

## Методы иммунобиосенсорного анализа: принципиальные основы и возможности практического использования

А.И. Бураковский

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, лаборатория медицинского микроанализа, Минск, Беларусь

## Immunobiosensitive analysis: the principles basises and possibilityes in practical using

A.I. Buracovsky

Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences Belarus

Разработка новых высокочувствительных, специфичных, экспрессных методов для диагностики различных заболеваний на основе достижений современной биотехнологии, генетики, микробиологии остается актуальной проблемой. Поэтому тематика предоставляемой работы вызывает несомненный интерес в силу использования, с одной стороны, современного формата иммунохимического анализа — иммунного биосенсора на основе использования явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и специфичности иммунохимической реакции “антиген-антитело”, а с другой — важных объектов тестирования: в одном случае аутоантител к инсулину (социально значимой патологии — патогенетического маркера сахарного диабета I типа), а в другом — ксенобиотика нонилфенола (НФ), который обладает токсическим, мутагенным и канцерогенным воздействием на живые организмы и характеризуется негативным влиянием на иммунонейроэндокринную систему.

Появление аутоантител (ААТ) в организме оказывает влияние на функционирование различных звеньев иммуноэндокринного гомеостаза, запуская каскад патологических реакций (формирование иммунокомплексов, отложение их в органах и тканях, повреждение антигенов, вызвавших их продукцию, нарушение процессов презентации пораженных клеток и т.д.) [1]. Несмотря на большое число исследований, связанных с механизмами

появления ААТ и изучением их роли в патологии, остается много нерешенных вопросов. В частности, до сих пор не выяснены молекулярно – генетические основы феномена аутоиммунизации; роль при этом аутоантигенов, аутоантител и их фрагментов; механизмы «системности» этого процесса, что связано с отсутствием отечественных высокочувствительных и информативных методов тестирования различных типов ААТ, основанных на достижениях современной биотехнологии [2]. А между тем именно ранняя диагностика и знание механизмов развития аутоиммунных заболеваний, в частности, сахарного диабета (СД), являются основополагающими факторами своевременной организации лечебно-профилактических мероприятий этого грозного заболевания, сопровождаемого инвалидизацией и преждевременной смертностью детского и взрослого населения [3, 4].

В последние годы у исследователей различного профиля возник повышенный интерес к изучению свойств и способов детекции новых групп соединений и субстанций, в частности, поверхностно активных веществ (ПАВ), которые заняли одно из ведущих мест среди загрязнителей окружающей среды. Это связано с ранее недооцениваемым воздействием некоторых ПАВ, в частности – неионных ПАВ и продуктов их деградации, на эндокринную систему и регуляцию репродуктивной функции человека и животных [5]. Основным

классом неионных ПАВ, используемых в промышленных и бытовых препаратах, являются алкилфенолэтоксилаты, в первую очередь, нонилфенолэтоксилаты. Процессы их деструкции в окружающей среде приводят к образованию НФ, который является стабильным конечным продуктом деградации неионных ПАВ. Он используется в различных областях промышленности, таких как производство бумаги, ткани, красок, клея, резины и пластика, фенольно-альдегидных полимеров, неионных и анионных сурфактантов, пластмасс на основе поливинилхлорида и т.д. [6, 7]. НФ попадает в окружающую среду, в основном, с промышленными сточными водами и обнаруживается в воде, воздухе, почве, подземных водах и осадочных породах. НФ играет ключевую роль в токсичности неионных сурфактантов и характеризуется негативным влиянием на иммунонейроэндокринную систему. Он обладает способностью имитировать эффекты природных биологически активных соединений даже в сравнительно низких дозах и вызывать нарушение различных функций живых организмов [8, 9]. Отсюда очевидна необходимость идентификации, количественной детекции и изучения механизмов воздействия этой группы соединений на организм человека и животных, что возможно лишь с помощью высокочувствительных и специфических методов на уровне пороговых концентраций.

В настоящее время для количественного определения антиинсулиновых антител и концентрации НФ применяются различные методы. Большинство из них является сложными в выполнении, занимают много времени, требуют дорогостоящего оборудования и высокой квалификации исполнителей [10]. Существующие методы радиоиммунного (РИА) и иммуноферментного (ИФА) анализа позволяют проводить идентификацию и количественный анализ, как аутоантител различной специфичности, так и различных загрязняющих факторов внешней среды, однако, развитие новых современных технологий, в которых сочетается высокая специфичность анализа с его экспрессностью, обуславливает поиск и разработку новых методов анализа различных групп соединений. Создание таких методов позволит с высоким уровнем чувствительности ( $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  моль/л), сопоставимой с методами РИА и ИФА, и специфичности оцени-

вать концентрации широкого круга соединений и биорегуляторных молекул.

### **Цель исследования**

Целью данного исследования явилась разработка научных основ и принципов новых экспресс-методов иммунобиосенсорного анализа, основанных на использовании достижений современной биосенсорики, в частности феномена ППР, для идентификации и количественного анализа различных типов аутоантител и низкомолекулярных соединений, (на примере противоинсулиновых антител и ксенобиотика НФ).

### **Феномен ППР**

Феномен ППР заключается в том, что поляризованный лазерный луч входит в среду (стеклянная призма) с большим рефракторным индексом и выше критического угла происходит его полное внутреннее отражение. При этих условиях электромагнитное поле светового луча проникает через трансдьюсер — стеклянную пластину с напыленным слоем золота. В процессе объединения фотонов лазерного света с колебаниями электронной плазмы на внешней границе металла происходит возбуждение поверхностных плазмонов (электронов) и уменьшение интенсивности отраженного света. Поверхностный плазмон является особой формой электромагнитной волны, которая распространяется вдоль поверхности металла. Угол, при котором наступает плазмонный резонанс, называется резонансным углом [11, 12], величина которого зависит от рефракторного индекса и диэлектрической постоянной среды, контактирующей с металлом (слоем золота) и находящейся на расстоянии около 1 мкм от его поверхности. На поверхности трансдьюсера происходит иммобилизация биологического материала, и взаимодействие иммунохимических компонентов реакции с образованием иммунокомплекса, который изменяет диэлектрические характеристики адсорбционного слоя, что приводит к изменению резонансного угла, пропорционального концентрации анализируемого соединения [13].

### **Принцип работы ППР-иммунобиосенсора**

Принципиальная схема устройства ППР – иммунобиосенсора приведена на рисунке 1. Биологический распознающий элемент

(молекулы инсулина, либо конъюгат НФ с высокомолекулярным белком-носителем) иммобилизуется на поверхности сенсорного чипа (стеклянная пластинка с напыленным слоем золота). Другой связываемый агент — раствор образца (в первом случае — сыворотка крови пациентов, содержащая аутоантитела к инсулину, во втором — водные образцы, содержащие анализируемое соединение — НФ) наносится поверх сенсорного чипа, в результате чего происходит его взаимодействие с иммобилизованными молекулами. Связывание на

поверхности сенсорного чипа приводит к изменению резонансного угла (изменение рефракторного индекса), что прослеживается детектором. Время изменений рефракторного индекса регистрируется в виде сенсограмм (рис. 2). Сенсограммы не только дают информацию о связывании компонентов (или его отсутствии), но и содержат информацию о кинетике и силе взаимодействия, что позволяет рассчитать концентрацию исследуемого соединения. Параметры графического изображения результатов используются для расчета содержания ис-

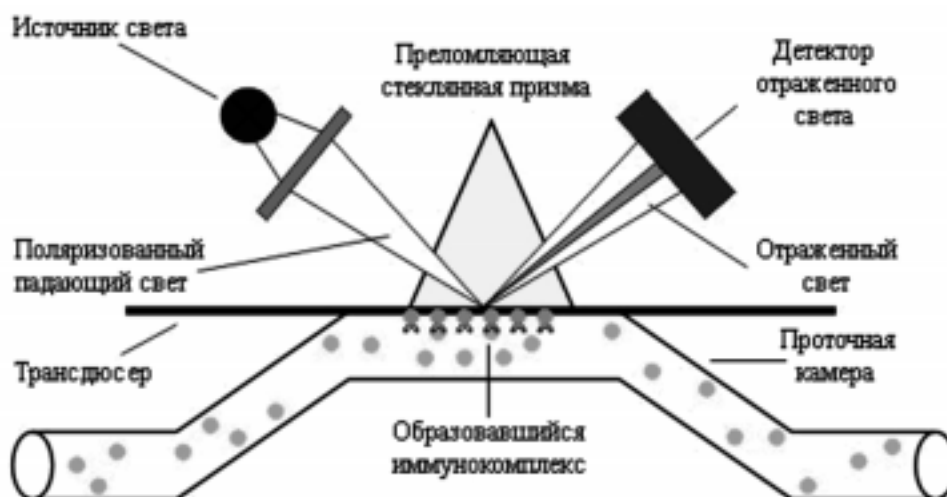


Рис. 1. Принципиальная схема устройства ППР – иммунобиосенсора

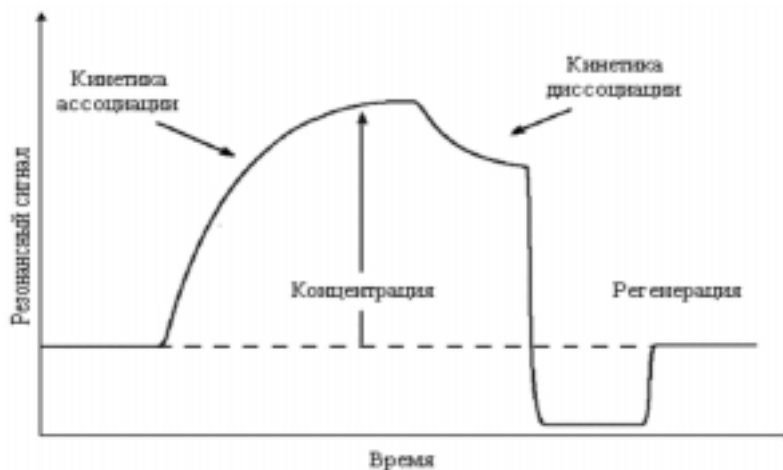


Рис. 2. Общий вид получаемой сенсограммы

следуемого соединения в анализируемых образцах с помощью калибровочного графика, отражающего зависимость концентрации данного соединения от величины сдвига резонансного угла. Измерения проводятся с использованием иммунного биосенсора "Плазмон SPR-4М" разработанного в институте физики полупроводников НАН Украины.

### **Аналитические характеристики разработанных методов**

На основе описанного принципа нами разработаны два новых метода иммунобиосенсорного анализа противоинсулиновых аутоантител — маркеров сахарного диабета I типа и ксенобиотика НФ — загрязняющего фактора внешней среды:

Аналитические характеристики и преимущества метода иммунобиосенсорного определения аутоантител к инсулину представлены ниже:

- высокий уровень чувствительности —  $5 \text{ Е/см}^3$ ;
- широкий диапазон определяемых концентраций ( $0 - 100 \text{ Е/ см}^3$ );
- экспрессность — время анализа составляет 10 минут (в традиционных методах ИФА и РИА оно составляет 4 – 24 часа);
- возможность повторного использования биосенсорного чипа.

Метод количественного иммунобиосенсорного определения НФ в водных средах имеет следующие характеристики:

- чувствительность анализа — 3-5 нг/мл (что вполне достаточно для определения потенциально опасных для организма концентраций НФ);
- время анализа — 10 минут (без предварительной подготовки трансдюсера);
- рабочий диапазон — до 1000 нг/мл;
- возможность повторного использования биосенсорного чипа.

### **Назначение методов**

Созданный формат иммунобиосенсорного метода тестирования аутоантител к инсулину может быть использован для идентификации и количественного анализа аутоантител к инсулину, изучения состояния инсулинорезистентности, дифференциальной диагностики диабета I и II типа и т.д., а также может служить основой для разработки других подобных методов для анализа аутоантител различных специфичностей, различных биологически активных соединений и патологических субстанций.

Разработанный метод иммунобиосенсорного анализа детергента НФ в водных средах может быть рекомендован для проведения мониторинга загрязнения водных объектов окружающей среды (сточной (до и после очистки), питьевой, водопроводной воды и т.д.), а также для контроля качества воды как в стационарных лабораториях, так и в полевых условиях, поскольку измерительная часть прибора компактна и может работать от автономного источника питания.

*Работа выполнена в рамках совместного Международного проекта Украинского и Белорусского Фондов фундаментальных исследований в соответствии с договором № Х05К—020 от 1 апреля 2005 г. с Белорусским Фондом фундаментальных исследований. Сроки выполнения: 01.04.2005 – 31.03.2007 гг.*

## **Литература**

1. Piven N.V., Starodub N.F., Burakovsky A.I. (et al). Principal approaches to the development of immunobiosensor analysis of antiinsulin antibodies. X International Congress of Rehabilitation in Medicine and Immunorehabilitation. 19-25 October, 2005, Athens, Greece; 45.
2. Piven N.V., Starodub N.F., Burakovsky A.I. (et al). Quantifying anti-insulin antibodies by means of their immunobiosensor analysis development. Abstract Book of XXIV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. 10-14 June, 2006, Vienna; 167.
3. Piven N.V., Starodub N.F. Biosensoric control of insulin autoantibodies. Abstract book of the Conference on Biosensing and Biodynamics. 2006, Bucharest; 27-28.
4. Piven, N.V., Starodub N.F., Burakovsky A.I. (et al). Principal approaches to the development of immunobiosensor analysis of anti-insulin antibodies. Allergol. Immunol. 2005; 6:10: 56-57.
5. Стародуб Н.Ф., Пивень Н.В., Бураковский А.И. «и соавт.». Разработка новых методов контроля качества воды. Биосенсорное определение неионных поверх-

ностно активных веществ. Химия и технология воды. 2005; 27:6: 591-599.

6. Wentz M. Detergency Theory and Technology. New York: Marcel Dekker; 1987.

7. Бураковский А.И., Пивень Н.В., Гончарик А.В., «и соавт.». Разработка количественного иммуноферментного анализа неионного сурфактанта нонилфенола в воде. Иммунология, аллергология, инфектология. 2005; 1: 87-94.

8. Piven N., Burakovski A. Immunosensor detection of nonylphenol the immunochemical marker of environment pollution. Abstract Book of XXVI Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. 9-13 June, 2007, Gxteborg, Sweden; 62:83: 167.

9. Goda Y., Kobayashi A., Fukuda K. (et al). Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals. Water Sci. and Devel. 2000; 42: 81-88.

10. Dzantiev B.B., Zherdev A.V., Romanenko O.G. (et al). Development and comparative study of different immunoenzyme techniques for pesticides detection. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 1996; 65: 95-111.

11. Пивень Н.В., Бураковский А.И., Гончарик А.В., «и соавт.». Принципиальные подходы к разработке методов иммунобиосенсорного анализа. Материалы Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика инфекционных болезней». 17-18 мая, 2007, Минск, Беларусь; 206-207.

12. Nabok A.V., Tsargorodskaya A., Hassan A.K. (et al). Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins. Appl. Surface Science. 2005; 246: 381-386.

13. Пивень Н.В. Иммунохимический анализ: научные основы, тенденции развития и возможности практического использования (обзор). Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. (ISSN 0236-297-X). 2007; 2: 6-26.