

О.В. Федорова, Р.О. Петріна, Н.Л. Заярнюк*, Я.М. Станішевський, В.П. Новіков
 Національний університет “Львівська політехніка”,
 кафедра технології біологічно-активних сполук, фармації та біотехнології;
 *Московська державна академія тонкої хімічної технології ім. М.В. Ломоносова,
 кафедра біомедичних та фармацевтичних технологій

СТВОРЕННЯ ПОЛІМЕРНИХ ДІАГНОСТИЧНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ФІБРОНЕКТИН

© Федорова О.В., Петріна Р.О., Заярнюк Н.Л., Станішевський Я.М., Новіков В.П., 2009

Досліджено умови адсорбції желатини на поверхню полімерних частинок для конструювання тест-системи для визначення клітинного фібронектину. Проаналізовано різницю між фізичною адсорбцією та ковалентною взаємодією. Підібрано оптимальні умови взаємодії желатини з фібронектином.

Gelatines adsorption on polymer dispersion surface for cell fibronectin sensitivity test-systems making have been investigated. The difference between physical adsorption and covalent interaction has been analysed. Optimum terms of the interaction of the gelatine with cell fibronectin has been selected.

Постановка проблеми. В імунохімічних реакціях, починаючи з реакції латексної аглютинації (РЛА) і до вивчення рецепторного апарату клітин, полімерні мікросфери використовують як носії біолігандів. Застосування полімерних мікросфер в імунодіагностиці вимагає жорстких вимог до них. Частинки, що використовуються, повинні бути монодисперсні, з розміром в межах 1–3 мкм, добре візуалізуватися при мікроскопії і залишатись індивідуальними в біологічних рідинах. Задача ускладнюється ще і тим, що навіть при виконанні цих вимог, при використанні монодисперсних та індивідуальних у фізіологічних рідинах частинок складно диференціювати специфічну взаємодію ліганду і неспецифічну адсорбцію частинок на клітинній мембрані. Отже, при конструюванні полімерних тест-систем для дослідження рецепторного апарату клітин необхідно мати носій з контрольованими властивостями його поверхневого шару [1–3].

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Фібронектин (ФН) – глікопротеїн ссавців, птахів та інших тварин, основною функцією якого є забезпечення адгезії клітин між собою та до різних біосубстратів. Він сприяє очищенню крові фагоцитами від клітинних, тканинних залишків, фібринових мікрозгустків, сполучаючись з цими частинками та опсонізуючи їх таким чином [4]. При конструюванні полімерних тест-систем для визначення клітинного ФН необхідно мати носій з контрольованими властивостями його поверхневого шару. Частинки, що використовуються, повинні містити на своїй поверхні желатин заданої концентрації для афінної взаємодії з ФН, мати діаметр 1–2 мкм, добре візуалізуватися при мікроскопії, залишатись індивідуальними у біорідинах, кількість частинок у полімерній дисперсії має становити 10^{10} – 10^{11} частинок/л.

Желатин є продуктом теплової, кислотної, лужної або ферментативної денатурації колагенів [5]. Модифікований желатин розглядається як нова високомолекулярна поверхнево-активна речовина з постійним та заданим складом. Вміст гідрофільних груп макромолекул желатину на поверхні частинок вищий, коли желатин має колагеноподібну структуру, а міцність адсорбційного шару вища при конформації “клубка”. Використаний як біоліганд, желатин одночасно виконує роль стабілізатора частинок дисперсії. Його адсорбція триває протягом 12 годин [6].

Мета. Метою роботи є розроблення оптимальних умов для іммобілізації желатину на поверхню полімерних мікросфер для афінної взаємодії з фібронектином для створення полімерних діагностичних тест-систем.

Експериментальна частина. Об'єктом досліджень є частинки полімерної дисперсії з карбоксильними та альдегідними групами на поверхні, які були одержані зародковою кополімеризацією стиролу та метакрилової кислоти, стиролу та акролеїну на полістирольних зародкових частинках середнього діаметра 1,06 мкм [2]. Синтезовані частинки відповідають вимогам, що висуваються для застосування їх в імунології: середній діаметр частинок становить 1–2 мкм, розподіл за розмірами вузький, агломераційна стійкість 0,15М. Для підвищення стійкості полімерних дисперсій до них додавали людський сироватковий альбумін у різних співвідношеннях до желатину.

Желатин адсорбується на поверхні частинок у конформації колагеноподібної спіралі при 5 °С, а у вигляді клубка при 60 °С. Представлені у табл. 1 результати дослідження показали, що ζ -потенціал частинок при однакових концентраціях желатину збільшується з підвищенням температури іммобілізації. Спосіб іммобілізації желатину на поверхню полімерних дисперсій впливає на чутливість РЛА. Так, чутливість РЛА значно вища при використанні частинок, на поверхню яких желатин адсорбований у вигляді клубка (при 60°С), ніж при використанні частинок, на поверхні яких він адсорбований у вигляді колагеноподібної спіралі (при 5°С). Це обумовлено здатністю желатину в цій конформації ефективніше взаємодіяти з фібронектином (ФН) [7].

Таблиця 1

Адсорбція кісткового желатину при різних температурах на полістирольні частинки

Концентрація желатину, фізично адсорб. на пов. частинок, %мас	Діаметр частинок, мкм.	ζ -потенціал, мВ.	Агрегативна стійкість частинок		Чутливість РЛА	Полімерна дисперсія, що не містить фібронектин (контроль)
			в ФБР (рН=7,2)	Конц. альбуміну, %		
при 60°С 0,004 0,035 0,15 0,6	1,15 1,27	-37,5 -22,4	-	(+) 0,025	1 : 320	Не аглютинуює (+)
			-	(+) 0,012	1 : 160	
			+	+	1 : 80	
			+	+	1 : 40	
при 5°С 0,004 0,035 0,15 0,6	1,22 1,38	-20,3 -15,2	-	(+) 0,05	1 : 10	Не аглютинуює (+)
			-	(+) 0,025	1 : 10	
			-	(+) 0,39*10 ⁻³	-	
			+	+	-	

- агрегативно нестійкі, + агрегативно стійкі
- ФБР – фосфатно-буферний розчин

Для вибору оптимального співвідношення між желатином та альбуміном на поверхню полімерних мікросфер фізично сорбували желатин та людський альбумін різної концентрації. Концентрацію желатину змінювали в інтервалі від 0,017 % до 2,5 % в розрахунку на полімер (табл.2). Для оцінки ефективності взаємодії фібронектину з желатином використовували реакцію, що проходить за типом РЛА. Концентрація альбуміну, необхідна для забезпечення стійкості системи, змінюється відповідно до концентрації желатину зворотно пропорційно. При використанні частинок, що містять желатин на поверхні, як тест-системи на ФН необхідний титр РЛА досягається в інтервалі концентрацій 0,017–0,07 %.

**Вплив концентрації фізично адсорбованого желатину та альбуміну на стійкість частинок.
Чутливість РЛА с використанням одержаних тест-систем**

Концентрація желатину, фізично адсорб. на поверхні частинок, %мас.	Агрегативна стійкість частинок		Чутливість РЛА	Полімерна дисперсія, що не містить фібрoneктин (контроль)
	в ФБР (рН=7,2).	Концентрація доданого альбуміну, %		
1. Полістирольна дисперсія, частинки якої використані для зародкової полімеризації				
0,017	-	(+)0,025	1: 125	Не аглютинуює (+)
0,035	-	(+)0,012	1: 256	
0,07	-	(+)0,005	1: 125	
0,15	-	(+)0,001	1: 256	
0,31	-	(+)0,001	1: 8	
0,62	-	(+)0,001	1: 8	
1,25	+	-	-	
2,5	+	-	-	
2. Кополімерна дисперсія, одержана зародковою полімеризацією : стирол+ акролеїн				
0,017	-	(+)0,58*10 ⁻²	1: 8	Не аглютинуює (+)
0,035	-	(+)0,58*10 ⁻²	1: 4	
0,07	-	(+)1,8*10 ⁻⁴	1: 4	
0,15	-	(+)0,11*10 ⁻⁴	1: 2	
0,31	-	(+)0,03*10 ⁻⁴	1: 2	
0,62	+	+	1: 2	
1,25	+	+	1: 2	
2,5	+	+	1: 2	
3. Кополімерна дисперсія, одержана зародковою полімеризацією стирол+метакрилова кислота.				
0,017	+	+	+	Не аглютинуює (+)
0,035	+	+	+	
0,07	+	+	+	
0,15	+	+	+	
0,31	+	+	+	
0,62	+	+	+	
1,25	+	+	+	
2,5	+	+	+	

- агрегативно нестійкі, + агрегативно стійкі

При ковалентному зв'язуванні функціональних груп желатину та полімерних частинок концентрацію желатину змінювали аналогічно. Присутність ковалентно зв'язаного желатину на поверхні частинок контролювали додаванням до системи твіну 80, який характеризується вищими поверхнево-активними властивостями, ніж желатин і повинен витиснути з адсорбційного шару частинок молекули фізично сорбованого желатину (табл.3).

Результати та їх обговорення. Результати вимірювань діаметра частинок та їх розподіл за розмірами та ξ -потенціалом для зародкової кополімерної дисперсії після фізичної адсорбції желатину на поверхню частинок представлені на рис.1, 2.

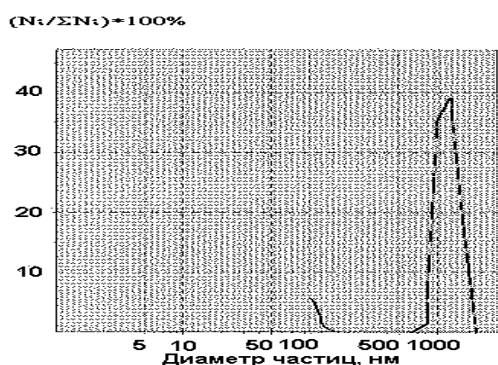


Рис.1. Розподіл частинок полістирольної дисперсії за розмірами після фізичної адсорбції желатину

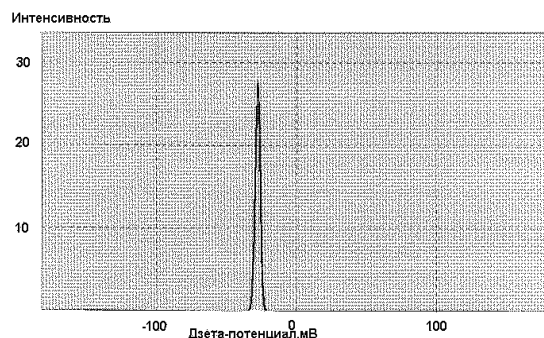


Рис.2. ξ -потенціал частинок полістирольної дисперсії після фізичної адсорбції желатину

Після адсорбції желатину на поверхню частинок найвірогідніше діаметр частинок збільшується з 1,1 мкм до 1,15 мкм, електрокінетичний потенціал зменшується з $-27,4$ до $-22,4$ мВ. Різниця між середніми діаметрами полімерних частинок до і після адсорбції желатину становить 0,14 мкм, тобто товщина адсорбційного шару желатину становить - 0,07 мкм.

В табл.3 наведені дані про вплив концентрації желатину, ковалентно зв'язаного з функціональними групами полімеру, та концентрації альбуміну, фізично адсорбованого на поверхню частинок, на стійкість полімерної тест-системи та чутливість РЛА.

Таблиця 3

Вплив концентрації ковалентно зв'язаного желатину та фізично адсорбованого альбуміну на стійкість та чутливість РЛА з використанням одержаних тест-систем

Концентрація желатину, при ковалентному зв'язуванні з частинками, %мас.	Агрегативна стійкість частинок		Чутливість РЛА		Полімерна дисперсія, що не містить фібрoneктин (контроль)
	в ФБР (рН=7,2).	Концентрація доданого альбуміну, %	частинки, не відмиті твіном 80	частинки, відмиті твіном 80	
1. Кополімерна дисперсія, одержана зародковою полімеризацією: стирол та метакрилова кислота					
0,017	-	(+)0,09	1: 512	титр не змінився	Не аглютинуює (+)
0,035	-	(+)0,09	1: 256		
0,07	-	(+)0,09	1: 256		
0,15	-	(+)0,023	1: 256		
0,31	-	(+)0,023	1: 128		
0,62	-	(+)0,023	1: 128		
1,25	-	(+)0,023	1: 128		
2,5	-	+	+		
2. Кополімерна: дисперсія, одержана зародковою полімеризацією: стирол та акролеїн					
0,017	-	(+)0,023	1: 256	титр не змінився	Не аглютинуює (+)
0,035	-	(+)0,023	1: 512		
0,07	-	(+)0,023	1: 256		
0,15	-	(+)0,023	1: 256		
0,31	-	(+)0,023	1: 256		
0,62	-	(+)0,023	1: 256		
1,25	-	(+)0,005	1: 128		
2,5	-	(+)0,005	1: 128		

Дані табл.3 свідчать про те, що титр РЛА не змінювався. Це підтверджує ковалентну взаємодію фібронектину з желатином. Протікання РЛА в лунках планшети, що містять та не містять фібронектин (контроль), спостерігали протягом 12 годин. Наведені дані свідчать, що агрегативної стійкості частинок досягають при концентрації желатину 1,25 % (приклад 1, табл.3), але при цьому не проходить РЛА. Титр РЛА зростає до 1:256 тільки при концентрації желатину, взятого в інтервалі 0,017–0,15 % та концентрації альбуміну >0,001%, відповідно. Максимальна чутливість РЛА (1:512) спостерігається при низьких концентраціях желатину – 0,017–0,035%.

Висновки. Отже, спосіб іммобілізації біоліганду значно впливає на стійкість полімерної тест-системи. Показано вплив природи желатину та його конформації на діаметр частинок, заряд, стійкість полімерних мікросфер та чутливість тест-систем. Встановлено, що для забезпечення стійкості частинок у буферному розчині в процесі одержання полімерної тест-системи на фібронектин та необхідної чутливості РЛА міжфазний адсорбційний шар частинок повинен бути завтовшки 0,06 мкм і складатися з молекул желатину та альбуміну, взятих у певних співвідношеннях.

1. Bangs L.B. *Immunological applications of microspheres* / L.B.Bangs // *The Latex Course*. –1996. – №4. – P.1–29. 2. Синтез полімерних суспензій для біоаналітичних досліджень / О.В. Федорова, Р.О. Петріна, В.П. Новіков, Я.М. Станішевський, І.О. Грицкова, М.І. Прокопов // *Вісник НУ «Львівська політехніка» «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. – 2006. – № 553. – С. 315–317. 3. Петріна Р.О., Кісельов Є.М., Зарічна О.З., Новіков В.П. Полімерні мікросфери для ковалентного зв'язування біоспецифічних лігандів // *Вісник Держ. ун-ту "Львівська політехніка"*. – 1999. – №374. – С.70–73. 4. Златопольский А.Д. Строение фибронектинов: сходство и различие / А.Д. Златопольский, В.И. Мазуров // *Вопросы мед. химии*. – 1985. – Т.31. – № 6. – С.2–14. 5. Вейс А.М. Макромолекулярная химия желатина. – М.: Пищепромиздат, 1971. 6. Адсорбция желатини на жидких границах раздела фаз / Т.Ф. Бусол, Г.М. Письменная и др. // *Коллоидн. журн.* – 1979. – Т.41. – № 6. – С 1055–1060. 7. Abe Vaynberg K. *Polyampholyte Gelatin Adsorption to Colloidal Latex : pH and Elektrolyte Effects on Acrylic and Polystyrene Latices.* / K. A. Vaynberg, J.Norman. Wagner, Ravi Sharma // *Biomacromolecules*. – 2000. – № 1. – P.466–472.