

ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО АМИНОКИСЛОТОЙ

З.Б. Артыкова, аспирант; *И.А. Грицкова, профессор; **С.А. Гусев, профессор; **Л.Ю. Басырева, старший научный сотрудник; *В.А. Сочилин, заведующий лабораторией; ****М.И. Штильман, профессор; ****А.В. Горячая, аспирант; *Г.П. Хейнман, инженер; *С.А. Кедик, профессор; *Н.И. Прокопов, профессор*

** МИТХТ им.М.В. Ломоносова*

*** ФГУ «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России*

**** АНО «Синтез полимерных сорбентов»*

***** РФХТУ им.Д.И.Менделеева*

e-mail: ser-gus@mail.ru

Методом затравочной полимеризации в присутствии растворимого в мономерной фазе кремнийорганического карбоксилсодержащего ПАВ были синтезированы сополимерные стирол-дивинилбензолные микросферы диаметром 6 мкм с карбоксильными группами на поверхности. Было показано, что карбоксильные группы доступны для ковалентного связывания биолгангов и поливинилпирролидона, модифицированного аланином. Высказано предположение о перспективности применения поливинилпирролидона, модифицированного аланином, для получения диагностических систем на основе полимерных микросфер.

Styrene-divinylbenzene particles (6 microns in diameter) with carboxyl groups on the surface have been synthesized by seed polymerization in the presence of an organosilicon carboxyl-containing surfactant soluble in the monomer phase. It has been shown that carboxyl groups on the microsphere surface are accessible for covalent immobilization of bioligands and alanine-modified polyvinylpyrrolidone. It was supposed that applying modified polyvinylpyrrolidone for obtaining diagnostic systems based on polymer microspheres is very perspective.

Ключевые слова: кремнийорганическое карбоксилсодержащее поверхностно-активное вещество, полимерные микросферы, поливинилпирролидон, модифицированный аминокислотой.

Key words: organosilicon surfactant containing carboxyl groups, polymer microspheres, polyvinylpyrrolidone modified with amino acid.

Полимерные микросферы нашли широкое применение в различных областях биотехнологии. Одна из них – это область создания диагностических тест-систем [1]. Носители биолгангов биологического происхождения (бактерии, дрожжи, эритроциты и т.д.) не обладают абсолютной инертностью, так как кроме иммобилизованного биолганда содержат на поверхности собственные биологически активные компоненты. Это побудило исследователей обратиться к синтетическим носителям, применение которых открыло возможность контроля состава носителя, направленного выбора способа иммобилизации лиганда, регулирования визуализации реакции и т.д.

Узловыми моментами в создании стабильной технологии получения полимерных носителей биолгангов являются проблема синтеза полимерных суспензий с заданным диаметром и узким распределением частиц по размерам и проблема агрегативной устойчивости микросфер в физиологических жидкостях.

Анализ опубликованных экспериментальных исследований по применению синтетических полимерных носителей показал, что уни-

версальные частицы для получения тест-систем различного целевого назначения синтезировать невозможно. Это объясняется необходимостью в каждом конкретном случае синтезировать полимерные микросферы с определенным диаметром и функциональными группами на поверхности частиц для ковалентного связывания с функциональными группами биолганда.

Однородность частиц по размерам дает определенное преимущество для использования их в диагностических реакциях, так как позволяет достаточно точно определить площадь поверхности носителя и установить степень ее покрытия биолигандом.

Выбор метода синтеза полимерных микросфер (эмульсионная, суспензионная, дисперсионная, осадительная или затравочная полимеризация) определяется, в первую очередь, требованием к диаметру частиц и содержанию в их межфазных адсорбционных слоях функциональных групп определенной природы.

Затравочная полимеризация является наиболее общим и удобным методом получения композиционных полимерных частиц на основе полистирола с самой разнообразной морфологией [2, 3, 4].

На первой стадии любым методом гетерофазной полимеризации (эмульсионной, суспензионной, дисперсионной, полимеризацией в отсутствие эмульгатора и т.д.) синтезируют исходные, затравочные, обычно полистирольные, частицы, которые используются на втором этапе синтеза композиционных полимерных частиц.

На второй стадии к синтезированной полимерной суспензии добавляют мономер иной природы (или смесь мономеров), эмульгатор, инициатор или другие целевые компоненты и проводят полимеризацию. При этом условия полимеризации подбирают таким образом, чтобы исключить образование новых частиц, т.е. чтобы полимеризация протекала исключительно в частицах затравки. При необходимости можно аналогичным образом провести третью, четвертую и т.д. стадии процесса до образования частиц необходимого диаметра, но обычно ограничиваются двумя стадиями [5].

Частицы полимерных суспензий, должны содержать на поверхности группы, способные непосредственно реагировать с amino-, карбоксильными или сульфгидрильными группами биомолекул [6] (это хлорметильные, хлорсульфоновые, альдегидные, эпоксидные и сульфгидрильные группы) или функциональные группы, которые неспособны к прямому взаимодействию с белками, однако могут образовывать с ними химическую связь после относительно простой реакции активации [6] (это карбоксильные, гидроксильные, аминные, амидные и гликолевые группы).

Наиболее часто в качестве носителей биолигандов используют полимерные микросферы с карбоксильными группами на поверхности [7]. Это объясняется тем, что способы их синтеза относительно просты и хорошо изучены. Их получают сополимеризацией гидрофобных мономеров (чаще всего стирола) с ненасыщенными кислотами (акриловой, метакриловой, итаконовой и т.д.) в присутствии или при отсутствии эмульгатора, затравочной полимеризацией ненасыщенных кислот на полистирольных затравочных частицах, полимеризацией стирола с поверхностно-активными сомономерами или инициаторами, содержащими в своих молекулах карбоксильные группы, а также полимеризацией стирола в присутствии нерастворимых в воде карбоксилсодержащих ПАВ. Такое многообразие разрабатываемых методов синтеза карбоксилсодержащих полимерных микросфер не случайно и объясняется поиском наиболее технологически простого и доступного способа их получения. Сложность процесса состоит в необходимости исключения полимеризации полярного сомомера в водной фазе (для получения суспензий с узким распределением частиц по размерам) и в концентрировании карбоксильных групп на

поверхности частиц. Распределение карбоксильных групп между поверхностью частиц и их объемом, обычно наблюдаемое при синтезе, является причиной постоянного изменения их свойств при хранении вследствие миграции карбоксилсодержащих фрагментов полимерных цепей к границе раздела фаз. [8].

Перспективным направлением является получение полимерных микросфер с карбоксильными группами на поверхности при проведении полимеризации в условиях синтеза ПАВ на границе раздела фаз и в присутствии карбоксилсодержащих кремнийорганических ПАВ [9]. Эти способы синтеза позволяют получать полимерные суспензии с разнообразным диаметром частиц, устойчивые при синтезе, хранении и использовании.

Известно, что устойчивость полимерных частиц определяется формированием в их межфазном слое электростатического и структурно-механического факторов стабилизации. Этого достигают применением ПАВ различной природы, а также проведением сополимеризации мономеров с ионогенными сомономерами, функциональные группы которых, ориентируясь на границе раздела двух фаз, вносят в стабильность частиц существенный вклад за счет формирования электростатического фактора стабилизации, а также в присутствии карбоксилсодержащих кремнийорганических ПАВ, нерастворимых в воде.

В данном исследовании были использованы полимерные микросферы, полученные в присутствии карбоксилсодержащих кремнийорганических ПАВ. Микросферы получали путем затравочной полимеризации стирола на затравочных полимерных микросферах диаметром 6 мкм и узким распределением по размерам.

Было показано, что карбоксильные группы, расположенные на поверхности этих ПМС, доступны, в первую очередь, для ковалентного связывания биолигандов, а также доступны для ковалентного связывания соединений, препятствующих физической сорбции белков. Одним из таких соединений является поливинилпирролидон, модифицированный аланином. Есть основания полагать, что ковалентная иммобилизация на поверхность ПМС модифицированного аланином поливинилпирролидона поможет подойти к решению одной из основных проблем, возникающих при разработке сложных систем анализа, состоящую в том, что кроме целевого, то есть специфически связанного с лигандом белка, на поверхность ПМС сорбируются неспецифические к данному лиганду белки. Присутствие этих белков затрудняет процесс выявления заданного целевого белка в многокомпонентной системе (плазме крови), снижает чувствительность и точность биохимических анализов [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

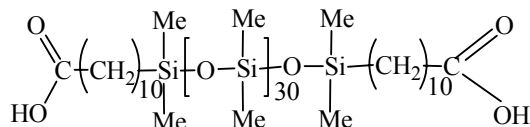
Стирол – очищенный технический продукт, использовали фракцию, кипящую при $t = 41\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 мм.рт.ст.) $d_4^{20} = 0.906\text{ г/см}^3$, $n_d^{20} = 1.5450$;

Додецилсульфат натрия (далее ДСН) (Sigma Aldrich);

Персульфат калия (ПК) (Sigma Aldrich);

Динитрил азоизомасляной кислоты (ДАК), очищали перекристаллизацией из метанола;

Кремнийорганическое соединение (α,ω -бис[10-карбоксидецил]полидиметилсилоксан) (далее КС₂) общей формулы:



где Me = CH₃– синтезирован в ГНИИХТЭОС, имеет ММ=2728 г/моль, % COOH_{пр} = 3.60 %; $\eta^{25} = 132\text{ сСт}$;

Карбодиимид (далее КДИ) (MERCK), *N*-ethyl-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, C₈H₁₇N₃HCl;

Лизин – аминокислота (Sigma Aldrich);

Фосфорно-физиологический раствор (далее ФФР) (Sigma);

Нингидрин «хч»;

Фосфатный буфер – 0.3М, pH=7.4;

Поливинилпирролидон (Sigma);

Поли-*N*-винилпирролидон с содержанием звеньев β-аланина (далее ПВПм) синтезирован М.И. Штильманом в РФХТУ им. Д.И. Менделеева.

Полистирольные микросферы с карбоксильными группами на поверхности частиц диаметром 6 мкм получали затравочной полимеризацией стирола, содержащего карбоксилсодержащий кремнийорганический ПАВ, на затравочных микросферах среднего диаметра ~6 мкм, полученных сополимеризацией стирола и дивинилбензола.

Затравочную полимеризацию проводили в стеклянном реакторе объемом 100 мл, снабженном теплообменной рубашкой, двухрядной стеклянной пропеллерной мешалкой и системой для продувки инертного газа (азота или аргона). Для поддержания необходимой температуры полимеризации через теплообменную рубашку реактора с помощью термостата прокачивали воду, температуру которой поддерживали на уровне $60 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

В реактор загружали затравочную полистирольную суспензию, в которой растворены водорастворимые компоненты и проводили дегазацию в течение 15-20 минут. В стироле растворяли ДАК и кремнийорганическое ПАВ. Дегазацию вели еще в течение 2-3 минут. Загружали в реактор после набухания полистирольной суспензии в стироле при комнатной температуре в течение 24 ч, реактор подключали к термостату, доводили температуру до

$60.0 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и отмечали время начала полимеризации [11].

Размеры частиц полимерных суспензий определяли с помощью электронного микроскопа S-570 «Hitachi» (Япония). Каплю разбавленной полимерной суспензии наносили на предметный столик микроскопа, предварительно подвергавшийся гидрофилизации для равномерного распределения суспензии по поверхности. Столик помещали в вакуумную камеру ионного напылителя IB-3, EIKO ENGINEERING (Япония), где при силе тока - 6 mA, напряжении на электродах - 900 В и вакууме 0.05 торр образец напыляли золотом. Анализ микрофотографий был осуществлен с помощью программы ImageJ.

Очистку полимерных суспензий от водорастворимых примесей проводили методом ультрафильтрации на ячейках типа ФМ-1000.

При последнем цикле очистки фильтрование вели до тех пор, пока в ячейке останется необходимый объем полимерной суспензии, при котором концентрация сухого остатка равна ~ 10%.

Для определения агрегативной устойчивости суспензии микросфер 0.5 мкл 4%-ой полимерной суспензии смешивали на стекле с равным объемом раствора электролита (NaCl) с концентрацией 0.15 М. Регистрацию устойчивости суспензии проводили визуально.

С целью адсорбировать на поверхность ПМС поливинилпирролидон с содержанием звеньев β-аланина и лизин к 10%-ой суспензии ПМС добавляли раствор ПВПм и лизина в требуемых концентрациях. Инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. Суспензию трижды промывали от не связавшегося ПВПм и лизина ФФР-буфером.

Ковалентную иммобилизацию лизина на поверхность ПМС проводили по следующей методике. К 4 %-ой суспензии микросфер добавляли водный раствор КДИ с концентрацией 10 мкг/мл в массовом соотношении 10:1 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. Затем суспензию трижды промывали ФФР от непрореагировавшего КДИ. Суспензию доводили до 4% и смешивали с раствором лизина в ФФР, концентрация которого составляет 30 мкг/мл (из расчета, что на 1 мл 4%-ой суспензии требуется добавить 0.3 мкг лизина). Инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. От несвязавшегося лизина суспензию микросфер трижды промывали ФФР методом центрифугирования и доводили суспензию до концентрации 10%.

Ковалентную иммобилизацию на поверхность ПМС поли-*N*-винилпирролидона с содержанием звеньев β-аланина проводили по следующей методике. К 4 %-ой суспензии микросфер добавляли водный раствор КДИ с концентрацией 10 мкг/мл в массовом соотношении 10:1 и инкубировали в течение 1 часа при ком-

натной температуре на шейкере. Затем суспензию промывали буфером ФФР от непрореагировавшего КДИ. Суспензию доводили до 10% и смешивали с раствором ПВПм в ФФР в требуемых концентрациях. Инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. От несвязавшегося поли-*N*-винилпирролидона суспензию микросфер трижды промывали ФФР.

Качественное определение иммобилизованного на поверхности полимерных микросфер лизина и поли-*N*-винилпирролидона с содержа-

нием звеньев β -аланина проводили калориметрическим методом. На пластинку наносили 5 мкл суспензии микросфер с иммобилизованным на поверхности лизином или поли-*N*-винилпирролидона с содержанием звеньев β -аланина, затем прикапывали 5 мкл 0.5%-ного спиртового раствора нингидрина. После этого пластинку выдерживали в течение 20 минут в термостате при температуре 100°C и проводили учет реакции. Окрашивание образца (рисунок 1.Б) в сине-фиолетовый цвет указывает на наличие аминокислоты.



Рис. 1. Качественное определение аминокислоты,
А – аминокислота отсутствует, Б – аминокислота присутствует.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для получения полимерных микросфер был выбран способ получения полистирольной суспензии методом затравочной полимеризации в присутствии растворимого в мономерной фазе кремнийорганического карбоксилсодержащего ПАВ.

Выбор этого способа синтеза был обусловлен простотой и надежностью (воспроизводимостью) его проведения. В качестве затравочных частиц были выбраны полистирол-дивинилбензолные микросферы со средним диаметром ~6 мкм (рис. 2.).

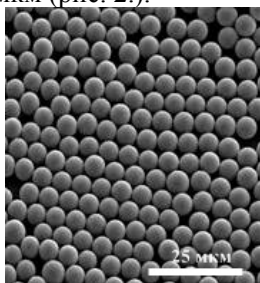


Рис. 2. Затравочные полистиролдивинилбензолные микросферы со средним диаметром 6 мкм.

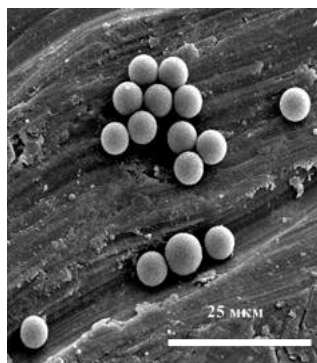


Рис. 3. Частицы полимерной суспензии после проведения затравочной полимеризации.

Рецептура синтеза полимерной суспензии, полученной методом затравочной полимеризации в присутствии кремнийорганического ПАВ, приведена в таблице 1.

Таблица 1. Рецепт проведения затравочной полимеризации стирола на полистирольных частицах 6 мкм.

Наименование компонента	Массовые части
Полимерная суспензия 6 мкм	100
Стирол	10
Вода	2400
ДАК	0.08
ПК	0.31
КС ₂	2.50

Полученные в присутствии кремнийорганического ПАВ полимерные суспензии имели частицы диаметром 6 мкм (рис.3), узкое распределение частиц по размерам (рис.4), коэффициент полидисперсности, равный 1.014, и агрегативную устойчивость микросфер в растворе электролита не менее 0.2 М.

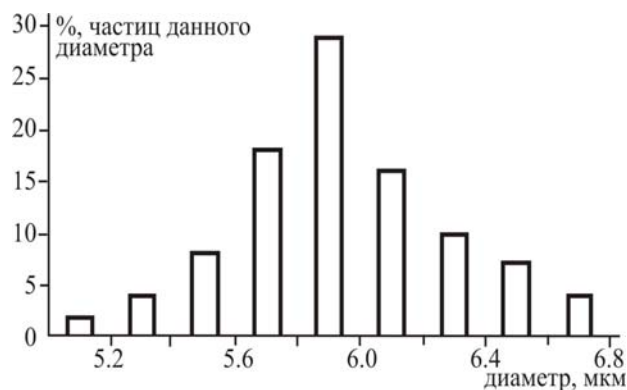


Рис. 4. Распределение диаметров частиц полимерной суспензии после проведения затравочной полимеризации.

Выбор лизина в качестве лиганда объясняется тем, что он специфически взаимодействует с плазминогеном, одним из белков плазмы крови.

Учитывая, что при развитии онкопатологии увеличивается интенсивность фибринолиза, определение количества плазминогена и анализ различных его изоформ в плазме крови представляет определенный интерес для диагностики раковых заболеваний. [12,13]

Для разработки таких методов диагностики могут быть использованы полимерные микросферы с ковалентно иммобилизованными лизином и поли-*N*-винилпирролидоном с содержанием звеньев β -аланина.

Лизин и ПВПм ковалентно иммобилизовали и физически адсорбировали на поверхность полимерных частиц, содержащую карбоксильные группы.

Для активации карбоксильных групп микросферы предварительно инкубировали с КДИ. Стандартная схема активации карбоксильных групп на поверхности частиц в присутствии водорастворимого карбодиимида (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид) при pH=6.8 с последующим взаимодействием полученных реакционноспособных групп с лизином и поли-*N*-винилпирролидоном приведена на рис. 5:

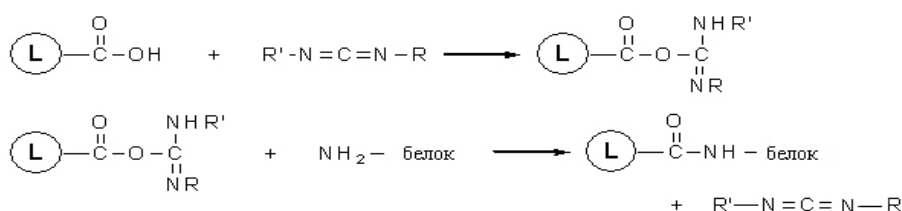
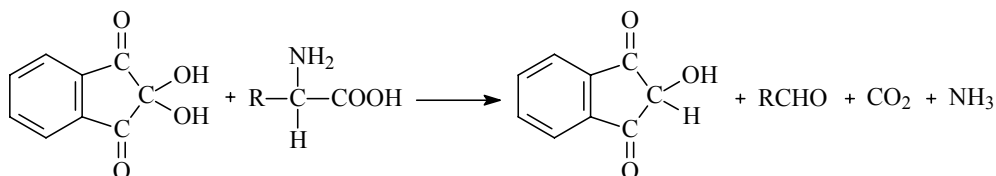


Рис. 5. Схема ковалентного связывания лизина и модифицированного аланином поливинилпирролидона с карбоксильными группами ПМС.

Концентрацию КДИ, лизина и поли-*N*-винилпирролидона выбирали, опираясь на расчетное количество карбоксильных групп на одной ПМС ($4.52 \cdot 10^8$) таким образом, чтобы обеспечить эквивалентные соотношения.

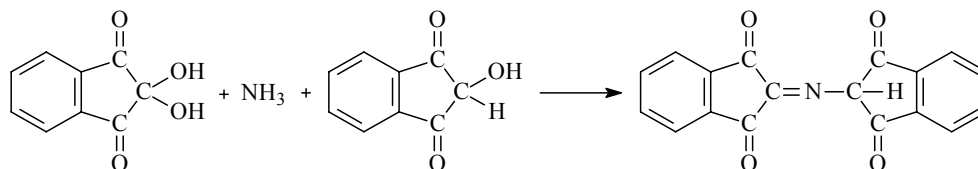
Для оценки результатов ковалентной иммобилизации лизина и поли-*N*-винилпирролидона на поверхности ПМС был проведен качествен-

ный анализ наличия аминокислоты на поверхности полистирольных микросфер. Хорошо известно, что специфическим реагентом на α -аминокислоту является нингидрин, который реагирует со всеми аминокислотами, исключая пролин и оксипролин. При этом образуется бесцветный гидриндантин, альдегид, диоксид углерода и аммиак.



В слабокислом растворе (pH 3-4) избыток нингидрина взаимодействует с гидриндантин

и аммиаком, образуя продукт пурпурного цвета.



Это окрашенное соединение можно использовать для определения α -аминокислот.

На рис. 6 представлены результаты проведенного анализа.

Из данных рисунка 6 видно, что лизин и ПВПм, адсорбированные на поверхность полимерных микросфер, полностью эллиурируются с этой поверхности трехкратным объемом раствора ФФР (рис. 6 Б и Д). Лизин и ПВПм, ковалентно связанные с поверхностными карбоксильными группами, в аналогичных условиях эллиуции остаются на поверхности (рис. 6

В и Г).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что лизин и поливинилпирролидон, модифицированный аминокислотой, ковалентно связываются с функциональными группами, расположенными на полимерной поверхности.

Совокупность полученных данных по агрегативной устойчивости полимерных суспензий в растворах электролита, распределению частиц по размерам, способности ковалентно связывать лиганды и соединения, препятствующие сорбции неспецифических белков, позво-

ляют сделать вывод о том, что синтезированные полимерные носители могут эффективно

использоваться при разработке иммунохимических диагностических систем.

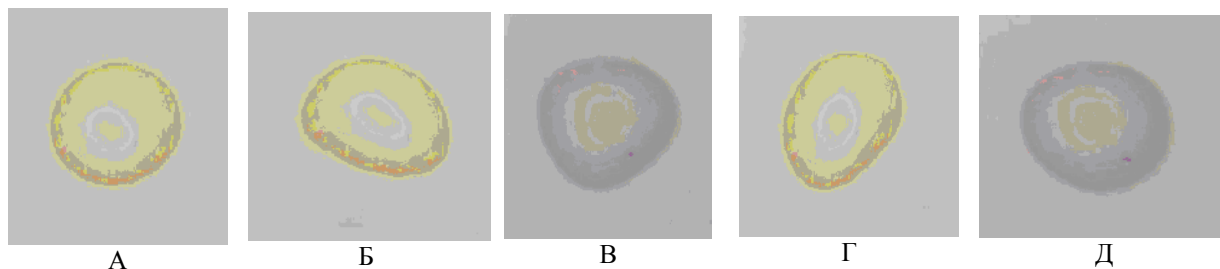


Рис. 6. Качественный анализ определения лизина на поверхности полистирольных микросфер, содержащих карбоксильные группы. (А) – исходная суспензия микросфер диаметром 6 мкм с карбоксильными группами на поверхности; (Б)- суспензия микросфер с физически адсорбированным на их поверхность лизином; (В) – суспензия микросфер с ковалентно иммобилизованным на их поверхность лизином; (Г) – суспензия микросфер с физически адсорбированным на их поверхность модифицированным поливинилпирролидоном; (Д) – суспензия микросфер с ковалентно иммобилизованным на их поверхность модифицированным поливинилпирролидоном.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bangs, L. B. Immunological applications of microspheres / L. B. Bangs // The Latex Course.– 1996. – N. 4. – P. 1–29.
2. Uniform Polymer Particles by Dispersion Polymerization in Alkohol / C. M. Tseng [et al.] // J. Polym. Sci. –1986. – Vol. 24. – P. 2995–3007.
3. Tuncel, A. Monosize Polystyrene Microbeads by Dispersion Polymerization / A. Tuncel, R. Kahraman, E. Piskin // J. of Appl. Polym. Sci. –1993. – Vol. 38, № 2. – P. 303–319.
4. О свойствах и микроструктуре композиционных латексных полимеров / В. И. Елисеева [и др.] // Высокомогл. соединения. – 1989. – Т. 31А, № 2. – С. 283–268.
5. Arshady, R. Suspension, emulsion and dispersion polymerization: A methodological survey / R. Arshady // Colloid. Polym. Sci. – 1992. – Vol. 270, № 8. – P. 717–732.
6. Bastosgonzalez, D. Electrokinetic Behavior of Polystyrene Latexes with Different Surface Groups- Effect of Heat-Treatment / D. Bastosgonzalez, R. Hidalgoalvarez, F. J. Delasnieves // J. of Colloid and Interface Science. – 1996. – Vol. 177, iss. 2. – P. 372–379.
7. Получение антителных диагностических тест-систем заданной специфичности / И. А. Грицкова, А. Н. Лобанов, Я. М. Станишевский, Н. И. Прокопов, Э. Г. Кравцов // Биотехнология. – 2003. – Вып. 2 – С. 81–85.
8. Прокопов, Н. И. Синтез монодисперсных функциональных полимерных микросфер для иммунодиагностических исследований / Н. И. Прокопов, И. А. Грицкова, В. Р. Черкасов. – М. : Центр БМТ ВИЛАР, 2005. – 137 с.
9. Analysis of Surface Aldehyde Functions on Surfactant-Free Polystyrene/Polyacrolein Latex / C. Lediszez [et al.] // Macromolecules. – 1996. – Vol. 29, iss. 3. – P. 953–959.
10. Waterboer, T. Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays / T. Waterboer, P. Sehr, M. Pawlita // J. of Immunological Methods. – 2006. – Vol. 309. – P. 200–204.
11. Синтез полимерных суспензий для иммунохимических исследований / И. А. Грицкова, Н. И. Прокопов, А. Н. Лобанов, Я. М. Станишевский // Молодые ученые и аспиранты МГТУ : тез. докл. научно-техн. конф., Мурманск, РФ, 18 – 20 апр. 2001. – Мурманск, 2001. – С. 323–324.
12. Черногубова, Е. А. Роль сериновых протеиназ в патогенезе рака простаты / Е. А. Черногубова, И. В. Браславская, А. Ю. Голиков // Вестник Южного научного центра. – 2009. – Т. 5, № 1. – С. 81–93.
13. Протеомные методы исследования в идентификации биомаркеров рака предстательной железы в моче / Е. Ф. Шин [и др.] // Вестник Южного научного центра. – 2009. – Т. 5, № 1. – С. 107–120.