE

Katarzyna Arkusz¹

¹ Uniwersytet Zielonogórski, Wydział Mechaniczny, Zakład Inżynierii Biomedycznej,
65-417 Zielona Góra, ul. Licealna 9

*e-mail: k.arkusz@ibem.uz.zgora.pl

STRESZCZENIE

Celem pracy było sprawdzenie możliwości wykorzystania elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej do oznaczania poziomu czynnika martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor*, TNF α). Pomiary za pomocą wagi EQCM (ang. *Electrochemical Quartz Crystal Microbalance*) przeprowadzono w standardowym trój-elektrodowym układzie, w którym zastosowano: (1) immobilizowaną elektrodę Ti/TiO₂ jako elektrodę pracującą, (2) elektrodę złotą jako elektrodę pomocniczą i (3) elektrodę Ag/AgCl jako elektrodę odniesienia. Próbki immobilizowano metodą bezpośredniej adsorpcji poprzez nakropienie 10 μ l przeciwciał TNF α o stężeniu 1 μ g/ml na powierzchnię Ti/TiO₂ i inkubowaniu przez 1 h. Pomiary piezoelektryczne wykonano w zakresie (-0,3 ÷ -0,8) V z prędkością skanowania 20 mV/s w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (0,01 M PBS, pH 7,4) z dodatkiem 10 μ l standardowego roztworu antygenów TNF α (50–1000 pg/ml). Wyniki badań dowiodły, że przygotowana platforma jest czuła na zmianę stężenia antygenu na powierzchni elektrody. Kryształy pokryte TiO₂ z immobilizowaną warstwą przeciwciał i antygenu TNF α wykazały wyraźny spadek częstotliwości, który stabilizuje się na określonym poziomie w zależności od stężenia antygenu (błąd średniokwadratowy $R^2 = 0,9624$).

Słowa kluczowe: immunosensor, czynnik martwicy nowotworów (TNF α), elektrochemiczna mikrowaga kwarcowa (EQCM)

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the possibility of using electrochemical quartz crystal microbalance EQCM for the determination of the level of tumor necrosis factor (TNF α). EQCM measurements were carried out in a standard three-electrode system, which uses: (1) Ti/TiO₂ immobilized electrode as the working electrode, (2) gold electrode as the counter electrode, and (3) Ag/AgCl electrode as the reference electrode. Samples were immobilized by dropping 10 μ l TNF α antibody with concentration 1 μ g/ml onto the Ti/TiO₂ surface and incubated for 1 h. Piezoelectric and voltamperometric measurements were carried out in (-0.3 ÷ -0.8) V interval with the scan rate 20 mV/s in phosphate-buffered saline solution (0.01 M PBS, pH 7.4) with addition of 10 μ l standard TNF α antigen (50–1000 pg/ml). Obtained results proved that the prepared platform was sensitive to change of antigen concentration on the surface of the electrode. Crystals covered by TiO₂ with an immobilized layer of antibody and antigen TNF α showed a significant decrease of frequency,

which remains on specified level according to the antigen concentration (mean squared error $R^2 = 0.9624$).

Keywords: immunosensor, tumor necrosis factor (TNF α), electrochemical quartz microbalance (EQCM)

1. Wstęp

Rozwój nanotechnologii i postępy w dziedzinie mikrosystemów przyczyniają się do coraz częstszego wykorzystywania mikroczojników w badaniach biomedycznych. Mikrowagi kwarcowe czy mikrobelki sprężyste są przykładami czujników mikromechanicznych, które mogą być stosowane do obserwacji oddziaływań pomiędzy biomolekułami [1].

Elektrochemiczna mikrowaga kwarcowa (EQCM) jest nowoczesnym urządzeniem pomiarowym, które znajduje zastosowanie w precyzyjnych badaniach bardzo małych mas. Podstawę działania tego urządzenia stanowi rejestracja zmieniających się częstotliwości rezonansowych drgań elektrody pod wpływem zmian jej masy, z wykorzystaniem funkcji zmiennego potencjału oraz prądu. Najważniejszą częścią urządzenia jest piezoelektryczny rezonator kwarcowy w postaci kryształu o odpowiednim kształcie i grubości, z napyłonymi po obu jego stronach elektrodami (zazwyczaj Pt lub Au). Przyłożenie do jego powierzchni zewnętrznego potencjału elektrycznego wytwarza wewnętrzne naprężenie mechaniczne, a utworzone pole elektryczne powoduje sprężyste drgania, które są źródłem fali akustycznej rozchodzącej się w kierunku prostopadłym do powierzchni [2]. Technika ta odgrywa zasadniczą rolę jako połączenie badań voltamperometrycznych z analizą zmian masy rzędu kilku nanogramów [3].

Jedna z napyłonych elektrod jest w kontakcie z elektrolitem i stanowi jednocześnie elektrodę roboczą w trójelektrodowym naczyniu elektrochemicznym. Osadzenie na tej elektrodzie obcej warstwy skutkuje zmianą grubości oscylatora kwarcowego, prowadzącą do zmiany częstotliwości rezonansowej (wydłużenie okresu drgań) zgodnie ze wzorem Sauerbrea [4] lub Kanazawy [5] oraz spadkiem wartości amplitudy drgań. Mierząc więc zmiany częstotliwości, można określić zmiany masy związanej z powierzchnią roboczą.

Technika EQCM znajduje zastosowanie przede wszystkim w próżniowych systemach osadzania, w kontroli osadzania ultracienkich folii, wykrywaniu skażeń, a także w pomiarze masy aerozolu [6, 7]. Coraz częściej mikrowagę kwarcową stosuje się do przeprowadzania analiz środowiskowych i żywnościowych, ze względu na jej zdolność monitorowania analitów w czasie rzeczywistym [8]. W medycynie i naukach pokrewnych technika QCM znalazła zastosowanie w oznaczeniach małych cząsteczek [9] (jony metali ciężkich, proste związki organiczne i nieorganiczne), dużych cząsteczek [10, 11] (białka, kwasy nukleinowe), a także leków [12]. Mikrowaga kwarcowa osiąga czułość ok. 0,1 ng, dlatego też z powodzeniem można ją stosować jako część układu biosensora. Selektywność wskazań zapewniana jest poprzez wykorzystanie specyficznych oddziaływań pomiędzy różnymi biocząsteczkami, np. typu antygen-przeciwciała.

Biosensory piezoelektryczne charakteryzują się wysoką czułością oraz szybkim czasem pomiaru, co umożliwia ich potencjalne zastosowanie do oznaczania substancji, których stężenie w organizmie zmienia się gwałtownie, czego przykładem jest czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF α). To jedna z głównych cytokin zapalnych, wywierająca wpływ na komórki śródbłonna. Wraz z wytwarzanymi przez siebie innymi cytokinami wpływa endo- (w wysokich stężeniach), para- i autokrynnie (w niskich stężeniach) na neutrofile, monocyty, fibroblasty, keratynocyty, makrofagi i komórki tłuszczne [13]. Znaczenie biologiczne TNF α jest bardzo duże, ponieważ występujące receptory błonowe mają wpływ na różnorodne komórki. Największy wpływ zaobserwowano w przebiegu reakcji immunologicznych i w komórkach nowotworowych. Początkowo Carswell [14], później Coley [15], wskazali przeciwnowotworowe działanie TNF α . Właściwości te wynikają z możliwości hamowania proliferacji komórek nowotworowych, pobudzania apoptozy i wzrostu różnicowania się komórek. TNF α wstrzymuje proces angiogenezy oraz przyspiesza wykrzepianie w obszarze naczyń doprowadzających. Zauważono jednak, że nie przy wszystkich rodzajach nowotworów zachodzą wyżej opisane zjawiska. W przypadku białaczki włochatokomórkowej lub przewlekłej białaczki B-komórkowej zauważono nasilenie się stanu chorobowego na skutek wzrostu stężenia TNF α [16]. W sytuacji przerzutu do kości wyższe stężenie TNF α powoduje aktywację szlaku przemian kwasu arachidowego oraz osteoklastów.

Dodatkowo dochodzi do przyspieszenia syntezy prostaglandyn (głównie PGE₂, która posiada właściwości destrukcyjne kości). Uwalniane są również interleukiny IL-1 i IL-6 oraz hamowane są: proliferacja osteoblastów i aktywność fosfatazy zasadowej. W związku z ambiwalentnym działaniem TNF α zasadne jest monitorowanie stężenia tej cytokiny w obszarze guza w trakcie leczenia onkologicznego.

Wśród dotychczas opracowanych elektrochemicznych biosensorów do oznaczania TNF α najniższy limit detekcji 0,48 pg/ml przy użyciu metod spektrofotometrycznych uzyskano w przypadku czujnika, którego podłoże stanowił modyfikowany PAMAM (poli(amidoamina)) [17]. Inne metody detekcji TNF α wymagały zastosowania dodatkowych zabiegów funkcjonalizacji platformy biosensorów, np. reakcji za pomocą EDC/NHS ((1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu i N-hydroksybursztyniimidu) [18], znakowania błękitem pruskim [19] lub zastosowania złożonych materiałów kompozytowych w roli elektrody pracującej, np. elektroda węglowa/mikrokulki magnetyczne [20], aptamery [21], elektroda złota znakowana SiO₂ oraz pokryta samoformującą się warstwą ditiobis[propanionu sukcyinimidylu] [22].

Dotychczas nie opracowano biosensora do detekcji czynnika martwicy nowotworów alfa przy użyciu techniki mikrowagi kwarcowej. Celem przeprowadzonych badań było więc sprawdzenie możliwości zastosowania tytanowych elektrod QCM w roli podłoża immunosensora do oznaczania czynnika martwicy nowotworów (TNF α) za pomocą mikrowagi kwarcowej. Na podstawie wcześniejszych badań [23, 24, 25] podjęto próbę bezpośredniej immobilizacji substancji biologicznych na podłożu Ti/TiO₂.

2. Materiał i metody

2.1 Modyfikacja powierzchniowa tytanowych elektrod QCM

Do realizacji niniejszych badań, zamiast standardowych elektrod QCM, zbudowanych z kryształu kwarcu pokrytego złotem, zastosowano kryształ kwarcu pokryty warstwą tytanu firmy International Crystal Manufacturing (ICM) o parametrach fizycznych:

- częstotliwość QCM: 6 MHz,
- średnica kryształu: 1,36 cm,
- średnica elektrody: 0,67 cm,
- grubość warstwy tytanu: 5000 Å,
- polerowanie: połysk.

Warstwę ditlenku tytanu na powierzchni elektrody QCM formowano w procesie anodowania elektrochemicznego w 85% roztworze glikolu etylenowego z dodatkiem 0,6% NH₄F. Do uzyskania warstwy TiO₂ zastosowano potencjał 17 V. Potencjał ten narastał od zera do wartości zadanej z prędkością 500 mV/s, po czym był utrzymywany przez 60 s.

Charakterystykę podłoża wytworzonego na elektrodzie tytanowej zbadano przy użyciu mikroskopu elektronowego z emisją polową JEOL JSM 7600F. Dzięki spektrometrowi dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego, w który wyposażony jest mikroskop, przeprowadzono ocenę składu jakościowego oraz ilościowego pierwiastków badanej próbki.

2.2 Modyfikacja biologiczna tytanowych elektrod QCM

Substancje biologiczne immobilizowane na powierzchni elektrod QCM pochodziły z zestawu ELISA TNF α (nr kat.: ET2010-1, AssayPro), w skład którego wchodziły roztwór standardowy antygeny TNF α i roztwór przeciwciał TNF α .

Ze względu na małą powierzchnię próbki do immobilizacji przeciwciał oraz antygenów TNF α zastosowano metodę nakrapiania w temperaturze (25 ± 1) °C. Proces unieruchamiania receptora biologicznego na matrycy Ti/TiO₂ przeprowadzono przez nakropienie 10 μ l standardowego roztworu ludzkich przeciwciał monoklonalnych (1 μ g/ml) oraz inkubowanie próbek przez 1 h (czas immobilizacji ustalono na podstawie wcześniejszych badań autorów [25]).

2.3 Pomiar zmian częstotliwości w funkcji czasu i potencjału

Odpowiedź immunosensora do oznaczania TNF α rejestrowano przy użyciu modułu elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej (EQCM) podłączonej do potencjostatu PGSTAT302N firmy Metrohm.

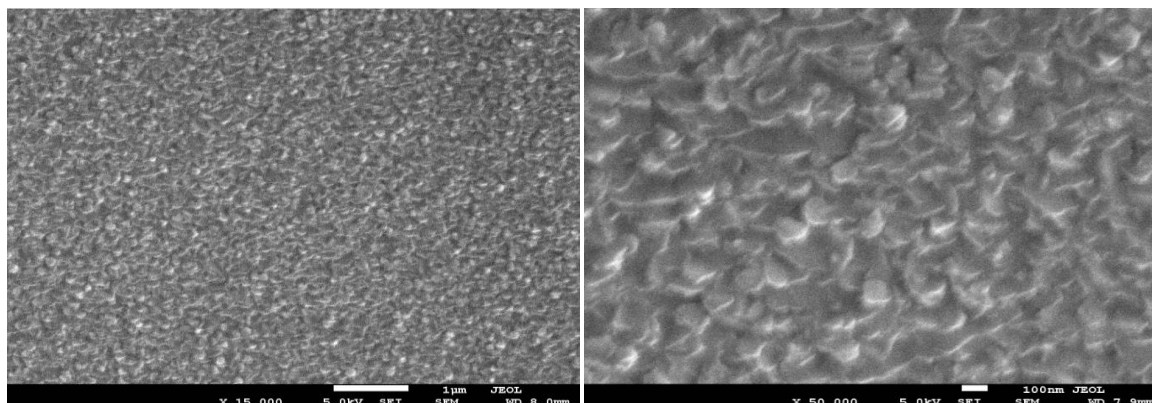
Pomiary EQCM przeprowadzono w standardowym trójelektrodowym układzie, w którym zastosowano: immobilizowaną elektrodę Ti/TiO₂ jako elektrodę pracującą, elektrodę złotą jako elektrodę pomocniczą oraz elektrodę Ag/AgCl jako elektrodę odniesienia.

Badania elektrochemiczne przeprowadzono w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (0,01 M PBS, pH 7,4, Sigma-Aldrich) z dodatkiem 10 μ l standardowego roztworu antygenów (zakres stężeń 50–1000 pg/ml), z szybkością skanowania 20 mV/s, w zakresie potencjałów (-0,3÷-0,8) V (vs E_{Ag/AgCl} = 0,222 V).

3 Wyniki

3.1 Analiza SEM/EDS uzyskanych struktur

Badania morfologii oraz składu chemicznego elektrody tytanowej pokrytej dwutlenkiem tytanu przeprowadzono za pomocą mikroskopu elektronowego JEOL JSM 7600F. Zdjęcia SEM przedstawione na rysunku 1, wykonane w powiększeniu 10 000 oraz 50 000 razy potwierdzają, że wytworzona powierzchnia Ti/TiO₂ jest jednorodna oraz zwarta.



Rys. 1. Obraz SEM Ti/TiO₂, widok z góry w powiększeniu 10 000x (lewa) oraz 50 000x (prawa)

W celu określenia składu chemicznego wykonano pomiar metodą spektrometrii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS), a uzyskane rezultaty zestawiono w tabeli 1. Analiza EDS wykazała obecność tytanu (Ti) i tlenu (O₂), potwierdzając wytworzenie warstwy tlenkowej. Zawartość tytanu w próbce (87,67% wag.) jest wyższa niż teoretyczna zawartość procentowa tytanu w TiO₂, czego przyczyną może być cienka warstwa ditlenku tytanu oraz pierwotne podłoże zbudowane z czystego tytanu.

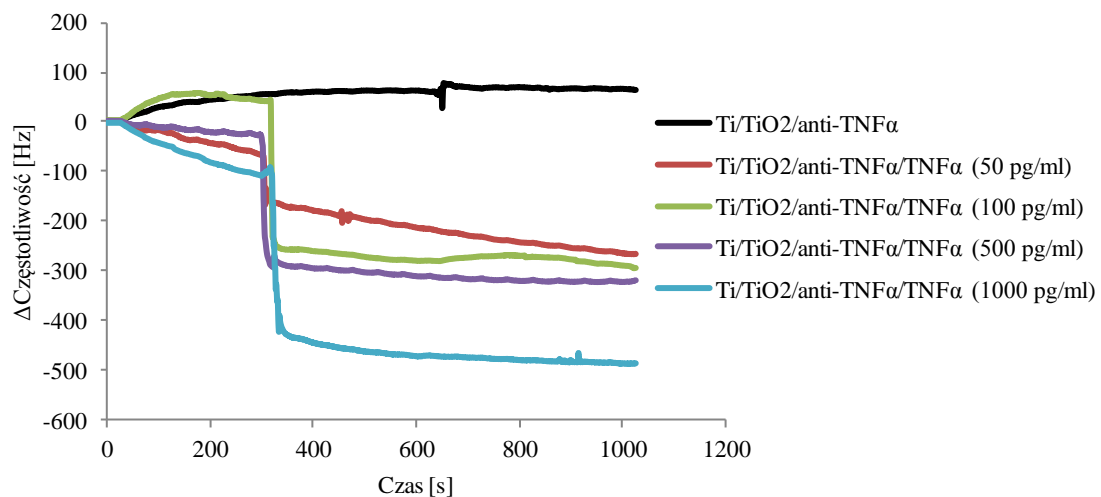
Dodatkowo zaobserwowano obecność śladowych ilości jonów fluorkowych stanowiących pozostałość w procesie formowania warstwy tlenkowej, co jest zjawiskiem pożądanym w procesie immobilizacji. Obecność jonów fluorkowych w niewielkim stężeniu i w roztworze niezawierającym jonów wapnia jest czynnikiem wspomagającym tworzenie wiązań wodorowych białek z podłożem oraz zapobiega fosforylacji białek [26].

Tabela 1. Tabela składu chemicznego matrycy nanorurek TiO₂ na podłożu Ti

	Tlen O ₂ [%]	Tytan Ti [%]	Fluor F [%]
Procent wagowy	9,33	87,67	3,0
Procent atomowy	22,68	71,18	6,15

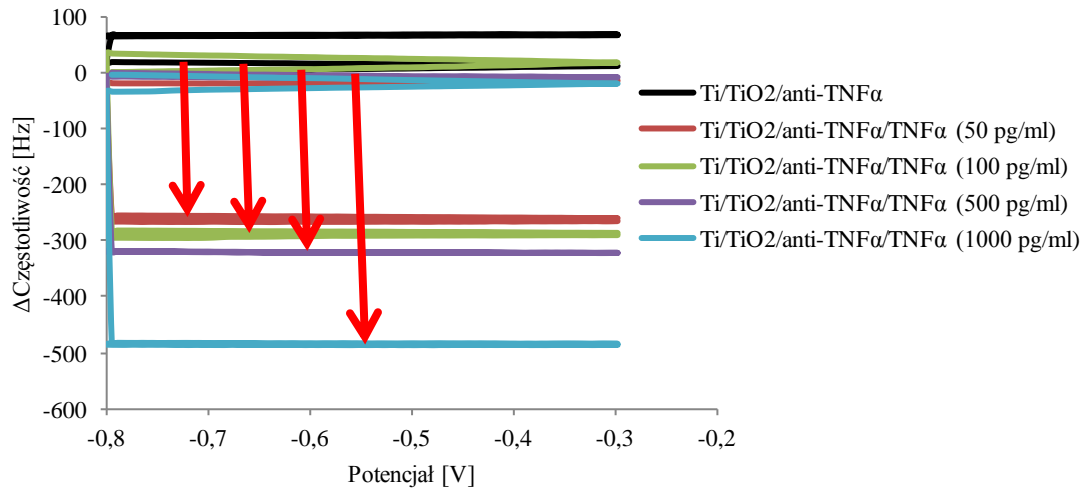
3.2 Odpowiedź immunosensora

Pomiary EQCM przeprowadzono w roztworze PBS (0,01 M, pH 7,4) przy zastosowaniu elektrod sfunkcjonalizowanych przeciwciałami TNF α oraz w obecności antygenów TNF α o różnych stężeniach w zakresie 50–1000 pg/ml. Na podstawie uzyskanych wyników wygenerowano dwa rodzaje wykresów. Pierwsze to wykresy zmian częstotliwości (Δf) w funkcji czasu, przedstawione na rysunku 2. Próbkę odniesienia stanowiła elektroda Ti/TiO $_2$ sfunkcjonalizowana wyłącznie przeciwciałami TNF α . W trakcie trwania pomiaru tej próbki nie zaobserwowano znaczących zmian częstotliwości. Gwałtowny spadek częstotliwości rejestrowany dla pozostałych próbek to moment dodania antygenów. Dla każdego stężenia TNF α zarejestrowano stabilny przebieg w dalszej części, który wykazywał następującą zależność: im wyższe stężenie dodanego TNF α , tym większy spadek częstotliwości.



Rys. 2. Zmiana częstotliwości elektrody Ti/TiO $_2$ z immobilizowanymi przeciwciałami TNF α po dodaniu antygenów TNF α w zakresie stężeń 50–1000 pg/ml w funkcji czasu

Drugi rodzaj wykresów to zmiany częstotliwości (Δf) w funkcji potencjału. Na rysunku 3 przedstawiono zmiany częstotliwości podczas cyklicznej polaryzacji próbki w zakresie potencjałów (-0,3 ÷ -0,8) V z szybkością 20 mV/s od włączenia do upłynięcia 10 min od momentu dodania antygenów. W trakcie dodawania antygenów również rejestrowany jest spadek częstotliwości.



Rys. 3. Zmiana częstotliwości elektrody Ti/TiO₂ z immobilizowanymi przeciwciałami TNF α po dodaniu antygenów TNF α w zakresie stężeń 50–1000 pg/ml w funkcji potencjału

Zmiana częstotliwości przekłada się na zmianę masy elektrody pracującej. Kryształy pokryte TiO₂ immobilizowanymi przeciwciałami po dodaniu antygenów TNF α wykazują wyraźny spadek częstotliwości, który koreluje ze stężeniem oznaczanego antygeny i potwierdza tworzenie się kompleksów antygen-przeciwciało. Taka tendencja odpowiada charakterystyce biosensorów piezoelektrycznych [10, 18].

Dzięki wykorzystaniu równania Sauerbrea (1) możliwe jest powiązanie zmian częstotliwości ze zmianami masy:

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m \quad (1)$$

gdzie:

Δf – zmiana częstotliwości,

C_f – współczynnik wrażliwości kryształu (0,0815 Hz·ng⁻¹·cm² dla 6 MHz w 20 °C),

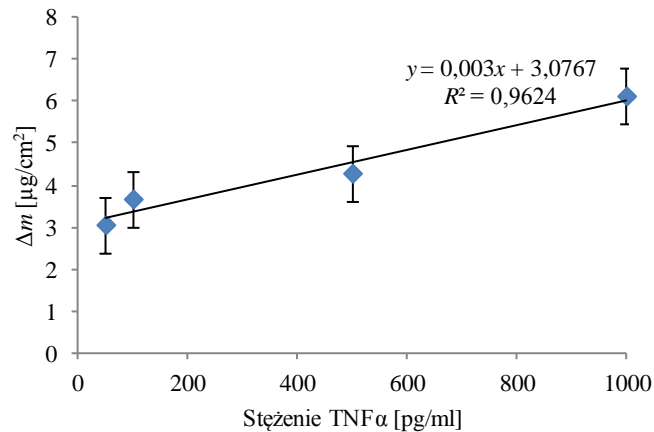
Δm – zmiana masy na jednostkę powierzchni (g·cm⁻²).

Wartości zmierzonej częstotliwości i obliczonej na jej podstawie masy warstwy przeciwciał zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Wartości Δf oraz Δm w zależności od stężenia antygeny TNF α

Stężenie antygeny TNF α [pg/ml]	Δf [Hz]	Δm [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$]
0	50	0,61
50	250	3,07
100	300	3,68
500	350	4,29
1000	500	6,13

Na podstawie obliczonych wartości mas wykreślono krzywą kalibracyjną zmiany masy w zależności od stężenia antygeny TNF α (p. rys. 4). Estymacja liniowa uzyskanych pomiarów pokrywa się z zakresem ich standardowych, a błąd średniokwadratowy dopasowania linii trendu wynosi 0,9624 dla oznaczanej cytokiny w zakresie stężeń 50–1000 pg/ml.



Rys. 4. Krzywa zmiany masy elektrody Ti/TiO₂ w zależności od stężenia antygeny TNFα

4 Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że przygotowana platforma Ti/TiO₂ jest czuła na zmianę stężenia czynnika martwicy nowotworów na powierzchni elektrody. Podłoże Ti/TiO₂ umożliwia skuteczną immobilizację przeciwciał TNFα i wiązanie antygenów na powierzchni elektrody, co potwierdza korelacja – wraz ze wzrostem stężenia antygeny tworzy się więcej kompleksów antygen-przeciwciało i tym większy jest spadek częstotliwości drgań kryształu.

Zmiana stężenia antygeny przekłada się na zmianę masy elektrody roboczej, na podstawie czego opracowano krzywą kalibracyjną, której błąd średniokwadratowy dopasowania jest równy 0,9624. Otrzymane wyniki wskazują, że kryształy pokryte TiO₂ po zastosowaniu odpowiednich modyfikacji będą odpowiednim materiałem do zastosowania w budowie biosensora stosowanego w badaniach biomedycznych z wykorzystaniem detekcji piezoelektrycznej.

LITERATURA

- [1] G.T. Heller, A.R. Marcser-Smith, M.S. Johal: *Quartz microbalance technology for biomolecular interactions*, Methods in Molecular Biology, vol. 1278, 2015, s.153–164.
- [2] F. Wudy, C. Stock, H.J. Gores: *Measurement Methods, Electrochemical: Quartz Microbalance*, Elsevier, Amsterdam, 2009.
- [3] T. Błażkiewicz: *Nowoczesne techniki analityczne w naukach farmaceutycznych – mikrowaga kwarcowa i jej zastosowanie*, Postępy Farmacji, vol. 1–2, 2013, s. 26–31.
- [4] M.H. Yang, S.B. Jong, T.W. Chung, Y.F. Huang, Y.C. Tyan: *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, InTech, 2011.
- [5] M. Michalzik, R. Wilke, S. Buttgenbach: *Miniaturized QCM-based flow system for immunosensor application on liquid*, Sensors and Actuators B, vol. 111, 2005, s. 410–415.
- [6] T. Hagihara, K. Yaori, K. Iwakura, N. Fukumuro, S. Yae: *Electrochemical quartz crystal microbalance study of the electrodeposition of platinum*, Electrochimica Acta, vol. 176, 2015, s. 65–69.
- [7] S. Kurosawa, H. Aizawa, J.W. Park: *Quartz crystal microbalance immunosensor for highly sensitive 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin detection in fly ash from municipal solid waste incinerators*, Analyst, vol. 130, 2005, s. 1495–1501.
- [8] S.Kurosawa, J.W. Park, H. Aizawa, S.I. Wakida, H. Tao, K. Ishihara: *Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring*, Biosensors and Bioelectronics, vol. 22, 2006, s. 472–481.
- [9] Y. Kosaki, K. Takano, D. Citterio, K. Suzuki, S. Shiratori: *Quartz crystal microbalance sensor using ionophore for ammonium ion detection*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, vol. 12, 2012, s. 563–567.
- [10] X. Wang, H. Yu, D. Lu, J. Zhang, W. Deng: *Label free detection of the breast cancer biomarker CA15.3 using ZnO nanorods coated quartz crystal microbalance*, Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 195, 2014, s. 630–634.
- [11] H. Furusawa, H. Nakayama, M. Funasaki, Y. Okahata: *Kinetic characterization of small DNA-binding molecules interacting with a DNA strand on a quartz crystal microbalance*, Analytical Biochemistry, vol. 492, 2016, s. 34–42.

- [12] M.R. Eslami, N. Alizadeh: *A dual usage smart sorbent/recognition element based on nanostructured conducting molecularly imprinted polypyrrole for simultaneous potential-induced nanoextraction/determination of ibuprofen in biomedical samples by quartz crystal microbalance sensor*, Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 220, 2015, s. 880–887.
- [13] G. Wcisło, J. Korniluk, K. Szarlej–Wcisło, W.Z. Pawlak, P. Nurzyński, R. Duchnowska: *Leczenie chorób nowotworowych czynnikiem martwicy nowotworów – alfa (TNF-alfa)*, Współczesna Onkologia, vol. 4, 2002, s. 222–227.
- [14] E.A. Carswell, L.J. Old, R.L. Kassei, S. Green, N. Fiore, B. Williamson: *An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors*, Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 72, 1975, s. 3666–3670.
- [15] W.B. Coley: *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases*, Clinical Orthopaedics and Related Research, vol. 105, 1991, s. 3–11.
- [16] M. Mervat, M. Morsi, A. Hussein, E.A. Abd, N.A. Moneim: *Evaluation of tumour necrosis factor- α , P-selectin (sP-Selectin), gamma-glutamyl transferase (GGT), glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) and alphafetoprotein (AFP) in patients with hepatocellular carcinoma before and during chemotherapy*, Turkish Journal of Cancer, vol. 35, 2005, s. 74–78.
- [17] A. Bosnjakovic, M.K. Mishra, H.J. Han, R. Romero, R.M. Kannan: *A dendrimer-based immunosensor for improved capture and detection of tumor necrosis factor- α cytokine*, Analytica Chimica Acta, vol. 720, 2012, s. 118–125.
- [18] M. Mazloum–Ardakani, L. Hosseinzadeh, A. Khoshroo: *Label-free electrochemical immunosensor for detection of tumor necrosis factor α based on fullerene-functionalized carbon nanotubes/ionic liquid*, Journal of Electroanalytical Chemistry, vol. 757, 2015, s. 58–64.
- [19] T. Li, Z. Si, L. Hu, H. Qi, M. Yang: *Prussian Blue-functionalized ceria nanoparticles as label for ultrasensitive detection of tumor necrosis factor- α* , Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 171–172, 2012, s. 1060–1065.
- [20] U. Eletxigerra, J. Martinez–Perdiguero, S. Merino, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, S. Campuzano: *Amperometric magnetoimmunoassay for the direct detection of tumor necrosis factor alpha biomarker in human serum*, Analytica Chimica Acta, vol. 838, 2014, s. 37–44.
- [21] Y. Liu, Q. Zhou, A. Revzin: *An aptasensor for electrochemical detection of tumor necrosis factor in human blood*, Analyst, vol. 138, 2013, s. 4321–4326.
- [22] T.S. Pui, T. Bansal, P. Kongsuphol, S.K. Arya: *Highly Sensitive Label Free Biosensor for Tumor Necrosis Factor*, World Academy of Science, Engineering and Technology, vol. 69, 2012, s. 747–750.
- [23] J. Filik, K. Cyran, J. Skóra, A. Kaczmarek, K. Arkusz, E. Krasicka–Cydzik: *Wykrywanie antygenu CA 15.3 metodami elektrochemicznymi na podłożu Ti/TiO₂*, Acta Bio–Optica et Informatica Medica, vol. 18, 2012, s. 134–138.
- [24] K. Arkusz, M. Nycz, E. Paradowska, E. Krasicka–Cydzik: *Electrochemical detection method for interleukin-6 on titania nanotube platforms*, Engineering of Biomaterials, vol. 17, 2014, s. 21–29.
- [25] J. Łoin, A. Kaczmarek, E. Krasicka–Cydzik: *Próba opracowania platformy biosensora trzeciej generacji dla H₂O₂ na powierzchni tytanu pokrytej nanorurkami TiO₂*, Acta Bio-Medica et Informatica Medica, vol.16, (2010), s. 54–56.
- [26] D.G. Hardie (red.): *Protein Phosphorylation: A Practical Approach*, IRL Press, Nowy Jork, 1993.

otrzymano / submitted: 26.05.2016

zaakceptowano / accepted: 01.09.2016