

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 615.46/47

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КОНЪЮГАТОВ «ПОЛИМЕРНАЯ МИКРОСФЕРА – БИОЛИГАНД» ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ПРОТЕИНОПАТИЙ

С.А. Кедик, заведующий кафедрой, ***И.А. Грицкова**, профессор,
***Н.И. Прокопов**, заведующий кафедрой, **Я.М. Станишевский**, доцент,
А.В. Панов, старший преподаватель, **В.В. Суслов**, старший научный сотрудник,
Е.А. Петрова, ведущий инженер

кафедра Биомедицинских и фармацевтических технологий

*кафедра Химии и технологии высокомолекулярных соединений

МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

e-mail: elizaweta@mail.ru

Рассмотрены основные подходы к созданию высокочувствительных тест-систем на основе полимерных микросфер с иммобилизованными биолигандами, предназначенных для экспресс-диагностики протеинопатий. Действие этих тест-систем основано на реакции латексной агглютинации между антигенами, химически привитыми к поверхности полимерной микросферы, и антителами к ним, содержащимися в биологическом образце. Проанализированы вопросы, связанные с получением и оптимальными свойствами полимерных микросфер, которые должны содержать на своей поверхности реакционноспособные по отношению к биолиганду функциональные группы. Рассмотрены проблемы, связанные с иммобилизацией биолигандов на поверхности этих полимерных микросфер, а также возможностями сохранения их нативной формы за счет использования спейсеров. На примере получения тест-систем для диагностики заболеваний щитовидной железы рассмотрены проблемы, возникающие при их конструировании.

Ключевые слова: тест-системы, экспресс-диагностика, протеинопатия, латексная агглютинация, функционализированные полимерные микросферы, биолиганд, иммобилизация, тиреоглобулин.

В практике клинико-диагностических лабораторий широко используются экспрессные иммунохимические тесты, позволяющие визуально оценить результат реакции. В частности, в инфекционной и неинфекционной диагностике для обнаружения антигенов и антител к ним широко применяются методы латексной агглютинации [1–3].

Принцип работы этих 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» [4]. Реакция образования такого комплекса является

высоко специфичной, т.е. в ответ 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.

Относительная дешевизна метода реакции латексной агглютинации (РЛА), простота и возможность постановки теста практически в любых условиях делают его очень удобным как при одиночных, так и при массовых исследованиях даже в небольших клинических мало оборудованных лабораториях. Схема протекания РЛА представлена на рисунке.

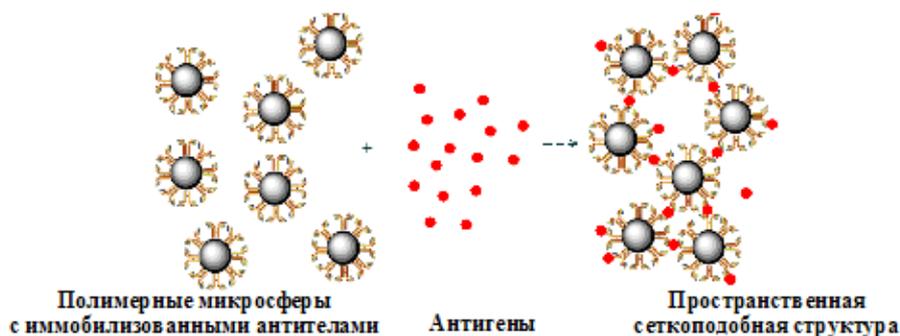


Схема протекания реакции латексной агглютинации.

Исторически первыми тесты агглютинационной экспресс-диагностики были разработаны для определения ревматоидного фактора (RF) [5].

Агглютинация сенсibilизированных эритроцитов барана сывороткой определенных пациентов, больных ревматоидным артритом, была впервые описана Мейером и позднее Ваалером в 1940 г. В 1948 г. Розе, Раган, Пирс и Липман разработали диагностический тест для ревматоидного артрита, основанный на этой реакции. Хеллер и соавторы модифицировали этот тест, используя суспензию таннизированных эритроцитов барана, смешанных с пулированной плазмой человека [5].

Агглютинация в этих тестах является в действительности реакцией преципитации, которая протекает на поверхности больших частиц – эритроцитов. Эти частицы обладают комплексной органической структурой, что вызывает затруднения при проведении процедуры и неточную интерпретацию результатов реакции. Эритроциты барана имеют много антигенов, которые реагируют с компонентами сывороток человека и животных, что обуславливает неспецифические реакции. Было обнаружено, что свежие клетки одних и тех же животных не дают постоянный титр в повторных тестах с одинаковыми образцами сыворотки. Консервированные красные клетки крови барана после длительного выдерживания часто не сохраняют прежнюю степень агглютинации. Смешанные суспензии клеток иногда дают в реакции агглютинации конечные точки, которые не воспроизводятся. Кроме того, при смешении эритроцитов барана с антибараньим рецептором или гамма-глобулином, вводится ряд неизвестных факторов, что делает конечную реакцию более сложной и трудной для интерпретации. Белковые компоненты сыворотки многих животных с трудом абсорбируются нормальными эритроцитами.

Для преодоления этих трудностей была предпринята попытка обработки эритроцитов танниновой кислотой. При этом, однако, комплексность органической и антигенной структуры эритроцитов сохранялась. Подобные затруднения характерны для эритроцитов и человека, и животных.

Все вышеуказанное требовало проведения большого количества параллельных контрольных исследований, что затрудняло внедрение этих тестов в широкую практику. Основным препятствием являлась биологическая нестабильная и неоднородная природа эритроцитарного носителя. Поэтому в 1957 году М. Сингер и М. Плотц предложили использовать вместо эритроцитов другие носители биоллигандов [5].

Их разделили на две большие группы: одна из них представляет собой биологические объекты – бактерии, липосомы, эритроциты,

крахмальные шарики и др., а другая неббиологические – активированный уголь, коллоидное золото, полимерные микросферы, стеклянные шарики. Каждая из этих групп характеризуется специфическими свойствами, определяющими область их применения. Недостатки биологических носителей заключаются в том, что они биodeградируемы и трудно поддаются контролю.

Поэтому в настоящее время развиваются исследования, направленные на замену биологических носителей лигандов, которые используются в реакции агглютинации, синтетическими носителями. Они более стабильны по свойствам по сравнению с носителями биологического происхождения и могут быть охарактеризованы по химическому строению, заряду, размеру частиц и распределению частиц по размерам (РЧР), что позволяет целенаправленно проводить выбор условий иммобилизации на их поверхности антигенов и антител.

Среди синтетических носителей особенно перспективны полимерные микросферы (ПМ), которые могут быть синтезированы с широким интервалом диаметров и узким распределением по размерам [6, 7]. Однородность частиц по размерам 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 латексной агглютинации.

Преимущества полимерных микросфер перед другими видами носителей биоллигандов состоят в следующем:

- возможности варьировать поверхностные свойства и размер микросфер в широком диапазоне значений с сохранением узкого распределения частиц по размерам;
- возможности вводить функциональные группы, необходимые для связывания с лигандами на стадии синтеза;
- устойчивости при хранении и в процессе иммобилизации биоллигандов.

К полимерным частицам предъявляют следующие основные требования:

- диаметр микросфер 1–5 мкм;
- узкое распределение частиц по размерам;
- наличие поверхности, способной необратимо физически сорбировать биоллиганды или содержать функциональные группы в поверхностном слое частиц, способные ковалентно связываться с биоллигандом;
- агрегативная устойчивость в растворах электролита, в процессах иммобилизации биоллигандов, при хранении;
- окраска полимерных микросфер.

Кратко рассмотрим методы синтеза таких полимерных суспензий.

Их получают гетерофазной полимеризацией и сополимеризацией гидрофобных и гидрофильных мономеров в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ) и гидрофобных мономеров в отсутствие эмульгатора. Методом безэмульгаторной полимеризации получают полимерные микросферы с диаметром частиц до 1 мкм с относительно узким РЧР. Хотя эти частицы и используют в качестве носителей биологандов в иммунохимических исследованиях, но их недостатком является невысокая устойчивость в буферных растворах, в которых получают конъюгат микросфера–биологанд, и при хранении.

Показано, что повысить устойчивость таких частиц удается добавлением нерастворимых в воде ПАВ, таких как ди-*пара*-толил-карбалк-оксифенилкарбинол [8], кремнийорганических ПАВ, жиров растительного и природного происхождения [9–11] и т.д. В этом случае они становятся перспективными для использования в качестве носителей биологандов.

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. Эффективность защитного действия стабилизатора невысока из-за их низкой концентрации, и образование частиц протекает по коагуляционному механизму. Размер полученных при этом полимерных дисперсий близок к 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 – природа инициатора и стабилизатора, температура процесса, вязкость системы, рН среды, массовое соотношение мономерной и водной фаз, а также скорость перемешивания, тип перемешивающего устройства и форма реакционного сосуда, – поэтому этот способ полимеризации практически не применяется.

Широко применяют для синтеза полимерных микросфер дисперсионную и затравочную полимеризации.

Методом дисперсионной полимеризации в органической среде получают полимерные

частицы с размером от 1 до 15 мкм. 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 1–6 мкм и разной концентрацией функциональных групп на поверхности [12, 13].

Метод затравочной полимеризации удобен тем, что позволяет получать полимерные частицы разного диаметра с необходимыми функциональными группами на их поверхности.

Основной задачей при затравочной полимеризации мономеров является поддержание постоянного числа набухших мономером частиц и проведение в них полимеризации до полной конверсии мономера, исключая образование в водной фазе частиц другого размера. 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-, амино-, альдегидные группы) на частицы 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 [14].

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.

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 [15] и радикальная эмульсионная полимеризация с использованием γ -излучения либо иницирующей окислительно-восстановительной системы [16]. Этими способами были получены полиакролеиновые микросферы с диаметрами 0.01–0.2 мкм и коэффициентом вариации менее 10% (методом анионной полимеризации) и диамет-

рами от 0.01-0.02 до 5.0 мкм (методом радикальной полимеризации). О плохой воспроизводимости процессов осадительной полимеризации акролеина сообщается в работах [17, 18]. 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. Более высокую стабильность имели полистиролакролеиновые суспензии, полученные в присутствии персульфата калия.

Для биомедицинских целей используют полимерные дисперсии, обладающие суперпарамагнитными свойствами [19–21] и содержащие оксид цинка в поверхностном слое частиц, характеризующиеся относительно узким РЧР. Их используют для культивирования клеток тканей животных и человека, в процессах магнитной сепарации, в качестве носителей для приготовления диагностических средств, применяемых в реакциях псевдогомогенного иммуноанализа.

Основной проблемой получения таких полимерных частиц является создание устойчивой дисперсии металла или его оксида и эмульсии мономера с заданным размером капель и сравнительно узким РЧР. Вторым важным моментом является сохранение стабильности реакционной системы в процессе полимеризации. Их получают методом затравочной и суспензионной полимеризации в присутствии ПАВ различной природы.

В последние годы появились работы, в которых описан синтез полимерных микросфер, содержащих нанокристаллы, которые являются перспективными для многоцветного мечения и одновременной идентификации различных биологических объектов.

Следует отметить, что синтез (co)полимеров с поверхностными функциональными группами представляет собой достаточно сложную научно-практическую задачу. Альтернативным методом получения таких микрочастиц является их формирование из растворов промышленно выпускаемых (co)полимеров, например, с применением современных микрореакторных технологий [22–24]. Такой подход перспективен для промышленного получения полимерных микрочастиц стабильного состава с узким распределением частиц по размерам. Кроме того, это позволяет избежать стадии перегонки огнеопасных и токсичных мономеров с целью удаления ингибиторов полимеризации и других примесей.

Иммобилизацию библигандов на поверхность полимерных микросфер проводят либо

путем их физической адсорбции, либо ковалентным связыванием функциональных групп библиганда и полимера, расположенных на поверхности частиц.

Анализ литературных данных [25–35] по исследованию иммобилизации библигандов на поверхность полимерных микросфер путем физической адсорбции позволил сделать следующие выводы:

- молекулы белка характеризуются высокой адсорбционной способностью к поверхности гидрофобных полимерных микросфер;
- полимерные микросферы, поверхность которых содержит функциональные группы, характеризуется незначительным сродством к белкам;
- на адсорбцию белка существенно влияет поверхностный заряд полимерных микросфер;
- сродство между молекулами белка и поверхностью полимерных частиц существенно зависит от рН среды;
- величина предельной адсорбции белка зависит от количества гидрофильных звеньев в полимерной молекуле и выше на частицах суспензии, полученных при меньшей концентрации ионогенного сомономера.

Проиллюстрируем вышесказанное несколькими примерами. Так, при создании диагностических тест-систем на RF и тиреоглобулин (Tg) в работах [6, 36] была изучена адсорбция альбумина и иммуноглобулина G (IgG) на полистирольные и полистиролметакриловые микросферы, используемые в качестве носителей.

Влияние условий иммобилизации белка на полистирольных микросферах на чувствительность получаемого латекс-теста оценивали методом реакции латексной агглютинации. Было показано, что максимальная чувствительность РЛА соответствует величинам адсорбции, значительно более низким, чем стационарное значение. Так, например, максимальную чувствительность для рН среды 5.8, 6.8 и 7.7 наблюдали при величинах адсорбции, составляющих 0.3–0.5 от Гмакс. Увеличение рН среды, т.е. смещение рН среды в щелочную область, приводит к снижению чувствительности РЛА, что связано с возрастанием заряда молекулы белка.

Выбор рН среды для проведения адсорбции белка и постановке РЛА также определяется максимальной чувствительностью латекс-тестов, которая достигается при рН среды 5.8. В этом случае молекулы белка имеют небольшой отрицательный заряд, который достаточен для стабилизации частиц и не препятствует проведению РЛА. Таким образом, максимальная чувствительность латекс-теста на альбумин была получена при концентрациях белка в растворе менее 1 мг/мл, рН среды 5.8 и ионной силе 0.1 М.

Технология получения диагностических препаратов с использованием полимерных микросфер с физически адсорбированными на их поверхность белками «легко» осуществима. Однако, ряд серьезных недостатков, среди которых следует выделить возможную десорбцию белка с поверхности полимерных частиц при изменении состава или pH реакционной системы в процессе получения диагностикума и ограниченную подвижность молекул белка в пространстве, требуют существенного ее совершенствования. Это обусловлено и тем, что нежелательные характеристики тест-систем обуславливают их невысокую диагностическую эффективность и недостаточное время хранения.

Поэтому в последние годы в иммунодиагностике, использующей РЛА, все более широкое применение находят полимерные носители с ковалентно иммобилизованными белками на их поверхности. Для получения высокочувствительного диагностикума эти методы активации должны удовлетворять следующим требованиям:

- проходить необратимо и количественно при возможно более мягких условиях;
- не уменьшать стабильность суспензий, не оказывать заметного влияния на их диаметр и РЧР;
- сохранять биохимическую активность молекул биолиганда, ковалентно связанного с функциональными группами полимера, расположенными на поверхности частиц суспензии.

Обзор литературных данных показал, что в области конструирования диагностических тест-систем с использованием полимерных микросфер в качестве носителей биолигандов существуют недостаточно изученные вопросы, касающиеся, прежде всего: выбора полимерных микросфер с оптимальными физико-химическими параметрами, пригодными для использования в качестве носителей биолигандов, выбора биолигандов и их целенаправленной иммобилизации на поверхность полимерных микросфер, обеспечивающих высокую активность и специфичность выявления детектируемого компонента в иммунохимических реакциях, выбора условий и параметров конструирования тест-системы с использованием полимерных микросфер и биолигандов и ряд других проблем.

Рассмотрим проблемы, возникшие при конструировании диагностической тест-системы, на примере тиреоглобулина, TgG.

TgG-тест предназначен для определения антител к TgG в сыворотке крови пациентов, что представляет важный иммунологический критерий при диагностике заболеваний щитовидной железы.

Для выбора полимерных микросфер был проведен сопоставительный анализ физико-химических параметров синтезированных полимерных суспензий различными методами полимеризации.

Методом безэмульгаторной полимеризации были получены сополимерные микросферы стирола (СТ) и стирол сульфоната натрия (ССН); методом затравочной полимеризации на затравочных полистирольных микросферах были получены сополимерные микросферы СТ, ССН и метакриловой кислоты (МАК), или глицидилметакрилата (ГМА), или акролеина (АК), или в присутствии полидиметилсилоксана (ПДС); и методом дисперсионной полимеризации были получены сополимерные микросферы СТ и МАК, ГМА и МАК, и хлорэтилметакрилата (ХЭМА) и МАК в присутствии поливинилпирролидона (ПВП). В каждом конкретном методе получения полимерных микросфер были экспериментально подобраны условия их синтеза: соотношение мономерной и водной фаз, количество инициатора, время полимеризации, температура и др.

Полимерные микросферы различались природой полимера, ПАВ, функциональными группами, наличием красителя и флуоресцентной метки, диаметром и числом частиц, величиной ξ -потенциала, а также их устойчивостью в растворе электролита. Все полученные полимерные суспензии характеризовались распределением частиц по размерам (коэффициент дисперсности $\sim 0.7-1\%$) и имели средние диаметры в диапазоне 1.15–3.9 мкм.

Создавая TgG-тест, необходимо было заново провести поиск по выбору природы полимерных микросфер и условий ковалентной иммобилизации белка на полимерные микросферы. Это обусловлено тем, что каждый белок имеет свои характеристики (молекулярный вес, изоэлектрическая точка) и, следовательно, условия связывания разных белков с одним и тем же типом полимерных частиц отличаются друг от друга.

Поскольку тетрамерная молекула TgG является производной молекулы IgG, то при выборе условий ковалентного связывания TgG человека с поверхностью частиц полимерной суспензии были учтены результаты ковалентной иммобилизации IgG на поверхность этих частиц.

Концентрацию карбодиимида изменяли в интервале от 0.5 до 5 мг/мл. Оказалось, что наибольшая чувствительность теста по отношению к антителам к TgG достигается при концентрации карбодиимида, равной 1 мг/мл.

Иммобилизацию биолиганда на поверхность полимерных микросфер проводили путем физической адсорбции и ковалентного связывания функциональных групп биолиганда и полимера.

Было показано, что обе тест-системы дают одинаковые положительные результаты. А раз тест-система, полученная с использованием полимерных микросфер (ПМ), на которые Tg был физически адсорбирован, и тест-система с ковалентно связанным тиреоглобулином на

поверхности ПМ дают одни и те же результаты, то возникает вопрос: целесообразно ли с точки зрения сложности процесса приготовления использовать диагностику с ПМ, содержащими на поверхности ковалентно связанный тиреоглобулин. И почему бы не взять для определения заболеваний щитовидной железы тест-систему с ПМ, на которые физически адсорбирован тиреоглобулин, процесс получения которой намного проще.

Данные диагностикумы хранили при 4°C в течение трех месяцев, после чего снова апробировали на тех же сыворотках. Титр тест-системы с ПМ, на которые физически адсорбирован тиреоглобулин, уменьшился в несколько раз, что говорит о ее неустойчивости при хранении. Это может быть обусловлено десорбцией белка с поверхности полимерных частиц при изменении внешних условий или рН реакционной системы.

Таким образом, поскольку технология получения тест-систем с использованием полимерных микросфер с физически адсорбированными на их поверхность белками «легко» осуществима, то целесообразно использовать такие тест-системы в момент их получения. Если же диагностику необходимо проводить через некоторое время, то используют тест-систему с ПМ, содержащими на поверхности ковалентно связанный лиганд.

Латексный диагностикум с ковалентно связанным тиреоглобулином апробировали в РЛА на панели образцов сывороток от практически здоровых людей и больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, и результаты сравнивали с концентрацией антител к Тg, определенной методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Были обнаружены расхождения определения аутоантител к Тg с помощью РЛА и ИФА. Они могут быть обусловлены свойствами носителей, используемых для получения тест-систем, и различиями в эпитопной специфичности Тg, иммобилизованного на их поверхности.

В результате проведенной работы с полимерными частицами диаметром 1.5 мкм с узким РЧР, содержащими на поверхности функциональные группы, была показана принципиальная возможность их использования для получения диагностической тест-системы, работающей по принципу РЛА для определения аутоантител щитовидной железы к Тg в образцах сыворотки крови человека.

Однако с поверхностью полимерных микросфер связывалось 80% Тg от исходного количества последнего. Дальнейшая экспозиция не приводила к увеличению количества связанного

Тg, что обусловлено отсутствием свободных альдегидных групп на поверхности полимерных микросфер.

Прямая иммобилизация функциональных групп Тg и полимерных микросфер не обеспечивала необходимой доступности антигенных детерминант Тg для связывания с активными центрами детектируемых аутоантител разработанными тест-системами. Была изучена возможность целенаправленной иммобилизации Тg на поверхность полимерных микросфер, которая обеспечила доступность антигенных детерминант Тg для связывания с активными центрами детектируемых аутоантител.

С помощью компьютерной программы Sybil-7.0 была сконструирована математическая модель участка Тg, гомологичного ацетилхолинэстеразе (АХЭ), содержащего ряд антигенных детерминант, распознаваемых аутоантителами к Тg, которая позволила выбрать наиболее вероятный способ иммобилизации Тg на поверхность полимерных микросфер, обеспечивающий максимальную доступность антигенных детерминант Тg. Этот способ предполагал ковалентное связывание концевых аминокислотных остатков лизина Lys-2764 и Lys-2768, содержащихся в молекуле Тg, с альдегидными группами полимерных микросфер.

Другие возможные способы иммобилизации Тg на поверхность полимерных микросфер приводят к экранизации антигенных детерминант Тg, тем самым снижая эффективность взаимодействия их с активными центрами аутоантител.

Выход из этой ситуации состоит в использовании при иммобилизации Тg на поверхность полимерных микросфер аминокислотного спейсера, например, глицина, который позволит не только избежать неспецифическую адсорбцию гидрофобных фрагментов Тg, в которых локализованы антигенные детерминанты связывания с активными центрами аутоантител, но и отдалить молекулу Тg от поверхности полимерных микросфер, тем самым сохранив ее нативную форму.

Дальнейшие исследования направлены на выбор способа присоединения Тg к полимерным микросферам через спейсер, позволяющий увеличить специфичность и чувствительность тест-системы.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (ГК № 14.512.11.0019 от 11.03.2013 г., шифр темы «2013-1.2-14-512-0007»).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. – М.: Медицина, 1976. С. 64–67.
2. Naidu A.S., Paulsson M., Wadstrom T. Particle agglutination assays for rapid detection of fibronectin, fibrinogen, and collagen receptors on *Staphylococcus aureus* // J. Clin. Microbiol. 1988. V. 26. № 8. P. 1549–1554.
3. Gasparyan V.K. Preparation and sensitization of polystyrene latex beads by some antigens and anti-bodies. Factors affection sensitivity and specificity of latex agglutination tests // J. Immunoassay Immunochem. 2002. V. 23. № 3. P. 399–404.
4. Мартынов А.И., Санков М.Н., Рябова Н.Л., Зайцева Е.В., Лукин Ю.В., Генералова А.Н., Едвабная Л.С., Голубева Н.Н. Разработка комплекса диагностикумов на латексной основе для экспресс-диагностики инфекций, вызываемых условно-патогенными бактериями // Новости науки и техники. Сер. «Медицина», Аллергия, астма и клиническая иммунология. – М.: 2001. № 1. С. 104–107.
5. Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. С. 294.
6. Грицкова И.А., Нусс П.В., Дорохова Е.А., Гусев С.А., Крашенинникова И.Г., Аль-Хаварин Д.И. Адсорбция белков на полистирольных микросферах и постановка реакции латекс-агглютинации // Коллоидный журн. 1994. Т. 56. № 4. С. 491–495.
7. Prokopov N.I., Gritskova I.A., Cherkasov V.R., Chalykh A.E. Synthesis of monodisperse functional polymeric microspheres for immunodiagnostic research // Successes Chem. J. 1996. V. 65. № 2. P. 178–192.
8. Грицкова И.А., Гжива Э. Способ получения полимерных суспензий с узким РЧР в присутствии ди-*n*-толил-карбалоксифенилкарбинола : пат. 163091, Республика Польша, 1994.
9. 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. № 1. С. 57–61.
10. Чирикова О.В. Синтез полимерных суспензий в присутствии карбоксилсодержащих поливинил-силоксанов : дис. ... канд. хим. наук. – М., 1994.
11. Шалыт С.Я. Условия формирования межфазных адсорбционных слоев олеорастворимых мыл синтетических жирных кислот и пути регулирования их стабилизирующего действия : дис. ... д-ра хим. наук. – М., 1987. 264 с.
12. Dispersion Polymerization in Organic Media / Ed. K.E.J. Barrett. – London: John Wiley&Sons, 1975. 322 p.
13. Polymeric Materials Encyclopedia. Vol. 9 / Eds. A. Guyot, J.C. Salamone. – Boca Raton: CRC Press, 1996. P. 7728–7237.
14. Елисеева В.И., Шапиро Ю.Е., Титова Н.В., Буданов Н.А. О свойствах и микроструктуре композиционных латексных полимеров // Высокомолекул. соед. 1989. Т. 31А. № 2. С. 263–268.
15. Fisher E.A. Method of protein coupling with latex beads : Brit. pat. 2 004892. – заявл. 25.03.1978, опублик. 12.11.1978.
16. Лукин Ю.В., Грицкова И.А., Праведников А.Н., Бахарев В.И. Полиакролеиновые латексы: синтез, введение наполнителей и механизм формирования // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 1. С. 159–161.
17. Bastosgonzalez D., Hidalgoalvarez R., Delasnieves F.J. Electro kinetic behavior of polystyrene latexes with different surface groups – effect of heat-treatment // J. Colloid and Interface Sci. 1996. V. 177. № 2. P. 372–379.
18. Лукин Ю.В., Буряков А.Н., Егоров В.В., Туркин С.И., Зубов В.П., Грицкова И.А., Зайченко А.С., Воронов С.А., Пучин В.А., Праведников А.Н. Способ получения магнитных латексов : А.с. СССР № 1290690, 1986.
19. Подойницин С.Н., Бахарев В.Н., Лукин Ю.В., Туркин С.И., Грицкова И.А., Зубов В.П., Буряков А.Н. Высокоградиентная магнитная сепарация клеток, меченных магнитными латексными частицами. 1. Осаждение меченых клеток // Биотехнология. 1989. Т. 5. С. 371–375.
20. Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solidliquid interface // Advan. Colloid & Interface Sci. 1986. V. 25. № 4. P. 267–340.
21. Гервальд А.Ю., Прокопов Н.И., Ширякина Ю.М. Синтез суперпарамагнитных наночастиц магнетита // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 3. С. 45–49.
22. Li P.C.H. Microfluidic Lab-on-a-Chip for chemical and biological analysis and discovery. – Boca Raton: CRC Press, 2006. 485 p.
23. Berthier J., Silberzan P. Microfluidics for biotechnology. – Boston: Artech House, 2006. 345 p.
24. Microarrays. Preparation, Microfluidics, Detection Methods and Biological Applications / Ed. by K. Dill, R. Liu, P. Grodzinski. – Springer, 2009. 356 p.
25. Камышный А.Л. Адсорбция глобулярных белков на твердых носителях: некоторые физико- химические характеристики // Журн. физ. химии. 1981. Т. 55. Вып. 3. С. 562–580.

26. De Baillcu N., Voegel J.C., Sohmitt A. Adsorption of human albumin and fibrinogen onto heparin-like materials. 1. Adsorption isotherms // *Colloids & Surfaces*. 1985. V. 16. P. 271–288.
27. Van Dulm P., Norde W. The adsorption of human plasma albumin on solid surfaces, with special attention to the kinetic aspects // *J. Colloids & Interface Sci.* 1983. V. 91. № 1. P. 248–255.
28. Ivarsson B.A., Hegg P.O., Lundstrom KJ., Jonsson U. Adsorption of proteins on metal surfaces studied by ellipsometric and capacitance measurements // *Colloids & Surfaces*. 1985. V. 13. P. 169–192.
29. Norde W., Fraaye J.G., Lyklema J. Protein adsorption at solid–liquid interfaces: A colloid-chemical approach // *AGC Symp. Ser.* 1987. № 343. P. 36–47.
30. Norde W., Mac Ritchie F., Nowicka G., Lyklema J. Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects // *J. Colloid & Interface Sci.* 1986. V. 112. № 2. P. 447–456.
31. Norde W., Lyklema J. The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonoclease at negatively charged polystyrene surfaces // *J. Colloid & Interface Sci.* 1978. V.66. № 2. P. 257–302.
32. Lyklema J., Norde W. Biopolymer adsorption with special reference to the serum albumin – polystyrene latex system // *Croat. Chem. Actia.* 1973. V. 45. № 1. P. 67–84.
33. Fair B.D., Jamieson A.M. Studies protein adsorption on polystyrene latex surfaces // *J. Colloid & Interface Sci.* 1980. V. 77. № 2. P. 525–534.
34. Kawaguchi H., Amagasa H., Hagiya T., Kimura N., Ohtsuka Y. Interaction between proteins and latex particles having different surface structures // *Colloids & Surfaces*. 1985. V. 13. P. 295–311.
35. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1983. 368 с.
36. Басырева Л.Ю. Создание диагностических тест-систем на основе полимерных суспензий и факторы, определяющие их чувствительность и специфичность : дис. ... канд. хим. наук. –М., 1994.

HIGH-SENSITIVITY TEST SYSTEMS BASED ON CONJUGATES «POLYMER MICROSPHERES – BIOLIGANDS» FOR RAPID PROTEINOPATHY DIAGNOSTICS

**S.A. Kedik, I.A. Gritskova, N.I. Prokopov, Ya.M. Stanishevsky,
A.V. Panov, V.V. Suslov, E.A. Petrova[@]**

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

[@]*Corresponding author e-mail: elizaweta__@mail.ru*

The main approaches to the creation of highly sensitive test systems based on polymeric microspheres with immobilized bioligands intended for rapid diagnostics of proteinopathy were considered. The effect of these test systems is based on the latex agglutination reaction between the antigens grafted to the surface of polymeric microspheres and antibodies contained in a biological sample. The issues related to obtaining and optimal properties of polymeric microspheres, which must contain functional groups reactive toward bioligands at their surface were analyzed. Problems associated with immobilization of bioligands on the surface of the polymeric microspheres and the possibility to improve the composition and preparation of test systems were considered. Special attention is given to obtaining test systems for the diagnosis of thyroid disease by means one of its antigens – thyroglobulin.

Key words: *test systems, rapid diagnosis, proteinopathy, latex agglutination, functionalized polymeric microspheres, bioligand, immobilization, thyroglobulin.*