

# ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПОДХОД В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ПРИ ОНКОПАТОЛОГИИ

**Карпенко Т.А., Бураковский А.И., Тишкевич М.Н., Ястребова А.А.**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь, 220141, ул. Купревича 5/2, e-mail: [info@iboch.bas-net.by](mailto:info@iboch.bas-net.by)*

В последние годы во всех странах мира отмечается рост онкологических заболеваний различных локализаций, которые занимают одну из лидирующих позиций среди причин смертности населения в Республике Беларусь и странах СНГ. По данным ВОЗ ежегодно онкологические заболевания диагностируют вновь у 10 миллионов человек [1]. В связи с этим основным направлением современной онкологии является разработка мер по своевременному выявлению и предупреждению раннего развития онкозаболеваний.

Одним из перспективных маркеров, вносящих существенный вклад в развитие ряда онкологических состояний является эпидермальный фактор роста (ЭФР). Нарушения функционирования сигнальной системы ЭФР и его рецептора обуславливает развитие злокачественных опухолей, оказывая влияние на клеточный цикл, обеспечение опухолевых клеток собственными сигналами выживания, повышение митотической активности, снижение процессов апоптоза и способность опухолевых клеток к миграции и инвазии. В силу этого возникает необходимость идентификации и количественной оценки ЭФР с высоким уровнем чувствительности и специфичности, что возможно при помощи современных методов иммунохимического анализа [2].

В настоящее время для детекции различных соединений активно используются экспрессные иммунохимические тесты с длительностью до 10 мин, сочетающие высокую чувствительность с простотой постановки, возможностью быстрого получения ответа при бесприборной (визуальной) регистрации результатов. В связи с этим целью настоящего исследования являлась разработка нового иммунохроматографического подхода с использованием конъюгата антител с наночастицами коллоидного золота (КЗ) для создания высокочувствительной и экспрессной системы определения ЭФР.

Получение КЗ проводили по методу Френса [3]. Для этого готовили 0,01% раствор  $\text{HAuCl}_4$  и нагревали до кипения, а затем при перемешивании добавляли 1% раствор цитрат натрия и кипятили полученную смесь еще 25 минут. После раствор охлаждали и хранили при 4-8 °С. Наиболее оптимальным при разработке иммунохроматографических тест-систем с использованием тест-полосок считается диаметр частиц КЗ в размере 30-40 нм.

Выбор нагрузки поликлональными антителами (ПАТ) на КЗ проводили на основании анализа оптического поглощения растворов коллоида при 580 нм в присутствии сорбируемого белка в разных концентрациях (в диапазоне от 250 до 2,25 мкг/мл). Добавление антител вначале приводит к росту оптического поглощения, после его величина  $A_{580}$  резко уменьшается и выходит на плато. Концентрация ПАТ, соответствующая стабилизации  $A_{580}$ , рассматривается как обеспечивающая насыщение центров иммобилизации. В качестве оптимальной принимается концентрация ПАТ, на 10-15% превосходящая точку выхода на плато [4].

Работоспособность и специфичность синтезированного конъюгата ПАТ с КЗ проверяли путем оценки его взаимодействия со специфическими и неспецифическими антивидовыми антителами к IgG.

Одним из компонентов иммунохроматографической тест-системы является рабочая мембрана, на которой в ходе анализа происходит формирования детектируемых иммунных комплексов. В работе сопоставлены 6 нитроцеллюлозных мембран, производства «Millipore», США, отличающихся по скорости продольного движения жидкости и сорбционной способности. В качестве оптимальной выбрана мембрана HiFlow Plus HFB 18002, Millipore, США, характеризующая максимальной интенсивностью образующихся

полос, низким пределом обнаружения и отсутствием фонового окрашивания тест-полоски вне зон специфического связывания конъюгата.

На нитроцеллюлозную рабочую мембрану (HiFlow Plus HFB 18002 «Millipore», США) наносили моноклональные антитела к ЭФР (аналитическая зона) и антивидовые антитела (контрольная зона). Конъюгат специфических антител с КЗ наносили на стекловолоконную мембрану (Glass fiber conjugate pad GFSP000800 «Millipore», США). Мембраны высушивали в течение суток при комнатной температуре и склеивали. Полученный из мембран с нанесенными иммунореагентами и впитывающей мембраны (Cellulose fiber sample pad CFSP002000 «Millipore», США) поликомпозитный лист нарезали на тест-полоски и хранили при комнатной температуре в герметичных пакетах.

Иммунохроматографический анализ проводили при комнатной температуре. Тест-полоску погружали на 1,5-2 мин в анализируемую пробу в вертикальном положении, затем извлекали, помещали на горизонтальную поверхность и через 10 мин визуально контролировали результат анализа. Количественно связывание коллоида в контрольной и аналитической зонах регистрировали путем сканирования мембран на сканере («Mustek», Тайвань). Цифровую обработку изображений осуществляли с помощью программы TotalLab («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

Изучены концентрации ЭФР в модельных образцах, содержащих известные концентрации ЭФР в диапазоне от 10 до 0,01 нг/мл, с помощью разработанного лабораторного варианта тест-системы.

Полученные данные подтверждают работоспособность тест-системы и возможность ее использования при определении ЭФР в биологическом материале (кровь, моча) при онкопатологии различного генеза.

#### Литература

1. Информационный бюллетень ВОЗ №310. – Май 2014.
2. Vyzova N.A., Lukhverchik L.N., Zherdev A.V. et al. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2013. Vol. 49, № 6. PP. 606-612.
3. Frens. G. // Nat. Phys. Sci. 1973. Vol. 241, № 105. PP. 20–21.
4. Panerai R.B., Chacon M., Pereira R. et al. // Med. Eng. Phys. 2004. V. 26. PP. 43-52.

### IMMUNOCHROMATOGRAPHIC APPROACHE FOR THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR DETERMINING AT ONCOPATHOLOGY

**Karpenka T.A., Burakovski A.I., Tsishkevich M.N., Yastrabava H.A.**

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,  
5/2 Kuprevich Str., 220141, [info@iboch.bas-net.by](mailto:info@iboch.bas-net.by)*

#### Summary

Development and optimization of immunochromatographic approach for the epidermal growth factor (promising marker of cancer pathology) determining were conducted. Obtained data confirm test system operability and possibility of its usage in biological material (serum, urine) for oncopathology of various genesis.