

# МЕТОДЫ ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ НОНИЛФЕНОЛА В ВОДНЫХ СРЕДАХ

Бураковский А.И., канд. биол. наук  
Лухверчик Л.М., канд. мед. наук

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск,  
Республика Беларусь  
ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток  
им. И.И. Мечникова» РАМН, г. Москва, Россия

*Одним из перспективных направлений для изучения биологической активности и путей метаболизма нонилфенола в окружающей среде, а также его детекции и количественной оценки в природных, пищевых и фармакологических объектах является разработка иммунохимических аналитических тест-систем.*

В настоящее время возрастает неконтролируемая диссеминация ксенобиотиков антропогенного происхождения в среде обитания человека, что неблагоприятно воздействует на его популяцию и снижает показатели санитарно-эпидемического благополучия населения, способствует росту числа заболеваний различного генеза и сокращению продолжительности жизни [1]. К ксенобиотикам относят промышленные загрязнители, пестициды, препараты бытовой химии, лекарственные средства и др., в том числе и поверхностно-активные вещества (ПАВ) [3].

Одним из основных классов неионных ПАВ, используемых в промышленных и бытовых препаратах, являются алкилфенолэтоксилаты и, в первую очередь, нонилфенолэтоксилаты. Процессы деструкции нонилфенолэтоксилатов в окружающей среде приводят к образованию нонилфенола (НФ) – 2,6-диметил-4-гептилфенол ( $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$ ). Присутствие НФ в окружающей среде является исключительно последствием антропогенного воздействия: попадая в окружающую среду, в основном, с промышленными сточными водами, он обнаруживается в воде, воздухе, почве, подземных водах и осадочных породах [6].

НФ обладает способностью имитировать эффекты природных биологически активных соединений даже в сравнительно низких дозах и вызывать нарушения различных функций живых организмов, приводя чаще всего к развитию хронических токсических эффектов. Он также способен оказывать влияние и на иммунную систему, стимулируя неспецифический иммунный ответ через механизмы фагоцитоза и изменяя процесс выработки цитокинов, а также снижать устойчивость организма к чужеродным агентам, таким как бактерии, вирусы и грибы. Немаловажной является способность НФ оказывать нейротоксический эффект на развивающуюся нервную систему [7].

Общественное беспокойство по поводу загрязнений различных объектов окружающей среды и организации их контроля, в частности, качества воды, стимулировало интенсивные попытки по разработке методов для оценки токсичности воды путем обнаружения и выявления загрязняющих компонентов [11]. Одним из перспективных направлений для изучения биологической активности и путей метаболизма ПАВ, в том числе и НФ, в окружающей среде, а также детекции этих соединений в природных, пищевых и фармакологических объектах, является разработка аналитических тест-систем, основанных на принципах взаимодействия «антиген-антитело», позволяющих проводить идентификацию и количественное определение широкого круга аналитов-мишеней с высоким уровнем чувствительности [12]. Одним из подходов к решению этой проблемы является создание инструментальных аналитических средств на основе принципов современного иммунохимического анализа в сочетании с достижениями биосенсорки.

Одним из вариантов иммунохимической оценки НФ и других ПАВ является твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) – наиболее распространенный и технологичный вид иммуноанализа. Имобилизация иммунореагентов на поверхности твердой фазы позволяет быстро и эффективно отделять образовавшиеся в ходе анализа иммунные комплексы от непрореагировавших молекул, а затем в оптимальных для ферментной метки условиях детектировать ее активность [18].

На основании проведенных исследований были получены и охарактеризованы компоненты иммунохимической реакции (конъюгаты НФ с различными белковыми носителями и высоко специфические антитела к НФ); разработаны и оптимизированы условия сорбции конъюгатов на твердой фазе – поверхности полистироловых планшетов; исследованы различные режимы проведения конкурентного ИФА; изучена специфичность анализа и стабильность реагентов. Это позволило разработать новый метод твердофазного конкурентного ИФА НФ в водных средах.

Принцип анализа: НФ, конъюгированный с белком-носителем (овальбумином), иммобилизуют в лунках полистиролового планшета. Затем в каждую лунку последовательно вносят компоненты иммунохимической реакции – специфичные к НФ антитела и анализируемые образцы воды с различными концентрациями НФ, что приводит к конкурентному взаимодействию между молекулами НФ в образце и иммобилизованными на планшете за сайты связывания антител к НФ, в результате чего на твердой фазе формируется комплекс «антиген-антитело». Последующее добавление меченных пероксидазой хрена вторых антител, специфичных к IgG кролика, позволяет приводить регистрацию ферментативной реакции. Активность пероксидазы хрена находится в обратной зависимости от концентрации НФ в образце и детектируется добавлением субстрат-хромогенного раствора, содержащего

АБТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота)). Количество продукта окисления АБТС измеряется по оптической плотности при длине волны в 405 нм и используется для подсчета содержания НФ в образце с помощью калибровочного графика, отражающего зависимость величины оптической плотности анализируемого раствора от концентрации НФ.

Преимуществами разработанного метода являются: высокая чувствительность (минимально тестируемая доза составляет 6-8 нг/мл), что позволяет осуществлять детекцию потенциально опасных для организма концентраций НФ; строгая специфичность, которая обеспечивается использованием высокоочищенных компонентов анализа и высокоспецифичных антител к НФ; широкий диапазон определяемых концентраций (от 6 до 400 нг/мл); время анализа составляет 4 часа без учета стадии предварительной сенсibilизации планшета; достоверность, воспроизводимость и высокая информативность полученных результатов; а также надежность и методическая доступность для практического использования.

Другим вариантом иммунохимической детекции соединений группы НФ является иммунобиосенсорный анализ. За прошедшие десятилетия в области разработки методов иммунобиосенсорного анализа различных молекул достигнут значительный прогресс. Создано и апробировано использование значительного числа систем, которые в настоящее время находят все более широкое применение в целом ряде отраслей науки, промышленности, сельского хозяйства и здравоохранения. Разработка методов иммунобиосенсорного анализа является одним из перспективных направлений развития методов экспресс-анализа [22].

Проведенные исследования позволили на основе полученных и охарактеризованных реагентов: разработать и оптимизировать условия сорбции конъюгата НФ с белком-носителем на поверхности трансдьюсера; исследовать кинетические режимы проведения иммунохимической реакции конкуренции иммобилизованного и анализируемого соединения – НФ; изучить аналитические параметры нового иммунохимического экспрессного метода определения НФ в водных средах, что послужило основой для разработки научных основ и технологии нового экспресс-метода количественного иммунобиосенсорного анализа ксенобиотика НФ в водных средах на основе использования достижений современной биосенсорики, в частности, явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и специфичности иммунохимической реакции взаимодействия антигена с антителами.

Принцип работы иммунобиосенсора состоит в том, что поляризованный лазерный луч с длиной волны 632,8 нм входит в среду 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 золотым напылением толщиной 20 нм. 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 (это и есть явление ППР). На поверхности трансдьюсера происходит адсорбция конъюгата НФ с белком-носителем. Для обеспечения контакта рабочей поверхности металлической пленки трансдьюсера с анализируемым образцом используется проточная камера объемом 10 мкл. В проточную камеру иммунобиосенсорного детектора последовательно добавляют антитела, специфичные к НФ, и анализируемый образец, содержащий НФ. В результате этого происходит взаимодействие иммунохимических компонентов реакции с образованием иммунокомплекса. Образовавшийся на золотой поверхности трансдьюсера иммунокомплекс (дополнительный слой) изменяет диэлектрические характеристики адсорбционного слоя, что приводит к изменению резонансного угла, пропорционального концентрации анализируемого соединения. Изменения резонансного угла на поверхности биосенсорного чипа прослеживаются и регистрируются детектором. Параметры графического изображения результатов используются для расчета содержания НФ в водных образцах с помощью калибровочного графика, отражающего зависимость величины сдвига резонансного угла от концентрации НФ.

Метод обладает целым рядом преимуществ: высоким уровнем чувствительности – 3-5 нг/мл; высокой экспрессностью – время проведения анализа составляет 10-15 минут (без учета стадии предварительной иммобилизации); строгой специфичностью благодаря использованию высокоспецифичных антител к НФ и высокочувствительного физического явления – феномена ППР; высокой информативностью, воспроизводимостью и достоверностью полученных результатов; а также возможностью многократного использования сенсорного чипа.

Данные методы предназначены для обнаружения и количественного контроля уровня НФ в водных средах (питьевая вода, вода природных источников, речных водоемов, сточные воды до и после очистки и т.д.), а также для скрининга водных образцов при проведении мониторинга объектов окружающей среды, пищевых продуктов, различных жидкостей и др.

Внедрение таких методов в практику позволит существенно повысить контроль качества воды из различных источников, объектов окружающей среды, продуктов питания и т.д.

#### Литература

1. Safarik L., Ptackova L., Koneracka M., Safarikova M., Timko M., Kopcansky P. Determination of selected xenobiotics with ferrofluid-modified trypsin // *Biotechnology Letters*. – 2002. – Vol. 24. – P. 355-358.

2. McLachlan J. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals // *Endocrine Reviews*. – 2001. – Vol. 22. – P. 319-341.

3. Keith T.L., Snyder S.A., Naylor C.G., Staples C.A., Giesy J.P. Identification and quantitation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol in fish tissues from Michigan // *Environ. Sci. Technol.* – 2001. – Vol. 35. – P. 10-13.

4. Goda Y., Kobayashi K., Fukuda S., Fujimoto M., Ike M., Fujita M. Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals // *Water Sci. and Devel.* – 2000. – Vol. 42. – P. 81-88.

5. Granek V., Rishpon J. Detecting endocrine-disrupting compounds by fast impedance measurements // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – Vol. 36. – P. 1574-1578.

6. Пивень Н.В., Бураковский А.И., Гончарик А.В., Орлова Е.Е. Разработка количественного иммуноферментного анализа неионного сурфактанта нонилфенола в воде // *Имунопатология. Аллергология. Инфектология*. – 2005. – № 1. – С. 87-94.

7. Бураковский А.И. Методы иммунобиосенсорного анализа: принципиальные основы и возможности практического использования // *Имунопатология, Аллергология, Инфектология*. – 2008. – № 1. – С. 11-15.

8. Пивень Н.В., Бураковский А.И., Гончарик А.В., Орлова Е.Е. Нонилфенол как маркер загрязнения объектов окружающей среды и методы его иммунохимической детекции // *Имунопатология, Аллергология, Инфектология*. – 2005. – № 4 – С. 35-44.

9. Стародуб Н.Ф., Пивень Н.В., Демченко А.В., Гончарик А.В., Орлова Е.Е., Бураковский А.И., Мартынов А.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка новых методов контроля качества воды. Биосенсорное определение неионных поверхностно-активных веществ // *Химия и технология воды*. – 2005. – Т. 27, № 6. – С. 591-599.