

УДК 57.088.1

## АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ СЛОЯ БИОМОЛЕКУЛ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ

© 2020 г. М.В. Волкова, В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, С.А. Бирюков,  
Е.В. Горина, Г.И. Фильков, М.О. Дурманов

\*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),  
141701, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

E-mail: [durmanov.mo@mipt.ru](mailto:durmanov.mo@mipt.ru)

Поступила в редакцию 12.08.2020 г.

После доработки 18.08.2020 г.

Принята к публикации 20.08.2020 г.

Количественное определение цитокинов, хемокинов, факторов роста и других растворимых белковых молекул в различных биологических жидкостях является рутинной задачей современной диагностики и биомедицины, однако существующие в настоящее время методы анализа включают в себя несколько этапов и занимают продолжительное время. В работе представлен протокол, позволяющий с помощью метода интерферометрии слоя биомолекул определить в течение нескольких минут концентрацию аналита в пробе. В качестве модельной системы были использованы кондиционированные среды, полученные от мезенхимальных стволовых клеток мыши, выращенных в условиях нормоксии и гипоксии в виде монослоя, 3D-клеточных листов или в виде 3D-сфероидов, в которых определяли концентрацию VEGF-A (фактора роста эндотелия сосудов). Метод показал высокую чувствительность (как минимум 0.10 нг VEGF-A в мл). Полученные значения концентраций VEGF-A в кондиционированных средах мезенхимальных стволовых клеток оказались близки к величинам, определенным с помощью иммуноферментного анализа. С использованием интерферометрии слоя биомолекул было обнаружено достоверное увеличение продукции VEGF-A в 2.5–3.0 раза сфероидами и клеточными листами мезенхимальных стволовых клеток по сравнению с клетками, выращенными в монослое. Таким образом, разработанный протокол позволил адаптировать метод интерферометрии слоя биомолекул для быстрого количественного анализа факторов роста в кондиционированных средах.

*Ключевые слова:* интерферометрия слоя биомолекул, биосенсор, мезенхимальные стволовые клетки, кондиционированная среда, 3D-культура клеток, фактор роста эндотелия сосудов.

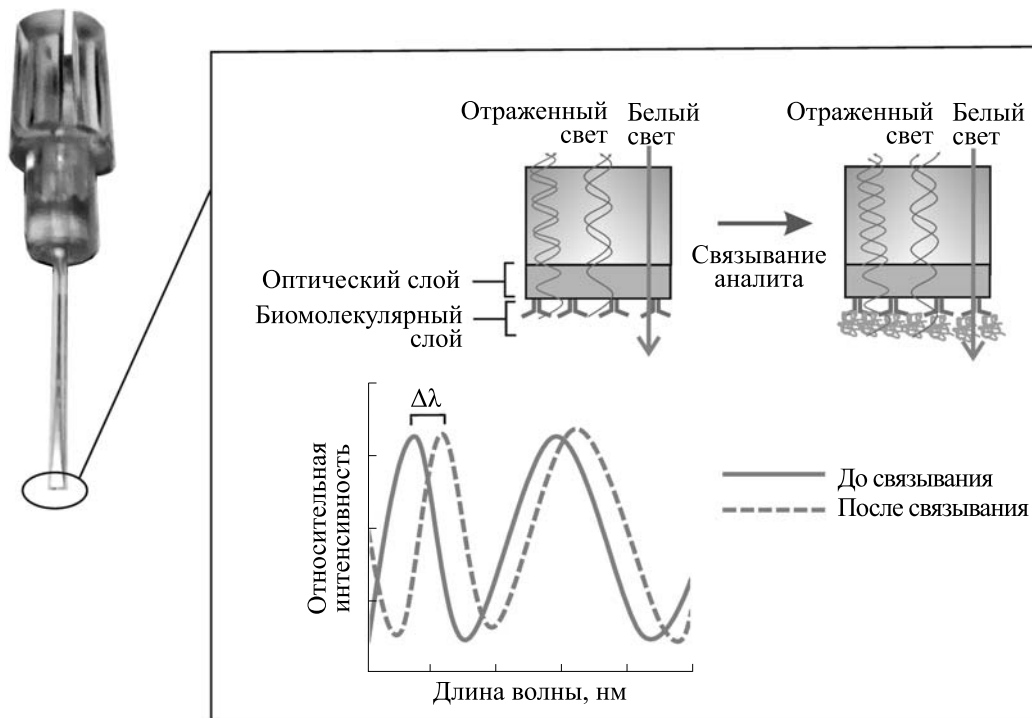
DOI: 10.31857/S0006302920060083

В настоящее время в современной диагностике и биомедицинских исследованиях существует ряд методов для оценки количественного содержания растворимых белков в биологических жидкостях. К таким подходам относят иммуноферментный и мультиплексный анализы, а также радиоиммунный метод. Как правило, процедура детекции с помощью этих способов занимает длительное время либо подразумевает применение дорогостоящего оборудования. В связи с

этим происходит усовершенствование текущих рутинных методов анализа, а также ведется разработка новых.

Метод интерферометрии слоя биомолекул (BLI, Bio-Layer Interferometry) появился относительно недавно и с успехом был использован для количественной оценки взаимодействий «белок–нуклеиновая кислота» и «белок–белок» [1]. В данной технологии применяются оптоволоконные чипы, имеющие на конце оптический слой, на внешней поверхности которого находится связанный слой биомолекул (рис. 1). Принцип метода основан на регистрации пучков белого света, отраженных от внутренней границы раздела оптического слоя и от биомолекулярного слоя. Данные пучки интерферируют между собой, в ре-

*Сокращения:* BLI – интерферометрия слоя биомолекул (Bio-Layer Interferometry), BLItz – система регистрации интерферометрии слоя биомолекул, VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов А (Vascular Endothelial Growth Factor A), МСК – мезенхимальные стволовые клетки, PBS – фосфатно-буферный раствор (Phosphate Buffer Solution).



**Рис. 1.** Схема принципа метода BLI. Спектрометр регистрирует в реальном времени сдвиг интерферентного паттерна ( $\Delta\lambda$ ), величина которого возрастает пропорционально утолщению биомолекулярного слоя биосенсора в результате связывания молекул анализита.

зультате чего получается характерный спектр, называемый интерферентным паттерном. При связывании молекул анализита с иммобилизованными на поверхности чипа лигандами толщина биомолекулярного слоя увеличивается во времени в соответствии с кинетикой межмолекулярных взаимодействий. Изменение толщины биомолекулярного слоя в результате связывания лиганда и анализита приводит к пропорциональному увеличению величины спектрального сдвига ( $\Delta\lambda$ ) интерферентного паттерна, которая и регистрируется спектрометром в реальном времени [2].

Система регистрации интерферометрии слоя биомолекул (BLItz) предполагает использование оптоволоконных чипов, содержащих на своей поверхности различные варианты молекул для иммобилизации биомолекул, связывающих анализит, или для детекции анализита напрямую. Например, для присоединения аналитсвязывающих белков, имеющих в своем составе His-tag, или нуклеиновых кислот, помеченных биотином, могут быть использованы чипы с покрытием из Ni-NTA [3] или стрептавидина [4] соответственно. Если анализитом являются антитела, то для их детекции можно применить чипы, покрытые протеином А или протеином G [1]. В подавляющем большинстве случаев система BLItz используется для оценки кинетики связывания/диссоциации [5, 6], а также скрининга сродства макромолекул

аналитов к иммобилизованному на чипе белку или нуклеиновой кислоте [4, 7, 8].

В данной работе мы адаптировали метод BLI для оценки количественного содержания факторов роста в биологических жидкостях. Разработанный протокол позволил измерить содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) в кондиционированных средах от мезенхимальных стволовых клеток в течение нескольких минут в расчете на один образец.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные согласно стандартному протоколу выделения из красного костного мозга самцов мышей Balb/c (пос. Столбовая Московской области, Россия), выращивали в среде DMEM (Gibco, США) с 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), заменимыми аминокислотами (Capricorn Scientific, Германия) и 50 мкг в мл гентамицина (Дальхимфарм, Хабаровский край, Россия). Культивирование МСК в условиях нормоксии проводили при 37°C в атмосфере 21% кислорода, 5% углекислого газа и влажности 95% в инкубаторе Smart Biotherm (Biosan, Латвия). В условиях гипоксии МСК содержали в мультигазовом инкубаторе CB150 (Binder, Германия) при 37°C в атмосфере с

5% кислорода, 5% углекислого газа и влажности 95%.

**3D-культуры мезенхимальных стволовых клеток.** Сфероиды МСК выращивали в агарозных вставках, полученных с использованием Micro-Tissues 3D Petri dish micromolds (Z764019, Sigma Aldrich, США). В агарозные вставки вносили по 150 мкл среды, содержащей 16000 клеток. Культивирование сфероидов осуществляли в условиях нормоксии в течение четырех суток. Для получения листов из МСК клетки высевали на шести-луночные планшеты в количестве 300000 клеток на лунку и инкубировали до достижения монослоя. После этого питательную среду заменяли на среду аналогичного состава, дополнительно содержащую аскорбиновую кислоту (PanReac, Испания) в концентрации 50 мкг/мл, и культивировали еще в течение семи суток.

**Получение кондиционированных сред.** Для получения кондиционированных сред от МСК, культивируемых в условиях гипоксии с 5% кислорода или в условиях нормоксии с 21% кислорода, клетки высевали на шести-луночные планшеты в количестве 250000 клеток на лунку в 1 мл среды. Спустя сутки клеткам меняли среду, а затем инкубировали в течение 48 ч. После этого среды отбирали, замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для получения кондиционированных сред от сфероидов МСК их извлекали из агарозной подложки и переносили в 96-луночный планшет в количестве 20–30 штук на лунку. Культивирование сфероидов в планшете проводили в 100 мкл питательной среды в течение 48 ч, после чего питательные среды отбирали. Листы МСК инкубировали в течение 48 ч в 1 мл среды, а затем брали ее для анализа. Для правильной оценки секреторной активности 3D-культур МСК по сравнению с клетками, выращенными в монослое, важно было нормировать измеренные величины концентраций VEGF-A на объем среды и тотальный клеточный белок. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда в лизатах, полученных из МСК в монослое, в сфероидах и в листах. В качестве лизирующего буфера применяли 0.2 мМ ЭДТА (VWR international LLC, West Chester, США) и 0.1% тритон X-100 (VWR international LLC, West Chester, США) в фосфатно-буферном растворе (PBS), pH 7.4.

**Изучение секреции VEGF-A с использованием метода BLI.** Концентрацию VEGF-A определяли с помощью прибора BLItz Pro (ForteBio, Pall Life Sciences, США), для чего использовали оптоволоконные биосенсоры с конъюгированным протеином А. Все измерения проводили после предварительного выдерживания чипов в фосфатном буфере в течение как минимум 10 мин (этап гидратации). Биосенсор устанавливали в прибор, погружали в пробирку с PBS на 30 с для регистрации

начальной базовой линии, а затем перемещали в каплю стокового раствора антитела против VEGF-A мыши (ab52917, Abcam, США) с концентрацией 0.296 мг в мл на 120 с (рис. 2). После загрузки биосенсор перемещали на 60 с в PBS и еще на 60 с в некондиционированную питательную среду для отмывки сенсора от неспецифически связанных антител и регистрации новой базовой линии. С целью измерения биосенсор помещали в каплю с исследуемой кондиционированной средой на 60 с. После получения профилей связывания  $\Delta\lambda(t)$  была определена площадь под кривой в течение измеряемого временного интервала:

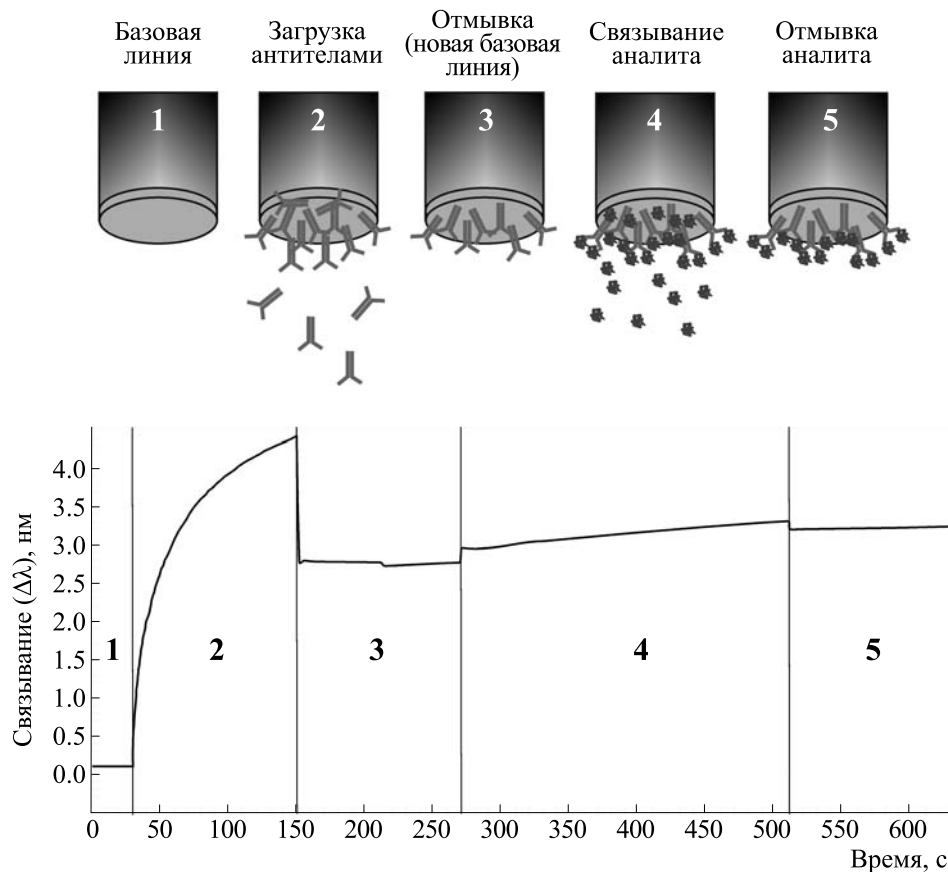
$$S_{\text{sample}} = \int_{t_1=0}^{t_2=60} \Delta\lambda(t) dt, dt = 0.2 \text{ с.}$$

Для построения калибровочного графика вместо исследуемой кондиционированной среды использовали стандарты VEGF-A в питательной среде с концентрациями 0.1, 1.0, 10, 100 и 1000 нг в мл. Процесс ассоциации антител с белком в калибровочных растворах проводили последовательно от меньшей концентрации к большей, с инкубацией на каждом шаге длительностью 60 с, после чего определяли величины площадей под кривыми связывания  $S_{0.1}$ ,  $S_{1.0}$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{100}$  и  $S_{1000}$  соответственно. Таким образом, калибровочный график определял зависимость площади под кривой связывания от концентрации VEGF-A и был использован для определения содержания аналита в экспериментальных образцах.

Значения констант  $k_a$  и  $k_d$  были получены с помощью аппроксимации кривых связывания и диссоциации одноэкспоненциальной функцией, выполненной в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения прибора BLItz Pro 1.3 (ForteBio, Pall Life Sciences, NY). Значения  $K_D$  были определены из соотношений  $k_d/k_a$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения содержания фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A в кондиционированных средах от МСК мыши были использованы оптоволоконные чипы с конъюгированным протеином А. Этот белок бактериального происхождения обладает высокой природной аффинностью к Fc-доменам тяжелых цепей иммуноглобулинов типа G (IgG) человека, мыши, кролика и некоторых других млекопитающих [9]. В классическом приложении данные чипы применяются для прямого количественного определения содержания антител в очищенных препаратах или биологических жидкостях [10]. Разработанный нами протокол предполагает иммобилизацию одинакового количества антител против VEGF-A на



**Рис. 2.** Схема протокола определения концентрации растворенного фактора роста VEGF-A методом BLI. Протокол включает пять этапов: 1 – регистрация начальной базовой линии (в PBS); 2 – загрузка биосенсора с протеином А антителами против VEGF-A (стоковый раствор антител); 3 – отмывка биосенсора от слабо связавшихся антител и определение новой базовой линии (сначала в PBS, затем – в среде с сывороткой); 4 – детекция VEGF-A в образце (в кондиционированной среде с сывороткой); 5 – отмывка от VEGF-A (в среде с сывороткой).

несколько биосенсоров. Один из чипов используется для детекции возрастающей и известной концентрации VEGF-A в некондиционированной среде с целью построения калибровочного графика. С помощью других чипов проводят измерения в опытных образцах, применяя один чип для одного измерения и последующего определения концентрации VEGF-A по калибровке. На рис. 2 представлена общая схема последовательности протокола детекции VEGF-A и соответствующие каждому этапу изменения значений сдвига интерференционного паттерна  $\Delta\lambda$  во времени.

Первичная загрузка биосенсоров с протеином А антителами продемонстрировала одинаковую кинетику связывания с выходом на плато в пределах очень близких значений (рис. 3а), что свидетельствует об однородности загрузки чипов антителами против VEGF-A мыши. После процедуры загрузки чипы переносили в фосфатный буфер, где они инкубировались до начала измерений концентрации VEGF-A в образцах. Отмывка чи-

пов сопровождалась частичной диссоциацией связавшихся антител (рис. 3б), что позволило оценить эффективную константу диссоциации  $K_D$ , которая составила  $7.5 \cdot 10^{-7}$  М (таблица). Интересно отметить, что протеин А имеет четыре домена для связывания с IgG, и его взаимодействие с иммуноглобулинами описывается сложной кинетикой. Величина  $K_D$ , отражающая силу его взаимодействия с Fc-регионами, снижается при увеличении концентрации антител, варьируя в пределах от  $10^{-10}$  до  $10^{-6}$  М [11]. Полученное в нашем случае относительно высокое значение эффективной константы диссоциации можно объяснить высокой концентрацией стокового раствора антител, которая составила 0.296 мг/мл.

Как отмечалось выше, один из биосенсоров был использован для построения калибровочного графика зависимости спектрального сдвига интерференционного паттерна от количества связавшегося анализита, т.е. VEGF-A. Каждое последовательное погружение связанного с антите-

лами чипа в среды с увеличивающейся концентрацией VEGF-A приводило к связыванию дополнительного количества ростового фактора, о чем говорит выход кривой изменения спектрального сдвига на новый более высокий стационарный уровень. По значениям площади под кривой кинетики связывания был построен калибровочный график (рис. 4). Для валидации полученной калибровки были проведены измерения в средах, содержащих известные концентрации VEGF-A мыши. В результате полученные площади под кривой связывания оказывались близкими к калибровочным значениям, а полученные константы связывания, диссоциации и равновесия соответствовали значениям, описывающим кинетику взаимодействия антитело-антиген (таблица).

В качестве модельной системы нами были использованы кондиционированные среды, отобранные из культур мезенхимальных стволовых клеток мыши. Применение МСК и их производных в регенеративной медицине является перспективным подходом для лечения повреждений костной ткани, инфаркта миокарда, ожогов и механических ран [12, 13]. Значительный вклад в минимизацию повреждений тканей, вызванных воспалением, вносит паракринная активность МСК, которая выражается в продукции противовоспалительных молекул и цитокинов, включая простагландин E2 (PGE2) и интерлейкин 10 (IL-10), а также факторов роста, например, инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1), фактора роста фибробластов (FGF-2), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и других [14, 15]. Следует отметить, что на паракринную активность МСК огромное влияние оказывают условия культивирования и внешнее молекулярное окружение. Одним из таких факторов является гипоксия, которая характерна для тканей при различных патологиях, сопровождающихся воспалением. Гипоксия наряду с провоспалительными цитокинами стимулирует МСК к повышенной продукции различных молекул, в том числе VEGF-A. В свою очередь, VEGF-A способствует васкуляризации поврежденной ткани, что необходимо для ее заживления.

В условиях культивирования МСК *ex vivo* существует несколько способов обеспечить условия гипоксии и тем самым увеличить продукцию VEGF-A и других факторов роста. Во-первых, можно культивировать клетки в условиях пониженного содержания кислорода в атмосфере в специальном инкубаторе. Во-вторых, можно вырастить МСК в виде 3D-культур, например сфероидов, представляющих собой тканеподобные агрегаты клеток и содержащие включения внеклеточного матрикса, а также клеточных листов, состоящих из нескольких слоев МСК. Сначала мы с помощью метода ВЛ оценили экспрессию VEGF-A в кондиционированных средах, полу-

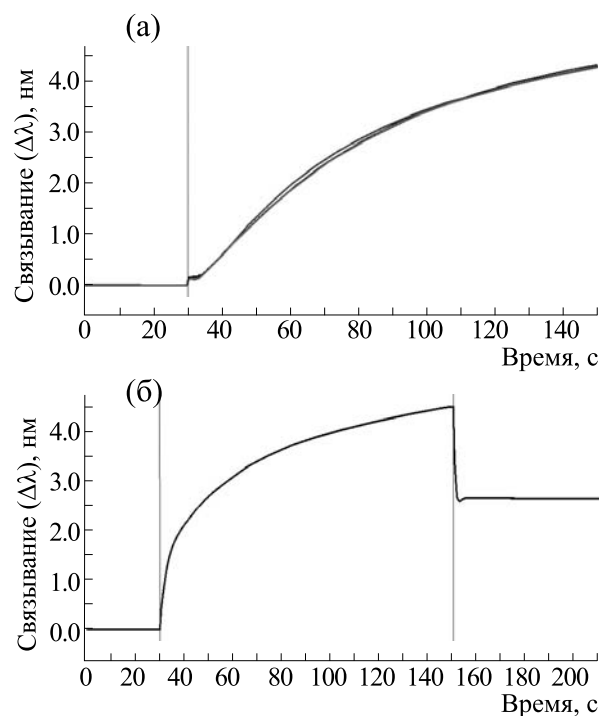
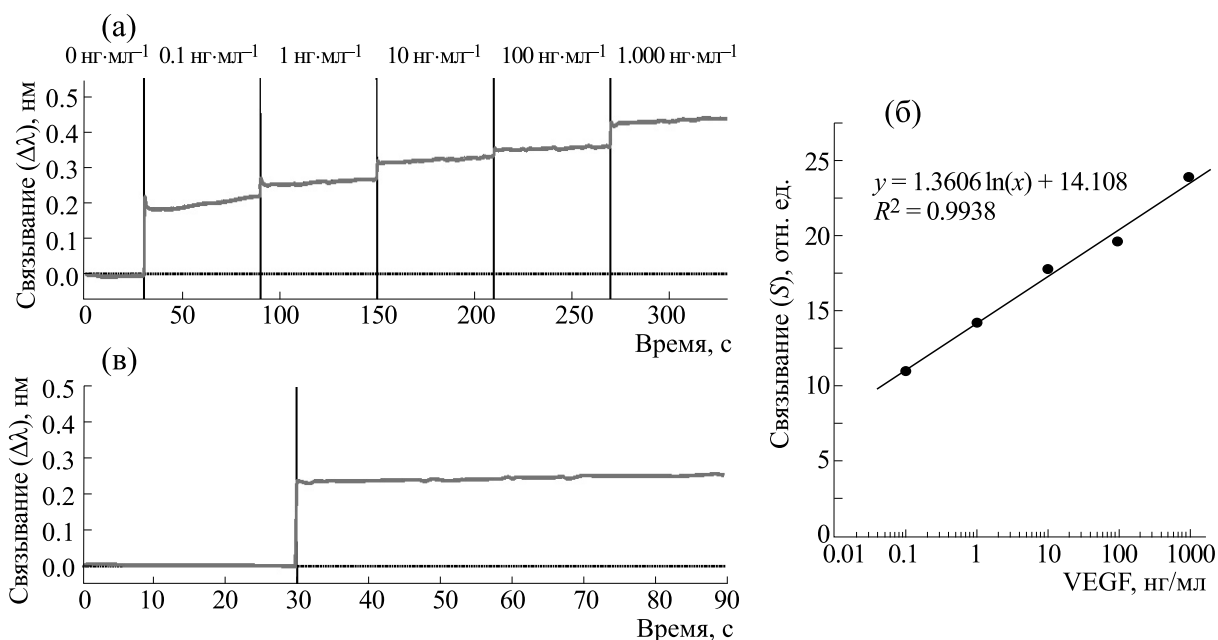


Рис. 3. Первичная загрузка биосенсоров с протеином А антителами против VEGF-A мыши. Профили связывания четырех биосенсоров с антителами (а) и вид типичной кривой связывания-диссоциации (б).

ченных от МСК при культивировании в атмосфере с нормальным содержанием кислорода, а также в атмосфере с 5% кислорода. Оказалось, что в условиях гипоксии содержание VEGF-A в средах от МСК мыши возрастает, хотя полученные различия не являются статистически значимыми (рис. 5а). Полученные значения концентрации VEGF-A согласно калибровочному графику составили порядка 0.5–1.0 нг/мл, что по порядку величины совпадает с концентрациями, измеренными в похожих условиях для кондиционированных сред от мышинных МСК с помощью иммуноферментного анализа [16].

Метод ВЛ также позволил сравнить экспрессию VEGF-A в средах от МСК, выращенных в монослое в условиях нормоксии (контроль) и в составе 3D-культур, включая сфероиды и листы. Полученные сфероиды МСК были выращены в агарозных вставках и имели диаметр  $140 \pm 40$  мкм (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение). Листы МСК были получены в шестилуночных планшетах и имели толщину в два-три слоя клеток (рис. 5б). Для правильной оценки полученные величины концентраций VEGF-A были дополнительно нормированы на белок и на объем среды. Результаты измерений продемонстрировали увеличение экспрессии VEGF-A в 3D-культурах в 2.5–3.0 раза по сравнению с монослоем МСК, хотя между собой показатели для сфероид-



**Рис. 4.** Построение калибровочного графика и определение аналита в пробе. (а) – Кривые связывания загруженного антителами биосенсора возрастающих концентраций VEGF-A в калибровочных растворах, содержащих 0.1, 1.0, 10, 100 и 1000 нг VEGF-A в мл среды с сывороткой. (б) – Вид калибровочного графика, в котором значения величины связывания ( $S$ ) соответствуют площади под кривой связывания в растворе с определенной концентрацией VEGF-A. (в) – Типичный вид кривой связывания загруженного антителами биосенсора с VEGF-A в образце с кондиционированной средой.

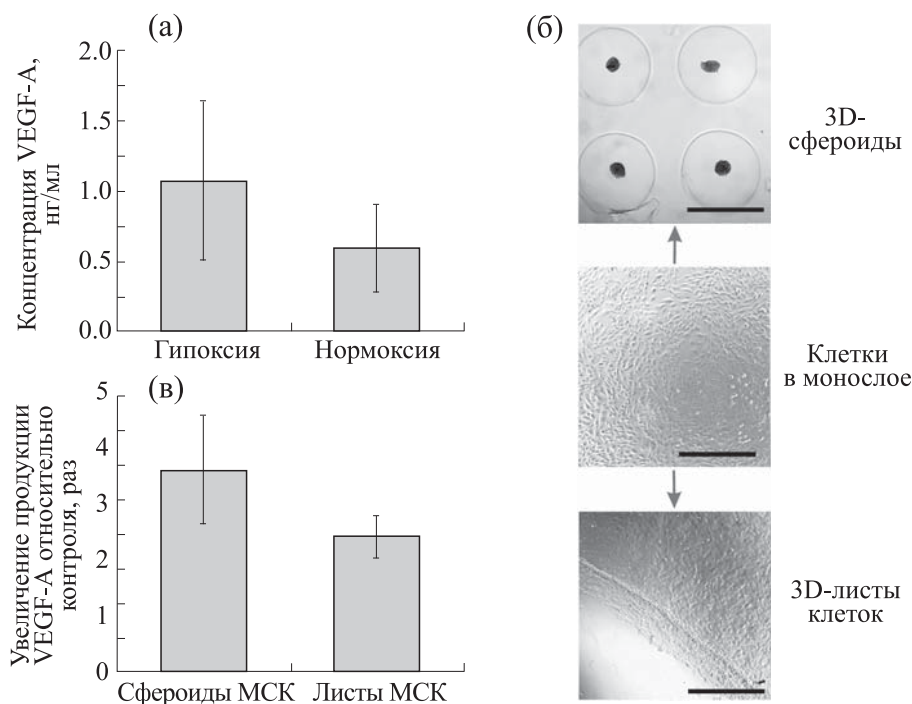
дов и листов статистически значимо не отличались (рис. 5в). Иммуноферментный анализ также ранее показал увеличение экспрессии VEGF-A МСК в составе сфероидов по сравнению с МСК в монослое в несколько раз [17].

Таким образом, с помощью метода интерферометрии слоя биомолекул можно оценивать концентрации растворимых белков в кондиционированных средах как при работе с клетками в монослое, так и в 3D-культурах клеток. Следует отметить, что при адаптации метода ВЛІ к конкретному аналиту следует принимать во внимание несколько факторов. Во-первых, используемые антитела должны обладать высоким сродством к выбранному чипу. Например, иммуноглобулины коровы будут слабо связываться с чипами с протеином А, а потому более целесообразным является использование антител кролика, обладающим гораздо более высоким сродством к протеину А [9]. Во-вторых, стоит брать в расчет и состав биологической жидкости, в кото-

рой находится измеряемый аналит. В нашем случае чипы с протеином А могут применяться для детекции VEGF-A мыши в кондиционированной среде, содержащей телячью сыворотку, но не могут быть использованы для определения VEGF-A человека в его плазме, поскольку она помимо VEGF-A содержит иммуноглобулины субтипов G1, G2 и G4, обладающих высоким сродством к протеину А [9]. Наконец, несмотря на высокую чувствительность метода, его погрешность будет увеличиваться при уменьшении количества аналита в образце, что будет создавать сложности с определением белковых молекул в очень малых концентрациях (менее 100 пг/мл). Тем не менее не исключено, что уменьшить ошибку вполне возможно при использовании других биосенсоров, например аминокреактивных, к которым можно ковалентно присоединять любые молекулы, содержащие аминокислотные группы. Главным несомненным плюсом метода ВЛІ является его быстрота и простота, что при наличии калибровочно-

Кинетические константы связывания и диссоциации, измеренные методом ВЛІ

Межмолекулярные взаимодействия	$k_a, M^{-1} c^{-1}$	$k_d, c^{-1}$	$K_D, M$
Протеин А – IgG	$1.449 \cdot 10^4$	$1.087 \cdot 10^{-2}$	$7.506 \cdot 10^{-7}$
IgG – VEGF-A	$4.285 \cdot 10^4$	$<10^{-7}$	$<10^{-12}$



**Рис. 5.** Определение концентрации VEGF-A в кондиционированных средах от МСК мыши, выращенных в различных условиях. (а) – Сравнение уровня VEGF-A в средах от МСК, выращенных в монослое в условиях нормоксии (21% кислорода) и гипоксии (5% кислорода). (б) – Изображения МСК мыши в монослое, а также производных 3D-культур на основе МСК, включая сфероиды и клеточные листы. Масштабный отрезок соответствует 800 мкм. (в) – Увеличение экспрессии VEGF-A 3D-клеточными культурами на основе МСК мыши по сравнению с клетками, выращенными в монослое в условиях нормоксии (контроль). Измерения для диаграмм (а) и (в) были проведены в трех повторах; величины представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

го графика позволяет оценить концентрацию аналита в образце за несколько минут.

В работе была продемонстрирована возможность использования метода интерферометрии слоя биомолекул для количественной оценки фактора роста эндотелия сосудов в биологических жидкостях. Возможности этого подхода были показаны на примере анализа кондиционированных сред от культур МСК, выращенных в монослое, а также в виде 3D-сфероидов и клеточных листов. Чувствительность адаптированного метода ВЛИ составила для VEGF-A как минимум 100 пг/мл. Несмотря на ограничения этого способа детекции, его основным преимуществом служит быстрота и простота проведения анализа.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидии по соглашению от 28.10.2018 г. №14.575.21.0179 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57518X0179), заключенному между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Московским физико-техническим институтом.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Sultana and J. E. Lee, *Cur. Protocols Prot. Sci.* **79**, 19 (2015).
2. C. W. Meyerhofer and D. Yao, in *Label-Free Technologies for Drug Discovery* (Wiley, 2011).
3. W.-H. Lua, S. K.-E. Gan, D. P. Lane, and C. S. Verma, *Npj Breast Cancer* **1**, 1 (2015).
4. C. J. Weeramange, M. S. Fairlamb, D. Singh, et al., *Prot. Sci.* **29**, 1004 (2020).
5. M. Groner, T. Ng, W. Wang, and A. K. Udit, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 5843 (2015).
6. W. A. Lea, P. T. O'Neil, A. J. Machen, et al., *Biochemistry* **55**, 4885 (2016).
7. H. Müller-Esparza, M. Osorio-Valeriano, N. Steube, et al., *Front. Mol. Biosci.* **7** (2020).

8. Y. Wang, E. E. Dzakah, Y. Kang, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 5499 (2019).
9. S. Hober, K. Nord, and M. Linhult, *J. Chromatography B* **848**, 40 (2007).
10. C. H. Goey, D. Bell, and C. Kontoravdi, *MAbs.* **10**, 476 (2018).
11. J. T. Nelson, S. Kim, N. F. Reuel, et al., *Anal. Chem.* **87**, 8186 (2015).
12. Y. Han, X. Li, Y. Zhang, et al., *Cells* **8**, 886 (2019).
13. P. Bianco, X. Cao, P.S. Frenette, et al., *Nature Med.* **19**, 35 (2013).
14. Y. Shi, Y. Wang, and Q. Li, *Nature Rev. Nephrol.* **14**, 493 (2018).
15. M. J. Fontaine, H. Shih, and R. Schäfer, *Transfus. Med. Rev.* **30**, 37 (2016).
16. L. Chen, Y. Xu, J. Zhao, et al., *PLoS One* **9** (2014).
17. I. A. Potapova, G. R. Gaudette, and P. R. Brink, *Stem Cells* **25**, 1761 (2007).

## Adaptation of Bio-Layer Interferometry for Quantification of Vascular Endothelial Growth Factor in Cell-Conditioned Culture Media

M.V. Volkova, V.V. Boyarintsev, A.V. Trofimenko, S.A. Biryukov, E.V. Gorina,  
G.I. Filkov, and M.O. Durymanov

*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
Institutsky per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

Quantitative analysis of cytokines, chemokines, growth factors and other soluble proteins in different biological liquids is routinely performed in contemporary diagnostics and biomedicine research. However, current methods of analysis are time-consuming and include multiple steps. In this study, we have developed a protocol that describes how bio-layer interferometry can be applied to quantify an analyte in several minutes. Conditioned growth media collected from mouse mesenchymal stem cells grown in normoxia or hypoxic conditions in a monolayer fashion, MSC-derived 3D cell sheets and 3D spheroids were used as a model system in which we determined a concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF-A). This technique displayed a high sensitivity (down to 0.1 ng of VEGF-A per mL as a minimum). The measured concentrations of VEGF-A in the conditioned media from mesenchymal stem cells turned out to be similar with values determined by the enzyme-linked immunosorbent assay. Using bio-layer interferometry, it was shown that as compared to mesenchymal stem cells grown in monolayer, spheroids and 3D sheets of mesenchymal stem cells produce significantly more VEGF-A (by 2.5–3.0-fold). Thus, due to the developed protocol it was possible to adapt bio-layer interferometry for rapid quantification of growth factors in conditioned media.

*Keywords: bio-layer interferometry, biosensor, mesenchymal stem cells, conditioned media, 3D cell culture, vascular endothelial growth factor*