

## РАЗДЕЛ III. ХИМИЯ

УДК 542.91:547.538

**Кострюкова Т.С., Васильев Н.В.**

*Московский государственный областной университет  
ФГУП “ГосНИИ Биологического приборостроения”*

### ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ХИМИИ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА И КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**T. Kostryukova, N. Vasilev**

*Moscow State Regional University  
State Scientific Center “State Research Institute of Biological Engineering”*

### PROSPECTS OF DEVELOPMENT OF CHEMICAL REAGENTS FOR IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS AND CLINICAL DIAGNOSIS

*Аннотация.* В работе обобщены сведения, позволяющие определить основные перспективы направлений разработки флуоресцентных реагентов, применяемых в иммунофлуоресцентных методах с временной задержкой, описаны необходимые требования к флуоресцентной метке. Особое внимание уделено фторированным β-дикарбонильным ароматическим и гетероароматическим соединениям – одному из наиболее эффективных классов реагентов для иммунофлуоресцентного анализа.

*Ключевые слова:* иммунофлуоресцентный анализ, люминесцентная метка, β-дикетон, экологический анализ, биоспецифическое связывание.

*Abstract.* The paper summarizes information, which allows one to determine the main promising directions in the development of fluorescent reagents used in immunofluorescence time-delay methods, and describes the requirements to a fluorescent label. Particular attention is paid to fluorinated β-dicarbonyl aromatic and heteroaromatic compounds, as one of the most efficient types of reagents for immunofluorescence analysis.

*Key words:* immunofluorescence analysis, fluorescent label, β-diketone, ecological analysis, biospecific binding.

Обнаружение и идентификация возбудителей инфекционных заболеваний занимают ключевое место при экологическом мониторинге природных очагов инфекций и в клинической лабораторной диагностике. Ввиду сложности задач такого анализа возникает ряд проблем, наиболее существенными из которых являются: низкая концентрация возбудителей в пробах из природных источников (вода, почва, воздух), материалах (суспензии из переносчиков, суспензии из органов животных), пробах из биологических жидкостей организма человека и животных (кровь, моча, ликвор и др.); возможное присутствие в анализируемых пробах нескольких болезнетворных агентов различных таксономических групп (бактерии, риккетсии, вирусы), сапрофитной микрофлоры, а также неспецифических мешающих примесей (пыль,

различные органические и неорганические вещества), затрудняющих учет и интерпретацию результатов [2; 4, 151; 5; 8].

К разрабатываемым реагентам иммунофлуоресцентного анализа – одного из основных видов анализа в медико-биологической практике, предъявляются жесткие требования эффективности и временной задержки люминесценции, длинам волн возбуждения и т. д. Все эти факторы определяют чувствительность, быстродействие, специфичность, производительность и возможности одновременного выявления в пробе нескольких биоагентов [2]. В настоящей работе освещены основные сведения, позволяющие определить основные перспективы направлений разработки флуоресцентных меток и особенно фторированных  $\beta$ -дикарбонильных ароматических и гетероароматических соединений, как одного из наиболее эффективных типов реагентов для иммунофлуоресцентного анализа. В настоящей работе не преследуется цель дать исчерпывающий обзор по флуоресцентным меткам, применяющимся в иммуноанализе. Достаточно полные обзоры по иммунофлуоресцентному анализу приведены в обзорных работах [2; 4, 151; 5; 8].

При проведении иммунофлуоресцентного анализа используется следующий общий принцип: при облучении образца «пучком» электромагнитного излучения метка, маркирующая акт биоспецифического взаимодействия, переходит в возбужденное состояние и затем излучает квант с длиной волны большей, чем длина волны возбуждения. Выбор метки чрезвычайно важен, поскольку достигаемый аналитический эффект не должен маскироваться свечением и рассеянием биологического материала, а также образцом полимерной подложки – пластика планшета. Требования к флуоресцентной метке: флуоресцентная метка должна высокоэффективно поглощать свет, молекулярная экстинкция  $\epsilon \geq 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; иметь высокий квантовый выход; различие между длинами волн возбуждения и флуоресценции должно превышать величину  $\geq 100 \text{ nm}$ ; обладать низкой неспецифической сорбцией на белках и поверхностях;

иметь определенную растворимость в воде, быть достаточно устойчивой фотохимически и термодинамически. Большое время жизни в возбужденном состоянии  $\geq 600 \text{ мкс}$ . также является необходимым для современного иммунофлуоресцентного анализа [2; 8].

**Метки, реализующие быструю люминесценцию.** Наибольшее распространение на первоначальном этапе развития иммунофлуоресцентного анализа получили метки на основе ксантеновых красителей – производных 9-фенилксантена. Наиболее известными являются флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ), родамин изотиоцианат (РИТЦ) и другие [10; 15; 18]. Эти соединения до сих пор практически применимы в медико-биологической практике. Мечение этими соединениями осуществляется за счет присоединения тиоизотиоцианатной группы к нуклеофильным группам – главным образом аминным группам, биологических молекул, реже упоминается присоединение по тиоловым группам еще реже по гидроксильным. Такое присоединение достаточно эффективно осуществляется в водных растворах при pH, близких к нейтральным, однако во многих случаях требует применения больших избытков реагентов.

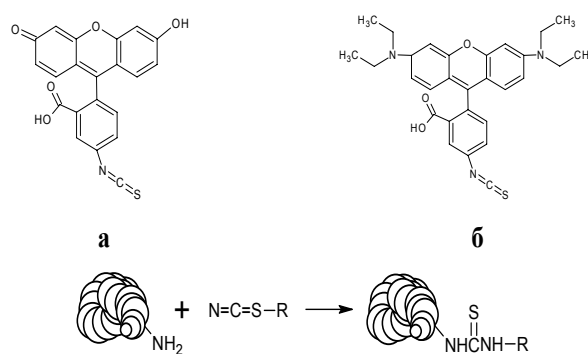


Рис. 1. Формулы ФИТЦ (а), РИТЦ (б) и типовая реакция присоединения изотиоцианатных меток к белку.

Аналитический эффект в этих методиках иммунофлуоресцентного анализа основан на регистрации поляризации ФИТЦ при биоспецифическом связывании пары реагент – аналит, один из компонентов которой был

конъюгирован с меткой [12]. При этом, чем сильнее изменяется сигнал люминесценции меченых ФИТЦ молекул анализируемого вещества, связанного с антителами, тем выше концентрация искомого аналита в пробе. Метки типа ФИТЦ характеризуются высокими коэффициентами экстинкции, высокими квантовыми выходами, однако обладают малым стоковым сдвигом, фотовыцветаемы и имеют низкие временные задержки люминесценции, что определяется «быстрым» механизмом их люминесценции [2]. Ксантоновые красители ряда флуоресцеина и родамина в настоящее время модифицированы и содержат в качестве функциональных групп сукцинимидные [3], малеинимидные фрагменты ( N-(7-диметиламино-4-метил-2-окси-3-хроменил) малеимид ДАКМ) [16]. Некоторые реагенты, разработанные на ранних стадиях развития анализа, содержат карбоксильные группы, и их мечение осуществляется “in situ” сшивающим реагентом – дициклогексилкарбодиимидом. Такие метки, к примеру, эритрозин [17], а также карбоксилсодержащие порфирины и хлорины, характеризуются чрезвычайно высокими значениями квантовых выходов и экстинкции, например, копропорфирин (I) [2; 9]. Рассмотренные структуры люминесцентных меток характеризуются быстрой люминесценцией, что ограничивает чувствительность в методиках медико-биологического анализа при их применении.

**Реагенты, применяемые в иммунофлуоресцентных методах с временной задержкой.** Основные достижения современного иммунофлуоресцентного анализа связаны с развитием методик с использованием длительно люминесцирующих реагентов, – комплексов редкоземельных металлов (Eu, Tb, Sm, Dy) или комплексов металлов группы платины (Pt, Pd). Преимуществом этих комплексов являются длительные времена жизни возбужденных состояний, вследствие механизмов их люминесценции. Регистрация эмиссии кванта осуществляется в стробоскопическом режиме флуориметрами, позволяющими измерять флуоресценцию с разным временем задержки относительно возбужда-

ющих импульсов (рис. 2) [11]. В связи с “отсечением” короткоживущей люминесценции, флуоресцентный иммуноанализ с временным разрешением в милли- и микросекундном диапазоне времен затухания люминесценции позволяет регистрировать предельно низкое содержание люминесцентных меток ( $10^{-14}$  М и более для ионов европия [13]). Анализ проводится как в объеме пробы, так и на твердой фазе, и в мультианалитном варианте анализа на биочипах с несколькими флуорохромами.

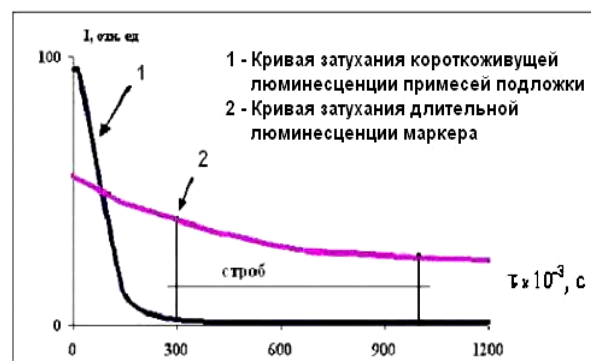


Рис 2. Регистрация фосфоресценции с временным разрешением

В объемных методах наибольшее распространение в последние 30 лет получили методы лантанидного иммунофлуоресцентного анализа (ЛИФА) [2; 8]. Для мечения биоспецифического взаимодействия в этом методе применяются тиоизоцианатные производные полиаминокарбоновых кислот, а главным компонентом в составе усиливающего раствора является ароматический фторированный β-дикетон. Как правило, это 2-нафтоилтрифторцетон (НТА), который перехватывает  $\text{Eu}^{+3}$ , выполняя роль комплексона иона и фотосенсибилизатора.

Образующийся в результате перекомплексообразования комплекс  $\text{Eu}^{+3}$  с β-дикетоном, собственно, и детектируется люминесцентным методом.

**Метки на основе фторированных β-дикетонов.** Фторированные β-дикетоны давно привлекают внимание как эффективные комплексоны металлов, применяемые в иммунофлуоресцентном анализе [21]. Наибо-

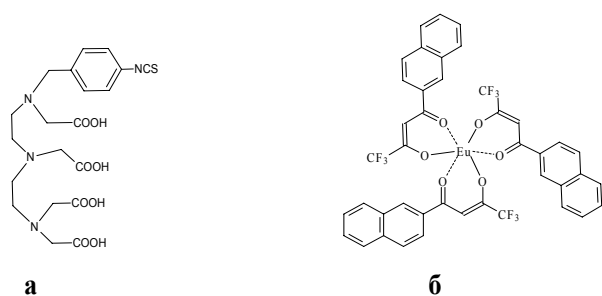


Рис. 3. Тиоизоцианатное производное ДТПА (а) и комплекс НТА-Eu (б)

лее перспективными считаются комплексы фторированных  $\beta$ -дикетонатов, содержащие ароматические и гетероароматические заместители, что определяется повышенной устойчивостью этих комплексов, особенно в кислых средах, а также хорошими хромофорными свойствами [21]. Люминесценция комплексов РЗЭ существенно «тушится» при гидратации, однако при создании комплексов на основе фторированных гидрофобных  $\beta$ -дикетонатов, вода эффективно вытесняется из внутренней сферы [19]. Перспективы разработки меток на основе  $\beta$ -дикетонатов преследуют цель избавиться от недостатков, присущих разделительным технологиям (метод «Дельфия»). Сокращение трудоемкой и длительной стадии перекомплексообразования в настоящее время реализовано рядом авторов. Одним из примеров молекулярного конструирования  $\beta$ -дикетонатных меток явился синтез фторированного тетракетона на основе дибензотиофена, который подшивается к белкам за счет хлорсульфонильных групп [23]. Определение антител по методике с временной задержкой с использованием этого реагента имеет чувствительность на уровне  $10^{-15}$ М.

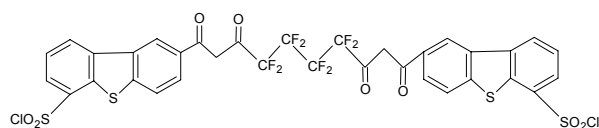


Рис. 4. Формула BCOT

Другой тип тетракетонатов разрабатывался на основе *o*-терфенила японскими ( $C_3F_7$ ) [22] и китайскими исследователями ( $CF_3$ ) [20]. Эффективность реагентов в медико-биологическом анализе с временным разрешением подтверждена при разработке ДНК-гибризационного анализа, а также в серодиагностике тиреотропных гормонов человека.

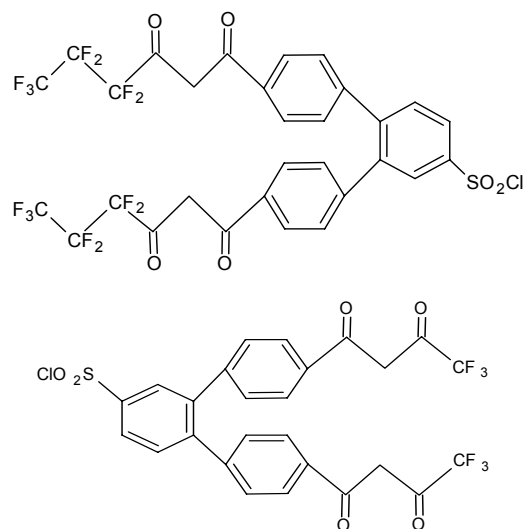


Рис. 5. Производные *o*-терфенила

В последние годы в нашей стране разработаны реагенты для иммунофлуоресцентного анализа, сравнимые, и даже превосходящие зарубежные аналоги. Существенный вклад в разработку этих реагентов внесен научной химической школой Московского государственного областного университета в сотрудничестве с Институтом биологического приборостроения МЗ РФ. Синтезирован ряд фторированных тетракетонатов и тетракетондиэфиров – производных нафталина, которые выгодно отличаются от НТА повышенной устойчивостью их комплексов с  $Eu^{3+}$  [1]. Фторированные гетероциклические  $\beta$ -дикетонаты опубликованы в качестве новых аналитических реагентов комплексообразующего типа, для допирования наночастиц и для использования в области люминесцентно-спектрального анализа, в частности, для клинической диагностики объектов биогенного происхождения [3; 7].

HetAr-C(O)CH<sub>2</sub>C(O)CF<sub>3</sub>, где HetAr

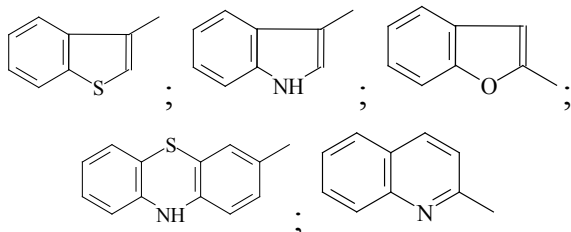
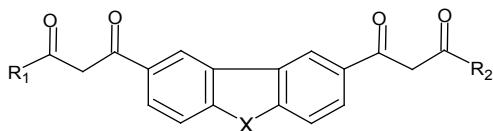


Рис 6. Фторированные бензогетероциклические β-дикетоны

Тетракетоны на основе флуорена, карбазола, дибензофурана и дибензотиофена, в которых содержатся различные полифторалкильные заместители, изучены в работах [6; 7].



Где R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: -CF<sub>3</sub>; -C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>; -C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>; -C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>; -CF<sub>2</sub>OCF<sub>3</sub>; -CHF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> и др., X=CH<sub>2</sub>, S, O, NH

Рис 7. Фторированные дибензогетероциклические β-дикетоны

Особенно интересными являются производные флуорена и особенно карбазола, которые имеют максимумы возбуждения люминесценции, расположенные в области свыше 360 нм, что позволяет использовать для возбуждения в случае карбазольных комплексов дешевые светодиоды. Соединения образуют стабильные комплексы с Eu<sup>3+</sup>, не диссоциирующие вплоть до концентраций 10<sup>-11</sup> – 10<sup>-12</sup> М. Приведены данные о включении европейских комплексов в меламиноформальдегидные латексные частицы, проведен иммуноанализ тиреотропного гормона человека с использованием в усиливающем растворе разработанных реагентов. Уникальные свойства полученных реагентов и их комплексов позволили осуществить на их основе получение ковалентно связанных наночастиц различных типов, применимых в целях иммунофлуоресцентного анализа, в том числе для создания биочипов [4, 151].

Следует констатировать, что на сегодняшний день не создано оптимальной флуорес-

центной метки на основе β-дикетонатных хелатов ионов редкоземельных элементов. Постоянно возрастающие требования к экологическому и медико-биологическому клиническому анализу диктуют необходимость разработки новых, все более совершенных аналитических реагентов. В последние годы специалистами Московского государственного областного университета в сотрудничестве с Институтом биологического приборостроения МЗ РФ разработаны новые перспективные реагенты для конъюгирования с белками и для создания нано- и микродисперсий. Дальнейшее совершенствование таких реагентов может существенно улучшить возможности проведения безразделительного иммунофлуоресцентного анализа, а также создаст препаративную базу для создания флуоресцирующих нано- и микрочастиц, нашедших применение в биочипах.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Васильев Н.В., Романов Д.В., Лямин А.И. и др. Синтез фторированных тетракетонов и дикетоэфиров и люминесцентно-спектральные свойства их комплексов с ионами лантаноидов // Известия РАН. Сер. Хим. 2006. № 2. С.269-273.
2. Злобин В.Н., Осин Н.С., Помелова В.Г. Перспективы совершенствования средств индикации на основе иммунофлуоресцентного анализа // Вестник Российской академии медицинских наук. 1999. №8. С. 8-15.
3. Каталог компании НАНОТЕХ-С, красители для модификации белков и пептидов [Электронный ресурс] // URL: <http://www.nanotex-c.ru/content/section/2/9/> (дата обращения 22.09.2011).
4. Кострюкова Т.С., Ивановская Н.П., Васильев Н.В. и др. Новые аналитические реагенты и методы иммунофлуоресцентного экологического анализа // Материалы VIII Всероссийской конференции «Экоаналитика 2011». Архангельск, 26 июня – 2 июля 2011г.: Изд-во Северного (Арктического) федерального ун-та, 2011. 310 с.
5. Кострюкова Т.С., Васильев Н.В., Ивановская Н.П. и др. Новые комплексы европия для иммунофлуоресцентного анализа биоспецифических взаимодействий // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2009. № 4. С. 33-40.
6. Патент РФ № 2296756. Комплексообразующие дибензосодержащие пятичленные циклические соединения, содержащие два симметричных

- бета-дикарбонильных заместителя с фторированными радикалами / Романов Д.В., Осин Н.С., Васильев Н.В. и др. // от 17.05.05 г., опубл. 10.04.07 г.
- Патент РФ № 2373200. Комплексообразующие бензосодержащие гетероциклические соединения, содержащие бета-дикарбонильный заместитель с фторированными радикалами / Романов Д.В., Лямин А. И., Ивановская Н.П., и др. // от 27.04.09 г., опубл. 20.11.09 г.
  - Савицкий А.П. // Итоги науки и техники. Сер. "Биотехнология". 1987. Т. 3. С. 117-166.
  - Савицкий А.П., Папковский Д.Б., Березин А.В. Флуоресцентный иммуноанализ. Порфирины – новый тип меток для иммуноанализа.//ДАН СССР. 1987. № 293. С. 744-748.
  - Brandtzaeg P. Rhodamine conjugates: specific and nonspecific binding properties in immunohistochemistry // Ann.N.Y.Acad.Sci. 1975. № 254. P. 35-54.
  - Diamandis E. P. Immunoassays with time-Resolved fluorescence spectroscopy: Principles and applications // Clin. Biochem. 1988. № 21. P. 139-150.
  - Gutierrez M.C., Gomez-Hens A., Perez-Bendito D. Immunoassay methods based on fluorescence polarization // Talanta. 1989. Vol. 36, № 12. P. 1187-1201.
  - Jamada S. Highly sensitive laser fluorometry of europium (III) with 1,1,1-trifluoro-4-(2-thienyl)-2,4-butanedione// Anal.Chem.Acta. 1981. № 127. P. 195-198.
  - Osin N.S., Pomelova V.G. Multi-array immunophosphorescence technology for the detection of pathogens // Frontiers in research. New Jersey, 2008. № 24. P. 233-240.
  - Savitsky A.P., Chudinov A.V., Krilova S.M. // Advances in Fluorescence Sensing Technology / Ed.J.R. Lakowicz.-SPIE, 1995. V. 2388. P. 429-434.
  - Sekine T. and all. Fluorescent thiol reagents. V. Microfluorometry of thiol compounds with a fluorescent-labeled maleimide // Anal.Biochem. 1972. № 48. P. 557-568.
  - Sidki A.M., Smith D.S., Landon J. Direct homogeneous phosphoroimmunoassay for carbamazepine in serum // Clin.Chem. 1986. №32. P. 52-56.
  - Steinbach G., Mayersbach H. Characterization of fluorescein isothiocyanate. II. Absorption and fluorescence after conjugation to human- and rabbit-gamma-globulin and bovine serum albumin// Acta Histochem. 1976. № 55. P. 110-123.
  - Voloshin A.I., Shavaleev N.M., Kazakov V.P. Water enhances photoluminescence intensity of Eu and Sm tris- $\beta$ -diketonates in toluene solution// J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2000. № 136. P. 203-208.
  - Wu F.B., Zhang C. A new europium  $\beta$ -diketone chelate for ultrasensitive time-resolved fluorescence immunoassays // Anal. Biochem. 2002. № 311. P. 57-67.
  - Xu Y-Y., Hemilla I.A., Lovgren T. N.-E. Co-fluorescence effect in time resolved fluoroimmunoassays // Analyst. 1992. № 117. P. 1061-1069.
  - Yuan J., Matsumoto K. A new tetradentate  $\beta$ -diketonate-europium chelate that can be covalently bound to proteins or time-resolved fluoroimmunoassay // Anal. Chem. 1998. № 70. P. 596-601.
  - Yuan J., Matsumoto K. Synthesis of a new tetradentate beta-diketonate-europium chelate and its application for time-resolved fluorimetry of albumin//J. Pharm.Biomed.Anal. 1997. №15. P. 1397-1403.