

МОНОЛИТНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ: РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ**Джуца А.Ю.¹, Волокитина М.В.^{1,2}, Коржикова-Влах Е.Г.^{1,2}, Тенникова Т.Б.²**¹ Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет,
*Университетский проспект, 26, Петергоф, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ*² Институт высокомолекулярных соединений РАН
Большой пр. В.О., 31, г. Санкт-Петербург, 199004, РФ; e-mail: volokitinamariya@yandex.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Метод молекулярного импринтинга является широко используемым синтетическим подходом для изготовления новых функциональных полимерных материалов, характеризующихся высокой молекулярной селективностью. Этот метод основан на полимеризации функциональных мономеров в присутствии целевых молекул-шаблонов. Молекулярно-импринтированные полимеры применяются в широком спектре областей, таких как изготовление химических и биологических сенсоров, твердофазная экстракция, анализ лекарственных препаратов благодаря присущей им прочности, возможности многократного использования и воспроизводимости результатов. В настоящее время все больше исследований посвящено использованию в качестве сорбентов для процессов биосепарации макропористых монолитных материалов. Преимуществами данных материалов являются простота синтеза, высокая воспроизводимость, высокая механическая и химическая устойчивость и хорошо контролируемая поровая структура. Целью данной работы являлась разработка молекулярно-импринтированных систем на основе сополимера 2-аминоэтилметакрилата, 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата для экспресс-анализа фенилаланина в биологических жидкостях и исследования процесса молекулярного распознавания в этих системах. В рамках данной работы методом свободнорадикальной фотоинициируемой полимеризации получен ряд макропористых монолитных материалов в формате тонкого слоя. С использованием полученных МИП-систем разработана оптимальная процедура анализа фенилаланина. Изучено влияние таких факторов, как время взаимодействия МИП-системы с анализируемым объектом, размер пор материала матрицы и концентрация молекулы шаблона.

Ключевые слова: макропористые монолитные сорбенты, биочипы, молекулярно-импринтированные полимеры, фенилкетонурия.

Молекулярно-импринтированные полимерные (МИП) материалы – полимерные системы, содержащие молекулярные отпечатки, сформированные в результате сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии определенных молекул-шаблонов [1]. Принцип работы МИПов основывается на молекулярном распознавании целевой молекулы отпечатком, сформированном в процессе полимеризации и комплементарным целевой молекуле по размеру и форме, а также по расположению функциональных групп мономерных звеньев [2].

Синтез МИПов представляет собой универсальную процедуру, позволяющую, варьируя состав полимеризационной смеси, формат и способ полимеризации, получать селективные полимерные матрицы для детектирования широкого круга соединений. Одним из перспективных классов современных полимерных матриц для создания МИП-систем являются макропористые материалы монолитного типа. Данные материалы обладают рядом таких преимуществ, как стабильная и хорошо контролируемая на стадии получения поровая структура, высокая химическая и механическая стабильность, стабильность поровой структуры, и др. [3, 4].

Молекулярно-импринтированные полимеры получают в форме диспергированных частиц, планарных систем и монолитных колонок [5-8]. Однако, наибольший интерес представляет возможность получения высокоселективных МИПов в формате тонкого слоя, то есть биологического микрочипа. Использование подобных устройств позволит применять высокоселективные МИПы для определения различных диагностических маркеров при минимизации затрат времени и дорогостоящих реагентов для анализа.

Целью данной работы была разработка молекулярно-импринтированных систем на основе сополимера 2-аминоэтилметакрилата, 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата для экспресс-анализа уровня фенилаланина в биологических жидкостях и изучения особенностей молекулярного распознавания в данных системах.

Использование в качестве молекулы-шаблона фенилаланина обусловлено возможностью применения разрабатываемых тест-систем для диагностики фенилкетонурии (ФКУ). Данное заболевание является наследственным и в его основе лежит нарушение аминокислотного обмена [9]. В связи с высокой распространенностью в популяции, тяжестью поражения нервной системы и возможностью профилактики инвалидизирующих последствий, ФКУ является одной из первых наследственных болезней обмена, рекомендованных ВОЗ для ранней диагностики у новорожденных путем неонатального скрининга [10]. Критерием диагностики ФКУ, как правило, является уровень фенилаланина в сыворотке крови.

В ходе исследования был осуществлен синтез серии макропористых монолитных НИП и МИП материалов с использованием различного состава смеси порообразующих растворителей методом свободно-радикальной фотоиницируемой полимеризации и изучение поровой структуры полученных материалов методами сканирующей электронной микроскопии и эталонной порометрии.

Структура и свойства макропористого материала могут в большой степени влиять на процесс молекулярного распознавания. Поэтому правильный выбор полимеризационной системы и условий реакции имеет существенное значение при получении наиболее эффективных систем, основанных на молекулярном распознавании. Ключевыми характеристиками макропористых монолитных материалов является средний размер пор, пористость и удельная площадь поверхности [11]. По этой причине одной из задач данной работы являлось получение серии макропористых материалов в формате тонкого слоя с различным средним размером пор и изучение их эффективности в процессе молекулярного распознавания. Помимо поровых характеристик важным фактором, обуславливающим эффективность молекулярного распознавания, является правильный выбор мономеров в полимеризационной системе, которые могут придавать матрице необходимые гидрофильно-гидрофобные свойства, а также создавать благоприятное окружение для импринтируемой молекулы.

Для синтеза полимерных макропористых монолитных материалов были выбраны следующие мономеры: 2-аминоэтилметакрилат (АЭМА), 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА) и этиленгликольдиметакрилат (ЭДМА) в объемных соотношениях 10:30:60 %. В качестве молекулы-шаблона для получения систем молекулярного распознавания (молекулярно-импринтированных макропористых монолитных слоёв) использовали Восзамещенный L-фенилаланин. Для инициирования свободнорадикальной реакции полимеризации был использован фотоинициатор 2-гидрокси-2-метилпропиофенон. Использование различных комбинаций объемных соотношений растворителей достигали получения материалов с различным средним размером пор. Так как толуол является несольватирующим растворителем для получаемых сополимеров, при использовании его в качестве порообразующего агента получали материалы с большим средним размером пор. Увеличение доли додеканола в полимеризационной смеси, напротив, позволяло получать поры с меньшим размером (табл. 1).

Методом сканирующей электронной микроскопии была показана однородность структуры и морфологии поверхности синтезированных материалов (рис. 1). На представленных микрофотографиях отчетливо видна микроглобулярная структура полученных полимеров. Размер микроглобул варьировался в зависимости от используемой системы порогенов. Так, увеличение содержания толуола в реакционной смеси приводило к увеличению размера полимерных микроглобул и, как следствие, образованию пор большего размера.

Для оценки эффективности и селективности связывания фенилаланина использовали метод флуоресцентного анализа. Для этого предварительно меченый флуоресцентной меткой FITC фенилаланин наносили на поверхность материала с помощью бесконтактного наноспоттера GesimNano-Plotter NP (Германия). После нанесения слою помещали во влажную среду и термостатировали в закрытом виде в темноте при температуре 37 °С. После завершения процесса аффинного связывания биочипы промывали смесью изопропанола с водой при использовании термошейкера и осуществляли детектирование на флуоресцентном сканере для микрочипов при длине волны лазера 532 нм.

Эффективность связывания аналита оценивали по величине относительной интенсивности сигнала, то есть по разности интенсивностей сигнала в анализируемой зоне и свечения фона (сигнал-шум). Для сравнения были проведены различные варианты связывания фенилаланина с использованием молекулярно-импринтированных и неимпринтированных систем. На рисунке 2 представлены изображения поверхности монолитных МИП и НИП-слоёв после проведения анализа.

Таблица 1. Поровые характеристики полученных макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГЭМА-АЭМА-ЭДМА

№	Поровые характеристики		Порогены (%об:%об)	Примечания
	Размер пор, нм	Пористость, %		
1	1200	65	D:T = 20:80	
2	1100	60	D:T = 20:80	+BocPhe (4%)
3	980	60	D:T = 20:80	+BocPhe (6%)
4	960	65	D:T = 40:60	
5	720	60	D:T = 40:60	+BocPhe (4%)
6	650	60	D:T = 40:60	+BocPhe (6%)
7	680	65	D:T = 60:40	
8	470	65	D:T = 60:40	+BocPhe (4%)
9	380	60	D:T = 60:40	+BocPhe (6%)
10	340	65	D:T = 60:40	+BocPhe (8%)
11	390	65	D:T = 80:20	

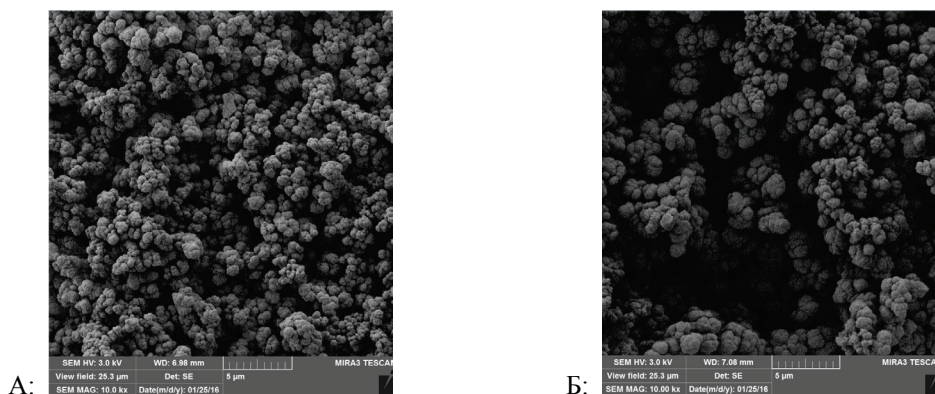


Рисунок 1. Микрофотографии образцов макропористых монолитных материалов (СЭМ анализ) на основе сополимера ГЭМА-АЭМА-ЭДМА (НИП), полученных с использованием различного содержания порообразующих растворителей: *А* – додеканол:толуол – 60:40 (об%/об%); *Б* – додеканол:толуол – 20:80 (об%/об%)

Промывка системы после взаимодействия с анализитом является важным этапом анализа и производится для удаления несвязавшегося и неспецифически связавшегося анализита с поверхности и из внутреннего порового пространства материала. При этом важно, чтобы при качественном удалении неспецифически связавшихся молекул, основная их часть оставалась в искусственных сайтах связывания молекулярно-импринтированных систем. Так как фенилаланин хорошо растворим в изопропиловом спирте, для изучения влияния состава промывочной смеси были выбраны растворы с различными объемными соотношениями воды и изопропилового спирта. Гистограммы, иллюстрирующие результаты данного эксперимента представлены на рисунке 3. По полученным данным можно судить о том, что соотношение сигнал-шум начинает существенно падать при доле изопропилового спирта в промывочном растворе более 50%, что говорит о дальнейшем вымывании не только несвязавшегося фенилаланина, но и закрепившегося на сайтах связывания. Таким образом, оптимальной смесью для промывки был выбран раствор изопропанол - вода в соотношении 50-50.

Изучение влияния среднего размера пор макропористых монолитных слоёв на процесс молекулярного распознавания было проведено с использованием серии материалов со средним размером пор, близким к 400, 800 и 1200 нм. Гистограммы, иллюстрирующие зависимость относительной интенсивности сигнала от среднего размера пор для различных концентраций наносимого анализита, представлены на рисунке 4. Очевидно, что при проведении анализа в течение 3 часов размер пор материала не оказывал существенного влияния на эффективность связывания анализита с искусственными сайтами молекулярного распознавания. Данный результат возможно объяснить способностью анализита максимально связываться с молекулярно-импринтированной матрицей за данный промежуток времени, в связи с чем эффект размера пор нивелируется. Кроме того, из полученных данных видно, что при увеличении концентрации наносимого раствора анализита относительная интенсивность сигнала возрастает до максимального значения, достигаемого при концентрации порядка 50 000 нг/мл. При этом минимальная рабочая концентрация анализита для фенилаланина, меченого FITC составляла 10 000 нг/мл.

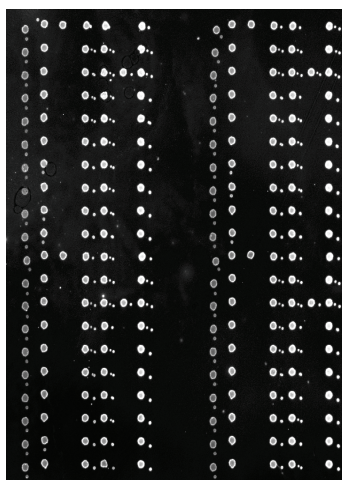


Рисунок 2. Поверхность биочипа после проведения анализа

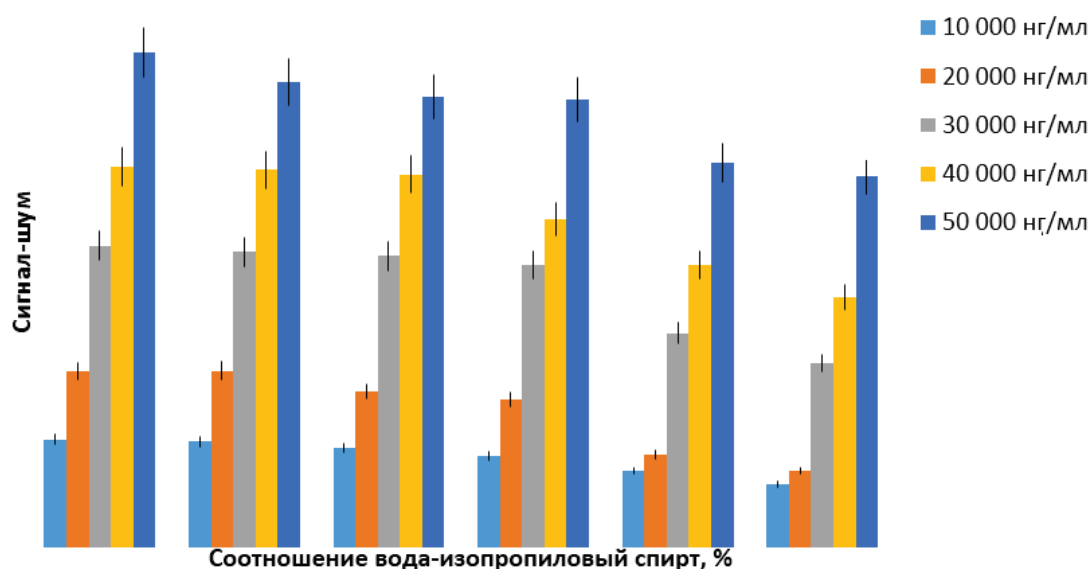


Рисунок 3. Влияние состава промывочной смеси на интенсивность сигнала, детектируемого с использованием МИП-системы (4%-BocPhe). Условия проведения анализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия с аналитом – 2 часа, температура – 37 °С.

Изучение влияния времени взаимодействия было проведено с использованием материалов со средним размером пор близким к 400 нм. Для этого после раскапывания растворов аналита на поверхность биочипы оставляли термостатироваться при температуре 37 °С на 0,5, 1, 2, 3, 5 и 24 ч. После чего следовала процедура промывки и детектирования. Гистограммы, показывающие зависимость относительной интенсивности сигнала от концентрации аналита и времени взаимодействия, представлены на рисунке 5. Очевидно, что относительная интенсивность сигнала устанавливается в своем максимальном значении по прошествии трех часов взаимодействия. Дальнейшее увеличение времени взаимодействия не влияет на значение сигнала, что говорит о достижении максимального количества связываний анализируемого вещества с сайтами МИП-матриц по истечении 3-х часов взаимодействия для систем с различным содержанием молекулы-шаблона.

Изучение влияния количества молекулы-шаблона в полимеризационной смеси на эффективность анализа фенилаланина было проведено на материалах со средним размером пор близким к 400 нм. Для исследования были взяты смеси с мольным содержанием фенилаланина 4, 6, 8% от общего количества мономеров, а также смеси без содержания молекулы-шаблона. Из представленных на рисунке 6 гистограмм можно наблюдать

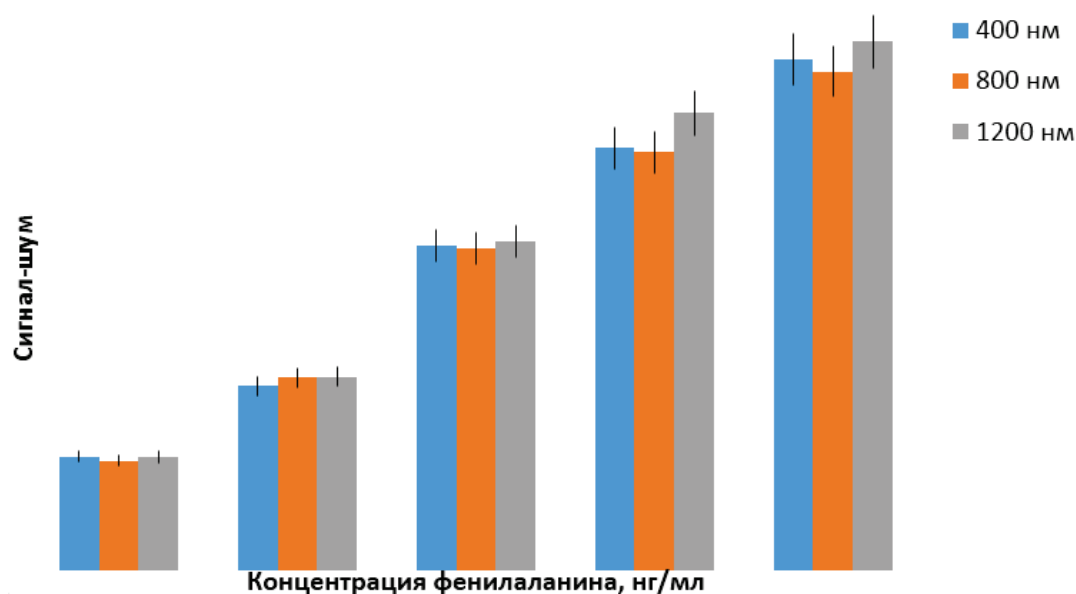


Рисунок 4. Влияние среднего размера пор на интенсивность сигнала, детектируемого при использовании МИП-системы (6%-BocPhe). Условия проведения биоанализа: время взаимодействия – 3 часа, температура – 37 °С.

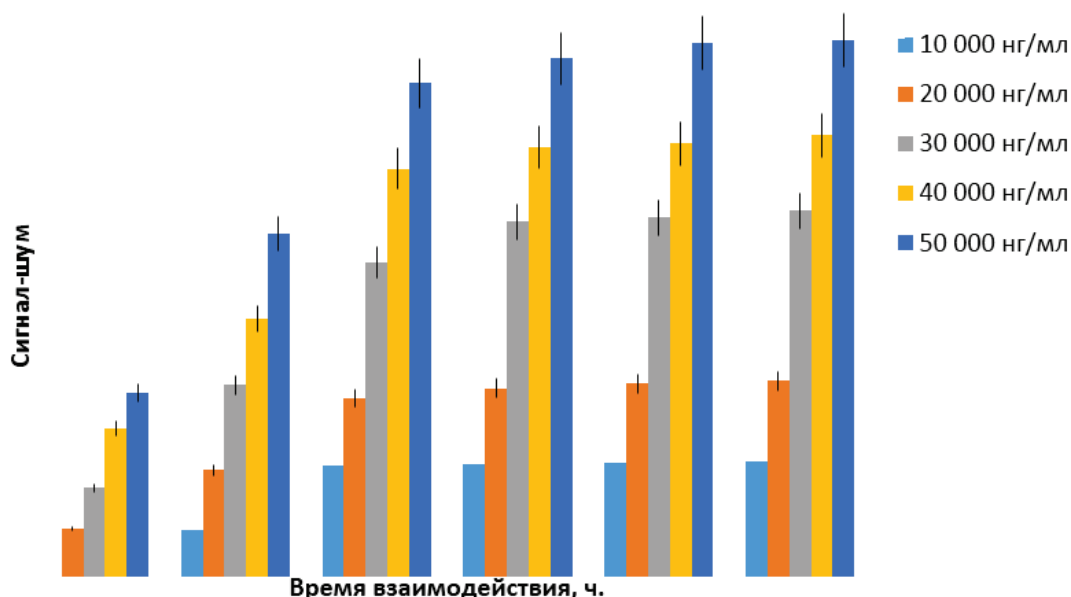


Рисунок 5. Влияние времени взаимодействия аналита с МИП-системой (6%-BocPhe) на относительную интенсивность детектируемого сигнала. Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, температура 37°С

небольшое увеличение соотношения сигнал-шум для обеих систем при переходе от 4 %- к 8 %-содержанию фенилаланина в полимеризационной смеси, что говорит о практически идентичной эффективности использования молекулярно-импринтированных систем с различным содержанием молекулы-шаблона при детектировании фенилаланина в выбранных оптимальных условиях.

Для полученных МИП-систем с различным содержанием молекулы-шаблона были рассчитаны значения коэффициента импринтирования (IF) при концентрации аналита 50 000 нг/мл. Значения IF составили 1.7; 1.8 и 1.9 для МИП-систем, полученных при использовании 4 %; 6 % и 8 %-го содержания шаблона в полимеризационной смеси, соответственно. Показано, что эффективность молекулярного импринтинга немного возрастает при переходе от 4 % к 8 %-содержанию фенилаланина в полимеризационной смеси.

Таким образом, изучено влияние состава промывочной смеси, времени взаимодействия, среднего размера пор и количества молекулы-шаблона на эффективность анализа с использованием разработанных МИП-систем. Установлено, что при проведении взаимодействия в течение 3 часов, достигается максимальное связывание аналита с материалом МИП матрицы вне зависимости от его поровых характеристик и содержания молекулы-шаблона. Оптимальной системой для промывки МИП матриц была выбрана смесь вода-изопропиловый спирт в объемном соотношении 50-50%. По результатам расчета импринтинг-факторов показана высокая эффективность

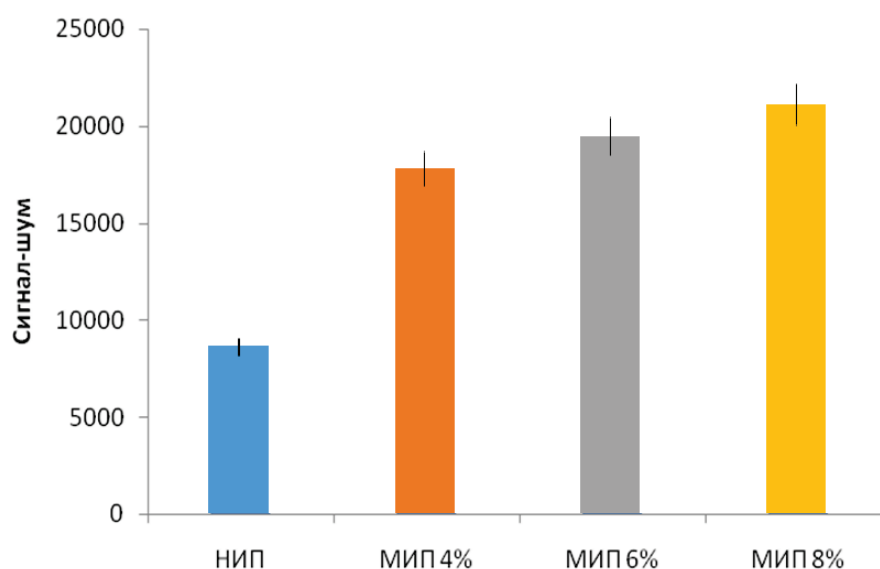


Рисунок 6. Влияние количества шаблона на относительную интенсивность сигнала при проведении детектирования фенилаланина с использованием различных МИП-систем. Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия – 3 часа, температура – 37°С.

использования разработанных молекулярно-импринтированных систем для детектирования низкомолекулярных метаболитов на примере анализа фенилаланина.

При выполнении работы было использовано оборудование ресурсных центров СПбГУ «Термогравиметрические и колориметрические методы исследования» для проведения анализа поровых характеристик получаемых материалов методом эталонной порометрии и «Геомодель» для исследования материалов методом сканирующей электронной микроскопии. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №14-50-00069 (направление 05-109).

Список литературы / References:

1. Тарантул В.З. Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии. Т. 1. – М.: Языки славянской культуры, 2015, 984 с. [Tarantula V.Z. Explanatory dictionary of molecular and cellular biotechnology. Vol. 1. – M.: languages of Slavic culture, 2015, 984 p. (In Russ.)]
2. Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. Успехи химии, 2006, т. 75, с. 998-1017 [Lisichkin G.V., Krutyakov Yu.A. Chemistry Successes, 2006, vol. 75, pp. 998-1017 (In Russ.)].
3. Svec F., Tennikova T., Deyl Z. *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*, Elsevier. 2003.
4. Tennikova T.B., Belenkii B.G, Svec F. High-performance membrane chromatography. A novel method of protein separation. *J. Liq. Chromatogr.*, 1990, vol. 13 (1), pp. 63-70.
5. Kryscio D., Peppas N. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *ActaBiomater.*, 2012, vol. 8 (2), p. 461.
6. Vlach E.G., Stepanova M.A., Korneeva Yu.M., Tennikova T.B. Molecularly imprinted macroporous monoliths for solid-phase extraction: Effect of pore size and column length on recognition properties. *J. Chromatogr. B*, 2016, pp. 198-204.
7. Ashleya J., Shahbazia M.-A., Kanta K., Chidambarab V.A., Wolffa A., Dang Duong Bangb, Suna Yi. Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, vol. 91, pp. 606-615.
8. Zhao Cheng-Jun, Ma Xiong-Hui, Li Jian-Ping. An Insulin Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor Based on Epitope Imprinting. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, vol. 45, pp. 1360-1366.
9. Sahai I., Marsden D. Newborn screening. *Clin. Lab. Sci.*, 2009, vol. 46 (2), pp. 55-82.
10. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии. М., 2013. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of phenylketonuria. Moscow, 2013 (In Russ.)]
11. Vlach E.G., Tennikova T.B. Preparation of methacrylate monoliths. *J. Sep. Sci.*, 2007, vol. 30, pp. 2801-2813.

MONOLITHIC MOLECULARLY IMPRINTED SYSTEMS FOR THE DETECTION OF PHENYLKETONURIA: DEVELOPMENT AND STUDY OF THE PROPERTIES

Dzhuzha A.U.¹, Volokitina M.V.^{1,2}, Korzhikova-Vlach E.G.^{1,2}, Tennikova T.B.²

¹Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University

Universitetskii pr, 26, Peterhof, St. Petersburg, 198504, Russia

²Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences

Bolshoi pr. V.O., 31, St. Petersburg, 199004, Russia; e-mail: volokitinamariya@yandex.ru

Abstract. A method of molecular imprinting is a widely used synthetic approach for the fabrication of novel functional polymers with pre-designed molecular selectivity. This method is based on the polymerization of functional monomers in presence of specially introduced target template molecules. Molecularly imprinted polymer materials are applied in a wide range of areas such as chemical and biological sensors, solid phase extraction and drug assays owing to their inherent robustness, reusability and reproducibility. Nowadays, more and more studies are devoted to macroporous monolithic materials as the modern design of sorbents intended to the bioseparation processes. Among the advantages of this kind of materials are the simplicity of synthesis, high reproducibility, high mechanical and chemical stability and well-controlled porous structure. The aim of this work was the development of molecularly imprinted systems based on the copolymer of 2-aminoethyl methacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate and ethyleneglycol dimethacrylate for express-analysis of phenylalanine in biological liquids and study of the process of molecular recognition in these systems. In the frame of this work, a series of macroporous monolithic materials in the thin-layer form was obtained by the method of the free radical photo-initiative polymerization. Using obtained MIP systems, the optimal procedure for analyzing of phenylalanine was developed. The influence of such factors as the time of affinity interaction, the pore size of the material, the concentration of the template molecule were studied.

Key words: macroporous monolithic sorbents, biochips, molecular imprinted polymers, phenylketonuria.