

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Направление подготовки: 04.03.01 «Химия»**

**Образовательная программа: «Химия»**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

**РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МОНОЛИТНЫХ  
МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫХ СИСТЕМ ДЛЯ АНАЛИЗА  
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ**

Студент 4 курса

Джужа Аполлинария Юрьевна

Уровень образования:

бакалавриат

Научный руководитель:

к.х.н., н.с.

Волокитина Мария Владимировна

Санкт-Петербург

2018 год

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
1.1 Молекулярно-импринтированные полимеры .....	7
1.1.1 Основные представления .....	7
1.1.2 Способы получения молекулярно-импринтированных полимеров .....	7
1.1.3 Типы импринтинг-полимеров .....	11
1.1.4 Области применения молекулярно-импринтированных полимеров .....	14
1.2 Макропористые монокристаллические материалы .....	15
1.2.1 Синтез макропористых монокристаллических материалов .....	15
1.2.2 Контроль пористости и размера пор при синтезе монокристаллов .....	17
1.2.3 Методы изучения структуры монокристалла и морфологии поверхности .....	18
1.2.4 Макропористые молекулярно-импринтированные монокристаллические системы .....	21
1.3 Фенилкетонурия .....	23
1.3.1. Этиология и патогенез .....	24
1.3.2 Классификация и формы заболевания .....	26
1.3.3 Диагностика .....	26
1.3.4 Лечение .....	28
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	30
2.1 Материалы .....	30
2.2 Оборудование .....	30
2.3 Методы .....	31
2.3.1 Получение МИП и НИП-чипов на основе макропористых монокристаллических носителей .....	31
2.3.2 Получение флуоресцентно-меченых аналитов .....	32
2.3.3 Проведение анализа содержания фенилаланина с использованием МИП и НИП-чипов .....	33
2.3.4 Проведение анализа содержания фенилаланина с использованием МИП и НИП-чипов из модельной биологической жидкости .....	34
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....	35
3.1 Синтез макропористых монокристаллических материалов .....	35
3.2 Изучение влияния различных параметров на эффективность биоанализа .....	39

3.2.1 Влияние условий промывки системы после взаимодействия с аналитом.....	39
3.2.2 Влияние среднего размера пор макропористых монокристаллических материалов.....	41
3.2.3 Влияние времени взаимодействия аналита с молекулярно-импринтированной системой .....	43
3.2.4 Влияние количества молекулы-шаблона .....	45
3.3 Эффективность импринтинга.....	47
3.4 Изучение чувствительности МИП-системы при проведении анализа в различных средах.....	48
ВЫВОДЫ .....	51
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	52
БЛАГОДАРНОСТИ .....	56

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

МИП – молекулярно-импринтированный полимер

НИП – неимпринтированный полимер

БЭТ – метод Брунауэра-Эммета-Теллера

МЭП – метод эталонной порометрии

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФКУ - фенилкетонурия

АЭМА – 2-аминоэтилметакрилат

ГЭМА – 2-гидроксиэтилметакрилат

ЭДМА - этиленгликольдиметакрилат

ИФ – импринтинг-фактор

ДМСО – диметилсульфоксид

Phe – фенилаланин

Woc-Phe – Woc-защищенный фенилаланин

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых требований, предъявляемых к сорбционным материалам, используемым для аналитических целей, является их высокая селективность. В большинстве случаев данную задачу решают путём ввода в матрицу функциональных групп или лигандов, обладающих избирательной сорбцией по отношению к целевым веществам. Среди вариантов создания высокоселективных сорбционных систем выделяется синтез полимерных матриц, «структурно настраиваемых» на целевой сорбат. К таким системам можно отнести полимеры с «молекулярными отпечатками», получаемые методом молекулярного импринтинга.

В настоящее время молекулярно-импринтированные системы вызывают большой интерес исследователей всего мира благодаря своей способности к высокоспецифичному распознаванию молекул-шаблонов, отпечатки структуры которых заложены в организованной полимерной матрице. Одним из перспективных классов современных полимерных матриц для создания МИП-систем являются макропористые материалы монолитного типа, так как они обладают рядом преимуществ, таких как: стабильная и хорошо контролируемая на стадии получения поровая структура, высокая химическая и механическая стабильность, незатрудненный массоперенос и др.

Молекулярно-импринтированные полимеры получают в форме диспергированных частиц, планарных систем и объемных структур. 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. Таким образом, получение молекулярно-импринтированных систем на основе макропористых монолитных материалов в формате тонкого слоя **является актуальной задачей.**

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

**В задачи работы входило:**

- 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, БЭТ и эталонной порометрии;

- изучение влияния различных параметров, таких как характеристики материала и условия проведения, на эффективность определения фенилаланина с использованием полученных НИП и МИП сорбентов;

- изучение эффективности определения фенилаланина с использованием полученных НИП и МИП сорбентов при проведении анализа в модельных средах и в реальной биологической жидкости (плазме крови человека).

**Объектами исследования** являлись макропористые монолитные МИП и НИП материалы, полученные на основе мономеров метакрилового ряда с использованием БОК-замещенного фенилаланина в качестве молекулы-шаблона и предназначенные для получения биочипов для диагностики фенилкетонурии.

В качестве **методов исследования** применялись свободно-радикальная фотоиницируемая сополимеризация в массе, сканирующая электронная микроскопия, БЭТ и эталонная порометрия для изучения поровой структуры полученных материалов, флуоресцентный анализ для детектирования высокоселективного связывания фенилаланина.

## **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Молекулярно-импринтированные полимеры**

#### **1.1 Основные представления**

Молекулярно-импринтированные полимеры (МИПы) – это искусственные полимерные молекулы-отпечатки, получаемые в результате сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии определенных молекул-шаблонов [1]. Исторически интерес к технологии молекулярного импринтинга возник в области создания искусственных рецепторов, которые бы обладали большей стабильностью, чем природные, но при этом были бы способны к высокоспецифичному и аффинному взаимодействию [2,3]. Первая попытка создания полимеров с молекулярными отпечатками была осуществлена посредством смешивания кислого водного раствора силиката с метиловым оранжевым [4]. В результате был получен полимер, способный к дифференцированному распознаванию использованного в качестве шаблона красителя среди структурно сходных соединений. Таким образом, принцип работы МИПов основывается на формировании в процессе полимеризации полостей, комплементарных молекуле-шаблону, то есть подходящих не только по размеру и форме, но и по расположению функциональных групп мономеров сополимера [2]. Синтез МИПов представляет собой универсальную процедуру, позволяющую, варьируя состав полимеризационной смеси, формат и способ полимеризации, получать селективные полимеры для широкого круга соединений. Стоит заметить, что до сих пор импринтинг биологических макромолекул, таких как белки, является сложной задачей по причине их размера, сложной пространственной структуры, растворимости и конформационной подвижности [2,3,5,6]

#### **1.1.2 Способы получения молекулярно-импринтированных полимеров**

Наиболее распространённым методом получения молекулярно-импринтированных полимеров является свободно-радикальная полимеризация в массе [7-9]. В данном случае возможна конверсия широкого круга виниловых мономеров, привлекательных по причине своей коммерческой доступности и содержанию различных функциональных групп. Кроме того радикальная полимеризация проводится в относительно мягких условиях и не требует высокой чистоты реагентов. Полимеризационную смесь готовят из одного или нескольких

функциональных мономеров, сшивающего агента, инициатора полимеризации, растворителя, необходимого для образования пор, и шаблона. Инициация может быть вызвана либо нагреванием реакционной смеси до температуры распада инициатора, либо УФ-облучением.

Поскольку МИПы чаще всего используются в виде порошка частиц, размер которых варьируется в зависимости от целей использования, образовавшийся жесткий пористый полимерный монолит подвергают механическому размалыванию. При этом происходит образование неоднородных частиц. Гомогенизация по размеру осуществляется путем многократного просеивания через сита с определенным диаметром пор и последующей седиментации. Потери полимерного материала в ходе данных процедур могут составлять более 50% [10].

Синтез молекулярно-импринтированных полимеров включает три этапа: (I) образование предполимеризационного комплекса, (II) полимеризацию и (III) промывку полимера с целью удаления молекулы-шаблона.

На первом этапе формируется сеть контактов между молекулой-шаблоном (или ее фрагментом в случае высокомолекулярных соединений) и функциональными мономерами. Эти контакты могут формироваться как за счет ковалентных связей, так и нековалентных межмолекулярных взаимодействий - водородных и ионных связей, гидрофобных и  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и др. На втором этапе осуществляется процесс полимеризации образованного комплекса и сшивающего мономера – образуется полимерный каркас, который содержит участки с фиксированным расположением функциональных групп, задаваемым молекулой-шаблоном. В результате третьего этапа в полимерном каркасе образуются полости – отпечатки, которые в идеальном случае должны быть комплементарны шаблону по размеру, форме и расположению функциональных групп и способны к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном или его структурным аналогом [11].

Различия в формировании сети контактов между молекулой-шаблоном и функциональными мономерами на первом этапе синтеза МИПов обуславливают подразделение методов молекулярного импринтинга на ковалентный молекулярный импринтинг и нековалентный молекулярный импринтинг (рис.1).



При нековалентном импринтинге предполимеризационный комплекс образуется за счет самоассоциации молекул шаблона и мономера.[12, 13]. Внедрение шаблона при нековалентном импринтинге проводят, как правило, в неполярных органических растворителях, так как в полярных нековалентные контакты разрушаются, что препятствует образованию стабильного предполимеризационного комплекса. Также практикуется нековалентный импринтинг в водных средах для внедрения биомолекулярных шаблонов. [14, 15]. После проведения полимеризации молекула-шаблон удаляется многократной экстракцией растворителем или смесью растворителей [6].

Для получения МИПов методом нековалентного импринтинга в качестве функционального мономера чаще всего используют метакриловую кислоту – она способна образовывать и ионные, и водородные связи, а в качестве сшивающего мономера чаще всего используют этиленгликольдиметакрилат. Установлено, что использование при полимеризации смеси функциональных мономеров, способных к взаимодействию с различными функциональными группами молекулы-шаблона, приводит к повышению селективности связывания шаблона относительно полимера, полученного при использовании только одного функционального мономера [16]. Используются и более сложные подходы к формированию МИПов с применением ряда функциональных мономеров, композитных материалов, а также дополнительных факторов, позволяющих контролировать структуру полимера. Например, были использованы координационные свойства металлов для позиционирования фрагментов функциональных мономеров в микрогелевой структуре полимера, чтобы имитировать активный центр фермента класса протеаз. Полимер, полученный в присутствии ионов металла, обладал активностью, схожей с активностью фермента по сравнению с неимпринтированным полимером [17].

Процедура нековалентного импринтинга манипуляторно проще и не накладывает жестких ограничений на выбор функционального мономера и импринт-молекул. В настоящее время именно этот подход лежит в основе большинства работ по созданию МИПов [11,15].

Ковалентный импринтинг основан на химическом синтезе комплексов функциональный мономер – шаблон в виде модифицированного шаблона или молекулы конъюгата. При полимеризации таких конъюгатов в присутствии

сшивающих агентов образуется полимер, содержащий ковалентно связанные молекулы шаблона. После проведения полимеризации шаблон удаляется путем направленного разрушения химических связей, что и обуславливает узкий выбор пар шаблон-функциональный мономер. Как правило, степень извлечения шаблона при ковалентном импринтинге не превышает 90%. [6]. Чаще всего используют образование сложноэфирных или иминных связей, так как они легко деградируемы в определенных условиях [18]. При использовании ковалентного импринтинга получают полимеры с более однородным распределением отпечатков в структуре, а их соответствие молекуле-шаблону обеспечивается более четким положением функциональных групп, соответственно, и более высокой селективностью по сравнению с нековалентным импринтингом.

К недостаткам ковалентного импринтинга можно отнести трудность экстракции шаблона в условиях, не приводящих к деструкции полимера, медленную кинетику связывания и высвобождения целевой молекулы, обусловленную скоростью образования и разрушения ковалентной связи, а также значительно большую трудоемкость как в отношении выбора молекулы-шаблона, так и проведения эксперимента.

Попытки объединить достоинства ковалентного и нековалентного импринтинга привели к созданию метода так называемого полуковалентного импринтинга [19-21]. Этот метод заключается в проведении импринтинга путем полимеризации функциональных мономеров в ковалентных комплексах с шаблоном, при этом связи последнего с МИПами имеют нековалентную природу. В результате реализации подобного подхода получают полимеры, обладающие однородностью и селективностью ковалентно-импринтированных, и характеризующиеся кинетикой нековалентно-импринтированных, так как они не имеют других, кроме диффузии кинетических ограничений при последующем связывании молекулы шаблона.

Таким образом, выбор подхода для получения молекулярно-импринтированных полимеров зависит от многих факторов и определяется конкретной исследовательской или технологической задачей.

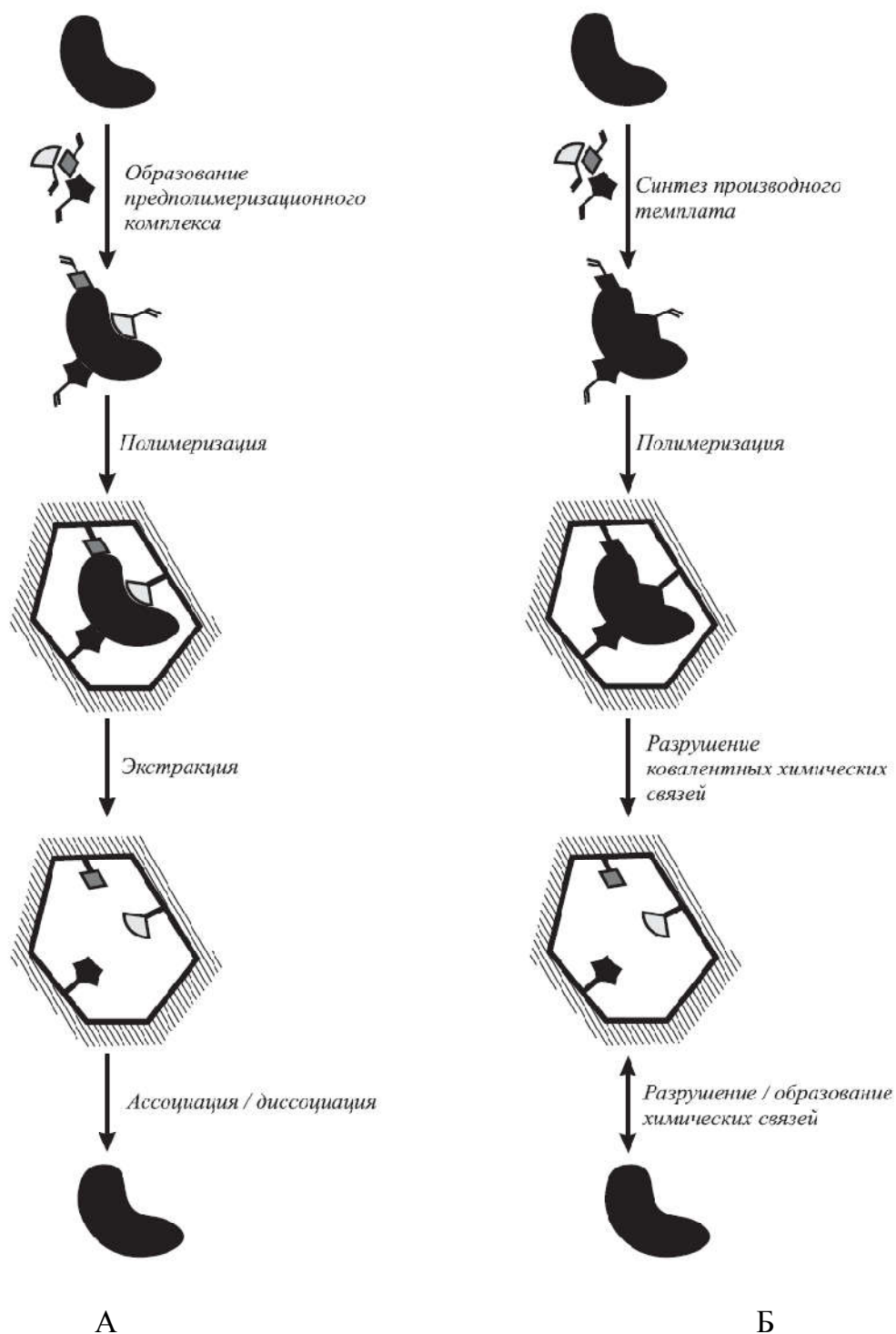


Рисунок 1 – Схемы нековалентного (А) и ковалентного (Б) импринтинга  
 Рисунок адаптирован из [5].

### 1.1.3 Типы импринтинг-полимеров

Методов получения органических полимеров для молекулярного распознавания разработано достаточно много. Среди них выделяют методы трёхмерного и двумерного импринтинга.

Наиболее популярным является проведение реакции в объеме (трехмерный импринтинг) с образованием полимерного матрикса, содержащего молекулы шаблона. Известны способы получения МИПов методом трехмерного импринтинга на основе гидрогелей. Преимуществом такого метода является полимеризация в мягких условиях. К недостаткам гель-полимеров можно отнести потерю стерического соответствия молекуле-шаблону из-за недостаточной жесткости полимерного каркаса, их неустойчивость при изменении среды, необходимость тщательного подбора функциональных мономеров [22].

Импринтинг с использованием композитных материалов позволяет изменять свойства МИПов. Достоинством такого метода является, как и для гидрогелей возможность проведения полимеризации в мягких условиях в водных растворах, однако при этом получают полимеры с большей, чем у гидрогелей, прочностью каркаса. Кроме того, носитель может выполнять дополнительные функции, например, за счет введения магнитных частиц полимер может обладать ненулевой остаточной намагниченностью – такой подход был предложен для селективного распознавания гемоглобина [23-25].

Широко применяется импринтинг молекул в структуре макропористых монолитных материалов. Необходимым условием формирования поровой структуры является наличие в полимеризационной смеси инертного растворителя, выполняющего роль порообразующего агента. Монолитные материалы представлены также криоструктурированными макропористыми гелями, так называемыми «криогелями». С использованием технологии криогелей, благодаря их сверхмакропористому характеру и высокой степени пористости, удалось добиться разделения цельных клеток. Они также используются в тканевой инженерии – на основе криогелей создаются скаффолды, обеспечивающие трехмерный рост клеток. Одним из важных достоинств криогелей является относительная безопасность их получения и экологичность – в качестве растворителя часто используется обычная вода, а для удаления молекулы-шаблона не требуются дополнительные реактивы. [6, 26].

Относительно новым направлением является получение МИПов в капроновой матрице. В такой схеме отсутствует стадия сополимеризации, так как формирование капронового каркаса происходит из уже находящихся в растворе полимерных цепей.

Было показано, что такие полимерные системы обладают повышенным сродством по отношению к молекуле-шаблону, присутствующей при синтезе. Кроме того, при использовании технологии получения МИПов на основе капроновой матрицы, можно получать полимеры различных форматов: в виде пленки или объемной структуры, например, микрочастицы. Однако для получения подобных систем в качестве растворителей используются сильные кислоты, которые могут способствовать деградации биологических шаблонов [3].

Импринтинг в капроне является не единственным примером импринтинга в готовые полимеры – также применяется импринтинг в биополимерах – нуклеиновых кислотах и полипептидах [27]. Однако набухаемость, лабильность и недостаточная проницаемость таких полимеров ограничивают их применение. Эти ограничения могут быть в значительной мере преодолены при закреплении тонкого слоя полимера на поверхности или в порах носителя, например пористого силикагеля (двумерный импринтинг). Прочное связывание достигается путем предварительного химического закрепления функциональных групп на поверхности носителя, способных в дальнейшем вовлекаться в реакцию полимеризации [2].

Принцип двумерного импринтинга заключается в иммобилизации молекулы-шаблона на поверхности носителя, ее обработке мономерами, иницировании полимеризации и последующем удалении подложки и шаблона, в результате чего образуется полимер, содержащий отпечаток, комплементарный удаленному шаблону. В качестве носителей используются: наночастицы золота, стекло, слюда, пористые частицы кварца, пластиковые планшеты и другие материалы [28]. Двумерный импринтинг позволяет дополнительно контролировать структуру МИПов при создании отпечатка шаблона путем использования носителей различного размера и разной степени пористости. Двумерные МИПы получают центрифугированием, напылением и софт-литографией [5].

Другой способ двумерного импринтинга заключается в нанесении тонких слоев полимера на плоские поверхности или частицы с иммобилизованным шаблоном. Его разновидностью является нанесение на подложку полимеризационной смеси, содержащей неиммобилизованный шаблон [29]. Подход двумерного импринтинга, не усложняя технологию синтеза полимера, обеспечивает большую доступность сайтов связывания, чем импринтинг в объеме.

#### 1.1.4 Области применения молекулярно-импринтированных полимеров

Чрезвычайная привлекательность импринтированных полимеров для практического использования обусловлена такими их свойствами, как крайне высокая стабильность, простота получения, аффинность и селективность.

Распространенной областью применения полимеров с «молекулярной памятью» является хроматографическое выделение индивидуальных веществ. МИП-хроматография оказалась адекватной альтернативой аффинной хроматографии при разделении стереоизомеров, так как сам принцип молекулярного импринтинга подразумевает энантиоселективность распознавания. Более того, возможно получение МИП-сорбентов для разделения соединений, содержащих несколько хиральных центров, например, дипептидов. МИПы с успехом разделяют изомеры различных углеводов [5]. Разработан метод определения абсолютной конфигурации молекул при использовании энантиомерных пар МИПов [30, 31]. Также МИПы применяются в качестве сорбентов в капиллярной электрохроматографии и тонкослойной хроматографии [11].

Однако наибольшее число публикаций по применению импринтированных полимеров посвящено системам твердофазной экстракции, что обусловлено дешевизной МИПов, их совместимостью с органическими растворителями, устойчивостью в различных средах и высокой избирательностью связывания. Необходимость эффективной предварительной очистки и концентрирования проб для медицинского, экологического и пищевого анализа определяет интерес к созданию новых методов твердофазной экстракции (ТФЭ) [32]. ТФЭ с использованием МИПов предложена для пробоподготовки биологических жидкостей – плазмы и сыворотки крови, мочи, желчи, экстракта из печени, а также питьевой и природной воды, продуктов питания, растительных экстрактов и многих других объектов. [5, 33, 34].

Ведутся работы в области разработки химических сенсоров на основе молекулярно-импринтированных полимеров – они рассматриваются как альтернатива биосенсорам, которые характеризуются низкой стабильностью и высокой стоимостью. В настоящее время разработаны сенсоры для определения некоторых гербицидов, сахаров, лекарств, нуклеиновых кислот, отравляющих веществ, антибиотиков, ферментов и др. [35-41].

Также перспективными являются направления разработки систем доставки лекарств и синтетических антител для применения *in vivo* на основе молекулярно-импринтированных полимеров. Благодаря своей стабильности в большинстве биологических и химических сред, использование МИПов обеспечивает постоянство скорости высвобождения лекарственного средства из полимерной структуры. Также гарантируется и замедленное высвобождение молекулы-шаблона за счет сродства матрицы к ней. При разработке систем для пролонгированной доставки лекарств опираются на их способность к распознаванию и связыванию/высвобождению молекул в ответ на изменение условий: pH, температуры, изменение концентрации конкурирующих молекул и самой молекулы-шаблона в окружающей среде [11].

Известны методы катализа органических реакций (альдольной конденсации, Дильса-Альдера, гидролиза эфиров и др.) при использовании МИПов. В таких случаях шаблоном для синтеза полимера является соединение, сходное с переходным состоянием трансформируемого субстрата [5].

## **1.2 Макропористые монолитные материалы**

Макропористые монолитные материалы представляют собой однородные твердые матрицы, содержащие систему взаимопроникающих пор различного размера. Как правило, их структура стабильна, то есть данные материалы не набухают и не сжимаются, их поровые характеристики не изменяются при помещении твердых сорбентов в раствор. Монолитные полимеры имеют высокую химическую стабильность, морфологию, обеспечивающую доступность порового пространства, и уникальные гидродинамические характеристики, что делает их перспективными материалами для реализации процессов, основанных на межфазовом динамическом массопереносе. Путем полимеризации в подходящих формах можно получить разнообразные варианты таких сорбентов требуемого размера и дизайна [42].

### **1.2.1 Синтез макропористых монолитных материалов**

Традиционным методом получения макропористых монолитных материалов является свободно-радикальная сополимеризация функциональных и сшивающих мономеров в присутствии инертного растворителя и инициатора. Первые макропористые монолиты на основе синтетических полимеров были получены методом свободно-радикальной термоинициируемой полимеризации [6]. Впоследствии для получения монолитов также стали применять свободно-

радикальную фотоиницируемую полимеризацию при комнатной температуре в присутствии низкокипящих растворителей, выступающих в качестве порообразователей [42].

Механизм структурообразования макропористого монолита из предполимеризационной смеси можно объяснить следующим образом (рис.2). Сначала под действием излучения происходит распад инициатора (используется термическое инициирование, фотоиницирование и инициирование под действием  $\gamma$ -излучения), и образовавшиеся свободные радикалы инициируют процесс полимеризации. По мере роста полимерных цепей, их растворимость в смеси растворителей снижается и они осаждаются с образованием ядер – гелеподобных олигомерных частиц. Так как мономеры являются термодинамически более хорошими растворителями для полимерных цепей, чем порообразующие растворители, осажденные ядра притягивают к себе мономеры. В результате концентрация мономеров в ядрах становится выше, чем в окружающем растворе, ядра постепенно достигают размеров микроглобул. Растущие полимерные глобулы объединяются в кластеры, удерживаемые полимерными цепями, пронизывающими соседние частицы. Дальнейший рост и сшивка микроглобул между собой приводит к окончательному формированию структуры пористого материала. Результатом процесса полимеризации является двухфазная система, состоящая из полимерного монолита и фазы инертных растворителей, заполняющих поровое пространство сополимера [6, 43]. При этом доля пустот в конечном полимере близка к объемной доле порообразующих растворителей в исходной полимеризационной смеси.

Образующийся полимер характеризуется сложной морфологией. Для данного материала характерно бимодальное распределение пор по размерам, что объясняется низким межфазным натяжением между органической и водной фазами и отсутствием динамических сил перемешивания. По этой причине уже на начальных стадиях полимеризации происходит осаждение образующихся ядер вследствие их более высокой плотности по сравнению с плотностью полимеризационной смеси [44]. Монолиты, полученные методом полимеризации в массе состоят из макроглобул, частично агрегировавших в кластеры. Нерегулярные пустоты между кластерами являются макропорами размером более 50 нм, которые образуют сплошную сеть каналов [45]. Наличие подобной сети каналов в макропористых монолитных



материалах увеличивает скорость массообмена между стационарной и подвижной фазами в условиях осуществления динамических межфазных процессов по сравнению с диспергированными сорбентами. Агломераты ядер образуют микроглобулы, расстояния между которыми составляют 20-50 нм и рассматриваются как *мезопоры*. Расстояния между непористыми ядрами, составляющие менее 2 нм, классифицируются как *микропоры*.

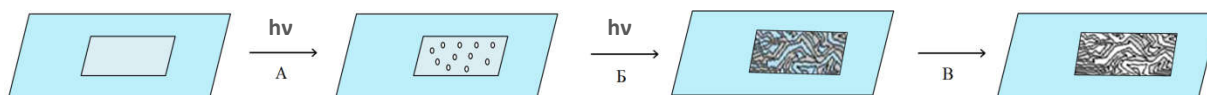


Рисунок 2 – Синтез макропористых монолитных материалов в формате тонкого слоя. А – реакционная смесь в полости стеклянной пластинки. Под действием УФ-излучения образуются центры полимеризации. Б – под действием УФ-излучения происходит сшивка полимерных глобул и образование проточных каналов (пор). В – получение готовой монолитной матрицы после промывки смесью изопропанол:вода

### 1.2.2 Контроль пористости и размера пор при синтезе монолитов

Образование поровой структуры в полимерных материалах объясняется как результат фазового разделения, начинающегося на определенном этапе процесса полимеризации. Разделяющиеся фазы состоят одна из высокомолекулярных, а другая - из низкомолекулярных соединений [46]. Правильный выбор состава полимеризационной смеси необходим для достижения требуемых поровых характеристик (пористости и среднего размера пор).

Пористость представляет собой долю объема пор в общем объеме пористого монолита. Одним из параметров контроля пористости монолитов, полученных методом свободно-радикальной полимеризации, является температура, при которой проводится реакция. В общем случае, чем выше температура процесса, тем меньше размер пор – это справедливо как для стирол/дивинилбензольных, так и для метакриловых полимеров [47]. Объяснением этого правила является то, что с увеличением температуры процесса увеличивается скорость роста полимерных цепочек, которые далее образуют нерастворимые ядра. Чем большее число ядер образовалось в полимеризационной смеси, и чем меньше размеры ядер, тем меньше объемы пустот в микроглобулах, формирующихся из этих ядер.

Решающим фактором является состав полимеризационной смеси, а именно состав смеси порообразующих растворителей. Чем больше объемная доля фазы порогенов, тем больше средний диаметр пор. Этот эффект может быть частично нивелирован путем увеличения температуры, так как при этом возрастает растворимость полимерных цепей в растворителях, а следовательно, уменьшается средний диаметр пор. Также на поровую структуру полимера оказывает влияние состав фазы порогенов. Основным параметром, характеризующим растворитель, является его термодинамическая совместимость к образующемуся сополимеру. Чем более «хорошим» является растворитель (более термодинамически совместимым), тем меньшие размеры пор получают в конечной структуре. Например, при использовании смеси додеканол:циклогесанол в качестве порогенов для полимеризации мономеров метакрилового ряда, с увеличением доли додеканаола увеличивается средний размер пор, так как он является несольватирующим растворителем для образующегося сополимера. В смеси же додеканол:толуол несольватирующим растворителем является толуол, а увеличение доли додеканаола приводит к получению полимеров с меньшим средним размером пор.

Важное значение также имеет соотношение функциональных и сшивающих мономеров в полимеризационной смеси. Чем больше доля сшивающего агента, тем выше степень сшивки на ранних стадиях полимеризации. Это приводит к раннему наступлению процесса фазового разделения, то есть к большому количеству маленьких ядер, а также к уменьшенной способности образовавшихся ядер к набуханию с растворителями и/или мономерами. Вследствие этого сшиваются ядра меньшего размера с образованием меньшего размера микроглобул и меньшего размера пустот - пор. Другими словами, образуются сильно агрегировавшие микроглобулы, состоящие из большего числа ядер. В итоге получается структура с высоким содержанием микропор и большой удельной площадью поверхности – до  $800 \text{ м}^2/\text{г}$  [48-50].

### **1.2.3 Методы изучения структуры монолита и морфологии поверхности**

Универсальным методом определения удельной площади поверхности макропористых монолитных материалов, мало чувствительным к химической природе поверхности, наличию пор и другим факторам является метод, основанный на физической адсорбции – метод Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ).

Был предложен метод вычисления удельной площади поверхности  $A$  по уравнению:

$$A = a_m N \omega_m, \quad (1)$$

где  $N$  - число Авогадро,  $\omega_m$  - площадь, приходящаяся на одну молекулу в монослое,  $a_m$  (моль/г) - емкость монослоя в так называемой точке Б - точке завершения заполнения первого слоя и начала заполнения второго слоя (т.е. объем монослоя на поверхности сорбента),  $a_m$  - наиболее просто определяемая константа из линейной формы уравнения полимолекулярной физической адсорбции:

$$\frac{p/p_0}{a(1-p/p_0)} = \frac{1}{a_m C} + \frac{(C-1)p/p_0}{a_m C}, \quad (2)$$

где  $p/p_0$  - отношение давления в системе к давлению конденсации,  $a$  - величина адсорбции,  $a_m$  - объем монослоя на поверхности сорбента,  $C$  - отношение константы адсорбционного равновесия в первом слое к константе конденсации.

Для нахождения площади поверхности пористого тела получают экспериментальную зависимость  $a = f(p/p_0)$  при постоянной температуре (изотерма адсорбции), после чего по уравнению БЭТ (2) вычисляют величину  $a_m$  и, затем, число молекул в монослое. Зная площадь, занимаемую одной молекулой, можно рассчитать суммарную площадь поверхности адсорбента любой формы и пористости.

При проведении эксперимента применяется адсорбция азота при температуре его кипения 77 К. Принято считать, что метод БЭТ можно использовать для определения площади поверхности с точностью 5–10% в интервале значений относительного давления  $(p/p_0) = 0,05 - 0,35$ .

Метод эталонной порометрии (МЭП) подходит для исследования любого типа пористых материалов, включая мягкие, хрупкие, а также материалы, склонные к образованию амальгам, и порошки. Метод сравнительно прост, осуществляется без разрушения образца, что позволяет проводить измерения в более широком диапазоне размеров пор. Любая смачивающая жидкость может быть использована в качестве тестирующей в МЭП. Метод позволяет работать в широком диапазоне давлений и температур. Таким образом, МЭП позволяет исследовать разные пористые материалы и образцы в их реальной среде использования.

Метод основан на законах капиллярного равновесия. Если известна порометрическая кривая, или порограмма, для одного тела (эталоны), то можно получить порограмму для неизвестного образца за счет сравнения количества жидкости в образце и в эталоне в условиях капиллярного равновесия, достигаемого плотным контактом этих двух пористых тел друг с другом. Выбор стандартного образца обусловлен необходимым отсутствием в нем капиллярной конденсации в том интервале давлений, в котором проводится исследование. То есть при изучении структуры микропор допустимо наличие в стандартном образце крупных мезопор и макропор, при изучении мезопористости стандартный образец может содержать крупные макропоры. МЭП измеряет зависимость равновесного объема смачивающей жидкости в образце ( $V_t$ ) как функцию объема жидкости в стандарте ( $V_s$ ). Количество жидкости в образцах определяется взвешиванием. Метод эталонной порометрии позволяет определять размеры пор в интервале от  $\sim 1,5$  до  $\sim 50$  нм.

Для измерения пор большего размера используется метод ртутной порометрии, позволяющий определять размеры пор от  $\sim 2,5$  до  $\sim 30\,000$  нм. Этот метод основан на принудительном введении (интрузии) ртути в поры твердого тела. Расчет производится по уравнениям Уошберна, выражающим зависимость давления, необходимого для введения несмачивающей жидкости в капилляр от радиуса капилляра (или от полуширины щели), от природы жидкости через величину ее поверхностного натяжения и от природы материала через величину его краевого угла смачивания (его почти всегда принимают равным  $140^\circ$ ).

Сочетание обоих методов позволяет, во-первых, исследовать пористую структуру в наиболее широком интервале размеров, а во-вторых, получить представление о том, насколько совпадают или различаются результаты измерений в интервале, где эти размеры перекрываются. При согласии результатов, полученных обоими методами, можно сделать вывод о том, что уравнения, лежащие в их основе, правильно отражают закономерности капиллярных свойств пористых материалов. Говоря о причинах наблюдаемых различий, нужно иметь в виду погрешности применения каждого отдельного метода. Так, к ошибкам ртутной порометрии чаще всего относят пренебрежение к отличиям краевого угла для материалов различной природы (в действительности он варьируется в интервале от  $135^\circ$  до  $150^\circ$ ) или возможное частичное разрушение некоторых образцов под действием высокого

давления. Кроме того, в методе ртутной порометрии отклонение формы пор от цилиндрической может приводить к отклонениям от простого соотношения, выражаемого уравнением Уошберна. Для метода эталонной попрометрии ошибки могут быть допущены при учете вклада полимолекулярной адсорбции.

Также для оценки размера пор может быть использован метод электронной микроскопии [51]. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) – метод анализа структуры поверхности объекта путем анализа отраженного «электронного изображения». Принципиальная схема сканирующего электронного микроскопа включает в себя источник электронов, оптическую систему для фокусировки электронов и сканирования (электронную колонну), камеру с образцом и детекторы для регистрации сигнала, а также систему откачки, необходимую для создания вакуума в микроскопе. Поскольку в воздухе электрон не сможет долететь от источника до образца, так как столкнется с молекулами воздуха на своем пути, вакуум в пушке, колонне и камере микроскопа является необходимым условием для работы микроскопа. Испускаемые катодом электроны, проходя через систему электронной оптики, фокусируются и ускоряются в направлении образца. В процессе сканирования сфокусированным пучком по поверхности образца происходит эмиссия вторичных электронов, которые регистрируются детектором. Таким образом, на систему сбора данных поступает информация о координатах пучка на образце и величине сигнала с детектора. При построении изображения каждой точке образца приписывается яркость, пропорциональная величине сигнала, измеренного в момент, когда пучок находился в этой точке. Количество вторичных электронов определяется углом падения пучка на поверхность, то есть морфологией поверхности. Наклонные участки поверхности на изображении во вторичных электронах выглядят более светлыми, по сравнению с поверхностью перпендикулярной первичному пучку. Вблизи острых краев или углов образца наблюдается увеличение выхода вторичных электронов связанное с возможностью выхода через несколько поверхностей (краевой эффект).

#### **1.2.4 Макропористые молекулярно-импринтированные монолитные системы**

Синтез макропористых МИП-матриц является относительно новым направлением в области синтеза МИП-систем. Существенное отличие монолитных

МИПов от мелкодисперсных частиц состоит в том, что большая часть импринт-сайтов локализуется в поверхностном слое проточных макропор, что положительно влияет на кинетику сорбции целевых молекул. Однако получение подобных систем не является тривиальной задачей по той причине, что в случае синтеза монолитных полимерных систем, содержащих молекулярные отпечатки, полимеризационная смесь должна содержать инертные растворители для осуществления процесса порообразования. В то же время шаблоны зачастую представляют собой твердые вещества, которые необходимо растворить перед введением в полимеризационную смесь. В некоторых случаях шаблон может быть растворен в одном из функциональных мономеров. Но на практике бывает сложно подобрать такую систему «функциональный мономер - шаблон», которая бы обеспечивала полное растворение и образование предполимеризационного комплекса «мономер - шаблон» при нековалентном импринтинге. Если такую возможность реализовать не удастся, то шаблон растворяют в порогенах или вводят дополнительный растворитель. Однако любое введение дополнительного реагента влияет на процесс разделения фаз в ходе полимеризации, а следовательно, и на поровую структуру получаемого материала.

В синтезе макропористых монолитных молекулярно-импринтированных материалов должны решаться две задачи: получение высокопроницаемой макропористой матрицы и эффективный импринтинг целевых шаблонных молекул. Если же импринт-молекулы относятся к разряду лабильных (например, белки), то выбираемые условия полимеризации также должны обеспечивать возможность сохранения активности импринтируемой биологической субстанции – в противном случае существует вероятность потери специфичной емкости импринтированной матрицы.

Для получения монолитных систем наиболее часто используются сополимеры мономеров метакрилового ряда. Например, сополимеризация метакриловой кислоты с этиленгликольдиметакрилатом в присутствии сульфаметазина приводит к получению системы для разделения смеси десяти сульфаниламидов, а в присутствии дифенокназола – системы для определения дифенокназола в водопроводной воде и виноградном соке. При сополимеризации метакриловой кислоты с триметилпропантриметакрилатом в присутствии (*R*)-пропранолола получают стационарную фазу для разделения энантиомеров пропранолола. Сополимеризация

более трех мономеров используется редко, однако получены импринтированные полимеры на основе и более сложного сополимера глицидилметакрилат – метакриловая кислота – стирол – дивинилбензол – три(аллил)изоцианурат.

Описаны различные способы получения МИП-монолитов. На примере импринтинга шаблона – фенилаланина можно рассмотреть несколько методов. Одним из них является импринтинг фенилаланина посредством золь-гель перехода. В работе [52] был проведен эксперимент, заключающийся в следующем: полимерную матрицу после набухания в растворе натриевой щелочи помещали в раствор соляной кислоты, содержащей большое число молекул шаблона. По мере синерезиса полимера после набухания, молекула-шаблон эффективно имплантировалась в полимерную матрицу. Метод импульсного лазерного напыления позволяет избежать необходимости подбора подходящих растворителей для молекулы-шаблона и позволяет получать пленки контролируемой толщины. Так были соосаждены на датчики поверхностного плазмонного резонанса полистрол-полиэтиленоксидный сополимер и фенилаланин [53].

В настоящее время МИП-монолиты используют в качестве стационарных фаз в трех основных областях: высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярная электрохроматография и твердофазная экстракция. Относительно новым является направление разработки трехмерных биочипов на основе молекулярно-импринтированных монолитов. Поэтому представляется интересной возможность применения молекулярного импринтинга для создания непроточных макропористых слоев для параллельного микроанализа в форме биочипа [6].

### **1.3 Фенилкетонурия**

Фенилкетонурия (ФКУ, код МКБ- 10 – E70.0; OMIM – 261600) и другие гиперфенилаланинемии (ГФА E70.1) – группа наследственных заболеваний, в основе которых лежит нарушение аминокислотного обмена. 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 [54]. Критерием диагностики ФКУ является уровень фенилаланина в сыворотке крови. У здоровых пациентов он не превышает 34-101 мкмоль/л. При значительном снижении

активности фермента фенилаланин-4-гидроксилазы уровень фенилаланина может повышаться до 900-1200 мкмоль/л. При остаточной активности фермента он колеблется от 120 до 900 мкмоль/л.

Тип наследования данного заболевания – аутосомно-рецессивный. Ген фенилаланингидроксилазы (PAH) локализуется на длинном плече хромосомы 12 – участок q22-24.1. Ген секвенирован. В настоящее время известна 991 мутация гена PAH и постоянно регистрируются новые [55]. Характер мутации определяет степень остаточной активности фермента или ее отсутствия и в большинстве случаев коррелирует с тяжестью заболевания. Однако корреляция между генотипом и фенотипом у больных не является абсолютной, пациенты с аналогичным генотипом могут иметь различные формы фенилкетонурии [56].

### **1.3.1 Этиология и патогенез**

Фенилкетонурия развивается в результате нарушения превращения фенилаланина в тирозин. В норме гидроксилирование фенилаланина в печени обеспечивается ферментом фенилаланингидроксилазой при участии кофактора тетрагидробиоптерина  $\text{BH}_4$ , молекулярного кислорода и железа(II). Метаболический блок данного процесса может происходить на разных уровнях, что определяет несколько форм болезни:

-Классическая фенилкетонурия (фенилкетонурия I типа) обусловлена дефицитом фермента фенилаланингидроксилаза (ФАГ), ведущим к накоплению фенилаланина и продуктов его распада в биологических жидкостях. Заболевание вызвано мутацией гена фенилаланингидроксилазы (PAH), которая обуславливает нестабильную структуру и дефицит активности этого фермента.

-Фенилкетонурия II типа обусловлена дефицитом дигидроптеридинредуктазы (DHPR), вследствие которого развиваются метаболические блоки на путях превращения фенилаланина в тирозин, а также образования предшественников нейромедиаторов катехоламинового и серотонинового ряда L-дофы и 5-окситриптофана. Заболевание вызвано мутацией структурного гена для цитозольной дигидроптеридинредуктазы QDPR. Ген QDPR локализован на хромосоме 4p15.3.

-Фенилкетонурия III типа связана с недостаточностью 6-пирувоилтетрагидроптеринсинтазы (PTPS), участвующей в процессе синтеза тетрагидробиоптерина из дигидронеоптеринтрифосфата. Заболевание вызвано



мутацией структурного гена для цитозольной 6- пирувоилтетрагидроптеринсинтазы PTS, что приводит к ее недостаточности в печени и эритроцитах. Ген PTS расположен на длинном плече хромосомы 11 в районе q22.3-23.3 [57].

При всех формах ФКУ основным путем превращения фенилаланина является его дезаминирование до фенилпировиноградной, далее фенилуксусной и фенилмолочной кислот, а так же декарбоксилирование до фенилэтиламина. Эти метаболиты накапливаются в организме и выделяются в повышенных концентрациях с мочой. Перечисленные токсичные производные способны проникать через гематоэнцефалический барьер и оказывать прямое нейротоксичное действие, особенно на развивающуюся центральную нервную систему ребенка. Повреждения отмечаются в коре и базальных ядрах головного мозга. Помимо этого фенилаланин конкурирует с большими нейтральными аминокислотами за белок-переносчик LAT1(транспортер L-аминокислот 1) через мембраны клеток, а также при транспорте через слизистую кишечника. При высокой концентрации в крови, фенилаланин, обладая большой аффинностью к белку-переносчику, легко проникает через гематоэнцефалический барьер, при этом подавляя транспорт других аминокислот (тирозина, триптофана, лейцина, изолейцина). Это приводит к торможению синтеза белков в головном мозге, пролиферации (разрастание путем размножения делением) дендритных клеток и нарушению миелинизации нервных волокон, а также к общему нарушению обмена белков, липо- и гликопротеинов, диспротеинемии, печеночной недостаточности. Одновременно с этим нарушается синтез нейротрансмиттеров (нейромедиаторов) – допамина, норэпинефрина, серотонина – как из-за препятствия трансмембранному переносу тирозина, триптофана, так и вследствие ингибирования тирозингидроксилазы, триптофангидроксилазы высокими концентрациями фенилаланина. Еще одним механизмом повреждения головного мозга считается снижение активности пируваткиназы, нарушение глутаматергической передачи нервного импульса и функции моноаминоксидазы. Существенную роль в патогенезе также играет недостаточный синтез тирозина, который является предшественником тироксина, катехоламинов и меланина. По этой причине у больного может развиваться вторичный гипотериоз – дополнительный фактор формирования умственной отсталости [58].

### 1.3.2 Классификация форм заболевания

Классификация форм ФКУ основывается на результатах молекулярно-генетических исследований. Клиническая же классификация базируется на уровне фенилаланина в крови больного до начала лечения, который косвенно отражает степень поражения и активность фермента фенилаланин-гидроксилазы:

- Классическая форма ФКУ (тип I, дефицит ФАГ) – уровень фенилаланина выше 20 мг/дл (1200 мкмоль/л).

- Средняя форма ФКУ - уровень 10,1 - 20 мг/дл (600 - 1200 мкмоль/л), а также при уровне фенилаланина 8,1 - 10 мг/дл, если он устойчив в крови ребенка на фоне физиологической нормы белка в рационе.

- Легкая (доброкачественная) ГФА - уровень фенилаланина 2,1 – 8,0 мг/дл (126 - 480 мкмоль/л). Эта форма ГФА обычно не требует специального лечения, однако такие дети должны находиться под наблюдением врача в течение первого года жизни с ежемесячным контролем уровня фенилаланина в крови.

Клиническая классификация признается условной, так как у новорожденного уровень концентрации фенилаланина не всегда достигает максимального значения к моменту проведения анализа. Кроме того, клинические проявления и клинический эффект могут быть различными у больных с одинаковым уровнем фенилаланина [59].

### 1.3.3 Диагностика

В Российской Федерации доклиническая диагностика фенилкетонурии при массовом обследовании новорожденных проводится с 1985 г. В основе неонатального скрининга данной болезни лежит определение биохимического фенотипа – повышенного уровня фенилаланина в сыворотке крови. Для этого существуют различные методы. До 1992 г. Применялся полуколичественный микробиологический тест Гатри, после – количественный флуориметрический анализ. В последнее время в отдельных регионах нашей страны стал применяться аналитический метод - тандемная масс-спектрометрия. Во всех случаях биологическим материалом служат высушенные на фильтровальной бумаге капли капиллярной крови.

Согласно приказу МЗ и СР от 22.03.2006 №185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания», процесс обследования включает несколько этапов. На первом этапе в родильном доме у всех доношенных детей на 4-й день жизни и на 7-й день жизни у недоношенных осуществляется забор

проб крови на специальные бумажные тест-бланки. Затем полученные тест-бланки доставляются в медико-генетическую консультацию для проведения исследований. Значение фенилаланина выше 2,0 мг/дл классифицируется как ГФА, которая требует проведения уточняющей диагностики (ретест с целью подтверждения ГФА и дифференциальная диагностика с целью выявления ее причин, которая проводится методом tandemной масс-спектрометрии). Следующими обязательными этапами скрининга являются наблюдение ребенка у генетика в медико-биологической консультации, лечение и диспансеризация, медико-генетическое консультирование семьи и пренатальная диагностика для следующих детей в данной семье.

В практике массового обследования новорожденных на фенилкетонурию используются разные методические подходы:

1. Проба Феллинга выявляет содержание фенилпирувата в моче при помощи хлорида железа (III) – появляется сине-зеленое окрашивание при наличии избытка фенилаланина. Метод не применяется для неонатального скрининга, так как позволяет диагностировать заболевание только со второго месяца жизни.

2. Микробиологический ингибиторный тест Гатри – полуколичественный микробиологический тест для определения концентрации фенилаланина в крови. В его основе лежит ингибирование бактериальной культуры *Bacillus subtilis*. Тормозящее влияние ингибитора устраняется при повышенных концентрациях фенилаланина в крови обследуемого. Содержание фенилаланина в крови определяется путем измерения зон роста микроорганизмов и сравнения их с соответствующими стандартами. Тест Гатри до настоящего времени используется во многих странах для проведения скрининга новорожденных. По данным W.B.Hanley (1997) чувствительность теста Гатри составляет 99,2%.

3. Хроматография – полуколичественный биохимический метод определения фенилаланина с помощью тонкослойной хроматографии аминокислот плазмы крови и мочи. Также используются методы ВЭЖХ, газовой хромато-масс-спектрометрии. Помимо содержания фенилаланина, при проведении хроматографического анализа возможно детектирование и других аминокислот.

4. Флуориметрия – количественный биохимический метод определения фенилаланина в крови с помощью современных автоматических флуориметров. Метод заключается в образовании флуоресцирующего комплекса фенилаланина с

нингидрином. Этот метод отличается высокой точностью, также возможен контроль уровня тирозина, что особенно важно при оценке эффективности терапии. Однако для проведения данного анализа необходимо элюирование аминокислот из сухого пятна крови. Данный метод используется для проведения массового автоматизированного скрининга.

5. Жидкостная тандемная хромато-масс-спектрометрия с ионизацией в электроспрее – один из основных методов в мировой практической медицине. Метод позволяет одновременно определять уровень тирозина и соотношение фенилаланин/тирозин. Метод является наиболее чувствительным и специфичным инструментом для выполнения целевого анализа аминокислот на следовом уровне. Он также оптимально подходит для целей первичного скрининга, так как позволяет уменьшить время анализа до 2-3 минут, что дает возможность для проведения более трехсот анализов в сутки при одновременном определении порядка 30 веществ-маркеров.

6. Молекулярно-генетические методы. Для уточнения клинического диагноза используются молекулярно-генетические методы диагностики генного дефекта. Сначала проводится поиск частых мутаций в гене PAH с помощью синтетических олигонуклеотидных зондов. Если исследуемые мутации не обнаружены, рекомендуется секвенирование гена PAH, в случае невозможности получения прямых генетических данных о гене PAH методом секвенирования – молекулярный анализ других генов, мутации которых ведут к ГФА. Данный метод позволяет выявить не саму мутацию, а факт передачи потомству хромосомы, несущей полиморфный маркер, тесно связанный с мутантным геном. Местоположение и вид мутаций в гене PAH пока нельзя использовать для полного прогноза клинического фенотипа, и в настоящее время генотипирование гена PAH имеет лишь ограниченную ценность при диагностике фенотипов ФКУ. В большинстве лабораторий существуют наборы, позволяющие определять частые мутации в гене PAH. Молекулярно-генетические методы позволяют также выявить гетерозиготное носительство генного дефекта и провести пренатальную диагностику [57].

#### **1.3.4 Лечение**

До настоящего времени единственным эффективным и патогенетически обоснованным методом лечения ФКУ является диетотерапия с использованием

специальных аминокислотных смесей без фенилаланина и с высоким содержанием тирозина. Диета заключается в устранении из питания высокобелковых продуктов. Основная цель диетотерапии – обойти метаболический блок преобразования аминокислот путем ограничения фенилаланина пищи до минимально допустимых количеств. Фенилаланин – незаменимая аминокислота, поэтому важно определить его минимальное суточное содержание в рационе больного ребенка: высокий уровень фенилаланина вредно сказывается на развитии мозга, в то время как недостаточное его содержание может стать причиной отрицательного азотистого баланса. Лечение начинают при уровне концентрации фенилаланина в крови 900 мкмоль/л и выше [60].

Так как долгосрочное соблюдение диеты затруднительно, разрабатываются новые методы лечения, такие как энзимотерапия, заключающегося в введении в организм фермента, перерабатывающего фенилаланин до нетоксичных продуктов и имеющего не млекопитающее происхождение. Также исследуется возможность лечения путем введения в кровь больших аминокислот (LNAA – large neutral aminoacids), конкурирующих с фенилаланином за трансмембранный белок-переносчик при прохождении гематоэнцефалического барьера и тем самым подавляющих его поступление в головной мозг, исследуются перспективы введения гликомакропептидов и сапроптеиновой терапии (лечение тетрагидробиоптерином). Трансплантация печени обеспечивает необходимую активность фенилаланингидроксилазы. Наиболее перспективным методом терапии фенилкетонурии является генная терапия, однако она на данный момент изучена только на мышах [61, 62].

## **2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **2.1 Материалы**

При подготовке стекол для проведения полимеризации использовался силанизирующий агент 3-(триметоксисилил)пропилметакрилат (Sigma-Aldrich, Германия). Для получения макропористых монолитных материалов в качестве мономеров использовали 2-аминоэтилметакрилат (АЭМА), 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА) и этиленгликольдиметакрилат (ЭДМА) (Sigma-Aldrich, Германия); в качестве порообразующих растворителей использовали смесь додекнола-1 и толуола (Вектон, Россия). Для инициирования реакции полимеризации применяли 2-гидрокси-2-метилпропиофенон (Sigma-Aldrich, Германия). Восзащищенный L-фенилаланин применяли как молекулу-шаблон для получения молекулярно-импринтированных монолитных материалов (Sigma-Aldrich, Германия). Для проведения анализа содержания L-фенилаланина (Вектон, Россия) в пробе с использованием полученных МИПов целевую молекулу метили флуоресцентными метками Cy3 и FITC (Sigma-Aldrich, Германия).

### **2.2 Оборудование**

Для проведения фотоиницируемой полимеризации использовали 125 В ультрафиолетовую ртутную лампу Philips (Нидерланды) широкого спектра излучения. Промывку слоёв проводили на орбитальном шейкере Unimax 1010 Heidolph (Германия).

Раствор анализируемой аминокислоты наносили на поверхность чипа с помощью бесконтактного споттера GesimNano-Plotter NP (Германия). Процесс связывания аналитана на МИПах осуществляли в воздушном термостате Binder (Германия)

Получение флуоресцентно-меченых аналитов и проводили на термо-шейкере Biosan TS-100 C (Латвия). Детектирование связавшегося аналита осуществлялось с помощью флуоресцентного сканера для микрочипов GenePix 4000 B (США) с программным обеспечением GenePixPro

## 2.3. Методы

### 2.3.1. Получение МИП и НИП-чипов на основе макропористых монолитных носителей

- Силанизация поверхности операционных ячеек.

На стеклянный стол с выровненной по уровню высотой помещали стёкла, содержащие предварительно вытравленные операционные ячейки. Смесь, состоящую из 3-(триметоксисилил)пропилметакрилата и толуола в соотношении 15 : 85 (об. %), вносили в ячейки в количестве 200 мкл, после чего стёкла накрывали непрозрачным колпаком и оставляли на 12 часов. После окончания реакции силанизации стёкла последовательно промывали трижды ацетоном и этанолом соответственно, после чего высушивали их в термостате в темноте при температуре не выше 40 °С.

- Получение макропористого монолитного слоя.

Монолитные материалы получали методом свободно-радикальной фотоиницируемой полимеризации. Объёмное соотношение порогены : мономеры составляло 60:40; объёмное соотношение функциональный мономер : сшивающий мономер составляло 60:40. В качестве инициатора использовали 2-гидрокси-2-метилпропиофенон в количестве 1% от суммарной массы мономеров.

Для изучения влияния размера пор на эффективность связывания использовали полимеризационные смеси с различным соотношением порообразующих растворителей. Составы смесей представлены в табл.1

Перед началом полимеризации смесь подвергали воздействию ультразвука в течение 40 минут для растворения АЭМА. Были получены молекулярно-импринтированные и неимпринтированные макропористые монолитные материалы с добавлением Вос-Phe в количестве 4, 6 и 8 мольных процентов от смеси мономеров и без него соответственно. Перед началом полимеризации полимеризационные ёмкости накрывали кварцевым колпаком и включали вентилятор для охлаждения системы. Распад инициатора осуществлялся при облучении полимеризационной смеси ультрафиолетовым излучением широкого спектра (200-380 нм). Образцы для анализа методами эталонной порометрии, БЭТ получали в стеклянных чашках Петри ( $d = 3$  см). Полимерные слои для биочипов и СЭМ получали в операционных ячейках, сформированных на поверхности стеклянных пластин размером  $2.6 \times 7.6$  см. Операционные ячейки имели прямоугольную форму с размерами  $2.5 \times 1.8$  см и

глубиной около 0.2 мм. Промывание слоёв проводили с использованием термошейкера при температуре 50 °С. Полученные материалы сушили в воздушном термостате при температуре 37 °С.

Таблица 1. Соотношение мономеров и порообразующих растворителей в полимеризационных смесях

№	Мономеры (%об:%об)	Порогены (%об:%об)	Примечания
1	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 20:80	
2	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 20:80	+BocPhe (4%)
3	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 20:80	+BocPhe (6%)
4	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 40:60	
5	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 40:60	+BocPhe (4%)
6	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 40:60	+BocPhe (6%)
7	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 50:50	
8	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 60:40	
9	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 60:40	+BocPhe (4%)
10	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 60:40	+BocPhe (6%)
11	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 60:40	+BocPhe (8%)
12	АЭМА-ГМА-ЭДМА = 10:30:60	D:T = 80:20	

### 2.3.2 Получение флуоресцентно-меченых аналитов

Для получения флуоресцентно-меченой аминокислоты (L-фенилаланина) использовали флуоресцентные красители Су3 и FITC. Мольное соотношение, взятое для реакции, составляло 1/1. Для приготовления аналита, меченого Су3, к раствору аминокислоты в воде с концентрацией 1 мг/мл добавляли 2.7 мг метки, предварительно растворенной в 0.05 мл диметилсульфоксида (ДМСО). Для приготовления раствора, меченого красителем FITC, к раствору аминокислоты в воде



сконцентрацией 1 мг/мл добавляли 2.3 мг метки, предварительно растворенной в ДМСО. Растворы изолировали от попадания света и оставляли на шейкере на 2 дня при температуре 25 °С при частоте оборотов – 450 об/мин.

### **2.3.3 Проведение анализа содержания фенилаланина с использованием МИП и НИП-чипов**

Нанесение растворов образцов для связывания аминокислоты осуществляли с помощью наноспоттера. Для проведения анализа использовали водные растворы с концентрациями меченого Су3 и FITCL-Phe 1000, 2000, 5000, 10 000 нг/мл и 10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 нг/мл соответственно. Каждый раствор наносили на три биочипа в 10-кратном повторе. Объем наносимой капли составлял 200 пкл. После нанесения слои помещали во влажную среду и термостатировали в закрытом виде в темноте при температуре 37°С. Для изучения влияния времени взаимодействия аналита с материалом биочипа после нанесения растворов флуоресцентно-меченых аналитов на поверхность оставляли систему в течение 0.5, 1, 2, 3, 5 и 24 часов.

После завершения процесса связывания биочипы промывали смесью изопропанола с водой при использовании термошейкера и осуществляли детектирование на флуоресцентном сканере для микрочипов при длине волны лазера 532 нм. Для изучения влияния состава промывочной смеси на эффективность вымывания фенилаланина с НИП и МИП-чипов варьировали содержание изопропилового спирта. Используемые соотношения вода/изопропиловый спирт представлены в табл.2.

Таблица 2. Соотношение вода/изопропанол в растворах для промывки МИП и НИП-чипов после взаимодействия с фенилаланином

№	Вода : Изопропиловый спирт (%об : %об)
1	90 : 10
2	80 : 20
3	70 : 30
4	50 : 50
5	25 : 75
6	10 : 90

### **2.3.4 Проведение анализа содержания фенилаланина с использованием МИП и НИП-чипов из модельной биологической жидкости**

- Изучение связывания фенилаланина из раствора, имитирующего плазму крови человека

Раствор, имитирующий плазму крови человека, готовили путем смешивания 0.01 М фосфатно-солевого буфера с раствором 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0.15 М раствором хлорида натрия. Нанесение растворов меченого Су3 и FITCL-Phe 1000, 2000, 5000, 10000 нг/мл и 10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 нг/мл соответственно на поверхность МИП и НИП-чипов осуществляли с помощью наноспоттера. Каждый раствор наносили на трибиочипа в 10-кратном повторе. Далее слои помещали во влажную среду и термостатировали в закрытом виде в темноте при температуре 37°C в течение трёх часов. После завершения процесса связывания биочипы промывали смесью изопропанола с водой с использованием термошейкера и осуществляли детектирование на флуоресцентном сканере для микрочипов при длине волны лазера 532 нм.

- Изучение связывания фенилаланина из плазмы крови человека

Проводили изучение связывания аналита, содержащегося в плазме крови человека, а также в разбавленной водой в 5 раз плазме крови человека. На поверхность МИП и НИП-чипов точно наносили растворы с содержанием фенилаланина, меченого Су3 и FITC 1000, 2000, 5000, 10000 нг/мл и 10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 нг/мл соответственно. Каждый раствор наносили на три биочипа в 10-кратном повторе. Далее слои помещали во влажную среду и термостатировали в закрытом виде в темноте при температуре 37°C в течение трёх часов. После завершения процесса связывания биочипы промывали смесью изопропанола с водой с использованием термошейкера и осуществляли детектирование на флуоресцентном сканере для микрочипов при длине волны лазера 532 нм.

## 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Синтез макропористых монолитных материалов

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. 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 моментом для эффективности 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 в качестве мономеров были выбраны: 2-аминоэтилметакрилат (АЭМА), 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА) и этиленгликольдиметакрилат (ЭДМА) в объемных соотношениях 10:30:60 %. Как молекулу-шаблон для получения систем молекулярного распознавания (молекулярно-импринтированных макропористых монолитных слоёв) использовали Вос-замещенный L-фенилаланин. Структурные формулы данных соединений представлены на (рис.3)

Для инициирования свободнорадикальной реакции полимеризации был использован фотоинициатор 2-гидрокси-2-метилпропиофенон. Схема его распада под действием УФ-излучения представлена на (рис. 4)

Использованием различных комбинаций объемных соотношений растворителей достигали получения материалов с различным средним размером пор. Материалы с небольшим средним размером пор получают при использовании сольватирующих растворителей, то есть термодинамически более совместимых с синтезируемым полимером. Уменьшение термодинамической совместимости смеси растворителей, а именно увеличение доли несольватирующего растворителя,

приводило к раннему разделению фаз в процессе полимеризации и получению сополимера с большими макропорами. В качестве порогенных растворителей были выбраны додекан-1-ол и толуол. Так, толуол является несольватирующим растворителем для получаемых сополимеров, поэтому 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.

При этом стоит отметить, что добавление в полимеризационную систему молекулы-шаблона приводит к изменению поровых характеристик получаемых макропористых монолитных матриц. Общей закономерностью является уменьшение среднего размера пор при добавлении молекулы-шаблона, при этом качественных изменений пористости не наблюдается. Так, в смеси с объемным соотношением додеканол:толуол = 40:60 при добавлении молекулы-шаблона средний размер пор уменьшается с 680 при отсутствии шаблона до 470 нм при 4%-ой мольной доле фенилаланина; 380 нм при 6% содержании фенилаланина. Поровые характеристики полученных макропористых монолитных носителей, определенные методом эталонной порометрии, представлены в табл.

Методом сканирующей электронной микроскопии была показана однородность структуры и морфологии поверхности синтезируемых материалов (рис. 5). На представленных микрофотографиях видна глобулярная структура полученных полимеров, причем размер глобул варьируется в зависимости от используемой системы порогенов. Так, увеличение содержания толуола в реакционной смеси приводит к увеличению глобус сополимера и образованию более крупных поровых промежутков между глобулами.

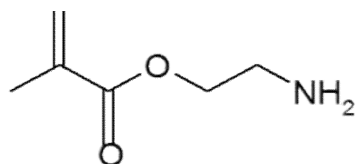
Методом БЭТ была измерена удельная площадь поверхности материалов, полученных при полимеризации смесей с различным содержанием импринтируемой молекулы фенилаланина. Из представленных в таблице 4 данных можно сделать вывод о том, что содержание молекулы-шаблона не влияет на удельную площадь поверхности.

Таблица 3. Поровые характеристики полученных макропористых монолитных материалов

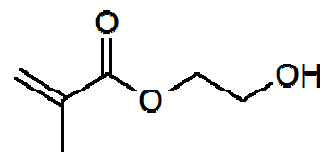
№	Поровые характеристики		Порогены (%об:%об)	Примечания
	Размер пор, нм	Пористость, %		
1	1200	65	D:T = 20:80	
2	1100	60	D:T = 20:80	+BocPhe (4%)
3	980	60	D:T = 20:80	+BocPhe (6%)
4	960	65	D:T = 40:60	
5	720	60	D:T = 40:60	+BocPhe (4%)
6	650	60	D:T = 40:60	+BocPhe (6%)
7	770	60	D:T = 50:50	
8	680	65	D:T = 60:40	
9	470	65	D:T = 60:40	+BocPhe (4%)
10	380	60	D:T = 60:40	+BocPhe (6%)
11	340	65	D:T = 60:40	+BocPhe (8%)
12	390	65	D:T = 80:20	

Таблица 4. Удельная площадь поверхности для материалов, с различным содержанием молекулы-шаблона

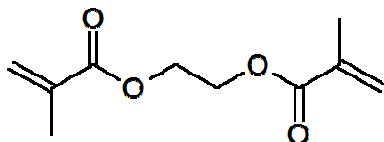
Содержание BocPhe, %mol	$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г
0	24,4
4	24,6
6	23,1
8	25,7



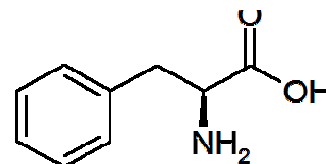
2-аминоэтилметакрилат (АЭМА)



2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА)



Этиленгликольдиметакрилат (ЭДМА)



L-фенилалнин

Рисунок 3. Структурные формулы мономеров и молекулы-шаблона

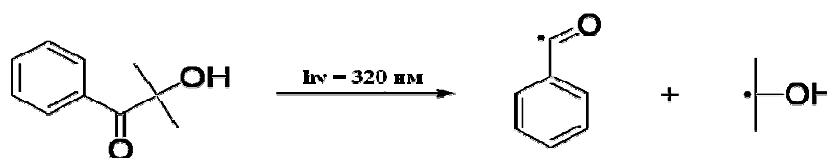


Рисунок 4. Схема реакции распада 2-гидрокси-2-метилпропиофенона под действием УФ-излучения

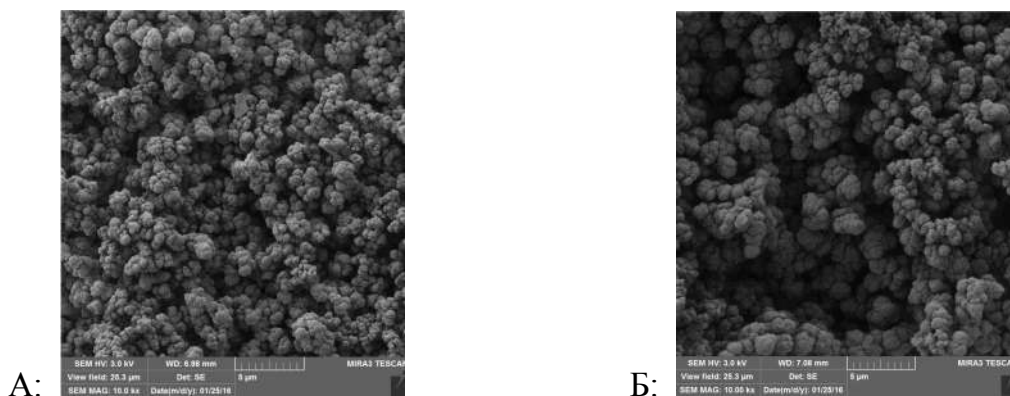


Рисунок 5. Микрофотографии образцов макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГЭМА-ЭДМА-АЭМА (НИП) с различными содержаниями порообразующих растворителей, полученные методом СЭМ

А – додеканол:толуол – 60:40 (%об:%об)

Б – додекалон:толуол – 20:80 (%об:%об)

## 3.2 Изучение влияния различных параметров на эффективность биоанализа

Эффективность связывания аналита оценивали по величине относительной интенсивности сигнала, то есть по разности интенсивностей сигнала в анализируемой зоне и свечения фона (сигнал-шум). Детектирование осуществлялось по флуоресценции цианинового красителя FITC, которым предварительно был помечен аналит (фенилаланин) при длине волны 532 нм. Для сравнения были проведены различные варианты связывания фенилаланина с использованием молекулярно-импринтированных и неимпринтированных систем. На рисунке 6 представлены изображения поверхности монокристаллических МИП и НИП-слоев после проведения анализа.

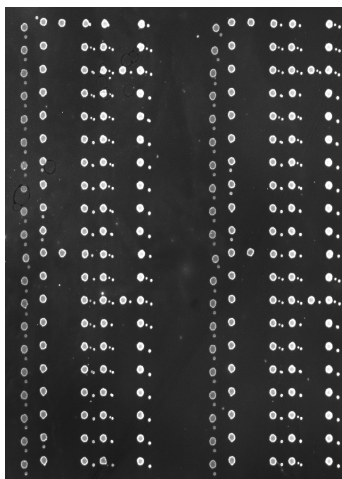


Рисунок 6. Поверхность биочипа после проведения анализа.

### 3.2.1 Влияние условий промывки системы после взаимодействия с аналитом

Промывка системы после взаимодействия с аналитом является важным этапом анализа и производится для удаления несвязавшегося и неспецифически связавшегося аналита 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 объемными соотношениями воды и изопропилового спирта, представленные в табл.2.

Гистограммы, иллюстрирующие результаты данного эксперимента представлены на рисунках 7 и 8.

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 фенилалнина, но и закрепившегося на сайтах связывания. Таким образом, оптимальной смесью для промывки был выбран раствор изопропанол - вода в соотношении 50-50.

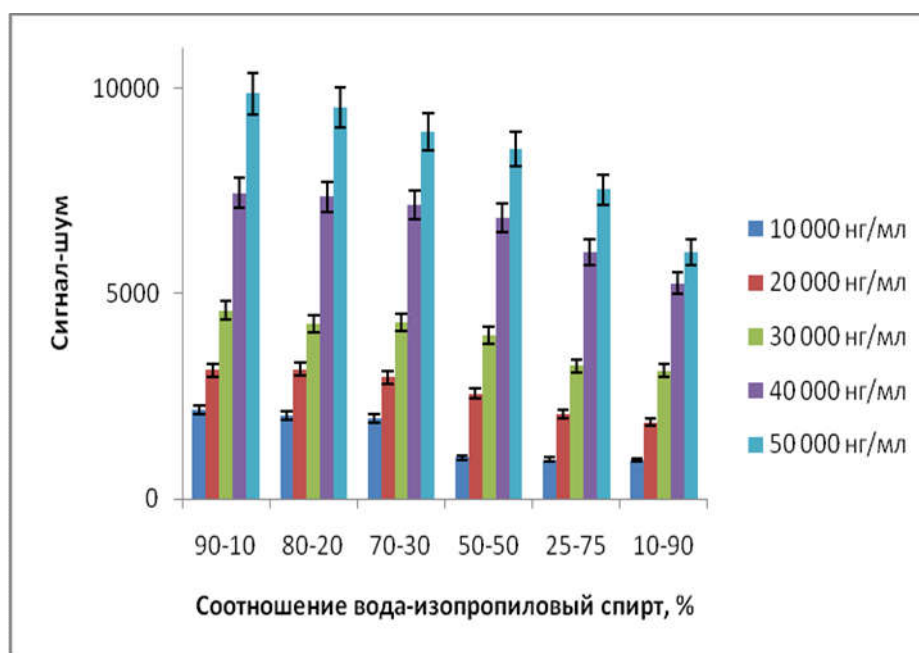


Рисунок 7. Влияние состава промывочной смеси на интенсивность сигнала на НИП-системе

Условия проведения анализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия с аналитом – 2 часа, температура – 37° С.



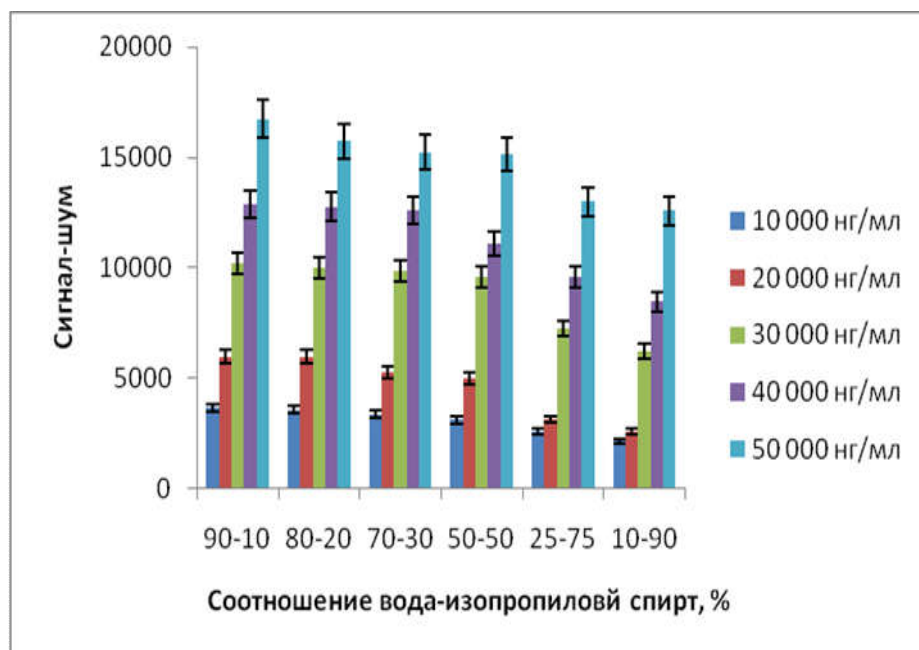


Рисунок 8. Влияние состава промывочной смеси на интенсивность сигнала на МИП-системе 4%-VocPhe

Условия проведения анализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия с аналитом – 2 часа, температура – 37°С.

### 3.2.2 Влияние среднего размера пор макропористых монолитных материалов

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 материалов для различных концентраций наносимого аналита, представлены на рисунках 9-11.

Очевидно, что при проведении анализа в течение 3 часов размер пор материала не оказывал существенного влияния на эффективность связывания аналита с искусственными сайтами молекулярного распознавания. Данный результат возможно объяснить способностью аналита 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 аналита относительная интенсивность сигнала возрастает до максимального значения, достигаемого при концентрации порядка 50 000 нг/мл. При этом минимальная рабочая концентрация

аналита для фенилаланина, меченого FITC и  $Cu_3$  составляла 10 000 нг/мл и 1000 нг/мл соответственно.

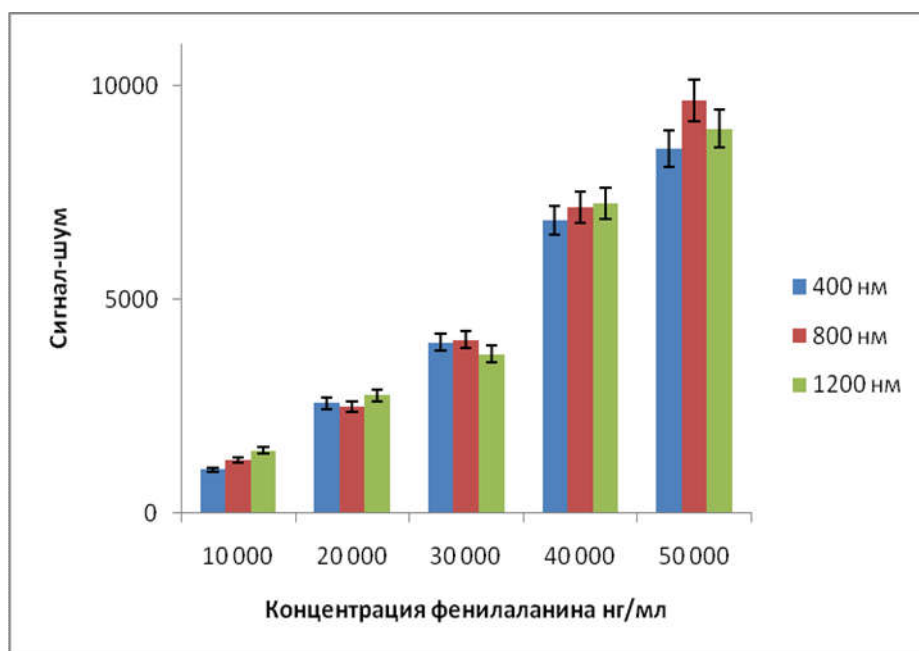


Рисунок 9. Влияние среднего размера пор на интенсивность сигнала для НИП-системы

Условия проведения биоанализа: время взаимодействия – 3 часа, температура – 37°С.

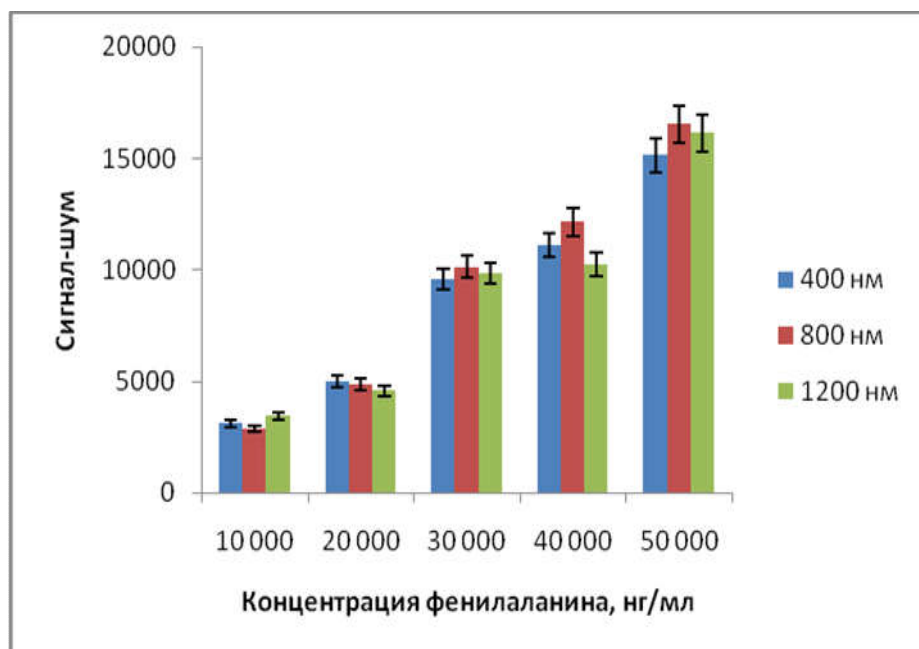


Рисунок 10. Влияние среднего размера пор на интенсивность сигнала для МИП-системы 4%-BocPhe

Условия проведения биоанализа: время взаимодействия – 3 часа, температура – 37°С.

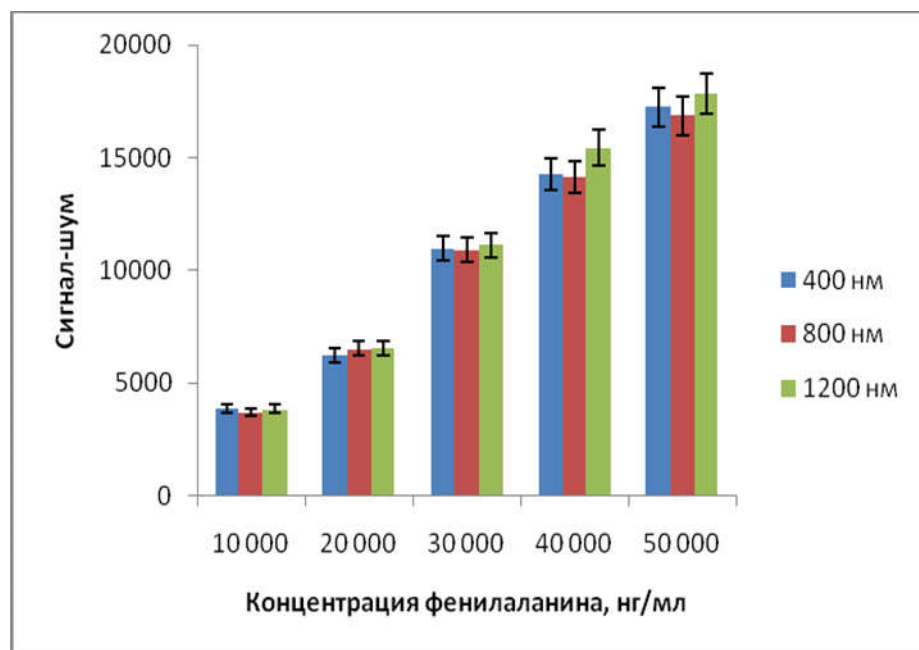


Рисунок 11. Влияние среднего размера пор на интенсивность сигнала для МИП-системы 6%-ВосPhe

Условия проведения биоанализа: время взаимодействия – 3 часа, температура – 37°С.

### 3.2.3 Влияние времени взаимодействия аналита с молекулярно-импринтированной системой

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 рисунках 12-14.

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 анализируемой молекулы с сайтами МИП-матриц по истечении 3-х часов взаимодействия для систем с различным содержанием молекулы-шаблона.

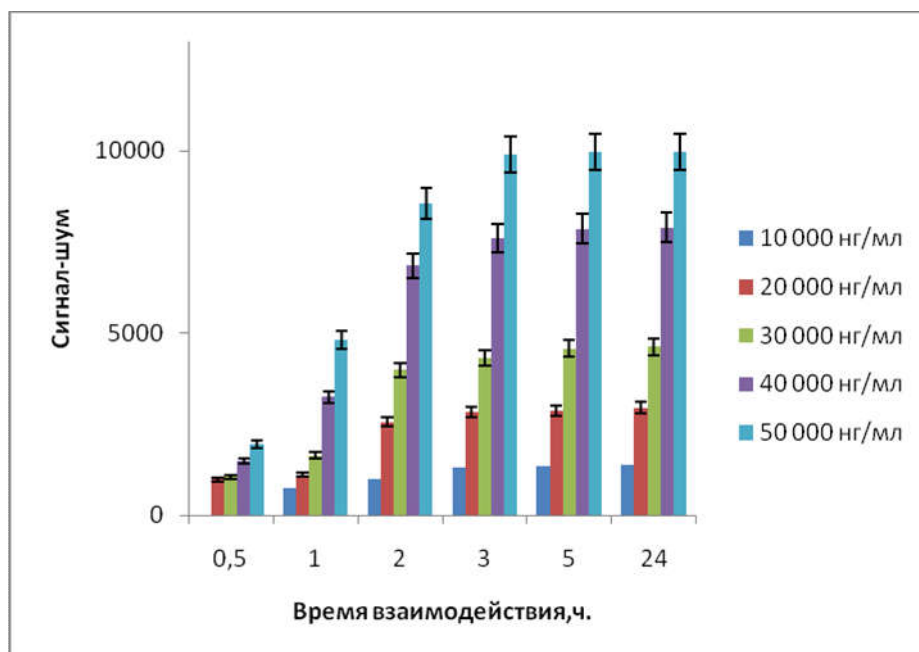


Рисунок 12. Влияние времени взаимодействия аналита с НИП-системой на интенсивность сигнала

Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, температура 37°С

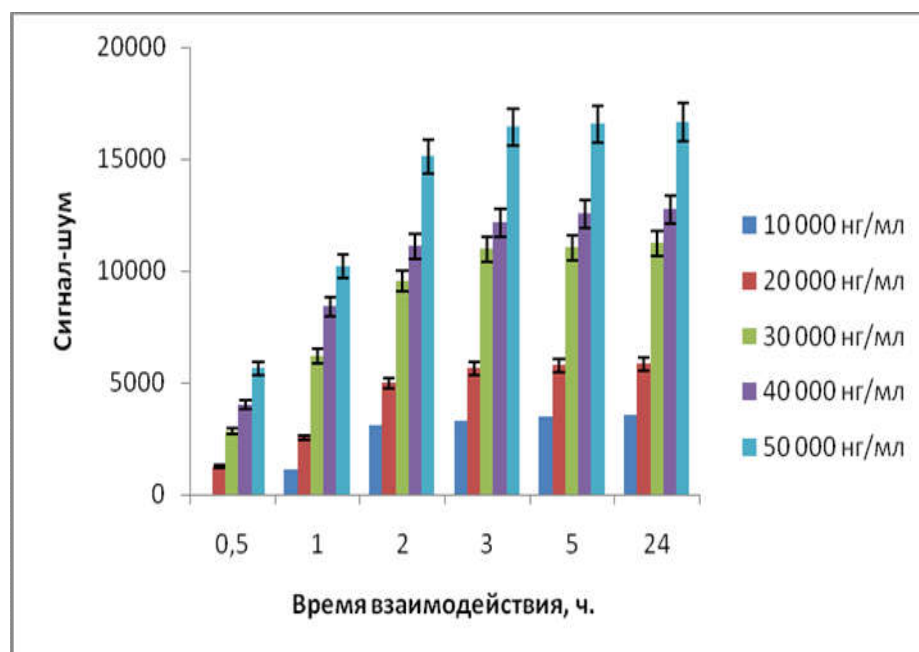


Рисунок 13. Влияние времени взаимодействия аналита с МИП-системой 4%-BosPhe на интенсивность сигнала

Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, температура 37°С

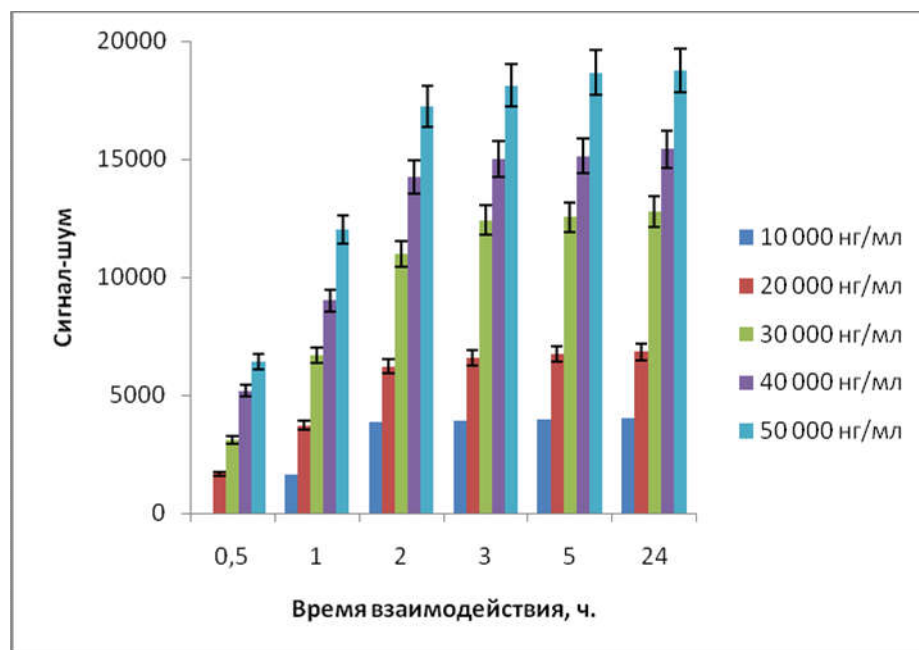


Рисунок 14. Влияние времени взаимодействия аналита с МИП-системой 6%-ВосPhe на интенсивность сигнала

Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, температура 37°С

### 3.2.4 Влияние количества 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. Детектирование проводилось по двум флуоресцентным меткам – Су3 и FITC. 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 15 гистограмм можно наблюдать небольшое увеличение соотношения сигнал-шум для обеих систем при переходе от 4%- к 8%-содержанию фенилаланина, что говорит о практически идентичной эффективности использования молекулярно-импринтированных систем с различным содержанием молекулы-шаблона для детектирования фенилаланина в выбранных оптимальных условиях.

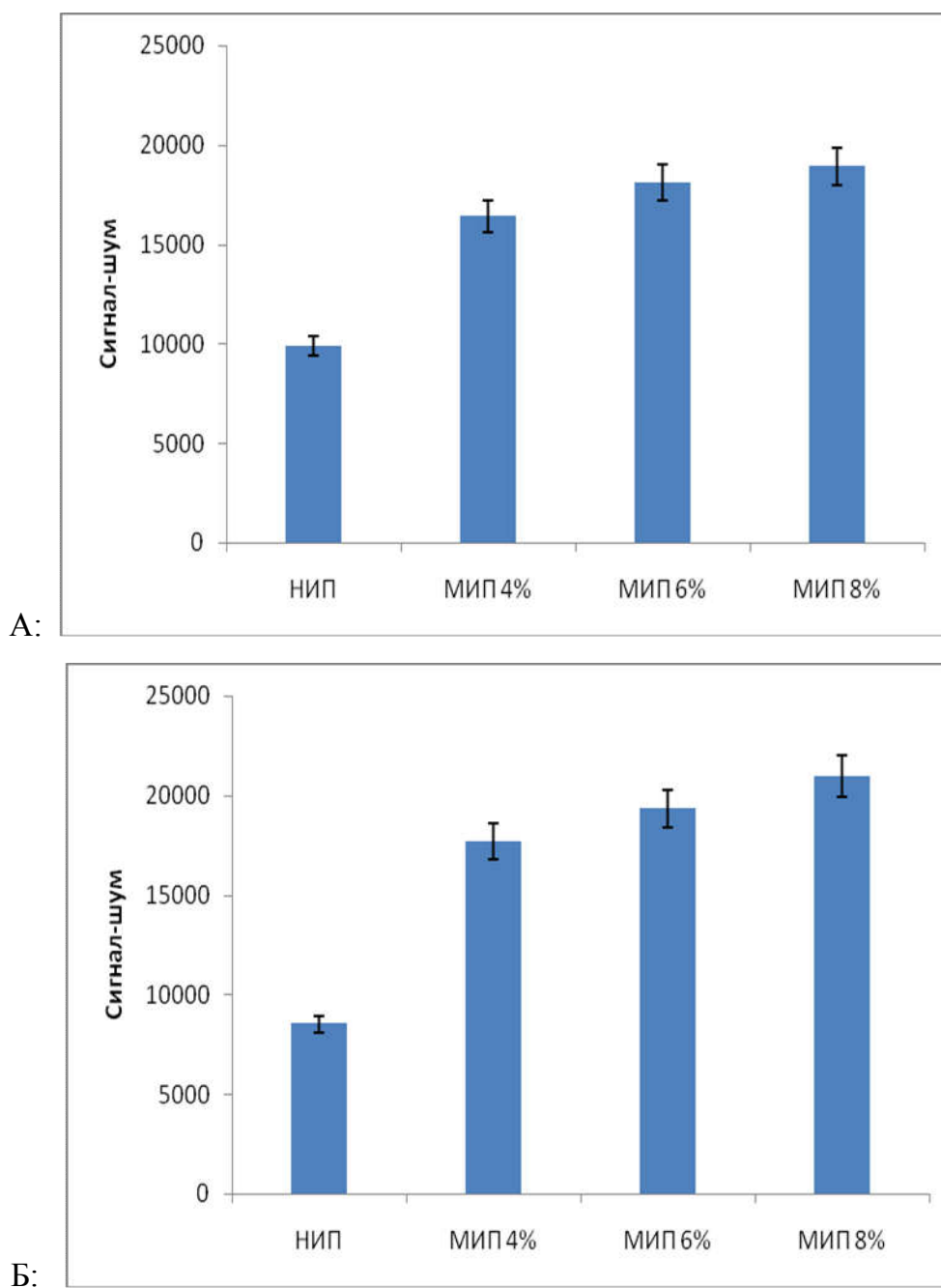


Рисунок 15. Влияние количества шаблона на интенсивность сигнала при проведении детектирования по флуоресцентной метке  $Cu_3$  (А) и FITC (Б)

Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия – 3 часа, температура – 37°С

### 3.3 Эффективность импринтинга

Эффективность импринтинга фенилаланина определяли по значению импринтинг-фактора (ИФ):

$$IF = \frac{\text{сигнал} - \text{шум МИП}}{\text{сигнал} - \text{шум НИП}}$$

МИП - молекулярно-импринтированный полимер, НИП – неимпринтированный полимер.

Импринтинг считается эффективным при значениях ИФ больших, либо равных двум, однако и меньшие результаты периодически считаются приемлимыми. Из представленных в таблице 5 данных видно, что эффективность импринтинга растет во всех средах при переходе от 4% к 8%-содержанию фенилаланина в полимеризационной смеси, т.к. при больших содержаниях молекулы-шаблона образуется большее количество молекулярных отпечатков, способных к дальнейшему распознаванию и специфическому связыванию. Значения мольного содержания шаблона редко берут больше 10%, т.к. большое содержание молекул приводит к их «слипанию» и искажению отпечатков, что отрицательно сказывается на результатах анализа и, соответственно, эффективности импринтинга. Не является эффективным импринтинг 4% фенилаланина, т.к. значения ИФ для таких смесей во всех средах не превышают 1,7.

Таблица 5. Значения импринтинг-фактора (ИФ) для НИП- и МИП-систем с различным содержанием фенилаланина в различных средах

<b>ИФ при концентрации аналита 50 000 нг/мл</b>		
<b>МИП 4%</b>	<b>МИП 6%</b>	<b>МИП 8%</b>
Фосфатный буфер		
1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,3
Модельная биологически активная жидкость		
1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2
Разбавленная плазма крови человека		
1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,2
Плазма крови человека		
1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1

### **3.4 Изучение чувствительности МИП-системы при проведении анализа в различных средах**

В ходе работы были проведены эксперименты по связыванию аналита в фосфатном буфере, растворе, имитирующем плазму, разбавленной и неразбавленной плазме крови человека на НИПах и МИПах, полученных полимеризацией смесей, содержащих 4,6 и 8% БОК-защищенного фенилаланина со средним размером пор, близким к 400 нм. Детектирование проводилось по флуоресценции красителей FITC и СуЗ при длине волны 532 нм. Гистограммы, иллюстрирующие изменение чувствительности МИП при переходе из одной среды в другую представлены на рисунках 16 и 17 для аналита, меченого FITC и СуЗ соответственно.

Из полученных данных видно, что для систем с различными метками значения сигнал-шум близки для всех используемых сред: максимальное значение наблюдается при использовании фосфатного буфера, для систем с модельной биологически-активной жидкостью и разбавленной плазмой значения практически идентичны, минимальное значение показателя эффективности - сигнал-шум наблюдалось при проведении анализа из плазмы крови человека. Данный эффект можно объяснить наличием большого количества побочных компонентов в составе нативной плазмы крови, которые могут вносить некоторые помехи при проведении биоанализа. При использовании чистого фосфатного буфера проведение анализа не осложняется наличием побочных компонентов и позволяет достигать максимальных значений эффективности.

Для сравнения эффективности детектирования аналита в различных средах был рассчитан процент уменьшения сигнала в зависимости от используемой среды. Если принять за 100% эффективность связывания аналита, меченого FITC с концентрацией 50 000 нг/мл, в фосфатном буфере, при использовании разбавленной плазмы и модельной биологически активной жидкости данный показатель составляет 95% и 92% соответственно, в то время как при использовании нативной плазмы - 82%. То есть при переходе от чистого буфера к нативной плазме эффективность анализа падает всего на 18%. Та же зависимость наблюдается и при использовании в качестве аналита фенилаланина, меченого СуЗ.

На основе полученных результатов можно заключить, что выбранные модельные условия позволили получить сопоставимые результаты, хорошо



коррелирующие с процессом анализа фенилаланина в естественных условиях в плазме крови человека. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность применения разработанных молекулярно-импринтированных систем на основе макропористых монолитов в формате биочипов в процессах анализа биологически активных низкомолекулярных веществ.

Для оценки воспроизводимости результатов детектирования фенилаланина были вычислены коэффициенты вариации K1 (коэффициент вариации данных, полученных на одном носителе) и K2 (коэффициент вариации данных, полученных на нескольких носителях одного типа) которые представляют собой соотношение стандартного отклонения интенсивности флуоресценции к среднему значению интенсивности флуоресценции. Расчитанные коэффициенты K1 7% и K2 19% для материала со средним размером пор 400 нм свидетельствуют о получении данных с высокой степенью воспроизводимости. Таким образом, можно сделать вывод о перспективности использования разрабатываемых тест-систем для диагностики фенилкетонурии методом количественного анализа фенилаланина в плазме крови пациента.

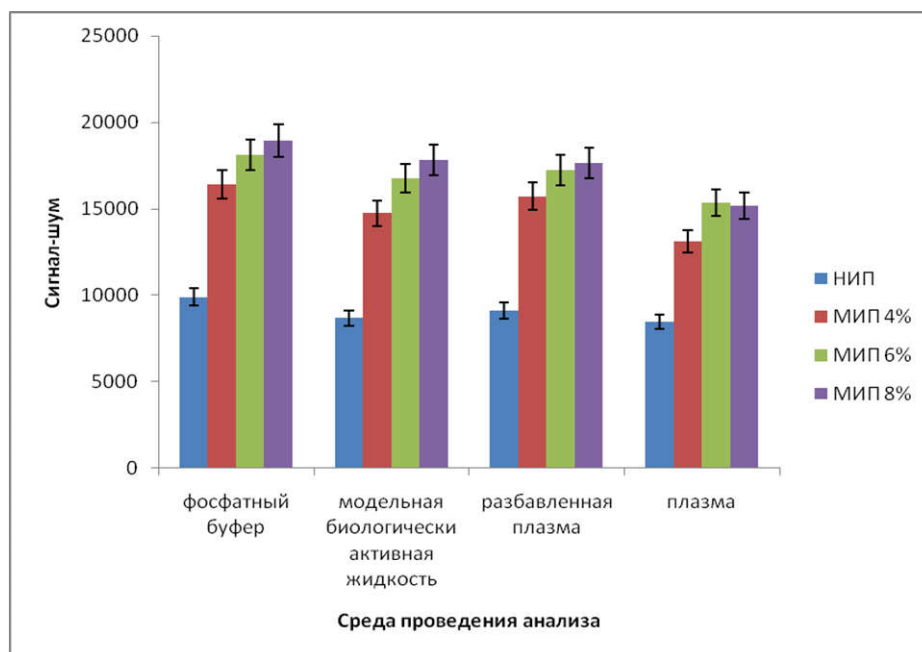


Рисунок 16. Чувствительность анализа в различных средах при использовании метки FITC

Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия – 3ч., температура – 37° С, концентрация анализата(фенилаланина) – 50 000 нг/мл

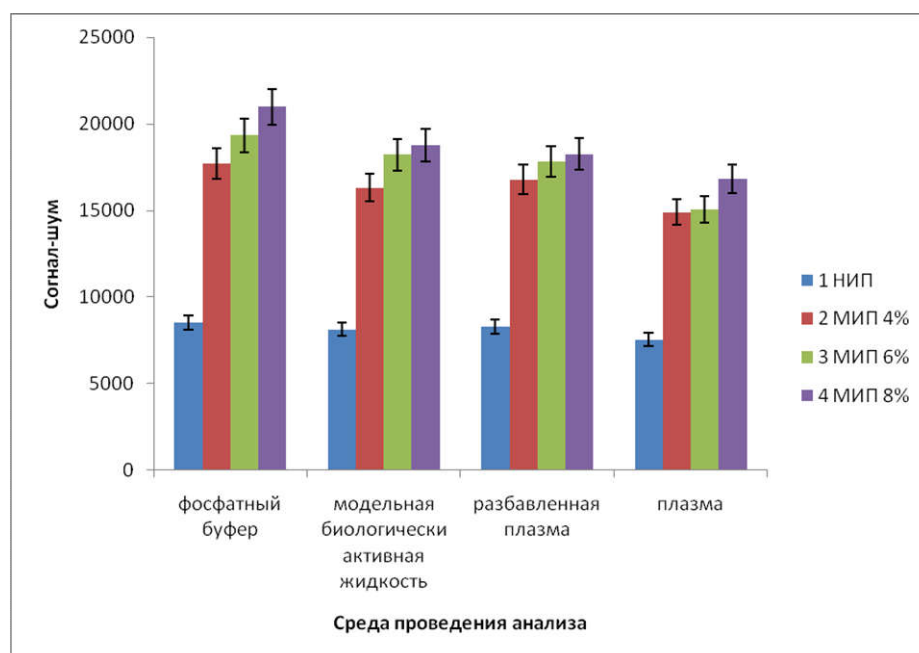


Рисунок 17. Чувствительность анализа в различных средах при использовании метки Су3

Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия – 3ч., температура – 37° С, концентрация аналита(фенилаланина) – 10 000 нг/мл.

## ВЫВОДЫ

1. В ходе работы получен ряд макропористых монолитных МИП и НИП материалов на основе сополимера АЭМА-ГЭМА-ЭДМА с различными поровыми характеристиками в формате тонкого слоя. Показано, что средний размер пор увеличивается при увеличении количества молекулы-шаблона в полимеризационной смеси.

2. 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 объёмном соотношении 50-50%.

3. По результатам расчета импринтинг-факторов показана высокая эффективность использования разработанных молекулярно-импринтированных систем для детектирования низкомолекулярных метаболитов на примере анализа фенилаланина.

4. Продемонстрирована высокая чувствительность разработанных молекулярно-импринтированных систем при проведении анализа фенилаланина в различных модельных средах и в плазме крови человека.

При выполнении представленной работы было использовано оборудование ресурсных центров СПбГУ «Термогравиметрические и колориметрические методы исследования» для проведения анализа поровых характеристик получаемых материалов методом эталонной порометрии, «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» для анализа поверхности МИП и НИП-материалов методом БЭТ и «Геомодель» для исследования материалов методом сканирующей электронной микроскопии.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

- [1] Тарантул В.З. Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии. Т. 1. – М.: Языки славянской культуры. 2015. 984 с.
- [2] Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. Успехи химии. 2006, 75, 998 – 1017.
- [3] Дмитриенко Е.В., Булушев Р.Д., И.А. Пышная, Д.В. Пышный. НАУКА из первых рук. 2011, 37, 86 – 93.
- [4] Dickey, F.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1949, 35, 227–229.
- [5] Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Успехи биологической химии. 2006, 46, 149 – 192.
- [6] E.G.Vlakh, V.A.KorzhikovA.V.Hubina, T.B.Tennikova. Russ.Chem.Rev. 2015, 84, 952-980.
- [7] Wulff, G. Angew. Chem. Int.Ed. Engl. 1995, 34, 1812–1832.
- [8] Mosbach K., Ramström O. BioTechnology. 1996, 14, 163–170.
- [9] Ansell R.J., Ramström O., MosbachK. Clin. Chem. 1996, 42, 1506–1512.
- [10] Brüggemann O., Haupt K., Ye L., Yilmaz E., Mosbach K. J.Chromatogr.A. 2000, 889, 15–24.
- [11] Е.В. Дмитриенко, И.А. Пышная, О.Н. Мартыанов, Д.В. Пышный. Успехи химии. 20016, 85, 513-536.
- [12] B. Sellergren, M.L. Lepistö, K. Mosbach, J.Am.Chem.Soc. 1998, 110, 5853.
- [13] M.J. Whitcombe, L. Martin, E.N. Vulfson, Chromatographia. 1998, 47, 457.
- [14] H.Zhang. Polymer. 2014, 55, 699.
- [15] M. Whitecombe, I. Chianella, L. Larcombe, S. Piletsky, J. Noble, R. Porter, A. Horgan, Chem. Soc. Rev. 2011, 40, 1547.
- [16] O. Ramstrom, L.I. Andersson, J. Mosbach, J.Org. Chem. 1993, 58, 7562.
- [17] R. Karmalkar, M. Kulkarni, R. Mashelkar. Macromolecules. 1996, 29, 1366.
- [18] T. Ikegami, T. Mukawa, H. Nariai, T. Takeuchi. Anal.Chim.Acta. 2004, 504, 131
- [19] Klein J.U., Whitecomb M.J., Mulholland F., Vulfson E.N. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1999, 38, 2057–2060.
- [20] A.Beltran, R. Marce, P. Cormack, F. Borrull. Anal.Chim.Acta. 2010, 677, 72.
- [21] S. Zimmerman, M. Wendland, N. Rakow, I. Zharov, K. Suslick. Nature (London). 2002, 418, 399.
- [22] D. Kryscio, N. Peppas. ActaBiomater. 2012, 8, 461

- [23] J. Yin, Z. Wang, M. Song, C. Zhao, H. Wang. *Analyst*. 2013, 138, 4958.
- [24] L. Li, X. He, L. Chen, Y. Zhang. *Chem. Asian J.* 2009, 4, 286.
- [25] T. Guo, Y. Xia, J. Wang, M. Song, B. Zhang. *Biomaterials*. 2005, 26, 5737.
- [26] F.M.Plieva, H.Kirsebom, B.Mattiasson. *J. Sep. Sci.*, 34, 2164 (2011); V.I.Loizinsky. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, 57, 1015 (2008)
- [27] M. Yoshikawa, K. Koso, K. Yonetani, S. Kitamura, S. Kimura. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2005, 43, 385.
- [28] N. Turner, C. Jeans, K. Brain, C. Allender, V. Hlady, D. Britt. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 1474.
- [29] Y .Li, Y. Liu, J. Liu, J. Liu, H. Tang, C.Cao, D. Zhao, Y. Ding. *Scientific Rep.*, 2015, 5, 7699.
- [30] Meador D.S., Spivak D.A. *Am.Chem.Soc.* 2014, 16, 1402-1405.
- [31] Jin Tan, Zi-Tao Jiang, Rong Li, Xiu-Ping Yan, *Trends in Analytical Chemistry*. 2012, 39.
- [32] E.G.Vlakh, M.A. Stepanova, Yu.M. Korneeva, T.B. Tennikova. *J. Chromatogr. B.* 2016,198 – 204.
- [33] M.A. García Mayor, G. Paniagua González, R.M. Garcinuño Martínez, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría. *Food Chemistry*. 2017, 221, 721-728.
- [34] Jon Ashleya, Mohammad-Ali Shahbazia, Krishna Kanta, Vinayaka Aaydha Chidambarab, Anders Wolffa, Dang Duong Bangb, Yi Suna. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, 91, 606–615.
- [35] Dong-Min Kima, Jong-Min Moona, Won-ChulLeea, Jang-HeeYoonb, Cheol Soo Choic,Yoon-Bo Shima. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, 91, 276–283
- [36] Zhao Cheng-Jun, Ma Xiong-Hui, Li Jian-Ping. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2017, 45, 1360–1366.
- [37] Aijaz Ahmad Malik, Chanin Nantasenamat, Theeraphon Piacham. *Materials Science and Engineering C*. 2017, 77 1341–1348.
- [38] Xin Zhanga, Shu Yanga, Rui Jiang, Liquan Sun, Siping Pang, Aiqin Luo. *Sensors and Actuators B*. 2018, 254, 1078–1086.
- [39] Zhifeng Xu, Peihong Deng, Junhua Li, Li Xu, Siping Tang. *Materials Science and Engineering B*. 2017, 218, 31–39.

- [40] Yuan Tan, Lijing Jing, Yonghong Ding, Tianxin Wei. *Applied Surface Science*. 2015, 342, 84–91.
- [41] Guat Wei Lima, Jit Kang Lima<sup>a,b</sup>, Abdul Latif Ahmada, Derek Juinn Chieh Chana. *Chemical engineering research and design*. 2015, 101, 2–14.
- [42] G.N. Khimich, E. N. Rakhmat, M. Yu. Slabospitskaya, T. B. Tennikova. *Russian Journal Of Applied Chemistry*. 2005, 78, 4.
- [43] Evgenia G.Vlakh, Tatiana B. Tennikova. *J.Sep.Sci*. 2007,30,2801–2813.
- [44]F. Svec, T. Tennikova, Z. Deyl. Elsevier. 2003.
- [45] Tennikova T.B, Belenkii B.G, Svec F. *J Liq. Chromatogr*. 1990, 13(1), 63-70.
- [46] T.I.Izaak, O. V. Vodyankina, *Russian Chemical Reviews*. 2009, 78(1), 77-88.
- [47] Santora B.P., Gagne M.R., Moloy K.G., Radu N.S. *Macromolecules*. 2001, 34, 658-61.
- [48] Michael R. Buchmeiser. *Polymer*. 2007, 48, 2187-2198.
- [49] Zalusky A.S., Olayo-Valles R., Taylor C.J., Hillmyer M.A. *J. Am. Chem. Soc*. 2001, 123, 1519-20.
- [50] Buchmeiser M. R. *Angew. Chem*. 2001, 113, 3911-3.
- [51] Карнаухов А. П. *Наука*, 1999, 470.
- [52] Joong Kon Park, Hamayun Khan, Jeong Woo Lee, *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, 35, 688–693.
- [53] Catherine N. Casey, Sara E. Campbell, Ursula J. Gibson. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010, 26, 703–709.
- [54] Sahai I., Marsden D. *Clin. Lab. Sci*. 2009, 46(2), 55-82.
- [55] Reuben Matalon, Richard Koch, Kimberlee Michals-Matalon, Kathryn Moseley, Sankar Surendran, Stephen Tyring, Heidi Erlandsen, Alejandra Gamez, Raymond C. Stevens, Anne Romstad, Lisbeth B. Møller, FlemmingGuttler, *Genetics in Medicine*, 2004, 6, 27-32.
- [56] Blau N. *Hum. Mutat*. 2016, 37(6), 508-515.
- [57] Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии. М. 2013.
- [58] С.Я. Волгина, С.Ш. Яфарова, Г.Р. Клетенкова. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, 2017, 62, 5, 111-118.
- [59] Scriver C.R., Kaufman K. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. NewYork. 2001, 1667–1724.

- [60] Т.Бушуева. Вопросы современной педиатрии. 2010, 9,1.
- [61] Maureen Anne Cleary. Paediatrics And Child Health. 2014, 25, 3.
- [62] Nenad Blau, Francjan J. van Spronsen, Harvey L. Levy. Lancet. 2010, 376, 1417–27.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает искреннюю признательность своему научному руководителю – к.х.н., н.с. Волокитиной Марии Владимировне – за предложенную интересную тему исследования для выполнения выпускной квалификационной работы и помощь в ее исполнении.

Автор благодарит д.х.н., профессора Тенникову Татьяну Борисовну за представленную возможность выполнения ВКР в Межкафедральной лаборатории биомедицинской химии СПбГУ, а так же всех сотрудников лаборатории за поддержку и ценные советы.

Отдельная благодарность выражается сотрудникам ресурсных центров СПбГУ «Термогравиметрические и калориметрические методы анализа», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» и «Геомодель» за проведение исследований, необходимых для выполнения ВКР.