

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ РАДІОЕЛЕКТРОНІКИ

МУЗИКА КАТЕРИНА МИКОЛАЇВНА



УДК 66.099.2: 66.021.2.081.3:681.2.08

**НАУКОВІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЇ СТВОРЕННЯ СЕНСОРНИХ
ЕЛЕМЕНТІВ ІЗ СИНТЕТИЧНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ**

Спеціальність 05.27.06 – технологія, обладнання та виробництво
електронної техніки

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора технічних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківському національному університеті радіоелектроніки Міністерства освіти і науки України.

Науковий консультант: доктор фізико-математичних наук, професор кафедри «Біомедична інженерія»,

РОЖИЦЬКИЙ Микола Миколайович,

Харківський національний університет радіоелектроніки
Міністерства освіти і науки України,

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук,
доктор фізико-математичних наук, професор
ЛЕПІХ Ярослав Ілліч,
директор Міжвідомчого наук.-навч. фіз.-техн.
центру МОН і НАН України при ОНУ ім. І.І. Мечникова

доктор технічних наук, професор
ПАВЛОВ Сергій Володимирович,
Вінницький національний технічний університет,
професор кафедри загальної фізики та фотоніки, проректор з наукової роботи

доктор технічних наук, професор
ЧЕРПАК Владислав Володимирович,
Національний університет «Львівська Політехніка»,
професор кафедри електронних приладів

Захист відбудеться «9» березня 2016 р. о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.052.04 при Харківському національному університеті радіоелектроніки за адресою: 61166, м. Харків, пр. Науки, 14.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Харківського національного університету радіоелектроніки за адресою: 61166, м. Харків, пр. Науки, 14.

Автореферат розісланий

5 лютого 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Пашенко О.Г.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Сучасний розвиток електронної техніки, зокрема, біомедичної, поставив до першочергових задач створення високоточних первинних перетворювачів (сенсорних елементів) для систем чутливого і селективного експрес-аналізу рідких середовищ на наявність діагностично важливих речовин, а також тих, що є потенційно небезпечними для людини (вміст яких в організмі, продуктах харчування і воді підлягає суворому контролю). Слід зазначити, що багато речовин не мають властивостей, які дозволяють визначати їх безпосередньо за допомогою існуючих фізико-хімічних методів. У цьому випадку потрібні пристрої з *елементами розпізнавання (сенсорними елементами)*, які базуються, зокрема, на принципах *ліганд-рецепторної* (ключ-замок) взаємодії. До таких пристроїв належать *біосенсиори*. Їх рецепторний шар має біологічну природу (тканини, мікроорганізми, органели, клітинні рецептори, ферменти, антитіла, нуклеїнові кислоти тощо).

До біосенсорів (зокрема, імуносенсорів) належать ферментні, флуоресцентні, волоконно-оптичні біосенсиори, біосенсиори на основі польових транзисторів, оптичні системи, п'єзоелектричні, мікрохвильові системи, прилади на основі резонансу поверхневих плазмонів і перетворювачі, чутливі до конформації. Такі пристрої широко увійшли до аналітичної практики і використовуються у різноманітних областях медицини, сільського господарства, мікробіологічної та харчової промисловості, в охороні навколишнього середовища.

Велика специфічність, чутливість і універсальність *біосенсорів* багато в чому завдячується властивостям елементів розпізнавання біологічної природи, найпопулярнішими з яких є *моноклональні антитіла*. Шляхом підбору відповідних антитіл можна створювати досить складні системи, що дозволяють ідентифікувати сполуки найрізноманітнішого спектру. Проте, хоча в багатьох випадках природні рецептори (зокрема, *моноклональні антитіла*) взаємодіють із лігандами з високою специфічністю, у нефізіологічних умовах вони вкрай нестабільні, а можливості їх отримання у великих кількостях часто обмежені. Крім того, далеко не всі молекули мають свої природні рецептори, тому створення *«синтетичних рецепторів»*, здатних до розпізнавання і зв'язування різноманітних молекул-мішеней із високою афінністю і специфічністю, являє великий *науково-практичний інтерес у галузі технології та виробництва сенсорної електронної техніки*.

Одним зі шляхів розробки *синтетичних макромолекулярних рецепторів* є отримання молекулярних відбитків різних сполук (шаблонів) на полімерній матриці внаслідок *молекулярного імпринтингу* – співполімеризації функціонального і зшивального мономерів за наявності молекул-шаблонів. Надзвичайна привабливість *молекулярно імпринтованих полімерів* (МІП) для практичного використання (зокрема, під час створення сенсорів) обумовлена вкрай високою стабільністю, простотою отримання, співставною з природними рецепторами афінністю, і селективністю.

Для того щоб на основі МІПів створити синтетичні рецептори, які витіснили б антитіла з технологічної ніші виробництва імуносенсорів без радикальних змін у вже добре відпрацьованих методах імуноаналізу, необхідно, аби МІПи запозичили такі властивості антитіл, як розчинність, розміри, специфічність, афінність, наявність епітопів (антигенних детермінант), а також зберігали свої основні переваги (низька вартість, швидкість виготовлення, висока стабільність).

Незважаючи на безсумнівні успіхи у технології молекулярного імпринтингу, низка невіршених проблем, пов'язаних зі складністю виробництва МПІв з гомогенними ділянками зв'язування за афіністю і специфічністю, гальмує створення високоселективних синтетичних рецепторів. Так, дотепер для синтезу МПІв найбільш широко використовується *метод полімеризації у масі* (bulk polymerization), основними недоліками якого є розташування ділянок молекулярного розпізнавання МПІв всередині макропористої структури, що обмежує їх доступність для молекул шаблону; пошкодження сайтів зв'язування в процесі розмелювання та неповне видалення молекул шаблону, що призводить в кінцевому рахунку до зниження селективності сенсора. Слабким місцем МПІв, отриманих з використанням інших форматів полімеризації, зокрема, *преципітаційної полімеризації, полімеризації в суспензії, полімеризації в емульсії, дисперсійної полімеризації* є невелика кількість доступних для зв'язування ділянок, що призводить до низької чутливості розпізнавання молекули шаблону.

Подолання даних проблем безпосередньо пов'язане з розробкою нових форматів полімеризації і вивченням фізико-хімічних механізмів формування МПІв та молекулярного розпізнавання за їх участі. Зокрема, зауважимо, що вибір функціонального мономера, який би утворював міцні комплекси з цільовим аналітом (шаблоном), є нетривіальним завданням, вирішення якого – важлива стадія у створенні високоафінічних «синтетичних рецепторів».

Враховуючи вищезазначене, *актуальність дисертаційної роботи* для галузі технології і виробництва сенсорної електронної техніки полягає у *проведенні теоретичних і експериментальних досліджень* фізико-хімічних механізмів формування «моноклональних МПІв» (з максимально гомогенними молекулярними відбитками, доступністю і великою кількістю ділянок молекулярного розпізнавання) та молекулярного розпізнавання за їх участі, що є вихідними положеннями для розробки наукових основ технології виготовлення нових функціональних матеріалів («*синтетичних рецепторів*»), які використовуватимуться у створенні сенсорів з системами ліганд-рецепторного розпізнавання. Це дасть можливість виключити з систем детектування нестабільні дороговартісні біологічні елементи, а в багатьох випадках і забезпечити визначення аналіту, природні рецептори до якого з певних причини недоступні. Пристрої з системами розпізнавання на основі штучних МПІ-рецепторів матимуть притаманну антитілам *високу специфічність* і характеризуватимуться набагато більшою *стабільністю, простотою* виготовлення, аніж сенсори на основі біологічних матеріалів (зокрема, ферментів і антитіл).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота за темою дисертації безпосередньо пов'язана з напрямками досліджень, що проводяться на кафедрі біомедицинської інженерії Харківського національного університету радіоелектроніки (ХНУРЕ), зокрема, за програмою держбюджетної науково-дослідної роботи №292-1 «Концепція молекулярного розпізнавання на основі «синтетичних рецепторів» та її застосування для створення приладів визначення речовин» (ДР № 0115U002428) та міжнародного проекту Українського науково-технологічного центру №5067 «Розробка новітніх нанофотонних технологій та пристроїв для детектування небезпечних та токсичних органічних сполук у водних об'єктах навколишнього середовища», де здобувач була виконавцем окремих розділів.

Метою роботи є теоретичне та експериментальне встановлення наявності ліганд-рецепторної взаємодії синтетичного рецептора з молекулами шаблону та наукове обґрунтування технології виготовлення сенсорних елементів із синтетичними рецепторами з суттєво підвищеною стабільністю порівняно з сенсорними елементами на основі матеріалів біологічної природи.

Задачі дослідження:

1. Сформулювати вихідні положення концепції технології створення «синтетичних рецепторів» (як елементів розпізнавання сенсорів), які, по-перше, включали б методологію технологічного процесу виготовлення «синтетичних рецепторів» та принципи дослідження впливу на нього вагомих факторів; по-друге, забезпечували б співставну з природними рецепторами специфічність «синтетичних рецепторів» за суттєво підвищеною стабільністю.

2. Теоретично дослідити (на прикладі окремих популярних мономерів та низькомолекулярних шаблонів) закономірності ліганд-рецепторної взаємодії «мономер-шаблон», які стали б вихідними положеннями для відшукування вагомих факторів впливу на технологічний процес створення високоспецифічних «синтетичних рецепторів».

3. Експериментально дослідити залежність кількості синтезованих високоафінних наночастинок популярно імпринтованих полімерів (синтезованих з використанням окремих популярних низькомолекулярних молекул-шаблонів) від умов полімеризації, яка стала б вихідним положенням для відшукування вагомих факторів впливу на технологічний процес ефективного створення (з максимальною концентрацією на виході) високоспецифічних «синтетичних рецепторів».

4. Експериментально дослідити вплив ліганд-рецепторної взаємодії (приєднання молекул шаблону до МПП-наночастинок) на зміну електричного поля на поверхні металу в умовах поверхневого плазмонного резонансу (ППР), що стало б вихідним положенням для *перевірки адекватності використання створених нанорозмірних МППів* в елементах розпізнавання оптичних сенсорів третього покоління (в основі яких лежать оптичні явища, що не мають аналогій в традиційних методах аналізу, зокрема, поверхневого збудження плазмонів за допомогою світла, – ППР), а також для перевірки фактами й уточнення за змістом сформованої концепції створення «синтетичних рецепторів».

5. Експериментально дослідити концентраційну залежність конкурентної взаємодії (за активні центри МПП-наночастинок, іммобілізованих на твердій фазі) кон'югату (ферментної мітки з шаблоном) та шаблону, що стало б вихідним положенням для *перевірки фактами адекватності* використання нанорозмірних МППів у сенсорних пристроях гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA), а також для уточнення за змістом сформованої концепції створення «синтетичних рецепторів».

6. Теоретично (в ході обчислювального експерименту на основі чисельного розв'язку відомої кінетичної моделі ліганд-рецепторної взаємодії за використання вхідних параметрів, отриманих експериментально) провести дослідження кінетики некооперативного зв'язування «синтетичний рецептор»-шаблон, результати яких стали б вихідним положенням для прогнозування швидкості відгуку сенсора з «синтетичними рецепторами» за різних значень їх концентрацій.

Об'єкт дослідження. Процес теоретичного та експериментального встановлення наявності ліганд-рецепторного розпізнавання молекул шаблону синтетичними рецепторами та наукове обґрунтування технології їх виготовлення.

Предмет дослідження. Нанорозмірні МППі з максимальною гомогенними молекулярними відбитками, доступністю і великою кількістю ділянок молекулярного розпізнавання, як нові функціональні матеріали для виробництва сенсорної електронної техніки.

Методи дослідження: наукометричні методи з використанням мультидисциплінарної бази Scopus; молекулярної механіки; квантово-хімічні методи класу теорії функціоналу густини; методи планування експерименту; спектрофотометрії; електронної мікроскопії; динамічного розсіювання світла; хімічної модифікації; поверхневого плазмонного резонансу; гетерогенного твердофазного імуноаналізу («ELISA»); чисельні методи розв'язку систем звичайних диференціальних рівнянь.

Наукова новизна отриманих результатів.

1. *Теоретично і експериментально* сформовано та верифіковано концепцію технології створення «синтетичних рецепторів», яка базується на науково обґрунтованому технологічному процесі виготовлення МППів з використанням нового типу імпринтингу на скляних мікросферах з іммобілізованим шаблоном, які на відміну від МППів, створених із застосуванням загальноживаних типів полімеризації, є *монодисперсними наночастинками з великою кількістю гомогенних і доступних для молекул-мішеней ділянок молекулярного розпізнавання*, (що є передумовою високої специфічності, притаманної антитілам), та мають *високу стабільність і швидкість виготовлення*, а також *низьку вартість* порівняно з природними рецепторами [11, 16, 17, 22, 24].

2. *Удосконалено алгоритмічну модель* раціонального вибору функціонального мономера в технології молекулярного імпринтингу, яка на відміну від відомих, що ґрунтуються на методах молекулярної механіки або динаміки в ході обчислення енергії зв'язування комплексів «мономер-шаблон», ґрунтується на застосуванні сучасних квантово-хімічних методів теорії функціоналу густини з урахуванням впливу середовища та за рахунок додаткового розрахунку різниці в енергіях взаємодії комплексів «шаблон-мономер» та «структурний аналог шаблону – мономер» дає можливість прогнозувати не тільки чутливість, а й специфічність синтетичного рецептора до різних речовин-мішеней.

3. *Вперше встановлено вплив* типу функціонального мономера на кількісний вихід синтезованих МПП-наночастинок під час твердофазного синтезу на поверхні з іммобілізованими молекулами шаблону, що корелює з даними квантово-хімічних розрахунків щодо визначення величини енергії сольватації міжмолекулярних комплексів «функціональний мономер-шаблон» (1:1), і підтверджує, що особливості сольватації індивідуальних компонентів, які входять до складу даних комплексів, визначають міцність останніх і, як наслідок, кількісний вихід МППів [17, 22].

4. *Уточнено параметр ΔE_{bind}* – (різницю в енергіях взаємодії між комплексами «шаблон : мономер» - «структурний аналог шаблону : мономер»), який на відміну від параметра E_{bind} (енергії взаємодії комплексів) дозволяє спрогнозувати специфічність синтетичного МПП-рецептора [19, 24].

5. *Удосконалено модель технологічного процесу* створення МППів високої специфічності, яка враховує додаткові вагомні фактори впливу, – тип мономера, темпера-

туру промивання МПП-наночастинок, температуру, за якої відбувалась полімеризація, що дозволяє виготовити МППи, які за афінністю можуть бути альтернативною антитілам, зокрема, у сенсорах з системами молекулярного розпізнавання [16, 20, 17, 19].

6. *Вперше* визначено коефіцієнт дисоціації ($K_d = 8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М) комплексу «АМПК-МПП – меламін», що підтверджує можливість створення високоспецифічних «синтетичних рецепторів» – аналогів антитіл – на основі нанорозмірних МППів, розроблених за технологією твердофазного синтезу з оптимізованими технологічними параметрами [22].

Практичне значення отриманих результатів

1. Загальну схему науково-обрунтованого технологічного процесу створення високоспецифічних сенсорних елементів із «синтетичними рецепторами» на основі нанорозмірних МППів може бути використано під час виготовлення чутливих елементів у ферментних, флуоресцентних сенсорах, у сенсорах на основі польових транзисторів, п'єзоелектричних сенсорах, а також в елементах функціональної електроніки, зокрема, біоелектроніки і хемотроніки.

2. Досягнуто межі меж визначення меламіну (5.8 пМ), що втричі менше, ніж в ELISA-аналіз на основі антитіл.

3. На прикладі «антимеламін синтетичних рецепторів» показано, що сенсорні елементи з «синтетичними рецепторами» на основі МПП-наночастинок мають співставну з антитілами характеристику специфічності і покращену стабільність в контексті сенсорів, що використовують як *безміткові технології детектування* (зокрема, базуються на явищі поверхневого плазмонного резонансу), так і *міткові* (зокрема, на основі *гетерогенного твердофазного імунаналізу (ELISA)*).

4. Розроблено технологію виготовлення і конструкцію мікрофлюїдного чипу (Пат. № 60060 Україна, МПК G01N 27/48), який може бути альтернативною з'ємним комерційно доступним мікрофлюїдним чипам у ППР-пристроях типу Bioscye 3000.

5. Технологічний процес синтезу молекулярно імпринтованих полімерів на скляних мікросферах з іммобілізованими молекулами шаблону пройшов апробацію в Інституті приладобудування (м. Харків), що підтверджено актом випробування.

6. Дослідний технологічний процес на основі запропонованих у роботі рішень та отриманих результатів пройшов апробацію в ГП «Харківський науково-дослідний інститут технології машинобудування» (м. Харків), що підтверджено актом випробування.

7. Сенсорні ELISA-елементи з «синтетичними рецепторами», виготовлені за розробленою технологією, впроваджено у наукову практику кафедри фізіотерапії та пульмонології Харківської медичної академії післядипломної освіти в ході дослідження біологічних рідин людини (акт впровадження).

8. Результати проведених досліджень використовуються в навчальному процесі ХНУРЕ під час викладання курсів «Біофізика», «Основи наукових досліджень», «Лабораторно-аналітична техніка» та «Нанотехнології в біології та медицині» в ході підготовки фахівців за напрямом «Біомедична інженерія» (акт впровадження).

Особистий внесок здобувача.

Всі основні результати дисертаційної роботи, які виносяться на захист, отримано автором самостійно. Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні концепції

пції, обґрунтуванні мети й задач дисертаційної роботи, а також методів їхнього вирішення.

У роботах, опублікованих у співавторстві, здобувачу належить: обґрунтування та реалізація технології виготовлення полімерного мікрофлюїдного пристрою [1]; ідея підходу до оптимізації дизайну мікрофлюїдного пристрою та її реалізація [2]; аналіз і синтез при критичному огляді робіт в області капілярного електрофорезу і електрохемілюмінесцентного аналізу [3-4]; проведення експериментальних досліджень під час визначення жовчних пігментів [7]; узагальнення інформації в області використання електрохемілюмінесцентних сенсорних елементів в мікрофлюїдному форматі [8]; проведення експериментальних досліджень електрохімічної поведінки наноелектродних ансамблів на основі вуглецевих нанотрубок, іммобілізованих на електроді [9-10]; проведення досліджень з визначення енергії взаємодії мономер-шаблон [11]; формулюванні ідеї електрохемілюмінесцентного визначення білірубину [12]; проведення обчислювального експерименту з сепарації альбумін-зв'язаного білірубину в мікрофлюїдному чіпі [13-14]; проведення теоретико-експериментальних досліджень щодо синтезу антиванкоміцин-наночастинок [15]; збір та аналіз інформації щодо технологічних проблем створення сенсорів на основі МППів [18]; синтез антимеламін-рецепторів на основі МППів та дослідження можливості їх використання у ферментному аналізі [24].

У всіх роботах автор брала участь в обговоренні отриманих результатів, підготовці й написанні статей.

Автор висловлює щирю подяку науковому консультанту, проф. Рожицькому М.М. за підтримку і поради під час докторантської підготовки; професору Лестерського університету Пілєцькому С.А. – за численні плідні рекомендації та надану можливість використання обладнання і хімічних реактивів, необхідних для досягнення мети роботи; к.х.н. Шишкіній С.В. та к.х.н. Жиколу О.А. – за консультації під час квантово-хімічних розрахунків, а також дозвіл використання обчислювальних потужностей об'єднаного розрахункового кластеру НТК «Інститут монокристалів» та Інституту скінтіляційних матеріалів НАН України у складі Українського національного ґрїда; с.н.с. Білаш О.М. – за щирю підтримку і допомогу з експериментальними дослідженнями; проф. Биху А.І. – за ретельне рецензування роботи і слухні зауваження; доц. Кукобі А.В. – за регулярні обговорення отриманих результатів; проф. Прасолу І.В. – за ініціативну підтримку; проф. Филипенку О.І. за конструктивні коментарі й внесок в оформлення результатів роботи, проф. Гордієнку Ю.О. – за слухні зауваження й рекомендації щодо оформлення результатів роботи; проф. Сліпченку М.І. – за моральне стимулювання проведення роботи над дисертацією і підтримку.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи доповідались (та опубліковані) у відповідних матеріалах на: Міжнародній конференції «Euronalysis» (Інсбрук, Австрія, 2009); Міжнародних молодіжних форумах «Радіоелектроніка і молодь у XXI столітті» (Харків, Україна, 2008, 2012); Всеукраїнській науково-технічній конференції «Фізичні процеси та поля технічних і біологічних об'єктів» (Кременчук, Україна 2009); Сесіях Наукової Ради НАН України з проблеми «Аналітична хімія» (Новий Світ, Крим, Україна 2009, Гурзуф, 2010, 2011); Міжнародній конференції «ELECTRONO4 – 7th ECEHMS» (Париж, Франція, 2011); 4-му Міжнародному радіоелектронному форумі «Прикладна радіоелектроніка. Стан і перспективи розвитку» (Харків, Україна, 2011); 7-й Міжнародній конференції «Instrumental Methods of

Analysis-Modern Trends and Applications» (Ханія, Греція, 2011); Міжнародній науково-практичній конференції «Застосування лазерів у біології та медицині» (Судак, Крим, Україна, 2011); Міжнародних науково-технічних конференціях «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, Україна, 2008, 2010); Міжнародних наукових конференціях «Функціональна база наноелектроніки» (Кацівелі, Крим, Україна 2010, 2011, Алушта, Крим, Україна 2013); «VIIIth International Conference in MEMS Desing» (Поляна, Львів, Україна, 2012); «The 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence» (Гелф, Канада, 2012); «The 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry» (Прага, Чеська Республіка, 2012); «The 26th European Conference on Solid-State Transducers» (Краків, Польща, 2012); «4th German-Ukrainian Symposium «Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology»» (Льменау, Німеччина, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції «Nanotechnology and Nanomaterials» (Буковель, 2013); 3-й Міжнародній конференції «Nanobiophotonics: Fundamental and Applied Aspects» (Харків, 2009, 2013); «The 1st International Meeting on Electrogenerated Chemiluminescence – ECL2014» (Бергіноро, Італія, 2014).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 40 наукових праць, у тому числі 2 розділи у 2 виданих закордоном монографіях, 13 статей (з них 8 – одноосібних) у вітчизняних фахових виданнях (з яких 1 публікація – у виданнях України, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 9 публікацій у періодичних фахових виданнях інших держав з напрямку, з якого підготовано дисертацію (з яких 5 публікацій – у виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, одна з публікацій – без співавторів); 16 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій і симпозіумів (з них 6 – проводилось за кордоном). Отримано 1 патент на корисну модель.

Структура й обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, п'яти розділів, висновків, переліку використаних джерел із 395 найменувань (50 сторінок), 10 додатків (29 сторінок). Повний обсяг дисертації складає 343 сторінки, з них 264 сторінки основного тексту, ілюстрованого 125 рисунками та 30 таблицями.

ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми роботи, показано зв'язок із науковими програмами, планами, темами, визначено мету і завдання дослідження, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, наведено відомості про особистий внесок автора, апробації та публікації.

У першому розділі проведено аналіз основних напрямків, тенденцій та етапів наукової думки в контексті створення сенсорів з первинними чутливими перетворювачами, розпізнавання хімічних речовин у яких ґрунтується на ліганд-рецепторній взаємодії. Використовуючи наукометричну базу даних *Scopus*, серед тисяч робіт у даній області для аналізу було відібрано піонерські (особливо, опубліковані в журналі «*Nature*»), найбільш показові (цитовані) публікації та нещодавні огляди.

Визначено переваги та недоліки, а також динаміку застосування біологічних матеріалів як елементів розпізнавання, що традиційно використовуються у сенсорах хімічних речовин. Показано, що: 1) головний вимозі до розпізнавальних елементів – *специфічності*, відповідають шість типів біологічних об'єктів: ферменти; антитіла; нуклеїнові кислоти; біотканини (тварин, рослин, грибів), клітинні рецептори, апта-

мери; 2) усім біологічним рецепторам (більшою чи меншою мірою) притаманні ті самі недоліки: нестабільність, висока вартість, складність отримання; 3) моноклональні антитіла (як розпізнавальні елементи біосенсорів) використовуються найчастіше, що пояснюється найбільшою специфічністю і чутливістю порівняно з іншими видами біологічних чутливих елементів; 4) основні недоліки антитіл: методична складність отримання; необхідність роботи з тваринами, невисока відтворюваність синтезів, обмеження для аналізу високотоксичних сполук, неможливість проведення аналізу в органічних середовищах та середовищах, агресивних до імуноглобулінів, нестабільність у широкому діапазоні температури рН.

Сформульовано *науково-прикладну проблему* створення сенсорів хімічних речовин, що полягає у необхідності вирішення протиріччя складності одночасного забезпечення таких характеристик сенсорів, як специфічність і висока чутливість (з одного боку) та стабільність роботи і низька собівартість виготовлення (з іншого). Проведено аналіз робіт попередників щодо можливості застосування МППів як синтетичних аналогів антитіл у біохімічному аналізі. Показано, що кількість публікацій в області МППів експоненційно зростає, що підтверджує інтерес до даного напрямку і безсумнівні успіхи, пов'язані з розширенням сфер застосування МППів, використанням нових шаблонів, мономерів. Разом з тим, значний прогрес досягнуто і в удосконаленні нових методів формування МППів – від *полімеризації в масі* (нерегулярні мікрочастинки), *суспензійної* (полідисперсні частинки), *преципітаційної* (полідисперсні мікро- та наночастинки). Зроблено висновок, що спільним недоліком МППів є: гетерогенність імпринтованих сайтів у полімерній матриці, слабка ємність вторинного зв'язування з молекулами-мішенями, складність іммобілізації на поверхні електрода. Сформульовано *мету і завдання* дослідження, пов'язані з науково-обґрунтованим створенням «синтетичних рецепторів» на основі МППів у вигляді монодисперсних наночастинок з максимально гомогенними молекулярними відбитками (сайтами) на поверхні, а також з теоретичним та експериментальним встановленням наявності ліганд-рецепторної взаємодії «синтетичних рецепторів» з молекулами шаблону. Створення сенсорних елементів на основі «моноклональних МППів» дало б змогу розв'язати протиріччя між складністю досягнення високої специфічності детектування зі збереженням стабільності сенсора.

Основні результати даного розділу опубліковані у працях [3, 4, 6, 7, 8-10, 12, 15, 18].

У другому розділі обґрунтовано концепцію створення сенсорів з системами розпізнавання на основі нанорозмірних «синтетичних рецепторів» та сформульовано її вихідні положення (див. рис.1). Для цього було проаналізовано можливі фактори впливу на сенсорні властивості МППів та розглянуто методи їх оцінювання. Зазначено, що реакцію взаємодії «МПП-шаблон» можна розглядати як окремий випадок зв'язування лігандів з макромолекулярними рецепторами, в основі якого лежать загальні принципи будь-якої бімолекулярної реакції, що є зворотною і описується тими самими кінетичними і термодинамічними параметрами, що і будь-який процес комплексоутворення. Тому розглянуто теоретичні засади ліганд-рецепторної взаємодії як підґрунтя до аналізу взаємодії «мономер-шаблон» у передполімеризаційному комплексі; особливу увагу приділено аналізу методів теоретичних досліджень, які змогли б використовуватися для визначення енергії подібної взаємодії. Показано, що на сьогодні такі дослідження спираються на кілька груп розрахункових методів, а

саме: молекулярної механіки; методи молекулярної динаміки; емпіричні та напівемпіричні квантово-механічні методи (КММ).

Зуважимо, що серед перелічених методів КММ є найточнішими, але мають змогу розраховувати системи з відносно малою кількістю атомів (~500). Це на декілька порядків менше, ніж можливо методами молекулярної механіки і динаміки.

Вихідні положення концепції створення сенсорів з елементами розпізнавання на основі нанорозмірних синтетичних рецепторів	<p>1. Молекулярний імпринтинг на поверхні з іммобілізованим шаблоном забезпечить:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Локалізацію сайтів на поверхні => доступність для молекул шаблону (вторинне зв'язування) => підвищення чутливості і швидкості відгуку, достовірність - Контроль орієнтації порожнин з ділянками зв'язування і форми МІПів => гомогенність => відтворюваність, специфічність - Нанорозміри МІПів => високу концентрацію сайтів зв'язування => чутливість <p>2. Теоретичні дослідження енергії ліганд-рецепторної взаємодії «шаблон»- «мономер» у передполімеризаційному комплексі => для перевірки вагомості впливу типу мономеру на чутливість і специфічність МІПу => для вибору функціонального мономеру, що утворюватиме міцний передполімеризаційний комплекс</p> <p>3. Планування експерименту синтезу синтетичних рецепторів => для пошуку оптимальних параметрів імпринтингу на твердій поверхні => для створення ефективної методики імпринтингу</p>
---	--

Рисунок 1 – Вихідні положення концепції створення сенсорів з системами розпізнавання на основі нанорозмірних «синтетичних рецепторів»

Слід зазначити, що в КММ для багатоелектронних систем, якими є і МПП-системи, точне рішення рівняння Шредінгера практично неможливе, тому для розрахунку енергій основного та збуджених станів доцільно застосовувати DFT-методи, в яких замість хвильових функцій в ході розрахунків використовують електронні щільності. Останнє дає можливість розраховувати системи з більшою кількістю електронів, ніж під час використання традиційних КММ Хартрі-Фока. Серед КММ DFT-методи, придатні для розрахунку систем з дещо більшою кількістю атомів (до 1000). Крім того, відомо, що напівемпіричні методи погано «працюють» для систем з водневими зв'язками і під час розрахунку перехідних структур. Розглянуто теоретичні основи квантово-хімічних розрахунків та визначено межі їх застосовності для дослідження взаємодії «мономер»-«шаблон» у передполімеризаційних комплексах. Проведено порівняльну характеристику програм (зокрема: GAMESS, Gaussian, NureChem) для проведення квантово-хімічних розрахунків.

Враховуючи, що будь-яка концепція має перевірятись та уточнюватись, було розглянуто лабораторні методики та експериментальне обладнання, що дозволили б, *по-перше*, експериментально перевірити адекватність результатів теоретичних досліджень, *по-друге*, перевірити різними незалежними методами можливість використання «синтетичних рецепторів» у популярних типах сенсорів з різними типами трансдюсерів. Показано, що *безміткові* пристрої на основі *поверхневого плазмонного резонансу* є найбільш популярними для дослідження ліганд-рецепторної взаємодії і створення сенсорів з системами розпізнавання. В свою чергу, *міткові* пристрої на основі *гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA)* є досить розповсюджені, а їх випуск є промислово налагодженим. Це означає, що в перспективі перехід на

МПП-рецептори у ELISA-пристроях зробить аналіз стабільнішим і знизить його грошову вартість, зберігаючи при цьому вже відпрацьовані протоколи аналізу.

Беручи до уваги, що в основі молекулярної взаємодії МПП і шаблону лежать ті самі принципи ліганд-рецепторної взаємодії, що і в імуноаналізі, то класифікація, застосована, зокрема, для *імуноферментного аналізу*, за аналогією може розповсюджуватися і на МПП-аналіз. Тому розглядалися підходи (зокрема, мікрофлюїдики, мікрочіпів та «Lateral-flow test») до створення сенсорних пристроїв для імуноаналізу.

Розглянуто кінетичні моделі ліганд-рецепторної взаємодії, які було б доцільно адаптувати для проведення досліджень кінетики комплексоутворення «мономер-шаблон», як інструменту для прогнозування часу відгуку сенсора на основі «синтетичних рецепторів». Розглянуто схеми та математичні моделі взаємодії лігандів з рецепторами. Зазначено, що схема некооперативного зв'язування 1 ліганда з 1 рецептором аналогічна кінетичному закону Міхаеліса-Ментена у ферментативній кінетиці (за умови «квазірівноваги»), досить широко використовується та дає відмінний збіг з великою кількістю експериментів. Враховуючи це і те, що «синтетичні рецептори» на основі МПП-наночастинок гомогенні як за специфічністю, так і за фізико-хімічними властивостями, – в основу вивчення кінетики взаємодії «синтетичний рецептор» – «шаблон» було покладено модель некооперативного зв'язування ліганда з рецептором (1:1). Детальніше ці питання розглядаються у п'ятому розділі, присвяченому побудові відповідної математичної моделі та проведенню обчислювального експерименту з вивчення кінетики.

Експерименти, пов'язані з оптимізацією якості «синтетичних рецепторів» та відшуканням оптимальних умов проведення технологічних процесів їх створення, є багатфакторними, тому не піддаються теоретичному вивченню у прийнятний термін традиційними методами, які ґрунтуються на почерговому варіюванні окремих незалежних змінних в умовах, коли інші залишаються незмінними. Як наслідок, багато рішень може прийматись на підставі інформації, що має випадковий характер, і відтак є далекими від оптимальних. Тому було проаналізовано шляхи проведення технологічних процесів створення «синтетичних рецепторів», що дозволяють вести дослідницьку роботу прискореними темпами і забезпечують прийняття рішень, близьких до *оптимальних*. Зазначено, що застосування статистичних методів *планування експерименту* (англ. «*design of experiments*») дає можливість одночасного варіювання всіма факторами на противагу широко розповсюдженому (традиційному) однофакторному експерименту (англ. «*one-variable-at-the-time*»).

Основні результати даного розділу опубліковані у працях [1, 2, 13, 14].

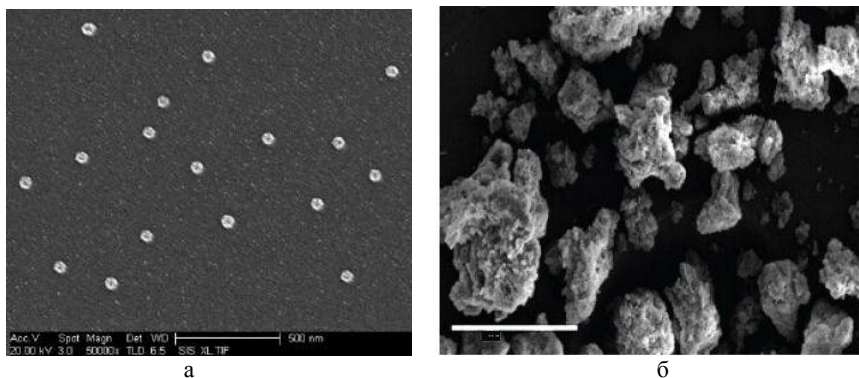
У третьому розділі розвинуто сформульовані раніше вихідні положення концепції технології створення «синтетичних рецепторів» (як елементів розпізнавання сенсорів), які б, *по-перше*, запозичили такі властивості природних рецепторів як специфічність, афінність; *по-друге*, мали високу стабільність і швидкість виготовлення, а також низьку вартість порівняно з природними рецепторами).

Молекулярний імпринтинг на поверхні з іммобілізованим шаблоном

Перше вихідне положення, покладене в концепцію, – необхідність синтезу МППв на твердій поверхні, що дасть можливість створити МППи у вигляді наночастинок з гомогенними, локалізованими на поверхні сайтами, було реалізоване на практиці.

Процедура отримання МПІв включала основні кроки: іммобілізація шаблону на твердій фазі (скляних мікросферах) певним чином; додавання передполімеризаційної суміші (функціональний мономер, мономер-зшивач, ініціатор полімеризації) і УФ-ініціювання полімеризації; промивання полімеризаційної суміші розчинником за низької температури (з метою промивання від мономерів, які не прореагували, та низькоафінних частинок); промивання полімеризаційної суміші розчинником за високої температури (з метою отримання розчину з МПІ-наночастинками високої афінності, – які є пористими МПІ-наноструктурами – «негативами» вихідного шаблону). Такий метод імпринтингу дає можливість контролювати не тільки орієнтацію порожнин з ділянками зв'язування, але й форму самих МПІв.

Нижче наведені фотографії МПІв, отриманих за розробленою нами методикою, та загальноновживаним методом «полімеризації в масі».



а – МПІ у вигляді регулярних за формою наночастинок (синтезованих нами)
б – МПІ у вигляді мікронних частинок нерегулярної морфології

Рисунок 2 – Фотографії МПІв, отримані з використанням електронного мікроскопа

Планування експерименту під час синтезу «синтетичних рецепторів»

У промисловій практиці універсальним і загальним є прагнення максимально можливого наближення до поставленої мети найбільш швидким способом і з найменшими витратами. Розробка ефективної методики синтезу високоафінних «синтетичних рецепторів» (зокрема, на прикладі антимеламін-МПІв), у якій оптимізовано технологічні параметри (концентрація мономера, співвідношення мономер-шаблон, вид розчинника, умови полімеризації тощо) було реалізовано з використанням статистичного методу – *планування експерименту*.

Планування експерименту – це процедура вибору кількості й умов проведення дослідів, необхідних і достатніх для вирішення поставленого завдання з необхідною точністю. Тут істотним є: прагнення до мінімізації загальної кількості дослідів; одночасне варіювання всіма змінними, що визначають процес; використання математичного апарата, що формалізує багато дій експериментатора.

В ході планування експерименту щодо синтезу МПІ-наночастинок високої афінності *параметром оптимізації* був їх вихід (маса), кількісна оцінка якого прово-

дилась за спектрами абсорбції на довжині хвилі 209 нм (максимум поглинання на-ноМПП). *Факторами впливу* було обрано: концентрацію функціонального мономера з діапазону зміни (1-5%); час опромінення – (2.5 - 4.5 хв); температуру під час УФ-полімеризації та температуру вимивання низькоафінних фракцій – (10 - 30°C).

За допомогою програмного забезпечення Modde 9.0 (Umetrics) було побудовано схему експерименту, що включала 27 дослідів (комбінацій факторів впливу), з яких після вилучення несумісних факторів залишилось 19.

Графічне подання виходу МПП-наночастинок (отримане в MODDE.9) як функції від часу полімеризації, концентрації мономера, температури елюції частинок низької афінності і температури, за якої проходила полімеризація, показана на рис. 3.

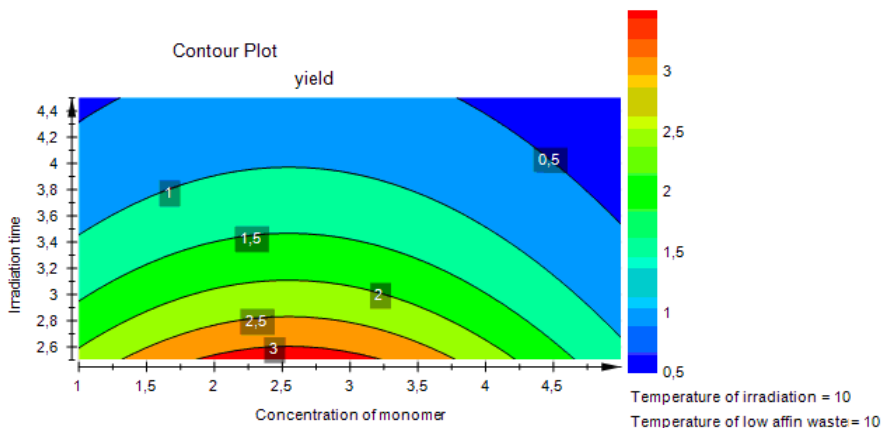


Рисунок 3 – Графічне представлення поверхні відгуку факторів впливу на кількісний вихід МПП-наночасток (у відн. од.)

Максимальний вихід МПП-наночастинок було досягнуто за таких діапазонів значень факторів впливу: концентрація мономера – (1.8-3.25%); час опромінення – (2.5-2.6 хв) і температура опромінення й промивання низькоафінних фракцій – (10°C). Таким чином, максимальний вихід МПП-наночастинок «синтетичних рецепторів», отриманих в одному виробничому циклі, виконаному за оптимізованих умов, становив 25 мг. Константа дисоціація синтезованих МПП-наночастинок була рівною $3.4 \cdot 10^{-9}$ М – значення, що відповідає афінності природних рецепторів. Останнє дає можливість стверджувати, що дані параметри є вагомими факторами впливу на процес створення високоафінних «синтетичних рецепторів».

Теоретичні дослідження ліганд-рецепторної взаємодії «шаблон»- «мономер» у передполімеризаційному комплексі

Як зазначалось у другому розділі, в основі молекулярної взаємодії МПП і шаблону лежать принципи ліганд-рецепторної взаємодії, тому при науковому обґрунтуванні вагомих факторів впливу на технологічний процес створення «синтетичних рецепторів» доцільно дослідити енергію взаємодії «шаблон-мономер» у передполімеризаційній фазі. Структурні формули функціональних мономерів, що використовувались у даному дослідженні, наведено на рис. 4.

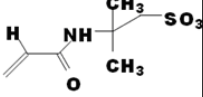
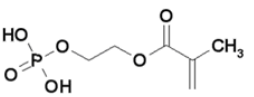
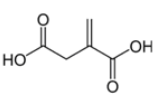
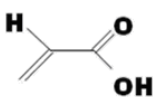
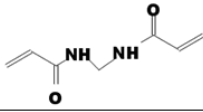
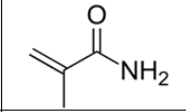
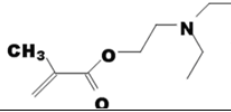
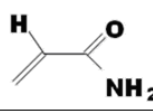
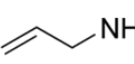
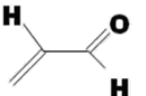
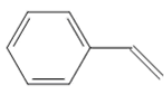
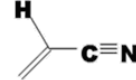
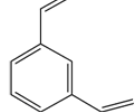
КИСЛОТНІ				
				
акриламід-2-метил-1-пропан-сульфонова кислота (АМПК)	Етиленгліколь метакрилат фосфат (ЕГМФ)	Ітаконова кислота	Акрилова кислота	
ОСНОВНІ				
				
N,N'-метиленбісакриламід	Метакриламід	N,N-діетиламіноетил-метакрилат	Акриламід	
НЕЙТРАЛЬНІ				
				
Аліамін	Акролейн	Стирол	Акрилонітрил	1,3-діетенілбензен

Рисунок 4 – Функціональні мономери, що використовувались у даному дослідженні

Вибір меламіну як шаблону обумовлено актуальністю його визначення, наприклад, беручи до уваги сумнозвісний «меламіновий скандал» у Китаї.

Розрахунки здійснювалися неемпіричним методом функціонала густини (функціонал $RwB97XD$) з використанням квантово-хімічної програми GAUSSIAN 09, версії A01. На першому етапі розрахунків програмно вирішувалось рівняння Кона-Шема (див. нижче), рішення якого дозволяло знайти значення електронної густини.

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + v_{eff}(r) \right) \phi_i(r) = \varepsilon_i \phi_i(r),$$

де ε_i – орбітальна енергія,

ϕ_i – орбіталь Кон-Шама,

$v_{eff}(r)$ – ефективний потенціал Кон-Шама, який розраховувався за формулою

$$\rho(r) = \sum_i |\phi_i(r)|^2.$$

Отримані значення повної енергії з урахуванням суперпозиційної помилки базисного набору (СППБН) (E_{CCE}), повної енергії мономера ($E(\text{mono})$) і повної енергії шаблону $E(\text{templ})$) використовувались для розрахунку енергії взаємодії (E_{bind}) мономер-шаблон за формулою:

$$E_{\text{bind}}(1:1) = E_{\text{CCE}}(1:1) - E(\text{mono}) - E(\text{templ}).$$

Візуалізація результатів проводилась у програмі GaussView 5.0. Вибір функціоналу Rwb97XD обумовлений можливістю опису системи з водневими зв'язками, а також π - π -стековими взаємодіями, які можуть брати участь у формуванні передполімеризаційних комплексів шаблон-мономер. Як базисний набір для оцінювання молекулярної структури використовували базис 6-31G(d), який враховує d-орбіталі на атомах другого періоду. Всі розрахунки проводились у режимі повної оптимізації геометричного положення кожного атома досліджуваної системи. Для всіх структур, отриманих внаслідок завершення роботи процедури оптимізації геометрії, розраховувались матриці других похідних (Гессіани). Для аналізу результатів розрахунку ми приймали до уваги тільки ті структури, які мають Гессіани з усіма позитивними значеннями. Суперпозиційну помилку базисного набору (СППБН) враховували методом противаг. Вплив водного середовища та ацетонітрилу враховували за допомогою моделі поляризованого континууму.

Підбір пари «функціональний мономер-шаблон»

Розрахункові значення енергій взаємодій отриманих у базисі 6-31G (d) для найбільш вигідних комплексів мономер-шаблон (показаних на рис. 5-6), наведені у таблиці 1.

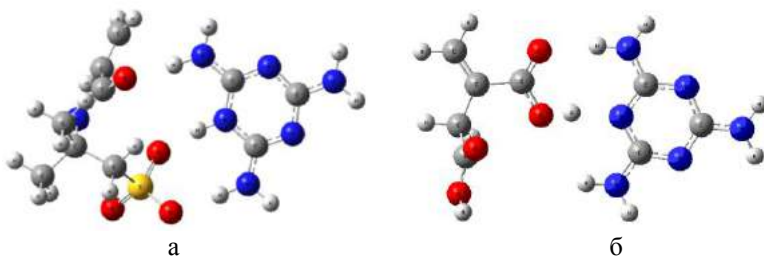


Рисунок 5 – Молекулярна структура передполімеризаційного комплексу 1:1 меламіну з (а) АМПК ($E_{\text{bind}} = -36,2$ ккал/моль) і (б) ітаконова кислота ($E_{\text{bind}} = -13,5$ ккал/моль) у воді (PCM)

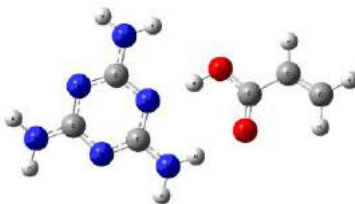


Рисунок 6 – Молекулярна структура передполімеризаційного комплексу 1:1 меламіну з акриловою кислотою ($E_{\text{bind}} = -12,3$ ккал/моль) у воді (PCM)

Результати проведеного обчислювального експерименту свідчать, що серед розглянутих мономерів (АМПК, ітаконова та акрилова кислоти), саме АМПК найбільш придатна для подальшого синтезу «синтетичних рецепторів» на меламін. Це пояснюється тим, що серед усіх розглянутих комплексів, дана кислота утворює найміцніший комплекс з меламіном. Найміцніші комплекси у даному випадку стали можливими завдяки особливості просторової будови молекули АМПК, в якій фосфатна та карбонільні групи розташовані так, що є можливість без стеричних перешкод утворювати водневі зв'язки з функціональними групами молекули меламіну, атразину чи пеніциліну. Про адекватність запропонованої методики розрахунків (кантово-механічним DFT-методом) щодо раціонального вибору найкращого кандидата у мономери можна судити, проводячи порівняння даних результатів з іншими теоретичними результатами, отриманими нами методом молекулярної механіки. Крім того, таку послідовність було підтверджено експериментально – шляхом зважування МПП-наночастинок, синтезованих з використанням 3-х різних полімерів (АМПК, ітаконова кислота, акрилова кислота) після повного випаровування розчинника об'ємом 5 мл. Процедура було повторено 5 разів. Таким чином, середньоарифметичне значення маси МПП-наночастинок (в мг): 0,85 для АМПК, 0,6 для ітаконовою кислоти; 0,25 для акрилової кислоти. Слід зазначити, що така різниця в концентрації була помітна візуально. Тому послідовність найкращих функціональних мономерів для синтезу антимеламін «синтетичних рецепторів» була така сама, що й під час експериментальних досліджень.

Таблиця 1 – Розрахункові значення енергій взаємодій (E_{bind}) найбільш вигідних комплексів «функціональний мономер-шаблон» у середовищі вода та ацетонітрил

Мономер	Енергія взаємодії	
	вода	ацетонітрил
	ккал/моль	ккал/моль
АМПК	-36,18	-39,17
Ітаконова кислота	-13,48	-26,73
Акрилова кислота	-12,27	-18,07
N,N'-метиленбісакриламід	-10,68	-16,95
Метакриламід	-9,25	-15,52
N,N'-діетиламіноетил-метакрилат	-8,43	-13,44
ЕГМФ	-8,12	-11,91
Акриламід	-7,51	-11,43
Аліламін	-6,55	-8,98
1,3-діетенілбензен	-6,09	-7,79
Стирол	-4,90	-7,47
Акролеїн	-4,84	-6,43
Акрилонітрил	-3,29	-5,95

Такі результати однозначно засвідчують, що величина енергії сольватації міжмолекулярних комплексів визначається природою та особливостями сольватації індивідуальних компонентів, які входять до складу даного комплексу. Тому *тип функціонального мономера є вагомим фактором впливу* на технологічний процес створення штучних рецепторів, від якого залежить *чутливість* ліганд-рецепторної взаємодії.

Також досліджено *вплив додаткової молекули мономера на енергію взаємодії* комплексу «шаблону-мономер» (див. табл. 2), яку розраховували як:

$$E_{\text{bind}}(1:2) = E_{\text{CCE}}(1:2) - E_{\text{CCE}}(1:1) - E(\text{mono}),$$

де $E_{\text{CCE}}(1:2)$ – повна енергія комплексу (1:2) з урахуванням СППБН.

Аналогічно обчислювався внесок третьої молекули функціонального мономера в енергію взаємодії комплексу (1:3):

$$E_{\text{bind}}(1:3) = E_{\text{CCE}}(1:3) - E_{\text{CCE}}(1:2) - E(\text{mono}),$$

де $E_{\text{CCE}}(1:3)$ – повна енергія комплексу (1:3) з урахуванням СППБН.

Таблиця 2 – Розрахункові значення енергій взаємодій (ккал/моль) з урахуванням вкладу кожної наступної молекули функціонального мономера 1:1 комплексу «меламін-мономер» у воді

<i>n</i>	АМПК	Ітаконова кислота	Акрилова кислота
1	-36,2	-13,5	-12,3
2	-25,7	-13,0	-12,1
3	-19,9	-12,7	-11,9

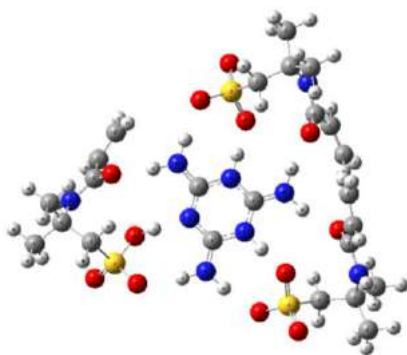


Рисунок 7 – Молекулярна структура меламін-АМПК при співвідношенні молекул (1:3) у воді

АМПК >> ітаконова кислота > акрилова кислота.

Слід зазначити, що вигравш в енергії від комплексів з другої і третьої молекули мономера нижча у разі повного перенесення протона (АМПК) і майже така сама, як в інших випадках. Стерична проблема, більш виражена для комплексоутворення за участі АМПК, також може зробити свій внесок у цей ефект.

У комплексах 1:3 всі сайти молекули меламіну беруть участь у міжмолекулярній взаємодії. Вищі комплекси «меламін-мономер», зокрема, «меламін-АМПК», також можливі.

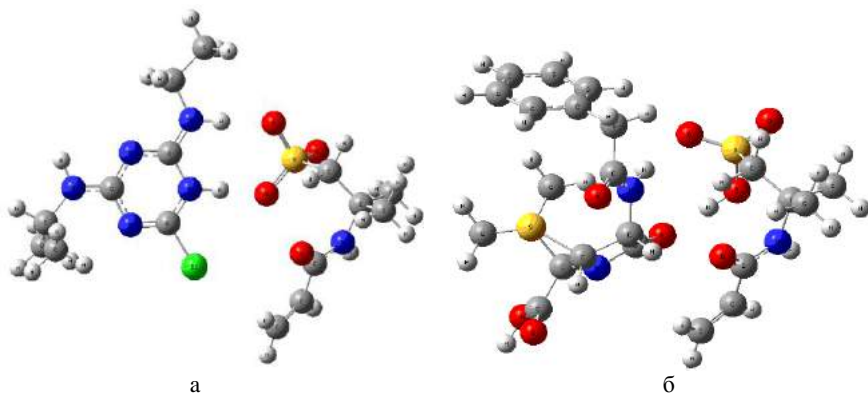


Рисунок 8 – Молекулярна структура передполімеризаційних комплексів (1:1) АМПК з: (а) атразином ($E_{bind} = -19,9$ ккал/моль) і (б) пеніциліном ($E_{bind} = -16,0$ ккал/моль) у воді (PCM)

Проте, три найбільш стійкі структури містять 8-членне кільце, побудоване на двох водневих зв'язках. Добре відомо, що такі кільця стабілізуються додатково декількома ккал / моль за рахунок кооперативних взаємодій. Ця стабілізація буде втрачена в разі надлишку мономера у комплексі, що призведе до стеричних проблем, які навряд чи призведуть до збільшення повної енергії взаємодії. Крім того, на практиці в процесі нековалентного імпринтингу рекомендується використовувати функціональні мономери в надлишку до шаблону, який необхідний, щоб змістити рівновагу в бік мономерної суміші комплексів. З цієї причини комплекси з чотирьох або більше молекул мономера в даному дослідженні не розглядалися.

Отримані значення різниці енергій взаємодій обраних мономерів з меламіном та іншими шаблонами, що досліджувалися у даній роботі, наведені в табл. 3. Показано, що різниця в енергіях взаємодії (ΔE_{bind}) для передполімеризаційного комплексу «меламін-АМПК» та схожим за будовою атразином з АМПК становить біля -16.26 ккал/моль як у воді, так і в ацетонітрилі. Для комплексів з іншими мономерами така різниця в енергіях не суттєва (біля 1 ккал/моль), що свідчить про можливість неспецифічної взаємодії даних мономерів з іншими шаблонами. Верифікація даних теоретичних досліджень з експериментальними даними (твердофазного імуноферментного визначення меламіну) свідчить, що *різниця у значеннях енергій взаємодій у комплексах («шаблон-мономер») та («структурний аналог шаблону-мономер») є вагомим фактором* впливу на технологічний процес створення «синтетичних рецептів», критерієм якості яких є *специфічність*.

Таким чином, у загальному вигляді *модель технологічного процесу*, що пов'язує *параметр оптимізації* (вихід високоафінних МПП-наночастинок) з *факторами впливу* можна записати як: $y = \varphi(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5)$, де φ – функція відгуку (кількість високоафінних МПП-наночастинок на виході), X_1 – тип мономера (E_{bind} , ΔE_{bind}), X_2 – концентрацію мономера, X_3 – час полімеризації, X_4 – температура промивання МПП-наночастинок, X_5 – температура, за якої відбувалась полімеризація.

Таблиця 3 – Значення різниці енергій взаємодій обраних мономерів з меламіном та іншими шаблонами, що досліджувались у даній роботі

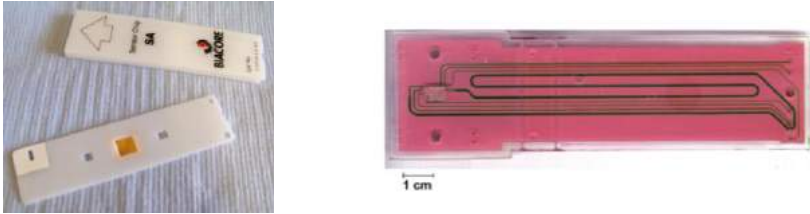
Мономер	Середовище	$\Delta E_{bind} = E_{\text{«меламін-мономер»}} - E_{\text{«атразин-мономер»}}$	$\Delta E_{bind} = E_{\text{«меламін-мономер»}} - E_{\text{«пеніцилін-мономер»}}$
		ккал/моль	ккал/моль
АМПК	Вода	-16,26	-20,18
	Ацетонітрил	-16,45	-20,10
Ітаконова кислота	Вода	-1,40	-3,57
	Ацетонітрил	-1,51	-3,57
Акрилова кислота	Вода	-1,01	-0,76
	Ацетонітрил	-1,01	-0,73

Основні результати даного розділу опубліковані у працях [11, 16, 17, 19, 20, 21].

У **четвертому розділі** експериментально перевірено вихідні положення сформульованої концепції, а саме – двома незалежними методами показано, що синтезовані нанорозмірні МПІ після оптимізації умов імпринтингу можуть бути (за показниками специфічності та чутливості) адекватною альтернативою природним рецепторам (антитілам).

Експериментальне дослідження специфічності ліганд-рецепторної взаємодії «синтетичний рецептор – шаблон» проводилось з використанням оптоелектронного перетворювача, що базуються на ефекті *поверхневого плазмонного резонансу* (ППР). Сенсори на основі ППР або скорочено «ППР сенсори» – це відносно новий клас сенсорів. Основні переваги використання таких систем перед традиційними методами обумовлені можливістю безпосереднього вивчення міжмолекулярних взаємодій і аналізу кінетичних параметрів зв'язування, що дозволяє виявити механізм такого процесу, а також відсутністю необхідності використання дороговартісних міток.

Вище нами (з використанням методу теорії функціонала густини) було показано, що серед 13 розглянутих функціональних мономерів *АМПК* утворює найбільш енергетично вигідний комплекс з *меламіном*. Крім того, дана кислота формує найміцніші комплекси з меламіном, навіть порівняно з *атразином*, який належать до того самого хімічного класу. Тому, для експериментальної верифікації запропонованої концепції синтезовані (з використанням функціонального мономера АМПК) антимеламін МПІ-наночастинки досліджувалися на одному з найбільш відомих нині у світі промислових ППР-сенсорів «*VIACORE 3000*» шведської фірми *Viacore AB*. Для цього вони іммобілізувалися на поверхні золотого мікрочіпу (*SIA Kit Au, Viacore*) за протоколом *Thermo Scientific NHS* і сульфо-*NHS*. ППР-дослідження проводились у мікрофлюїдній системі (рис. 9), що являла собою спеціальну мікропроточну комірку, мікроканали якої знаходяться в безпосередньому фізичному контакті з золотим чіпом. Було проведено шість досліджень взаємодії МПІ-наночастинок з меламіну різних концентрацій (4 нМ, 0064 нМ, 0.032 нМ, 0.16 нМ, 0.8 нМ, 20 нМ). За даними сенсора прилад *Viacore 3000* у режимі реального часу будував сенсограму – криву взаємодії меламіну з сенсорним чіпом, що містив шар МПІ-наночастинок, див. рис.9.



а – чіп з золотим шаром (SIA Kit Au, Biacore);
 б – мікрофлюїдний картридж, що інтегровувався у прилад Biacore 3000
 Рисунок 9 – Фотографії ППР-пристрою

За допомогою BIAEvaluation Software v4.1 (Biacore, Sweden) було отримано кінетичні параметри комплексоутворення, які аналізувалися із застосуванням моделі (1:1) Ленгмюра, що дало змогу визначення коефіцієнта дисоціації (K_d), який становив $8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М. На практиці часто умовно припускають, що якщо константа дисоціації є в діапазоні $10^{-9} - 10^{-6}$ М, то антитіла є високоафінними.

Таким чином, афінність синтезованих МПП-наночастинок, зокрема, на меламін, є близькою до афінності моноклональних антитіл з подібними до меламіну гаптенами. Тому МПП-наночастинки мають необхідні властивості «синтетичних рецепторів». Зауважимо, що синтезовані антимеламін МПП-наночастинки (з функціонально мономера – АМПК) мали більшу афінність до меламіну, ніж до атразину, що належить до того самого хімічного класу. Це корелює з даними наших теоретичних досліджень, розглянутих вище.

Дослідження молекулярної взаємодії «синтетичний рецептор – меламін» в умовах гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA)

Для визначення можливості використання МПП-наночастинок як альтернативи антитілам в імуносенсорах було проведено дослідження молекулярної взаємодії «синтетичний рецептор – меламін» в умовах *гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA)*, який є широкорозповсюдженим у *міткових* сенсорних пристроях.

У даній роботі як ферментна мітка (тест-система) використовувалася пероксидаза хрому (ПРХ), вибір якої обумовлювався її високою питомою каталітичною активністю, доступністю, стабільністю, простотою детектування. Як субстратний реагент ПРХ застосовували ТМБ – неканцерогенний замінник бензидину, продукт окислення якого пероксидом водню за наявності пероксидази дає інтенсивно забарвлену сполуку, яку реєстрували спектрофотометрично з довжиною хвилі 450 нм. Первинним процесом у псевдо-ІФА на основі МПП (як і будь-якого імунохімічного процесу) є стадія «впізнання» сполуки, що визначається специфічним до нього антитілом (наноМПП). Оскільки процеси утворення псевдоімунохімічних комплексів зумовлені афінністю, концентраціями компонентів та умовами реакції, то достатнім для визначення вихідної концентрації аналіту є кількісна оцінка псевдоімунохімічних комплексів, що утворилися. Як видно з рис. 10, величина (показника поглинання) сигналу, що детектується, знаходиться у зворотній залежності від концентрації речовини, яка визначається (меламіну). Аналіз висоти стовпців на гістограмі (рис. 10) показує, що за концентрації меламіну 10^{-4} нМ він не детектується, оскільки концентрація кон'югату суттєво вища. Зі збільшенням концентрації меламіну, починаючи з 10^{-3} нМ і до 5 нМ, спостерігається спад величини показника поглинання, що поясню-

ється втратою забарвленого кон'югату, який перестає утворювати ліганд-рецепторний комплекс з МПП-наночастинкою і легко вимивається буфером. Тобто в даному діапазоні концентрацій меламіну достатньо, аби витіснити кон'югат у ході «конкуренції» за порожнину у МПП-наночастинці, компліментарну за формою меламіну.

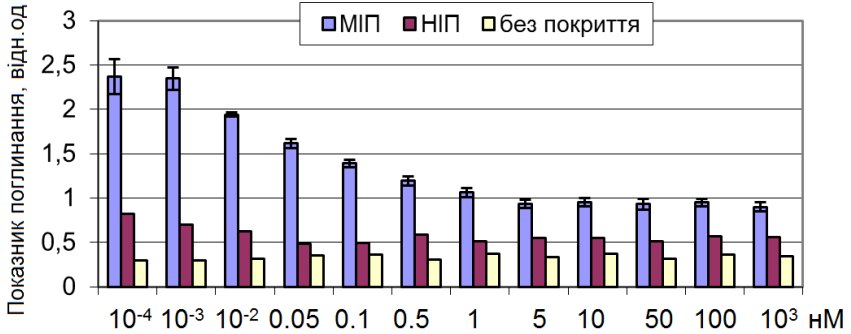


Рисунок 10 – Гістограма розподілу середньоарифметичних значень показника поглинання у лунках після проведення ферментативної реакції конкурентного аналізу

Аналіз рис. 11 вказує на те, що лінійний діапазон концентрацій знаходиться у межах 0.01 – 1 нМ. У даній роботі межа визначення меламіну становить 0.0058 нМ (5.8 пМ), що втричі менше, ніж ELISA-аналіз, що базується на антитілах. Слід зауважити, що в ході використання МППів на основі акрилонітрилу, змін у сигналі абсорбції практично непомітно (див. рис. 10 (для НІП)), що свідчить про низьку афінність таких МПП-наночастинок до меламіну.

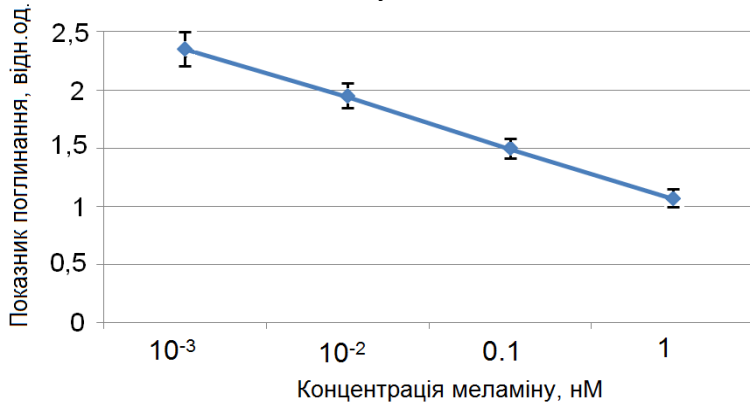


Рисунок 11 – Калібрувальний графік для визначення меламіну методом конкурентного псевдоімуноаналізу на основі МПП-наночастинок. Стандартне відхилення не більше 0.12

Проведені експериментальні дослідження (ТША) підтвердили, що МПП-наночастинки на основі АМПК можуть бути альтернативою антитілам (за афінністю) в ході визначення меламіну. В свою чергу, на МППи на основі акрилонітрилу (енергія взаємодії якого з меламіном у воді становила -3.29 ккал/моль, що вдесятеро менше, ніж для комплексу «АМПК-меламін» (-36.18 ккал/моль)), було неможливо створити «синтетичний рецептор» з високою афінністю до меламіну (див. на рис. 10 гістограму для НПП). Це підтверджує роль попередніх теоретичних розрахунків у науковому обґрунтуванні технології молекулярного імпринтингу щодо синтезу «синтетичних рецепторів».

Основні результати даного розділу опубліковані у працях [22, 24].

У п'ятому розділі наведено результати проведення обчислювального експерименту щодо прогнозування поведінки системи «МПП-рецептор-шаблон» за різних концентрацій рецептора та шаблону. Для цього було вперше адаптовано загальноживану схему ліганд-рецепторної взаємодії (див. схему 1) до моделювання кінетики утворення комплексів «шаблон»-«МПП-рецептор».



де L – ліганд; R – рецептор; LR – комплекс ліганду з рецептором, або ліганд-рецепторний комплекс; k_{+1} , і k_{-1} – константи швидкостей утворення (асоціації) і розпаду (дисоціації) ліганд-рецепторних комплексів.

З урахуванням закону діючих мас, базуючись на припущенні, що загальна кількість МПП-рецептора і ліганду в суміші підтримується постійною, для комплексу «шаблон – синтетичний рецептор» (1:1) (згідно зі схемою (1)), за відомих початкових концентрацій шаблону, МПП-рецепторів та їх комплексів, нами було побудовано математичну модель (див. 2):

$$\begin{cases} \frac{d[R]}{dt} = -k_1[R][L] + k_{-1}[LR], \\ \frac{d[L]}{dt} = -k_1[R][L] + k_{-1}[LR], \\ \frac{d[LR]}{dt} = k_1[R][L] + k_{-1}[LR]. \end{cases} \quad (2)$$

Методом Рунге-Кутта 4-го порядку було проведено чисельний розв'язок даної моделі. На рис. 12-13 наведено концентраційні профілі отриманих у ході комп'ютерного експерименту комплексів «шаблон – синтетичний рецептор».

Результати моделювання вказують на те, що досягнення рівноваги і, відповідно, утворення комплексу «шаблон»-«МПП-рецептор» значною мірою залежить від концентрації шаблону. Якомога точніша імітація реальних умов експерименту в ході обчислювального експерименту забезпечувалась урахуванням константи дисоціації, що була отримана з наших попередніх досліджень взаємодії «МПП-рецептор»-«шаблон» в умовах поверхневого плазмонного резонансу на обладнанні «Biacore 3000».

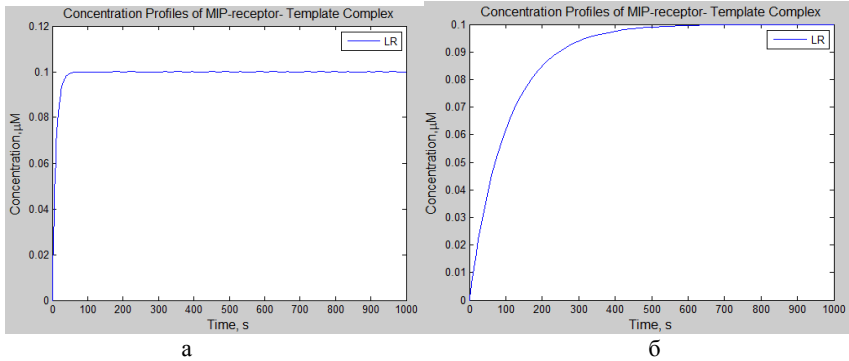


Рисунок 12 – Концентраційні профілі комплексу LR при $[L]_0 > [R]_0$ у: а) 100 разів ($[L]_0 = 10 \text{ мкМ}$) і б) у 10 разів ($[L]_0 = 1 \text{ мкМ}$)

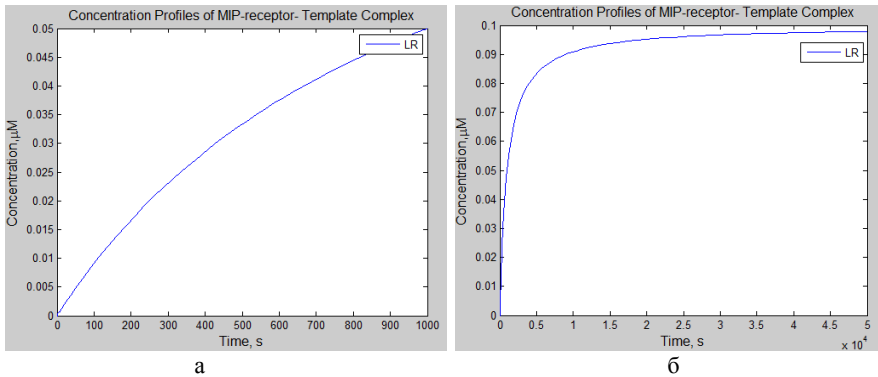


Рисунок 13 – Концентраційні профілі комплексу LR при $[L]_0 = [R]_0$ ($[L]_0 = 0.1 \text{ мкМ}$) при: а) $t = 50000 \text{ с}$; б) $t = 1000 \text{ с}$

Дана модель може використовуватися для дослідження кінетики взаємодії МПІв, що мають гомогенні сайти зв'язування. До таких МПІв належать МПІ-наночастинки, синтезовані за методом твердофазного синтезу.

Основні результати даного розділу опубліковані у статті [23].

ВИСНОВКИ

Дисертація є завершеною науковою роботою, в якій шляхом *теоретичного та експериментального встановлення* наявності ліганд-рецепторної взаємодії молекули шаблону (на прикладі популярних для визначення шаблонів) з «синтетичним рецептором» та *наукового обґрунтування технології* його створення було суттєво знижено гостроту *науково-прикладної проблеми* розробки електронних сенсорних пристроїв (з ліганд-рецепторним принципом розпізнавання) визначення хімічних речовин, яка полягала у необхідності вирішення протиріччя складності одночасного забезпечення таких характеристик сенсорів, як специфічність і висока чутливість (з одного боку) та стабільність роботи і низька собівартість виготовлення (з іншого).

Основні наукові та практичні результати роботи можна узагальнити у таких висновках:

1. Запропоновано та обґрунтовано концепцію створення сенсорних елементів з «синтетичними рецепторами» на основі нанорозмірних МППів, а також верифіковано її вихідні положення. Так, імпринтинг на поверхні зі скляними мікросферами з іммобілізованим шаблоном забезпечив створення МППів у вигляді наночастинок, що підтверджено незалежними методами (електронної мікроскопії та динамічного розсіювання світла). Високу афінність МПП-наночастинок ($K_d = 3.4 \times 10^{-9}$ М) було досягнуто тільки за умови використання науково обґрунтованого типу функціонального мономеру, що підтверджено даними ППР.

Запропонована методика твердофазного синтезу МПП-рецепторів може використовуватись як для меламіну, на прикладі якого проводилося дослідження, так і для інших речовин, які мають у своїй будові первинну аміногрупу (зокрема, антибіотиків різних класів).

2. Теоретично досліджено (квантово-хімічним методом теорії функціонала густини на рівні теорії Rwb97XD/6-31G(d)) молекулярну структуру та енергетичні характеристики передполімеризаційних комплексів «функціональний мономер – шаблон» у вакуумі, воді та ацетонітрилі. Як функціональні мономери розглядалися тринадцять мономерів з різними властивостями. Меламін використовувався як шаблон. Показано, що у воді й ацетонітрилі найбільш енергетично вигідними є комплекси меламіну з функціональними мономерами: АМПК ($E_{\text{bind}} = -36,2$ ккал/моль), ітаконовою кислотою ($E_{\text{bind}} = -13,5$ ккал/моль); та акриловою кислотою ($E_{\text{bind}} = -12,3$ ккал/моль). Результати експериментальних досліджень верифіковано незалежними методами: порівнянням з теоретичними результатами, отриманими нами раніше методом молекулярної механіки; порівнянням розрахункових даних розмірів водневих зв'язків SO...HN комплексу АМПК-меламін з експериментальними даними відомих структур молекулярних кристалів з Cambridge Structure Databank (CSD); експериментально (зважуванням наночастинок, ППР-дослідження).

Отримані результати енергій міжмолекулярної взаємодії «мономер-шаблон» та молекулярних структур дали можливість показати, що тип мономеру є вагомим фактором впливу на технологічний процес створення високоспецифічних «синтетичних рецепторів».

3. Методом теорії функціонала густини на рівні теорії Rwb97XD/6-31G(d) досліджено ліганд-специфічність «синтетичного рецептора» на меламін. АМПК, а також ітаконова та акрилова кислоти розглядалися як найкращі з потенційних функціона-

льних мономерів. Показано, що серед розглянутих мономерів саме АМПК найбільш придатна для подальшого синтезу «синтетичного рецептора» на меламін, оскільки найміцніші комплекси у даному випадку стали можливими завдяки особливостям просторової будови молекули АМПК, в якій фосфатна та карбонільні групи розташовані так, що є можливість без стеричних перешкод утворювати водневі зв'язки з функціональними групами молекули меламіна, атразина чи пеніциліна. Різниця в енергіях взаємодії (ΔE_{bind}) для передполімеризаційного комплексу «меламін-АМПК» та схожим за будовою атразином з АМПК становить біля -16.26 ккал/моль, як у воді, так і в ацетонітрилі, а для комплексів «пеніцилін-АМПК» – біля 20 ккал/моль відповідно. Для комплексів з іншими мономерами така різниця в енергіях не суттєва (біля 1 ккал/моль), що свідчить про можливість неспецифічної взаємодії даних мономерів з іншими шаблонами.

Отже, ΔE_{bind} між комплексами («шаблон» – «мономер») та («структурний аналог шаблону» – «мономер») є *вагомим фактором впливу* на технологічний процес створення штучних рецепторів, критерієм якості яких є *специфічність*, що також верифіковано експериментальними даними (псевдо-ELISA, ППР).

Запропонована алгоритмічна модель дає можливість прогнозувати специфічність мономера до різних речовин-мішеней за дослідженням параметрів комплексоутворення і визначенням типів специфічної міжмолекулярної взаємодії.

4. Експериментально досліджено залежність кількості синтезованих високоафінних наночастинок МППів (синтезованих з використанням окремих популярних низькомолекулярних молекул-шаблонів) від концентрації функціонального мономера з діапазоном зміни (1-5%); часу опромінення – (2.5 - 4.5 хв); температури під час УФ-полімеризації та температури вимивання низькоафінних фракцій – (10 - 30°C). Використанням статистичного методу «планування експерименту» (програмне забезпечення MODDE 9) дозволило втричі скоротити кількість дослідів, необхідних для оптимізації параметрів синтезу «синтетичних рецепторів» на меламін. Показано, що максимальний вихід МПП-наночастинок меламіну було досягнуто за таких параметрів: концентрація мономера 1.8-3.25%, час УФ-полімеризації 2.5-2.6 хв, температура під час опромінення і промивання від низькоафінних фракцій – 10°C. Кількісний вихід МПП-наночастинок, отриманих в одному виробничому циклі за оптимізованих умов, становив 25 мг, з константою дисоціації (K_d), рівною 3.4×10^{-9} М. Таке значення K_d менше, ніж 10^{-8} М (значення K_d , яке на практиці асоціюється з високою афінністю), що свідчить про високоафінність синтезованих МППів. Час полімеризації найістотніше впливає на кількість наночастинок на виході.

5. Розроблено *модель технологічного процесу*, що пов'язує *параметр оптимізації* (вихід високоафінних МПП-наночастинок) з *факторами впливу*: $y = \varphi(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5)$, де φ – функція відгуку (кількість високоафінних МПП-наночастинок на виході), X_1 – тип мономера ($E_{\text{bind}}, \Delta E_{\text{bind}}$), X_2 – концентрацію мономера, X_3 – час полімеризації, X_4 – температура промивання МПП-наночастинок, X_5 – температура, за якої відбувалась полімеризація.

6. Експериментально досліджено вплив ліганд-рецепторної взаємодії (приєднання молекул шаблону до МПП-наночастинок) на зміну електричного поля на поверхні металу в умовах ППР. Показано, що ліганд-рецепторна взаємодія синтезованих антимеламін МПП-наночастинок (з функціонального мономера – АМПК) з меламіном значно більше впливала на зміщення резонансного мінімуму ППР, ніж з атразином,

який належить до того самого хімічного класу. Це корелює з даними наших теоретичних досліджень, де вивчалися енергії взаємодій (E_{bind}) для комплексів «АМПК-меламін» та «АМПК-атразин» і становили відповідно -36.2 ккал/моль та -12.1 ккал/моль. Крім того, в ході ППР-експерименту визначено коефіцієнт дисоціації комплексу «синтетичний рецептор–меламін» ($K_d = 3.4 \times 10^{-9}$ М), що корелює з результатами, отриманими за допомогою моноклональних антитіл, з подібними до меламіну гаптенами. Дані результати вказують на те, що за рахунок науково обґрунтованого вибору типу мономера з використанням запропонованої технології імпринтингу на поверхні скляних мікросфер з іммобілізованим шаблоном можливо створити нанорозмірні МППи, які, будучи іммобілізованими на поверхні тонкого золотого шару, мають співставну з антитілами характеристику специфічності ($K_d = 10^{-9}$ М) в оптичних сенсорах третього покоління (що базуються на явищі ППР). Це підтверджує запроповану концепцію *адекватності використання* нанорозмірних МППів в елементах розпізнавання сенсорів, що використовують як *безміткові технології детектування* (зокрема, ППР-сенори).

7. Експериментально досліджено концентраційну залежність конкурентної взаємодії (за активні центри МПП-наночастинок, іммобілізованих на твердій фазі) кон'югату (ферментної мітки з шаблоном) та шаблону в умовах гетерогенного твердофазного імуноаналізу (ELISA). Показано, що межа визначення меламіну в ході використання синтезованих антимеламін МПП-наночастинок (з функціонального мономера – АМПК) становить 0.0058 нМ (5.8 пМ), що втричі менше, ніж ELISA-аналіз, що базується на антитілах. Слід зауважити, що в ході використання МППів на основі акрилонітрилу, змін у сигналі абсорбції практично непомітно, що свідчить про низьку афінність таких МПП-наночастинок до меламіну.

Це корелює з даними наших теоретичних досліджень, де вивчалися енергії взаємодій (E_{bind}) для комплексів «АМПК-меламін» та «акрилонітрил-меламін» і становили відповідно -36.18 ккал/моль та -3.29 ккал/моль, а також підтверджує роль попередніх теоретичних розрахунків у науковому обґрунтуванні технології створення сенсорних елементів із «синтетичними рецепторами».

Дані результати вказують на те, що за рахунок науково обґрунтованого вибору типу мономеру з використанням запропонованої технології імпринтингу на поверхні скляних мікросфер з іммобілізованим шаблоном можливо створити нанорозмірні МППи, які, будучи іммобілізованими в лунках полістирольного планшету, мають властивості високоафінних «синтетичних рецепторів» ELISA-пристроях. Це підтверджує запроповану концепцію адекватності використання нанорозмірних МППів в елементах розпізнавання сенсорів, зокрема, міткових.

8. Внаслідок теоретичного дослідження кінетики взаємодії «шаблон»-«МПП-рецептор», показано, що комплекс ($[LR]$) формується тим швидше, чим більша концентрація ліганду. При цьому і зростає швидкість досягнення рівноваги. Так, $[L]_0 > [R]_0$ у 100 разів ($[L]_0 = 10$ мкМ) рівновага досягається за 50 с; $[L]_0 > [R]_0$ у 10 разів ($[L]_0 = 1$ мкМ) – за 500 с; $[L]_0 = [R]_0$ ($[L]_0 = 0.1$ мкМ) – 50000 с.

Подібні дослідження доречні для прогнозування швидкості відгуку сенсора з «синтетичними рецепторами» за різних значень їх концентрації.

8. На основі результатів розв'язання перелічених вище завдань побудовано узагальнену схему технологічного процесу створення сенсорних елементів на базі наноМПП.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Музыка К.М. Технологія виготовлення полімерного мікрофлюїдного пристрою / К.М. Музыка, Бендебєря Г.М., Рожицький М.М. // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2008. – №4. – С.57-62.
2. Muzyka K. An approach to optimize the desing of microfluidic chips for electrophoretic separation / K. Muzyka K., M. Rozhitskii // *Microchim Acta*. – 2009. – Vol. 164. – P.257–262.
3. Музыка К.М. Системи капілярного електрофореза в електрохемілюмінесцентном анализе / К.М. Музыка, Н.Н. Рожицкий // *Журнал аналитической химии*. – 2010. – т.65, №6. – с.1-15.
4. Muzyka E.N. Systems of Capillary Electrophoresis in Electrochemiluminescence Analysis / E.N. Muzyka, N.N. Rozhitskii // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 65. – P. 550–564.
5. Музыка К.М. Новітні матеріали в електрохемілюмінесцентному аналізі / К.М. Музыка // *Східно-європейський журнал передових технологій*. – № 5/5 (47). – 2010. – С.20-23.
6. Музыка К.М. Електрохемілюмінесцентна сенсорика жовчних пігментів / К.М. Музыка // *Сенсорна електроніка та мікросистемні технології*. – 2011. – Т.2(8). – С.74-78.
7. Muzyka K. Electrochemiluminescent Determination of Bile pigments at testing of neonatal hyperbilirubinemia / K. Muzyka, O.M. Bilash, Y.T. Zhulodov, M.M. Rozhitskii // *Luminescence*. – 2010. – P. 204-205.
8. Muzyka K.M., Rozhitskii M.M. Microfluidic Electro-chemiluminescent detection devices with capillary electrophoresis (2011) *Microfluidics: Theory and Applications*. "Nova science publishing", NY, PP. 103 – 134. (chapter)
9. Музыка К.М. Наноелектродні ансамблі на базі мультистінних вуглецевих нанотрубок для електрохімічної сенсорики / К.М. Музыка, А.В. Кукоба, О.М. Білаш, М.М. Рожицький // *Східно-європейський журнал передових технологій*. – 2012. – №1/5(55). – С.32-35.
10. Muzyka K. Technology multiwalled carbon nanotubes-based nanoelectrode ensemble development / K. Muzyka, O. Bilash // *Nauka i Studia*. – 2012. – Vol. 11(56). – P. 97-103.
11. Muzyka K. Computational approach to investigation of template/monomer complex in melamine imprinted polymer / K. Muzyka, M. Rozhitskii // *Системи обробки інформації*. – 2012. – Вип. 2 (100). – С. 237– 240.
12. Muzyka K. Electrochemiluminescent determination of free unconjugated bilirubin in aquatic solution / K.Muzyka, Bilash O., Kukoba A., Rozhitskii M. // *Luminescence*, 2012, Vol. 27 (2), pp. 145-146.
13. Muzyka K. Numerical Experiment for Albumin Bounded Bilirubin Separation in Microfluidic Chip / K. Muzyka, O. Matviyiv // *Procedia Engineering*. – 2012. – Vol. 47. – P. 1358–1361.
14. Музыка К.М. Обчислювальний експеримент з сепарації альбумін зв'язаного білірубину в мікрофлюїдному чипі / К.М. Музыка, О.М. Матвійків// *Східно-європейський журнал передових технологій*. – 2012. – № 5/4 (59). – С.38-39.

15. Muzyka K. Current Trends in the Development of the Electrochemiluminescent Immunosensors / K. Muzyka // *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. – Vol. 54 – P. 393-407.
16. Muzyka K. Optimisation of the synthesis of vancomycin-selective molecularly imprinted polymer nanoparticles using automatic photoreator / K. Muzyka, K. Karim, A. Guerreiro, A. Poma and S. Piletsky // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. – Vol. 9(1). – P.154-161.
17. Музика К. Обчислювальний експеримент в обґрунтуванні вибору функціонального мономера для «штучного рецептора» на меламін / К. Музика // *Сенсорна електроніка та мікросистемні технології*. – 2014. – Т. 11. – № 1. – С. 33-41.
18. Muzyka K.M., Piletsky S., Rozhitskii M. Chapter. 5 MIP-based Voltammetric Sensors. in *Molecularly Imprinted Polymers: A Handbook for Academia and Industry*, Alvarez-Lorenzo C.; iSmithers, UK, 2013, 197-228. (Chapter)
19. Музика К. Метод теорії функціонала густини у дослідженні псевдоіммунологічної специфічності штучного рецептора на меламін / К. Музика // *Східноєвропейський журнал передових технологій*. – 2014. – № 5(6). – С. 22-26.
20. Музыка Е.Н. Планирование эксперимента в оптимизации синтеза ванкомицин-селективных «искусственных рецепторов» // *ScienceRise* 3(2) 14, 2014, с. 36-40.
21. Музыка К. Теоретическое изучение энергетических характеристик «искусственного рецептора» на меламин в предполимеризационной фазе / Музыка К. // *Журнала нано- и электронной физики*. – 2015. – Т.7. – № 1, 01017(5cc)
- Muzyka K. Theoretical study of energy characteristics of "artificial receptor" on melamine in pre-polymerization phase / K. Muzyka // *Journal of Nano- and Electronic Physics*. – 2015. – Vol. 7. – Article number 01017.
22. Музика К. М. «Штучні рецептори» на базі технології молекулярного імпринтингу в умовах поверхневого плазмонного резонансу / К.М. Музика // *Вісник НТУ «ХП»*. Серія: Механіко-технологічні системи та комплекси. – 2015. – № 10(11-12). – С.3–8.
23. Музыка К. Обчислювальний експеримент у вивченні кінетики реакції взаємодії «шаблон»-«штучний рецептор» / К. Музика // *Технологический аудит и резервы производства*. – 2015. – № 3(2). – С. 70-73.
24. Музыка К. Синтетичні антимеламін-рецептори на базі молекулярно імпринтованих полімерів для ферментного псевдоімуноаналізу / К. Музика, М. Рожицький // *Сенсорна електроніка та мікросистемні технології*. – 2015. – Т. 12. – № 2. – С.48-56.
25. Пат. № 60060 Україна, МПК G01N27/48. Мікрофлюїдний чип електрохемілюмінесцентного пристрою / К.М. Музика, М.М. Рожицький; заявник і власник Харківський національний університет радіоелектроніки; заявл. 18.11.2010; опубл. 10.06.2011, Бюл. №11, 4 с.
26. Музыка К.М., Рожицький М.М. Технологія виготовлення електрохемілюмінесцентного мікрофлюїдного пристрою / К.М. Музика, М.М. Рожицький // *Сенсорна електроніка та мікросистемні технології: 3-ї міжнародна наук.-техн. конференція, 2-6 червня 2008 р.:* тези доповіді. – Одеса, 2008. – С. 353.
27. Muzyka K. Electrochemiluminescent Microfluidic Sensor Fabrications Technology / K. Muzyka, M. Rozhitskii // *Euro Analysis 2009: XVth European*

Conference in Analytical Chemistry, 6-10 September 2009.: Abstracts book. – Innsbruck, Austria, 2009. – P. 104.

28. Музика К.М. Наноматеріали в електрохемілюмінесцентному аналізі / К.М. Музика, О.М. Білаш, А.В. Кукоба, І.В. Березовська, М.М. Рожицький // Аналітична хімія: Річна сесія наукової ради з проблеми, 14-19 травня 2011: тези доповіді-Гурзуф, Крим, Україна, 2011. – с.47.

29. Muzyka K. Nanoelectrode Ensemble Based on Multiwalled Carbon Nanotubes in Polymethylmethacrylate Film / K. Muzyka, A. Kukoba, O. Bilash, Y. Zholudov, and M. Rozhitskii // *Electrochemistry in Nano Structuration of Substrates and Energy: ELECNANO4 – 7th ECHEMS*, May 23-26, 2011: – Conference materials, Paris, France, 2011.

30. Muzyka K. Multiwalled Carbon Nanotubes-Based Nanoelectrode Ensemble / K. Muzyka, A. Kukoba, O. Bilash, and M. Rozhitskii // *Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications (IMA 2011): 7th International Conference*, 18-22 September 2011. – Conference materials, Chania, Greece, 2011. – PP273.

31. Музика К.М. Електрохімічні сенсори на базі наноелектродних ансамблів / К.М. Музика, О.М. Білаш, А.В. Кукоба, М.М. Рожицький // Функціональна компонентна база. Мікро-, опто і наноелектроніка: III Міжнар. наукова конф., 25-30 вересня 2011 р.: тези доп. – Кацівелі, Україна, 2011. – с. 67-68.

32. Muzyka K. Fabrication of Microfluidic Chip Based on Laser Ablation / K. Muzyka, O. Bilash, M. Rozhitskii // *MEMS Desing: VIIIth International Conference*, 17-20 квітня 2012 р.: тези доп. – Lviv-Polyana, 2012. – P.96.

33. Музика К.М. Технологія молекулярного імпринтингу в електрохімічних сенсорах // *Радиоэлектроника и молодёжь в XXI веке: XVI международный молодежный форум*. ч 1, 15-18 апреля 2012 г.: тезисы докл. – Харьков: ХНУРЭ, 2012. – С. 284-285.

34. Muzyka K. Numerical Experiment for Albumin Bounded Bilirubin Separation in Microfluidic Chip / K. Muzyka, O. Matviyiv // *Solid-State Transducers: The 26th European Conference*, 9-12 September 2012: Conference Materials – Krakow, Poland, 2012.

35. Muzyka K. Template/Monomer Complex Investigation in Melamine Imprinted Polymers / K. Muzyka, M. Rozhitskii // *Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology: 4th German-Ukrainian Symposium*, 18-20 September 2012: Conference Materials – Ilmenau, Germany, P. 38-39.

36. Muzyka K. Electrochemical Investigation of the Template/Monomer Complex in Melamine Imprinted Polymers / K. Muzyka, O.M. Bilash // *International Society of Electrochemistry: 63 Annual Meetings*, 19-24 August 2012: Conference Materials – Prague, Czech Republic, 2012.

37. Музика К.М. Обчислювальний підхід до дослідження темплат/мономерних комплексів меламін імпринтованих полімерів / К.М. Музика // Функціональна компонентна база. Мікро-, опто і наноелектроніка: V Міжнар. наукова конф., 25-30 вересня 2011 р.: тези доп. – Кацівелі, Україна, 2013. – С. 306-309.

38. Muzyka K. Design of Experiments Approach in Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles / K. Muzyka, S. Piletsky, K. Karim, A. Guerreiro, A. Poma // *Nanotechnology and nanomaterials: International research and practice*

conference, 25 August - 1 September 2013: Conference Materials – Bukovel, Ukraine, 2013. – P. 405.

39. Muzyka K. Computational Design of Supramolecular Receptors Against Melamine / K. Muzyka, K. Karim, S.A. Piletsky, M. Rozhitskii // Nanobiophotonics: Fundamental and Applied Aspects: 3rd Internat. conf., October 7-10, 2013, Conference Materials – B. Verkin Institute of Low Temperature Physics and Engineering, NASU., Kharkiv, Ukraine, 2013. – P. 101.

40. Музика К.М. Планування експерименту в оптимізації метода формування наночасток молекулярно імпринтованих полімерів / К.М. Музика, С. Пілецький, М.М. Рожицький // Функціональна база наноелектроніки: VI Міжнародна наука конференція 1-5 октября 2013 г.: тези докл. – Алушта, Україна, 2013. – С. 78-81.

41. Muzyka K. DFT calculations for rational design of electrochemiluminescent immuno-like assay of melamine / K. Muzyka // Electrogenerated Chemiluminescence: The 1st Internat. Meeting, 7-10 September 2014, Conference Materials – Bertinoro, Italy 2014.

АНОТАЦІЯ

Музика К.М. Наукові основи технології створення сенсорних елементів із синтетичними рецепторами. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук за спеціальністю 05.27.06 – технологія, обладнання та виробництво електронної техніки. – Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків, 2016.

Роботу присвячено розв'язанню науково-прикладної проблеми складності одночасного забезпечення високої специфічності і чутливості елементів розпізнавання хімічних сенсорів (з одного боку) та їх стабільності і низької собівартості виготовлення (з іншого). За рахунок проведення теоретичних досліджень ліганд-рецепторної взаємодії «шаблон – мономер» (з використанням сучасних квантово-хімічних методів класу теорії функціонала густини); розроблення технології молекулярного імпринтингу на поверхні скляних мікросфер з іммобілізованим шаблоном; застосування статистичних методів планування експерименту в ході оптимізації параметрів синтезу МПів було створено синтетичні рецептори, які є *монодисперсними МПП-наночастинками з великою кількістю гомогенних і доступних для молекул-мішеней ділянок молекулярного розпізнавання*. Експериментально підтверджено, що синтезовані МПП-наночастинки мають зіставну з моноклональними антитілами характеристику специфічності та покращену стабільність як у контексті елементів розпізнавання «безміткових» сенсорів, зокрема, на основі поверхневого плазмонного резонансу, так і у «міткових», – зокрема, ферментних псевдоімуносенсорах. Таким чином, науково обґрунтована технологія створення синтетичних рецепторів на основі наноМІ-Пів дозволила суттєво знизити гостроту зазначеної вище науково-прикладної проблеми розробки сенсорних пристроїв з системами молекулярного розпізнавання.

Ключові слова: технологія молекулярного імпринтингу, ліганд-рецепторна взаємодія, теорія функціоналу густини, наночастинки, полімеризація, хімічні сенсори, поверхневий плазмонний резонанс, гетерогенний твердофазний імуноаналіз, меламін.

АННОТАЦИЯ

Музыка Е.Н. Научные основы технологии создания сенсорных элементов с синтетическими рецепторами. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 05.27.06 – технология, оборудование и производство электронной техники. – Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков, 2016.

Работа посвящена решению научно-прикладной проблемы сложности одновременного обеспечения высокой специфичности и чувствительности элементов распознавания химических сенсоров (с одной стороны) и их стабильности и низкой себестоимости изготовления (с другой). За счет проведения теоретических исследований лиганд-рецепторного взаимодействия «шаблон - мономер» (с использованием современных квантово-химических методов класса теории функционала плотности); разработки технологии молекулярного импринтинга на поверхности стеклянных микросфер с иммобилизованным шаблоном; применения статистических методов планирования эксперимента при оптимизации параметров синтеза МИПов было создано синтетические рецепторы, которые являются монодисперсными МИП-наночастицами с большим количеством гомогенных и доступных для молекуламишеней участков молекулярного распознавания. Экспериментально подтверждено, что синтезированные МИП-наночастицы имеют сопоставимую с моноклональными антителами характеристику специфичности и улучшенную стабильность как в контексте элементов распознавания «безметковых» сенсоров, в частности, на основе поверхностного плазмонного резонанса, так и в «метковых», – в частности, ферментных псевдоиммуносенсорах. Таким образом, научно обоснованная технология создания синтетических рецепторов на основе наноМИПов позволила существенно снизить остроту указанной выше научно-прикладной проблемы разработки сенсорных устройств с системами молекулярного распознавания.

Ключевые слова: технология молекулярного импринтинга, лиганд-рецепторное взаимодействие, теория функционала плотности, наночастицы, полимеризация, химические сенсоры, поверхностный плазмонный резонанс, гетерогенный твердофазный иммуноанализ, меламина.

ABSTRACT

K.M. Muzyka. Scientific bases of technology of production recognition elements with synthetic receptors. – Manuscript.

Dissertations on scientific degree competition of the doctor of technical science in specialty 05.27.06 - technology, equipment and the development of electronic technics. – Kharkiv National University of Radioelectronics, Kharkiv, 2016.

The thesis is devoted to solving of the scientific and applied problem of difficulty simultaneous ensuring such analytical characteristics of the chemical sensors as of high specificity and sensitivity (with one hand) as well as stability, and low cost of production (on the other hand). The aims of this study was the development scientific bases of technology of creation synthetic receptors, based on molecularly imprinted polymers with affinity as their biological counterparts (such us monoclonal antibodies) and high stability and cheap production.

In order to estimate important factors which can be influence on affinity of molecularly imprinted polymers, as well as to determine and optimize technological parameters we have investigated “template – monomer” interaction using theoretical and experimental approaches.

Theoretical investigations of the binding energy (E_{bind}) of the imprinted molecule with functional monomers in pre-polymerisation complexes (1:1) were carried out using modern computational quantum chemical methods of density functional theory at Rwb97XD/6-31G(d) level of the theory in a vacuum, water and acetonitrile. In computational experiment thirteen monomers with different properties are considered as functional monomers. Melamine is used as a template. The calculation results have showed that three monomers, namely 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPSPA) ($E_{\text{bind}} = -36.18$ kcal / mol), itaconic acid ($E_{\text{bind}} = -13.48$ kcal / mol) and acrylic acid ($E_{\text{bind}} = -12.27$ kcal / mol), were identified as the best candidates for creation of molecularly imprinted polymers (MIPs) for melamine.

These data clearly indicated that the solvation energy of intermolecular complexes is determined mainly by the nature and characteristics of individual components which are part of the complex. That is why type of functional monomer is important synthesis parameters (factors) affecting the *yield* of MIP nanoparticles.

In order to predict *selectivity* of melamine-imprinted polymers, E_{bind} of AMPSPA, itaconic and acrylic acid were tested with atrazine, which is structure analogue of melamine. The difference in E_{bind} (ΔE_{bind}) between pre-polymerisation complex “melamine – AMPSPA” and “atrazine – AMPSPA” is about -16.26 kcal/mol in water and in acetonitrile. ΔE_{bind} for pre-polymerisation complexes with other monomers was not significant (around 1 kcal/mol) that indicating the possibility of non-specific interactions with other monomers data templates. Thus, (ΔE_{bind}) between pre-polymerisation complexes “template – monomer” and “template’s structure analog – monomer” can be recommended as important factor, which predict selectivity of “MIP-template” interaction.

In order to optimize other MIP-synthesis parameters (factors) affecting the high-affinity yield of MIP nanoparticles we have utilized experimental design (or design of experiments) approach. The factors chosen in the model were the amount of functional monomers in the polymerization mixture, irradiation time, temperature during polymerization, and elution temperature. Thus, the model of the technological process of nanoMIP production was developed, namely $y = \varphi(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5)$, where φ – response function (yield of high affinity MIP nanoparticles), X_1 – type of functional monomer (E_{bind} , ΔE_{bind}), X_2 – concentration of functional monomer, X_3 – time of polymerisation, X_4 – elution temperature, X_5 – temperature during polymerization.

It should be noted that the binding properties of the synthesized (under optimal conditions) anti-melamine MIP nanoparticles were analyzed by surface plasmon resonance (SPR) experiments (Biacore) using chips with immobilized templates. The apparent dissociation constants calculated for melamine nanoMIPs was $K_d = 3.4 \times 10^{-9}$ M.

Moreover, those MIP nanoparticles were investigated in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISE). The developed ELISE assay allowed the accurate determination of melamine with a limit of detection of 5.8 pM.

Correlation of theoretical and experimental data has proven that by using new approach for solid-phase synthesis MIP-nanoparticles under optimized parameters, it is possible to produce high-quality synthetic receptors which resemble, in practical terms, mono-

clonal antibodies, but are significantly cheaper and more stable. Such nanoMIP-base synthetic receptors can be used as a recognition elements in label- (e.g. ELISA) and label-free (e.g. SPR) chemical sensors. Moreover, technological schema of nanoMIP creation can be used in the future for up-scaling of MIP production for commercial application.

Thus, developed in this work science-based technology for creating synthetic receptors based on nanoMIPs has significantly reduce the acuteness of the above scientific and applied problems of the development of sensor devices with molecular recognition systems.

Keywords: molecular imprinting technology, ligand-receptor interaction, density functional theory, nanoparticles, polymerisation, chemical sensors, surface plasmon resonance, enzyme-linked immunosorbent assay, melamine.

Підп. до друку 03.02.2016. Формат 60x84 ¹/₁₆. Спосіб друку – ризографія.
Умов. друк. арк. 1,87 Ціна договірна. Тираж 100 прим.
Зам. № 1/4 від 05.02.2016 р. Ціна договірна.

Віддруковано в типографії ФОП Андреев К.В.
61166, Харків, вул. Серпова, 4
Свідоцтво про державну реєстрацію
Серія В00 № 966085 від 30.05.2003 р.