

**МЕТАБОЛІТИ СЕРОТОНІНУ І КАТЕХОЛАМІНІВ
ЯК ПУХЛИННІ БІОМАРКЕРИ: СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ В
ІНСТРУМЕНТАЛЬНИХ МЕТОДАХ АНАЛІЗУ**

О. Демків^{1*}, Н. Стасюк¹, Ю. Наум¹, Г. Клепач², З. Масляк³, М. Гончар^{1,2}

¹Інститут біології клітини НАН України

вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка

вул. І. Франка, 24, Дрогобич 82100, Україна

³ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»

вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79000, Україна

e-mail: demkiv@yahoo.com, olgademkiv81@gmail.com

Онкологічні захворювання залишаються однією з основних причин смертності у світі, а їхня рання діагностика є основним фактором успішного лікування. Останніми роками зростає інтерес до неінвазивного визначення пухлинних біомаркерів у біологічних рідинах. Ці біомаркери різноманітні за структурою – від низькомолекулярних сполук (катехоламіни, їхні метаболіти) до макромолекул (білки, мРНК, мікроРНК, антигени). Серед метаболічних біомаркерів важливе значення мають катехоламіни (дофамін, адреналін, норадреналін) та їхні метаболіти: ванілілмгдалева кислота (ВМК), гомованілінова кислота (ГВК) і 5-гідроксиіндолоцтова кислота (5-НІАА) – метаболіт серотоніну. Визначення рівня екскреції цих кислот використовують для ранньої діагностики захворювань центральної нервової системи та нейрогенних пухлин, зокрема, нейробластоми, феохромоцитом, парагангліоми. Визначення вмісту 5-НІАА в добовій сечі застосовують для діагностики карциноїдних пухлин.

У цьому огляді представлено порівняльний аналіз методів детекції пухлинних біомаркерів у біологічних рідинах. Для аналізу ВМК, ГВК і 5-НІАА використовують різні інструментальні підходи, зокрема, спектрофотометрію, флуориметрію, ВЕРХ та електрохімічні методи. Хоча ВЕРХ забезпечує високу чутливість і селективність, але попередня підготовка зразка призводить до підвищення вартості, складності й тривалості аналізу, роблячи його менш вигідним для клінічної практики. Натомість, електрохімічні методи, зокрема, з використанням сенсорів на основі молекулярно-імпринтованих полімерів (МІП) і наноматеріалів, є альтернативою, що не потребує складної підготовки зразка і дає змогу забезпечити точне та швидке вимірювання. Особливу увагу приділено сенсорам, здатним до вибіркового виявлення біомаркерів. Розвиток і вдосконалення методів кількісного аналізу біомаркерів-метаболітів відкривають нові можливості для підвищення ефективності неінвазивної діагностики раку, індивідуалізації підходів до лікування та моніторингу пацієнтів.

Ключові слова: біомаркери-метаболіти, біогенні аміни, 5-гідроксиіндолоцтова кислота, ванілілмгдалева кислота, гомованілінова кислота, діагностика раку

Онкологічні захворювання посідають одне із провідних місць серед причин смертності у світі. За прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), до 2040 р. очікується понад 28 мільйонів нових випадків раку щорічно. Рання діагностика є ключовим фактором підвищення ефективності лікування та покращення прогнозу для пацієнтів. Останнім часом зростає інтерес до кількісного визначення пухлинних біомаркерів у біологічних рідинах –

сечі, плазмі та сироватці крові – як до неінвазивного способу діагностики. Генетичні, епігенетичні, ліпідомні та протеомні маркери є важливими інструментами раннього скринінгу раку [6, 39]. Пухлинні біомаркери дуже різноманітні за структурою. Це білки (наприклад, альфа-фетопротейн, карциноембріональний антиген (CEA), хоріонічний гонадотропін (hCG)), нуклеїнові кислоти (мутантна ДНК, мРНК, мікроРНК), ліпіди та низькомолекулярні сполуки, зокрема, метаболіти [10, 24, 36]. Є різні методи виявлення мутантних генів (qPCR, секвенування РНК і ДНК), специфічних протеїнів (мас-спектрометрія, ELISA та Вестерн-блот), ліпідів і метаболітів ВЕРХ, електрохімія, флуоресцентна спектроскопія та інші [21, 30-34, 37]. Найчастіше для клінічної діагностики використовують імунотести, спектроскопію, ПЛР, ВЕРХ тощо. Вважають, що визначення кількох біомаркерів (генетичних, протеїнових, мРНК і профілів ДНК чи метаболітів) різними методами допоможе покращити діагностику й індивідуальні схеми лікування.

Метаболоміка відкриває нові можливості для неінвазивної діагностики раку, аналізуючи метаболіти, що змінюються під час трансформації нормальних клітин у злоякісні [25, 36]. Серед метаболічних біомаркерів важливе місце займають катехоламіни, зокрема, дофамін, норадреналін і адреналін та їхні метаболіти: ванілілмигдалева (ВМК) та гомованілінова кислоти (ГБК) [10]. ВМК і ГБК є біомаркерами діагностики онкологічних захворювань – феохромоцитом та нейроblastом [10, 36], а 5-гідроксиіндолацетову кислоту (5-НІАА) (метаболіт серотоніну) використовують для виявлення карциноїдних пухлин. Підвищені рівні цих метаболітів у сечі можуть свідчити про наявність пухлини або інших патологій.

У цьому огляді розглянуто проблеми використання метаболітів катехоламінів і серотоніну (ГБК, ВМК, 5-НІАА) як біомаркерів раку. Для їхнього аналізу використано різні інструментальні підходи, зокрема, спектрофотометрію, флуоресценцію, ELISA, ВЕРХ і електрохімічний аналіз. ВЕРХ має високу чутливість і селективність, але потребує попередньої підготовки зразків. Така підготовка покращує чутливість, але збільшує вартість, складність і тривалість аналізу. Особливу увагу в недавніх дослідженнях приділено електрохімічним сенсорним методам, які не потребують складної пробопідготовки і складного устаткування, забезпечують швидкі й точні результати, що дуже важливо для ранньої детекції та моніторингу онкологічних захворювань. Основне завдання огляду — висвітлити основні методи аналізу біомаркерів-метаболітів пухлин (ГБК, ВМК і 5-НІАА) і оцінити їхню ефективність для неінвазивної діагностики нейрогенних пухлин, а також розглянути потенціал цих біомаркерів у скринінгу ранньої діагностики й у виборі стратегії лікування злоякісних новоутворень, у контролі відповіді на лікування, оцінці прогресування захворювання або у виявленні рецидивів раку.

Метаболіти як біомаркери раку

Злоякісну трансформацію клітин супроводжують перепрограмування метаболічних шляхів і зміна рівнів метаболітів. Дослідження цих змін і аналіз циркулюючих метаболітів у біологічних рідинах (таких як сеча, слина, кров, піт) відкривають нові можливості у розробці неінвазивних методів ранньої діагностики та моніторингу раку [23].

Окрім метаболічних біомаркерів, важливу роль у діагностиці відіграють генетичні, епігенетичні та протеомні маркери. Деякі з них вже успішно застосовують для скринінгу різних типів раку [6]. Наприклад, альфа-фетопротейн використовують для скринінгу гепатоцелюлярної карциноми, карциноембріональний антиген, полісахаридні антигени, простатоспецифічний антиген і лактатдегідрогеназу – для інших видів раку [6]. HER2 є маркером раку молочної залози та шлунка, EGFR – раку легенів і колоректального, KRAS – колоректального раку та раку підшлункової залози, BRAF – меланоми [24]. На сьогодні дедалі більшу увагу приділяють пошуку нових біомаркерів, таких як мікроРНК та інші РНК, протеїни,

циркулюючі нуклеосоми, циркулююча ДНК пухлини (ctDNA) та циркулюючі пухлинні клітини (СТС) [6]. Розробка неінвазивних методів раннього виявлення раку залишається одним із ключових завдань сучасної онкології. Зокрема, циркулюючі метаболіти мають багатообіцяючі перспективи як неінвазивні біомаркери у діагностиці й терапії раку [40]. Є багато доказів, що зміни метаболітів відіграють ключову роль у пухлиногенезі та метастазуванні й можуть бути використані як біомаркери для діагностики і терапії раку. Наприклад, ефект Варбурга (підвищений гліколіз), підвищений рівень лактату і транспортерів глюкози (GLUT1) є ознаками метаболічних змін для багатьох видів раку [24]. Раковим клітинам властивий змінений ліпідний метаболізм (підвищення рівня холестерину й експресії FASN) і амінокислотний обмін (підвищене поглинання глутаміну, порушення метаболізму серину та гліцину), що спостерігають, зокрема, у хворих із раком молочної залози та колоректальним раком [23, 40]. Останніми роками велику увагу приділяють дослідженню катехоламінів і їхніх метаболітів як потенційних біомаркерів нейроендокринних пухлин, що має важливе значення для клінічної діагностики [6, 40].

Метаболіти катехоламінів: гомованілінова і ванілілмигдальна кислоти

Катехоламіни — це біогенні аміни, які утворюються з тирозину через багатоступінчастий ензиматичний шлях (рис. 1). До них належать адреналін, норадреналін і дофамін. Ці катехоламіни синтезуються в мозковому шарі надниркових залоз, однак норадреналін також іще виробляється в постгангліонарних симпатичних волокнах, а дофамін — у надниркових залозах і периферичних симпатичних гангліях [3]. Нейроендокринні хромафінні клітини цих тканин здійснюють біосинтез катехоламінів, а їхнє виведення відбувається нирками та меншою мірою печінкою у формі їхніх метаболітів, зокрема, ГВК і ВМК. Синтез катехоламінів починається з L-тироzinу, який перетворюється на L-ДОФА, що, своєю чергою, декарбоксилюється до дофаміну. Останній може бути гідроксильований до норадреналіну і пізніше метильований до адреналіну. Катехоламіни інактивуються шляхом метилювання, утворюючи метанефрини, які можуть далі метаболізуватись до ВМК і ГВК [33, 34].



Рис. 1. Основні продукти метаболічного шляху катехоламінів

Визначення концентрацій ГВК та ВМК у сечі є важливим діагностичним методом для оцінки метаболізму катехоламінів [33, 34, 37] і ранньої діагностики захворювань центральної нервової системи та нейрогенних пухлин: нейробластоми, феохромоцитом, парагангліоми та інших пухлин нервового гребеня. Нейробластома є найпоширенішою нейроендокринною пухлиною дитячого віку (1 випадок на 100 000 осіб), що становить близько 7,8 % випадків дитячого раку в США та 6–10 % у Великобританії [10]. У 90 % дітей із нейробластою

спостерігають підвищені рівні ГВК і ВМК у сечі, що робить ці метаболіти високоспецифічними діагностичними маркерами [3, 21].

Своєчасна діагностика катехоламін-продукуючих пухлин відіграє важливу роль у запобіганні прогресуванню злоякісних новоутворень і зниженні рівня смертності на метастатичних стадіях хвороби. Крім того, низькі рівні ГВК у спинномозковій рідині можуть вказувати на депресію або хворобу Паркінсона, тоді як підвищені рівні ГВК у плазмі крові фіксують у пацієнтів із шизофренією. Це свідчить про важливість розробки високочутливих методів для визначення рівня ГВК у біологічних рідинах. Нормальні концентрації ГВК і ВМК у сечі становлять від 8,2 до 41,0 мкМ та від 11,6 до 28,7 мкМ, відповідно [33, 34].

В онкології аналіз катехоламінів і їхніх метаболітів є важливим інструментом для діагностики й моніторингу стану пацієнтів із нейроендокринними пухлинами. Надмірна продукція катехоламінів і їхніх метаболітів (ВМК, ГВК, метанефрини та ін.) є надійними біомаркерами нейробластоми й інших пухлин нервового гребеня. Близько 80 % пацієнтів із нейробластою мають підвищені рівні ВМК, ГВК і дофаміну в сечі, що використовують для встановлення клінічного діагнозу.

В Японії, Канаді, Австрії та Німеччині з 1980-х років проводять масовий скринінг безсимптомних немовлят у віці 3 тижні, 6 місяців і 1 рік [10]. Японія почала скринінг 6-місячних дітей на нейробластоми за допомогою аналізу рівнів ГВК та ВМК у 1984 р. [10]. Це свідчить про те, наскільки важливо розробляти методи визначення цих біомаркерів у біологічних рідинах, а також вивчати їхній взаємозв'язок з іншими біохімічними показниками.

Метаболіт серотоніну – 5-гідроксиіндолоцтова кислота

Серотонін (5-НТ) є моноаміновим нейромедіатором, який бере участь у регуляції настрою, сну, апетиту й інших фізіологічних процесів. Він синтезується з L-триптофану через 5-гідрокситриптофан до 5-НТ, який далі метаболізується до 5-НІАА за участі моноаміноксидази й альдегіддегідрогенази (рис. 2) [12]. 5-НТ, як і його основний метаболіт 5-НІАА, є важливими біомаркерами нейроендокринних пухлин, зокрема, карциноїдного синдрому, який характеризується такими симптомами як біль у животі, діарея, втрата маси тіла та почервоніння шкіри [18].



Рис. 2. Схема метаболізму триптофану до 5-НІАА

Карциноїдні пухлини можуть споживати до 60 % доступного триптофану, сприяючи надмірній продукції серотоніну, що зумовлює характерні клінічні прояви. Діагностика таких станів часто базується на визначенні рівня 5-НІАА у сечі [12]. Рівень 5-НІАА допомагає контролювати перебіг хвороби: низький рівень можна спостерігати під час лікування, тоді як високий – під час прогресування хвороби [18]. Значення, що перевищують 25 мг на

добу, є переконливим підтвердженням карциноми. Проте слід зазначити, що низькі рівні 5-НІАА у спинномозковій рідині асоціюються з агресивною поведінкою та ймовірним суїцидом [18]. Проводячи аналіз, важливо враховувати вплив лікарських засобів і продуктів харчування (зокрема, баклажанів, авокадо, бананів, ананасів, слив і горіхів), які можуть змінювати рівень серотоніну та, відповідно, впливати на достовірність результатів [39].

Інструментальні хроматографічні методи аналізу пухлинних біомаркерів

Методи аналізу катехоламінів і їхніх метаболітів розвивалися від колориметричних [1] і флуориметричних [17] до сучасних високоточних методів, таких як газова хромато-мас-спектрометрія (ГХ-МС) [15], високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [31], імуоензиматичний аналіз (ІФА) [26] та капілярний електрофорез (КЕ) [7]. КЕ забезпечує високу роздільну здатність і швидкість аналізу, але для метаболітів, таких як 5-НІАА, ГВК, ВМК (рис. 3), котрі мають подібну структуру, заряд і розмір, необхідна попередня обробка зразків [30]. Хоча світлодіодне та флуоресцентне детектування можуть покращити чутливість виявлення аналітів, їхнє широке використання обмежується високою вартістю обладнання.

ВЕРХ у поєднанні з іншими типами детекторів (УФ, ФЦ, електрохімічними) є одним із найпоширеніших методів аналізу кінцевих метаболітів [5, 28]. Флуоресцентне детектування забезпечує високу чутливість, хоча потребує спеціальних реагентів [42, 43]. Рідинна хроматографія – тандемна мас-спектрометрія (РХ-МС) є перспективним методом для аналізу біологічних зразків, забезпечуючи високу специфічність і швидкість [42, 43]. Метод ВЕРХ-ЕХ (з електрохімічним детектором) є ефективною альтернативою РХ-МС завдяки простішій підготовці зразків і нижчій вартості. Його застосовують для аналізу ГВК, ВМК і 5-НІАА в різних біологічних рідинах. Амперометричні сенсори демонструють високу чутливість і широкий лінійний діапазон, тоді як кулонометричні сенсори менш чутливі до зміни потоку і температури [24, 28]. Вольтамперометрія дає змогу проводити аналіз без попередньої модифікації електродів. Окиснення ВМК і ГВК на склокарбоновому електроді формує характерні піки, що допомагає розрізняти їх [32, 33]. Окиснення 5-НІАА має інший механізм, зазвичай пов'язаний з утворення хінонімінової структури. Більшість методів включає етап попередньої екстракції зразків для підвищення чутливості й селективності. ВЕРХ-ЕХ залишається перспективним інструментом для клінічної діагностики, хоча потребує подальшого вдосконалення для аналізу низьких концентрацій метаболітів у біологічних зразках.

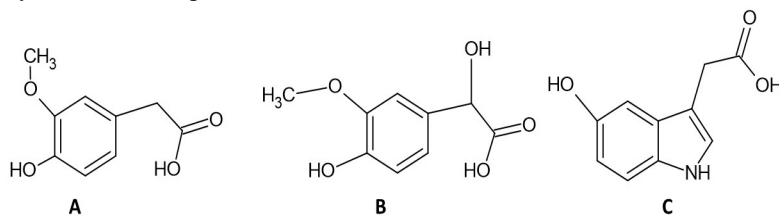


Рис 3. Структура пухлинних біомаркерів-метаболітів: ГВК (А), ВМК (В) та 5-НІАА (С) [38]

Електрохімічні сенсорні методи

Електрохімічні сенсорні методи відіграють ключову роль в аналізі пухлинних біомаркерів, забезпечуючи швидке, чутливе визначення під час використання невеликої кількості зразка без складної пробопідготовки. Основними підходами є вольтамперометрія (зокрема, циклічна вольтамперометрія (ЦВ) та диференційна пульс-вольтамперометрія (DPV)), потенціометрія й електрохімічна імпедансна спектроскопія. Ці методи ефективно застосовують для визначення метаболітів катехоламінів, таких як ГВК, ВМК і 5-НІАА (див.таблицю).

Електрохімічні сенсори для аналізу ВМК, ГМК і 5-НІАА

Аналіт	Полімерний шар/ електрод	Лінійний діапазон, мкМ	Нижня межа визначення, мкМ	Буфер	Потенціал, В	Метод	Посилання
ВМК	Основа Трегера/Гр	10–100	-	0,1 М	+0,54	DPV	13
ГВК		40–100		ФБ, pH 7,0	+0,28/		
ВМК	Нафіон/ СКЕ	8–100	2,4	0,1 М	+0,495	DPV	
ГВК				ФБ, pH 3,0	+0,540		
ВМК	Полі(нейтральний червоний)/СКЕ	4–10	1,1	0,1 М	+0,495	DPV	36
ГВК				ФБ, pH 3,0	+0,540		
ВМК	BDD електрод	2–100	0,4	0,1 М	+1,005	DPV	
ГВК				ФБ, pH 3,0	+0,835		
ВМК	Поліаміно-саліцилова кислота/PGE	0,5–15,4	0,28	0,1 М	-	DPV	34
ГВК		3–61,4		ФБ, pH 8			
ВМК	Похідна сечовини/ГЕ	9,96–158	1,99	0,1 М	+0,680	DPV	3
ГВК		9,96–624		ФБ, pH 6,0	+0,532		
ВМК	СКЕ	10–100	0,9	0,1 М	+0,5	DPV	4
ГВК		10–100		ФБ, pH 3,	+0,542		
5-НІАА		1,58–58,6	0,9		+0,7	SWV	
ВМК					+0,640		
ГВК	Друкований електрод	0,2–100	0,8	0,04 М БРБ, pH 3,0	+0,380	DPV	4, 12, 5
5-НІАА					+0,270		
ВМК	MWCNTs-PtNPs/СКЕ	0,5–80	0,173	0,1 М	+0,290	DPV	8
ГВК		0,2–80		ФБ, pH 7,0	+0,100		
ГВК	Origami 3D-ePAD/ GQDs@dual-MIP	0,001–25	0,047	0,04 М	+0,450	SWV	
5-НІАА				БРБ, pH 2,0	+0,450		
ВМК	Композитний електрод з карбонової плівки	1–100	0,60		+0,840	DPV	27
ГВК		0,8–100		БРБ, pH 2,0	+0,720		
5-НІАА	Лейцин-золь-гель	0,4–100	0,1	0,1 М	+0,450	ЦВ та DPV	20
ГВК				ФБ, pH 2,0			
ВМК	Оксид графену та полі(L-треонін)/SPCE	0,05–10	0,157	0,1 М ФБ, pH 7,0	+0,360	SWV	4
ГВК				0,1 М	+0,604		
ГВК	Полі(аліза-риновий червоний)/СКЕ	0,075–0,160	0,006	ФБ, pH 3,0	+0,446	DPV	2
ГВК				0,1 М			
ГВК	Cu/СКЕ	-	0,01	ФБ, pH 7,2	+0,590	SWV	19
ГВК				0,1М ЛК/ 0,2HCl			
ГВК	MIP/СКЕ	7,0 10 ⁻³	-	0,1 pH 1,1	+0,810	DPV	27
ГВК				БРБ, pH 2,0	+0,720		
ГВК	Електрод з карбонової пасти/(CPE)	-	0,4	0,2 М АБ, pH 2,0		DPV	14
5-НІАА							
5-НІАА	ОСКЕ	-	0,92			SWV	5
5-НІАА							
5-НІАА	Fe ₃ O ₄ @MIP/SPE	1–50	1,4	-	+0,25	DPV	9
5-НІАА		5 10 ⁻⁵ - 50		-	+0,500		
5-НІАА	MIPPy/СКЕ	0,5–200	0,022	-	+0,420	SWV	23
5-НІАА				-			
5-НІАА	AuHCl/SPC	0,01–100	0,001	-	+500	SSWV	9
5-НІАА				-			
5-НІАА	p(BG)/GNRs /PG	0,05–200	0,003	-	+296	SWV	
5-НІАА				-			
5-НІАА	PtMn NF/ГЕ	0,3–15	0,16	0,05 М	-200	Амп.	11
5-НІАА				АБ, pH 4,0			

Примітки: ГЕ – графітовий електрод; СКЕ – склокарбоновий електрод; БРБ – буфер Бріттона–Робінсона; ФБ – фосфатний буфер; АБ – ацетатний буфер; ЛК – лимонна кислота; ХА –

хроноамперометрія; полі-аміносаліцилова кислота/PGE – модифікований полі-4-аміносаліциловою кислотою графіт олівцевий електрод; OSCE – окиснений склокарбоновий електрод; SPEs – друкований електрод; SPCE – друкований карбоновий електрод; ITO – оксид індій-олово електрод; NGITO – модифікований НЧ золота електрод з оксиду індію та олова; MIP – молекулярно-імпринтований полімер, MIPP – молекулярно-імпринтований поліпірол; BDDE – алмазний електрод, легований бором; SWV – квадратно-хвильова вольтамперометрія; p(P3CA)/Pt/f-CNF – полі(пірол-3 карбонова кислота на платинізованих карбонових нановолокнах, Fe_3O_4 @MIP – полімер із молекулярним відбитком на основі магнітних НЧ; Origami 3D-ePAD/GQDs@dual-MIP – тривимірний електрохімічний аналітичний Оригамі на основі паперу, модифікований графеновими квантовими точками, покритими полімером з молекулярним відбитком, p-BG/GNRs – графенові нанострічки/полі/бромкрезоловий зелений; ЦВ – циклічна вольтаперограма; SSWV – стріпінг-вольтаметрія, DPV – диференційна імпульсна вольтамперометрія; OSWV – прямокутна вольтамперометрія Остерюнга; Амр. – амперометрія

Модифікація електродів плівками міді [19], методом електрополімеризації Alizarin Red S [2] або суміші 3-аміно-5-меркапто-1,2,4-тріазолу з карбоновими нанотрубками дає змогу значно підвищити селективність і чутливість визначення ГВК. Інші підходи, такі як електрополімеризація за наявності mIBG, α -циклодекстрину, L-лейцину чи 4-аміносаліцилової кислоти (ASA), покращують розділення аналітів і знижують межі визначення [4, 20, 34, 35]. Дослідження також показали, що альтернативні полімерні плівки на основі похідних кумарину, біс(дикарболіду) кобальту, сечовини [13], а також оксиду графену з полі-L-треоніном [4], демонструють широкий лінійний діапазон і низькі межі виявлення треоніну. Електрод, модифікований полі(*n*-амінобензойної кислоти) (P-pABA), ефективно використовують для одночасного визначення 5-НІАА, 5-НТ і ГВК [29]. Для електрода, модифікованого золь-гелем на основі L-лейцину, показано, що електрохімічне окиснення ГВК відбувається у два етапи: перший відповідає окисненню, а другий – утворенню хінону [20]. Перший цикл ЦВ демонструє три піки: відновлення ($E_{a2}=160$ мВ), окиснення ($E_{c2}=390$ мВ) і другий пік окиснення ($E_{l1}=733$ мВ). Це свідчить, що молекула ГВК має два електрохімічно активні центри: один зазнає необоротного окиснення (733 мВ/SCE), тоді як інший – квазіоборотного окиснення/відновлення. Під час окиснення ГВК можливе утворення олігомерів (димери, тримери і тетрамери) внаслідок димеризації радикалів. Спочатку утворюється катіон-радикал, який на другій стадії вступає в реакцію з іншим радикалом або з неактивною молекулою.

Окиснення ВМК також має два піки окиснення. Після окиснення ($-2e^-$, $-H^+$) спостерігають таутомеризацію з утворенням карбокатиона, який легко декарбоксилюється з утворенням ваніліну. Останній, своєю чергою, окиснюється ($-2e^-$, $-H^+$) з утворенням похідних *o*-хінону. Електрохімічна поведінка ГВК і ВМК суттєво залежить від рН розчину й типу модифікованого електрода: склокарбоновий (СКЕ), алмазний електрод, легований бором (BBD); композитні карбонові плівки; карбонова паста, друковані електроди [5, 14, 27]. Окиснення 5-НІАА на СКЕ супроводжується утворенням катіон-радикала, що може декарбоксилюватися або формувати димер. За потенціалу понад 0,7 В формується 4,5-дигідроксиіндол-3-оцтова кислота. Висока чутливість OSCE до 5-НІАА зумовлена взаємодією функціональних груп з оксигеновмісними групами поверхні електрода.

Намагаючись віднайти принципово нові сенсорні матеріали, дослідники досягли значного прогресу в розробці полімерів з молекулярним імпринтом (MIP), які стали основою створення «розумних» сенсорів для детекції біомаркерів раку. Такі сенсори є надійними і потужними сучасними аналітичними інструментами, що мають переваги у селективності та стабільності [27, 36], порівняно з ензимами, нанозимами [9], антитілами і природними рецепторами. Метод молекулярного імпринтингу передбачає формування полімерної матриці за наявності цільового аналіту, який виконує роль шаблону. Функціональні

мономери полімеризуються за допомогою крос-лінкера, утворюючи стабільні біоміметичні матриці. Після видалення шаблонної молекули у полімері залишаються специфічні порожнини, здатні селективно зв'язуватися з цільовими аналітами (маркерами), що забезпечує високу специфічність аналізу (рис. 4). Електрополімеризація МІР на електродах є важливим досягненням, оскільки вона істотно знижує вартість, підвищує ефективність і прискорює аналіз завдяки мінімізації у підготовці зразків і реагентів [9, 14, 27, 36] (рис. 4).

МІР-сенсори, завдяки високій специфічності й чутливості, мають великі перспективи у клінічній діагностиці. Останні дослідження підтверджують їхнє успішне використання для окремого або одночасного аналізу кількох біомаркерів [27, 36]. Так, К. Сомнет зі співавторами розробив багатошаблонні полімери [36], які допомагають сенсорам виявляти ВМК та 5-НІАА одночасно в одному зразку [36]. Використання різних наноматеріалів, зокрема, графенових квантових точок [36] або нанокompозитів, збільшує площу поверхні, електропровідність, що значно підвищує чутливість сенсорів.

Електрохімічні сенсори на основі МІР дають високі показники чутливості й селективності та відкривають широкі можливості для діагностики захворювань. Зокрема, нові сенсори з подвійним імпринтингом на наносферах кремнезему з наночастинками Аргентуму ($\text{SiO}_2@\text{AgNPs}$) [29] чи НЧ Ауруму з графеновими квантовими точками (GQDs-AuNPs) [36] дають змогу аналізувати 3-нітротирозин (3-NT) і 8-гідроксидезоксигуанозин (8-OHdG) [9], а також 3-NT і 4-нітрохінолін-N-оксид (4-NQO) [9, 36]. Сенсор GQDs@dual-MIP/SPGE із подвійним відбитком для одночасного аналізу 5-НІАА та ВМК у зразках сечі та плазми був створений за використання 3-(3-амінопропіл)триетоксисилану (APTES) як функціонального мономера у співполімеризації з тетраетилортосиликатом (TEOC) та інтеграції в Origami у формі тривимірного дизайну 3D-ePAD [36]. Квантові точки GQD слугували ефективним ядром для оболонки 5-НІАА та ВМК, бо він має велику площу поверхні й електропровідність, що забезпечує високошвидкісний транспорт електронів завдяки квантовому обмеженню і кращій взаємодії за допомогою π - π кон'югації та поверхневих груп на його поверхні, а також сприяє збільшенню кількості сайтів імпринтингу.

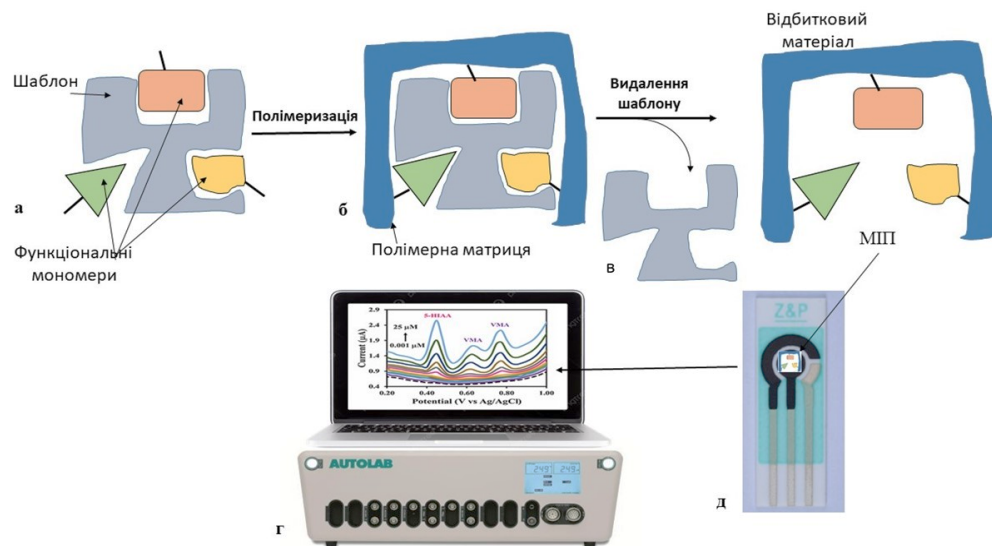


Рис. 4. Схема створення та застосування МІР-сенсора: а – приготування МІР суміші; б – формування МІР шару; в – видалення шаблонної молекули з МІР; г – виявлення цільових молекул; д – МІР-сенсор

МІР-сенсори перспективні для клінічної діагностики завдяки високій специфічності й чутливості. Їх успішно застосовують для одночасного аналізу кількох біомаркерів, зокрема, ВМК та 5-НІАА, в одному зразку [27, 36]. Використання наноматеріалів (графенових квантових точок (GQDs) [36] чи нанокомпозитів) або подвійного імпринтингу на основі наносфер кремнезему з НЧ Аргентуму ($\text{SiO}_2\text{@AgNPs}$) чи НЧ Ауруму з GQDs (GQDs-AuNPs) [11, 29, 36] підвищує чутливість і дає змогу аналізувати кілька біомаркерів одночасно. Наприклад, $\text{GQDs@dual-MIP/SPGE}$ ефективно використовують для одночасного аналізу 5-НІАА і ВМК у зразках сечі та плазми [9, 27], забезпечуючи високу чутливість завдяки великій площі поверхні й електропровідності GQDs.

Таким чином, використання МІР у поєднанні з нанотехнологіями суттєво покращує характеристики сенсорів для кількісного визначення біомаркерів раку, що відкриває широкі перспективи їхнього використання у діагностиці захворювань і моніторингу ефективності лікування.

Онкологічні захворювання суттєво змінюють внутрішньоклітинний метаболізм, сприяючи росту злоякісних клітин. Метаболоміка дає змогу визначити ключові метаболіти, які можуть слугувати неінвазивними біомаркерами для діагностики онкології. Метаболіти біогенних амінів, такі як ВМК, ГВК і 5-НІАА, є ключовими біомаркерами для діагностики та моніторингу нейроендокринних пухлин, таких як феохромоцитома, нейробластома і карциноїдні пухлини.

У статті розглянуто важливість кількісного визначення цих метаболітів у біологічних рідинах для ранньої діагностики та моніторингу онкологічних захворювань. Крім метаболічних біомаркерів, важливу роль відіграють також генетичні, епігенетичні, протеомні маркери, а деякі з них вже успішно застосовують для раннього скринінгу раку. Своєчасна діагностика катехоламін-продукуючих пухлин має важливе значення у запобіганні розвитку злоякісних новоутворень і зниженню смертності на метастатичних стадіях хвороби.

У статті висвітлено різні аналітичні методи визначення біомаркерів, зокрема, спектрофотометрію, флуоресценцію, мас-спектрофотометрію, електрофорез, інструментальні хроматографічні методи й електрохімічні підходи. ВЕРХ забезпечує високу чутливість і селективність, але потребує складної підготовки зразка, що збільшує вартість і тривалість аналізу. Натомість, електрохімічні методи забезпечують швидкий і точний аналіз без складної підготовки зразка, що робить їх придатними для використання у клінічній діагностиці.

Ключовою перевагою електрохімічних сенсорів є можливість швидкого і високочутливого виявлення біомаркерів завдяки модифікації поверхні електродів наноматеріалами або молекулярно-імпринтованими полімерами. Останні забезпечують високу селективність, що робить їх перспективними для клінічного застосування в ранній діагностиці, оцінці ефективності терапії та моніторингу перебігу захворювання. Розвиток і вдосконалення методів кількісного визначення пухлинних біомаркерів, зокрема, завдяки використанню інноваційних неінвазивних підходів, є важливим кроком на шляху до більш ефективної та своєчасної діагностики онкологічних захворювань, що може значно покращити результати лікування і прогноз для пацієнтів.

Розкриття інтересів

Автори заявляють, що конфлікту інтересів немає.

Подяки

Ця робота підтримана: ІІЕ Scholar Rescue Fund, НФД України (№ 2021.01/0010), Simons Foundation (No. 1030281), IMPRESS-U (УНТЦ 7113).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Allenbrand R., Garg U. Quantitation of homovanillic acid (HVA) and vanillylmandelic acid (VMA) in urine using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) // Clin. Appl. Mass. Spectrom. 2010. P. 261–269.
2. Antherjanam S., Saraswathyamma B., Kumar S. M. S. Simultaneous electrochemical determination of the tumor biomarkers homovanillic acid and vanillylmandelic acid using a modified pencil graphite electrode // Microchem. J. 2023. Vol. 190. P. 108659. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108659>.
3. Balakrishna P., George S., Hatoum H., Mukherjee S. Serotonin Pathway in Cancer // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22 (3). P. 1268. doi.org/10.3390/ijms22031268
4. Baluchová S., Barek J., Tomé L. I. et al. Vanillylmandelic and homovanillic acid: Electroanalysis at non-modified and polymer-modified carbon-based electrodes // J. Electroanal. Chem. 2018. Vol. 821. P. 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.03.011>
5. Clark Z. D., Cutler J. M., Pavlov I. Y. et al. Simple dilute-and-shoot method for urinary vanillylmandelic acid and homovanillic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry // Clin. Chim. Acta. 2017. Vol. 468. P. 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.03.004>
6. Das S., Dey M. K., Devireddy R., Gartia M. R. Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis // Sensors. 2024. Vol. 24 (1). P. 37. doi.org/10.3390/s24010037
7. De Benedetto G. E., Fico D., Pennetto A. et al. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. Vol. 98. P. 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.039>
8. Dejmekova H., Adamkova H., Barek J., Zima J. Voltammetric and amperometric determination of selected catecholamine metabolites using glassy carbon paste electrode // Mon. Chem. 2017. Vol. 148. P. 511–515. doi.org/10.1007/s00706-016-1902-8
9. Demkiv O., Nogala W., Stasyuk N. et al. Laccase mimetics as sensing elements for amperometric assay of 5-hydroxyindoleacetic acid in urine // Bioelectrochemistry. 2024. Vol. 108839. doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108839
10. Eisenhofer G., Peitzsch M., Bechmann N., Huebner A. Biochemical Diagnosis of Catecholamine-Producing Tumors of Childhood: Neuroblastoma, Pheochromocytoma and Paraganglioma // Front. Endocrinol. 2022. Vol. 13. P. 901760. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.901760>
11. Elugoke S. E., Adekunle A. S., Fayemi O. E. et al. Molecularly imprinted polymers (MIPs) based electrochemical sensors for the determination of catecholamine neurotransmitters—Review // Electrochem. Sci. Adv. 2021. Vol. 1 (2). doi.org/10.1002/elsa.202000026
12. Ewang-Emukowhate M., Nair D., Caplin M. The role of 5-hydroxyindoleacetic acid in neuroendocrine tumors: the journey so far // Int. J. Endocrine Oncol. 2019. Vol. 6. <https://doi.org/10.2217/ije-2019-0001>
13. Fu B., Chen H., Yan Z. et al. A simple ultrasensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in human urine based on MWCNTs-Pt nanoparticles as peroxidase mimics // J. Electroanal. Chem. 2020. Vol. 866. P. 114165. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114165>
14. Gupta P., Goyal R. N., Shim Y. B. Simultaneous analysis of dopamine and 5-hydroxyindoleacetic acid at nanogold modified screen printed carbon electrodes // Sens. Actuators B Chem. 2015. Vol. 213. P. 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.066>
15. Hassanpour-Sabet R., Seyfinejad B., Khostowshahi E.M. et al. UiO-66-based metal-organic framework for dispersive solid-phase extraction of vanillylmandelic acid from urine before

- analysis by capillary electrophoresis¹ // RSC Adv. 2022. Vol. 12 (44). P. 28728–28737. doi.org/10.1039/D2RA02916B
16. *Hatefi-Mehrjardi A., Ghaemi N., Karimi M. A.* et al. Poly-(alizarin red S)-modified glassy carbon electrode for simultaneous electrochemical determination of levodopa, homovanillic acid and ascorbic acid // *Electroanalysis*. 2014. Vol. 26. P. 2491–2500. doi.org/10.1002/elan.201400302
17. *Issaq H. J., Delviks K., Janini G. M., Muschik G. M.* Capillary zone electrophoretic separation of homovanillic and vanillylmandelic acids // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1992. Vol. 15 (18). P. 3193–3201. doi.org/10.1016/s0003-2670(02)00241-6
18. *Balakrishna P., George S., Hatoum H., Mukherjee S.* Serotonin Pathway in Cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22 (3). P. 1268. doi:10.3390/ijms22031268
19. *Khamlichi R. E., Bouchta D., Anouar E. H.* et al. A novel l-leucine modified sol-gel-carbon electrode for simultaneous electrochemical detection of homovanillic acid, dopamine and uric acid in neuroblastoma diagnosis // *Mater. Sci. Eng C*. 2017. Vol. 71. P. 870–878. doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.076
20. *Kodakat K., Kumar K. G.* Fabrication and comprehensive comparison of the performance of chemically modified GCE and SPCE for the simultaneous determination of uric acid and vanillylmandelic acid // *Microchem. J.* 2024. Vol. 197. P. 109767. https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109767
21. *Komarnicki P., Musialkiewicz J., Stańska A.* et al. Circulating Neuroendocrine Tumor Biomarkers: Past, Present and Future // *J. Clin. Med.* 2022. Vol. 11. P. 5542. doi.org/10.3390/jcm11195542
22. *Kovac A., Somikova Z., Zilka N., Novak M.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of panel of neurotransmitters in cerebrospinal fluid from the rat model for tauopathy // *Talanta*. 2014. Vol. 119. P. 284–290. doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.027
23. *Liu S., Chen Y., Wan P.* et al. Determination of 5-hydroxyindole acetic acid by electrochemical methods with an oxidized glassy carbon electrode // *Electrochim. Acta*. 2016. Vol. 216. P. 528–534. doi.org/10.1016/j.electacta.2016.09.001
24. *Makrlíková A., Ktena E., Economou A.* et al. Voltammetric determination of tumor biomarkers for neuroblastoma (homovanillic acid, vanillylmandelic acid, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid) at screen-printed carbon electrodes // *Electroanalysis*. 2017. Vol. 29. P. 146–153.
25. *März J., Kurlbaum M., Roche-Lancaster O.* et al. Plasma Metabolome Profiling for the Diagnosis of Catecholamine Producing Tumors // *Front Endocrinol.* 2021. Vol. 12. P. 722656. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.722656
26. *Matser Y. A. H., Verly I. R. N., van der Ham M.* et al. Optimising urinary catecholamine metabolite diagnostics for neuroblastoma // *Pediatr Blood Cancer*. 2024. Vol. 71 (11). https://doi.org/10.1002/pbc.30289
27. *Moncer F., Adhoum N., Catak D., Monser L.* Electrochemical sensor based on MIP for highly sensitive detection of 5-hydroxyindole-3-acetic acid carcinoid cancer biomarker in human biological fluids // *Anal. Chim. Acta*. 2021. Vol. 1181. P. 338925. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338925
28. *Němečková-Makrlíková A., Navrátil T., Barek J.* et al. Determination of tumor biomarkers homovanillic and vanillylmandelic acid using flow injection analysis with amperometric detection at a boron doped diamond electrode // *Anal. Chim. Acta*. 2019. Vol. 1087. P. 44–50. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.062

29. Nontawong N., Ngaosri P., Chunta S. et al. Smart sensor for assessment of oxidative/nitrative stress biomarkers using a dual-imprinted electrochemical paper-based analytical device // *Anal. Chim. Acta*. 2022. Vol. 1191. P. 339363. <https://doi.org/10.1016/j.ca.2021.339363>
30. Pantiya P., Guiard B. P., Gotti G. Sensitive and fast detection of monoamines and their metabolites by high-performance liquid chromatography coupled with an electrochemical detector (HPLC-ECD) under isocratic conditions: Application to intracerebral microdialysis in mice treated with fluoxetine and atomoxetine // *Chromatographia*. 2024. Vol. 87 (3). P. 175–185. doi.org/10.1007/s10337-023-04309-5
31. Premnath M. S., Zubair M. Laboratory Evaluation of Tumor Biomarkers // *StatPearls. Treasure Island*. 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583032>
32. Saracino M. A., Gerra G., Somaini L. et al. Chromatographic analysis of serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid and homovanillic acid in dried blood spots and platelet poor and rich plasma samples // *J. Chromatogr A*. 2010. Vol. 1217 (29). P. 4808–4814. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.031>
33. Saracino M. A., Santarcangelo L., Raggi M. A., Mercolini L. Microextraction by packed sorbent (MEPS) to analyze catecholamines in innovative biological samples // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. Vol. 104. P. 122–129. doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.003
34. Shishkanova T. V., Broncová G., Fitl P. et al. Voltammetric detection of catecholamine metabolites using Tröger's base modified electrode // *Electroanalysis*. 2018. Vol. 30 (4). P. 734–739. doi.org/10.1002/elan.201700635
35. Shishkanova T. V., Králík F., Synytsya A. Voltammetric detection of vanillylmandelic acid and homovanillic acid using urea-derivative-modified graphite electrode // *Sensors*. 2023. Vol. 23 (7). P. 3727. <https://doi.org/10.3390/s23073727>
36. Somnet K., Chimjarn S., Wanram S. et al. Smart dual imprinted Origami 3D-ePAD for selective and simultaneous analysis of vanillylmandelic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid carcinoïd cancer biomarkers using graphene quantum dots coated with dual molecularly imprinted polymers // *Talanta*. 2024. Vol. 269. P. 125512. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125512>
37. Suri G. S., Kaur G., Carbone G. M., Shinde D. Metabolomics in oncology // *Cancer Rep*. 2023. Vol. 6 (3). doi.org/10.1002/cnr2.1795
38. Taran F., Frobert Y., Créminon C. et al. Competitive enzyme immunoassay with monoclonal antibody for homovanillic acid measurement in human urine samples // *Clin Chem*. 1997. Vol. 43 (2). P. 363–368. doi.org/10.1016/S0009-8981(97)00092-2
39. Uchikura K. Fluorometric determination of urinary Vanilmandelic acid and Homovanillic acid by high performance liquid chromatography after electrochemical oxidation // *Anal. Sci*. 1990. Vol. 6 (3). P. 351–354. doi.org/10.2116/analsci.6.351
40. Wang W., Rong Z., Wang G. et al. Cancer metabolites: promising biomarkers for cancer liquid biopsy // *Biomark Res*. 2023. Vol. 11. P. 66. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00507-3>
41. Zhao H. X., Mu H., Bai Y. H. et al. A rapid method for the determination of dopamine in porcine muscle by pre-column derivatization and HPLC with fluorescence detection // *J. Pharm. Anal.* 2011. Vol. 1 (3). P. 208–212. doi:10.1016/j.jpha.2011.04.003.

Стаття надійшла до редакції 05.03.25

доопрацьована 08.05.25

прийнята до друку 17.05.25

**SEROTONIN AND CATECHOLAMINE METABOLITES
AS TUMOR BIOMARKERS:
CURRENT ADVANCES IN INSTRUMENTAL ANALYSIS METHODS**

O. Demkiv^{1*}, N. Stasyuk¹, Y. Naum¹, M. Klepach², Z. Maslyak³, M. Gonchar^{1,2}

*¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

*²Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University
24, I. Franko St., Drohobych 82100, Ukraine*

*³SI „Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine, NAMS of Ukraine“
45, Heneral Chuprynka St., Lviv 79000, Ukraine*

**Corresponding author: olgademkiv81@gmail.com*

Oncological diseases remain a leading cause of death worldwide. Early cancer diagnosis is crucial for improving patient treatment outcomes. Recently, there has been significant interest in non-invasive detection of tumor biomarkers in biological fluids. These biomarkers range from simple molecules like catecholamines to complex compounds such as proteins, hormones, enzymes, antigens, mRNA, microRNA, and DNA profiles. Catecholamines and their metabolites, particularly vanillylmandelic acid (VMA) and homovanillic acid (HVA), as well as serotonin's metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), are key metabolic biomarkers. Determination of the level of these acids in biological fluids is used for early diagnosis of diseases of the neurogenic tumors, in particular, neuroblastoma, pheochromocytoma, paraganglioma. Determination of 5-HIAA content in daily urine is used in the diagnosis of carcinoid tumors.

This review compares methods for detecting tumor biomarkers in human biological fluids. Various instrumental approaches, including spectrophotometry, fluorescence, HPLC, and electrochemical methods of analysis are used for analysis of VMA, HVA, and 5-HIAA. HPLC provides a high sensitivity, though it requires sample preparation, which may significantly increase the cost, complexity, and time of analysis. Electrochemical methods, in particular, sensors based on molecularly imprinted polymers (MIP), are an alternative that does not require complex sample preparation and allows a high accuracy and fast measurement. The inclusion of nanomaterials or MIP in to the recognition layer the sensors increases the sensitivity and selectivity of electrodes, making them promising. The development and improvement of methods for the quantitative analysis of biomarkers open up new opportunities for non-invasive cancer diagnostics, individualizing treatment approaches and monitoring of patients.

Keywords: biomarkers, biogenic amines, 5-hydroxyindoleacetic acid, vanillylmandelic acid, homovanillic acid, cancer diagnostics