

Joanna Czulak

Temat: Polimery z odciskiem molekularnym – właściwości katalityczne otrzymanych układów

(ENG - Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers – catalytic activity of obtained materials)

Od 1931 roku wzrosło zainteresowanie polimerami z odciskiem molekularnym (*ang. Molecularly imprinted polymers - MIP*), co przełożyło się na ich wykorzystanie w rozmaitych dyscyplinach nauki. Materiały polimerowe MIP mogą posiadać różną morfologię poczynając od monolitów blokowych, kulistych mikrokropelek, kończąc na nano-hydrożelach, co czyni je atrakcyjnymi dla szerokiego zakresu zastosowań. MIP-y cechuje wysoka selektywność i specyficzność oraz duża wytrzymałość na skrajne warunki chemiczne, takie jak niskie/wysokie pH, temperatura lub wysokie stężenia rozpuszczalników organicznych. MIP-y zostały zaprojektowane jako kompatybilne materiały względem wielu grup docelowych, w tym peptydów, białek i innych związków makromolekularnych, a także związków małowcząsteczkowych, takich jak leki, ich metabolity, zanieczyszczenia, materiały wybuchowe itp. Wysoka zdolność MIP-ów do rozpoznawania molekularnego umożliwia również wykorzystanie ich jako katalizatorów lub analogów enzymów. W niniejszej pracy badania zostały skoncentrowane na wykorzystaniu kilku technik syntezy polimerów MIP, nadaniu im właściwości katalitycznych, kombinacji aktywności katalitycznej i rozpoznawania molekularnego lub wyłącznie właściwości rozpoznawania molekularnego względem enzymu. Badania opierały się odpowiednio na wykorzystaniu MIP-ów jako sztucznych enzymów, wprowadzając dodatkowo możliwości rozpoznawania molekularnego oraz poprzez zastosowanie naturalnych enzymów. W tym celu wytworzono trzy rodzaje materiałów z odciskiem molekularnym, pierwszy posiadający wewnętrzną aktywność katalityczną, drugi poprzez sieciowanie naturalnego enzymu jako monomeru oraz trzeci przez zastosowanie enzymu jako wzorca podczas syntezy polimeru.

Pierwszy etap badań polegał na przygotowaniu i zbadaniu właściwości katalitycznych polimerów z odciskiem molekularnym, które naśladują miejsca aktywne metaloenzymów. Synteza MIP-ów opierała się na polimeryzacji suspensyjnej monomerów funkcyjnych (4-winylopirydyny i akrylonitrylu) z trimetakrylanem trimetylopropanu jako środka

sieciującego w obecności jonów metali przejściowych i alkoholu 4-metoksybenzylowego jako wzorca. Do wytworzenia tych biomimetyków metaloenzymów wykorzystano mikroelementy najczęściej spotykane w naturalnych enzymach: Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} . W celu przygotowania katalizatorów, najpierw przeprowadzono sorpcję metali aby uzyskać odpowiednie obsadzenia centrów aktywnych. Katalizatory z odciskiem molekularnym zawierające jony Cu^{2+} , Co^{2+} i Zn^{2+} zostały z powodzeniem wykorzystane do utleniania hydrochinonu w obecności nadtlenu wodoru. Katalizator z jonami Mn^{2+} nie wykazywał aktywności ze względu na niewystarczające obsadzenie tym metalem. Natomiast katalizatory Cu^{2+} -MIP wykazywały największą aktywność katalityczną. W przypadku katalizatorów Cu i Co-MIP ich aktywność dodatkowo zwiększono dzięki zastosowaniu techniki odcisku powierzchniowego. Wszystkie otrzymane układy scharakteryzowano poprzez wykonanie analizy: chłonności w wodzie i 0,001 M roztworze HCl, zawartości azotu, porowatości, sorpcji i właściwości katalitycznych. Dodatkowo dla polimerów wytworzonych z jonami Cu^{2+} , Co^{2+} i Zn^{2+} przeprowadzono badania stabilności po okresie 10 i 18 miesięcy od syntezy.

Kolejna zastosowana technika łączy w sobie użycie MIP-ów do testów immunologicznych oraz metody bio-imprintingu naturalnych enzymów. W tym przypadku wykorzystano usieciowane nanocząstki białkowe (peroksydazy chrzanowej - HRP), które pełniły funkcję czynnika rozpoznającego i sygnalizującego w teście immunologicznym podobnym do techniki ELISA. Zastosowano metodę syntezy w obecności wzorca zaimmobilizowanego na stałym podłożu. Nanocząstki wytworzono wykorzystując HRP jako monomer funkcyjny i aldehyd glutarowy jako czynnik sieciujący, mający za zadanie utrwalenie sztywności wnęki wytworzonej wokół wzorca, zwiększenie stabilności operacyjnej oraz termicznej usieciowanych nanocząstek enzymów. Jako wzorzec zastosowano dwa antybiotyki: wankomycynę i ampicylinę. Właściwości enzymatyczne nanocząstek HRP są odpowiedzialne za zdolność sygnalizacyjną, podczas gdy ich właściwości rozpoznawcze są wynikiem procesu wdrukowania molekularnego. W celu opracowania testu podobnego do ELISA, wybrano kompetencyjny format, w którym docelową cząsteczkę unieruchomiono na dnie studzienek mikroplątek. Następnie usieciowane cząsteczki HRP z odciskiem molekularnym zostały użyte jako substytut zarówno do przeciwciał jak i koniugatu w tradycyjnym teście ELISA. Ponadto przeprowadzono testy wiązania i reaktywności krzyżowej usieciowanego HRP w obecności drugiego antybiotyku. Uzyskane wyniki wykazały duże powinowactwo i selektywność nanocząstek HRP w kierunku wzorca

zastosowanego podczas procedury nadruku molekularnego. Dodatkowo usieciowane nanocząsteczki HRP wykazały zwiększoną trwałość i stabilność termiczną w porównaniu z natywnym enzymem HRP.

Trzecia użyta metoda polegała na zastosowaniu techniki wdrukowania molekularnego do rozpoznawaniu enzymów, wytwarzając stabilizujące cząstki MIP, które jednocześnie wykazały powinowactwo do HRP. Preparaty te zostały przygotowane w celu sprawdzenia potencjalnego wykorzystania ich do stabilizacji lub zwiększenia aktywności katalitycznej enzymów oraz ich trwałości. Nanocząstki wytwarzano przez syntezę monomerów rozpuszczalnych w wodzie w obecności fazy stałej z zaimmobilizowanym HRP. Do syntezy użyto: N-izopropylakrylamidu, N-tert-butyloakrylamidu i kwasu akrylowego jako monomerów funkcyjnych i N, N'-metyleno-bisakrylamid jako środek sieciujący. Wielkość nanocząstek została określona metodą dynamicznego rozpraszania światła a ich stężenie przy użyciu spektrofotometru. Następnie przeprowadzono badania agregacji w ciągu 5 dni, które wykazały, że agregaty nanocząsteczkowe zwiększają swój rozmiar od 142,6 nm przy pierwszym pomiarze do około 240 nm, a następnie stopniowo zmniejszają się i ich rozmiar stabilizuje się przy 174,70 nm. W końcowej analizie stabilizujących MIP-ów zaobserwowano wpływ obecności nanocząsteczek na aktywność katalityczną HRP w różnych temperaturach (w temperaturze 4 °C, 18 °C, 37 °C i 58 °C) w ciągu 72 godzin. Wyniki potwierdzają, że MIP-y mogą zwiększyć trwałość HRP podczas przechowywania przez 72 godziny w temperaturze 4, 18 i 37 °C. Nano MIP-y nie wpływały na trwałość termiczną HRP w temperaturze 58 °C