

**И.А. Грицкова,
Н.И. Прокопов,
Я.М. Станишевский
МИТХТ им. М.В. Ломоносова**

БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР

УДК 576.8.097.34:616-097.5:612.018:611.441

В работе рассмотрено современное состояние проблемы по синтезу полимерных микросфер и получение на их основе тест-систем на различные виды заболеваний.

В настоящее время существует большое количество методов, позволяющих определять наличие и концентрацию биохимических лигандов в исследуемых биологических образцах [1,2]. Определяемый лиганд, как правило, играет важную роль в биохимических процессах, и позволяет диагностировать различные виды заболеваний.

Принцип работы многих методов основан на иммунохимической реакции между антигеном (веществом, несущим признаки генетической чужеродной информации для данного вида организма) и антителами (белками, относящимися к классу иммуноглобулинов, продуцируемыми клетками иммунной системы организма в ответ на появление антигена) с образованием комплекса “антиген-антитело” [3-6]. Реакция образования такого комплекса является высоко специфичной, т.е. на появление в организме определенного антигена, иммунная система вырабатывает антитела строго определенного строения, способные взаимодействовать только с этим антигеном. При этом, вследствие того, что и антиген и антитело могут взаимодействовать одновременно с несколькими молекулами друг друга, образуются пространственные сетки, узлами которых служат молекулы антигена.

Образование сеток-агломератов, а, следовательно, и обнаружение того или иного вида антигенов, может быть зарегистрировано различными методами, например, методами спектрофотометрии, нефелометрии, турбидиметрии, лазерной автокорреляционной спектроскопии и т.д. Использование для обнаружения комплекса “антиген-антитело” специального дорогостоящего оборудования создает

заметные трудности для широкого применения указанных методов при диагностике заболеваний. В тоже время, связывание антигенов (антител) с определенными носителями, которые выполняют исключительно индикаторную функцию, позволяет обнаружить появление комплексов даже невооруженным глазом как скопление агломератов частиц носителя.

Носители биоллигандов могут быть разделены на две большие группы. Одна из них представляет собой биodeградируемые объекты - бактерии, липосомы, химически модифицированные эритроциты, крахмальные шарики и др., а другая недеградируемые - активированный уголь, коллоидное золото, эмульсии парафинового масла покрытого альбумином, полимерные микросферы, стеклянные шарики. Каждая из этих групп характеризуется специфическими свойствами, определяющими область их применения. Следует отметить, что биodeградируемые носители, как правило, имеют природное происхождение и трудно поддаются контролю, в то время как синтетические объекты стабильны и являются контролируемыми, т.е. могут быть охарактеризованы по заряду, химическому строению, гидрофобности и т.д.

Среди синтетических носителей особенно перспективны полимерные микросферы, которые могут быть синтезированы с узким распределением по размерам в широком интервале диаметров, что важно для получения высокочувствительных диагностических тест-систем.

Однородность частиц по размерам дает определенное преимущество для

использования их в диагностических реакциях, так как позволяет достаточно точно определить площадь поверхности носителя белковых молекул и установить степень ее покрытия антигеном или антителом. Кроме того, она обуславливает сходный характер их поведения во время агглютинации, что облегчает “прочтение” результатов реакции латекс-агглютинации (РЛА).

К полимерным суспензиям с узким распределением частиц по размерам (РЧР) обычно относят суспензии, содержащие частицы полимера строго сферической формы и одинакового диаметра, диспергированные в воде [7,8]. Типичные значения коэффициента вариации (мера отклонения диаметров частиц от среднего значения), составляют 1-3% (для частиц с диаметром в интервале 0,1-10мкм) [9,10] и 10-30% (для частиц с диаметром в интервалах менее 0,06 и более 10мкм) [10,11].

Радикальная гетерофазная полимеризация является наиболее распространенным способом получения полимерных суспензий, широко используемых в медицине, биологии и биотехнологии [12].

Основными требованиями, которые в этом случае должны удовлетворять полимерные частицы – это биологическая, химическая и коллоидная устойчивость в физиологических жидкостях, узкое распределение частиц по размерам, возможность образования прочной связи белков и других биополимеров с функциональными поверхностными группами полимера частиц суспензий. Кроме того, необходимо получать дисперсии с заданными размерами частиц, которые определяют их применение в различных видах анализа с визуальной или инструментальной детекцией результатов биоспецифических реакций [13].

К настоящему времени определены принципы синтеза полимерных суспензий с узким распределением частиц по размерам в широком интервале диаметров [14,15]. Кратко рассмотрим основные методы синтеза таких полимерных суспензий.

Их получают гетерофазной полимеризацией гидрофобных мономеров

(стирола, метилметакрилата, винилтолуола и т.д.) в отсутствие эмульгатора (безэмульгаторная полимеризация). В этом случае получают полимерные микросферы с диаметром частиц до 1мкм и узким распределением частиц по размерам (РЧР). Хотя эти частицы и используют в качестве носителей биополимеров в иммунохимических исследованиях, но их недостатком является невысокая устойчивость в буферных растворах, в которых получают конъюгат микросфера-биополимер.

Показано, что повысить устойчивость таких частиц удается добавлением малорастворимых в воде поверхностно-активных веществ (ПАВ), таких как дипара-толил-карб-алкоксифенилкарбинол [16], кремнийорганические ПАВ [17,18], жиры растительного и природного происхождения [19] и т.д.

Синтез полимерных суспензий осуществляют и методом суспензионной полимеризации мономеров. Сущность метода суспензионной полимеризации состоит в том, что мономер или смесь мономеров диспергируют в жидкой фазе, главным образом в водной, путем механического перемешивания в присутствии стабилизаторов таких как : крахмал, желатин, ацетилцеллюлоза, натриевые и калиевые соли полиакриловой и полиметакриловой кислот, сополимеры гидрофобных мономеров с малеиновым ангидридом и др [20,21]. Эффективность защитного действия стабилизатора невысокая из-за их низкой концентрации и образование частиц протекает по коагуляционному механизму. Размер полученных при этом полимерных дисперсий идентичен размеру исходных капель мономера и колеблется от десятков микрон до нескольких миллиметров.

Средний диаметр частиц полимерной дисперсии, образующихся при суспензионной полимеризации, и распределение их по размерам, устойчивость реакционной системы и конечной суспензии полимерных частиц определяются множеством факторов, таких как природа инициатора и стабилизатора, температура процесса, вязкость системы, pH среды, массовое соотношение

мономерной и водной фаз, а также скорость перемешивания, тип перемешивающего устройства и форма реакционного сосуда [22,23].

Широко применяют для синтеза полимерных микросфер дисперсионную и затравочную полимеризацию.

Методом дисперсионной полимеризации в органической среде получают полимерные частицы с размером от 1 до 15 мкм. [24,25]. Необходимыми условиями проведения дисперсионной полимеризации в органической среде является присутствие растворителя, растворяющего мономер, но осаждающего образующийся полимер, а также стерического полимерного стабилизатора, обеспечивающего стабилизацию образующихся полимерных частиц. Этим методом синтезированы микросферы с диаметрами в интервале 1-3 мкм. и разной концентрацией эпоксидных групп на поверхности частиц полимерных суспензий (в интервале 5-100 мкмоль/г полимера) [26].

Метод затравочной полимеризации удобен тем, что позволяет регулировать как размер частиц полимерных суспензий, так и природу функциональных групп на их поверхности [27,28].

Основной задачей при затравочной полимеризации мономеров является поддержание постоянного числа набухших мономером частиц, и проведения в них полимеризации до полной конверсии мономера. Частицы конечной полимерной суспензии характеризуются гетерогенной морфологией, то есть внутриглобулярной композиционной неоднородностью, и имеют структуру типа «ядро-оболочка» (например, полистирольное ядро, окруженное полиакриловой оболочкой, или наоборот).

Для получения частиц с функциональными группами на поверхности, проводят затравочную полимеризацию функциональных мономеров (содержащих гидроксильные, эпокси-, amino-, альдегидные группы) на частицах суспензии, чаще всего полистирольной. Затравочная полимеризация функциональных сомономеров позволяет не только сконцентрировать на поверхности частиц полярные группы, необходимые для

дальнейшей модификации частиц, но и повысить стабильность суспензии даже при низкой концентрации эмульгатора [29].

Другим способом получения частиц с узким РЧР является гетерофазная осадительная полимеризация различных мономеров. Ее обычно проводят в средах, в которых образующийся при синтезе полимер нерастворим. Недостатком этого способа синтеза является плохая воспроизводимость результатов и невысокая устойчивость в буферных растворах [12].

Методом осадительной полимеризации получают полимерные суспензии с альдегидными группами на поверхности частиц. Описаны два способа получения полиакролеиновых микросфер с узким РЧР: анионная осадительная полимеризация в щелочных условиях [30] и радикальная эмульсионная полимеризация с использованием γ -излучения либо иницирующей окислительно-восстановительной системы [31]. Этими способами были получены полиакролеиновые микросферы с диаметрами 0,01-0,2 мкм и коэффициентом вариации менее 10% (методом анионной полимеризации) и 0,01-0,02 до 5,0 мкм (методом радикальной полимеризации). О плохой воспроизводимости процессов осадительной полимеризации акролеина сообщается в работах [32]. Отмечается, что в частицах полиакролеиновых суспензий всегда содержится некоторое количество олигомерного продукта, наличие которого обусловлено особенностями механизма осадительной полимеризации. Вследствие этого, с течением времени такие олигомерные молекулы могут диффундировать из объема частиц на их поверхность, что приводит к заметному ухудшению свойств микросфер в процессе хранения. Для устранения указанных недостатков были предложены ряд методов, позволяющих заметно повысить химическую стабильность полиакролеиновых микросфер, снизить физическую адсорбцию белковых молекул на их поверхности и повысить выход целевого продукта [33,34].

Существующие в настоящее время методы синтеза функциональных

суспензий с аминогруппами на поверхности частиц сводятся либо к сложным многостадийным реакциям полимераналогичных превращений [35], либо к полимеризации или сополимеризации дорогостоящих функциональных мономеров (например, аминостирола) [36]. В этом отношении перспективным является использование методов модификации полимерных суспензий соединениями, содержащими реакционноспособные

аминогруппы, и прежде всего аминокислотами [37]. В этом случае одновременно проводят два процесса – сополимеризацию диенового мономера со стиролом и прививку серусодержащих аминокислот по двойным связям сополимера.

Основные типы полимерных суспензий, частицы которых используются в качестве носителей биологандов в иммунохимических реакциях сведены в табл.1.

Таблица1. Основные типы полимерных суспензий, частицы которых используют в качестве носителей биологандов

Тип полимерной суспензии	$d_{\text{частиц}}$, мкм.	Тип связывания лиганда с полимерными микросферами	Диагностические тест-системы созданные на их основе
Полистирольная суспензия	0,5	1.адсорбция рекомбинантным оболочечным антигеном CbrE HIV 2.адсорбция антигенами <i>Toxoplasma gondii</i> .	Для скрининга специфических к нему антител в сыворотках крови. Для выявления специфических антител в сыворотках крови.
Полистиролметакриловая суспензия	0,7	Ковалентная иммобилизация: 1.тиреоглобулина (TgG) человека. 2.антител к АФП. 3.иммунноглобулина G (IgG) человека, Fc-фрагмент которого модифицирован прогреванием. 4. антител к АМГФ и ТБГ.	Для диагностики ревматоидных заболеваний, заболеваний щитовидной железы, ранней стадии беременности. Для определения альфо-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови больных первичным раком печени. Для выявления RF-фактора. Для определения альфа-микроглобулина фертильности (АМГФ) и трофобластического β -глобулина (ТБГ) в сыворотке крови.
Полистирольная суспензия с эпоксидными группами на поверхности полимерных микросфер.	0,6-0,8	Ковалентная иммобилизация противостафилококковых антител	Для выявления <i>S. aureus</i> и его антигенов в биосубстратах больных гнойно-воспалительными заболеваниями.
Полистирольные суспензии с эпоксидными и альдегидными группами на поверхности частиц.	1-3	Ковалентная иммобилизация: 1.антигенов <i>Y. Enterocolitica</i> сероварианты 03 и 09; 2.липополисахаридный бруцеллезный антиген; 3.фракция МВ-50 дифтерийный анатоксин.	Тест-системы на : Иерсиниоз. Бруцеллез. Дифтерит.

Полиакролеиновая суспензия (окрашенная флюорисцентным красителем)	1,5	Ковалентная иммобилизация: 1.моноклональными антителами против 2,4-D. 2.стрептавидином	Для полуколичественного определения гаптена (2,4-дихлор-феноксисукусная кислота). Детекция ДНК фага λ в дот-анализе.
Полиакролеиновая суспензия (окр.малахитовым зеленым)	1,5	Ковалентная иммобилизация антигенов вируса кори штамма Л-16	Для определения противокоревых антител в сыворотке крови.
Меламинформальдегидная суспензия	0,6	Адсорбция искусственных антигенных детерминант белков ВИЧ в воде синтетических пептидов	Для определения антител вызываемых ВИЧ.
Поли(изопрен-со-стирольная) суспензия, модифицированная цистеином	1,2	Сорбция биолиганда (поверхностного антигена клеточных стенок грибов P.Candida)	Для определения паприна
Поли(изопрен-со-стирольная) суспензия модифицированная серосодержащими аминокислотами	1,2		Для иммуногистохимических исследований, в частности маркеров клеточной поверхности лимфоцитов крови больных с диагнозом СПИД.
Полистирольная суспензия, полученная в отсутствие ПАВ и в присутствии полидиметилсилоксана (ПДС), а также полистиролметакриловая суспензия	0,3-0,6	На полистирольную суспензию белок (конъюгат IgG-фракции, выделенной из антисыворотки к CRP) адсорбировали физически, а на частицы полистиролметакриловой суспензии проводили ковалентное связывание белка.	Для определения С-реактивного белка.

Практическое применение полимерных микросфер в качестве носителей биолигандов намного опередило научные исследования в области синтеза полимерных микросфер с определенными свойствами, позволяющими, их использовать в этом качестве, что и до сих пор, к сожалению, является причиной их выбора методом эмпирического поиска, то есть методом проб и ошибок. Кажущаяся на первый взгляд простота перехода от биологических носителей к синтетическим в реальности не подтвердилась. В первую очередь не подтвердилось мнение об универсальности

полимерных бионосителей, то есть возможности их использования, например, для создания тест-систем на все возможные виды заболеваний и изучения фагоцитоза.

Все это стимулирует постановку новых исследований в области синтеза полимерных суспензий с целью определения факторов регулирующих строение межфазного слоя частиц, его морфологию распределение функциональных групп на поверхности полимерных частиц или конформацию специфических лигандов для аффинного взаимодействия с биолигандом.

Эти исследования нами осуществлялись в 2-х направлениях:

1. Создание полимерных микросфер с межфазной поверхностью, обеспечивающей устойчивость полимерных микросфер, оптимальное содержание функциональных групп для ковалентного связывания с биолигандами;
2. Синтез полимерных микросфер, содержащих на поверхности вещества в

определенной конформации, специфически связывающих с биополимерами.

Первое направление предполагало выбор способа синтеза полимерных микросфер с определенным строением межфазного адсорбционного слоя (МАС), устойчивых в буферных растворах, сохраняющих свои свойства в течение не менее 6 месяцев [38-44].

Второе направление предполагало разработку способа синтеза полимерных микросфер, и выбор способа иммобилизации различных лигандов на их поверхности, специфически взаимодействующими с определяемым биополимером [45-51].

Свойства конъюгатов полимерная микросфера-биополимер, «ПМ-биополимер», должны были соответствовать их использованию в качестве маркеров, тест-систем для определения антигенов и антител и для изучения процессов фагоцитоза. Для выбора полимерных микросфер необходимо было провести сопоставительный анализ методов получения полимерных микросфер, различающихся

природой полимера, ПАВ, функциональных групп, наличием красителя и флуоресцентной метки, диаметром и числом частиц, а также их устойчивостью при хранении в физиологических растворах.

Методом безэмульгаторной, затравочной и дисперсионной полимеризации были синтезированы полимерные суспензии с различным составом межфазного адсорбционного слоя (табл.2.), состоящим:

- только из гидрофобного полимера и ионогенных фрагментов молекул инициатора (персульфата калия);
- из полимера, содержащего кроме ионогенных фрагментов молекул инициатора, функциональные группы, способные либо непосредственно взаимодействовать с функциональными группами биополимера (альдегидные, эпоксигруппы), либо взаимодействовать после их активирования (карбоксовые, аминогруппы).

Таблица 2. Характеристика полимерных суспензий

Тип полимерной суспензии	d _{частиц} , мкм	Концентрация частиц N, в 1 л 0,1% суспензии	ξ-потенциал, мВ	% количество агрегатов, содержащих не более 3 частиц в расчёте на общее число частиц	
				в *ФСБ (рН=7,2)	в ФСБ при добавлении 0,1 %масс. альбумина
Сополимерная суспензия ССН и СТ	1,15	6,2*10 ¹¹	-44,4	100 -	0 +
Сополимерные суспензии, полученные затравочной полимеризацией ССН, СТ:				90-100	0
1).а). МАК (0,3 м.ч. **)	1,64	4,7*10 ¹¹	-48,3	-	+
б). МАК (0,6 м.ч.)	1,43	7,2*10 ¹¹	-36,4	-	+
в). МАК (0,3 м.ч.)	1,54	5,7*10 ¹¹	-23,8	-	+
+флюоресц. краситель.					
2). ГМА (0,6 м.ч.)	1,61	5,1*10 ¹¹	-40,3	-	+
3). Акролеин (0,6 м.ч.)	1,70	4,2*10 ¹¹	-52,4	-	+
4). в присутствии ПДС	1,49	6,4*10 ¹¹	-46,4	-	+
Сополимерные суспензии, полученные дисперсионной полимеризацией:				0	0
5). СТ+МАК (2 м.ч.)	2,98	6,2*10 ¹¹	-5,2	+	+
6). ГМА+ МАК (2 м.ч.)	2,76	7,9*10 ¹¹	-4,3	+	+
7). ХЭМА+ МАК (2 м.ч.)	3,90	5,8*10 ¹¹	-4,5	+	+

«-» - агрегативно неустойчивы, «+» - агрегативно устойчивы;

*ФСБ - фосфатно-солевой буфер (pH=7,2);

**м.ч. – массовая часть мономера взятого при сополимеризации.

Это полистирольные, поли(стирол-со-метакрилат)ные (СТ+МАК), полиглицидил-метакрилатные (ГМА+МАК), полихлорэтил-метакрилатные (ХЭМА+МАК) суспензии, синтезированные суспензионной и дисперсионной полимеризацией, а также полимерные суспензии, полученные затравочной полимеризацией стирола (СТ), содержащего карбоксилсодержащий

полидиметилсилоксан (ПДС), стиролсульфоната натрия (ССН), метакриловой кислоты (МАК), акролеина и глицидилметакрилата (ГМА) на полистирольных затравочных частицах.

Полимерные суспензии характеризовались узким распределением частиц по размерам и имели средние диаметры в диапазоне $1,15 \div 2,98$ мкм (рис.1-3).

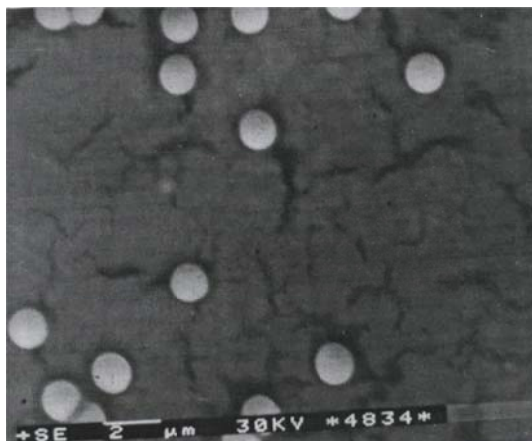


Рис.1. Микрофотография сополимерной суспензии ССН и СТ, полученная методом сканирующей электронной микроскопии.

Средний $d_{\text{частиц}} = 1,15$ мкм

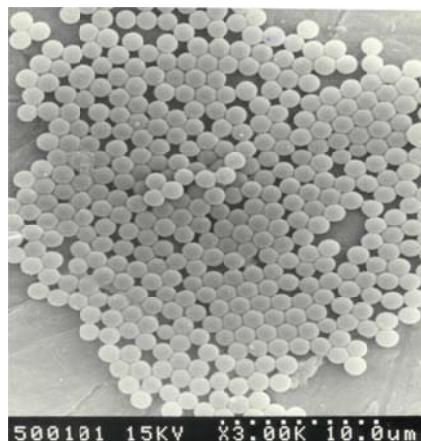
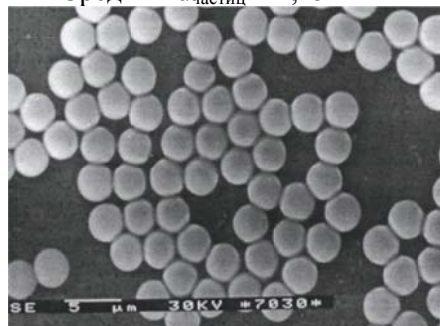


Рис.2. Микрофотография сополимерной суспензии ССН, СТ и ПДС полученная методом сканирующей электронной микроскопии. Средний $d_{\text{частиц}} = 1,49$ мкм

Рис.3. Микрофотография сополимерной суспензии СТ+МАК полученная методом сканирующей электронной микроскопии. Средний $d_{\text{частиц}} = 2,98$ мкм

Свойства полимерных суспензий соответствовали перечню требований, выполнение которых необходимо для использования полимерных микросфер в качестве носителей библигандов.

Однако оказалось, что при замене водной фазы на физиологический раствор или раствор буфера, в которых проводят реакцию латексной агглютинации (РЛА), полимерные суспензии ведут себя неодинаково. Частицы полимерных суспензий, полученных затравочной полимеризацией образовывали агрегаты, состоящие из двух, трех... пяти и более частиц, а частицы, синтезированные

дисперсионной полимеризацией, сохраняли индивидуальность.

Полимерные микросферы отличались друг от друга тем, что полученные дисперсионной полимеризацией, содержали в межфазном слое поливинилпирролидон, который обеспечивал их устойчивость в качестве стерического стабилизатора, в отличие от частиц, полученных другими способами, и их заряд был невысоким (табл.2).

Частицы, не содержащие поливинилпирролидон в межфазном слое, в физиологическом растворе агрегировали. Образование агрегатов частиц удалось

избежать только после адсорбции на их поверхность полимерного ПАВ-альбумина, взятого в определенной концентрации (табл.2).

Таким образом, казалось, что полимерные микросферы соответствуют требуемым свойствам. Но, в процессе создания тест-систем было обнаружено, что на полимерные микросферы, содержащие в поверхностном слое поливинилпирролидон, не адсорбируются такие биолиганды как желатин, протеин, столбнячный анатоксин и т.д. Использовать такие полимерные микросферы в качестве носителей биолигандов оказалось возможным только после их модификации и появления в межфазном слое частиц функциональных групп, способных ковалентно связываться с функциональными группами биолигандов. Для этого проводили затравочную сополимеризацию мономеров с акролеином или метакриловой кислотой на полистирольных частицах по тому же рецепту. К альдегидным или карбоксильным группам полимера, находящимся в межфазном слое полимерных микросфер, ковалентно присоединяли функциональные группы биолиганда.

Таким образом, для создания тест-систем различного назначения были предложены полимерные микросферы различного диаметра с межфазной поверхностью, содержащей функциональные группы для ковалентного связывания с биолигандами.

Полимерные микросферы использовали при получении тест-систем для определения различных вирусных и инфекционных заболеваний, таких как: RF-фактора; Тириоглобулина; Иерсиниоза; Бруцеллеза; СПИДа; Лихорадки Синдбис; Сальмонеллеза; Лептоспироза; Инфекционного бронхита кур.

Методика их получения включала выбор способа ковалентной иммобилизации биолиганда на поверхность полимерных микросфер, который зависел от природы

функциональной группы, а также определения оптимальной концентрации биолиганда для получения высокого титра РЛА.

Было установлено, что после иммобилизации биолиганда заряд (ξ – потенциал) частиц уменьшался, и снижалась устойчивость конъюгата «ПМ-биолиганд». В связи с этим во многих случаях добавляли альбумин для повышения устойчивости системы.

Создание тест-систем, в которых полимерная микросфера содержала в поверхностном слое специфические лиганды, аффинно взаимодействующие с определяемым биолигандом, можно разделить на два самостоятельных раздела. Первый включал создание тест-системы, состоящей из полимерных микросфер, на поверхность микросфер которых иммобилизовывали биолиганд или специальные вещества в конформации, удобной для прямого аффинного взаимодействия с определяемым лигандом.

Рассмотрим это на примере создания тест-систем на фибронектин.

В этом случае необходимо было на поверхность полимерных микросфер иммобилизовать желатину в конформации, удобной для аффинного взаимодействия с фибронектином.

Конформация молекул желатины существенно зависит от температуры: при 5°C – они имеют вид коллагеноподобной спирали, а при 60°C – клубка. Естественно, это отражается на площади, занимаемой молекулой желатины на поверхности полимерных микросфер, и количестве молекул желатины, необходимых для полного насыщения их поверхности.

Проведенные исследования показали (табл.3), что при иммобилизации желатины в конформации клубка устойчивость полимерных микросфер выше, чем при иммобилизации в конформации коллагеноподобной спирали. ξ – потенциал частиц, на которых желатину

иммобилизировали в виде полимерного клубка, оказался выше, чем у частиц, содержащих желатин в виде коллагеноподобной спирали что, по-видимому, обусловлено частичной экранизацией ионогенных групп, полимера на поверхности полимерных микросфер.

Полученные тест-системы были изучены в РЛА. Как видно из данных, приведенных в табл.3 при высокой концентрации желатины на поверхности

полимерных микросфер не происходит эффективного ее взаимодействия с фибронектином. Уменьшение концентрации желатины приводит снижению устойчивости полимерных микросфер. При формировании на поверхности полимерных микросфер смешанного слоя из молекул желатины и альбумина, индифферентного к фибронектину, удалось найти их мольное соотношение, при котором полимерные микросферы устойчивы.

Таблица 3. Адсорбция костной желатины, при разных температурах, на частицы полистирольной суспензии.

Концентрация желатины, физически адсорбируемой на поверхности частиц, %масс	$d_{\text{частиц}}$, мкм	ξ -потенциал, мВ.	Агрегативная устойчивость частиц		Чувствительность РЛА	Полимерная суспензия не содержащая фибронектин (контроль)
			в ФБР (рН=7,2)	Концентрация добавленного альбумина, %		
при 60°C						
0,004			+	(-) 0,025	1 : 320	Не агглютинирует (-)
0,035	1,15	-37,5	+	(-) 0,012	1 : 160	
0,15	1,27	-22,4	-	-	1 : 80	
0,6			-	-	1 : 40	
при 5°C						
0,004			+	(-) 0,05	1 : 10	Не агглютинирует (-)
0,035	1,22	-20,3	+	(-) 0,025	1 : 10	
0,15	1,38	-15,2	+	(-) $0,39 \cdot 10^{-3}$	-	
0,6			-	-	-	

+ агрегативно неустойчивы

- агрегативно устойчивы

Сравнительный анализ титров РЛА тест-системами, полученными из полимерных микросфер различной природы, содержащих желатину физически адсорбированную на

поверхности полимерных микросфер и ковалентно присоединенную за счет взаимодействия функциональных групп показан в табл.4 и табл.5.

Таблица 4. Влияние концентрации физически адсорбированной желатины и альбумина, на устойчивость частиц. Чувствительность РЛА с использованием полученных тест-систем.

Концентрация желатины, физически адсорбируемой на поверхности частиц, %масс.	Агрегативная устойчивость частиц		Чувствительность РЛА	Полимерная суспензия, не содержащая фибронектин (контроль)
	в ФБР (рН=7,2).	Концентрация добавленного альбумина, %		
1. Полистирольная суспензия (Ст), частицы которой использованы для затравочной полимеризации				
0,017	+	(-)0,025	1: 125	Не агглютинирует (-)
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.Сополимерная суспензия, полученная затравочной полимеризацией: Ст, ССН в присутствии ПДС				
0,017	+	$(-)0,58 \cdot 10^{-2}$	1: 8	Не агглютинирует (-)
0,035	+	$(-)0,58 \cdot 10^{-2}$	1: 4	
0,07	+	$(-)1,8 \cdot 10^{-4}$	1: 4	
0,15	+	$(-)0,11 \cdot 10^{-4}$	1: 2	
0,31	+	$(-)0,03 \cdot 10^{-4}$	1: 2	
0,62	-	-	1: 2	
1,25	-	-	1: 2	
2,5	-	-	1: 2	
Сополимерные суспензии, полученные дисперсионной полимеризацией: 3.Ст+МАК (2 м.ч.) 4.ГМА+ МАК (2 м.ч.)				
0,017	-	-	-	Не агглютинирует (-)
0,035	-	-	-	
0,07	-	-	-	
0,15	-	-	-	
0,31	-	-	-	
0,62	-	-	-	
1,25	-	-	-	
2,5	-	-	-	

+ агрегативно неустойчивы

- агрегативно устойчивы

При ковалентном связывании функциональных групп желатины и полимера частиц, концентрацию желатины изменяли в том же интервале значений. Количество несвязанной желатины определяли путем измерения поверхностного натяжения водной фазы после добавления в систему более поверхностно-активного, чем желатина, вещества твина 80. Поверхностное натяжение водной фазы практически не изменилось, сохранился и титр РЛА (табл.5), что свидетельствовало о взаимодействии фибронектина только с желатиной, функциональные группы которой ковалентно связаны с функциональными группами полимера.

Видно, что тест-системы (табл.5), содержащие на поверхности полимерных микросфер ковалентно иммобилизованную желатину, сохраняли устойчивость в течение 6 месяцев и имели более высокие титры РЛА (1:128 - 1:512) (что говорит о высокой чувствительности тест-систем) в сравнении с тест-системами (табл.4), представляющими собой полимерные микросферы с физически адсорбированной желатиной на поверхности полимерных микросфер, которые сохранили устойчивость 3 месяца (титр фибронектина был в пределах 1:2 - 1:128).

Таким образом, для получения тест-систем на фибронектин оказались пригодны полимерные микросферы:

- с диаметром $\geq 1 \mu\text{м}$;
- ПМ, на поверхности которых содержатся функциональные группы для ковалентного связывания с аминоклупами желатины;
- ПМ, в межфазном адсорбционном слое которых содержатся желатина и альбумин в определенных массовых соотношениях.

Второй путь создания таких тест-систем состоял в использовании аффинного взаимодействия между биополимерами, один из которых был иммобилизован на поверхность полимерных микросфер, за счет ковалентного взаимодействия функциональных групп, для получения спейсера, необходимого для придания определенной конформации биополимеру, например, иммуноглобулину G, при создании антигенных тест-систем на различные вирусные и инфекционные заболевания.

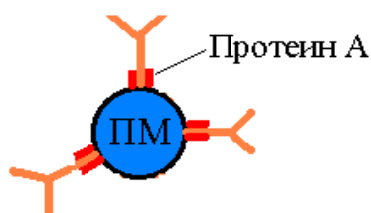
Было высказано предложение о том, что иммобилизацию биополимера (антигена) на поверхность полимерных микросфер целесообразно проводить через спейсерную ножку образованную за счет аффинного взаимодействия между протеином А и Fc-фрагментом иммуноглобулина G (IgG) (рис.4).

Таблица 5. Влияние концентрации ковалентно связанной желатины и физически адсорбированного альбумина, на устойчивость частиц. чувствительность рла с использованием полученных тест-систем.

Концентрация желатины, при ковалентном связывании с частицами %масс.	Агрегативная устойчивость частиц		Чувствительность РЛА		Полимерная суспензия, несодержащая фибронектин (контроль)
	в ФБР (рН=7,2).	Концентрация добавленного альбумина, %	частицы, неотмытые твином 80	частицы, отмытые твином 80	
1.Сополимерная суспензия, полученная затравочной полимеризацией: Ст, ССН и МАК(0.6м.ч.)					
0,017	+	(-)0,09	1: 512	титр не изменился	Не агглютинирует (-)
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.Сополимерная суспензия, полученная затравочной полимеризацией : Ст, ССН и Акролеина(0.6м.ч.)					
0,017	+	(-)0,023	1: 256	титр не изменился	Не агглютинирует (-)
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		
3.Сополимерная суспензия, полученная затравочной полимеризацией: Ст, ССН и ГМА(0.6м.ч.)					
0,017	+	(-)0,023	1: 128	титр не изменился	Не агглютинирует (-)
0,035	+	(-)0,023	1: 256		
0,07	+	(-)0,023	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	+	(-)0,005	1: 128		
4.Сополимерная суспензия, полученная затравочной полимеризацией: Ст, ССН в присутствии ПДС.					
0,017	+	(-)0,58*10 ⁻²	1: 512	титр не изменился	Не агглютинирует (-)
0,035	+	(-)0,58*10 ⁻²	1: 512		
0,07	+	(-)1,8*10 ⁻⁴	1: 256		
0,15	+	(-)0,11*10 ⁻⁴	1: 256		
0,31	+	(-)0,03*10 ⁻⁴	1: 256		
0,62	-	-	1: 128		
1,25	-	-	1: 128		
2,5	-	-	1: 128		

+ агрегативно неустойчивы

- агрегативно устойчивы



Конъюгат "ПМ-Протеин А-IgG"

Рис.4. Схема конъюгата "ПМ-протеин А-IgG"

Осуществить это оказалось возможным, поскольку молекула иммуноглобулина G является бифункциональной, имеет глобулярную белковую структуру, состоящую из двух идентичных Fab-фрагментов в которых сосредоточены активные центры связывания с эпитопами антигена и константный Fc-фрагмент (рис.5).

Изначально к функциональным группам полимерных микросфер ковалентно присоединяли аминокислоты протеина А. Затем молекулу иммуноглобулина G иммобилизовывали на поверхность полимерных микросфер Fc-фрагментом, который аффинно взаимодействует с протеином А.

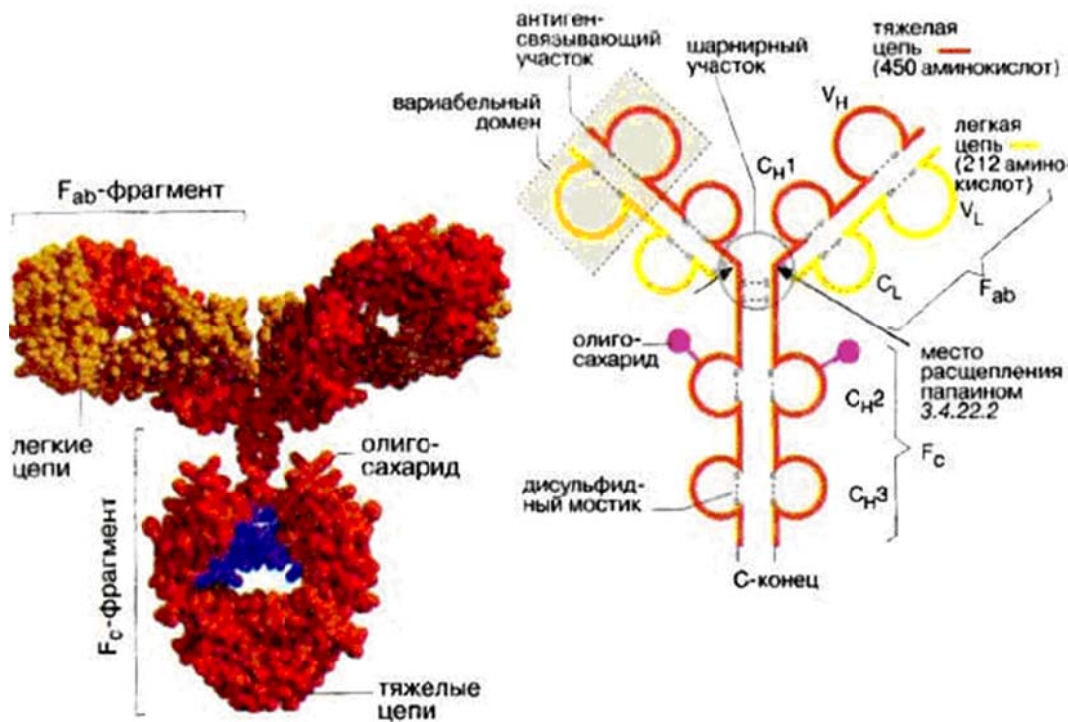
Fab-фрагмент, несущий активные центры, в этом случае оказывается ориентированным "наружу", и

взаимодействие его с детектируемым антигеном значительно возрастет.

Таким образом, была предложена гибкая технология получения антительных тест-систем для определения различных вирусных и инфекционных заболеваний, обусловленная тем, что к конъюгату «Полимерная микросфера – протеин А» можно иммобилизовать антитела любой заданной специфичности.

Следует отметить, преимущества и недостатки создания такого вида антительных тест-систем.

К достоинствам относится повышение стабильности полимерных тест-систем, обусловленной лиофилизацией поверхности полимерных микросфер и уменьшением константы Гаммакера, которая является мерой межмолекулярных и межчастичных взаимодействий. Лيوфилизация поверхности наряду с реологическими параметрами межфазных слоев биополимера является условием проявления структурно-механического фактора устойчивости по Ребиндеру [53,54]. В случае же ориентации молекулы IgG Fc-фрагментом в водную фазу гидрофобным участком, стабильность системы уменьшается



Доменная структура иммуноглобулина G

Рис.5. Структура молекулы иммуноглобулина G

К преимуществам данного способа относятся и то, что не требуется предварительного выделения и очистки антител содержащихся в γ -глобулиновой фракции, а также устойчивость конъюгата «Полимерная микросфера – протеин А», которая позволяет использовать его более 6 месяцев.

К недостаткам создания таких тест-систем можно отнести следующее: антитела, взятые для иммобилизации через спейсор – протеин А должны содержать Fc-фрагмент. В этом отношении оказываются не пригодны анатоксические сыворотки, очищенные методом "диаферм", поскольку Fc-фрагмент иммуноглобулина в них удаляется; видовая принадлежность

иммуноглобулинов также ограничивает возможность взаимодействия со спейсором; в том случае, когда производится указанным способом иммобилизация антител из нативных сывороток, необходимо учитывать их титр. Низкотитражные сыворотки оказываются для этого не пригодны.

Используя полимерные микросферы, иммобилизованные протеином А были получены антительные тест-системы разной специфичности:

- Ирсиниозная к *Y. enterocolitica* серотипа O3;
- Сальмонеллезная к *S. pullorum*;
- Липтоспирозная к *L. conicola*;

К вирусу инфекционного бронхита кур (ИБК) штамма H120.

Таблица 6. Активность антительных тест-систем

Биотест-системы на основе:	Концентрация антигена выявляемого антительной биотест-системой		
Сыворотки кишечно-ирсиниозной (разведение сыворотки 1:80)	<i>Yersinia enterocolitica</i> 0,061мкг/мл		
Частицы без протеина А	-		
Сыворотки пулорозной (разведение сыворотки 1:40)	S.pul 300кД* 1,09мкг/мл	S.pul 100-300кД* 1,95мкг/мл	S.pul 30-100кД* 0,02мкг/мл
Частицы без протеина А	-	-	-
Сыворотки лептоспирозной (разведение сыворотки 1:640)	<i>L. canicola</i> 4296ккл/мл		
Частицы без протеина А	-		
Сыворотки против вируса ИБК (разведение сыворотки 1:64)	Вирус ИБК штамм H120 10 ⁵ ЭИД/мл**		
Частицы без протеина А	-		

*-фракция О-антигена.

** - ЭИД/мл – Эмбриональная инфекционная доза

В табл. 6 приведены данные по активности антительных тест-систем при определении минимальных концентраций антигенов и живых микроорганизмов. Полученные посредством спейсорного присоединения антительные тест-системы оказались высоко чувствительны.

Таким образом, проведенные исследования, с одной стороны, открыли

пути создания эффективных тест-систем, в основе работы которых лежит РЛА, а с другой – показали необходимость проведения дальнейших фундаментальных исследований по регулированию свойств межфазной поверхности полимерных микросфер, обеспечивающих оптимальную иммобилизацию биолигандов, и, соответственно высокую чувствительность РЛА.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bangs L.B. Immunological applications of microspheres // The Latex Course.-1996.- N4.-p.1-29.
2. Lyerly D.M., Hahn P. An assay for elevated levels of fecal leukocytes // American Clin. Lab.-1994.-v.5.-p.18-20.
3. Enhanced agglutination method and kit. US Pat 4,636,479 MKN G 01 N33/546 /Martin F.J., Kung T.V. –заявл. 20.04.1983, опубл. 13.01.1987.
4. Кнорре Д.Г. ДНК- и РНК- зонды как альтернатива и дополнение иммунохимического анализа // ЖВХО им. Менделеева.- Москва.- 1989.- с.52-56.
5. Alhakim A.H., Hull R. Studies towards the development of chemically synthesised non-radioactive biotinylated nucleic acid hybridisation probes // Nucleic Acid Res.-1986.- v.14.- p.9965-9976.
6. Елинов Н.П. Химическая микробиология. М.: Высшая школа.-1984.-с.294.
7. Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers// Ed. by Lovell P.A., El-Aasser M.S.- John Wiley & Sons-1997 - p.826.
8. Polymeric Dispersions : Principles and Applications (NATO Asi Series. Series E, Applied Sciences, Vol 335.)// Ed.by Asua J.M.-N.-Y.: Kluwer Academic Pub.-1997- p. 349.
9. Ugelstad J., Mfutakamba H.R., Mork P.C., Ellingsen T., Berge R., Holm L., Schinid R., Jorgedal A., Hansen F.K., Nustad K. Preparation and characterization of monodisperse polymer particles // J.Polym.Sci., Polym.Symp.-1985.-v.72.-p.225-240.
10. Ober S.K., Lok K.P., Hair M.L. Monodispersed, micron-sized polystyrene particles by dispersion polymerization // J.of Polym.Sci., Polym.Letters Ed.-1985.-v.23.-p.103-108.
11. Brouwer W.M. The preparation of small polystyrene particles // J.of Appl.Polym.Sci.-1989.-v.38.-p.1335-1346.
12. Прокопов Н.И. Синтез полимерных суспензий с узким распределением частиц по размерам методом гетерофазной полимеризации: Дисс... докт. хим. наук. –М., 1999.
13. Bang L.B. Uniform Latex Particles.- Indianapolis: Seradin Inc.- 1984.-p.68.
14. Okubo M., Shiozaki M., Tsujihiro M., Tsukuda Y. Preparation of micron-size monodisperse polymer particles by seeded polymerization utilizing the dynamic monomer swelling method // Coll.Polym.Sci.-1991.-v.269.-p.222-226.
15. Грицкова И.А., Крашенинникова И.Г., Аль-Хаварин Д.И., Нусс П.В., Дорохова Е.А. Гжива Никсиньска И. Устойчивые полистирол-метакриловые суспензии с узким распределением частиц по размерам// Коллоидн. ж. -1995, -т.57. -N2. -с.182-185.
16. Способ получения полимерных суспензий с узким РЧР в присутствии ди-п-толил-карб-алоксифенилкарбинола: Пат. 163091, Республика Польша/Грицкова И.А., Гжива Э.-1994.
17. Грицкова И.А., Чирикова О.В., Щеголихина О.И., Жданов А.А.. Необычный эффект стабилизации полимерных суспензий в присутствии карбоксилсодержащих поливинилсилоксанов // Докл.РАН-1994-т.334 –N1-с.57-61.
18. Чирикова О.В. Синтез полимерных суспензий в присутствии карбоксилсодержащих поливинилсилоксанов: Дисс. ... канд. хим. наук. МИТХТ, Москва, 1994.
19. Гжива-Никсиньска И. Авто. реф. дисс. на соискание уч. степ. к.х.н. – Варшава, 1996.
20. Суспензионная полимеризация винилхлорида. Стабилизаторы полимеризующейся эмульсии. Сб. обзорной информации.- М.: НИИТЭХИМ, 1975.-с.63.
21. Милицкова Е.А. К вопросу стабилизации размеров гранул суспензионных полимеров // Пластические массы.-1961.-N.8.-с.6-8.
22. Егоров В.В. Радикальная полимеризация поверхностно-активных мономеров. Авто. реф. дисс. в форме научного доклада на соискание уч. степ. д.х.н. – Москва, 1992.
23. Киселев Е.М. Полимерные материалы на основе гидропероксидного мономера 2-гидроперокси 2-метилгексен-5-ин-3 : Дисс... докт. хим. наук. –Львов., 1998.
24. Ahmed S.F., Poehlein G.W. Kinetics of Dispersion Polymerization of Styrene in Ethanol .1. Model Development// INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH. –1997. –v.36. -Iss 7. –p.2597-2604.

25. Ahmed S.F., Poehlein G.W. Kinetics of Dispersion Polymerization of Styrene in Ethanol .2. Model Validation// INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH. -1997, -v.36. -Iss 7. -p.2605-2615.
26. Кирш Ю.Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды//М.:Наука – 1998-252 с.
27. Okubo M., Shiozaki M. Production of Micron-Size Monodisperse Polymer Particles by Seeded Polymerization Utilizing Dynamic Swelling Method with Cooling Process// Polym. Int. -1993, -v.30. -Iss 4. -p.469-474.
28. Takahashi K.,Nagai K.Preparation of Reactive Polymeric Microspheres by Seeded Copolymerization Using a Polymerizable Surfactant Bearing an Active Ester Group//POLYMER-1996-Vol.37-Iss. 7-p.1257-1266
29. Елисеева В.И., Шапиро Ю.Е., Титова Н.В., Буданов Н.А. О свойствах и микроструктуре композиционных латексных полимеров. // Высокомолекул. соед., - 1989.-т.31А.-N.2.-с.263-268.
30. Schlund B., Pith T.,Lambla M. Syntheses et caractéristiques structurales de latex reactifs // Macromol.Chem.Suppl.- 1985.-N 10/11.-p.419-433.
31. Method of protein coupling with latex beads: Brit. Pat. 2 004892, МКИ С 08 L 89/00, С 08 F 2/44 / Fisher E.A.-за явл.25.03.1978,опубл.12.11.1978.
32. Лукин Ю.В.,Грицкова И.А.,Праведников А.Н.,Бахарев В.И. Полиак ролеиновые латексы: синтез, введение наполнителей и механизм формирования // ДАН СССР.-1985.-т.285.-N 1.-с.159-161.
33. Дорохова Е.А. Полимерные микросферы для реакции латекс-агглютинации: Дис. ... канд.хим.наук.-М.,1991.- с.108.
34. Bastosgonzalez D.,Hidalgoalvarez R.,Delasnives F.J. Electrokinetic Behavior of Polystyrene Latexes with Different Surface Groups - Effect of Heat-Treatment //J.OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE-1996-Vol.177-Iss.2-p.372-379.
35. Tenoso H.J.,Smith D.B.Covalent bounding of antibodies to polystyrene latex beads: concept//NASA Tech. Brief.-Washington,1972- p.28.
36. Shirahama H.,Suzava T. Adsorption of bovine serum albumin onto styrene-2-hydroxyethyl methacrylate copolymer latex // J.Coll.and Interface.Sci.-1985.-v.104.-N 2.-p.416-421.
37. Черкасов В.Р. Полимерные суспензии, модифицированные серусодержащими аминокислотами,для иммунохимических исследований. Дис. ... канд.хим.наук.М., 1992. – с.138.
38. Станишевский Я.М., Грицкова И.А., Кравцов Е.Г., Быков В.А., Прокопов Н.И. Полимерные суспензии для проведения реакций фагоцитоза // Биомедицинские технологии. - Москва-2000.-Вып.13.-с.43-51.
39. Станишевский Я.М. Свойства частиц полимерной суспензии, используемой в качестве носителя биополимеров, при получении тест-системы // Тезисы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов-2001” -Москва-2001.-с.190.
40. Станишевский Я.М., Грицкова И.А., Измайлова В.Н., Быков В.А., Кравцов Е.Г., Прокопов Н.И., Харлов А.Е., Лобанов А.Н. Полимерные суспензии для диагностической тест-системы на фибронектин // БИОТЕХНОЛОГИЯ теоретический и научно-практический журнал.-Москва-2001.-Вып.3.-с.71-84.
41. Ya.M. Stanishevskii, I.A. Grizkova, V.N. Izmailova, V.A. Bykov, E.G. Kravtsov, N.I. Prokopov, A.E. Kharlov, A.N. Lobanov. Polymeric Suspensions for the Fibronectin Diagnostic Test System // Russian Journal of Biotechnology. Moscow-2001.- Vol.1,V.3.-pp.169-177.
42. Станишевский Я.М., Грицкова И.А., Быков В.А., Кравцов Е.Г., Прокопов Н.И., Измайлова В.Н., Лобанов А.Н. Влияние способа присоединения биополимера на устойчивость иммунохимических тест-систем, основу которых составляют полимерные микросферы // Биомедицинские технологии. -Москва-2001.-Вып.16.-с.-107-113.

43. Izmailova V.N., Grizkova I.A., Yampolskaya G.P., Kgarlov A.E., Shvedov E.S., Grigorievskaya I.I, Stanishevskiy Ya.M., Grigorieva A.V., Turygin D.S. Periodic colloidal structures in thin films of latexes, modified by proteins. // XII INTERNETIONAL CONFERENCE SURFACE FORCES. Zvenigorod, Russia. June29-July5. 2002. p.101.
44. Gritskova I.A., Prokopov N.I., Lobanov A.N., Stanishevskiy Ya.M., and Ozhekhovski A. Synthesis of Polymer Suspensions for Immunoassay // Polymer Science (Russia), Ser. A, Vol.44, №11, 2002, pp. 1107-1111.
45. Станишевский Я.М., Грицкова И.А., Прокопов Н.И., Кравцов Э.Г., Волина Е.Г., Лобанов А.Н, Григорьевская И.И. Получение антительных диагностических тест-систем заданной специфичности // БИОТЕХНОЛОГИЯ теоретический и научно-практический журнал.-Москва-2003.-Вып.2.-с.81-85.
46. Станишевский Я.М., Марков А.Г., Мягкова М.А., Быков В.А., Прокопов Н.И., Грицкова И.А. Частицы полимерных суспензий в качестве носителей биологандов на примере лецитина // Материалы II Всероссийской конференции “Физико-химические процессы в конденсированном состоянии и на межфазных границах” «ФАГРАН-2004» Воронеж 2004, Том. 2., с. 649-650.
47. Станишевский Я.М., Грицкова И.А., Прокопов Н.И., Кузьмина Н.С., Кириллова Г.А., Кузнецова Г.И. Полимерные микросферы – носители биологанда в реакции латекс-агглютинации для определения аутоантител к тиреоглобулину // Журнал Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. -Москва-2004.-Вып.8-9.с.61-65.
48. Грицкова И.А., Марков А.Г., Станишевский Я.М., Быков В.А., Прокопов Н.И., Хачатурян И.В., Мягкова М.А., Каплун А.П., Скопинцев В.Б. Исследование свойств полимерных микросфер различной природы, используемых при создании тест-систем для определения С-реактивного белка // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. - Москва-2005.-Вып.1-2.с.69-75.
49. Станишевский Я.М., Прокопов Н.И., Грицкова И.А., Храмович В.Е., Кузьмина Н.С., Кириллова Г.А., Кузнецова Г.И. Перспективы синтеза полимерных микросфер и создание на их основе скрининговых тестов для детекции антител к аутоантигенам щитовидной железы. Сообщение 1. Синтез полимерных носителей. //БИОТЕХНОЛОГИЯ теоретический и научно-практический журнал.-Москва-2005.-Вып.4.-с.78-83.
50. Кириллова Г.А., Кузьмина Н.С., Кузнецова Г.И., Станишевский Я.М., Прокопов Н.И., Грицкова И.А., Храмовичев В.Е. Перспективы синтеза полимерных микросфер и создание на их основе скрининговых тестов для детекции антител к аутоантигенам щитовидной железы. Сообщение 2. Создание латексного экспресс-теста для определения аутоантител к тиреоглобулину // БИОТЕХНОЛОГИЯ теоретический и научно-практический журнал.-Москва-2005.-Вып.5.-с.90-95.
51. Кузьмина Н.С., Кириллова Г.А., Гаврилова Н.Ф., Свиридов В.В., Кузнецова Г.И., Яковлева И.В., Буркин М.А., Лукин Ю.В., Генералова А.Н., Станишевский Я.М., Грицкова И.А., Прокопов Н.И. Определение антител к тиреоглобулину и пероксидазе щитовидной железы в сыворотке крови человека в реакции латекс-агглютинации //Аллергия, астма и клиническая иммунология (ВИНИТИ РАН). -Москва 2005, №8, -с. 19-24.
52. Королук А.М., Сбойчаков В.Б. Медицинская микробиология.-Учебное пособие. Санкт-Петербург 1999г.
53. Ребиндер П.А. Поверхностные явления в дисперсных системах. Коллоидная химия. // Избр. тр. М.: Наука, 1978. Т.1.
54. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Туловская З.Д. // Коллоид. журн.1998. № 5. Т.60. с.598.