
СОДЕРЖАНИЕ

Том 77, номер 4, 2022

**Номер содержит работы по анализу
биомедицинских объектов.
Редактор-составитель – Б.Б. Дзантиев**

Вступительное слово 297

ОБЗОРЫ

Пределы обнаружения иммуноаналитических систем: лимитирующие факторы
и способы снижения

А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев 298

Применение низкотоксичных квантовых точек нового поколения
структуры I–III–VI₂ в анализе

*Т. С. Пономарева, А. С. Новикова, А. М. Абрамова, О. А. Горячева,
Д. Д. Дрозд, П. Д. Строкин, И. Ю. Горячева* 312

Сухие образцы биологических жидкостей на пористых мембранах – перспективный метод
пробоподготовки для биомедицинской и ветеринарной диагностики

Ж. В. Самсонова, Н. Ю. Саушкин, А. П. Осипов 321

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Ацетилхолинэстеразный сенсор на основе композита пиллар[6]арена
и наночастиц серебра для определения лекарственных препаратов
для лечения болезни Альцгеймера

*Р. В. Шамагсумова, А. В. Васюк, Д. Н. Шурник, В. Г. Евтюгин,
И. И. Стойков, Г. А. Евтюгин* 343

Перспективы использования хромато-масс-спектрометрии для определения
липидов в клинической кардиολипидологии

*А. В. Алесенко, М. А. Шупик, У. А. Гутнер, Д. А. Затейщиков, Л. О. Минушкина,
А. А. Рогожина, А. Т. Лебедев, О. А. Малошицкая, С. А. Соколов, И. Н. Курочкин* 354

Планшетный хемилюминесцентный метод определения микроРНК-141, основанный
на применении каталитической сборки шпилек и конъюгата стрептавидина
и полипероксидазы

О. Л. Бодулев, И. Ю. Сахаров 366

Пьезоэлектрический иммуносенсор на основе магнитных углеродных
нанокомпозитов для определения ципрофлоксацина

Е. В. Бизина, О. В. Фарафонова, Н. И. Золотарева, С. С. Гражулене, Т. Н. Ермолаева 375

Методика поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения
дибутилфталата в воде

В. С. Барановская, А. Н. Берлина, С. А. Еремин 384

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО

DOI: 10.31857/S0044450222040065

Уважаемые коллеги!

В данном выпуске “Журнала аналитической химии” представлены работы по биохимическим методам анализа, одному из важных и активно развивающихся направлений аналитической химии. В основе этих методов лежат реакции, осуществляемые с использованием специфических биологических молекул — ферментов, антител, рецепторов и др. Биохимические взаимодействия обеспечивают возможность выявления целевых соединений в сложных, многокомпонентных пробах. Существующее разнообразие биохимических реагентов позволяет разрабатывать методы обнаружения и оценки содержания аналитов разного строения и свойств — от тяжелых металлов, пестицидов и антибиотиков до вирусных частиц и бактериальных клеток. Возможности этих методов анализа в последние годы неуклонно расширяются благодаря применению молекулярного дизайна новых рецепторных молекул с управлением их аффинностью и селективностью, использованию разнообразных наномаркеров и их сочетаний для достижения минимальных пределов обнаружения, разработкам новых подходов для проведения внелабораторного и многоком-

понентного анализа. В настоящее время коммерчески доступны био- и иммунодиагностические наборы для определения широкого круга соединений, используемые в практике медицинской и ветеринарной диагностики, экологического мониторинга, контроля качества и безопасности потребительской продукции. Но биохимический анализ — интенсивно развивающаяся область, в которой многое еще находится на уровне научных исследований.

Работы в данном номере журнала направлены в основном на анализ объектов для целей медицины. Авторы статей — ведущие российские специалисты в области биоаналитической химии. Не претендуя на представление всех направлений исследований, подготовленный спецномер “Журнала аналитической химии”, надеемся, позволит оценить разнообразие и уровень современных отечественных разработок и привлечет внимание аналитического сообщества к возможностям биохимического анализа.

Редактор-составитель выпуска

доктор химических наук, профессор Б.Б. Дзантиев

УДК 543.57.083.3

ПРЕДЕЛЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ: ЛИМИТИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ

© 2022 г. А. В. Жердев^а, Б. Б. Дзантиев^а, *

^аИнститут биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 10.09.2021 г.

После доработки 06.10.2021 г.

Принята к публикации 06.10.2021 г.

Одним из приоритетных направлений развития современных иммуноаналитических систем стало обеспечение достоверного выявления и определения все более низких концентраций аналитов. В этой связи востребована оценка факторов, влияющих на предел обнаружения и лимитирующих дальнейшее снижение этой величины. В мини-обзоре рассмотрено разнообразие иммуноаналитических систем, теоретические оценки их пределов обнаружения. Охарактеризованы возможности снижения предела обнаружения, предоставляемые изменением состава определяемых иммунных комплексов, использованием новых маркеров, включаемых в эти комплексы, различными способами их регистрации и усиления регистрируемого сигнала. Обсуждаются подходы, предлагаемые для выявления в тестируемых пробах единичных молекул целевых соединений.

Ключевые слова: иммуноаналитические методы, иммунные комплексы, маркеры, предел обнаружения, способы усиления сигнала, выявление единичных молекул.

DOI: 10.31857/S0044450222040156

Иммунохимические методы выявления и определения содержания различных соединений, основанные на применении антител, нашли широкое применение в современной практике – в медицинской и ветеринарной диагностике, контроле качества и безопасности потребительской продукции (прежде всего, продуктов питания), экологическом мониторинге [1, 2]. Все иммунохимические методы основаны на образовании комплекса антител с определяемым антигеном (аналитом), который регистрируется инструментально или визуально. Разнообразные наборы реагентов и методики определения отличаются как по схемам формирования иммунных комплексов и способам их регистрации, так и по используемым препаратам антител, которые могут связывать целевые соединения с разной аффинностью и специфичностью [3]. В этой связи востребовано сравнение доступных пользователю вариантов, при выборе из которых крайне важную роль играет предел обнаружения – минимальная выявляемая концентрация целевого соединения. Для обоснованного сравнения данная величина должна быть корректно установлена; особенно решения этой задачи неоднократно обсуждались применительно к биоаналитическим системам [4–6].

Чтобы аналитическая методика имела практическую ценность, предел обнаружения должен быть ниже или равен концентрации, являющейся пороговой для принятия решения на основании результатов анализа пробы (например, предельно допустимой концентрации в пище опасного для здоровья вещества или концентрации биомаркера в крови, разграничивающей здоровых и больных пациентов). Это требование необходимо, но не достаточно. На сегодняшний день для большинства значимых биологически активных веществ уже предложены аналитические методики с пределами обнаружения, достигшими эти пороговые уровни. Однако поиск методик с еще меньшими пределами обнаружения продолжается [7–11]. В чем состоят преимущества таких разработок? Во-первых, информация о присутствии контролируемого соединения даже в концентрации ниже пороговой также позволяет делать значимые выводы. Например, концентрация биомаркера некоторой патологии еще недостаточно высока, чтобы говорить о заболевании, но свидетельствует о возможных угрозах для здоровья в будущем и целесообразности профилактических мер. Во-вторых, снижение предела обнаружения, как правило, сопровождается ростом точности определения концентраций аналита,

близких к пороговым. В-третьих, низкий предел обнаружения обеспечивает запас при работе с многокомпонентными пробами биологического происхождения, матрица которых может влиять на формирование специфических комплексов и генерацию регистрируемого сигнала. В таких ситуациях простое разбавление пробы значительно снижает влияние матрицы на получаемые результаты.

Существуют и исключения, когда для аналитической методики оптимален строго определенный предел обнаружения. Как правило, это присуще унифицированным методикам с фиксированным разведением пробы (автоматические анализаторы) или без разведения (полевые обследования), когда информация о достижении пороговой концентрации достаточна для дальнейших действий, например, для отбраковки коммерческих продуктов с превышением нормативных требований по уровню контаминант. Однако в большинстве случаев предельно низкий уровень выявляемых концентраций все же востребован.

Стремление ко все более низким пределам обнаружения влияет и на научные разработки. В ведущих журналах, специализирующихся в области биоаналитических методов, доминируют статьи, описывающие установление рекордно низких пределов обнаружения применительно к тому или иному практически востребованному аналиту. Такая гонка иногда негативно сказывается на качестве и значимости результатов разработок. Встречаются статьи, в которых предложенные изменения аналитической методики не сопровождаются значительными изменениями регистрируемого параметра и не должны были бы вызвать столь существенный сдвиг предела обнаружения, который, тем не менее, декларируется авторами без объяснения причин и не подтверждается в последующих публикациях.

В этой ситуации важно понимать, какие пределы обнаружения в принципе могут быть достигнуты при известных характеристиках компонентов иммуноаналитической системы – константах взаимодействия реагентов, соотношении между концентрацией образующегося иммунного комплекса и величиной генерируемого им сигнала. Эта информация позволяет научно обоснованно относиться к достигаемым пределам обнаружения, подразделяя их на потенциально возможные и нереалистичные. Более того, знания о том, какие факторы лимитируют снижение предела обнаружения, служат основой при выборе наиболее перспективных подходов к дальнейшему совершенствованию аналитических систем и корректного планирования их разработок.

Данный мини-обзор посвящен рассмотрению факторов, лимитирующих пределы обнаружения

иммуноаналитических систем, и путей преодоления существующих ограничений.

ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАТОВ ИММУНОАНАЛИЗА

Иммуноаналитические методы основаны на применении антител или их производных в качестве рецепторных молекул. Способность антител связываться с высокой аффинностью с самыми различными соединениями (антигенами) обеспечивается генетической вариабельностью определенных участков этих молекул и осуществляемом в организмах животных отборе клонов продуцирующих антитела клеток при контакте с соответствующим антигеном (клонально-селекционная теория) [12], а также дополнительными процессами диверсификации антител в организме [13]. Разработан ряд протоколов, позволяющих получать *in vivo* или *in vitro* высокоспецифичные антитела [14–16]. Количество вариантов антител разной специфичности, которые могут быть наработаны этими методами, оценивается в десятки миллионов, а последующая генно-инженерная модификация антигенсвязывающих сайтов антител еще больше увеличивает их разнообразие. При этом, если ранние методики позволяли получать антитела лишь к биополимерам, то на сегодняшний день имеется множество антител, связывающихся с различными низкомолекулярными соединениями и даже с ионами металлов [17, 18], селективно распознающих близкие по структуре молекулы. В каталогах ведущих фирм представлены десятки тысяч препаратов антител к различным соединениям.

Иммуноаналитические разработки начинались с методик, в которых комплексообразование антиген–антитело регистрировалось без дополнительных реагентов, например, по формированию в растворе мутного преципитата или осаждению иммунного комплекса в виде наблюдаемого невооруженным глазом осадка. Однако величины пределов обнаружения для таких методик были весьма высокими, и их применение было оправдано лишь для немногих соединений с высоким содержанием в биопробах [19]. Для преодоления этого ограничения было предложено мечение иммунореагентов соединениями, выявляемыми в низких концентрациях. В качестве таких маркеров в разных разработках применяют изотопы, ферменты, флуорофоры [20]. Чтобы измерить количество образовавшихся иммунных комплексов, успешно используется иммобилизация реагентов на носитель и его отмывка после проведения иммунной реакции, удаляющая несвязавшиеся реагенты и компоненты пробы (гетерогенные схемы анализа). Существуют и безразделительные (гомогенные) схемы анализа, однако они требуют существенных изменений свойств маркера при

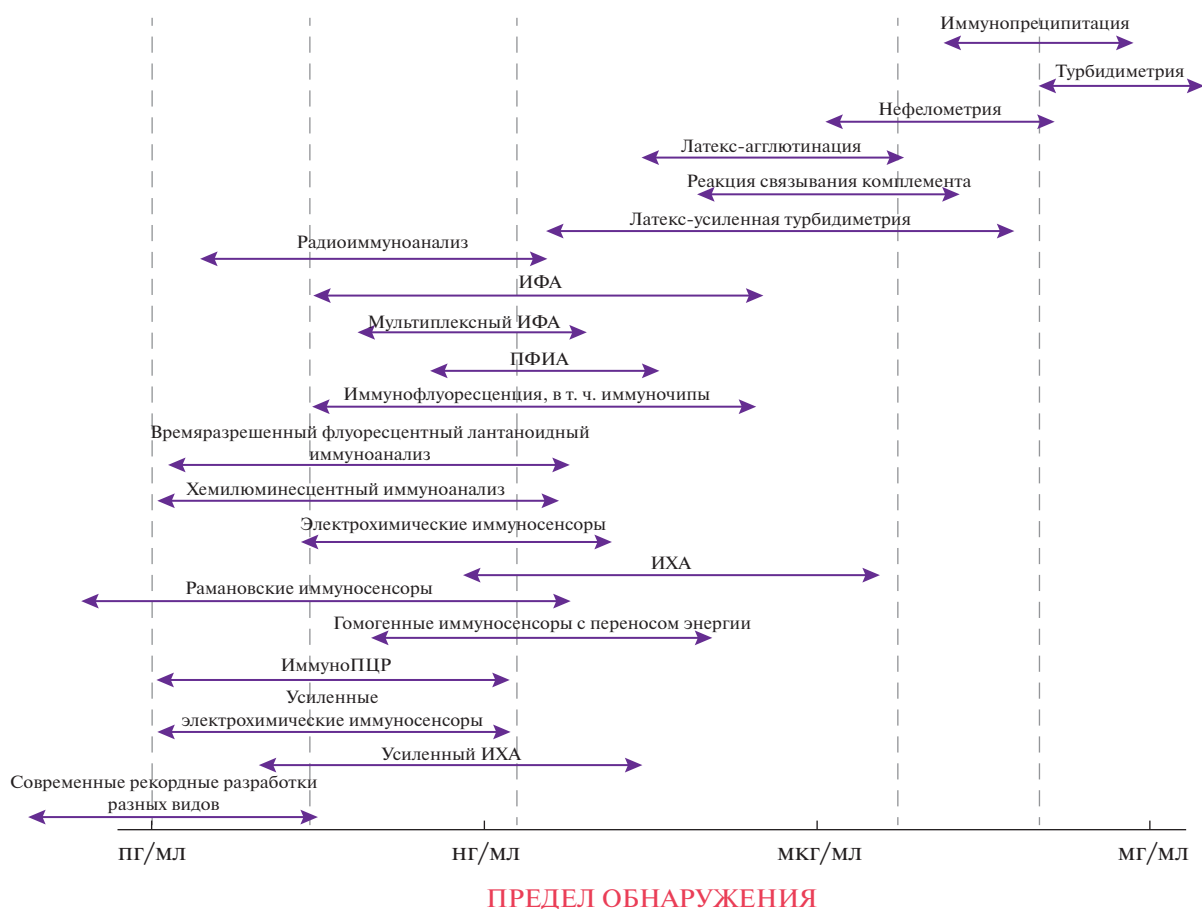


Рис. 1. Концентрации аналитов, определяемые с помощью различных иммуноаналитических методов (на основании данных [26, 27]). Расположение методов сверху вниз соответствует примерному хронологическому порядку их появления.

включении в иммунный комплекс и, как правило, более чувствительны к влиянию матрицы тестируемых проб [21]. При этом, если в начале разработок гомогенных методов иммуноанализа в основном предлагалось использовать модуляцию активности ферментного маркера в комплексе с антителами [22], то разрабатываемые сейчас методические решения преимущественно основаны на процессах переноса энергии между донором и акцептором, объединяемых в результате реакции антиген–антитело [23–25].

Рис. 1 схематично демонстрирует разнообразие иммуноаналитических методов и смещение новых разработок в область более низких определяемых концентраций. Отметим, что на сегодняшний день массовое практическое применение нашли лишь немногие из этих методов – иммуноферментный анализ с колориметрическим и люминесцентным детектированием, иммунохроматография и, для ряда низкомолекулярных аналитов, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Для соединений, контролируемых в высоких концентрациях, по-прежнему применя-

ют агглютинационные методы из-за их методической простоты. Радиоиммунные методы анализа, пережившие бум во второй половине прошлого века, сейчас используют все реже. Учитывая эту консервативность, следует понимать, что успех какой-то новой разработки по снижению предела обнаружения сам по себе не гарантирует ее последующей популярности как средства массовой диагностики. Для такого перевооружения аналитических лабораторий должно совпасть много факторов как научно-организационного (применимость для многих аналитов, создание приборной базы), так и социального характера.

Предложено большое число классификаций форматов иммунохимического анализа, основанных на отличиях по типу используемых маркеров, составу определяемых иммунных комплексов и последовательности их формирования [28, 29]. При рассмотрении вопросов о пределах обнаружения, достигаемых в разных форматах иммуноанализа, первоочередное значение имеет их разделение на односайтные (конкурентные) форматы, используемые при определении низкомолекулярных ан-

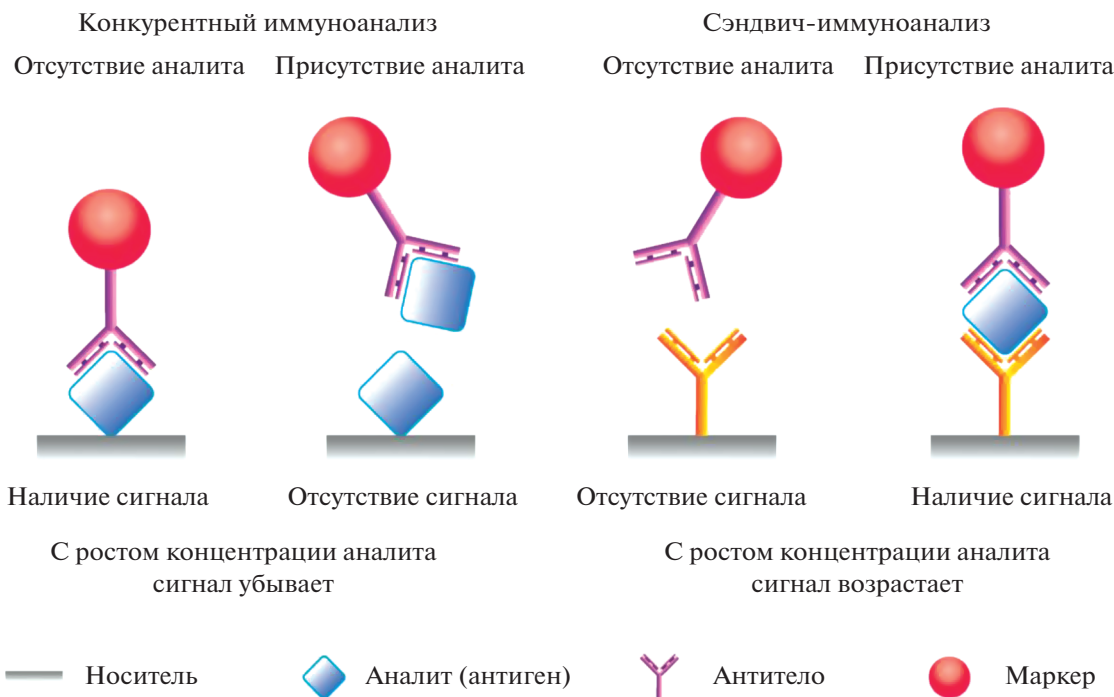


Рис. 2. Принципиальные схемы конкурентного и сэндвич-иммуноанализа.

тигенов с единственной антигенной детерминантой (сайтом связывания антител), и двухсайтные (сэндвич) форматы, применяемые для более крупных антигенов с несколькими детерминантами. Рис. 2 демонстрирует принципиальное отличие этих форматов, приводящее к разному ходу концентрационной зависимости аналитического сигнала (обеспечиваемого связыванием маркера с носителем).

В последние годы активно развиваются неконкурентные форматы иммуноанализа низкомолекулярных соединений. В таких системах преодолевается ряд ограничений конкурентных схем, однако их реализация требует наличия особых реагентов и далеко не для всех аналитов возможна [30, 31].

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ В ИММУНОАНАЛИЗЕ

В зависимости от способов введения метки и последовательности формирования детектируемых комплексов сэндвич- и конкурентные форматы анализа разделяются на множество подгрупп. Тем не менее можно рассмотреть простейшие взаимодействия, исключив из рассмотрения диффузионные ограничения и различия индивидуальных молекул в препаратах антигенов и антител. Для таких систем возможны общие алгебраические решения, определяющие зависимость регистрируемого сигнала от concentra-

ции выявляемого соединения в пробе. Анализ этих математических описаний, проведенный Джексоном и Экинсом [32], позволил охарактеризовать градуировочные зависимости неконкурентного и конкурентного иммуноанализа, связь их параметров со свойствами антител. Развивая этот подход, Тейлор и соавт. [33] включили в рассмотрение реальные особенности вариации фонового сигнала и показали соответствие теоретических прогнозов экспериментальным данным. В соответствии с проведенными расчетами предел обнаружения иммуноанализа для конкурентных форматов определяется аффинностью антител и воспроизводимостью сигнала в отсутствие аналита (уравнение (1)), а для неконкурентных форматов – этими двумя параметрами, а также аффинностью взаимодействий реагентов и компонентов пробы в аналитической системе, приводящих к неспецифическому связыванию маркера (уравнение (2)):

$$\sigma_{\min, 0} = CV_0/K_a, \quad (1)$$

$$\sigma_{\min, 0} = K_n CV_0/K_a, \quad (2)$$

где $\sigma_{\min, 0}$ – минимальная теоретически возможная концентрация, отклик для которой соответствует стандартному отклонению при нулевой концентрации аналита; CV_0 – коэффициент вариации отклика системы при нулевой концентрации аналита; K_a – равновесная константа связывания при образовании иммунного комплекса; K_n – средняя константа связывания при неспецифическом взаимодействии.

Учитывая, что хорошие для аналитического применения антитела характеризуются константами связывания с антигеном порядка 10^8 – 10^{10} M^{-1} , а рекордные антитела – до 10^{12} M^{-1} , предел обнаружения в конкурентном анализе низкомолекулярных (до 1 кДа) соединений может достигать пико-молярных концентраций, а фемтомолярные уровни должны подтверждаться крайне высокой аффинностью антител.

В случае сэндвич-анализа теоретические расчеты не устанавливают категорических запретов для чрезвычайно низких пределов обнаружения, однако неспецифические взаимодействия и чувствительность детектирования маркера лимитируют это снижение [34].

На сегодняшний день разработан теоретический аппарат, описывающий особенности взаимодействий реагентов в разных более сложных иммуноаналитических системах со своими особенностями локализации реагентов в пространстве, порядка их добавления и перемещения. Такие модели предложены, в частности, для радиоиммунного [35, 36], иммуноферментного [37–39] и иммунохроматографического [40–44] анализа, а также для других иммуноаналитических систем [45–53]. Недавние обзоры [29, 54] суммируют разнообразие используемых в этих моделях подходов. Хотя в ряде систем возникают дополнительные средства усиления сигнала, общие закономерности, сформулированные Джексоном и Экинсом, продолжают для них выполняться, но могут сопровождаться более сложными математическими описаниями требований к минимально возможному пределу обнаружения. Именно эти особенности и имеются в виду, когда в некоторых работах декларируется преодоление порога Джексона–Экинса [55, 56]. Радикальное изменение критериев для предела обнаружения становится возможным лишь при переходе от обычных концентрационных зависимостей аналитического сигнала к регистрации единичных иммунных взаимодействий (см. ниже).

ВОЗМОЖНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ФАКТОРЫ, ЛИМИТИРУЮЩИЕ ВЕЛИЧИНЫ ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ

С учетом изложенных выше общих закономерностей рассмотрим инструментарий, который может быть использован при разработке высокочувствительных иммуноаналитических систем. Детальное обсуждение крайне разнообразных конкретных работ значительно увеличило бы объем текста, нарушив концепцию мини-обзора. Мы ограничимся перечислением принципиальных методических решений, адресуя читателей к их детализации в указываемых публикациях, преимущественно обзорных.

Прежде всего, предлагаемая методика должна быть оптимизирована: определено сочетание ее параметров – концентраций реагентов, продолжительностей стадий, характеристик реакционной среды и др., которое обеспечивает минимальный предел обнаружения аналита при сохранении приемлемой точности количественного определения его концентрации [57, 58]. Большая часть публикуемых разработок по иммуноанализу включает такую оптимизацию как серию последовательных экспериментов с варьированием каждого из параметров. Однако влияние этих параметров на предел обнаружения может быть зависимым друг от друга, и корректный выбор оптимума требует более детальной многофакторной оптимизации. Соответствующий инструментарий аналитической химии успешно адаптирован и апробирован для иммуноанализа [59–61] и несомненно эффективен, несмотря на некоторую трудоемкость и сложность обработки данных. Отметим, что часть параметров (например, pH, ионная сила реакционной среды, концентрации детергентов) может быть выбрана в монопараметрических экспериментах, так как их оптимальные значения не зависят от других параметров. С учетом этого выбора многофакторную оптимизацию можно ограничить влияющими друг на друга концентрационными и временными параметрами.

Качество используемых в иммуноанализе антител, несомненно, имеет важное значение. Помимо скрининга коммерчески доступных и получаемых в лаборатории препаратов антител, изменение их связывающих свойств может быть достигнуто генетическим дизайном антиген-связывающих сайтов [62–64], а также методами клик-химии [65], с помощью которых можно ковалентно связывать молекулы в комплексах иммунореагентов [66]. Однако, как следует из рассмотренных выше закономерностей, далеко не всегда аффинность иммунного взаимодействия является фактором, лимитирующим снижение предела обнаружения. К тому же кинетическая константа ассоциации у разных антител к одному и тому же соединению близка, будучи обусловленной диффузионной подвижностью в растворе и площадями участков связывания на поверхностях реагирующих молекул. Отличия разных производных антител (Fab-фрагментов, наноантител) в этом отношении невелики, хотя такие производные востребованы в новых разработках благодаря другим своим преимуществам – меньшему размеру, стабильности, простоте модификации и пр. [67, 68]. Рост аффинности в таких ситуациях определяется, прежде всего, кинетическими константами диссоциации, а их вклад в количество иммунных комплексов проявляется лишь при продолжительных инкубациях. Большое значение имеет также соотношение аффинностей у нативных и модифицированных моле-

кул. В частности, в конкурентном формате иммуноанализа с мечением антигена более низкая аффинность меченого препарата по сравнению с нативным сдвигает рабочий диапазон и предел обнаружения в сторону более низких концентраций [69]. Еще один значимый фактор – би- и поливалентность молекул иммуноглобулинов, которая обеспечивает возможность образования множественных связей с поливалентным антигеном, но становится негативным фактором, когда моновалентный аналит конкурирует с поливалентным антигенным препаратом за связывание с антителами [70]. В таких ситуациях может быть оправдана замена полномерных молекул антител на их моновалентные фрагменты.

Критичным для обеспечения низкого предела обнаружения является достижение реакцией антиген–антитело химического равновесия, особенно в ситуациях, когда из-за тех или иных практических потребностей тестирование должно быть проведено за несколько минут. Диффузионно-обусловленные ограничения взаимодействий между иммобилизованным и находящимся в растворе иммунореагентом могут быть преодолены с использованием так называемых гомогенно-гетерогенных форматов анализа, в которых носитель с антителами вначале диспергирован в объеме, а после быстрой гомогенной реакции с антигеном осаждается и таким образом отделяется от непрореагировавших компонентов реакционной смеси. В качестве таких носителей могут использоваться водорастворимые полиэлектролиты (отделяемые добавлением противоионов), другие полимеры, а также магнитные частицы [71–73]. Дополнительный выигрыш при этом можно получить, если осажденные иммунные комплексы ресуспендируются в меньшем объеме по сравнению с исходным объемом тестируемой пробы. Помимо этого, для ускорения иммунной реакции предложено использовать ультразвук [74, 75], повышение мобильности молекул в растворе с помощью наномоторов [76–79]. Ряд перспективных результатов получен для микрофлюидных систем с концентрированием выявляемых иммунных комплексов в микроканалах [80, 81], в том числе в сочетании с центрифугированием [82].

Важно проведение аналитических реакций в условиях, когда используемые антитела сохраняют реакционную способность. Их химическая модификация и иммобилизация часто приводят к инактивации, что снижает степень связывания маркера и препятствует высокочувствительному определению образующихся иммунных комплексов. Для преодоления этого ограничения используют различные способы ориентированной иммобилизации, в том числе посредством взаимодействия антител с реагентами, распознающими удаленные от антиген-связывающих сайтов участки молекулы и тем самым максимально со-

храняющие доступность этих сайтов для иммунного взаимодействия [83–85].

Еще один важный ресурс – использование в иммуноанализе маркеров, достоверно выявляемых в низких концентрациях. Разные варианты маркеров рассматривались на ранних этапах развития иммуноферментного анализа, но сейчас существующие разработки ограничены небольшим числом ферментов, наиболее широко используемыми из которых являются пероксидаза и щелочная фосфатаза. Однако продолжают активные исследования по поиску наиболее эффективных субстратных растворов, прежде всего, для систем с люминесцентной регистрацией продукта, показавших существенные выигрыши в пределах обнаружения по сравнению с колориметрическими системами [86, 87]. В иммуноаналитических системах с электрохимической регистрацией сигнала активно применяются и другие ферменты – глюкозооксидаза, ацетилхолинэстераза и др.

Активно рассматриваются новые наночастицы – маркеры для различных иммуноаналитических систем (рис. 3). Варьирование химического состава (и соответственно спектральных характеристик), размеров, формы наночастиц позволяет значительно изменить величину сигнала, регистрируемого от единичного иммунного комплекса. Разнообразие разработок в этом направлении представлено в ряде обзоров [88–93]. Отметим, что возможности новой кандидатной наночастицы могут быть оценены ее простой и быстрой “паспортацией” по физико-химическим параметрам, т.е. не требуют полного цикла экспериментов по разработке и характеристике иммуноаналитической системы [94].

Эффекты гигантского комбинационного рассеяния на поверхности наночастиц также обладают значительным потенциалом для снижения предела обнаружения [95–97]. Хотя реализованные на практике разработки часто уступают теоретическим ожиданиям, на сегодняшний день большая часть рекордных по пределам обнаружения иммуноаналитических систем с использованием наночастиц относится именно к таким маркерам. При снижении стоимости приборного обеспечения можно ожидать дальнейшего роста их конкурентного потенциала [98, 99].

Особый интерес представляют неоптические варианты регистрации наномаркеров – термометрия, магнитометрия и др. [100–103]. В таких системах можно обеспечить крайне низкий фоновый сигнал и, в полном соответствии с теоретическими предсказаниями, достоверно определять низкие концентрации аналитов. Отдельно отметим методики иммуноанализа с масс-спектрометрической регистрацией маркера, характеризующиеся весьма низкими пределами обнару-

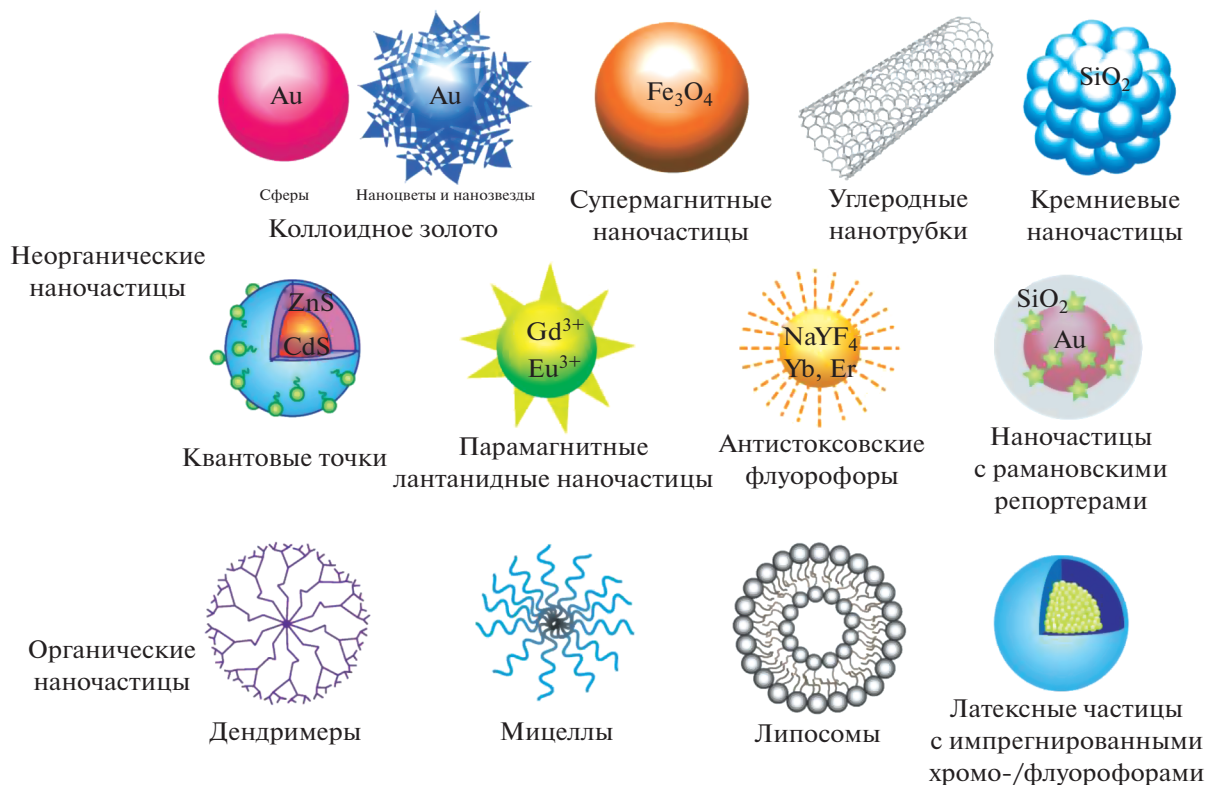


Рис. 3. Основные наночастицы, используемые в иммуноанализе.

жения, но требующие сложного и дорогостоящего приборного обеспечения [104].

Достоинством флуоресцентных маркеров — как органических, так и нанодисперсных — также является возможность выбора препаратов с длинами волн возбуждения и эмиссии, исключающими влияние компонентов пробы на регистрируемый сигнал. Низкий фон позволяет, увеличивая интенсивность возбуждающего света, наращивать отклик аналитической системы и достоверно определять низкие концентрации аналитов. Возможности флуоресцентных маркеров в иммуноанализе представлены в недавних обзорах [105–108].

Следующий класс перспективных направлений для снижения предела обнаружения в иммуноанализе — амплификационные методы, когда исходно связавшийся с иммунным комплексом единичный маркер генерирует или связывает значительное число регистрируемых молекул или частиц. Описан ряд вариантов такой амплификации [109–116]:

- высвобождение молекул маркера из общего носителя (например, липосомы);
- высвобождение с поверхности частицы многих независимо регистрируемых молекул-зондов;
- образование на основании одной связанной наночастицы агрегатов из десятков и сотен взаи-

модействующих с ней функционализированных наночастиц;

- наращивание наночастиц-маркеров восстановлением солей металлов на их поверхности;
- использование наночастиц-нанозимов, катализирующих трансформацию субстратов в определяемые продукты, и др.

Применение в качестве маркеров нанозимов — наночастиц металлов, обладающих каталитическими свойствами, — позволяет использовать их высокую толерантность к условиям среды, инактивируя каталитическую активность компонентов пробы и после этого регистрируя активность нанозима с крайне низким фоновым сигналом [117, 118].

В ряде разработок иммунохимические взаимодействия интегрируются с широко известными методами амплификации, используемыми в молекулярно-генетических разработках. Так, принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей многократно удваивать выявляемую олигонуклеотидную цепочку посредством циклов ферментативного синтеза комплементарных последовательностей и их высвобождения при высокотемпературной обработке, может служить заключительным этапом иммунохимического анализа с включением в иммунный комплекс олигонуклеотидного маркера [119–122].

Таблица 1. Критерии оценки описаний иммуноаналитических систем

Разработка иммуноаналитической системы с низким пределом обнаружения имеет следующие шансы воспроизведения и дальнейшего применения:	
высокие, если:	низкие, если:
Ее преимущества подтверждены сравнением с серийным иммуноанализом, реализованным с использованием тех же иммунореагентов	Сравнение ограничивается ссылкой на публикацию предшественников
Количественные отличия нового подхода к генерации аналитического сигнала сопоставимы с отличиями физических свойств компонентов, используемых для этой генерации	Преимущества нового подхода обосновываются только качественным комментарием об отличии свойств используемых компонентов
Ожидаемые концентрации иммунореагентов в реакционной среде и константы их взаимодействия (ограниченные свойствами антител) позволяют ожидать формирование иммунных комплексов в количествах, достаточных для воспроизводимого отклика системы	При заявленном пределе обнаружения на объем проведения реакции приходится единичные иммунные комплексы
Представлены экспериментальные данные по определению аналитов в концентрациях, близких к пределу обнаружения	Достижение предела обнаружения обосновывается исключительно расчетом по 3σ -критерию
Относительные стандартные отклонения на градуировочной кривой сопоставимы с погрешностями пипетирования (инжектирования) реагентов и резко не различаются для высоких и низких концентраций аналита	Заявленный предел обнаружения достигается благодаря резкому снижению относительных стандартных отклонений сигнала в области низких концентраций
Показано отсутствие влияния на специфическое взаимодействие основных компонентов проб для их реальных концентраций в биоматрицах	Изучение селективности взаимодействий сводится к тестированию чистых растворов аналита и других веществ в сопоставимых концентрациях
Подтверждена возможность тестирования неразбавленных или разбавленных в несколько раз биопроб	Апробация в биоматрицах ограничивается определением аналита при добавлении к пробе, разбавленной в десятки-сотни раз (что означает пропорционально худший предел обнаружения в расчете на исходный объем биопробы)
Для биопроб, используемых в качестве отрицательного контроля, отсутствие аналита в концентрациях вплоть до предела обнаружения разрабатываемого метода подтверждено альтернативным высокочувствительным методом	Отсутствие аналита в отрицательном контроле постулируется без данных об использованном для проверки методе и его пределе обнаружения

К сожалению, разработки, непосредственно направленные на минимизацию фонового связывания маркера в иммуноанализе, крайне разрознены и решения, предлагаемые для одних систем, часто оказываются непригодными для других. Поэтому универсальный используемый разработчиками методический аппарат сводится к немногим давно известным подходам, таким как применение детергентов. Учитывая критерий Джексона–Экинса, новые общие решения по снижению неспецифического сигнала могут внести существенный вклад в борьбу за низкие пределы обнаружения иммуноаналитических систем.

Как уже отмечалось, в последние годы наблюдается рост количества публикаций, описывающих новые методические решения в иммуноанализе и достигаемые с их помощью рекордно низкие пределы обнаружения. Полезно, по мнению авторов, сформулировать критерии, позволяющие оценить перспективы предлагаемого подхода, шансы получить сходные выигрыши при работе с другими аналитами и иммунореагентами. Соответствующие признаки суммированы в табл. 1. Надеемся, что эти критерии могут быть полезными и при планировании собственных экспериментов, способствовать усилению доказательной базы при представлении результатов исследований.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ РЕШЕНИЯ В ИММУНОАНАЛИЗЕ, ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ

Детектирование единичных молекул можно рассматривать как крайний вариант амплификации сигнала, когда результатом одного взаимодействия становится существенное изменение свойств в макрообъеме. В принципе, решение таких задач хорошо известно физикам, на протяжении десятилетий успешно регистрирующим единичные заряженные частицы в камере Вильсона или пузырьковой камере – детекторе, заполненном переохлажденным перенасыщенным паром, в котором заряженная частица инициирует конденсацию водяных капель и трекров из этих капель вдоль своего движения.

Данное сравнение наглядно демонстрирует два основных требования к детектору единичных молекул – трансформация единичного события на наноразмерном уровне в детектируемый сигнал и крайне низкая вероятность инициации такого же сигнала любыми другими компонентами пробы или реакционной среды. В биохимическом анализе нельзя достоверно говорить о выявлении единственной молекулы, так как наблюдаемый сигнал может быть вызван не ее связыванием, а каким-то из многих возможных неспецифических взаимодействий. Однако статистически достоверное отличие между интенсивностью сигнала при тестировании пробы и при эксперименте с объектом, в котором гарантировано отсутствие целевого аналита, дает основу для вывода об обнаружении целевого соединения (реально речь может идти как минимум о нескольких десятках молекул в охарактеризованном объеме пробы).

Существующее разнообразие разработок по детектированию методами иммуноанализа единичных молекул охарактеризовано в недавних обзорах [9, 123–130]. Отметим следующие основные направления таких разработок:

- генерация сигнала на сенсорной поверхности с множеством микроячеек, при котором связывания единичного маркера в ячейке достаточно для генерации в ней сигнала, регистрируемого обычно методом флуоресцентной микроскопии;
- изменение проницаемости мембраны с микрорамами, которые блокируются рецепторными молекулами и открываются при их связывании с молекулами аналита;
- комплексообразование флуоресцентных наночастиц за счет иммунных взаимодействий, регистрируемое в капиллярных ячейках;
- изменение проводимости полевых транзисторов, вызываемое связыванием с единичными чувствительными участками нанометровых размеров;

- атомно-силовая регистрация единичных иммунных комплексов на поверхности, сканируемой с помощью микрощупов-кантилеверов, выявляющих перепады уровня на наноразмерном уровне, которые трансформируются в сдвиг луча в детекторе и таким образом регистрируются;

- фишинг единичных молекул антигенов на поверхности посредством ее сканирования кантилеверами с иммобилизованными рецепторными молекулами.

Некоторые методические решения для регистрации единичных молекул уже реализованы в серийно производимых приборах и их реagentном обеспечении – Single Molecule Array (Simoa™) фирмы “Quanterix”, Single Molecule Counting (SMC™) Erenna® фирмы “Millipore Merck”, Ion Torrent™ от “Thermo Fisher” и др.

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ РАЗВИТИЯ ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Поскольку приведенное выше изложение было ориентировано в основном на демонстрацию разнообразия подходов к снижению пределов обнаружения в иммуноанализе, имеет смысл в заключение выделить наиболее активно развивающиеся разработки и практические задачи, для решения которых наиболее востребовано их применение.

Наибольшее число публикаций в ведущих журналах, рассматривающих иммуноаналитические разработки, посвящено: 1) новым маркерам, 2) новым схемам усиления сигнала с участием нескольких реагентов, 3) новым вариантам геометрии тест-систем и расположению последовательно взаимодействующих реагентов. Все эти направления предоставляют много возможностей предложить новую аналитическую систему и, при убедительной демонстрации ее преимуществ, расширить арсенал биометодов.

Какая практически значимая информация может быть получена с помощью новых высокочувствительных разработок в области иммуноанализа? Не претендуя на полноту перечня, отметим несколько таких задач в разных областях применения:

- совершенствование клинических методов диагностики заболеваний, требующих выявления маркеров в ультранизких концентрациях;
- простой внелабораторный контроль состояния здоровья с неинвазивным отбором биопроб. Тут наиболее востребованы быстрые тест-методы иммуноанализа;
- мониторинг воздуха и воды для оперативно-го выявления опасных соединений;
- быстрое одновременное определение многих аналитов в одной пробе малого объема.

Эффективное решение этих задач возможно лишь в сочетании с форматами иммунодиагностики, позволяющими определять низкие концентрации аналитов, поэтому рассмотренные в обзоре разработки представляются крайне востребованными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00370).

Авторы благодарят Н.А. Таранову за подготовку иллюстративного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wild D. The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. 4th Ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 2013. 1036 p.
2. O'Kennedy R., Murphy C. Immunoassays: Development, Applications and Future Trends. Singapore, Singapore: Jenny Stanford Publishing, 2017. 470 p.
3. Vashist S.K., Luong J.H.T. Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press, 2018. 478 p.
4. Loock H.P., Wentzell P.D. Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications // Sens. Actuators B: Chem. 2012. V. 173. P. 157.
5. Masson J.F. Consideration of sample matrix effects and "biological" noise in optimizing the limit of detection of biosensors // ACS Sensors. 2020. V. 5. № 11. P. 3290.
6. Molina-Fernandez I., Leuermann J., Ortega-Monux A., Wanguemert-Perez J.G., Halir R. Fundamental limit of detection of photonic biosensors with coherent phase read-out // Optics Express. 2019. V. 27. № 9. P. 12616.
7. Ju H. Signal amplification for highly sensitive immunosensing // J. Anal. Test. 2017. V. 1. № 1. P. 7.
8. Wu Y.F., Tilley R.D., Gooding J.J. Challenges and solutions in developing ultrasensitive biosensors // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. № 3. P. 1162.
9. Momenbeitollahi N., Cloet T., Li H.Y. Pushing the detection limits: strategies towards highly sensitive optical-based protein detection // Anal. Bioanal. Chem. 2021. V. 413. № 24. P. 5995.
10. Shirshahi V., Liu G. Enhancing the analytical performance of paper lateral flow assays: From chemistry to engineering // Trends Anal. Chem. 2021. V. 136. Article 116200.
11. Van-Thuan N., Song S., Park S., Joo C. Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral-flow assay // Biosens. Bioelectron. 2020. V. 152. Article 112015.
12. Ribatti D. Sir Frank Macfarlane Burnet and the clonal selection theory of antibody formation // Clin. Exper. Med. 2009. V. 9. № 4. P. 253.
13. Kanyavuz A., Marey-Jarossay A., Lacroix-Desmazes S., Dimitrov J.D. Breaking the law: Unconventional strategies for antibody diversification // Nature Rev. Immunol. 2019. V. 19. № 6. P. 355.
14. Leenaars M., Hendriksen C.F.M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies evaluation and recommendations // ILAR J. 2005. V. 46. № 3. P. 269.
15. Howard G.C., Kaser M.R. Making and Using Antibodies: A Practical Handbook. 2nd Ed. Boca Raton, USA: Press-Taylor & Francis Group, 2014. 427 p.
16. Lee Y.J., Jeong K.J. Challenges to production of antibodies in bacteria and yeast // J. Biosci. Bioeng. 2015. V. 120. № 5. P. 483.
17. Li P.W., Zhang W., Zhang Z.W., Zhang Q., Chen Z.Y. Fundamentals of hapten-protein conjugate synthesis to obtain high-quality antibodies for analysis of food and environmental contaminants // Curr. Org. Chem. 2017. V. 21. № 26. P. 2606.
18. Wang Y., Zhang C., Liu F. Antibody developments for metal ions and their applications // Food Agric. Immunol. 2020. V. 31. № 1. P. 1079.
19. Firestone G.L., Winguth S.D. Immunoprecipitation of proteins // Methods Enzymol. 1990. V. 182. P. 688.
20. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. Иммуноаналитические методы / Биохимические методы анализа / Под ред. Дзантиева Б.Б. М.: Наука, 2010. С. 303.
21. Dinis-Oliveira R.J. Heterogeneous and homogeneous immunoassays for drug analysis // Bioanalysis. 2014. V. 6. № 21. P. 2877.
22. Wu A.H.B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 369. № 2. P. 119.
23. Takkinen K., Zvirbliene A. Recent advances in homogeneous immunoassays based on resonance energy transfer // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 55. P. 16.
24. Dong J., Ueda H. Recent advances in Quencher, a fluorescent immunosensor // Sensors. 2021. V. 21. № 4. Article 1223.
25. Eangoor P., Das S., Pucc V. Evaluation of homogeneous proximity immunoassays for preclinical bioanalysis // Bioanalysis. 2020. V. 12. № 14. P. 1757.
26. Immunoassays ELISA & CLIA. Antrim, UK: Fortress Diagnostics. 2020. <https://www.fortressdiagnostics.com/news/2020/march/extensive-range-of-high-quality-immunoassays> (21.11.2021).
27. Dzantiev B.B., Urusov A.E., Zherdev A.V. Modern techniques of immunochemical analysis: Integration of sensitivity and rapidity // Biotechnol. Acta. 2013. V. 6. № 4. P. 94.
28. Miyai K. Classification of immunoassay / Principles and Practice of Immunoassay / Eds. Price C.P., Newman D.J. London: Palgrave Macmillan, 1991. P. 246.
29. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Математическое моделирование биоаналитических систем // Успехи биол. химии. 2017. Т. 57. С. 385. (Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Mathematical modeling of bioassays // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. № 13. P. 1744.)
30. Liu A.P., Anfossi L., Shen L., Li C., Wang X.H. Non-competitive immunoassay for low-molecular-weight contaminant detection in food, feed and agricultural products: A mini-review // Trends Food Sci. Technol. 2018. V. 71. P. 181.
31. Li Y., Zhang G., Mao X., Yang S.P., De Ruyck K., Wu Y.N. High sensitivity immunoassays for small molecule compounds detection – Novel noncompetitive

- immunoassay designs // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 103. P. 198.
32. Jackson T.M., Ekins R.P. Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: Current practice and potential advantages of fluorescent Eu³⁺ chelates as non-radiometric tracers // *J. Immunol. Methods.* 1986. V. 87. P. 13.
 33. Taylor J., Picelli G., Harrison D.J. An evaluation of the detection limits possible for competitive capillary electrophoretic immunoassays // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. P. 3699.
 34. Woolley C.F., Hayes M.A., Mahanti P., Gilman S.D., Taylor T. Theoretical limitations of quantification for noncompetitive sandwich immunoassays // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 28. P. 8605.
 35. Rodbard D., Feldman Y. Kinetics of 2-site immunoradiometric (sandwich) assays. I. Mathematical models for simulation, optimization, and curve fitting // *Immunochemistry.* 1978. V. 15. № 2. P. 71.
 36. Rodbard D., Feldman Y., Jaffe M.L., Miles L.E. Kinetics of two-site immunoradiometric ("sandwich") assays. II. Studies on the nature of the "high-dose hook effect" // *Immunochemistry.* 1978. V. 15. № 2. P. 77.
 37. Merrill S.J. Computational models in immunological methods: An historical review // *J. Immunol. Methods.* 1998. V. 216. № 1–2. P. 69.
 38. Hayashi Y., Matsuda R., Maitani T., Imai K., Nishimura W., Ito K., Maeda M. Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 5. P. 1295.
 39. Choi D. H., Katakura Y., Matsuda R., Hayashi Y., Hirobe M., Goda Y., Ninomiya K., Shioya S. Validation of a method for predicting the precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA // *Anal. Sci.* 2007. V. 23. № 2. P. 215.
 40. Qian S.Z., Bau H.H. A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays // *Anal. Biochem.* 2003. V. 322. № 1. P. 89.
 41. Qian S.Z., Bau H.H. Analysis of lateral flow biodetectors: Competitive format // *Anal. Biochem.* 2004. V. 326. № 2. P. 211.
 42. Liu Z., He X., Li A., Qu Z., Xu F. A two-dimensional mathematical model for analyzing the effects of capture probe properties on the performance of lateral flow assays // *Analyst.* 2019. V. 144. № 18. P. 5394.
 43. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Byzova N.A., Zvereva E.A., Bartosh A.V., Dzantiev B.B. Mathematical modeling of immunochromatographic test systems in a competitive format: Analytical and numerical approaches // *Biochem. Eng. J.* 2020. V. 164. Article 107763.
 44. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Mathematical model of serodiagnostic immunochromatographic assay // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 8. P. 4419.
 45. Worsfold P.J., Hughes A. A model immunoassay using automated flow-injection analysis // *Analyst.* 1984. V. 109. P. 339.
 46. Pribyl M., Snita D., Hasal P., Marek M. Modeling of electric-field driven transport processes in microdevices for immunoassay // *Chem. Eng. J.* 2004. V. 101. № 1–3. P. 303.
 47. Zuber E., Rosso L., Darbouret B., Socquet F., Mathis G., Flandrois J.P. A descriptive model for the kinetics of a homogeneous fluorometric immunoassay // *J. Immunoassay.* 1997. V. 18. № 1. P. 21.
 48. Naruse M., Morishita M., Onodera T., Toko K., Hayashi Y. Modeling of detection limit for competitive immunoassay using surface plasmon resonance sensor // *Sensors Materials.* 2016. V. 28. № 3. P. 219.
 49. Taylor J., Picelli G., Harrison D.J. An evaluation of the detection limits possible for competitive capillary electrophoretic immunoassays // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. № 17. P. 3699.
 50. Roy P., Cherng-Wen D. Microfluidic competition assay via equilibrium binding // *Sens. Actuators B: Chem.* 2009. V. 139. № 2. P. 682.
 51. Wu D., Voldman J. An integrated model for bead-based immunoassays // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 154. Article 112070.
 52. Yanagisawa N., Dutta D. Microfluidic enzyme-linked immunosorbent assay in a region of finite length // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 817. P. 28.
 53. Rafat N., Satoh P., Barton S.C., Worden R.M. Integrated experimental and theoretical studies on an electrochemical immunosensor // *Biosensors.* 2020. V. 10. № 10. Article 144.
 54. Gasperino D., Baughman T., Hsieh H.V., Bell D., Weigl B.H. Improving lateral flow assay performance using computational modeling // *Ann. Rev. Anal. Chem.* 2018. V. 11. № 11. P. 219.
 55. Brown E.N., McDermott T.J., Bloch K.J., McCollom A.D. Defining the smallest analyte concentration an immunoassay can measure // *Clin. Chem.* 1996. V. 42. P. 893.
 56. Ekins R., Kelso D. Single-molecule ELISA // *Clin. Chem.* 2011. V. 57. № 3. P. 372.
 57. Hsieh H.V., Dantzer J.L., Weigl B.H. Analytical tools to improve optimization procedures for lateral flow assays // *Diagnostics.* 2017. V. 7. № 2. Article 29.
 58. Bishop J.D., Hsieh H.V., Gasperino D.J., Weigl B.H. Sensitivity enhancement in lateral flow assays: A systems perspective // *Lab Chip.* 2019. V. 19. № 15. P. 2486.
 59. Jeney C., Dobay O., Lengyel A., Adam E., Nasz I. Taguchi optimisation of ELISA procedures // *J. Immunol. Methods.* 1999. V. 223. № 2. P. 137.
 60. Luo W., Pla-Roca M., Juncker D. Taguchi design-based optimization of sandwich immunoassay microarrays for detecting breast cancer biomarkers // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. № 14. P. 5767.
 61. Joelsson D., Moravec P., Troutman M., Pigeon J., DePhillips P. Optimizing ELISAs for precision and robustness using laboratory automation and statistical design of experiments // *J. Immunol. Methods.* 2018. V. 337. P. 35.
 62. Zhao J., Nussinov R., Wu W.-J., Ma B.Y. In silico methods in antibody design // *Antibodies.* 2018. V. 7. № 3. Article 22.
 63. Peltomaa R., Barderas R., Benito-Pena E., Moreno-Bondi M.C. Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021 (online publication).
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03619-7>

64. Tiller K.E., Tessier P.M. Advances in antibody design // *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2015. V. 17. P. 191.
65. Wang P., Xue T.X., Sheng A.Z., Cheng L.F., Zhang J. Application of chemoselective ligation in biosensing // *Crit. Rev. Anal. Chem.* (online publication). <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1791044>
66. Sadiki A., Kercher E.M., Lu H., Lang R.T., Spring B.Q., Zhou Z.S. Site-specific bioconjugation and convergent click chemistry enhances antibody-chromophore conjugate binding efficiency(dagger) // *Photochem. Photobiol.* 2020. V. 96. № 3. P. 596.
67. Bastos-Soares E.A., Sousa R.M.O., Gomez A.F., Alfonso J., Kayano A.M., Zanchi F.B., Funes-Huacca M.E., Stabeli R.G., Soares A.M., Pereira S.S., Fernandes C.F.C. Single domain antibodies in the development of immunosensors for diagnostics // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 165. P. 2244.
68. Bever C.S., Dong J.-X., Vasylieva N., Barnych B., Cui Y.L., Xu Z.L., Hammock B.D., Gee S.J. VHH antibodies: Emerging reagents for the analysis of environmental chemicals // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 22. P. 5985.
69. Xu Z.L., Shen Y.D., Beier R.C., Yang J.Y., Lei H.T., Wang H., Sun Y.M. Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 647. P. 125.
70. Winzor D.J. Allowance for antibody bivalence in the characterization of interactions by ELISA // *J. Mol. Recogn.* 2011. V. 24. № 2. P. 139.
71. Dzantiev B.B., Zherdev A.V., Yazyznina E.V. Application of water-soluble polymers and their complexes for immunoanalytical purposes / *Smart Polymers for Bioprocessing and Bioprocessing* / Eds. Mattiasson B., Galaev I.Yu. London—N.Y.: Taylor & Francis, 2002. P. 207.
72. Rocha-Santos T.A.P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles // *Trends Anal. Chem.* 2014. V. 62. P. 28.
73. Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение магнитных наночастиц в иммуноанализе // *Российские нанотехнологии.* 2017. Т. 12. № 9–10. С. 3. (Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Application of magnetic nanoparticles in immunoassay // *Nanotechnologies in Russia.* 2017. V. 12. № 9–10. P. 471.)
74. Kuznetsova L.A., Coakley W. Applications of ultrasound streaming and radiation force in biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. № 8. P. 1567.
75. Wiklund M., Hertz H.M. Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays // *Lab. Chip.* 2006. V. 6. № 10. P. 1279.
76. Pacheco M., Angel Lopez M., Jurado-Sanchez B., Escarpa A. Self-propelled micromachines for analytical sensing: A critical review // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 25. P. 6561.
77. Jurado-Sanchez B. Nanoscale biosensors based on self-propelled objects // *Biosensors.* 2018. V. 8. № 3. Article 59.
78. Wang J. Self-propelled affinity biosensors: Moving the receptor around the sample // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 76. P. 234.
79. Ye H., Wang Y., Xu D.D., Liu X.J., Liu S.M., Ma X. Design and fabrication of micro/nano-motors for environmental and sensing applications // *Appl. Mater. Today.* 2021. V. 23. Article 101007.
80. Al Mughairy B., Al-Lawati H.A.J. Recent analytical advancements in microfluidics using chemiluminescence detection systems for food analysis // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 124. Article 115802.
81. Shi Y.X., Ye P., Yang K.J., Meng J., Guo J.C., Pan Z.X., Bayin Q.G., Zhao W.H. Application of microfluidics in immunoassay: Recent advancements // *J. Healthc. Eng.* 2021. V. 2021. Article 2959843.
82. Shi Y.X., Ye P., Yang K.J., Meng J., Guo J.C., Pan Z.X., Zhao W.H., Guo J.H. Application of centrifugal microfluidics in immunoassay, biochemical analysis and molecular diagnosis // *Analyst.* 2021. V. 146. № 19. P. 5800.
83. Lu B., Smyth M.R., O’Kennedy R. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors // *Analyst.* 1996. V. 121. № 3. P. R29.
84. Crivianu-Gaita V., Thompson M. Immobilization of Fab' fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 70. P. 167.
85. Iijima M., Kuroda S. Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 89. № 2. P. 810.
86. Zhao L., Sun L., Chu X. Chemiluminescence immunoassay // *Trends Anal. Chem.* 2009. V. 28. № 4. P. 404.
87. Xiao Q., Xu C. Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 124. Article 115780.
88. Gao Y., Zhou Y., Chandrawati R. Metal and metal oxide nanoparticles to enhance the performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // *ACS Appl. Nano Mater.* 2020. V. 3. № 1. P. 1.
89. Huang Y., Xu T.L., Wang W.O., Wen Y.Q., Li K., Qian L.S., Zhang X.J., Liu G.D. Lateral flow biosensors based on the use of micro- and nanomaterials: A review on recent developments // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. № 1. Article 70.
90. Quesada-Gonzalez D., Merkoci A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 73. P. 47.
91. Mohamad A., Teo H., Keasberry N.A., Ahmed M.U. Recent developments in colorimetric immunoassays using nanozymes and plasmonic nanoparticles // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019. V. 39. № 1. P. 50.
92. Welch E.C., Powell J.M., Clevinger T.B., Fairman A.E., Shukla A. Advances in biosensors and diagnostic technologies using nanostructures and nanomaterials // *Adv. Funct. Mater.* 2021. V. 31. № 44. Article 2104126.
93. Pirsaeheb M., Mohammadi S., Salimi A. Current advances of carbon dots based biosensors for tumor marker detection, cancer cells analysis and bioimaging // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 115. P. 83.
94. Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Ways to reach lower detection limits in lateral flow immunoassays. Ch. 2 / *Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic*

- Applications / Ed. Anfossi L. London: InTechOpen, 2018. P. 9.
95. Smolsky J., Kaur S., Hayashi C., Batra S.K., Krasnoslobodtsev A.V. Surface-enhanced Raman scattering-based immunoassay technologies for detection of disease biomarkers // *Biosensors*. 2017. V. 7. № 1. Article 7.
 96. Wang Z.Y., Zong S.F., Wu L., Zhu D., Cui Y.P. SERS-activated platforms for immunoassay: Probes, encoding methods, and applications // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. № 12. P. 7910.
 97. Khlebtsov B., Khlebtsov N. Surface-enhanced Raman scattering-based lateral-flow immunoassay // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. № 11. Article 2228.
 98. Wang C., Liu M., Wang Z.F., Li S., Deng Y., He N.Y. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices // *Nano Today*. 2021. V. 37. Article 101092.
 99. Chen H., Das A., Bi L., Choi N., Moon J.I., Wu Y., Park S., Choo J. Recent advances in surface-enhanced Raman scattering-based microdevices for point-of-care diagnosis of viruses and bacteria // *Nanoscale*. 2020. V. 12. № 42. P. 21560.
 100. Kavetskiy T., Alipour M., Smutok O., Mushynska O., Kiv A., Fink D., Farshchi F., Ahmadian E., Hasan-zadeh M. Magneto-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in biomedical analysis // *Microchem. J.* 2021. V. 167. Article 106320.
 101. Gloag L., Mehdipour M., Chen D.F., Tilley R.D., Gooding J.J. Advances in the application of magnetic nanoparticles for sensing // *Adv. Mater.* 2019. V. 31. № 48. P. 4819.
 102. Qie Z.W., Ning B.A., Liu M., Bai J.L., Peng Y., Song N., Lv Z.Q., Wang Y., Sun S.M., Su X., Zhang Y.H., Gao Z.X. Fast detection of atrazine in corn using thermometric biosensors // *Analyst*. 2013. V. 138. № 17. P. 5151.
 103. Zhang Y., Yang H., Zhou Z.G., Huang K., Yang S.P., Han G. Recent advances on magnetic relaxation switching assay-based nanosensors // *Bioconjug. Chem.* 2017. V. 28. № 4. P. 869.
 104. Stevens K.G., Pukala T.L. Conjugating immunoassays to mass spectrometry: Solutions to contemporary challenges in clinical diagnostics // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 132. Article 116064.
 105. Aranda P.R., Messina G.A., Bertolino F.A., Pereira S.V., Baldo M.A.F., Raba J. Nanomaterials in fluorescent laser-based immunosensors: Review and applications // *Microchem. J.* 2018. V. 141. P. 308.
 106. Chang X.-H., Zhang J., Wu L.-H., Peng Y.K., Yang X.Y., Li X.L., Ma A.J., Ma J.C., Chen G.Q. Research progress of near-infrared fluorescence immunoassay // *Micro-machines*. 2019. V. 10. № 6. Article 422.
 107. Gong X.Q., Cai J., Zhang B., Zhao Q., Piao J.F., Peng W.P., Gao W.C., Zhou D.M., Zhao M., Chang J. A review of fluorescent signal-based lateral flow immunochromatographic strips // *J. Mater. Chem.* 2017. V. 5. № 26. P. 5079.
 108. Абрамова А.М., Горячева О.А., Дрозд Д.Д., Новикова А.С., Пономарева Т.С., Строкін П.Д., Горячева И.Ю. Люминесцентные полупроводниковые квантовые точки в химическом анализе // *Журн. аналит. хим.* 2021. Т. 76. № 3. С. 195. (Abramova A.M., Goryacheva O.A., Drozd D.D., Novikova A.S., Ponomareva T.S., Strokin P.D., Goryacheva I.Y. Luminescence semiconductor quantum dots in chemical analysis // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 3. P. 273.)
 109. Fenzl C., Hirsch T., Baemner A.J. Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio)analytical applications // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 79. P. 306.
 110. Edwards K.A., Bolduc O.R., Baemner A.J. Miniaturized bioanalytical systems: Enhanced performance through liposomes // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012. V. 16. № 3–4. P. 444.
 111. Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способы повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем с колориметрической детекцией (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. Т. 57. № 2. С. 107. (Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Methods for increasing sensitivity of immunochromatographic test systems with colorimetric detection (review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. № 2. P. 143.)
 112. Wang Y.S., Jin M.J., Chen G., Cui X.Y., Zhang Y.D., Li M.J., Liao Y., Zhang X.Y., Qin G.X., Yan F.Y., Abd El-Aty A.M., Wang J. Bio-barcode detection technology and its research applications: A review // *J. Adv. Res.* 2019. V. 20. P. 23.
 113. Di Nardo F., Chiarello M., Cavallera S., Baggiani C., Anfossi L. Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives // *Sensors*. 2021. V. 21. № 15. Article 5185.
 114. Yang H., Xu W., Zhou Y. Signal amplification in immunoassays by using noble metal nanoparticles: A review // *Microchim. Acta*. 2019. V. 186. № 12. Article 859.
 115. Xiong Y., Leng Y.K., Li X.M., Huang X.L., Xiong Y.H. Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 126. Article 115861.
 116. Calabria D., Calabretta M.M., Zangheri M., Marchegiani E., Trozzi I., Guardigli M., Michelini E., Di Nardo F., Anfossi L., Baggiani C., Mirasoli M. Recent advancements in enzyme-based lateral flow immunoassays // *Sensors*. 2021. V. 21. № 10. Article 3358.
 117. Niu X.H., Cheng N., Ruan X.F., Du D., Lin Y.H. Review-nanozyme-based immunosensors and immunoassays: Recent developments and future trends // *J. Electrochem. Soc.* 2019. V. 167. № 1. Article 037508.
 118. Wang Q.Q., Wei H., Zhang Z.Q., Wang E.K., Dong S.J. Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 105. P. 218.
 119. Spengler M., Adler M., Niemeyer C.M. Highly sensitive ligand-binding assays in pre-clinical and clinical applications: Immuno-PCR and other emerging techniques // *Analyst*. 2015. V. 140. № 18. P. 6175.
 120. Рязанцев Д.Ю., Воронина Д.В., Забриев С.К. Иммуно-ПЦР: достижения и перспективы // *Успехи биол. химии*. 2016. Т. 56. С. 377. (Ryazantsev D.Y., Voronina D.V., Zavriev S.K. Immuno-PCR: Achievements and perspectives // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. V. 81. № 13. P. 1754.)

121. *Dahiya B., Mehta P.K.* Detection of potential biomarkers associated with outrageous diseases and environmental pollutants by nanoparticle-based immuno-PCR assays // *Anal. Biochem.* 2019. V. 587. Article 113444.
122. *Sang P.T., Hu Z.G., Cheng Y.L., Yu H., Xie Y.F., Yao W.R., Guo Y.H., Qian H.* Nucleic acid amplification techniques in immunoassay: An integrated approach with hybrid performance // *J. Agric. Food Chem.* 2021. V. 69. № 21. P. 5783.
123. *Gooding J.J., Gaus K.A.* Single-molecule sensors: Challenges and opportunities for quantitative analysis // *Angewandte Chemie – Int. Ed.* 2016. V. 55. № 38. P. 11354.
124. *Wang J.J., Yang J., Ying Y.L., Long Y.T.* Nanopore-based confined spaces for single-molecular analysis // *Chem. Asian J.* 2019. V. 14. № 3. P. 389.
125. *Pleshakova T.O., Bukharina N.S., Archakov A.I., Ivanov Y.D.* Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 4. Article 1142.
126. *Li M., Xi N., Wang Y., Liu L.* Advances in atomic force microscopy for single-cell analysis // *Nano Res.* 2019. V. 12. № 4. P. 703.
127. *Farka Z., Mickert M.J., Pastucha M., Mikusova Z., Skladal P., Gorris H.H.* Advances in optical single-molecule detection: En route to supersensitive bioaffinity assays // *Angewandte Chemie – Int. Ed.* 2020. V. 59. № 27. P. 10746.
128. *Armstrong R.E., Horacek M.Z.* Plasmonic assemblies for real-time single-molecule biosensing // *Small.* 2020. V. 16. № 52. Article 2003934.
129. *Wu Y., Bennett D., Tilley R.D., Gooding J.J.* How nanoparticles transform single molecule measurements into quantitative sensors // *Adv. Mater.* 2020. V. 32. № 18. Article 1904339.
130. *Macchia E., Manoli K., Di Franco C., Scamarcio G., Torsi L.* New trends in single-molecule bioanalytical detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 5005.

УДК 543.064

ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКОТОКСИЧНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ I–III–VI₂ В АНАЛИЗЕ

© 2022 г. Т. С. Пономарева^а, А. С. Новикова^а, А. М. Абрамова^а, О. А. Горячева^а, Д. Д. Дрозд^а, П. Д. Строкин^а, И. Ю. Горячева^а, *

^аСаратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт химии
Астраханская ул., 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: goryachevaiy@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2021 г.

После доработки 15.07.2021 г.

Принята к публикации 15.07.2021 г.

Полупроводниковые люминесцентные квантовые точки (КТ) структуры I–III–VI₂ представляют новый класс люминесцентных материалов, сочетающих уникальные оптические и электронные свойства, но отличающихся низкой токсичностью по сравнению с традиционными КТ на основе кадмия. Успехи в коллоидном синтезе тройных КТ использованы при разработке флуоресцентных химических и биологических сенсоров для обнаружения различных аналитов. В обзоре рассмотрены основные подходы к синтезу КТ структуры I–III–VI₂, особенности их строения и свойств, освещены современные тенденции их применения в качестве низкотоксичных люминесцентных меток в биомедицине и химическом анализе.

Ключевые слова: некадмиевые квантовые точки, флуоресценция, квантовые структуры I–III–VI₂, люминесцентная метка, анализ, биомедицина.

DOI: 10.31857/S0044450222040090

Развитие и совершенствование технологии получения люминесцентных материалов позволит открыть новые потенциальные возможности их применения. Полупроводниковые люминесцентные нанокристаллы – квантовые точки (КТ) – вызвали широкий практический интерес за счет своих уникальных оптических свойств, обусловленных квантово-размерным эффектом, а именно: зависимостью величины запрещенной зоны от размера КТ при величине наночастицы меньше или сопоставимой с радиусом экситона Бора [1]. До недавнего времени научный интерес был сфокусирован на получении бинарных КТ, состоящих из атомов полупроводниковых материалов II–VI (CdSe, ZnS), III–V (InAs, InP) и IV–VI (PbS, PbTe) [2]. Несмотря на их яркую люминесценцию, высокую фото- и коллоидную стабильность, токсичность некоторых элементов (Cd, Pb, Se, Hg) и прекурсоров, значительные затраты времени при синтезе, сложности очистки и зачастую необходимую трудоемкую гидрофилизация поверхности ограничивают их применение.

Альтернативным источником нового низкотоксичного люминесцентного материала выступают многокомпонентные коллоидные КТ структуры I–III–VI₂. Подобно традиционным КТ на основе сульфидов и селенидов кадмия, КТ

тройного состава I–III–VI₂ (I = Cu, Ag; III = In, Al, Ga; VI = S, Te, Se) имеют широкий спектр поглощения, высокую фотостабильность, но не содержат токсичные элементы в составе и имеют характерную нестехиометрию, что открывает новые возможности их применения [3]. К настоящему моменту достигнуты определенные успехи в синтезе коллоидных люминесцентных наночастиц в различных средах, однако поиск оптимальных вариантов воспроизводимых методик синтеза КТ структуры I–III–VI₂ с улучшенными характеристиками остается актуальной задачей. Решение вопросов, связанных с оптимизацией условий синтеза и разработкой наночастиц нового поколения позволит расширить сферы их аналитического применения.

Данный обзор сфокусирован на конструктивном анализе современных подходов к получению КТ структуры I–III–VI₂ и возможностях их аналитического применения. Показаны преимущества и недостатки данных квантовых структур, обсуждены стратегии модификации для улучшения их характеристик. Освещены современные тенденции их применения в качестве низкотоксичных люминесцентных зондов в биомедицине и химическом анализе.

СТРОЕНИЕ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КВАНТОВЫХ ТОЧЕК I–III–VI₂

Тройные КТ представляют собой системы из трех элементов, структуру которых можно считать производной от бинарных полупроводников типа II–VI, где анионный сайт представлен одним и тем же элементом VI группы (S, Se или Te). Катионный центр в таких системах включает комбинацию металлов I и III группы, соотношение которых можно варьировать в широком диапазоне [4, 5]. Вследствие этого тройные КТ могут существовать в виде ряда нестехиометрических фаз с различным структурным порядком, электронными и оптическими свойствами.

Кристаллическая структура тройных КТ может быть представлена фазами халькопирита, сфалерита и вюрцита [6, 7]. Фаза халькопирита имеет тетрагональную элементарную ячейку, которая термодинамически стабильна ниже 620°C, а фаза сфалерита устойчива при более высоких температурах. Стоит отметить, что, кроме термодинамически стабильных структур, в нанокристаллических формах полупроводников можно наблюдать метастабильные структуры, которых нет в объемных материалах, что обуславливает появление новых свойств КТ [8].

Квантовые точки структуры I–III–VI₂ сложнее, чем широко изученные бинарные КТ II–VI; взаимосвязь оптоэлектронных свойств тройных КТ обуславливается не только квантово-размерными эффектами в полупроводниках, но и особенностями кристаллической структуры и механизмами генерации люминесценции. В ряде недавно опубликованных исследований показано, что высокая внутренняя дефектность КТ может служить удобной платформой для понимания природы и механизмов генерации люминесценции тройных КТ [9, 10].

Излучательный переход в тройных КТ рассматривают с точки зрения теории донорно-акцепторной пары (ДАП). Тройные КТ имеют большое количество донорных и акцепторных состояний внутри запрещенной зоны, изменяя которые можно управлять люминесцентными свойствами [11]. Как отмечают исследователи, энергия излучения зависит от пространственного разделения ДАП, однако с помощью такой модели не удается легко объяснить наблюдаемую сильную зависимость энергии люминесценции от размера КТ [9]. Кроме рекомбинации ДАП, существуют (1) излучательная рекомбинация, источником которой являются переходы через поверхностные дефекты или из зоны проводимости на акцепторные состояния, близкие к валентной зоне; (2) безызлучательная рекомбинация через поверхностные ловушки. Такие процессы приводят к ограничению в отношении квантового выхода (КВ) флуоресценции (ФЛ). Описаны [12] подходы к умень-

шению безызлучательной рекомбинации и улучшению оптических характеристик КТ. Например, нанесение пассивирующей оболочки на поверхность тройных нанокристаллов приводит к получению систем КТ типа ядро/оболочка с улучшенными свойствами [13–15]. В качестве альтернативы высоколюминесцентные КТ могут быть получены без нанесения внешней оболочки путем легирования тройных нанокристаллов, например, цинком [16]. Введение цинка в состав тройных нанокристаллов изменяет внутренние электронные состояния и может привести к сдвигу полосы ФЛ в коротковолновую область. Это явление связано либо с катионным обменом на поверхности КТ, вызывающим градиентное легирование и соответственно уменьшение размеров ядра ввиду квантового ограничения, либо с увеличением ширины запрещенной зоны материала. Таким образом, механизмы люминесценции тройных КТ сильно зависят от стехиометрии и структуры нанокристаллов.

Состав и структура КТ определяют ширину запрещенной зоны (E_g) в квантовых точках, от которой зависят их оптические характеристики (спектры возбуждения и испускания) [12]. Например, КТ состава I–III–VI₂ демонстрируют прямую запрещенную зону с шириной 1.5 эВ (сульфид меди-индия), 1.05 эВ (селенид меди-индия), 1.87 эВ (сульфид серебра-индия) и 1.2 эВ (селенид серебра-индия) [2]. Оптические свойства таких соединений наиболее подробно рассмотрены для систем CuInS₂ (CIS) и AgInS₂ (AIS) со структурой ядро/оболочка или со структурой твердого раствора ZnS. Такие системы демонстрируют:

- *Широкий спектр поглощения*, благодаря чему КТ с разным диаметром могут быть одновременно возбуждены одним источником света для наблюдения эмиссии от КТ разного цвета. В отличие от бинарных КТ, для которых характерен хорошо различимый экситонный пик в видимой и ультрафиолетовой областях, тройные КТ демонстрируют непрерывный характер полосы поглощения без максимумов.
- *Широкий пик излучения ФЛ* (100–150 нм), с одной стороны, затрудняющий отдельную обработку сигналов от смеси КТ, с другой, – позволяющий использовать более широкий круг детекторов.
- *Значительное время жизни ФЛ* (сотни наносекунд) по сравнению с бинарными КТ (десятки наносекунд), что объясняется рекомбинацией донорно-акцепторной пары в зависимости от состава и структуры КТ. Большое время жизни упрощает использование таких КТ в качестве меток в химическом анализе.
- *Значительный Стоксов сдвиг* (0.5–0.6 эВ), который снижает эффекты перепоглощения [17].

• *Отсутствие ионов тяжелых металлов* (Cd, Hg, Pb) в составе, что позволяет говорить о низкой токсичности данных квантовых структур и объясняет интерес к применению тройных КТ в биомедицинских исследованиях [18–20].

Таким образом, зависимость свойств от состава и структуры КТ предполагает разработку воспроизводимых способов их получения с заданными характеристиками, определяющимися областью их дальнейшего применения.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОЛЛОИДНОГО СИНТЕЗА КВАНТОВЫХ ТОЧЕК СТРУКТУРЫ I–III–VI₂

В настоящее время основными подходами к получению тройных КТ являются методы высокотемпературного и инъекционного синтезов в органических растворителях при высоких температурах [21]. Тип растворителя определяет максимальную температуру реакции [22]. В высокотемпературном методе синтеза КТ один или несколько прекурсоров металлов в сочетании с источником серы нагревают и выдерживают в течение большого промежутка времени для получения КТ. Среда обеспечивает условия для формирования нанокристаллов с небольшим количеством дефектов решетки и позволяет контролировать размер, форму и морфологию получаемого продукта [23]. В качестве среды и поверхностно-пассивирующего агента в высокотемпературном методе используют органические растворители, такие как октадецен, триоктилфосфин или олеиламин и додекантиол [24]. Получаемые таким способом наночастицы в основном гидрофобны, поэтому их переводят в водную фазу с целью улучшения биосовместимости и повышения стабильности.

Авторы работы [25] продемонстрировали двухэтапную стратегию получения КТ с мультислойной оболочкой CuInS₂/ZnS/ZnS ($\lambda_{\text{ФЛ}} = 554$ нм) при высоких температурах (230–240°C). Квантовый выход ФЛ таких структур достигал 76% с хорошей монодисперсностью, что позволило применить их в светоизлучающих диодах.

Инъекционный метод получения КТ основан на созревании Оствальда. Этот синтез начинается с введения холодного раствора реакционноспособного прекурсора в горячий органический растворитель, который вызывает образование зародышей кристаллов. При понижении температуры растворителя новые ядра не образуются. Рост монодисперсных ядер в более крупные частицы происходит при низкой температуре, при которой образование новых ядер невозможно. Такой подход позволяет настраивать средний размер КТ, варьируя продолжительность нагрева реакционной смеси после впрыскивания. В работе [7] осуществлен синтез CuInS₂ методом горячей

инъекции. Показано, что от дозы олеиламина, выступающего в качестве органического кэпирующего агента, зависят кристаллическая структура и размер получаемых КТ. Так, в случае низкой концентрации олеиламина (0.1 и 1.5 мл) образовывалась фаза сфалерита, а более высокие концентрации олеиламина способствовали формированию фаз псевдохалькопирита и вюрцита. Авторы работы [26] получили CIS/ZnS КТ типа халькопирита с настраиваемой эмиссией от 632 до 739 нм с КВ ФЛ до 62% одностадийным методом горячей инъекции. Такие характеристики были достигнуты за счет варьирования температуры и времени реакции, а также количества модификатора.

Однако многие варианты применения тройных КТ, в частности, в качестве люминесцентных меток, требуют, чтобы КТ образовывали стабильные коллоиды в полярных растворителях, прежде всего, в воде. Квантовые точки, полученные в органических растворителях, переводят в водную среду путем обмена первичных лиофильных лигандов на небольшие бифункциональные молекулы, которые могут пассивировать поверхность КТ и в то же время делают ее гидрофильной [16, 17].

В качестве альтернативы в последнее время активно предпринимаются попытки получения тройных КТ непосредственно в водной среде [3]. Основными преимуществами такого подхода считаются улучшенная биосовместимость, хороший выход продукта, меньшее количество органических отходов, что приводит к низкому загрязнению окружающей среды и снижению экономических затрат. Реакция обычно происходит между поверхностными лигандами и прекурсорами металлов. Нитраты или галогениды металлов используют в качестве прекурсоров, тиомочевину и сульфид натрия – в качестве источника серы благодаря их хорошей растворимости в воде и высокой реакционной способности. Водорастворимые тиолы, такие как глутатион, меркаптоуксусная кислота, меркаптопропионовая кислота, L-цистеин используют в качестве стабилизаторов поверхности.

Как правило, синтез КТ ядра/оболочки представляет собой двухэтапный процесс – сначала синтез ядер, а затем нанесение оболочки. Так, в работе [15] осуществлен синтез КТ структуры ядро/оболочка AgInS₂/ZnS непосредственно в водной среде при 96–98°C с применением тиогликолевой кислоты в качестве стабилизатора поверхности. Оптимальное молярное соотношение Ag : In : S составило 1 : 7 : 10, а Zn : Ag – 10 : 1. Последующее многократное переосаждение КТ 2-пропанолом привело к получению 11 фракций КТ с испусканием в области спектра от красной до зеленой и максимальным значением КВ ФЛ до 47%. Авторы работы [27] описали синтез КТ AgInS₂/ZnS

(AIS/ZnS) непосредственно в водной среде с использованием глутатиона в качестве модификатора поверхности. Полученные квантовые структуры имели размер ~2.9 нм. До покрытия оболочкой сульфида цинка эмиссия AgInS₂ составила 665 нм, после покрытия – 623 нм. Квантовый выход ФЛ при этом увеличился с 31.6% (AgInS₂) до 49.5% (AgInS₂/ZnS). Сдвиг максимума полосы ФЛ в коротковолновую область авторы объясняли частичным обменом между катионами ядра (Cu, In) и оболочкой (Zn). В работе [28] описано получение гидрофильных КТ непосредственно в воде в течение 45 мин при 95°C. В качестве агента для создания оболочки использовали тиогликолевую кислоту и цитрат натрия. Полученные КТ люминесцировали при 680 нм с КВ ФЛ 10.3% и средним размером частиц ~2.5 нм.

Следует отметить, что прямой синтез в водной фазе ограничен температурой кипения воды, из-за чего эффективный контроль морфологии КТ в процессе их роста не всегда осуществим. В последнее время активно проводятся исследования по получению КТ типа I–III–VI₂ методами гидротермального синтеза [29, 30]. Для этого используют автоклавы и нагревают выше температуры кипения растворителя в течение нескольких часов. Увеличение температуры гидротермального процесса, в котором основной средой является вода, под действием давления приводит к уменьшению поверхностных дефектов, следовательно, к улучшению морфологии поверхности нанокристалла. Протокол синтеза основан на введении предшественников металлов с поверхностным лигандом, корректировке pH и добавлении халькогенидной соли. В работе [31] синтезированы КТ структуры ядро/оболочка состава AIS/ZnS с применением гидротермального метода синтеза. В качестве лиганда и стабилизатора поверхности использовали цитрат натрия и L-глутатион. Синтез осуществляли в течение 5 ч в автоклаве при 90°C. Варьируя соотношение Zn/AgIn и тиомочевина/цинк, можно получить КТ с эмиссией в желто-оранжевой области спектра и максимальным КВ до 45.7% с временем жизни 482 нс. Сию Лю и соавт. [32] показали, что, варьируя время гидротермального синтеза (150°C, 21 ч), можно получить КТ CuInS₂, испускающие свет в ближнем инфракрасном диапазоне спектра ($\lambda_{\text{ФЛ}} = 660$ нм).

Тем не менее КТ, синтезированные в водной фазе, по-прежнему уступают по оптическим характеристикам КТ, полученным в высококипящих органических растворителях. Однако возможность разделения после синтеза различных по размеру фракций, отсутствие сложных процедур очистки и гидрофилизации, а также определенные успехи по получению КТ в воде делают такие методики синтеза КТ перспективными и востребованными.

ПРИМЕНЕНИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК СОСТАВА I–III–VI₂ В ХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ И БИМЕДИЦИНЕ

Химический анализ. Последние достижения в области нанотехнологий и наноматериалов интегрированы в аналитическую химию для разработки большого количества флуоресцентных химических и биологических сенсоров на различные аналиты [2, 20, 33]. Суть применения КТ в качестве химического сенсора заключается в изменении спектроскопического/флуоресцентного сигнала из-за специфического взаимодействия с аналитом. Такое взаимодействие между КТ и аналитом может привести к тушению или усилению аналитического сигнала из-за процессов рекомбинации электронно-дырочной пары [3]. В качестве наиболее распространенных аналитов, используемых в разработке флуоресцентных датчиков, являются антитела, ДНК, РНК, глюкоза, ферменты, раковые биомаркеры и т.д.

Так, авторы работы [34] синтезировали квантовые структуры AgInS₂ с аминогруппами на поверхности при использовании полиэтиленimina в качестве модификатора поверхности и КВ ФЛ 32% непосредственно в водной среде. Полученные образцы использовали для определения глюкозы за счет уменьшения флуоресценции КТ. В диапазоне 1–10 мкМ и 1–1000 мкМ зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации глюкозы линейна с пределом обнаружения (ПрО) 0.90 мкМ.

Синтезированные в водной среде КТ AgInZnS применены в качестве сенсора для обнаружения ионов кадмия [35]. Посредством электростатического взаимодействия ионы кадмия адсорбировались на отрицательно заряженные КТ, что приводило к усилению рекомбинации пары донор/акцептор и пассивации поверхностных дефектов КТ, в связи с чем, присутствие ионов кадмия увеличивало интенсивность флуоресценции КТ. Данный сенсор способен определять ионы кадмия в пробах воды в диапазоне концентраций 0.1–290 мкМ с ПрО 37.8 нМ.

Хорошие селективность и чувствительность (ПрО 15 нМ) достигнуты в работе [36] по обнаружению ионов меди с применением КТ AgInS₂, модифицированных додецилтриметиламмоний бромидом в качестве поверхностного агента. Добавление ионов меди к КТ приводило к тушению флуоресценции КТ, обусловленному переносом электрона на медь(II), что подтверждалось данными рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии.

Модифицированные меркаптопропионовой кислотой и полиэтиленимином КТ AgInS₂ использованы в работе [37] для обнаружения гормона дофамина в сыворотке крови. Интенсивность флуоресценции синтезированных КТ линейно

уменьшалась при увеличении концентрации дофамина в диапазоне 0.5–300 мкМ с PrO 2.84 нМ. Авторы предполагают, что механизм тушения флуоресценции связан с фотоиндуцированными электронами, мигрировавшими из КТ в дофаминхинон, которые возникли в результате окисления дофамина окружающим кислородом.

Кроме методов, основанных на тушении или усилении сигнала флуоресценции КТ в присутствии различных ионов или молекул, существуют методы, использующие КТ для визуализации специфических взаимодействий, например, антиген–антитело [38]. Сущность такого подхода состоит в использовании КТ в роли флуоресцентных меток антигенов, либо специфичных антител. В работе [39] применили подход антиген/антитело для разработки иммунохроматографического анализа с КТ $CuInZnS/ZnS//ZnS$ в качестве флуоресцентных меток для определения С-реактивного белка (маркер воспаления). Диапазон определяемых содержаний С-реактивного белка в сыворотке крови составил 0–800 нг/мл с пределом обнаружения 5.8 нг/мл. Авторами работы [40] разработана методика определения человеческого интерлейкина-6 с использованием КТ $CuInS/ZnS$ в “сэндвич-формате” иммуноанализа. Микроволновый синтез КТ $CuInS/ZnS$ позволил получить КТ, испускающие свет в видимом диапазоне спектра. Полученные КТ применили в качестве меток в иммунофлуоресцентном анализе для определения интерлейкина-6 с пределом обнаружения 0.008 нг/мл. Авторы отмечают возможность использования полученных КТ в медицинской диагностике для определения биомаркеров рака и других заболеваний.

Помимо определения маркеров различных заболеваний показана возможность применения тройных КТ для контроля различных низкомолекулярных соединений – микотоксинов, фолиевой кислоты и др., что важно для мониторинга качества продуктов питания и объектов окружающей среды (табл. 1). Квантовые точки состава $AgInS/ZnS$, синтезированные водным методом, применены в качестве люминесцентной метки в иммунохроматографическом анализе для количественного определения и качественного обнаружения фолиевой кислоты в образцах сока в течение 20 мин с пределом обнаружения 0.1 нг/мл [41]. Сперанская и соавт. [42] методом высокотемпературного органического синтеза синтезировали КТ $CuInS/ZnS$, покрытые ПЭГ-содержащим браш-полимером, с КВ ФЛ более 50%. Продемонстрировано успешное связывание КТ с антителами для иммунофлуоресцентного определения афлатоксина В1 (микотоксин) с PrO 0.03 нг/мл. Авторы отметили, что использование метки на основе КТ состава $I-III-VI_2$ позволило повысить чувствительность анализа в че-

тыре раза по сравнению с ферментативной меткой.

Биоаналитические сенсорные платформы на основе КТ могут также использовать Ферсеровский резонансный перенос энергии (ФРПЭ). В этом случае энергия передается от донора энергии (КТ) к акцептору за счет диполь-дипольных взаимодействий [3]. Длительное время жизни ФЛ тройных КТ способствует разработке сенсорных систем нового поколения. Так, Кузнецова и соавт. [43] разработали систему мультиплексного анализа с временным разрешением на основе КТ $AgInS_2/ZnS$ (донор) и цианинового красителя (акцептор), которая основана на тушении флуоресценции КТ. Показано, что в комплексах КТ $AgInS_2/ZnS$ с цианиновыми красителями $Cu3$ и $Cu5$ происходит эффективный ФРПЭ при значительном увеличении интенсивности и времени жизни ФЛ красителей $Cu3$ и $Cu5$ с 0.6 и 0.5 нс до 5 и 9 нс соответственно. Эта же научная группа [44] продемонстрировала платформу на основе ФРПЭ между КТ $AgInS_2/ZnS$, внедренными в матрицу-носитель на основе полимерных микросфер, и двумя цианиновыми красителями. Уменьшение расстояния между КТ и красителем приводило к тушению флуоресценции КТ. По данным авторов, данная платформа имеет потенциал для разработки селективных и чувствительных датчиков для мультиплексного определения различных биомаркеров.

Таким образом, использование низкотоксичных КТ структуры $I-III-VI_2$ для определения различных биологических соединений имеет преимущества по сравнению с традиционными подходами на основе органических красителей и белковых флуорофоров с точки зрения чувствительности, стабильности и возможности мультиплексирования, несмотря на начальный этап их применения.

Биомедицина. Применение КТ состава $I-III-VI_2$ в биовизуализации молекул может предоставить ключевую информацию при изучении физиологических процессов или диагностике заболеваний. Возросший интерес к данной тематике обусловлен не только малыми размерами КТ, настраиваемой эмиссией вплоть до ближней ИК-области (окно прозрачности биоткани 650–1350 нм), хорошей стабильностью и яркостью излучения, но и отсутствием ионов тяжелых металлов (Cd, Pb, Hg) в их составе, так как одной из проблем применения бинарных КТ в биологии является их потенциальная токсичность [2, 45, 46]. Важно понимать, что уровень биотоксичности КТ обусловлен не только внутренней токсичностью ионов металлов, входящих в состав КТ, но и покрывающими поверхность КТ лигандами, концентрацией, способом доставки и биораспределением в организме.

Таблица 1. Применение тройных квантовых точек в химическом анализе

Область применения	Аналит	Образец	КТ					Метод синтеза	Механизм взаимодействия	Линейный диапазон	Про	Литература
			тип КТ	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{ФЛ}}$, нм	КВ ФЛ, %	размер, нм					
Анализ объектов окружающей среды	Cd^{2+}	Водные растворы	AgInZnS	Н/д	556	До 41	~4	Водный	Адсорбция ионов Cd^{2+} за счет электростатических взаимодействий → усиление ФЛ КТ	0.1–290 мкМ	37.8 наноМ	[35]
	Cu^{2+}	Водные растворы	Zn-AIS	365	601	31.2	4.5	Высокотемпературный	Тушение с переносом электрона	0.05–10 мкМ	15 наноМ	[36]
Клинический анализ	Дофамин	Сыворотка крови человека	AIS	Н/д	530–670	8.76	2.1 ± 0.77	Гидротермальный	Тушение ФЛ	0.5–300 мкМ	2.84 наноМ	[37]
	C-реактивный белок	Сыворотка крови человека	CuInZnS/ZnS//ZnS	365	537	≤58	7.8 ± 1.2	Высокотемпературный	Подавление ФЛ из-за взаимодействия антиген-антитело	0–800 нг/мл	5.8 нг/мл	[39]
	Интерлейкин-6 человека	–	CIS/ZnS	Н/д	540–680	24	~3.3	Микроволновый	Подавление ФЛ из-за взаимодействия антиген-антитело	0.02 нг/мл до 20 нг/мл	0.008 нг/мл	[40]
Анализ пищевых продуктов	Глюкоза	–	AIS-ПЭИ	420	560	До 32	3.1	Водный	Тушение ФЛ переносом электрона	1–10 мкМ и 10–1000 мкМ	0.90 мкМ	[34]
	Афлатоксин В1	Кукуруза и пшеница	CIS/ZnS	Н/д	650	50	≈4.5	Высокотемпературный	Ферментативный метод, тушение ФЛ	0.5–18 мкг/кг	0.6 мкг/кг	[42]
	Фолиевая кислота	Фруктовые соки	AIS/ZnS	410	590	38	<7	Водный	Подавление ФЛ из-за взаимодействия антиген-антитело	2–47 нг/мл	0.1 нг/мл	[41]

Обозначения: КВ – квантовый выход, КТ – квантовая точка, Н/д – недоступные данные, Про – предел обнаружения, ПЭИ – полиэтиленимин, ФЛ – флуоресценция.

Опубликованные работы демонстрируют потенциал применения тройных КТ I–III–VI₂ в современных исследованиях по тераностике [19]. Для направленной доставки и нацеливания на специальные антигены, КТ должны быть функционализированы с помощью соответствующих нацеливающих агентов, таких как аптамер, антитело или биоспецифические лиганды (фолиевая кислота). Например, в работе [47] представлена стратегия ковалентного связывания КТ AgInS₂/ZnS, покрытых амфифильным полимером поли(малеиновым ангидридом-альт-1-октадеценем) с противораковым производным фолиевой кислоты метотрексатом. С помощью анализа пролиферации клеток установлено, что клетки рака шейки матки (HeLa) сохранили >80% жизнеспособных клеток через 24 ч при концентрациях до 300 мкг/мл. Кроме того, с помощью МТТ-теста показано, что этот наноматериал оказывает дозозависимое антипролиферативное действие на раковые клетки. Эти важные особенности предполагают, что КТ AgInS₂/ZnS, конъюгированные с метотрексатом, могут стать новым кандидатом для диагностики и лечения рака в будущем. В работе [48] использовали КТ AgInS₂, помеченные фолиевой кислотой в качестве нацеливающего агента и метотрексатом в качестве противоопухолевого препарата, для фототермической и комбинированной терапии рака. Метотрексат, доставляемый с КТ, меченный фолиевой кислотой, снижал жизнеспособность клеток HeLa в зависимости от дозы и времени, снижая IC₅₀ метотрексата с 10 мкг/мл до 5–2.5 мкг/мл за 24–48 ч. Сообщалось [49], что КТ CuInS₂, полученные гидротермальным методом и люминесцирующие в ИК-области, конъюгированы с противораковым препаратом доксорубицином; при этом происходит эффективная доставка доксорубина к раковым клеткам-мишеням.

Авторы работы [50] использовали КТ AgInS₂/ZnS и карбоксиметилцеллюлозу в качестве стабилизирующего лиганда для мультиплексной визуализации клеток злокачественной глиомы (U-87 MG) *in vitro*, показав их перспективы в качестве современной наноплатформы для мультимодальной биовизуализации.

Кроме описанных выше подходов, применяются КТ, допированные гадолинием и марганцем с целью придания КТ магнитных свойств [51–53]. Это позволит отслеживать морфологические изменения мягких тканей на уровне всего организма и дать оценку развитию заболевания. Так, группа исследователей [52] сообщила о возможности допирования гадолинием КТ CuInS₂/ZnS и использовании полученной системы в качестве нанозонда для мультимодальной визуализации раковых клеток HeLa. Таким образом, допирование КТ парамагнитными ионами позволяет осуществлять адресную доставку в интересующую

ткань и обеспечивать мультимодальную визуализацию, которая играет решающую роль в клинической диагностике.

Несмотря на значительные успехи применения некадмиевых КТ структуры I–III–VI₂ в качестве низкотоксичных нанозондов и наноносителей в биомедицинских исследованиях, вопрос об их долгосрочном воздействии *in vivo* еще предстоит изучить.

* * *

Востребованность новых аналитических методов с улучшенной чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и высокой селективностью обусловила интерес к полупроводниковым КТ структуры I–III–VI₂ и, как следствие, к большому разнообразию способов их получения и модификации. Образцы КТ, обладающие хорошим распределением по размеру, сферической формой и высокими значениями КВ ФЛ получают с применением подходов высокотемпературного и инъекционного методов синтеза, подобно бинарным КТ. Однако возможность получения разных фракций КТ в зависимости от размера, отсутствие сложных процедур очистки и гидрофилизации, а также удовлетворительные оптические характеристики делают водные методики синтеза КТ также перспективными и востребованными. Следует, однако, отметить, что существуют еще некоторые нерешенные вопросы, связанные с механизмом люминесценции тройных КТ, их структурой и влиянием на процессы синтеза КТ и их свойства. Тем не менее опубликованные работы по аналитическому применению некадмиевых КТ показали хорошую чувствительность (PrO на уровне наномолярных концентраций), селективность и биосовместимость, однако вопрос об их долгосрочном воздействии *in vivo* еще предстоит изучить.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 20-13-00195).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knowles K.E., Hartstein K.H., Kilburn T.B., Marchioro A., Nelson H.D., Whitham P.J., Gamelin D.R. Luminescent colloidal semiconductor nanocrystals containing copper: Synthesis, photophysics, and applications // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. № 18. P. 10820.
2. Jain S., Bharti S., Bhullar G.K., Tripathi S.K. I–III–VI core/shell QDs: Synthesis, characterizations and applications // *J. Lumin.* 2020. V. 219. Article 116912.
3. Muñoz R., Santos E.M., Galan-Vidal C.A., Miranda J.M., Lopez-Santamarina A., Rodriguez J.A. Ternary quantum dots in chemical analysis. Synthesis and detection mechanisms // *Molecules.* 2021. V. 26. № 9. P. 2764.
4. Chen B., Zhong H., Zhang W., Tan Z. A., Li Y., Yu C., Zhai T., Bando Y., Yang S., Zou B. Highly emissive and

- color-tunable CuInS₂-based colloidal semiconductor nanocrystals: Off-stoichiometry effects and improved electroluminescence performance // *Adv. Funct. Mater.* 2012. V. 22. № 10. P. 2081.
5. *Jing L., Kershaw S.V., Li Y., Huang X., Li Y., Rogach A.L., Gao M.* Aqueous based semiconductor nanocrystals // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. № 18. P. 10623.
 6. *van Der Stam W., Berends A.C., de Mello Donega C.* Prospects of colloidal copper chalcogenide nanocrystals // *Chem. Phys. Chem.* 2016. V. 17. № 5. P. 559.
 7. *Liu L., Li H., Liu Z., Xie Y. H.* Structure and band gap tunable CuInS₂ nanocrystal synthesized by hot-injection method with altering the dose of oleylamine // *Mater. Des.* 2018. V. 149. P. 145.
 8. *Cichy B., Wawrzynczyk D., Samoc M., Stręk W.* Electronic properties and third-order optical nonlinearities in tetragonal chalcopyrite AgInS₂, AgInS₂/ZnS and cubic spinel AgIn₅S₈, AgIn₅S₈/ZnS quantum dots // *J. Mater. Chem. C.* 2017. V. 5. № 1. P. 149.
 9. *Moodelly D., Kowalik P., Bujak P., Pron A., Reiss P.* Synthesis, photophysical properties and surface chemistry of chalcopyrite-type semiconductor nanocrystals // *J. Mater. Chem. C.* 2019. V. 7. № 38. P. 11665.
 10. *Cai C., Zhai L., Ma Y., Zou C., Zhang L., Yang Y., Huang S.* Synthesis of AgInS₂ quantum dots with tunable photoluminescence for sensitized solar cells // *J. Power Sources.* 2017. V. 341. P. 11.
 11. *Protesescu L., Yakunin S., Bodnarchuk M.I., Krieg F., Caputo R., Hendon C.H., Yang R.X., Walsh A., Kovalenko M. V.* Nanocrystals of cesium lead halide perovskites (CsPbX₃, X = Cl, Br, and I): Novel optoelectronic materials showing bright emission with wide color gamut // *Nano Lett.* 2015. V. 15. № 6. P. 3692.
 12. *Абрамова А.М., Горячева О.А., Дрозд Д.Д., Новикова А.С., Пономарева Т.С., Строкин П.Д., Горяева И.Ю.* Люминесцентные полупроводниковые квантовые точки в химическом анализе // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 3. С. 195. (*Abramova A.M., Goryacheva O.A., Drozd D.D., Novikova A.S., Ponomareva T.S., Strokin P.D., Goryacheva I.Y.* Luminescence semiconductor quantum dots in chemical analysis // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 3. P. 273.)
 13. *Zhang C., Xia Y., Lian L., Fu X., Yin L., Zhang J., Luo W., Miao X., Zhang, D.* Dependence of the photoluminescence of hydrophilic CuInS₂ colloidal quantum dots on Cu-to-In molar ratios // *J. Electron. Mater.* 2019. V. 48. № 1. P. 286.
 14. *Soares J. X., Wegner K.D., Ribeiro D.S., Melo A., Häußler I., Santos J.L., Resch-Genger U.* Rationally designed synthesis of bright AgInS₂/ZnS quantum dots with emission control // *Nano Res.* 2020. V. 13. № 9. P. 2438
 15. *Raevskaya A., Lesnyak V., Haubold D., Dzhanagan V., Stroyuk O., Gaponik N., Zahn D.R.T., Eychmüller A.* A fine size selection of brightly luminescent water-soluble Ag-In-S and Ag-In-S/ZnS quantum dots // *J. Phys. Chem. C.* 2017. V. 121. № 16. P. 9032.
 16. *Zhou P., Zhang X., Liu X., Xu J., Li L.* Temperature-dependent photoluminescence properties of quaternary ZnAgInS quantum dots // *Opt. Express.* 2016. V. 24. № 17. P. 19506.
 17. *Li S., Tang X., Zang Z., Yao Y., Yao Z., Zhong H., Chen B.* I–III–VI chalcogenide semiconductor nanocrystals: Synthesis, properties, and applications // *Chinese J. Catal.* 2018. V. 39. № 4. P. 590.
 18. *Zhu C., Chen Z., Gao S., Goh B. L., Samsudin I. B., Lwe K.W., Wu Y., Wu C., Su X.* Recent advances in non-toxic quantum dots and their biomedical applications // *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 2019. V. 29. № 6. P. 628.
 19. *Ranjbar-Navazi Z., Omid Y., Eskandani M., Davaran S.* Cadmium-free quantum dot-based theranostics // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 118. P. 386.
 20. *Kokorina A.A., Ponomaryova T.S., Goryacheva I.Y.* Photoluminescence-based immunochemical methods for determination of C-reactive protein and procalcitonin // *Talanta.* 2021. V. 224. Article 121837.
 21. *Reiss P., Carriere M., Lincheneau C., Vaure L., Tamang S.* Synthesis of semiconductor nanocrystals, focusing on nontoxic and earth-abundant materials // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. № 18. P. 10731.
 22. *Gong F., Tian S., Liu B., Xiong D., Zhao X.* Oleic acid assisted formation mechanism of CuInS₂ nanocrystals with tunable structures // *RSC Adv.* 2014. V. 4. № 69. P. 36875.
 23. *Girma W.M., Fahmi M.Z., Permadi A., Abate M.A., Chang J.Y.* Synthetic strategies and biomedical applications of I–III–VI ternary quantum dots // *J. Mater. Chem. B.* 2017. V. 5. № 31. P. 6193.
 24. *Tsolekile N., Parani S., Matoetoe M.C., Songca S.P., Oluwafemi O.S.* Evolution of ternary I–III–VI QDs: Synthesis, characterization and application // *Nano-Structures and Nano-Objects.* 2017. V. 12. P. 46.
 25. *Ye Y., Yang Z., Zhao Z., Zheng K., Yang B., Liu J., Ye B, Gong Z., Xu S.* Efficient multi-shell CuInS₂/ZnS/ZnS quantum-dots based light-emitting diodes: Time-controlled synthesis of quantum-dots and carrier balance effects of PEI // *Opt. Mater.* 2020. V. 106. Article 109926.
 26. *Xiang W., Xie C., Wang J., Zhong J., Liang X., Yang H., Luo L., Chen Z.* Studies on highly luminescent AgInS₂ and Ag–Zn–In–S quantum dots // *J. Alloys Compd.* 2014. V. 588. P. 114.
 27. *Parani S., Oluwafemi O. S.* Selective and sensitive fluorescent nanoprobe based on AgInS₂/ZnS quantum dots for the rapid detection of Cr(III) ions in the midst of interfering ions // *Nanotechnology.* 2020. V. 31. № 39. Article 395501.
 28. *May B.M., Parani S., Oluwafemi O.S.* Detection of ascorbic acid using green synthesized AgInS₂ quantum dots // *Mater. Lett.* 2019. V. 236. P. 432.
 29. *Chen T., Hu X., Xu Y., Wang L., Jiang W., Jiang W., Xie Z.* Hydrothermal synthesis of highly fluorescent Ag–In–S/ZnS core/shell quantum dots for white light-emitting diodes // *J. Alloys Compd.* 2019. V. 804. P. 119.
 30. *Hu X., Chen T., Xu Y., Wang M., Jiang W., Jiang W.* Hydrothermal synthesis of bright and stable AgInS₂ quantum dots with tunable visible emission // *J. Lumin.* 2018. V. 200. P. 189.
 31. *Chen S., Ahmadiantehrani M., Zhao J., Zhu S., Mamalis A.G., Zhu X.* Heat-up synthesis of Ag-In-S and Ag-In-S/ZnS nanocrystals: Effect of indium pre-

- cursors on their optical properties // *J. Alloys Compd.* 2016. V. 665. P. 137.
32. Liu S., Li Y., Su X. Determination of copper(ii) and cadmium(ii) based on ternary CuInS₂ quantum dots // *Anal. Methods.* 2012. V. 4. № 5. P. 1365.
 33. Goryacheva O.A., Novikova A.S., Drozd D.D., Pidenko P.S., Ponomaryeva T.S., Bakal A.A., Mishra P.K., Beloglazova N.V., Goryacheva I. Y. Water-dispersed luminescent quantum dots for miRNA detection // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 111. P. 197.
 34. Wang L., Kang X., Pan D. Gram-scale synthesis of hydrophilic PEI-coated AgInS₂ quantum dots and its application in hydrogen peroxide/glucose detection and cell imaging // *Inorg. Chem.* 2017. V. 56. № 11. P. 6122.
 35. Liu Y., Tang X., Deng M., Zhu T., Edman L., Wang J. Hydrophilic AgInZnS quantum dots as a fluorescent turn-on probe for Cd²⁺ detection // *J. Alloys Compd.* 2021. V. 864. P. Article 158109.
 36. Liu Y., Deng M., Zhu T., Tang X., Han S., Huang W., Shi Y., Liu A. The synthesis of water-dispersible zinc doped AgInS₂ quantum dots and their application in Cu²⁺ detection // *J. Lumin.* 2017. V. 192. P. 547.
 37. Shi H., Jia L., Wang C., Liu E., Ji Z., Fan J. A high sensitive and selective fluorescent probe for dopamine detection based on water soluble AgInS₂ quantum dots // *Opt. Mater.* 2020. V. 99. P. 109549.
 38. Foubert A., Beloglazova N.V., Rajkovic A., Sas B., Madder A., Goryacheva I.Y., De Saeger S. Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 83. P. 31.
 39. Wu R., Zhou S., Chen T., Li J., Shen H., Chai Y., Li L.S. Quantitative and rapid detection of C-reactive protein using quantum dot-based lateral flow test strip // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1008. P. 1.
 40. Xiong W.W., Yang G.H., Wu X.C., Zhu J.J. Aqueous synthesis of color-tunable CuInS₂/ZnS nanocrystals for the detection of human interleukin 6 // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2013. V. 5. № 16. P. 8210.
 41. Novikova A.S., Ponomaryeva T.S., Goryacheva I.Y. Fluorescent AgInS/ZnS quantum dots microplate and lateral flow immunoassays for folic acid determination in juice samples // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. № 8. P. 1.
 42. Speranskaya E.S., Beloglazova N.V., Abé S., Aubert T., Smet P.F., Poelman D., Goryacheva I.Y., De Saeger S., Hens Z. Hydrophilic, bright CuInS₂ quantum dots as Cd-free fluorescent labels in quantitative immunoassay // *Langmuir.* 2014. V. 30. № 25. P. 7567.
 43. Kuznetsova V., Tkach A., Cherevkov S., Sokolova A., Gromova Y., Osipova V., Baranov M., Ugolkov V., Fedorov A., Baranov A. Spectral-time multiplexing in fret complexes of AgInS₂/ZnS quantum dot and organic dyes // *Nanomaterials.* 2020. V. 10. № 8. P. 1.
 44. Kuznetsova V., Osipova V., Tkach A., Miropoltsev M., Kurshanov D., Sokolova A., Cherevkov S., Zakharov V., Fedorov A., Gun'ko Y., Baranov A. Lab-on-microsphere-fret-based multiplex sensor platform // *Nanomaterials.* 2021. V. 11. № 1. P. 1.
 45. Lian W., Tu D., Hu P., Song X., Gong Z., Chen T., Song J., Chen Z., Chen X. Broadband excitable NIR-II luminescent nano-bioprobes based on CuInSe₂ quantum dots for the detection of circulating tumor cells // *Nano Today.* 2020. V. 35. Article 100943.
 46. Wang L., Xu D., Gao J., Chen X., Duo Y., Zhang H. Semiconducting quantum dots: Modification and applications in biomedical science // *Sci. China Mater.* 2020. V. 63. № 9. P. 1631.
 47. Wu P.J., Ou K.L., Chen J.K., Fang H.P., Tzing S.H., Lin W.X., Chang J.Y. Methotrexate-conjugated AgInS₂/ZnS quantum dots for optical imaging and drug delivery // *Mater. Lett.* 2014. V. 128. P. 412.
 48. Hashemkhani M., Muti A., Sennaroğlu A., Acar H.Y. Multimodal image-guided folic acid targeted Ag-based quantum dots for the combination of selective methotrexate delivery and photothermal therapy // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2020. V. 213. Article 112082.
 49. Gao X., Liu Z., Lin Z., Su X. CuInS₂ quantum dots/poly(l-glutamic acid)-drug conjugates for drug delivery and cell imaging // *Analyst.* 2014. V. 139. № 4. P. 831.
 50. Mansur A.A., Mansur H.S., Carvalho S.M., Caires A.J. One-pot aqueous synthesis of fluorescent Ag-In-Zn-S quantum dot/polymer bioconjugates for multiplex optical bioimaging of glioblastoma cells // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2017. V. 2017. Article ID 3896107.
 51. Gedda G., Chen G.R., Yao Y.Y., Girma W.M., Li J.D., Yen C.L., Ling Y.C., Chang J.Y. Aqueous synthesis of dual-targeting Gd-doped CuInS₂/ZnS quantum dots for cancer-specific bi-modal imaging // *New J. Chem.* 2017. V. 41. № 23. P. 14161.
 52. Chen S., Zaeimian M.S., Monteiro J.H., Zhao J., Mamalis A.G., de Bettencourt-Dias A., Zhu X. Mn doped AIZS/ZnS nanocrystals: Synthesis and optical properties // *J. Alloys Compd.* 2018. V. 725. P. 1077.
 53. Chetty S.S., Praneetha S., Vadivel Murugan A., Govarthanan K., Verma R.S. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells labeled with Mn²⁺ and Gd³⁺ co-doped CuInS₂-ZnS nanocrystals for multimodality imaging in a tumor mice model // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020. V. 12. № 3. P. 3415.

УДК 543.05,543.062,615.074

СУХИЕ ОБРАЗЦЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ НА ПОРИСТЫХ МЕМБРАНАХ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОЙ И ВЕТЕРИНАРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

© 2022 г. Ж. В. Самсонова^а, *, Н. Ю. Саушкин^а, А. П. Осипов^а^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119992 Россия

*e-mail: jvsamsonova@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2021 г.

После доработки 11.10.2021 г.

Принята к публикации 11.10.2021 г.

Метод пробоподготовки жидких биообразцов в высушенном на носителе виде (технология сухих пятен крови) в последние 20 лет находит все более широкое применение в разных областях биоанализа, фармакокинетики, терапевтическом мониторинге лекарственных средств, токсикокинетики, метаболомики и диагностики заболеваний. Технология сухих пятен крови включает в себя нанесение образца непосредственно на носитель; после высушивания образец анализируют с помощью современных аналитических, иммунохимических и генетических методов. К преимуществам такого метода пробоподготовки относятся минимальная инвазивность, небольшой объем образца, легкость и экономичность отбора, транспортировки и хранения проб, высокая стабильность аналитов. В обзоре рассмотрены основные аспекты применения метода пробоподготовки биологических жидкостей, суспензий, тканей и органов в виде сухих пятен на пористых мембранных носителях в аналитической практике. Описаны принципы использования мембранных носителей для получения биологических образцов в виде сухих пятен, подходы к их аналитическому применению, мешающие факторы и ограничения, связанные с реологическими свойствами крови, виды устройств для отбора крови и других проб, текущее состояние и перспективы развития технологии сухих пятен.

Ключевые слова: биологические жидкости, сухие пятна крови, пористые мембранные носители, экстракция.

DOI: 10.31857/S0044450222040119

Метод пробоподготовки образцов крови в виде высушенных на носителе пятен – технология сухих пятен крови (СПК) (от англ. dried blood spots, DBS) – получил свое распространение с 60-х гг. прошлого столетия, когда полученные на фильтровальной бумаге сухие пятна крови новорожденных были успешно использованы для обнаружения наследственного заболевания фенилкетонурии путем определения маркера фенилаланина [1]. Используя данный подход, доктор Роберт Гатри на ранней стадии обнаружил 39 случаев заболевания среди 400 тысяч новорожденных, что в конечном итоге послужило толчком к развитию неонатального скрининга и внедрению технологии СПК в медицину. На сегодняшний день пробоподготовка проб биологических жидкостей в виде сухих пятен является важнейшим средством для проведения неонатального скрининга и выявления редких генетических заболеваний новорожденных, также она получает широкое распространение в различных биоаналитических исследованиях, прежде всего, в

доклинических испытаниях лекарств, медицинских, токсикокинетических и фармакокинетических исследованиях, в клинической фармакологии; высушенные на носителе пробы также используются в судебной, допинговой, экологической экспертизах, создании биобанков [2–11]. В сухих пятнах биологических жидкостей определяют как низкомолекулярные вещества, так и белковые молекулы, например антитела, а также ДНК/РНК. Использование технологии СПК позволяет снизить инвазивность процесса отбора крови, т.е. травмируемость пациента, уменьшить смертность подопытных животных в доклинических исследованиях, поскольку для получения одного сухого образца в виде пятна требуется всего одна капля крови (30–50 мкл). Сухие образцы обладают высокой стабильностью и не требуют соблюдения норм холодильной цепи при перевозке к месту их анализа. Именно поэтому данный подход хорошо зарекомендовал себя при использовании в дистанционной диагностике заболеваний человека, мониторинге эпидемиологических ситуа-

ций, например, при выявлении вируса иммунодефицита человека (**ВИЧ**) в странах Африки, где жаркий климат и недостаточное лабораторное обеспечение затрудняют работу с жидкими образцами [12–14]. Такой подход позволяет упростить хранение и транспортировку биобразцов, так как сухие образцы могут храниться и/или пересылаться к месту лабораторного анализа при температуре окружающей среды, в том числе при повышенных температурах, в течение нескольких дней, сохраняя при этом стабильность сорбированных на мембранный носитель компонентов. При работе с сухими образцами снижается риск биологического заражения, помимо этого сухие образцы после проведения анализа проще утилизировать, чем жидкие. Сухие пятна крови могут быть легко получены пациентом самостоятельно, так как не требуют специальных навыков работы с комплектом для отбора, а высушенные образцы могут быть направлены в лабораторию, к примеру, по почте, исключая лишние расходы на транспортировку. Биоаналитические методы, основанные на технологии СПК, за счет своих преимуществ уже стали серьезной альтернативой традиционному анализу жидкой венозной крови или сыворотки. Использование биообразцов в виде сухих пятен на сегодняшний день с успехом распространяется не только на цельную кровь, но также и на другие биологические жидкости, такие как слюна, плазма, синовиальная жидкость, моча, молоко и др. [15]. Для таких сухих пятен применяют общее название – матричные пятна (от англ. matrix spots). Целевые аналиты определяют в сухих пятнах с помощью различных аналитических методов, таких как газовая (**ГХ**) или жидкостная хроматография (**ЖХ**) в сочетании с масс-спектрометрией (**МС**), иммунохимические методы, например иммуноферментный анализ (**ИФА**) и методы, основанные на принципе агглютинации, полимеразная цепная реакция (**ПЦР**) и др. [16–20].

Интерес к тематике СПК, бурно развивавшейся в последние 10–15 лет, не ослабевает до сих пор. Согласно данным Scopus, с 2014 года ежегодно публикуется более 400 научных статей по этой тематике, причем порядка 10% из них составляют обзорные статьи (рис. 1а). В России, по данным Scopus, число научных публикаций по тематике СПК значительно меньше по сравнению со многими другими странами (рис. 1б). Пока в отечественной науке данной тематике уделяется недостаточное внимание, а использование технологии СПК на практике ограничено.

ПРИНЦИП МЕТОДА ПРОБОПОДГОТОВКИ БИООБРАЗЦОВ В ВИДЕ СУХИХ ПЯТЕН НА ПОРИСТЫХ МЕМБРАНАХ

Пробоподготовка образцов в виде сухих пятен основана на капельном нанесении биологической жидкости, суспензии, либо получении отпечатка органа или ткани на специальной впитывающей мембране и последующем высушивании пробы. Пористый мембранный материал, состоящий из переплетенных волокон, впитывает наносимую пробу за счет капиллярных сил согласно его сорбционной емкости. В классическом варианте карточка для отбора пробы цельной крови представляет собой конверт, внутри которого находится целлюлозная мембрана в виде прямоугольника с обозначенными круглыми зонами для нанесения образца (рис. 2). Мембранный материал может содержать предварительно нанесенные реагенты для повышения сохранности белков либо нуклеиновых кислот, например лизирующие, хелатирующие вещества и детергенты [21, 22].

При отборе крови ее по каплям наносят в центр окружности, соблюдая правило: одна капля – одна окружность. У взрослых пациентов, как правило, кровь отбирают из пальца, у новорожденных – из пятки, у животных – из уха, хвоста. После нанесения биопробы карточку с образцом высушивают при комнатной температуре, после чего сухая проба готова к отправке в лабораторию. Помимо капельного нанесения возможно нанесение необходимого объема биологической жидкости полуавтоматической дозатором, а также получение отпечатка исследуемого органа (например, селезенки) или ткани путем их соприкосновения с впитывающим мембранным материалом. Таким образом, такие карточки для получения сухих пятен являются универсальным средством для хранения и транспортировки разнообразных биообразцов.

Для проведения анализа в лаборатории из сухого пятна вырезают участок мембраны в виде диска диаметром в несколько миллиметров, например, с помощью специального ручного приспособления – медицинского дырокола или панчера (от англ. puncher). Затем проводят элюирование сухого образца в раствор для выполнения соответствующего анализа. Развитие современных аналитических систем направлено на автоматизацию процессов пробоподготовки, экстракции и анализа проб. Существуют автоматизированные станции, которые способны работать одновременно с десятками подобных карточек с СПК, проводить их идентификацию, сортировку, отделение участков с образцом, последующую экстракцию и добавление внутреннего стандарта (**ВС**) [23]. Такие автосамплеры в сочетании с аналитическими установками на базе ЖХ-МС поз-

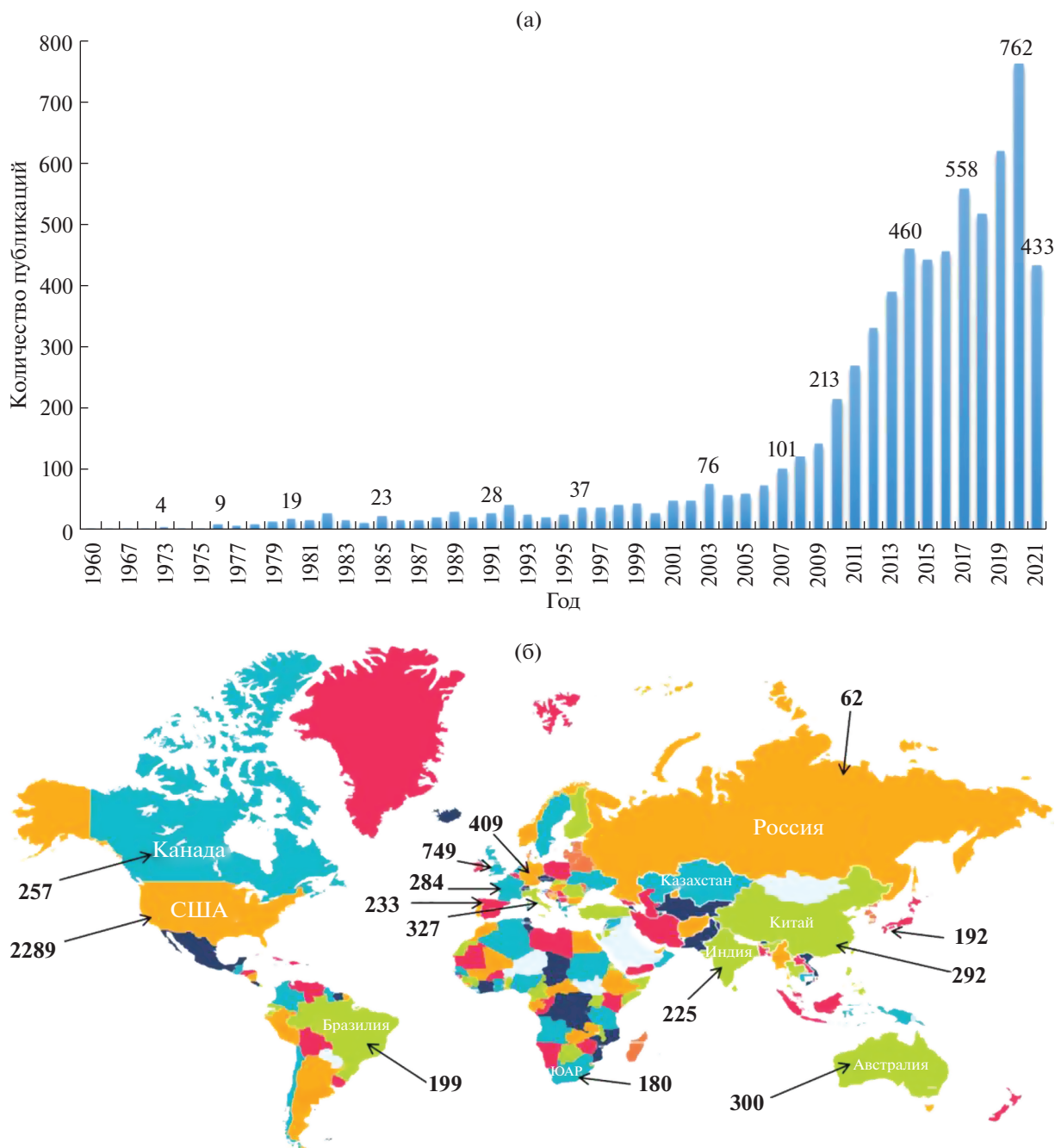


Рис. 1. Распределение публикаций по тематике СПК (DBS) по данным Scopus по годам (а); количество публикаций с 2000 по 2021 гг. в разных странах (б).

воляют быстро количественно определять диагностически значимые вещества в крови [24–26].

АНАЛИТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТЕХНОЛОГИИ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Понимание того, как целевой аналит распределяется между плазмой и эритроцитами, имеет большое значение для разработки лекарств и про-

ведения клинических исследований. Для технологии СПК важно знать, как будут соотноситься концентрации определяемого вещества в сухом пятне с реальной концентрацией в плазме/сыворотке крови, поскольку на носитель наносится цельная кровь, имеющая в своем составе и плазму, и форменные элементы крови, которые в процессе высушивания пробы на мембране лизируются. Исторически сложилось, что в аналитиче-

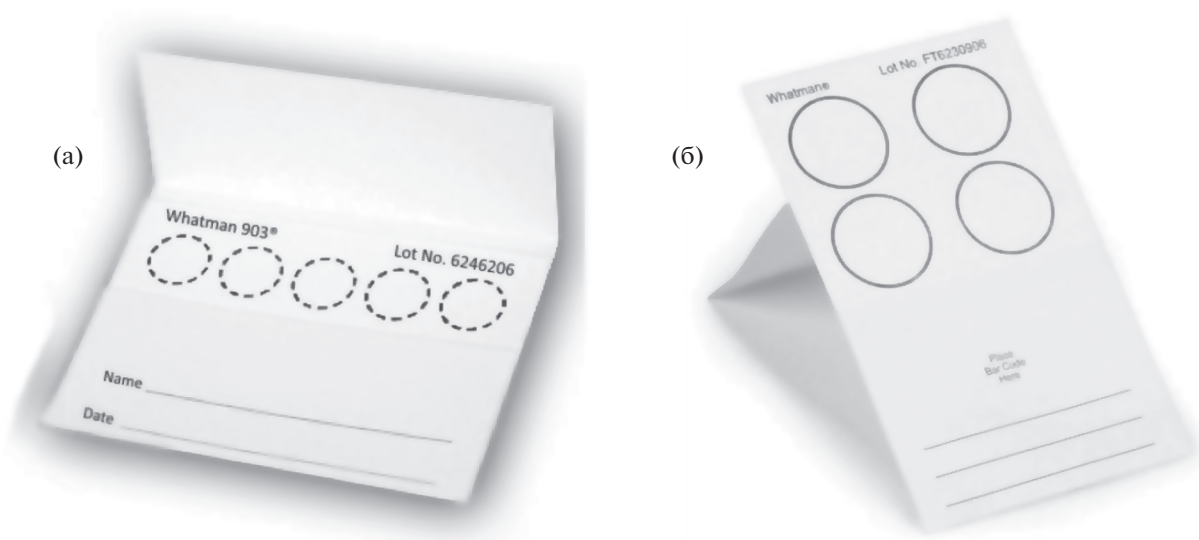


Рис. 2. Классический вариант карточки для отбора и получения сухих пятен крови Whatman 903 (а), FTA карта (Whatman, США) для получения сухих образцов для проведения ПЦР (б).

ских целях в медицине и ветеринарии используют плазму либо сыворотку крови, отделенную от клеток. Эритроциты играют важную роль в распределении аналита и могут влиять на полученные в фармакокинетике и фармакодинамике данные [27]. Если аналит в крови присутствует не только в плазме, но и в эритроцитах, то в сухом пятне его определяемая концентрация будет выше, чем в плазме. Такое распределение определяемого вещества зависит от его физико-химических свойств и должно подтверждаться в корреляционных параллельных измерениях сухих образцов крови и жидких образцов плазмы/сыворотки с введением поправочного коэффициента, если это необходимо.

Экстракция сухих пятен с носителя. Экстракция сорбированного на мембранный материал образца — один из важнейших подготовительных этапов перед проведением количественного анализа. Эффективность экстракции напрямую влияет на степень извлечения вещества и в конечном итоге на чувствительность методов к целевому аналиту. Более того, стадия экстрагирования критична при добавлении ВС, а также при экстрагировании СПК с использованием органических растворителей и смесей для анализа инструментальными методами [28, 29].

В целом способы экстракции биообразцов в виде сухих пятен подразделяют на две группы: офлайн и онлайн. При офлайн экстракции все необходимые этапы восстановления сухого образца посредством перевода сорбированных на носителе компонентов в растворитель проводят вручную. Это — отделение необходимого участка мембраны с сухим пятном, добавление экстраги-

рующего раствора с включенным ВС, центрифугирование и ввод полученного экстракта в хроматографическую систему. Иногда требуется также выпаривание, перерастворение в более подходящем для конкретной системы растворителе и т.д. Офлайн экстракция — эффективная процедура, однако является трудо- и времязатратной, ограничивая широкое применение технологии СПК в неинструментальных методах анализа, таких как иммунохимические методы и ПЦР. Причем в первом случае, как правило, используют экстракцию определяемых веществ в буферный раствор, а для выделения нуклеиновых кислот и последующего проведения ПЦР используют стандартные методы экстракции [22, 30, 31]. В отличие от офлайн, онлайн экстрагирование — процесс, позволяющий снизить затраты времени за счет автоматизации и одновременной подготовки к анализу сразу нескольких образцов. Онлайн экстрагирование стало возможным благодаря развитию соответствующего инструментария для автоматической пробоподготовки СПК. Компания “САМАГ” (Швейцария) выпускает автоматизированные системы пробоподготовки, оборудованные считывателем штрих-кодов, встроенной промывающей станцией, возможностью добавления ВС и подключения к системам ЖХ-МС [23]. Такая система способна обрабатывать набор из 500 карточек с СПК. Другая установка Prolab GmbH (Reinach, Швейцария) способна применять различные протоколы экстрагирования за счет возможности зажима карт и пропускания через пятно крови раствора под давлением до 200 атм. Автоматизированные станции по экстракции образцов СПК совмещают с твердофазной экстрак-

цией (ТФЭ). Компания “Spark Holland” (Emmen, Нидерланды) представила модифицированную установку, не требующую предварительного разделения экстрагированного образца с помощью ЖХ. Установка способна проводить предварительное экстрагирование на основе метода flow-through, т.е. путем пропускания элюента сквозь пятно и затем направлять поток в ТФЭ-МС/МС-систему. Подобная установка может с высокой точностью и воспроизводимостью обрабатывать порядка 20 образцов в час.

В идеале анализ на основе СПК должен осуществляться без предварительных стадий вырезания части мембраны с образцом и элюирования, например, на основе прямого МС-анализа поверхности (ПА-МС). Способ ПА-МС позволяет формировать заряженные ионы при комнатной температуре и нормальном давлении и затем направлять их в масс-спектрометр для количественного определения [32]. К методам ПА-МС относится десорбционная электрораспылительная ионизация (desorption electrospray ionization, **DESI**), где ионизация происходит за счет бомбардировки поверхности заряженными микрокаплями с образованием капель, содержащих целевой аналит, которые испаряются в нагретой капиллярной системе и детектируются в масс-анализаторе. Наиболее часто встречающиеся ионизирующие анализаторы – это PaperSpray, DESI (Prosolia Inc., USA) и прямой анализ в режиме реального времени, (direct analysis in real time, **DART**) [32]. DART анализ основан на прямом воздействии ионизирующих газов на сухой анализируемый образец, исключая стадию предварительной экстракции биологического материала с носителя. Подобный способ способен значительно сократить время проведения анализа, но пока отстает от традиционных МС-методов по чувствительности и воспроизводимости результатов.

Методы анализа сухих пятен биологических образцов. В большинстве случаев имеющегося объема материала достаточно для проведения качественного и количественного анализа, однако ввиду малого объема отбираемого образца следует учитывать, что используемый метод анализа СПК должен обладать достаточной чувствительностью [2, 4, 6, 9]. Для количественного определения целевого аналита в образцах сухих пятен используют ГХ и ЖХ, МС, атомно-абсорбционную спектроскопию и МС с индуктивно связанной плазмой. Для анализа СПК наиболее часто применяют ЖХ в сочетании с различными методами детектирования, так как большая часть аналитов – это органические вещества, лекарства, их метаболиты и эндогенные соединения. Сочетание ГХ с МС применяют для анализа образцов СПК в неонатальном и метаболическом скрининге [33, 34], при определении аминокислот, гормонов и других метаболитов. Для определения

широкого круга веществ используют также МС с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (**МАЛДИ-МС**). Предварительное разделение образцов с использованием ЖХ в данном случае обычно не требуется, что сокращает продолжительность анализа. Показано, что количественное и в некоторых случаях качественно определение может занимать уникально короткое время – порядка 5–10 с на один образец [35, 36].

Как отмечено выше, большинство методов, использующих СПК, предполагает определение низкомолекулярных веществ, например биомаркеров заболеваний, лекарств, запрещенных веществ и др. [2–11]. Для определения высокомолекулярных веществ сухие образцы используют значительно реже. Кехлер с соавт. [37] сравнили эффективность ЖХ с тандемным МС-детектированием (**ЖХ-МС/МС**) для определения белковой молекулы с иммуноанализом – золотым стандартом выявления высокомолекулярных белков. Авторы сделали вывод, что использование МС для количественного определения крупных белковых молекул возможно, но чувствительность метода при анализе СПК примерно в 20 раз ниже, чем в иммунохимическом анализе. Следует отметить, что иммунохимические методы для анализа сухих пятен применяют значительно реже. Это связано, прежде всего, с трудоемкостью анализа, большим числом операций предварительной подготовки сухих образцов в ручном режиме, так как применение инструментальных методов для количественного определения высокомолекулярных веществ ограничено. Помимо этого количественный анализ затруднен в связи со сложностью состава крови и особенностями распределения вещества между плазмой и клетками крови [27]. Однако ИФА и методы на основе агглютинации в качественном или полуколичественном варианте используют в серологических исследованиях, например, при мониторинге распространенности инфекционных заболеваний в популяциях сельскохозяйственных и диких животных и птиц [38, 39]. Для выявления искомым фрагментов нуклеиновых кислот в сухих образцах используют метод ПЦР, причем для экстракции и последующей амплификации пригоден образец любого происхождения, нанесенный и высушенный на носителе (биологическая жидкость, экстракт, суспензия, ткань, орган) [21, 22].

Стабильность определяемых компонентов в составе сухих образцов. Одним из преимуществ пробоподготовки образцов в виде сухих пятен в большинстве случаев является увеличение стабильности определяемых компонентов биологических жидкостей после высушивания на мембранном носителе. Так, например, наблюдаемые концентрации аминокислот, хранимых в СПК при комнатной температуре, лишь незначительно снижа-

лись в пределах от 3.1 до 7.3% ежегодно [40]. При хранении при -18°C таких подверженных разложению веществ, как ацилкарнитины, зафиксирована их стабильность в течение как минимум 330 дней. При хранении сухих образцов при комнатной температуре период полураспада ацилкарнитинов составлял от 161 до 990 дней [41].

Антитела достаточно стабильны при хранении в составе высушенной на носителе крови, сыворотки или плазмы. Так, образцы СПК, полученные от диких северных оленей в полевых условиях, при определении антител к возбудителям инфекционных заболеваний демонстрировали идентичные результаты в течение двух лет хранения при комнатной температуре [31]. ДНК- и РНК-содержащие вирусы также удается сохранять в высушенном виде достаточно продолжительное время. Многочисленные примеры использования специальных FTA карт (Whatman, США), импрегнированных лизирующими и хелатирующими агентами для лизиса клеток и увеличения сохранности нуклеиновых кислот вирусов-возбудителей при хранении, описаны в работе [30]. Так, например, в работе [42] на примере чумы мелких жвачных животных показано, что одноцепочечные вирусные РНК вируса-возбудителя могут быть выявлены в СПК спустя, как минимум, три месяца хранения при температурах, характерных для тропических стран. Более того, при анализе СПК провирусную ДНК вируса-возбудителя африканской чумы свиней удалось обнаружить даже спустя девять месяцев хранения при 37°C . В другом исследовании [43] определяли РНК вируса ящура в сухих образцах эпителия языка и конечностей зараженных коров, отправленных по почте без охлаждения по длинному маршруту от места отбора до лаборатории после периода дождей, а также в летний период в Индии. Показано, что независимо от температурных условий ($21-45^{\circ}\text{C}$) и влажности окружающей среды (20–100%) во всех образцах определили геном и серотип вируса ящура через 22–56 дней после отбора образцов.

Использование мембранных носителей для хранения образцов в высушенном виде позволяет улучшить стабильность многих биомолекул за счет дегидратации образца и, следовательно, минимизации ферментативных и гидролитических процессов. Например, вещество лопинавир в течение двух лет хранения в образцах СПК сохраняется значительно лучше, чем в замороженной плазме [36]. На примере бензодиазепинов, определение которых проводят в судебной медицине, показано увеличение стабильности аналитов при хранении на носителе [44]. В некоторых случаях отмечено, что на стабильность при хранении влияет наличие в составе мембранного носителя стабилизирующего агента, например ЭДТА [45]. Подводя итог, можно заключить, что технология СПК предлагает простой и эффективный способ

доставки и хранения биологических образцов, сокращая расходы на перемещение проб к месту анализа и хранение, позволяет снизить требования к соблюдению температурных норм. Стабильность конкретного вещества и возможность его анализа в сухом матричном пятне следует изучать в отдельных исследованиях, однако в большинстве случаев транспортировку и краткосрочное хранение сухих образцов с уверенностью можно проводить без охлаждения.

ПРОБЛЕМЫ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ В ВИДЕ СУХИХ ПЯТЕН

Эффект гематокрита исследуемого образца крови. На сегодняшний день серьезным ограничением применения технологии СПК в количественном анализе является вариативность уровня гематокрита от образца к образцу цельной крови. Гематокрит (Ht) – это отношение объема эритроцитов к объему образца крови. Значение Ht образца может значительно влиять на точность определения целевого вещества в биоаналитических методах на основе СПК. Нормальное значение Ht составляет порядка 0.41–0.51 для мужчин и 0.37–0.47 для женщин [46]. Однако в определенных группах населения его пределы варьируются, например, 0.28–0.67 у новорожденных (0–1 год) и 0.35–0.42 у детей (2–12 лет). Уровень Ht капиллярной крови, как правило, выше, чем венозной. Для разных видов животных и птиц величина Ht также варьируется. Величина Ht прямо пропорциональна вязкости крови, что влияет на текучесть и диффузионные свойства крови, нанесенной на мембрану (рис. 3). При высоких значениях Ht образца распределение капли крови по мембране затруднено; размер пятна на носителе при этом будет меньше по сравнению с каплей равного объема, но с меньшим значением Ht [47]. Очевидно, что чем больше объем цельной крови, приходящейся на единицу площади сухого пятна, тем большая масса соответствующего сухого образца будет отобрана для анализа при отделении части мембраны равного размера, а значит, концентрации выявленных аналитов будут варьироваться.

Эффект гематокрита зависит также от физико-химических свойств аналита и от свойств используемого мембранного материала. Относительно низкое значение Ht приводит к отклонению результатов определения концентраций аналита в отрицательную сторону (в сравнении со средним уровнем Ht, равным 0.45), тогда как положительное отклонение наблюдается при повышенном значении Ht. Различия в коэффициентах распределения определяемых веществ между клетками крови и плазмой приводят к тому, что эффект гематокрита может проявляться для разных ве-

ществ по-разному. Так, на примере нескольких иммунодепрессантов с использованием пяти различных карточек для отбора СПК изучена взаимосвязь значений Ht со степенью извлечения веществ с мембран [48]. Эффект гематокрита проявлялся на всех пяти карточках. В зависимости от типа карточек результаты анализа, в особенности при экстремальных значениях Ht и повышенных концентрациях, варьировались в значительной степени. При повышенных концентрациях иммунодепрессантов такролимуса, сиролимуса, эверолимуса, аскомицина и темсиролимуса эффект гематокрита проявлялся намного сильнее, чем при низких концентрациях. В целом эффект гематокрита увеличивает разброс результатов анализа, увеличивая суммарную погрешность, которая может превысить допустимое значение 15% [49, 50].

Эффект размера пятна. Нанесение разных объемов крови на мембрану может быть причиной различия результатов определения концентрации аналита при фиксированном размере отделенного участка мембраны с образцом и значении Ht образца. Исследованы диски диаметром 3 мм из центра и периметра пятна, а также с участка “гало” вокруг пятна [51]. “Гало-эффект” возникает при высыхании пятна крови и характеризуется более светлым оттенком края, нежели основной части пятна. В участке “гало” наблюдали значительное (более 15%) отклонение концентрации целевого аналита от значений, полученных из центральных участков. Данное отклонение вызвано неравномерным распределением аналита, а также эффектом гематокрита образца. При исследовании наличия врожденных заболеваний точность определения аминокислот, ацилкарнитин и гуанидиацетата сильно зависит от используемого в анализе участка пятна [51]. Для преодоления эффекта размера пятна используют ряд контрольных образцов нескольких концентраций и объемов нанесенной крови. После высушивания участок мембраны с образцом (например, диск диаметром 3 мм) анализируют вместе с набором градуировочных стандартов, для которых объем нанесенной крови может быть таким же, как один из указанных выше или иным. Разница результатов ЖХ-МС/МС-анализа не должна превышать 15% от номинального значения [20, 52, 53].

Хроматографический эффект. При нанесении крови на бумажный мембранный носитель может происходить неравномерное распределение определяемых веществ вследствие проявления хроматографического эффекта, в результате концентрации аналита в центре пятна крови и на его периферии будут различаться. В зависимости от типа используемых целлюлозных мембран можно наблюдать различия в получаемых результатах [54, 55]. Ранее показано, что целевые низкомолекулярные аналиты могут неравномерно распределяться по

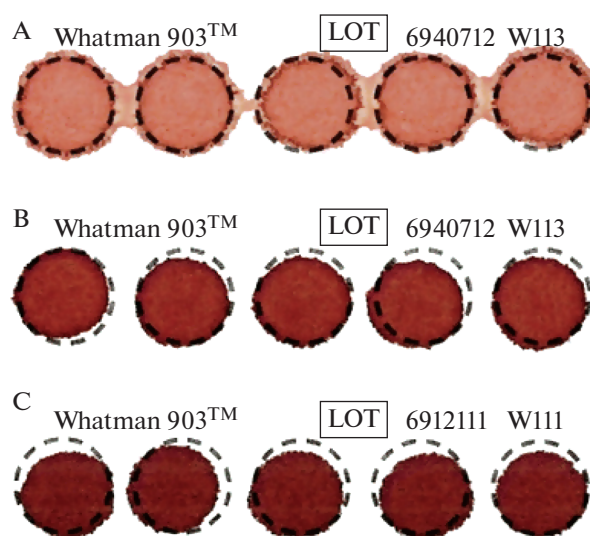


Рис. 3. Величина пятна крови на карточке Whatman 903 в зависимости от значения гематокрита наносимого образца цельной крови: А – $Ht = 0.18$, В – $Ht = 0.35$, С – $Ht = 0.50$ [46].

мембранному компоненту. Рен с соавт. [56] визуализировал распределение вещества на различных целлюлозных карточках для отбора крови (31 ETF, Grade 226, FTA Elute, 903 и FTA, Whatman, США) и продемонстрировал неравномерное распределение веществ, меченных изотопом C^{14} . Более того, степень неравномерности распределения целевого аналита на конкретной мембране зависела помимо состава мембраны и от количества нанесенной крови. Например, для карточки FTA elute лучший результат получен при нанесении меньших объемов крови (30 мкл вместо 100 мкл). Показано также, что распределение аналитов на химически модифицированных карточках, таких как FTA и FTA elute, сильнее зависит от внешних факторов: влажность воздуха и температура в значительной степени влияют на точность результатов анализа. Негомогенное распределение целевого аналита наблюдали также О’Мара с соавт. [57], которые исследовали распределение гликогенсинтаз с различным связыванием с белками плазмы. В зависимости от структурных особенностей исследуемых молекул хроматографический эффект значительно влиял на их распределение вдоль пятна крови.

Введение внутреннего стандарта в сухую пробу, эффект матрицы. При количественном анализе жидких образцов инструментальными методами добавление ВС осуществляется просто, быстро и надежно по сравнению с сухими образцами. Равномерно распределить ВС в сухом образце без предварительного элюирования – непростая задача, которую приходится решать при детектировании методом МС, основанном на непосред-

ственным пропускании элюирующего раствора через пятно крови и последующем распылении [29]. Помимо этого, на точность результатов МС-определения может влиять наличие матрицы. Использование при экстрагировании СПК растворов с высоким содержанием воды в сочетании с полярным органическим растворителем (метанол, ацетонитрил) может привести к совместной экстракции полярных компонентов матрицы, что впоследствии вызовет эффекты ионной супрессии или усиления при МС-анализе [2].

Пути преодоления эффекта гематокрита образца крови. Эффект гематокрита, пожалуй, самое главное препятствие на пути широкого применения СПК в биоанализе. Для преодоления эффекта гематокрита на сегодняшний день предложены различные подходы, направленные в основном на осуществление отбора фиксированного объема пробы. Например, нивелировать эффект можно за счет ограничения площади впитывающей поверхности при нанесении образца на участки мембраны в виде дисков определенного размера или перфорированные по краю [35, 58–60]. В работе [58] использовали предварительно вырезанные (pre-cut) целлюлозные диски, закрепленные на клейкой ленте. Для проведения анализа вырезанный диск используют целиком с известным объемом нанесенной крови. Этот подход уменьшает отклонения при анализе проб с низким и высоким гематокритом по сравнению со средним (0.45). Однако результаты все равно могут заметно варьироваться для некоторых аналитов в зависимости от значений гематокрита, что объясняется различным распределением определяемого вещества между плазмой и клетками крови. В работе [59] также использовали заранее вырезанные диски для определения ацетаминофена. Такой подход позволил увеличить точность результатов анализа. Кроме того, он упростил утилизацию образцов, так как для анализа пробу берут целиком без остатка. Другие предлагаемые в литературе варианты pre-cut устройств с дисками определенного диаметра представляют собой пластиковые картриджи или кейсы с помещенным внутрь индивидуальным целлюлозным диском [35]. Иной способ преодоления эффекта гематокрита подразумевает перерасчет найденных концентраций аналита, исходя из значений H_t конкретного образца. Однако для этих целей требуется определить значение H_t , что затруднительно для сухих образцов, хотя соответствующие методики существуют. К примеру, известен метод, позволяющий с достаточной точностью определить гематокрит по уровню калия в крови либо по оценке отражения ультрафиолетового излучения от поверхности пятна [61, 62], в том числе с помощью автоматической системы [63]. Другие разработки направлены на создание вспомогательных устройств, точно дозирующих образец на мем-

бранный носитель. Эффект гематокрита удастся исключить в случае использования полученного пятна крови в анализе целиком. Недавно представлено устройство на основе мембранного фильтра [64], позволяющее отделять плазму от клеточных элементов крови. Конструкция состоит из двух различных мембран, первая из которых представляет собой барьер для эритроцитов и задерживает их, а вторая служит носителем для отделенной от клеток плазмы. Таким образом, образцы плазмы могут быть получены без предварительного центрифугирования. Такая технология может стать альтернативой СПК и другим методам микросэмплинга (отбора микроколичеств крови), так как полностью исключает влияние гематокрита на точность анализа сухого образца. Более радикальным способом борьбы с имеющимися недостатками анализа СПК является разработка новых альтернативных форматов устройств для получения сухих пятен, в том числе содержащих мембранные носители различного состава. Некоторые устройства описаны в следующем разделе.

УСТРОЙСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУХИХ ОБРАЗЦОВ НА МЕМБРАННОМ НОСИТЕЛЕ

В настоящее время для отбора сухих биопроб в основном используют целлюлозные карточки, производство которых началось с момента успешного применения технологии СПК в неонатальном скрининге. С тех пор принципиальное устройство и состав данных карточек не претерпели серьезных изменений. Карточка состоит из внутренней впитывающей части, представляющей собой целлюлозный материал определенного химического и физического состава, а также из внешней части, выполняющей защитную и информационную функции (рис. 2). На внутренней части очерчены круги, которые обозначают места нанесения каплей биообразца или отпечатка ткани/органа. Большая часть карточек для медицинских целей производится фирмой “Whatman” (США) – крупной компанией по производству бумажных фильтров и сопутствующих материалов. Некоторые другие компании (“Ahlstrom-Munktell” (Швеция), “Fisher Scientific” (США) и др.) производят карточки под своим брендом, но используют схожий формат и целлюлозный материал (Whatman 903). Данный формат карточки удобен для нанесения капиллярной крови из пальца пациента, но при этом для корректного нанесения крови требуется соблюдать ряд условий, которые часто нарушаются. Так, например, каплю крови нужно наносить в центр круга, при этом нельзя наносить каплю в один круг дважды. Отклонения от центра приводит часто к необходимости повторного нанесения капли на ту же область, что вызывает локальное увеличение кон-

центрации вещества на носителе и как следствие завышение результатов анализа, а также снижение воспроизводимости. Кроме того, сам по себе используемый в качестве впитывающей мембраны целлюлозный материал обладает рядом свойств, которые затрудняют последующий анализ сухого образца. Выше описаны мешающие анализу эффект гематокрита и хроматографический эффект за счет физико-химических свойств полых целлюлозных волокон. Помимо этого, количество сорбируемого образца на единицу площади целлюлозной мембраны, как правило, неизвестно. Использование целлюлозного материала на данный момент является, скорее, данью традициям и устоявшимся рыночным отношениям. Современные научные разработки направлены не только на создание новых аналитических подходов для анализа СПК, но и на использование более технологичных мембранных материалов, роль которых заключается не только в адсорбции и сохранении биологического образца, но и в минимизации влияния различных факторов на последующий анализ сухих пятен [65]. Так, например, описано использование нецеллюлозных материалов для получения СПК [66, 67]. Отмечено, что нецеллюлозные материалы обладают лучшими параметрами распределения независимо от вязкости наносимой жидкости, однако пятно на таких носителях может быть неравномерным по форме, а при вырезании диска материал оказывается более хрупким по сравнению с бумажным [48].

Для преодоления проблем пробоподготовки и анализа, связанных с применением целлюлозного материала, предложено множество различных устройств, основная цель которых – получение микроколичеств сухих образцов определенного объема и облегчение последующего анализа [68]. Новое устройство для получения сухих образцов NemaSpot TE (SpotOnScience, США) [69] представляет собой футляр, содержащий внутри пористый целлюлозный носитель, выполненный в виде пропеллера (рис. 4). Каплю крови наносят на центральную часть мембраны, после чего она распространяется по лепесткам мембраны в радиальном направлении, футляр плотно закрывается, и мембрана высушивается за счет находящегося внутри осушителя. Лепестки мембраны впитывают ограниченный объем крови, при полном их заполнении снижается влияние гематокрита. Для проведения анализа достаточно отделить один из лепестков и провести десорбцию определяемого вещества из мембраны. Подобный подход к пробоподготовке в сравнении с классическим целлюлозным носителем для капельного нанесения (Munktel TFN) приводил к более высокой корреляции результатов в сравнении с быстрыми тестами при выявлении ВИЧ в Нигерии [53]. Данное исследование показало, что при не-



Рис. 4. Устройство для получения образца сухой крови NemaSpot HF (SpotOnScience, США).

достаточной оснащенности лабораторного и врачебного персонала требуются более оптимизированные методики и строгое соблюдение правил использования устройств при получении сухих образцов. Помимо этого, необходимы устройства, пригодные для отбора проб в полевых условиях, обеспечивающие получение точных результатов анализа, а также высокую корреляцию с методами – золотыми стандартами. К недостаткам системы NemaSpot следует отнести ее относительную сложность в изготовлении и последующем использовании, так как для нанесения образца крови требуются дополнительные инструменты, например дозаторы. Для достижения высокой воспроизводимости результатов анализа обязательно наносить точную аликвоту крови в центр мембраны, причем необходимо контролировать объем наносимой жидкости, чтобы он не превышал максимальную емкость мембраны. Более того, если не удается отобрать необходимый для нанесения объем (кровь может плохо вытекать из пальца), то невозможно полностью заполнить лепестки, и объем крови в лепестке оказывается неизвестным, а результат анализа – некорректным. Компания-производитель разработала также устройство с носителем в виде спирали Nemaspot SE: кровь наносится в центр и в процессе распространения пробы по носителю происходит отделение клеточных элементов. Таким образом, отделяя необходимый участок носителя, можно анализировать сухой образец крови или соответствующей плазмы.

Другое устройство для микросэмплинга Volumetric Absorptive Microsampling VAMS (Neoteryx,



Рис. 5. Устройство для микросэмплинга Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) (Neoteryx, США).

США) [70, 71] представляет собой пластиковый стержень, на конце которого располагается небольшой адсорбционный элемент из полимерного материала в виде спичечной головки (рис. 5). Авторы утверждают, что емкость элемента фиксированная и в зависимости от назначения устройства может составлять от 10 до 30 мкл, что подтверждено введением в пробу радиоактивных изотопов и измерением радиоактивности адсорбента с образцом [70]. Для нанесения крови конец впитывающей головки опускают в образец до полного насыщения. Влияние гематокрита на анализ в диапазоне значений Ht 0.20–0.70 незначительно, и отклонение от условно нормального значения (0.45) составляло 5%, что значительно меньше, чем для классической целлюлозной мембраны, где результаты измерений варьировались в пределах 30%.

Устройство Asante Dried Blood Specimen Collection Strips (Sedia Biosciences Corporation, США) (рис. 6) представляет собой впитывающую полоску на пластиковой основе по типу латеральной. Кровь впитывается в сорбционный материал длиной около 2 см, который имеет определенную емкость, что позволяет отбирать фиксированный объем крови. Перед анализом проводят полную экстракцию сорбированной крови в раствор. Это позволяет снизить влияние погрешностей при отборе крови, связанных с переизбытком или недостаточным количеством нанесенной пациентом крови. Однако дозирование сухого образца в данном случае не предусмотрено, нанесенный и высушенный образец полностью смывается в раствор. На подобном принципе построена карточка фирмы “RayBiotech Life” (США), содержащая несколько полосок для отбора около 30 мкл цельной крови на каждую.

С целью отбора фиксированного объема крови представлено вспомогательное устройство Не-

maXis (DBS System SA, Швейцария) [72], интегрированное со стандартной карточкой фирмы “Whatman”, которое с помощью капиллярной системы позволяет наносить кровь на мембрану в центр окружности в фиксированном объеме (рис. 7). Это позволяет избежать погрешностей при нанесении крови пациентом при условии последующего экстрагирования в автоматических проточных системах, в которых используется вся площадь мембраны с нанесенным сухим образцом.

В работе [73] авторы использовали капилляр для точного дозирования 3 мкл крови вместе с заранее вырезанными дисками целлюлозного материала (рис. 8). Данная система состоит из фиксированных в пластиковом картридже частей мембраны, на которые наносят точный объем крови (3 мкл) из капилляра. Подобная система позволяет повысить точность нанесения образца по сравнению полуавтоматическим дозатором. Однако все это, несомненно, усложняет устройство и способ нанесения пробы. По практической пригодности подобные устройства вряд ли сравнятся с классическими карточками для отбора, которые просты в изготовлении, хранении и при транспортировке.

Помимо новых устройств также описаны форматы карточек и мембранных материалов, которые могли бы служить альтернативой традиционному прямоугольному формату карточек. Например, в работе [74] для получения СПК использованы полоски из целлюлозного материала с уширенным концом (рис. 9). Такой формат, по мнению авторов, удобен для отбора определенного объема крови (около 20 мкл) и последующего анализа крови методом ПЦР для диагностики малярии. Безусловно, такой формат пригоден для качественного анализа, но не подходит для количественных измерений, так как дозирование образца является неточным.

Отбор крови на полоски целлюлозного материала впервые предложен Кензо Нобуто для диагностики токсоплазмоза в 1966 г. [75]. Полоски состояли из двух частей: впитывающей и области распределения (рис. 10). В дальнейшем полоски Нобуто неоднократно использовались для ветеринарной диагностики различных инфекционных заболеваний как домашних, так и диких животных [31, 76–79].

Наша научная лаборатория активно работает по тематике пробоподготовки биообразцов в виде сухих пятен в течение последних 10 лет. Авторы обзора предложили новый формат пробоподготовки сухих образцов с использованием разделенных на зоны одинакового размера узких полосок (стрипов) высокопористого материала (рис. 11) [80, 81]. Такой стрип мембранного материала несет в себе две функции: во-первых, функцию носителя биоматериала для хранения и



Рис. 6. Устройство для отбора крови Asante Dried Blood Specimen Collection Strips (Sedia Biosciences Corporation, США).



Рис. 7. Система отбора крови HemaXis (DBS System SA, Швейцария).

транспортировки сухого образца в лабораторию и, во-вторых, функцию микросэмплера, т.е. устройства, способного впитывать фиксированное микроколичество жидкости, представляя собой капиллярный дозатор. Количество сорбиру-

ванной жидкости определяется сорбционными свойствами используемого материала. Данный формат позволяет дозировать сухой образец, используя необходимое количество идентичных участков мембраны, что обеспечивает возмож-

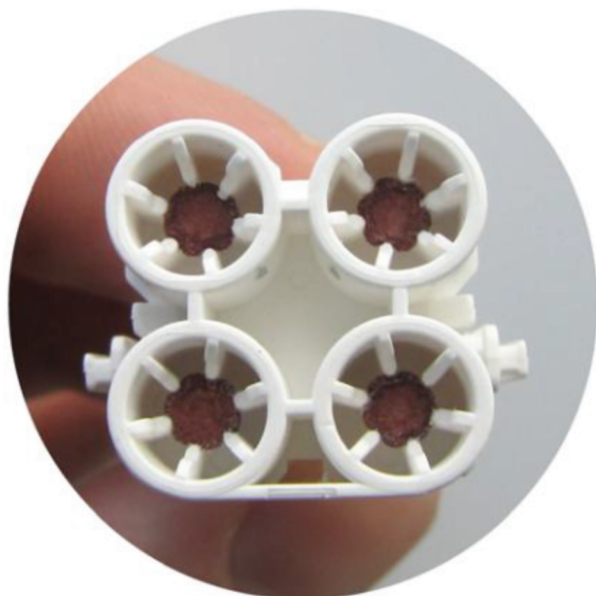


Рис. 8. Устройство для капиллярного нанесения крови на pre-cut диски [73].

ность проведения повторных исследований или нескольких видов анализа одной сухой пробы. Помимо этого, нанесение образца при использовании стрипа облегчается: образец можно наносить из напльва крови в месте пункции или из пробирки, опустив край стрипа в жидкость. В первом случае это значительно облегчает отбор

образца крови у животных и птицы. Жидкость, попадая на материал, легко впитывается и распространяется вдоль полоски пористого мембранного материала за счет капиллярных сил. На многочисленных примерах показано, что распределение как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных веществ вдоль стрипа происходит равномерно, что позволяет использовать для анализа любой участок мембраны без ущерба для точности анализа [80–83]. Показано также, что это условие соблюдается для мембранных материалов из цельных стекловолоконных и полимерных волокон, тогда как для целлюлозного материала имеет место хроматографический эффект [80]. Изучение физико-химических свойств мембранных материалов разной природы с точки зрения их применимости для данного формата и последующего использования для пробоподготовки и анализа сухих образцов биологических жидкостей позволило выделить стекловолоконный материал как наиболее эффективный для использования в биоаналитике. Так, например, на стекловолоконном материале образцы крови с различным значением гематокрита распределяются более равномерно, чем на целлюлозном (рис. 12). При этом равномерность распространения зависит от сорбционных свойств мембраны. Успешное использование предложенного формата пробоподготовки в сочетании с количественным, полуколичественным и качественным иммунохимическим анализом и ПЦР продемонстрировано на примере выявления гормонов, метаболитов, белков, антител, ДНК в образцах

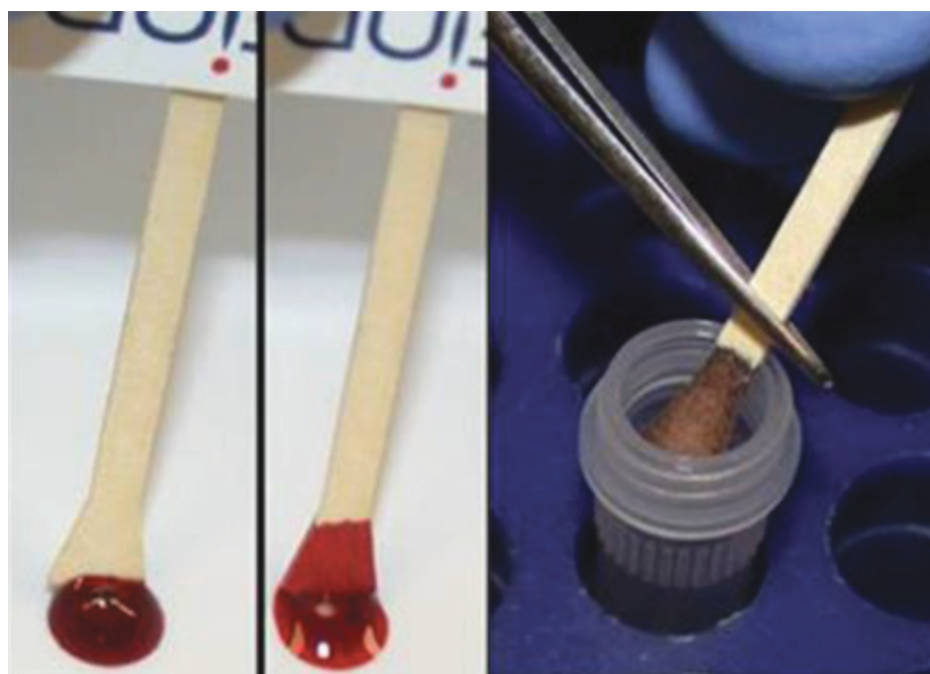


Рис. 9. Карточки с целлюлозным мембранным носителем в виде полосок с уширением [74].

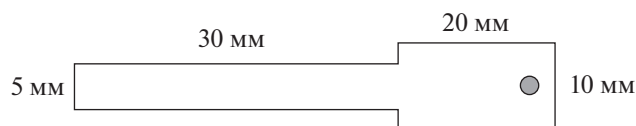


Рис. 10. Схематическое изображение целлюлозной полоски Нобуто [75].

цельной крови, сыворотки, плазмы и цельного молока для целей биомедицинской и ветеринарной диагностики [80–93].

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИООБРАЗЦОВ В ВИДЕ СУХИХ ПЯТЕН НА ПОРИСТЫХ НОСИТЕЛЯХ

На сегодняшний день пробоподготовка биопроб в виде сухих пятен применяется преимущественно для определения низкомолекулярных веществ, например биологически активных фармацевтических соединений и запрещенных наркотических веществ [7, 8, 11, 18], а также для сбора биоматериала для проведения ПЦР и генетических исследований [22, 30, 42, 43, 94]. Метод СПК хорошо подходит для терапевтического лекарственного мониторинга, требующего многократных измерений во время терапии веществами с коротким интервалом воздействия [44]. Особое место технология СПК занимает в дистанционной диагностике заболеваний человека и в неонатальном скрининге [43].

Мониторинг заболеваний человека. По мнению авторов работы [95], можно выделить как мини-

мум 45 аналитов, выявление которых в СПК представляет наибольшую ценность для популяционных исследований. Среди них биомаркеры, характеризующие состояние эндокринной, сердечно-сосудистой, репродуктивной, иммунной систем организма, которые на современном уровне развития диагностических технологий могут быть выявлены в малом объеме исследуемого образца. В настоящее время технология СПК интегрирована в несколько национальных американских и международных программ популяционных исследований детей старшего возраста, взрослых и пожилых людей. Так, технология СПК нашла широкое применение в дистанционном исследовании гепатита [96] и ВИЧ в африканских странах [12, 13, 15]. Усилия, направленные на повышение доступности тестирования на ВИЧ в сельских районах развивающихся стран, где живут более 90% всех ВИЧ-инфицированных людей, имеют решающее значение для борьбы с этой болезнью. Технология СПК обеспечивает простой, надежный и доступный способ сбора образцов крови и других биологических жидкостей для скрининга болезни, контроля качества санитарной помощи, измерения вирусной нагрузки ВИЧ и тестирования лекарственной устойчивости в условиях, когда отбор венозной крови и ее транспортировка неосуществимы или затруднены [14]. Большинство количественных анализов на вирусную нагрузку ВИЧ проводят методом ПЦР, который требует большого количества плазмы (100–600 мкл) и транскрипции РНК в ДНК до амплификации. Кроме внеклеточной РНК ВИЧ-1, которая содержится в образцах

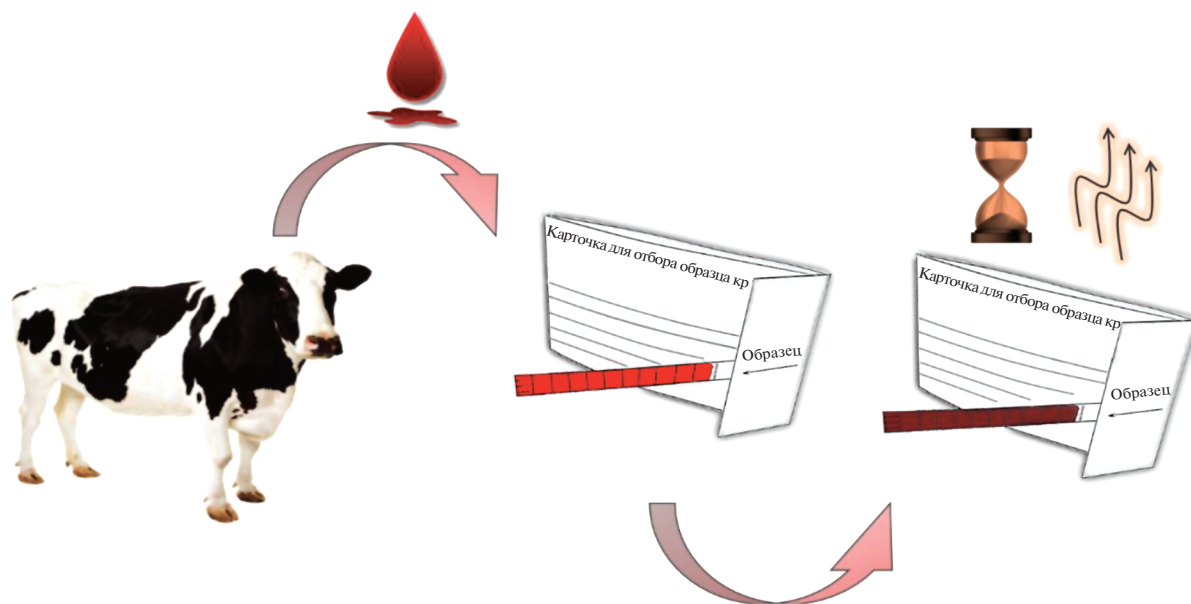


Рис. 11. Новый формат пробоподготовки сухих проб на узком маркированном стрипе мембранного материала.

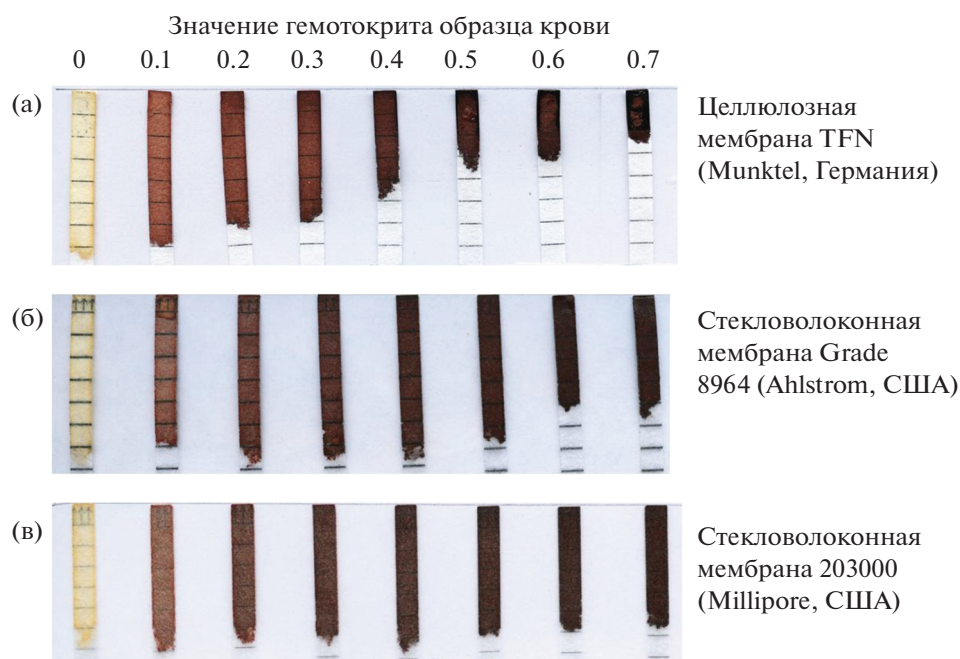


Рис. 12. Распространение 80 мкл крови вдоль узкой полоски (стрипа) мембранного материала в зависимости от значений гематокрита образца крови.

плазмы, сухие образцы содержат цельную кровь, а следовательно, внутриклеточную РНК ВИЧ-1 и провирусную ДНК ВИЧ-1. В результате анализ на вирусную нагрузку с использованием технологии СПК потенциально более чувствителен, чем определение ВИЧ-1 в плазме или сыворотке. Это имеет большое значение для раннего выявления ВИЧ [21].

Доклинические и клинические исследования лекарств. В основе работ в области доклинических испытаний лежит отбор крови подопытных животных в течение определенного периода времени после введения препарата для установления точных значений концентраций соответствующих препаратов в крови. Доклинические испытания включают в себя исследование фармакологических и токсикологических свойств препаратов. В настоящее время очень многие исследования и публикации посвящены именно этому направлению использования технологии СПК в области фармакокинетики [4, 27, 49, 50, 97, 98]. Стандартная методика выполнения анализов и проведения фармакокинетических исследований предусматривает серийный забор достаточно большого объема крови (обычно около 1 мл) животных (крыс, мышей), при этом животное в процессе отбора крови погибает. Переход на технологию СПК позволяет значительно сократить объем отбираемого биологического материала и сэкономить значительные средства. Кроме того, с помощью СПК можно использовать одно и то же жи-

вотное в одной и той же серии измерений многократно [98].

Терапевтический мониторинг лекарств. Низкая травмируемость при использовании технологии СПК делает ее незаменимой в терапевтическом мониторинге лекарственных препаратов, когда с целью назначения необходимого курса приема препарата необходимо отслеживать его концентрацию в организме в динамике. Это особенно актуально для препаратов с малым терапевтическим временем воздействия на организм или для нестабильных препаратов. Например, в работе [99] СПК анализировали на наличие иммуносупрессоров методом ЖХ-МС/МС. Технологию СПК, особенно в сочетании с ЖХ-МС/МС, активно используют в клинических исследованиях жаропонижающих, противокашлевых, противовирусных, противосудорожных, иммуносупрессорных, противоэпилептических и других лекарственных средств. Однако в случае применения СПК в терапевтическом мониторинге необходимо учитывать некоторые факторы, которые могут значительно влиять на результаты анализа сухих и жидких образцов (например, гематокрит) [95].

Неонатальный скрининг. Использование технологии СПК в неонатальном скрининге получило широкое распространение во всем мире [4]. Ввиду малого объема отбираемой крови травмируемость новорожденных снижается, облегчается отбор крови и становится возможным ранняя диагностика патологий. У грудных детей в основном выявляют этиологию и патогенез врожден-

ных заболеваний. Такие заболевания встречаются очень редко и составляют единицы на тысячу и десятки тысяч новорожденных, однако их своевременная диагностика и последующее наблюдение гарантирует избавление ребенка от негативных проявлений заболевания. Так, например, при обнаружении фенилкетонурии (нарушения метаболизма фенилаланина) ребенку назначают специальную диету, исключающую потребление высокобелковой пищи. Ограничение потребления организмом фенилаланина позволяет избежать необратимых патологических изменений, приводящих к умственной отсталости [100].

Технология сухих пятен крови в ветеринарии и биологии. Несмотря на то, что технология СПК относительно широко применяется в медицинских исследованиях, ее значимость для ветеринарии и биологии на сегодняшний день явно недооценена. По сути использование технологии СПК для отбора, хранения и анализа сухих образцов в диагностике болезней сельскохозяйственных животных, птицы, домашних и диких животных находится лишь в самой начальной стадии развития, хотя успешные попытки исследовать серологическими методами полученные на мембранных материалах сухие образцы крови сельскохозяйственных животных описаны еще в 50–60-х годах прошлого века [74, 101]. После этого в течение нескольких лет наблюдался всплеск научных работ не только по медицинской, но и ветеринарной тематике. В течение последующих 30 лет технология не вызвала серьезного интереса в ветеринарии и биологии и только в конце 90-х–начале 2000-х гг. число публикаций начало расти вслед за широким распространением технологии СПК в мире. Однако даже на сегодняшний день общее число публикаций, посвященных применению СПК в ветеринарной диагностике и биологических исследованиях, невелико и составляет порядка двухсот пятидесяти работ.

Ветеринарную диагностику на основе технологии СПК проводят с использованием широкого спектра методов, в основном это серодиагностика для выявления специфических антител в крови животного и ПЦР для обнаружения генома возбудителя. Для определения антибиотиков, пестицидов, металлов применяют инструментальные методы анализа, такие как ЖХ, МС и др. [102–107]. Большой практический интерес вызывает использование высушенных на носителе образцов для мониторинга заболеваний в регионах с тропическим климатом, труднодоступных и удаленных местах, странах с обширной территорией, где могут наблюдаться сложности при транспортировке и хранении проб. Технология СПК неоднократно применялась для мониторинга важных инфекционных заболеваний сельскохозяйственных и домашних животных, например трипаносомных заболеваний скота в странах Африки

[108], а также для исследования векторных организмов, участвующих в переносе инфекции [109]. Интересным направлением таких исследований является анализ слюны комаров, а также частей самих векторных насекомых, например мухи цеце, клопов и других насекомых, на предмет выявления генома возбудителя [110, 111]. В работе [112] идентификация инфицированных и неинфицированных животных серологическим методом проходила эффективнее на основе результатов, полученных с помощью СПК, чем при анализе жидких проб. Отмечено, что для получения сыворотки для стандартного анализа жидкой пробы в полевых условиях требуется гораздо больше усилий, так как необходим отбор значительного количества материала из хвостовой или яремной вены крупного рогатого скота.

Технологии СПК находят применение при мониторинге заболеваний разнообразных диких животных и птиц [21, 30, 31, 76–78, 113–115]. Большинство инфекционных заболеваний диких животных слабо подвержено контролю. Ввиду невозможности массового отбора проб в один день, пробы аккумулируются в течение длительного времени. Технология СПК позволяет хранить высушенные пробы в течение всего срока экспедиции, не прибегая к их охлаждению. Данный подход использовали при мониторинге бруцеллеза северных оленей в Канаде [77]. Данное заболевание сложно контролируется ввиду сурового климата и огромного ареала обитания диких животных. Домашний скот также подвержен этому заболеванию и основная причина инфицирования – передача инфекции от диких животных. Кроме того, не исключена опасность заражения человека при недостаточной тепловой обработке пищи. Образцы отбирали у убитых в ходе отстрела оленей в экстремальных условиях при температурах до -40°C на полоски Нобуто и через два месяца анализировали методом ИФА. Сбор сухих проб на мембранные носители используют при генетических и морфологических исследованиях, например, для определения генома и серотипа возбудителей инфекционных заболеваний, создания биобанков [22, 43]. С использованием технологии СПК изучают антропогенное влияние на представителей дикой фауны. Для этого в крови перелетных птиц определяют токсиканты, наличие тяжелых металлов, пестицидов и антибиотиков [102–106].

Перспективно использование технологии СПК для мониторинга инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и уровня поствакцинального иммунитета [85, 91]. Сельскохозяйственные животные и птицы ввиду массовости содержания подвержены большому числу инфекционных заболеваний, обычно имеющих вирусную природу, а в условиях промышленного содержания инфекция способна быстро распространяться и

поражать большое число голов. В зависимости от распространенности в конкретном регионе для профилактики инфекционных заболеваний существуют специальные программы вакцинации поголовья. В большинстве публикаций, освещающих применение технологии СПК, отмечается, что для успешной борьбы с опасными инфекциями диких и сельскохозяйственных животных требуется развитие эффективного и недорогого метода хранения и транспортировки образцов крови, каким и является метод получения сухих пятен биологических жидкостей на мембранных носителях [22, 43, 76, 79, 94]. Однако в ветеринарной практике в России технология непопулярна и малоизвестна, отсутствуют утвержденные методические указания для использования сухих образцов в мониторинговых программах. Для животных возможности нанесения крови и получения сухих пятен при использовании классических карточек ограничены. Показательно, что в некоторых работах исследователи для удобства нанесения пробы самостоятельно нарезают целлюлозный материал на полосы для возможности пропитки мембраны напрямую из пункции и удобства дозирования на последующих этапах [38, 116, 117].

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ТЕХНОЛОГИИ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Метод отбора микроколичеств крови на мембранный носитель будет находить все более широкое применение при разработке новых лекарственных препаратов, где необходимо постоянно отбирать образцы биологических жидкостей у лабораторных животных. Очевидно, что технология СПК также будет распространяться на методики сбора и анализа не только образцов цельной крови, но и других биологических жидкостей человека и животных [2, 15, 83, 84]. На данном этапе развития множество операций при пробоподготовке образца проводят вручную. И хотя это не представляет проблему для маленьких выборок, при масштабном исследовании необходимо применение автоматизированных технологий. На сегодня уже созданы приборы, позволяющие полностью автоматизировать процесс обработки карточек с образцами в виде сухих пятен для последующего автоматизированного анализа [23, 63]. Параллельно с уменьшением количества отбираемого материала, миниатюризацией устройств, способных отбирать микроколичества жидкостей, идет процесс миниатюризации анализаторов, включающих в себя одновременно узлы пробоподготовки образцов СПК и масс-спектрометр. Делаются попытки сопряжения автоматизированных устройств, используемых для СПК, с инструментами, применяемыми в других методиках, для расширения спектра анализируемых объектов и увеличения точ-

ности анализа. Опубликовано довольно много работ по разработке методов СПК с применением ЖХ-МС/МС, что значительно расширяет возможности технологии за счет сочетания нескольких методик, которые взаимно компенсируют недостатки друг друга [2]. При точном соблюдении методики отбора образцов, автоматизации операций отделения участка мембраны с образцом и экстракции (элюирования) аналитов, усовершенствовании химического состава пористых сорбирующих мембран для повышения устойчивости нестабильных соединений технология СПК будет играть важную роль в количественном анализе лекарственных препаратов и определении метаболитов в крови, а также в диагностике заболеваний в медицине и ветеринарии [15]. Расширяется спектр определяемых соединений с использованием СПК; разрабатываются методы определения микроэлементов [117], насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот [118]. Новое направление использования технологии СПК анонсировано в июле 2021 года. На 138-й сессии МОК Всемирное антидопинговое агентство (WADA) объявило об утверждении метода тестирования пятен сухой крови спортсменов на запрещенные вещества (допинг) на международных соревнованиях, в том числе на Олимпийских играх, начиная с Олимпиады-2021 в Токио.

* * *

Поводя итог, хочется отметить, что, несмотря на широкое распространение, целлюлозные пористые носители имеют общепризнанные недостатки – неравномерность нанесения и распределения пятна крови, зависимость площади зоны распространения пятна крови от вязкостных свойств индивидуального образца, а также неполное смывание образца с носителя вследствие частично необратимой сорбции компонентов крови на волокнах целлюлозы. Эти недостатки ограничивают возможности технологии СПК при использовании в количественном анализе для целей диагностики. Особенно это касается иммунохимических методов, хотя для неонатального скрининга технология хорошо отработана и стандартизована. Сегодня для получения сухих пятен биообразцов предлагаются новые нецеллюлозные пористые мембранные материалы, обладающие неоспоримыми эксплуатационными и аналитическими преимуществами и позволяющими нивелировать либо полностью избежать нежелательных эффектов, присущих целлюлозе. Помимо этого, ведется поиск более удобных в использовании форматов устройств для отбора биопроб, которые позволят осуществлять эффективный отбор образцов не только у человека, но и у животных, в том числе вне лаборатории. Стоит отметить, что большинство новых устройств для от-

бора и пробоподготовки образцов в виде сухих пятен не предназначены для массового скрининга, а рассчитаны на индивидуальное применение. Стоимость усовершенствованного индивидуального устройства для отбора крови, сложность его изготовления и использования предполагает, скорее, применение в медицине. В ветеринарной диагностике применение биообразцов в виде сухих пятен для мониторинга инфекционных заболеваний мало распространено, что связано в том числе с высокой стоимостью предлагаемых на рынке устройств для отбора проб, рассчитанных на медицинское применение, с отсутствием альтернативных систем и форматов пробоподготовки, удобных для ветеринарного применения, в частности для отбора крови у животных и птицы в полевых условиях. Кроме этого, слабо развиты методические подходы к работе с сухими образцами. Путем развития удобных устройств для отбора проб технология СПК может стать альтернативой использованию жидких проб для массового мониторинга сельскохозяйственных животных и птицы, а также других ветеринарных и биологических исследований представителей дикой флоры и фауны. Применение в диагностике медицинских устройств на основе целлюлозных мембран, преимущественно в виде карточек, ориентировано на количественный анализ физико-химическими методами с целью оценки уровня низкомолекулярных веществ в крови человека. Продолжительность анализа и перечень определяемых веществ сильно зависят от возможности автоматизации стадий работы с сухими образцами. Наличие станций для автоматической пробоподготовки – серьезный барьер для широкого внедрения технологии в практику в развивающихся странах. Для рутинного иммунохимического анализа в лабораториях, ориентированных на исследование жидких образцов, использование сухих образцов создает дополнительные методические сложности, так как большинство операций с СПК проводится вручную. Несмотря на растущую популярность, технология СПК еще не до конца устоялась и не утвердилась по некоторым аналитическим аспектам. В целом технология СПК развивается в направлении усовершенствования и увеличения доли автоматизированных процессов, что в конечном итоге приведет к снижению средней продолжительности анализа и к возможности проведения масштабных исследований и мониторинга заболеваний. С развитием современных технологий повышается точность и чувствительность результатов, полученных с использованием сухих пятен биологических жидкостей. Использование технологии СПК, очевидно, будет постепенно заменять традиционный анализ жидкой плазмы. Неоспоримыми преимуществами технологии СПК являются простота отбора крови самим пациентом, возможность отправки сухого

образца по почте и получения результата анализа дистанционно, возможность доставки сухого образца в лабораторию из удаленных районов, например из стран Африки. Подобный способ доставки способен упростить работу и способствовать выявлению и искоренению заболеваний, таких как ВИЧ и гепатит В, в странах третьего мира.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guthrie R., Ada S. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants // *Pediatrics*. 1963. V. 32. № 3. P. 338.
2. Meesters R.J., Hooff G.P. State-of-the-art dried blood spot analysis: An overview of recent advances and future trends // *Bioanalysis*. 2013. V. 5. № 17. P. 2187. <https://doi.org/10.4155/bio.13.175>
3. Demirev P.A. Dried blood spots: Analysis and applications // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 2. P. 779. <https://doi.org/10.1021/ac303205m>
4. Sharma A., Jaiswal S., Shukla M., Lal J. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis // *Drug Test. Anal.* 2014. V. 6. № 5. P. 399. <https://doi.org/10.1002/dta.1646>
5. Diener C., Galata V., Keller A., Meese E. MicroRNA profiling from dried blood samples // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2019. V. 56. № 2. P. 111. <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1561641>
6. Antunes M.V., Charão M.F., Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring // *Clin. Biochem.* 2016. V. 49. № 13–14. P. 1035. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004>
7. Lim M.D. Dried blood spots for global health diagnostics and surveillance: Opportunities and challenges // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018. V. 99. № 2. P. 256. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0889>
8. Stove C.P., Ingels A.S., De Kesel P.M., Lambert W.E. Dried blood spots in toxicology: From the cradle to the grave? // *Crit. Rev. Toxicol.* 2012. V. 42. № 3. P. 230. <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.650790>
9. Enderle Y., Foerster K., Burhenne J. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. V. 130. P. 231. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.026>
10. Malsagova K., Kopylov A., Stepanov A., Butkova T., Izotov A., Kaysheva A. Dried blood spot in laboratory: Directions and prospects // *Diagnostics*. 2020. V. 10. № 3. P. 248. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248>
11. McClendon-Weary B., Putnick D.L., Robinson S., Yeung E. Little to give, much to gain – What can you do with a dried blood spot? // *Curr. Environ. Health Rep.* 2020. V. 7. P. 211. <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00289-y>
12. Smit P.W., Sollis K.A., Fiscus S., Ford N., Vitoria M., Essajee S., Barnett D., Cheng B., Crowe S.M., Denny T., Landay A., Stevens W., Habiambere V., Perriens J.H., Peeling R.W. Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early

- infant diagnosis // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 3. Article e86461.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086461>
13. Parry C.M., Parkin N., Diallo K., Mwebaza S., Batamwita R., DeVos J., Bbosa N., Lyagoba F., Magambo B., Jordan M.R., Downing R., Zhang G., Kaleebu P., Yang C., Bertagnolio S. Field study of dried blood spot specimens for HIV-1 drug resistance genotyping // *J. Clin. Microbiol.* 2014. V. 52. № 8. P. 2868.
<https://doi.org/10.1128/jcm.00544-14>
 14. Solomon S.S., Solomon S., Rodriguez I.I., McGarvey S.T., Ganesh A.K., Thyagarajan S.P., Mahajan A.P., Mayer K.H. Dried blood spots (DBS): A valuable tool for HIV surveillance in developing/tropical countries // *Int. J. STD AIDS*. 2002. V. 13. № 1. P. 25.
<https://doi.org/10.1258/0956462021924578>
 15. Li W., Lee M.S. Dried Blood Spots: Applications and Techniques. USA: Wiley, 2014. P. 363.
 16. Lehmann S., Picas A., Tiers L., Vialaret J., Hirtz C. Clinical perspectives of dried blood spot protein quantification using mass spectrometry methods // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2017. V. 54. № 3. P. 173.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1297358>
 17. Freeman J.D., Rosman L.M., Ratcliff J.D., Strickland P.T., Graham D.R., Silbergeld E.K. State of the science in dried blood spots // *Clin. Chem.* 2018. V. 64. № 4. P. 656.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.275966>
 18. Li W., Tse F.L.S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules // *Biomed. Chromatogr.* 2010. V. 24. № 1. P. 49.
<https://doi.org/10.1002/bmc.1367>
 19. Wagner M., Tonoli D., Varesio E., Hopfgartner G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots // *Mass Spectrom. Rev.* 2016. V. 35. № 3. P. 361.
<https://doi.org/10.1002/mas.21441>
 20. Jager N.G., Rosing H., Schellens J.H., Beijnen J.H. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: A review // *Bioanalysis*. 2014. V. 6. № 18. P. 2481.
<https://doi.org/10.4155/bio.14.185>
 21. Smit P.W., Elliott I., Peeling R.W., Mabey D., Newton P.N. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014. V. 90. № 2. P. 195.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0463>
 22. Smith, L.M., Burgoyne, L.A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA data basing paper // *BMC Ecology*. 2004. V. 4. № 4.
<https://doi.org/10.1186/1472-6785-4-4>
 23. Luginbühl M., Gaugler S. The application of fully automated dried blood spot analysis for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the CAMAG DBS-MS 500 autosampler // *Clin. Biochem.* 2020. V. 82. P. 33.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.02.007>
 24. Thomas A., Déglon J., Steimer T., Mangin P., Daali Y., Staub C. On-line desorption of dried blood spots coupled to hydrophilic interaction/reversed-phase LC/MS/MS system for the simultaneous analysis of drugs and their polar metabolites // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. № 6–7. P. 873.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200900593>
 25. Wong P., Pham R., Whitely C., Soto M., Salyers K., James C., Bruenner B.A. Application of automated serial blood sampling and dried blood spot technique with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies in mice // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 56. № 3. P. 604.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.06.022>
 26. Déglon J., Thomas A., Mangin P., Staub C. Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: Concepts and biomedical applications // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. № 8. P. 2485.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5161-6>
 27. Emmons G., Rowland M. Pharmacokinetic considerations as to when to use dried blood spot sampling // *Bioanalysis*. 2010. V. 2. № 11. P. 1791.
<https://doi.org/10.4155/bio.10.159>
 28. Abu-Rabie P., Denniff P., Spooner N., Brynjolffssen J., Galluzzo P., Sanders G. Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. № 22. P. 8779.
<https://doi.org/10.1021/ac202321q>
 29. Meesters R., Hooff G., van Huizen N., Gruters R., Luidert T. Impact of internal standard addition on dried blood spot analysis in bioanalytical method development // *Bioanalysis*. 2011. V. 3. № 20. P. 2357.
<https://doi.org/10.4155/bio.11.202>
 30. Cardona-Ospina J.A., Villalba-Miranda M.F., Palechor-Ocampo L.A., Mancilla L.I., Sepúlveda-Arias J.C. A systematic review of FTA cards® as a tool for viral RNA preservation in fieldwork: Are they safe and effective? // *Prev. Vet. Med.* 2019. V. 172. 104772.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104772>
 31. Curry P.S., Ribble C., Sears W.C., Orsel K., Hutchins W., Godson D., Lindsay R., Dibernardo A., Campbell M., Kutz S.J. Blood collected on filter paper for wildlife serology: Evaluating storage and temperature challenges of field collections // *J. Wildl. Dis.* 2014. V. 50. № 2. P. 308.
<https://doi.org/10.7589/2012-06-150>
 32. Van Berkel G.J., Pasilis S.P., Ovchinnikova O. Established and emerging atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 9. P. 1161.
<https://doi.org/10.1002/jms.1440>
 33. Chace D.H. Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: Historical perspective and future directions // *J. Mass Spectrom.* 2009. V. 44. № 2. P. 163.
<https://doi.org/10.1002/jms.1528>
 34. Hernandez V.V., Barbas C., Dudzik D. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies // *Electrophoresis*. 2017. V. 18. P. 2232.
<https://doi.org/10.1002/elps.201700086>
 35. Meesters R.J., Zhang J., van Huizen N.A., Hooff G.P., Gruters R.A., Luidert T.M. Dried matrix on paper disks: The next generation DBS microsampling technique for managing the hematocrit effect in DBS analysis // *Bioanalysis*. 2012. V. 4. № 16. P. 2027.
<https://doi.org/10.4155/bio.12.175>

36. Meesters R.J., Hooff G.P., Gruters R., van Kampen J.J., Luidert T.M. Incurred sample reanalysis comparison of dried blood spots and plasma samples on the measurement of lopinavir in clinical samples // *Bioanalysis*. 2012. V. 4. № 3. P. 237.
<https://doi.org/10.4155/bio.11.328>
37. Kehler J.R., Bowen C.L., Boram S.L., Evans C.A. Application of DBS for quantitative assessment of the peptide Exendin-4; comparison of plasma and DBS method by UHPLC-MS/MS. // *Bioanalysis*. 2010. V. 2. № 8. P. 1461.
<https://doi.org/10.4155/bio.10.108>
38. Randriamparany T., Kouako, K.V., Michaud V., Fernández-Pinero J., Gallardo C., Le Potier M.F., Rabenarivahiny R., Couacy-Hymann E., Raherimandimby M., Albina E. African swine fever diagnosis adapted to tropical conditions by the use of dried-blood filter papers // *Transbound. Emerg. Dis.* 2016. V. 63. № 4. P. 379.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12295>
39. Sharma R., Parker S., Al-Adhami B., Bachand N., Jenkins E. Comparison of tissues (heart vs. brain) and serological tests (MAT, ELISA and IFAT) for detection of *Toxoplasma gondii* in naturally infected wolverines (*Gulo gulo*) from the Yukon, Canada // *Food Waterborne Parasitol.* 2019. V. 15. Article e00046.
<https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00046>
40. Strnadová K.A., Holub M., Mühl A., Heinze G., Ratschmann R., Mascher H., Stöckler-Ipsiroglu S., Waldhauser F., Votava F., Lebl J., Bodamer O.A. Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. № 4. P. 717.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.076679>
41. Fingerhut R., Ensenaer R., Röschinger W., Arnecke R., Olgemöller B., Roscher A.A. Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: Implications for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 9. P. 3571.
<https://doi.org/10.1021/ac8022235>
42. Michaud V., Gil P., Kwiatek O., Prome S., Dixon L., Romero L., Le Potier M.F., Arias M., Couacy-Hymann E., Roger F., Libeau G., Albina E. Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR // *J. Virol. Methods.* 2007. V. 146. № 1–2. P. 257.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.006>
43. Madhanmohan M., Yuvaraj S., Manikumar K., Kumar R., Nagendrakumar S.B., Rana S.K., Srinivasan V.A. Evaluation of the flinders technology associates cards for storage and temperature challenges in field conditions for foot-and-mouth disease virus surveillance // *Transbound. Emerg. Dis.* 2016. V. 63. P. 675.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12316>
44. Alfazil A.A., Anderson R.A. Stability of benzodiazepines and cocaine in blood spots stored on filter paper // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V. 32. № 7. P. 511.
<https://doi.org/10.1093/jat/32.7.511>
45. Prieto J.A., Andrade F., Lage S., Aldámiz-Echevarría L. Comparison of plasma and dry blood spots as samples for the determination of nitisinone (NTBC) by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Study of the stability of the samples at different temperatures // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011. V. 879. № 11–12. P. 671.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.031>
46. De Kesel P.M., Sadones N., Capiou S., Lambert W.E., Stove C.P. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: Challenges and solutions // *Bioanalysis*. 2013. V. 5. № 16. P. 2023.
<https://doi.org/10.4155/bio.13.156>
47. Adam B.W., Alexander J.R., Smith S.J., Chace D.H., Loeber J.G., Elvers L.H., Hannon W.H. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried blood spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix // *Clin. Chem.* 2000. V. 46. № 1. P. 126.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/46.1.126>
48. Koster R.A., Botma R., Greijdanus B., Uges D.R.A., Kosterink J.G.W., Touw D.J., Alffenaar J.W.C. The performance of five different dried blood spot cards for the analysis of six immunosuppressants // *Bioanalysis*. 2015. V. 7. № 10. P. 1225.
<https://doi.org/10.4155/bio.15.63>
49. Beaudette P., Bateman K.P. CIRRI: Weather-based irrigation management program for container nurseries // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004. № 809. P. 153.
<https://doi.org/10.21273/HORTTECH.25.4.528>
50. Pandya H.C., Spooner N., Mulla H. Dried blood spots, pharmacokinetic studies and better medicines for children // *Bioanalysis*. 2011. V. 3. № 7. P. 779.
<https://doi.org/10.4155/bio.11.19>
51. Denniff P., Spooner N. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs // *Bioanalysis*. 2010. V. 2. № 8. P. 1385.
<https://doi.org/10.4155/bio.10.103>
52. Spooner N., Lad R., Barfield M. Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: Considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 4. P. 1557.
<https://doi.org/10.1021/ac8022839>
53. Liang X., Li Y., Barfield M., Ji Q.C. Study of dried blood spots technique for the determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human whole blood by LC-MS/MS // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. V. 877. № 8–9. P. 799.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.015>
54. Holub M., Tuschl K., Ratschmann R., Strnadová K.A., Mühl A., Heinze G., Sperl W., Bodamer O.A. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 373. № 1–2. P. 27.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.04.013>
55. Zheng N., Yuan L., Ji Q.C., Mangus H., Song Y., Frost C., Zeng J., Aubry A.F., Arnold M.E. “Center punch” and “whole spot” bioanalysis of apixaban in human dried blood spot samples by UHPLC-MS/MS // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015. V. 988. P. 66.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.02.023>

56. Ren X., Paehler T., Zimmer M., Guo Z., Zane P., Emons G.T. Impact of various factors on radioactivity distribution in different DBS papers // *Bioanalysis*. 2010. V. 2. № 8. P. 1469.
<https://doi.org/10.4155/bio.10.96>
57. O'Mara M., Hudson-Curtis B., Olson K., Yueh Y., Dunn J., Spooner N. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples // *Bioanalysis*. 2011. V. 3. № 20. P. 2335.
<https://doi.org/10.4155/bio.11.220>
58. Youhnovski N., Bergeron A., Furtado M., Garofolo F. Pre-cut Dried Blood Spot (PCDBS): An alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011. V. 25. № 19. P. 2951.
<https://doi.org/10.1002/rcm.5182>
59. Li F., Zulkoski J., Fast D., Michael S. Perforated dried blood spots: A novel format for accurate microsampling // *Bioanalysis*. 2011. V. 3. № 20. P. 2321.
<https://doi.org/10.4155/bio.11.219>
60. Li F., Ploch S., Fast D., Michael S. Perforated dried blood spot accurate microsampling: The concept and its applications in toxicokinetic sample collection. // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. № 5. P. 655.
<https://doi.org/10.1002/jms.3015>
61. Capiou S., Stove V.V., Lambert W.E., Stove C.P. Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 1. P. 404.
<https://doi.org/10.1021/ac303014b>
62. Miller IV J.H., Poston P.A., Rutan S.C., Thomas K.H. An on-card approach for assessment of hematocrit on dried blood spots which allows for correction of sample volume // *J. Anal. Bioanal. Tech.* 2013. V. 4. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000162>
63. Luginbühl M., Fischer Y., Gaugler S. Fully automated optical hematocrit measurement from dried blood spots // *J. Anal. Toxicol.* 2020. Article bkaa189.
<https://doi.org/10.1093/jat/bkaa189>
64. Li Y., Henion J., Abbott R., Wang P. The use of a membrane filtration device to form dried plasma spots for the quantitative determination of guanfacine in whole blood // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012. V. 26. № 10. P. 1208.
<https://doi.org/10.1002/rcm.6212>
65. Velghe S., Delahaye L., Stove C.P. Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V. 163. P. 188.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.010>
66. Li W., Doherty J.P., Kulmatycki K., Smith H.T., Tse F.L. Simultaneous LC-MS/MS quantitation of acetaminophen and its glucuronide and sulfate metabolites in human dried blood spot samples collected by subjects in a pilot clinical study // *Bioanalysis*. 2012. V. 4. № 12. P. 1429.
<https://doi.org/10.4155/bio.12.119>
67. Lawson G., Cocks E., Tanna S. Quantitative determination of atenolol in dried blood spot samples by LC-HRMS: A potential method for assessing medication adherence // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. V. 897. P. 72.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.013>
68. Delahaye L., Veenhof H., Koch B.C.P., Alffenaar J.C., Linden R., Stove C. Alternative sampling devices to collect dried blood microsamples: State-of-the-art // *Ther. Drug. Monit.* 2021. V. 43. № 3. P. 310.
<https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000864>
69. Rosypal A.C., Pick L.D., Hernandez J.O.E., Lindsay D.S. Evaluation of a novel dried blood spot collection device (HemaSpot™) to test blood samples collected from dogs for antibodies to *Leishmania infantum* // *Vet. Parasitol.* 2014. V. 205. № 1–2. P. 338.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.031>
70. Denniff P., Spooner N. Volumetric absorptive microsampling: A dried sample collection technique for quantitative bioanalysis // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 16. P. 8489.
<https://doi.org/10.1021/ac5022562>
71. Kip A.E., Kierns K.C., Rosing H., Schellens J.H.M., Beijnen J.H., Dorlo T.P.C. Volumetric absorptive microsampling (VAMS) as an alternative to conventional dried blood spots in the quantification of miltefosine in dried blood samples // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017. V. 135. P. 160.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.012>
72. Leuthold L.A., Heudi O., Déglon J., Raccuglia M., Augsburg M., Picard F., Kretz O., Thomas A. New microfluidic-based sampling procedure for overcoming the hematocrit problem associated with dried blood spot analysis // *Anal. Chem.* 2015. V. 8. № 4. P. 2068.
<https://doi.org/10.1021/ac503931g>
73. Neto R., Gooley A., Breadmore M.C., Hilder E.F., Lapiere F. Precise, accurate and user - independent blood collection system for dried blood spot sample preparation // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. № 14. P. 3315.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0993-y>
74. Polley S.D., Bell D., Oliver J., Tully F., Perkins M.D., Chiodini P.L., Gonzalez I.J. The design and evaluation of a shaped filter collection device to sample and store defined volume dried blood spots from finger pricks // *Malar. J.* 2015. V. 14. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s12936-015-0558-x>
75. Nobuto K. Toxoplasmosis in animal and laboratory diagnosis // *Jpn. Agric. Res. Q.* 1966. V. 1. № 3. P. 11.
76. Curry P.S., Ribble C., Sears W.C., Hutchins W., Orsel K., Godson D., Lindsay R., Dibernardo A., Kutz S.J. Blood collected on filter paper for wildlife serology: Detecting antibodies to *Neospora Caninum*, West Nile virus, and five bovine viruses in reindeer // *J. Wildl. Dis.* 2014. V. 50. № 2. P. 297.
<https://doi.org/10.7589/2012-02-047>
77. Curry P.S., Elkin B.T., Campbell M., Nielsen K., Hutchins W., Ribble C., Kutz S.J. Filter-paper blood samples for Elisa detection of brucella antibodies in Caribou // *J. Wildl. Dis.* 2011. V. 47. № 1. P. 12.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.12>
78. Jara R.F., Sepúlveda C., Ip H.S., Samuel M.D. Total protein concentration and diagnostic test results for gray wolf (*Canis lupus*) serum using Nobuto filter paper strips // *J. Wildl. Dis.* 2015. V. 51. № 2. P. 475.
<https://doi.org/10.7589/2013-07-185>
79. Nemeth N.M., Bosco-Lauth A.M., Williams L.M., Bowen R.A., Brown J.D. West Nile virus infection in ruffed grouse (*Bonasa umbellus*): Experimental infection

- and protective effects of vaccination // *Vet. Pathol.* 2017. V. 54. № 6. P. 901.
<https://doi.org/10.1177/0300985817717770>
80. Саушкин Н.Ю. Аналитические системы на основе технологии сухих пятен крови и высокопористых мембранных носителей для целей ветеринарной диагностики. Дис. ... канд. хим. наук. Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2019. 174 с.
81. Осипов А.П., Кондаков С.Э., Григоренко В.Г., Смоленский В.И., Прокопцева О.С., Самсонова Ж.В. Устройство для получения, хранения и транспортировки сухих образцов жидкостных объектов, предназначенных для последующего проведения лабораторного анализа. Патент РФ № 2519030. Заявка 2013102274/15 от 18.01.2013, опублик. 15.07.2014.
82. Samsonova J.V., Chadina A.D., Osipov A.P., Kondakov S.E. Porous membrane strip microsampling: a dried biofluid collection format and application for quantitative enzyme immunoassay // *Anal. Methods.* 2016 V. 8. P. 4835.
<https://doi.org/10.1039/C6AY00724D>
83. Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. Strip-dried whole milk sampling technique for progesterone detection in cows by ELISA // *Talanta.* 2017. V. 175. P. 143.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.032>
84. Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. A new dried milk sampling technique and its application for progesterone detection in cows // *Vet. J.* 2014. V. 199. № 3. P. 471.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.031>
85. Samsonova J.V., Saushkin N.Yu., Osipov A.P., Kondakov S.E., Fomina S.N., Mischenko A.V. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus serotypes A, O and Asia-1 by ELISA in strip-dried samples from vaccinated bovines // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019. V. 188. P. 491.
<https://doi.org/10.1007/s12010-018-02938-3>
86. Saushkin N.Yu., Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. Strip-dried blood sampling: applicability for bovine leukemia virus detection with ELISA and real-time PCR // *J. Virol. Methods.* 2019. V. 263. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.11.004>
87. Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Кондаков С.Э., Лысова Е.С., Елизарова И.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А. Использование стрипованных образцов биологических жидкостей для определения специфических антител у инфицированного мелкого рогатого скота // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия.* 2018. Т. 59. № 3. С. 235. (Saushkin N.Yu., Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E., Lysova E.S., Elizarova I.A., Khaertynov K.S., Shuralev E.A. Strip-dried biofluids for the detection of specific antibodies in small, infected ruminants // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2018. V. 73. № 3. P. 135.)
<https://doi.org/10.3103/S0027131418030069>
88. Чвала И.А., Мищенко А.В., Лозовой Д.А., Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Кондаков С.Э., Осипов А.П., Кузнецов Д.В., Черных О.Ю. Контроль эффективности иммунизации птиц против гриппа А/Н5 с использованием технологии сухих пятен крови // *Ветеринария.* 2018. № 2. С. 24.
89. Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Кондаков С.Э., Ефимова М.А., Чернов А.Н. Диагностика инфекционных заболеваний крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа в сухих пятнах крови с использованием нового формата пробоподготовки // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2: Химия.* 2016. Т. 57 № 4. С. 263. (Saushkin N.U., Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E., Efimova M.A., Chernov A.N. A new sampling format for the diagnostics of bovine infectious diseases in dried blood spots by ELISA // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2016. V. 71. № 4. P. 253.)
<https://doi.org/10.3103/S0027131416040088>
90. Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Кондаков С.Э., Хаммадов Н.И., Усолцев К.В., Макаев Х.З., Чернов А.Н. Сравнение методов ПЦР и ИФА для определения лейкоза крупного рогатого скота с использованием сухих пятен крови // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2: Химия.* 2016. Т. 57. № 5. С. 41. (Saushkin N.U., Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E., Khammatov N.I., Usol'tsev K.V., Makaev Kh Z., Chernov A.N. Comparison of PCR and ELISA methods for the detection of bovine leucosis in dried blood spots // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2016. V. 71. № 5–6. P. 319.)
<https://doi.org/10.3103/S0027131416050084>
91. Самсонова Ж.В., Саушкин Н.Ю., Осипов А.П., Яковлев С.С., Рождественская Т.Н. Сухие образцы крови для транспортировки и анализа при контроле поствакцинального иммунитета птицы // *Птица и птицепродукты.* 2019. № 5. С. 48.
92. Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Серебренникова К.В. Набор для получения, хранения и транспортировки сухих образцов крови или сыворотки крови птиц для контроля эффективности вакцинации. Патент РФ № 2706405. Заявка 2018143019 от 05.12.2018, опублик. 18.11.2019.
93. Trifonova O.P., Maslov D.L., Balashova E.E., Lokhov P.G. Evaluation of dried blood spot sampling for clinical metabolomics: Effects of different papers and sample storage stability // *Metabolites.* 2019. V. 9. № 11. P. 277.
<https://doi.org/10.3390/metabo9110277>
94. Bhuiyan A.R., Chowdhury E.H., Kwiatek O., Parvin R., Rahman M.M., Islam M.R., Albina E., Libeau G. Dried fluid spots for peste des petits ruminants virus load evaluation allowing for non-invasive diagnosis and genotyping // *BMC Vet. Res.* 2014. V. 10. 247.
<https://doi.org/10.1186/s12917-014-0247-y>
95. McDade T.W., Williams S.A., Snodgrass J.J. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research // *Demography.* 2007. V. 44. № 4. P. 899.
<https://doi.org/10.1353/dem.2007.0038>
96. Lange B., Roberts T., Cohn J., Greenman J., Camp J., Ishizaki A., Messac L., Tuailon E., van de Perre P., Pichler C., Denking C.M., Easterbrook P. Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV-RNA using dried blood spot (DBS) samples - A systematic review and meta-analysis // *BMC Infect. Dis.* 2017. V. 17 (Suppl 1). P. 693.
<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2776-z>

97. Rowland M., Emmons G.T. Use of dried blood spots in drug development: Pharmacokinetic considerations // *AAPS J.* 2010. V. 12. № 3. P. 290.
<https://doi.org/10.1208/s12248-010-9188-y>
98. Henion J., Oliveira R. V., Chace D.H. Microsample analyses via DBS: Challenges and opportunities // *Bioanalysis.* 2013. V. 5. № 20. P. 2547.
<https://doi.org/10.4155/bio.13.197>
99. Marca G. la, Malvagia S., Pasquini E., Innocenti M., Fernandez M.R., Donati M.A., Zammarchi E. The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type I in expanded newborn screening programs // *Hell. J. Nucl. Med.* 2008. V. 22. P. 812.
<https://doi.org/10.1002/rcm.3428>
100. Blau N. Genetics of phenylketonuria: Then and now // *Hum. Mutat.* 2016. V. 37. № 6. P. 508.
<https://doi.org/10.1002/humu.22980>
101. Karstad L., Spalatin J., Hanson R.P. Application of the paper disc technique to the collection of whole blood and serum samples in studies on eastern equine encephalomyelitis // *J. Infect. Dis.* 1957. V. 101. № 3. P. 295.
102. Lehner A.F., Rumbeiha W., Shlosberg A., Stuart K., Johnson M., Domenech R., Langner H. Diagnostic analysis of veterinary dried blood spots for toxic heavy metals exposure // *J. Anal. Toxicol.* 2013. V. 37. № 7. P. 406.
<https://doi.org/10.1093/jat/bkt048>
103. Shlosberg A., Rumbeiha W.K., Lublin A., Kannan K. A database of avian blood spot examinations for exposure of wild birds to environmental toxicants: The DABSE biomonitoring project // *J. Environ. Monit.* 2011. V. 13. № 6. P. 1547.
<https://doi.org/10.1039/C0EM00754D>
104. Shlosberg A., Wu Q., Rumbeiha W.K., Lehner A., Cuneah O., King R., Hatzofe O., Kannan K., Johnson M. Examination of eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus fulvus*) in Israel for exposure to environmental toxicants using dried blood spots // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2012. V. 62. № 3. P. 502.
<https://doi.org/10.1007/s00244-011-9709-4>
105. Lehner A.F., Johnson M., Buchweitz J. Veterinary utility of dried blood spots for analysis of toxic chlorinated hydrocarbons // *Toxicol. Mech. Methods.* 2017. V. 28. № 1. P. 29.
<https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1354414>
106. Perkins M., Basu N. Dried blood spots for estimating mercury exposure in birds // *Environ. Pollut.* 2018. V. 236. P. 236.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.036>
107. Posyniak A., Zmudzki J., Niedzielska J. Liquid chromatography analysis of enrofloxacin and ciprofloxacin in chicken blood spotted on filter-paper disks // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002. V. 780. № 2. P. 309.
[https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00540-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00540-8)
108. Ahmed H.A., Picozzi K., Welburn S.C., MacLeod E.T. A comparative evaluation of PCR- based methods for species- specific determination of African animal trypanosomes in Ugandan cattle // *Parasit. Vectors.* 2013. V. 6. № 1. P. 316.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-316>
109. Adams E.R., Hamilton P.B., Malele I.I., Gibson W.C. The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding // *Infect. Genet. Evol.* 2008. V. 8. № 4. P. 439.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.07.013>
110. Hall-Mendelin S., Ritchie S.A., Johansen C.A., Zborowski P., Cortis G., Dandridge S., Hall R.A., Van den Hurk A.F. Exploiting mosquito sugar feeding to detect mosquito-borne pathogens // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 11255.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1002040107>
111. Brito C.M., Lima M.M., Sarquis O., Pires M.Q., Coutinho C.F., Duarte R., Pacheco R.S. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction // *Parasitol. Res.* 2008. V. 103. № 5. P. 1111.
<https://doi.org/10.1007/s00436-008-1102-5>
112. Hopkins J.S., Chitambo H., Machila N., Luckins A.G., Rae P.F., Van Den Bossche P., Eisler M.C. Adaptation and validation of antibody-ELISA using dried blood spots on filter paper for epidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomiasis in cattle // *Prev. Vet. Med.* 1998. V. 37. № 1–4. P. 91.
[https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00101-9)
113. Rasolonjatovo F.S., Guis H., Rajeev M., Dacheux L., Arivony Nomenjanahary L., Razafitrimo G., Rafisan-drantantsoa J.T., Cêtre-Sossah C., Heraud J.M., Andriamandimby S.F. Enabling animal rabies diagnostic in low-access areas: Sensitivity and specificity of a molecular diagnostic test from cerebral tissue dried on filter paper // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020. V. 14. № 3. Article e0008116.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008116>
114. Foss L., Reisen W., Fang Y., Kramer V., Padgett K. Evaluation of nucleic acid preservation cards for West Nile virus testing in dead birds // *PLOS One.* 2016. V. 11. Article e0157555.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157555>
115. Al-Kappany Y.M., Abbas I.E., Devleeschauwer B., Dorny P., Jennes M., Cox E. Seroprevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in Egyptian sheep and goats // *BMC Vet. Res.* 2018. V. 14. № 1. P. 120.
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1440-1>
116. Jefferies R., Ryan U.M., Irwin P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies // *Vet. Parasitol.* 2007. V. 144. № 1–2. P. 20.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>
117. Pedersen L., Andersen-Ranberg K., Hollergaard M., Nybo M. Quantification of multiple elements in dried blood spot samples // *Clin. Biochem.* 2017. V. 50. № 12. P. 703.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.01.010>
118. Liu G., Mühlhäusler B.S., Gibson R.A. A method for long term stabilisation of long chain polyunsaturated fatty acids in dried blood spots and its clinical application // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2014. V. 91. № 6. P. 251.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.09.009>

УДК 543.9+544.6

АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТА ПИЛЛАР[6]АРЕНА И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2022 г. Р. В. Шамагсумова^а, *, А. В. Васюк^а, Д. Н. Шурпик^а, В. Г. Евтюгин^а,
И. И. Стойков^а, Г. А. Евтюгин^а

^аКазанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: rezeda84190@mail.ru

Поступила в редакцию 19.08.2021 г.

После доработки 11.10.2021 г.

Принята к публикации 12.10.2021 г.

Разработан вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного углеродной чернью, пиллар[6]ареном и наночастицами серебра, для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы, используемых при лечении болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний. Наночастицы серебра формируются непосредственно в слое за счет восстановления ионов серебра гидрохиноновыми фрагментами макроцикла. Их образование подтверждено трансмиссионной электронной микроскопией. Фермент иммобилизовали поверх модифицирующего слоя с помощью карбодиимидного связывания. Установлены электрохимические характеристики компонентов покрытия. Определена зависимость токов пика окисления макроцикла и наночастиц серебра от способа формирования поверхностного слоя. Показано, что ток пика окисления пилларарена меняется при добавлении ацетилтиохолина в силу его включения в окисление продукта ферментативного гидролиза субстрата. В присутствии донепезила, гуперзина А, берберина и галантамина скорость ферментативной реакции снижается. Изменение тока окисления, измеряемого в хроноамперометрическом режиме, зависит от концентрации ингибитора. Градуировочная зависимость для определения ингибиторов имеет сигмоидный характер и аппроксимируется логистической функцией. Пределы обнаружения, оцениваемые по концентрации, отвечающей 15%-ному ингибированию, составили для гуперзина А 1.2 нМ, галантамина 12.5 нМ, донепезила 2.5 нМ и берберина 10 нМ. Разработанный биосенсор апробирован при определении остаточных содержаний галантамина в искусственной моче.

Ключевые слова: ацетилхолинэстеразный сенсор, пиллар[6]арен, углеродная чернь, наночастицы серебра, вольтамперометрия, определение обратимых ингибиторов.

DOI: 10.31857/S0044450222040132

Электрохимические ферментные биосенсоры находят применение при определении широкого круга соединений, используемых в качестве лекарственных препаратов, химических средств защиты растений, пищевых добавок, а также относящихся к метаболитам и биомаркерам заболеваний [1–3]. Значительная их часть выступает в качестве субстратов ферментативных реакций. Так, глюкоза окисляется до глюконолактона в присутствии глюкозооксидазы [4], а молочная кислота до пирувиноградной – в присутствии лактатоксидазы [5]. Такие биосенсоры отличаются высокой специфичностью отклика, однако обеспечивают относительно низкую чувствительность определения аналитов. Альтернативой вы-

ступают биосенсоры, в которых определяемые вещества ингибируют целевую реакцию субстрата, снижая ферментативную активность [6, 7]. В этом случае определяемые концентрации могут находиться в нано- и даже пикомолярном диапазоне, что имеет значение при определении токсинов и остаточных количеств лекарственных препаратов [8–10]. Среди многочисленных компонентов таких биосенсоров наиболее известным и перспективным является фермент ацетилхолинэстераза (АХЭ, КФ 3.1.1.7) [11–13]. Он играет ключевую роль в переносе нервного импульса в синаптической щели, разделяющей окончания аксонов, благодаря быстрому и селективному гидролизу природного нейротрансмиттера – аце-

тилхолина. Снижение активности АХЭ влечет за собой мышечные судороги, миоз зрачка, нарушение сердечной деятельности, при тяжелых поражениях — летальный исход. Вещества нервнопаралитического действия, разработанные как химическое оружие, относятся к сильным необратимым ингибиторам АХЭ [12, 14].

После запрещения химического оружия фокус применения АХЭ сместился в сторону определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов, а в последнее время — лекарственных препаратов миорелаксантного действия, применяемых в офтальмологии [15], и лекарств против нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и старческая деменция [16]. В настоящее время терапия подобных заболеваний направлена на купирование основных симптомов путем компенсации снижения уровня ацетилхолина. Для этого применяют обратимые ингибиторы АХЭ, как правило, включающие в свой состав катионные или способные к протонированию центры, имитирующие триметиламмонийную группу природного субстрата — ацетилхолина. Взаимодействие таких препаратов с активным центром фермента снижает его доступность для взаимодействия с субстратом и тем самым снижает скорость ферментативной реакции.

Основное методическое отличие функционирования биосенсоров на основе АХЭ для определения необратимых и обратимых ингибиторов состоит в том, что в последнем случае измерение сигнала происходит в присутствии и субстрата, и ингибитора. Это снижает определяемые концентрации обратимых ингибиторов по сравнению с сильными необратимыми ингибиторами, а также ужесточает требования к устойчивости сигнала во времени и его воспроизводимости в серии измерений.

С учетом указанных особенностей возрастает внимание к совершенствованию конструкции биосенсоров с иммобилизованной АХЭ, которые должны обеспечивать высокую стабильность сигнала и чувствительность его регистрации. Ранее нами исследованы условия определения обратимых ингибиторов АХЭ, применявшихся в качестве лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера, с использованием методов физической иммобилизации фермента и традиционного в подобных биосенсорах медиатора электронного переноса фталоцианина кобальта в качестве модификатора [17–19].

В данной работе мы впервые использовали с той же целью новый перспективный медиатор — композит пиллар[6]арена с наночастицами се-

ребра. Необходимость применения медиатора электронного переноса обусловлена большим перенапряжением окисления тиохолина. Данный продукт образуется при ферментативном гидролизе тиоаналога ацетилхолина и часто используется для вольтамперометрической и амперометрической регистрации сигнала биосенсора. Пиллар [6]арен — макроциклическое производное гидрохинона, в котором шесть его фрагментов соединены мостиковыми метиленовыми группами в *мета*-положении (схема 1) [20].

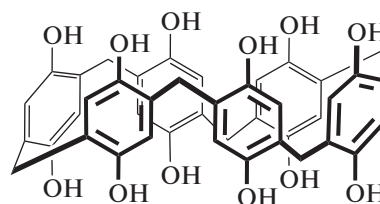


Схема 1. Структурная формула пиллар[6]арена.

Электрохимическая активность пиллар[*n*]аренов связана с обратимым окислением—восстановлением фрагментов гидрохинона, а реакционная способность в значительной степени зависит от внутримолекулярных водородных связей между соседними гидроксильными группами обоих ободов макроцикла. Включение наночастиц серебра, образующихся за счет химического восстановления ионов серебра пиллар[6]ареном, является перспективным приемом повышения эффективности медиаторного переноса электрона за счет способности металла к взаимодействию с тиольными группами органических соединений. Поскольку тиохоллин при этом может дополнительно накапливаться в приэлектродном слое, использование такого композита может повысить чувствительность биосенсора в отношении ацетилтиохолина и ингибиторов фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали АХЭ из электрического угря (156 Е/мг препарата или 224 Е/мг белка), углеродную чернь (N220, IMERIS, Бельгия), ацетилтиохоллин хлорид, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС), *N*-гидроксисукцинимид (*N*-ГС), *N*-(3-диметиламинопропил)-*N*-этилкарбодиимида хлорид (ЭДХ), хлорид берберина, гидрохлорид донепезила, гуперзин А, гидробромид галантамина (Sigma-Aldrich, США) (схема 2).

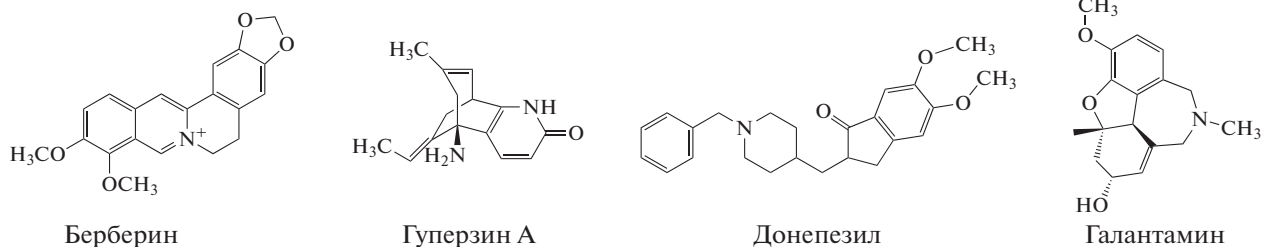


Схема 2. Структурные формулы обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы.

Другие реагенты категории ч.д.а. и analytical grade использовали без дополнительной очистки. Буферные растворы и растворы реагентов для электрохимических измерений готовили на деионизованной воде (Millipore-Q, Франция). Концентрированные растворы АХЭ и ацетилтихолина хранили в замороженном виде при -20°C и разводили до рабочей концентрации непосредственно перед использованием. Искусственную урину готовили путем растворения точных навесок компонентов, конечные концентрации составили 0.02 М КСl, 0.049 М NaCl, 0.015 М KH_2PO_4 , 0.01 М CaCl₂, 0.018 М NH₄Cl и 0.018 М мочевины.

Пиллар[6]арен синтезировали на кафедре органической и медицинской химии Казанского федерального университета по модифицированной методике [21]. Кратко, для этого проводили циклизацию 1,4-бис(2-бромэтокси)бензола в присутствии метансульфоновой кислоты в хлороформе сначала при 0°C , затем при 35°C . Продукт обрабатывали VBr_3 для освобождения гидроксидных групп (схема 3). Структуру пиллар[6]арена подтверждали данными ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектроскопии. Синтезированный пиллар[6]арен хранили в атмосфере аргона при -20°C .

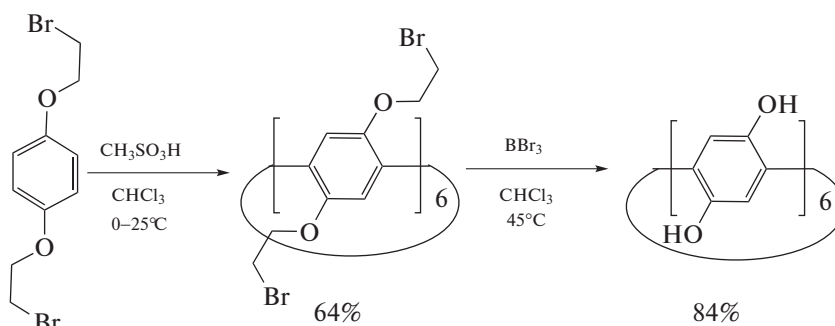


Схема 3. Общая схема синтеза пиллар[6]арена.

Микроизображения с помощью трансмиссионной электронной микроскопии получали с помощью микроскопа Hitachi HT7700 Exalens (Япония) при напряжении 120 кэВ. Смесь пиллар[6]арена и нитрата серебра наносили на медную сетку 3 мм 200 меш, покрытую формваром и углеродом.

Вольтамперометрические измерения проводили в трехэлектродной ячейке в режиме постоянноточковой вольтамперометрии и хроноамперометрии с помощью потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm Autolab, Нидерланды). В качестве рабочих электродов использовали стеклоуглеродный электрод (СУЭ) из стержней СУ2000 диаметром 1.7 мм (НИИГрафит, Москва) в оболочке из политетрафторэтилена со стальным токосъемником. Противоеlectродом служила платиновая проволока, электродом сравнения — хлоридсеребряный электрод ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3.0 \text{ M KCl}$;

Metrohm AG, Швейцария). Измерения проводили в нетермостатированной трехэлектродной ячейке объемом 5 мл.

Модификация стеклоуглеродного электрода. Перед нанесением модифицирующего покрытия СУЭ механически полировали, промывали ацетоном, этанолом и деионизованной водой. После этого проводили циклирование его потенциала в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М Na_2SO_4 , в течение 10 мин или до постоянства токов в интервале потенциалов от -1.0 до 1.0 В (приблизительно 10 циклов). Для нанесения суспензии углеродной черни электрод подсушивали на воздухе при комнатной температуре и закрепляли в штативе рабочей поверхностью вверх. Суспензию углеродной черни готовили, добавляя ее точную навеску в диметилформамид из расчета 1 мг/мл, с последующей ультразвуковой обработкой в течение 30 мин. Далее 3 мкл суспензии на-

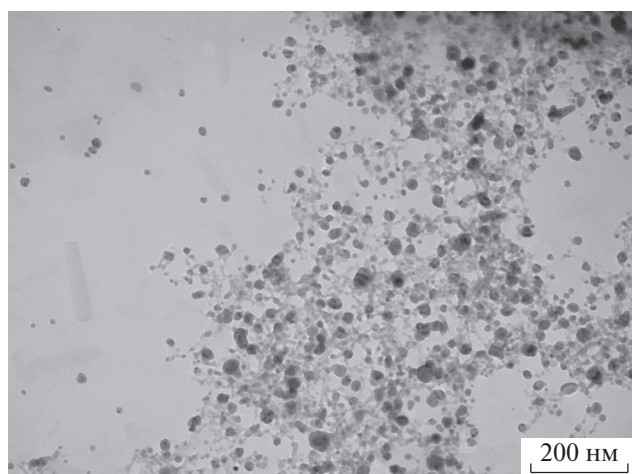


Рис. 1. Микрофотографии, полученные из смеси пиллар[6]арена и нитрата серебра с помощью трансмиссионной микроскопии при 50000-кратном увеличении.

носили на электрод и высушивали при 60°C в течение 20 мин. Затем на слой углеродной черни капельно наносили 2 мкл 30 мкМ раствор пиллар[6]арена в этаноле и высушивали при комнатной температуре. После этого на ту же поверхность наносили 5 мкл 0.1 мМ раствора нитрата серебра, поверхность закрывали пластиковой пробиркой для предотвращения высыхания и оставляли на 10 мин. Поверхность электрода после этого промывали деионизованной водой. В ряде экспериментов нанесение растворов пиллар[6]арена и нитрата серебра повторяли 2–3 раза для увеличения концентрации наночастиц серебра в слое.

Иммобилизация ацетилхолинэстеразы. На поверхность СУЭ, модифицированного пиллар[6]ареном и наночастицами серебра, последовательно наносили 3 мкл раствора ЭДХ (3 мг/мл в 0.05 М МЭС, рН 5.5) и 3 мкл N-ГС (1 мг/мл в 0.05 М МЭС, рН 5.5). Электрод закрывали пластиковой пробиркой и оставляли на 30 мин. Далее поверхность промывали деионизованной водой и вносили 2 мкл раствора АХЭ (2.5–20 Е/мл в 0.005 М фосфатном буферном растворе с рН 7.2). После высушивания при комнатной температуре электроды промывали тем же фосфатным буферным раствором и хранили при необходимости при 4°C в сухом виде.

Измерение сигнала биосенсора проводили в измерительной ячейке, содержащей 5 мл 0.05 М фосфатного буферного раствора, в хроноамперометрическом режиме при 0–0.4 В. Регистрировали хроноамперограмму до и после введения в буферный раствор ацетилхолина (концентрация в ячейке 0.5 мМ). При определении концентрации ингибитора сначала регистрировали анодный ток

в течение 200 с в присутствии 0.5 мМ ацетилтиохолина, далее в ячейку добавляли раствор ингибитора и продолжали регистрацию тока в течение еще 200 с. Степень ингибирования (I , %) рассчитывали, исходя из изменения тока:

$$I (\%) = \Delta I / I_0, \quad (1)$$

где ΔI – изменение тока при введении в раствор ингибитора и I_0 – анодный ток, отвечающий исходной концентрации субстрата в отсутствие ингибитора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Условия получения композита пиллар[6]арена и наночастиц серебра. При модификации СУЭ, модифицированного углеродной чернью, пиллар[6]ареном и нитратом серебра на циклических вольтамперограммах наблюдали пики окисления–восстановления макроцикла и анодного окисления элементного серебра, образующегося в слое за счет восстановления ионов Ag^+ гидрохиноновыми фрагментами пиллар[6]арена. Образование наночастиц серебра независимо подтвердили данными трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 1). Как видно, наночастицы серебра равномерно распределены в пленке пиллар[6]арена, с которым они образуют высокопористые сетчатые структуры.

Концентрации компонентов покрытия изменяли путем последовательного нанесения одинаковых аликвот растворов пиллар[6]арена и нитрата серебра (см. “Экспериментальную часть”). В целом вольтамперограммы имели сходный вид, однако токи растворения элементного серебра (острый необратимый пик при 0.3 В) выражены сильнее для покрытий, в которых последним слоем был AgNO_3 (рис. 2).

Исследовали влияние на сигналы на вольтамперограммах времени инкубирования электрода в растворе нитрата серебра и его концентрации при различном числе слоев реагентов (рис. 3). Из рисунка следует, что увеличение времени инкубирования приводит к регулярному возрастанию тока пика окисления наночастиц серебра, в то время как ток пика окисления пиллар[6]арена меняется менее регулярно с максимумом при времени инкубирования 10 мин. Последующее снижение тока пика может быть связано как с частичной инактивацией окисленных продуктов, склонных к хемосорбции, так и с увеличением сопротивления переноса заряда в слое. Оптимальная концентрация ионов серебра в процессе формирования поверхностного слоя составила 0.1 мМ. Ее увеличение снижает ток пика окисления пиллар[6]арена и слабо влияет на токи пика окисления самого серебра. Интересно отметить, что с формальной точки зрения увеличение коли-

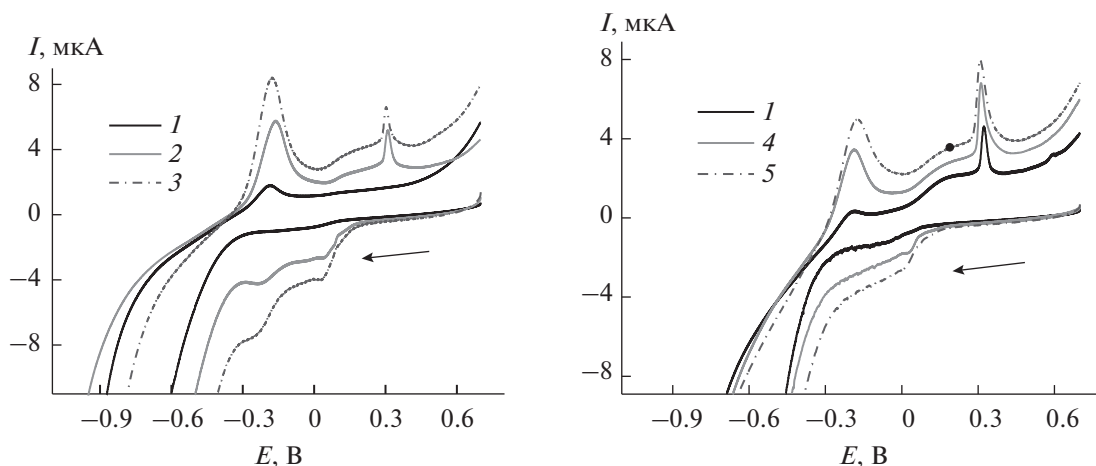


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы, полученные на стеклоуглеродном электроде, покрытом углеродной чернью, пиллар[6]ареном (1) и композитами состава пиллар[6]арен–Ag–пиллар [6]арен (2), (пиллар[6]арен–Ag)₂–пиллар[6]арен (3), (пиллар[6]арен–Ag)₂ (4) и (пиллар[6]арен–Ag)₃ (5). Измерения в 0.1 М растворе NaNO₃, 100 мВ/с. Время инкубирования в 0.1 мМ растворе AgNO₃ 10 мин. Стрелки обозначают направление сканирования потенциала.

чества макроцикла, участвующего в окислении ионов Ag⁺, должно снижать поверхностную концентрацию гидрохиноновых фрагментов, а значит, и токи их окисления на электроде. Противоположное влияние при промежуточной концентрации AgNO₃ свидетельствует в пользу сложного механизма электродных реакций со взаимным влиянием обоих электрохимически активных компонентов слоя на процессы переноса заряда. Это подтверждается пилообразной зависимостью тока пика окисления пиллар[6]арена от природы внешнего слоя.

При последовательном добавлении к углеродной черни растворов пиллар[6]арена и нитрата серебра ток пика окисления макроцикла выше, когда он присутствует во внешнем слое, и снижается при нанесении в заключительной стадии модификации раствора AgNO₃. При этом токи пика окисления пиллар[6]арена сохраняют постоянство в интервале рН 5.0–8.1 (рис. 4). Для пика окисления элементарного серебра столь регулярного изменения тока пика при рН 5.0 не наблюдали, а при более высоких значениях рН изменения противоположны наблюдаемым для макроцикла: токи пика снижались для внешнего слоя покрытия из пиллар[6]арена и увеличивались при внешнем слое из наночастиц серебра. Необходимо отметить, что во всех вариантах модификации электрода частицы, участвующие в переносе электрона, находились на поверхности стеклоуглерода, но не в растворе, поэтому указанные изменения не могут быть связаны с диффузионным переносом окисляющейся формы реагента из раствора. По-видимому, можно говорить об эффективности восстановления ионов Ag⁺ и челночном механизме переноса электрона внутри

многослойного покрытия, испытывающего влияние регулярности строения слоя пиллар[6]арена и наночастиц серебра. Поскольку условия регистрации микроснимков в трансмиссионной электронной микроскопии радикально отличались от условий регистрации вольт-амперных кривых (пиллар[6]арен и нитрат серебра смешивали в гомогенных условиях, после чего их смесь наносили на медную сетку и высушивали), сопоставление полученных результатов не позволило оценить регулярность распределения частиц серебра на поверхности СУЭ в слое углеродной черни.

Условия измерения сигнала ацетилхолинэстеразы биосенсора. Исходя из полученных данных о влиянии состава поверхностного слоя на электрохимические характеристики, для последующей иммобилизации фермента использовали электрод, покрытый четырьмя слоями модификаторов. Присутствие серебра во внешнем слое облегчало перенос электрона от тиохолина, образующегося в ферментативной реакции, а увеличение числа слоев до шести снижало абсолютную величину токов пика.

Иммобилизация фермента поверх модифицирующего слоя из углеродной черни, пиллар[6]арена и наночастиц серебра незначительно меняла морфологию пиков на вольтамперограммах. В частности, пики окисления–восстановления макроцикла становились более симметричными, а относительная величина пика окисления серебра снижалась. Введение в раствор фермента и ацетилтиохолина приводило к закономерным изменениям на циклических вольтамперограммах (рис. 5а): токи пика окисления снижались, а ток пика восстановления – увеличивался. Такие изменения связаны с участием окисленной формы пиллар[6]арена в химическом окислении

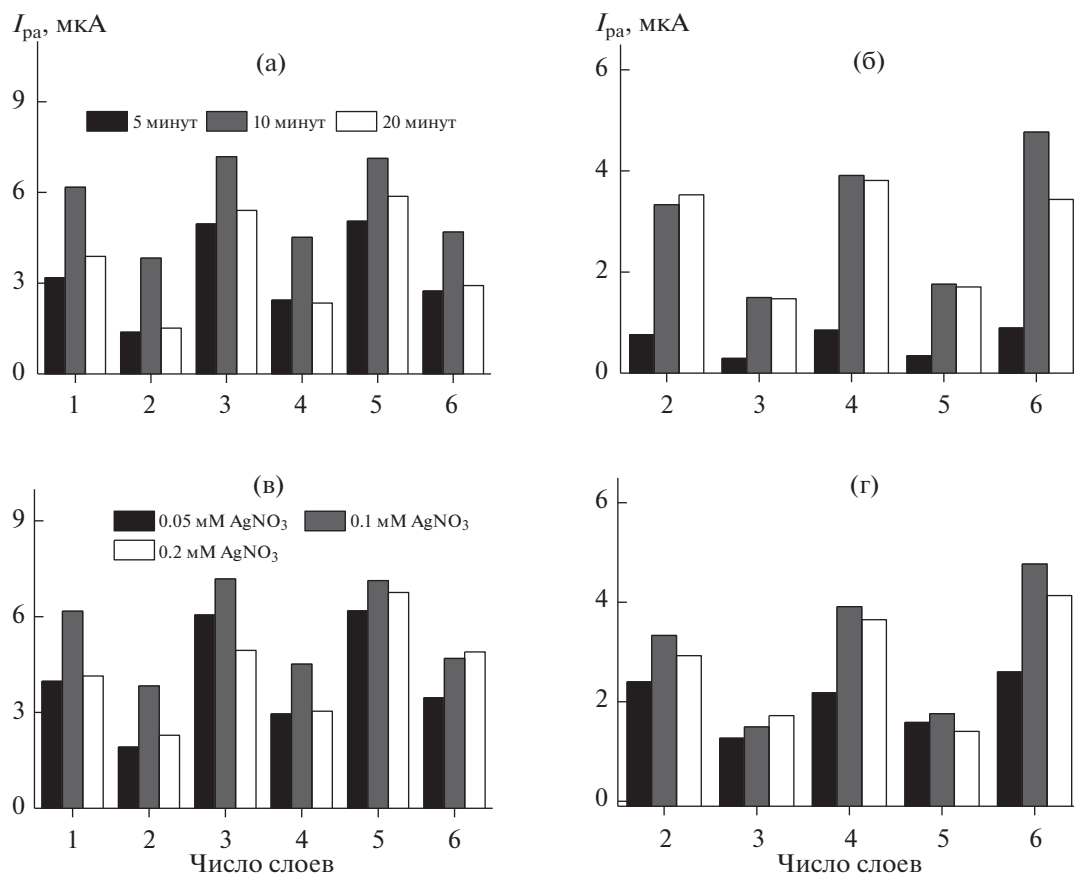


Рис. 3. Зависимость тока пика окисления пиллар[б]арена (а, в) и наночастиц серебра (б, г) от числа слоев модификаторов при варьировании времени инкубирования электрода в 0.1 мМ растворе AgNO_3 (а, б) и концентрации раствора AgNO_3 при времени инкубирования 10 мин (в, г).

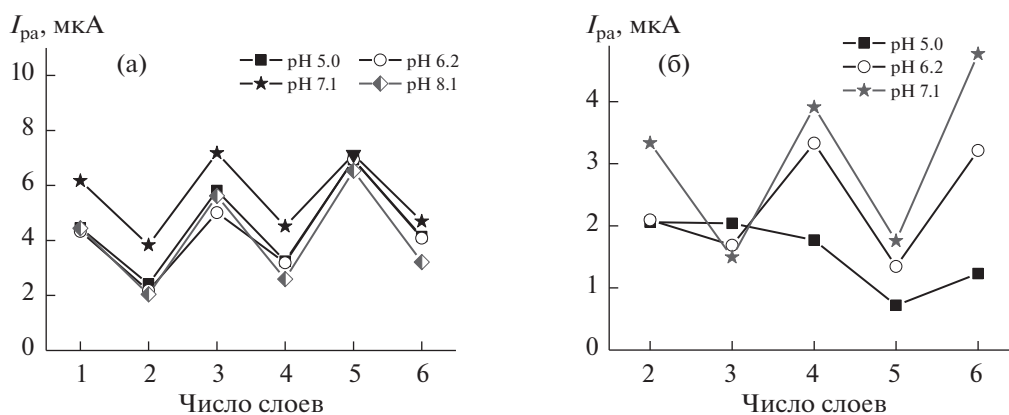


Рис. 4. Зависимость тока пика окисления пиллар[б]арена (а) и наночастиц серебра (б) от числа слоев модификаторов при варьировании pH. Измерения в 0.1 М растворе NaNO_3 , 100 мВ/с. Время инкубирования в 0.1 мМ растворе AgNO_3 10 мин.

тиохолина, что приводило к изменению соотношения бензохиноновых и гидрохиноновых фрагментов макроцикла. Изменения тока пика окисления серебра, по-видимому, связаны с их уча-

стием в переносе электрона внутри слоя, а также с частичным блокированием поверхности тиохолином, накапливающимся за счет самопроизвольного образования связей Ag-S . Аналогичное

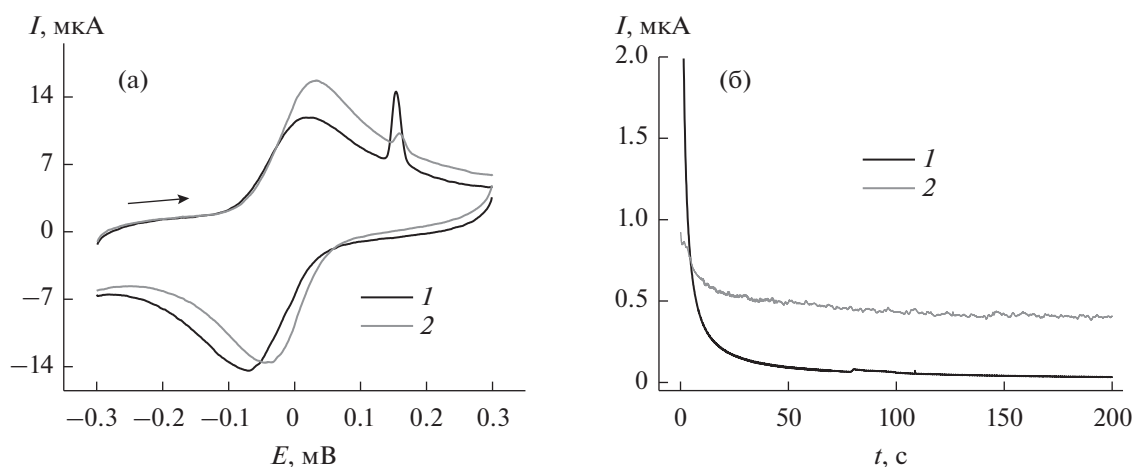


Рис. 5. Циклические вольтамперограммы (а) и хроноамперограммы (б), полученные на стеклоуглеродном электроде, модифицированном углеродной чернью, композитом (пиллар[6]арен–Ag)₂ и ацетилхолинэстеразой (0.005 Е на электрод). Измерения в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, до (1) и после добавления 1.0 мМ ацетилтиохолина (2). Потенциал электрода в хроноамперометрическом режиме 0.3 В.

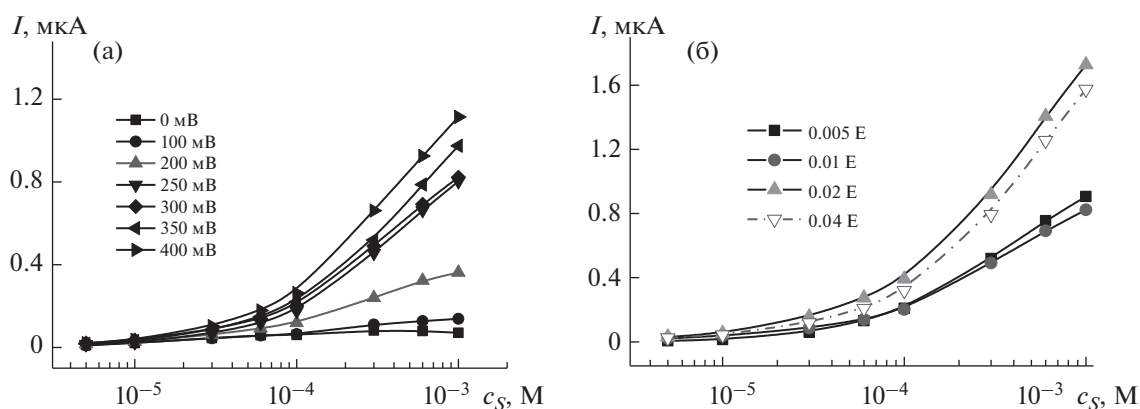


Рис. 6. Зависимость сигнала ацетилхолинэстеразных биосенсоров от концентрации субстрата, полученная при разных потенциалах электрода (а) (0.005 Е АХЭ на электрод) и количестве взятой для иммобилизации ацетилхолинэстеразы (б) (потенциал электрода 0.3 В). Измерения в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl.

поведение наблюдали ранее для сходных модифицирующих материалов, полученных из тиакваликсарена с пирокатехиновыми группами и нитрата серебра [22, 23].

Аналогичные изменения тока наблюдали в хроноамперометрическом режиме (рис. 5б) при поляризации электрода в интервале 50–400 мВ. Поскольку формат биосенсора лучше совместим с хроноамперометрическим режимом измерения сигнала, дальнейшие исследования проводили в указанных условиях. Зависимости стационарного тока, устанавливающегося при 100 с после введения субстрата, от концентрации субстрата и количества фермента, взятого для иммобилизации, приведены на рис. 6. Как видно, сигнал биосенсора закономерно увеличивается с потенциалом электрода, начиная с 200 мВ. Последующие изме-

рения проводили при потенциале 300 мВ, обеспечившим несколько меньший разброс результатов измерения (2.5% относительно 3.5% для 400 мВ в серии из пяти биосенсоров). Что касается влияния количества фермента, устойчивый сигнал зарегистрирован, начиная с 0.005 Е на электрод. Поскольку ингибитор рекомендовано определять при минимальной концентрации фермента [10, 12], в дальнейшем использовали 0.005 Е АХЭ на электрод.

Определение обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы. Введение в рабочий раствор, содержащий субстрат, лекарственных препаратов – обратимых ингибиторов АХЭ приводило к снижению стационарного тока за счет уменьшения скорости гидролиза субстрата и, как следствие, – уменьшения количества тиохолина, реагирующе-

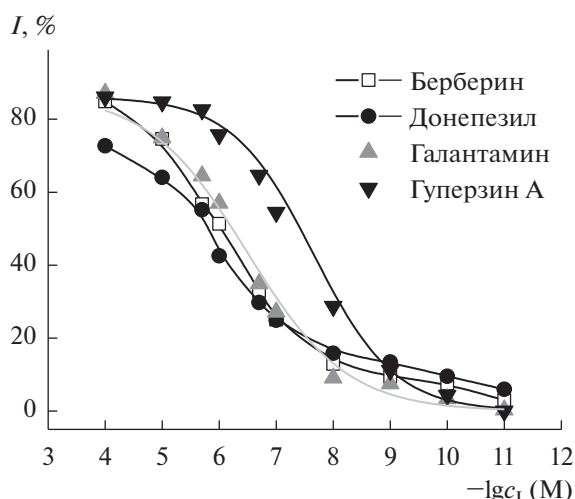


Рис. 7. Градуировочные зависимости для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы с помощью биосенсора на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного углеродной чернью, композитом (пиллар[6]арен-Ag)₂ и ацетилхолинэстеразой (0.005 E на электрод). Измерения в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, тиохолин 1.0 мМ.

го на электроде. Градуировочные зависимости (рис. 7) имели сигмоидную форму, типичную для обратимых ингибиторов. Для ее аппроксимации применяли логистическую аппроксимирующую функцию (2), ранее успешно использованную в аналогичных исследованиях обратимого ингибирования АХЭ [17–19] и распространённую в иммунохимических исследованиях:

$$I\% = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2. \quad (2)$$

Здесь I (%) – степень ингибирования АХЭ, рассчитанная по уравнению (1), исходя из относительного уменьшения тока окисления тиохolina при введении в раствор ингибитора; A_1 и A_2 – верхний и нижний пределы изменения степени ингибирования; x – мера содержания ингибитора (в данном случае $x = -\lg(c_i, \text{M})$); x_0 – точка перегиба графика, формально отвечающая 50%-ному ингибированию фермента (концентрация EC_{50}); p – параметр, определяющий крутизну

средней части графика, т.е. чувствительность определения ингибитора. Значения соответствующих параметров градуировочных зависимостей приведены в табл. 1. Концентрацию ингибитора, отвечающую 15%-ному ингибированию (EC_{15}), выбрали в качестве предела обнаружения. Это связано с тем, что стандартное отклонение при измерении сигнала биосенсора обычно составляет 3–5%, что при соотношении сигнал/шум, равном 3, дает минимальный достоверный результат измерения ингибирования 15% [12, 14, 17–19]. В нашем случае в серии из пяти биосенсоров относительная дисперсия отклика на 0.5 мМ ацетилтиохолин составила 3.5%, в серии из пяти измерений с одним биосенсором – 2.5%, так что использованная оценка оказалась даже более строгой, чем следует из метрологических характеристик разработанного биосенсора.

Чувствительность определения аналитов с помощью разработанного биосенсора сопоставима или лучше характеристик АХЭ-биосенсоров, описанных в литературе. Так, при проточно-инжекционном определении донепезила с ферментом, иммобилизованным на наночастицах золота, значение EC_{50} составило 0.5 мкМ, берберина 6.45 мкМ [24]. Использование в качестве трансдьюсера нитрида углерода с частицами палладия и включение АХЭ в пленку хитозана позволило добиться предела обнаружения гуперзина А 1.3 нМ [25], проведение измерения в микрореакторе с АХЭ, адсорбированной на силикагеле, показало EC_{50} 1.52 мкМ [26]. В той же системе значение EC_{50} галантамина составило 13 мкМ, для фермента, иммобилизованного в полиметилметакрилате, – 0.47 мкМ [27]. Предел обнаружения галантамина при его определении с помощью АХЭ, иммобилизованной на магнитных частицах, составил 1.5 мкМ [28], в колориметрическом сенсоре на основе смартфона в качестве измерительного инструмента и АХЭ, иммобилизованной в хитозане, – 1.3 мкМ [28]. При физической адсорбции фермента в полиэлектролитные комплексы значение EC_{50} берберина составило 0.6 мкМ гуперзина А – 0.05 мкМ [19], галантамина – 0.69 мкМ [18].

Попытки получить сигнал об ингибировании АХЭ с помощью сенсора, содержащего пил-

Таблица 1. Параметры логистической аппроксимационной модели (уравнение (2)) отклика АХЭ биосенсора на обратимые ингибиторы и значения EC_{15} и EC_{50} индивидуальных ингибиторов

Ингибитор	$A_1, \%$	$A_2, \%$	x_0	p	R^2	$EC_{15}, \text{нМ}$	$EC_{50}, \text{мкМ}$
Гуперзин А	86 ± 2	2 ± 1	7.4 ± 0.2	3.0 ± 0.2	0.9920	1.2	0.04
Галантамин	91 ± 2	1 ± 1	6.2 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.9829	12.5	0.63
Донепезил	72 ± 1	6 ± 1	6.0 ± 2	2.9 ± 0.2	0.9945	2.5	1.0
Берберин	84 ± 2	6 ± 1	6.6 ± 2	2.2 ± 0.1	0.9855	10.0	0.25

лар[6]арен без наночастиц серебра, показали значительно меньшую чувствительность определения аналитов. Так, для гуперзина А предел обнаружения составил 10 нМ, галантамина – 50 нМ, донепезила – 12 нМ и берберина – 120 нМ. Возможно, это частично связано с неустойчивостью отклика на макроцикл, который даже в отсутствие фермента имеет тенденцию к уменьшению в серии последовательных измерений из одного раствора. Такое поведение может быть обусловлено хемосорбцией промежуточных продуктов окисления пиллар[6]арена и недостаточной его стабилизацией в частицах углеродной черни. Возможно, аккумуляция тиохolina, обладающего свойствами восстановителя, на наночастицах серебра дополнительно стабилизирует медиатор в составе биосенсора. Для дальнейшего применения пиллар[6]арена в составе АХЭ-биосенсора может понадобиться оптимизация матрицы для включения макроцикла.

Операционные характеристики и анализ реального объекта. Биосенсор показал высокую устойчивость сигнала при хранении в рабочем буферном растворе и в сухом виде. Так, при использовании в течение дня при комнатной температуре сигнал на 0.5 мМ ацетилтиохоллин практически не менялся, в течение двух недель он снижался на 20–25% от исходной величины, но при этом его чувствительность в отношении обратимых ингибиторов не менялась. Реактивация биосенсора после его контакта с ингибитором достигалась путем промывки рабочим буферным раствором. Степень реактивации оценивали по воспроизводимости отклика на субстрат. Каждый биосенсор позволял проводить до 50 циклов измерения ингибирования–реактивации без потери чувствительности сигнала к ингибитору в изученном интервале его концентраций.

При хранении биосенсора в сухом виде при 4°C 50% исходного сигнала сохранялось после трех месяцев хранения. Значение EC_{50} изученных ингибиторов при этом несколько возрастало, поскольку инактивации подвергались в первую очередь молекулы фермента, наиболее доступные для ингибитора. Указанные изменения слабо влияют на возможности использования разработанного биосенсора для определения остаточных количеств лекарственных препаратов в моче. По результатам фармакокинетических исследований, с мочой выделяются в неизменном виде 30–40% принимаемых препаратов [29–31], при этом их концентрация в случае суточного приема 3–5 мг составляет 0.8 мкМ (расчет для донепезила).

Для оценки возможности применения разработанного биосенсора в терапевтической практике при лечении больных нейродегенеративными заболеваниями протестировали искусственную мочу (состав приведен в “Экспериментальной

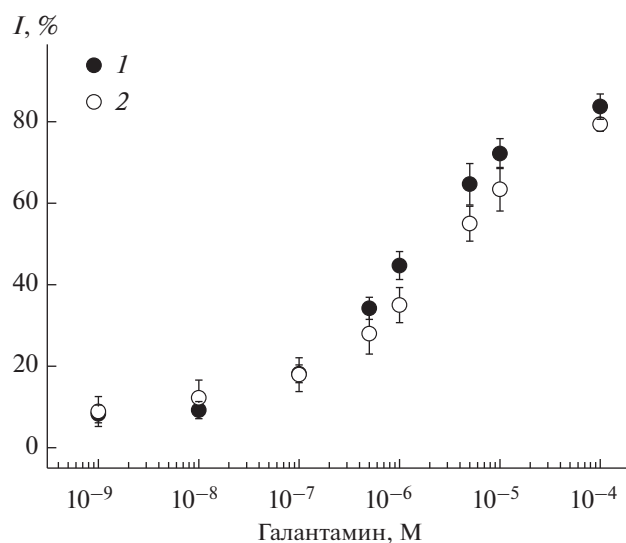


Рис. 8. Градуировочные зависимости для определения галантамина в фосфатном буферном растворе (●) и в искусственном образце урины (○). Измерения при рН 7.8, концентрации ацетилтиохolina 0.5 мМ. Приведены средние значения для трех биосенсоров.

части”), содержащую переменные количества галантамина. Мочу предварительно разбавляли в 10 раз и корректировали рН до 7.8. Как следует из рис. 8, в пределах погрешности измерений установленные значения концентрации не отличались от полученных в стандартных условиях. Степень открытия, рассчитанная по графикам, составляла 92–98%. Следует отметить, что воспроизводимость результатов измерений в моче ниже, чем в фосфатном буферном растворе, и составила в среднем 5%. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения разработанного биосенсора для контроля остаточных количеств изученных лекарственных препаратов в моче пациентов.

Действие обратимых ингибиторов на АХЭ неселективно, регистрируемая степень ингибирования АХЭ не дает информации о природе и числе ингибиторов в анализируемом образце. Однако, учитывая близость полученных характеристик ингибирования, снижение сигнала биосенсора можно рассматривать как оценку общего содержания препаратов антихолинэстеразного действия в образце. Возможно, в перспективе можно повысить селективность определения остаточных количеств лекарственных препаратов, используя мультисенсорный подход с варьированием природы и способа модификации электрода-трансдьюсера, а следовательно, и индивидуальных характеристик определения аналитов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 17-13-01208).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ispas C.R., Crivat G., Andreescu S.* Review: Recent developments in enzyme-based biosensors for biomedical analysis // *Anal. Lett.* 2012. V. 45. P. 168. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.633188>
2. *Nigam K.V., Shukla P.* Enzyme based biosensors for detection of environmental pollutants – A review // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 25. № 11. P. 1773. <https://doi.org/10.4014/jmb.1504.04010>
3. *Yang H.* Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012. V. 16. № 3–4. P. 422. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.03.015>
4. *Wang H.-C., Lee A.-R.* Recent developments in blood glucose sensors // *J. Food Drug Anal.* 2015. V. 23. № 2. P. 191. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.12.001>
5. *Rattu G., Khansili N., Maurya V.K., Krishna P.M.* Lactate detection sensors for food, clinical and biological applications: A review // *Environ. Chem. Lett.* 2021. V. 19. P. 1135. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01106-6>
6. *Budnikov H.C., Evtugyn G.A.* Electrochemical biosensors for inhibitor determination: Selectivity and sensitivity control // *Electroanalysis.* 1996. V. 8. № 8–9. P. 817. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080821>
7. *Bucur B., Purcarea C., Andreescu S., Vasilescu A.* Addressing the selectivity of enzyme biosensors: solutions and perspectives // *Sensors.* 2021. V. 21. № 9. Article 3038. <https://doi.org/10.3390/s21093038>
8. *Kurbanoglu S., Ozkan S.A., Merkoçi A.* Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 89. P. 886. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.102>
9. *Tortolini C., Bollella P., Antiochia R., Favero G., Mazzei F.* Inhibition-based biosensor for atrazine detection // *Sens. Actuators B.* 2016. V. 224. P. 552. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.095>
10. *Amine A., Mohammadi H., Bourais I., Palleschi G.* Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. № 8. P. 1405. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.07.012>
11. *Pundir C.S., Chauhan N.* Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review // *Anal. Biochem.* 2012. V. 429. № 1. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.025>
12. *Arduini F., Amine A., Moscone D., Palleschi G.* Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review) // *Microchim. Acta.* 2010. V. 170. P. 193. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0317-1>
13. *Pohanka M.* Cholinesterases in biorecognition and biosensors construction: A review // *Anal. Lett.* 2013. V. 46. № 12. P. 1849. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.780240>
14. *Pohanka M., Adam V., Kizek R.* An acetylcholinesterase-based chronoamperometric biosensor for fast and reliable assay of nerve agents // *Sensors* 2013. V. 13. № 9. P. 11498. <https://doi.org/10.3390/s130911498>
15. *Pohanka M.* Diagnoses of pathological states based on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase // *Curr. Med. Chem.* 2020. V. 27. № 18. P. 2994. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190130161202>
16. *Caratelli V., Ciampaglia A., Guiducci J., Sancesario G., Moscone D., Arduini F.* Precision medicine in Alzheimer's disease: An origami paper-based electrochemical device for cholinesterase inhibitors // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 165. № 1. Article 112411. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112411>
17. *Ivanov A., Davletshina R., Sharafieva I., Evtugyn G.* Electrochemical biosensor based on polyelectrolyte complexes for the determination of reversible inhibitors of acetylcholinesterase // *Talanta.* 2019. V. 194. P. 723. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.100>
18. *Davletshina R., Ivanov A., Evtugyn G.* Acetylcholinesterase sensor based on polyelectrolyte complexes with DNA inclusion for the determination of reversible inhibitors // *Electroanalysis.* 2020. V. 32. № 2. P. 308. <https://doi.org/10.1002/elan.201900507>
19. *Davletshina R., Ivanov A., Shamagsumova R., Evtugyn V., Evtugyn G.* Electrochemical biosensor based on polyelectrolyte complexes with dendrimer for the determination of reversible inhibitors of acetylcholinesterase // *Anal. Lett.* 2021. V. 54. P. 1709. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1821700>
20. *Ogoshi T., Yamagishi T.* Pillararenes: Versatile synthetic receptors for supramolecular chemistry // *Eur. J. Org. Chem.* 2013. V. 15. P. 2961. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300079>
21. *Cao D., Kou Y., Liang J., Chen Z., Wang L., Meier H.* Eine leichte und effiziente Herstellung von Pillararenen und einem Pillarchinon // *Angew. Chem.* 2009. V. 121. P. 9901. <https://doi.org/10.1002/ange.200904765>
22. *Evtugyn G.A., Shamagsumova R.V., Sidorov R.R., Stoiakov I.I., Antipin I.S., Ageeva M.V., Hianik T.* Dopamine sensor based on a composite of silver nanoparticles implemented in the electroactive matrix of calixarenes // *Electroanalysis.* 2011. V. 23. № 10. P. 2281. <https://doi.org/10.1002/elan.201100197>
23. *Kuzin Yu. Porfireva, A., Stepanova V., Evtugyn V., Stoiakov I., Evtugyn G., Hianik T.* Impedimetric detection of DNA damage with the sensor based on silver nanoparticles and neutral red // *Electroanalysis.* 2015. V. 27. № 12. P. 2800. <https://doi.org/10.1002/elan.201500312>
24. *Vandeput M., Parsajoo C., Vanheuverzwijn J., Patris S., Yardim Y., le Jeune A., Sarakbi A., Mertens A., Kauffmann J.-M.* Flow-through enzyme immobilized amperometric detector for the rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by flow injection analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 102. P. 267. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.012>
25. *Wang B., Ye C., Zhong X., Chai Y., Chen S., Yuan R.* Electrochemical biosensor for organophosphate pesticides and huperzine-A detection based on Pd wormlike nanochains/graphitic carbon nitride nanocomposites and acetylcholinesterase // *Electroanalysis.* 2016. V. 28. P. 304. <https://doi.org/10.1002/elan.201500339>

26. *da Silva J.I., de Moraes M.C., Vieira L.C.C., Corrêa A.G., Cass Q.B., Cardoso C.L.* Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 73. P. 44.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.026>
27. *Kostelnik A., Pohanka M.* Superficially bound acetylcholinesterase based on a chitosan matrix for neurotoxic compound assay by a photographic technique // *Anal. Lett.* 2018. V. 51. P. 1622.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1381846>
28. *Kostelnik A., Kopel P., Cegan A., Pohanka M.* Construction of an acetylcholinesterase sensor based on synthesized paramagnetic nanoparticles, a simple tool for neurotoxic compounds assay // *Sensors.* 2017. V. 17. P. 676.
<https://doi.org/10.3390/s17040676>
29. *Jia J., Zhao Q., Liu Y., Gui Y., Liu G., Zhu D., Yu C., Hong Z.* Phase I study on the pharmacokinetics and tolerance of ZT-1, a prodrug of huperzine A, for the treatment of Alzheimer's disease // *Acta Pharmacol. Sin.* 2013. V. 34. P. 976.
<https://doi.org/10.1038/aps.2013.7>
30. *Lin P.P., Li X.N., Yuan F., Chen W.L., Yang M.J., Xu H.R.* Evaluation of the in vitro and in vivo metabolic pathway and cytochrome P450 inhibition/induction profile of Huperzine A // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 11. P. 248.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.039>
31. *Mannens G.S.J., Snel C.A.W., Hendrickx J., Verhaeghe T., le Jeune L., Bode W., van Beijsterveldt L., Lavrijsen K., Lempoels J., van Osselaer N., van Peer A., Meuldermans W.* The metabolism and excretion of galantamine in rats, dogs, and humans // *Drug Metab. Dispos.* 2002. V. 30. P. 553.
<https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.553>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.51 616.153.922 577.125.54

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ КАРДИОЛИПИДОЛОГИИ

© 2022 г. А. В. Алесенко^{а, *}, М. А. Шупик^а, У. А. Гутнер^а, Д. А. Затейщиков^{б, **},
Л. О. Минушкина^б, А. А. Рогожина^б, А. Т. Лебедев^{с, ***}, О. А. Малошицкая^{а, с},
С. А. Соколов^с, И. Н. Курочкин^{а, с}

^аИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

^бЦентральная государственная медицинская академия УД ПРФ
ул. М. Тимошенко, 19, стр. 1А, Москва, 121359 Россия

^сМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 3, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alicealessenko@gmail.com

**e-mail: zd@bk.ru

***e-mail: mocehops@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.05.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 05.07.2021 г.

Кардиолипидология – новое направление в кардиологии – интенсивно развивается благодаря методу масс-спектрометрии. Особое значение этот метод приобрел для определения молекулярных видов сфинголипидов, метаболизм которых тесно связан с метаболизмом холестерина. Методом хромато-масс-спектрометрии изучены изменения в уровне ряда сфинголипидов, претендующих на роль маркеров сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (молекулярных форм сфингомиелинов, церамидов, глюкозилцерамидов, сфингозина и сфинганина), в плазме крови пациентов с наследственными формами раннего атеросклероза (семейной гиперлипидемии, СГЛ). Исследуемая группа (52 человека) состояла из пациентов с острой манифестацией атеросклероза, с постинфарктным кардиосклерозом, с дислипидемией или ранними ССЗ. У больных с семейной СГЛ отмечалось увеличение доли длинноцепочечного сфингомиелина SM18:1/22:0 и уровня церамидов с углеродной цепью C20-1 и C22-1. У больных с высокой клинической вероятностью СГЛ выявлено повышение уровня сфингозина, обладающего проапоптотическими свойствами, который может рассматриваться в качестве маркера дополнительного риска сердечно-сосудистых осложнений. Поиск новых маркеров ССЗ позволит совершенствовать персонализированный подход к ведению таких больных и улучшить результаты их лечения.

Ключевые слова: хромато-масс-спектрометрия, сфинголипиды, сфингомиелины, церамиды, сфингозин, атеросклероз, семейная гиперлипидемия.

DOI: 10.31857/S0044450222040028

Клиническая липидология – это академическая дисциплина, которая в первую очередь ориентирована на знание патофизиологии, диагностики и клинического лечения липидных и липопротеиновых нарушений при многих патологиях, включая сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). Установлена роль глицерофосфолипидов и сфинголипидов как факторов риска развития ССЗ и сосудистых осложнений при многих других патологиях.

Сердечно-сосудистые заболевания остаются главной причиной смертности в индустриально

развитых странах. В настоящее время, несмотря на внедрение высокотехнологичных методов диагностики и лечения атеросклероза и его осложнений, резко увеличилась инвалидизация и смертность населения в трудоспособном возрасте, определяемые так называемой “ранней” ишемической болезнью сердца (ИБС). Одним из самых значимых факторов риска атеросклероза является гиперхолестеринемия. При гиперхолестеринемии основой скрининга является обычный анализ липидного спектра, включающий определение уровня общего холестерина, холестерина

липопротеидов низкой и высокой плотности, триглицеридов. С другой стороны, во многих ведущих клиниках мира все чаще стали определять сфинголипиды в качестве дополнительных маркеров риска сердечно-сосудистых и многих других заболеваний [1–3]. На сегодняшний день имеются результаты исследований на животных моделях, культуре тканей и у людей [4–6], которые демонстрируют возможность участия сфинголипидов в патогенезе многих ССЗ и других патологиях. Опубликованы работы, демонстрирующие значение сфинголипидов как факторов риска развития сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом и метаболическим синдромом [7], а также при дислипидемии и повышении уровня артериального давления [4, 8, 9].

Сфинголипиды – это группа липидов, в состав которых входит молекула алифатического спирта сфингозина. К ним относятся сфингомиелины, цереброзиды, церамиды, сфингозины и сфингозин-1-фосфат (рис. 1).

Установлено, что катаболизм сфинголипидов связан с катаболизмом холестерина, однако точный механизм этой связи до сих пор неизвестен. Не исключено, что первопричина накопления холестерина в условиях гиперхолестеринемии может быть связана с нарушениями в метаболизме сфингомиелина. В связи с этим более адекватная коррекция уровня холестерина может определяться нормализацией метаболизма сфинголипидов [4].

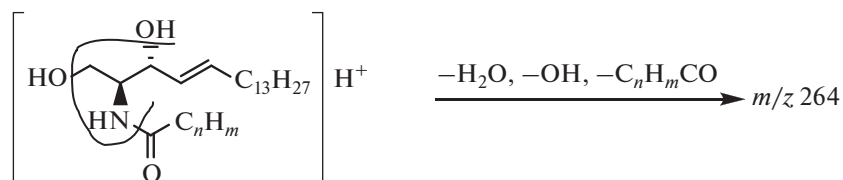
Для функции клетки чрезвычайно важны не только холестерин и сфинголипиды как отдельные представители клеточного и мембранного липидома, но и их комплексы. Они представляют динамический дуэт, который образуется в ответ на воздействия, которым подвергается клетка. Однако они могут выступать и в качестве “недружелюбных” партнеров в случае их дисбаланса в результате различных патологий сердечно-сосудистой системы и мозга [10, 11].

Как правило, в виде комплекса холестерин и сфингомиелин существуют в структурах рафтов – специфических мембранных образований, на которых расположены сигнальные комплексы [11, 12]. Тесное взаимодействие между стерольным кольцом холестерина и церамидной последовательностью сфингомиелина приводит к образованию специфического домена. В этих микродоменах холестерин выполняет стабилизирующую функцию, заполняя пустоты между большим объемом сфинголипидов. Холестерин-сфингомиелиновое взаимодействие определяет переход этих доменов в жидко-упорядоченную или желеобразную фазу, что определяет уникальную характеристику рафтов. Другие же домены клеточной мембраны существуют в более дезорганизованных жидких фазах из-за отсутствия хо-

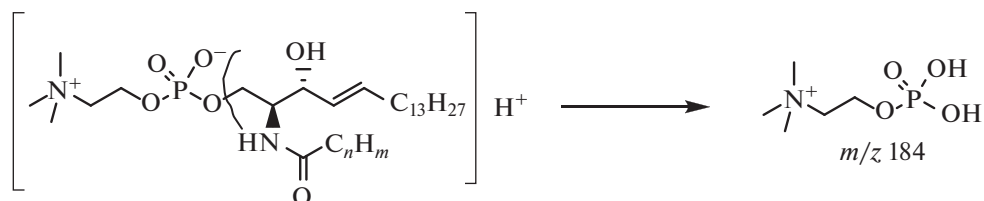
лестерин-сфингомиелинового взаимодействия. Содержание холестерина в мембране четко коррелирует с содержанием сфинголипидов [13]. При снижении уровня сфингомиелина и церамида содержание холестерина также падает. Активация сфингомиелиназы ускоряет этерификацию холестерина без увеличения пула клеточного холестерина [14]. При этом сфингозин, который является продуктом ферментативной деградации церамида, ингибирует этерификацию холестерина [15]. Не исключено, что первопричиной накопления холестерина может быть увеличение уровня сфингомиелина.

Таким образом, тестирование уровня сфинголипидов при атеросклерозе может быть таким же значимым и информативным, как и определение уровня холестерина. Применение лекарственных средств, корректирующих патологические изменения в метаболизме сфинголипидов, могут быть более эффективными, чем, например, терапия с использованием статинов. Исследования роли сфинголипидов в развитии ССЗ непременно дадут возможность обнаружить новые мишени из числа ферментов сфинголипидного метаболизма (сфингомиелиназы и церамидазы) и создать новые лекарственные препараты для предупреждения и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

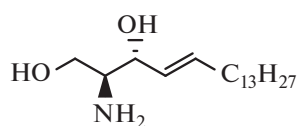
Измерение уровня липидов, в основном общего холестерина, общих триглицеридов, липопротеинов низкой плотности и холестерина липопротеинов высокой плотности, до настоящего времени являлось обычной клинической практикой сердечно-сосудистых заболеваний и гиполипидемической терапии. Более того, детальная оценка липидного состава, т.е. молекулярных видов, которые относятся к классам липидов, практически не используется из-за сложности их диагностики. Однако установлено, что липидом человека включает тысячи единиц молекулярных разновидностей с функциональным разнообразием. Молекулярные виды липидов внутри липидных классов имеет модульную структуру, определяемую большим разнообразием жирных кислот, прикрепленных к общей основной цепи, которая определяет класс липидов. Конъюгированные жирные кислоты могут различаться по длине углеродной цепи, количеству, положению и конфигурации (*цис*- или *транс*-) их двойных связей, а также по положению и типу (ацил-, алкил- или винил-) связи с основной цепью. Учитывая все это разнообразие сфинголипидов, метод анализа должен надежно дифференцировать все липиды в соответствии с типом сфингоидного основания, жирнокислотными остатками и типом гидрофобной головы. Современная масс-спектрометрия (МС) позволяет анализировать все это разнообразие липидома человека [16–18]. Она дает возможность достаточно легко получать информацию об элементном составе липида,



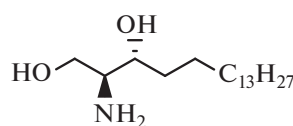
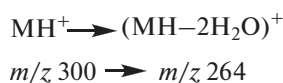
Протонированные церамиды, $m = 2n + 1$ или $m = 2n - 1$ ($n = 15, 17, 19, 21, 23, 25$)



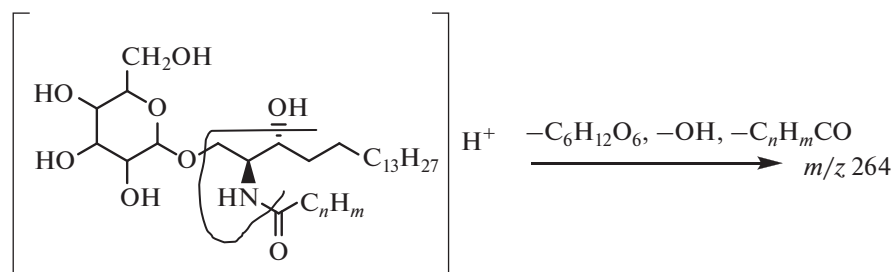
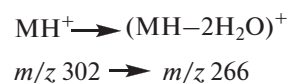
Протонированные сфингомиелины, $m = 2n + 1$ или $m = 2n - 1$ ($n = 15, 17, 19, 21, 23, 25$)



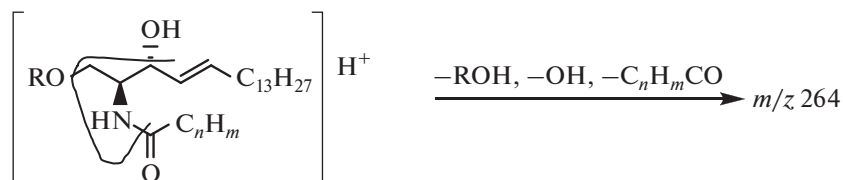
Сфингозин



Сфинганин



Протонированные гексозилцерамиды, $m = 2n + 1$ или $m = 2n - 1$ ($n = 15, 17, 19, 21, 23, 25$)



Протонированные церамиды или гексозилцерамиды ($\text{R} = \text{H}$ или $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6$), $n = 15, 17, 19, 21, 23, 25$.

Рис. 1. Схема фрагментации церамидов, сфингомиелинов, сфингозина, сфинганина и галактозилцерамидов, исследуемых методом масс-спектрометрии. Стрелками обозначены сайты фрагментаций.

природе жирных кислот, наличии двойных связей. Сложнее выявить положение двойных связей и кислотных остатков в молекуле липида, включая даже дифференцирование оптических изомеров у центрального атома глицеринового остатка.

Поскольку полная характеристика молекулы липида требует продвинутых методов тандемной масс-спектрометрии, зачастую полная структурная идентификация не проводится, а анализ ограничивается установлением класса липида, его

молекулярной массы и природы жирнокислотных групп [17].

Наиболее популярными методами ионизации в липидомике являются электрораспыление [19], химическая ионизация при атмосферном давлении [20] и матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) [16, 21]. Интересные результаты о структуре липидов могут быть получены и методами ионизации на открытом воздухе [22, 23]. В качестве масс-анализаторов используют устройства практически любого типа: секторные [24], квадрупольные [25, 26], время-пролетные [27, 28], ионные ловушки [25, 29–31], а также масс-спектрометры ионного циклотронного резонанса [32].

Развитие методов жидкостной хроматографии ультравысокого разрешения в комбинации с масс-спектрометрией дало толчок к изучению самых разнообразных липидных маркеров, в том числе ассоциированных с ранним развитием атеросклероза [1–4]. Фактически методы жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), благодаря своей информативности, селективности, чувствительности, широчайшему динамическому диапазону, являются на сегодняшний день наиболее эффективными для исследования липидов всех типов, включая минорные компоненты [17, 25, 29, 30].

В настоящее время в липидомике существует два основных подхода. Первый основан на предварительном хроматографическом разделении компонентов образца, как правило, методом ЖХ, и вводе элюата в масс-спектрометр в онлайн режиме, а второй – на прямом вводе всей пробы непосредственно в ионный источник (скорострельная липидомика) [17]. Основным достоинством второго подхода является возможность получения сигнала молекулярного иона конкретного липида с постоянной интенсивностью. Это позволяет проводить любые tandemные эксперименты, необходимые для установления структурных особенностей молекулы. Тем не менее следует учитывать, что при вводе сложных смесей в источник ионизации возможна дискриминация отдельных компонентов [17].

Наиболее информативными, безусловно, являются подходы с использованием tandemной масс-спектрометрии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Для установления структуры липидов полезными оказываются все варианты MS/MS, включая спектры ионов-продуктов, ионов-предшественников, выбросов идентичных нейтральных частиц, а также мониторинг выбранных реакций [17]. Структурная близость липидов одного типа позволяет использовать для идентификации и определения методы вычислительной липидомики. В частности, предложен вариант одновременного полуколичественного

определения более 800 фосфолипидов в клеточных экстрактах [33]. На основании интенсивностей пиков биомаркеров в экспериментальных образцах можно сравнивать однотипные образцы, выявлять тонкие различия, свидетельствующие о протекании каких-либо эндогенных или экзогенных процессов, осуществлять надежную диагностику заболеваний.

Для сфинголипидов, участие которых в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний в настоящее время интенсивно изучается, возможно полное установление структуры по масс-спектру как положительных, так и отрицательных ионов. Сфинголипиды достаточно легко ионизируются, а фрагментация ионов дает исчерпывающую информацию об углеводородном составе молекул и о типе гидрофобной части молекулы. Например, все сфинголипиды легко протонируются, а сфингозин-1-фосфаты, сфингомиелины, сульфатиды и ганглиозиды образуют также депротонированные молекулы с удобной регистрацией соответствующих отрицательных ионов. Проведение фрагментации как простых, так и сложных сфинголипидов позволяет узнать тип гидрофильной части молекулы и жирнокислотный состав. Например, сфингомиелины можно легко отличить от других классов липидов по интенсивному пику с m/z 184 в спектрах ДАС (диссоциация, активированная соударениями) их протонированных молекул. Этот пик обусловлен протонированной головной фосфохолиновой группой [17]. На рис. 1 приведена схема фрагментации изученных нами сфинголипидов. Однако, поскольку при фрагментации заряд обычно остается на гидрофильной части молекулы (как, например, в случае сфингомиелинов), для подробного исследования структуры жирных кислот, присоединенных к сфингоидному основанию, необходимо использовать tandemную масс-спектрометрию с регистрацией нескольких поколений фрагментных ионов (метод MSⁿ) [17].

В силу сложности анализируемых молекул и, как следствие, большого количества возможных осколков, образующихся при фрагментации, разработана специальная номенклатура для описания этих осколочных ионов, позволяющая определить состав исходной молекулы по “отпечаткам пальцев” [34, 35].

При исследовании молекул со сфингоидным основанием, а также сфингозин-1-фосфатов методом анализа ионов-предшественников необходимо помнить, что молекулы, содержащие четыре и более двойных связей, образуют более интенсивные ионы-продукты, чем молекулы с меньшим количеством двойных связей. Это означает, что при проведении количественного анализа необходимо использовать стандарты как для молекул без двойных связей, так и для молекул с

двойными связями. Кроме того, насыщенные молекулы (например, сфинганины) образуют в условиях популярных вариантов tandemной масс-спектрометрии ДАС с высокой энергией ионы-продукты с m/z 60, которые являются более специфичными, чем обычные продукты дегидратации. Оптимизация условий ионизации и ДАС для молекул со сфингоидными основаниями приводит к надежным результатам их анализа [17]. Однако определение молекул со сфингоидным основанием методом анализа ионов-предшественников сопряжено с определенными сложностями. Во-первых, ионизация может подавляться в присутствии большого количества других молекул в экстракте. Во-вторых, необходимо учитывать влияние эффективных размеров молекулы (т.е. длины цепи и количества двойных связей) на процесс фрагментации. Ионы с меньшим количеством атомов обладают меньшим количеством степеней свободы, поэтому на каждую из них приходится большая энергия, что может приводить к дополнительной фрагментации. При тех же условиях для больших молекул на каждую степень свободы приходится меньше энергии, поэтому фрагментация проходит менее эффективно, что снижает сигнал от этих ионов. Этот эффект хорошо заметен при исследовании С2-церамидов и природных длинноцепочечных церамидов [36]. Однако в природных церамидах с длиной цепи 16–26 атомов углерода этот эффект выражен меньше.

Для определения сфинголипидов широко используются оба варианта ВЭЖХ-анализа: с обращенной фазой (для отделения сфингозина от сфинганина) и с нормальной фазой (для отделения церамидов от сфингомиелинов). Использование хроматографии не всегда эффективно, поскольку, например, сфингозин и сфинганин можно разделить и в условиях прямого ввода образца. Однако если в биологическом образце содержится большое количество сфингозина, то он затрудняет количественное определение сфинганина и требует предварительного хроматографического разделения. Тем не менее есть работы, в которых сфинголипиды эффективно анализируются методом прямого ввода [34, 37]. Преимуществом такого подхода является значительное уменьшение продолжительности анализа одного образца.

Цель настоящего исследования — изучение особенностей спектра сфинголипидов у больных, имеющих различную клиническую вероятность семейной гиперлипидемии. Для этого изучали полученные методом ЖХ-МС качественные и количественные характеристики сфинголипидов в образцах крови больных с рядом ССЗ, в частности, семейной гиперхолестеринемии (СГЛ). Следует подчеркнуть, что прогностическая значимость церамидов уже оценивалась в зарубежных исследованиях, однако уровень церамидов опре-

делялся у больных с острым коронарным синдромом [2]. В то же время особенности сфинголипида у больных с наследственными дислипидемиями пока не изучены.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Состав пациентов с наследственными формами раннего атеросклероза. Изучали изменения в уровне ряда сфинголипидов, претендующих на роль маркеров ССЗ (молекулярных форм сфингомиелинов, церамидов, гексозилцерамида, сфингозина и сфинганина), в плазме крови пациентов с наследственными формами раннего атеросклероза. Группа включала $n = 52$ человека. Данная группа состояла из пациентов с острой манифестацией атеросклероза, которая завершается инфарктом или инсультом (острый коронарный синдром (ОКС), $n = 6$); с острым нарушением мозгового кровообращения, атеротромботический вариант (ОНМК, $n = 9$); постинфарктного кардиосклероза (ПИКС, $n = 8$), а также из больных с дислипидемией, которая характеризуется либо повышением уровней холестерина и/или триглицеридов, либо снижением уровня холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛВП) в плазме, что способствует развитию атеросклероза ($n = 28$), и одного пациента с периферическим атеросклерозом. Среди перечисленных больных особую группу составляли пациенты с различной клинической вероятностью семейной гиперлипидемии. В эту группу входило 35 больных (15 мужчин (42.9%) и 20 женщин (57.1%)), средний возраст 49.8 ± 9.96 лет) с дислипидемией или ранними сердечно-сосудистыми заболеваниями, развившимися в возрасте до 55 лет у мужчин и до 60 лет у женщин. Клиническую вероятность семейной дислипидемии оценивали по критериям сети Голландских липидных клиник. Десять больных имели низкую вероятность СГЛ (1–2 балла), у 22 больных диагноз расценивался как вероятная СГЛ (3–5 баллов), у трех больных — возможная или определенная СГЛ (два больных 6 баллов и один больной 9 баллов).

Определяли параметры со следующими референсными значениями: общий холестерин (2.0–5.2 ммоль/л), холестерин липопротеинов низкой плотности (ЛНП) (до 3.3 ммоль/л), липопротеинов высокой плотности (0.91–1.56 ммоль/л), триглицеридов сыворотки крови (0.50–1.70 ммоль/л) на биохимическом анализаторе CLIMA MC-15 (RAL, Испания).

Методы определения сфинголипидов. Липиды из плазмы выделяли по методу Блайя–Дайера.

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрическую идентификацию и определение молекулярных видов сфингомиелинов, церамидов и сфингоидных оснований (сфингозина и сфинганина)

проводили на масс-спектрометре TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific, Германия) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). На рис. 1 представлена схема фрагментации сфинголипидов, исследуемых методом МС. Для керамидов фрагментацию исходных протонированных и дегидратированных молекул проводили при энергии 20 эВ с образованием фрагмента с m/z 264.2 Да, время измерения сигнала составляло 30 мс. Для сфингомиелинов при энергии 20 эВ в качестве иона продукта выбрали фрагментный ион с m/z 184.1 Да, время измерения сигнала составляло 30 мс. Для сфингозина фрагментацию протонированных молекул проводили при энергии 12.5 эВ с образованием ионов-продуктов с m/z 252.2 Да, время измерения сигнала составляло 30 мс. Для сфинганина при энергии 12.5 эВ с образованием иона-продукта с m/z 266.2 Да время измерения сигнала составляло 30 мс.

Концентрации сфингомиелинов, керамидов и сфингоидных оснований определяли методом внешнего стандарта. В качестве стандартов использовали сингозин d7, сфинганин, сфингомиелин d18:1/16:0, сфингомиелин d18:1/18:0, керамид d18:1/16:0, керамид d18:1/18:1, керамид d18:1/18:0, керамид d18:1/24:1, керамид d18:1/24:0 фирмы "Avanti" (США). Для определения керамидов использовали площади пиков ММР-переходов $[M + H - H_2O]^+ \rightarrow 264.2$ Да, для сфингомиелинов $[M + H]^+ \rightarrow 184.1$ Да, для сфингозина $300.2 \rightarrow 252.2$ Да, для сфинганина $302.2 \rightarrow 266.2$ Да.

Хроматографическое разделение проводили с использованием системы Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Германия) на колонке Eclipse Plus C8 3.0 × 150 мм (Agilent, США), размер частиц 3,5 мкм. При определении керамидов и сфингомиелинов колонку термостатировали при 35°C, поток – 500 мкл/мин; использовали следующие подвижные фазы: фаза А – 1 мМ раствор формиата аммония в воде + 0.1% (по объему) муравьиной кислоты, фаза Б – 1 мМ раствор формиата аммония в метаноле + 0.1% (по объему) муравьиной кислоты (с 0 до 14 мин градиент фазы Б от 75 до 100%, с 14 по 24 мин 100% фазы Б, с 24 до 26 мин градиент фазы Б от 100 до 75%, с 26 по 30 мин 75% фазы Б). Параметры источника ионизации и квадруполей: температура нагревателя 350°C, температура капилляра 300°C, поток распыляющего газа 50 arb (приборные единицы), поток вспомогательного газа 15 arb, поток обдувочного газа 2 arb, напряжение на капилляре 3.5 кВ, разрешение квадруполей Q1/Q3 1.2/1.2 Да, давление газа в ячейке соударений 2 мТорр.

При определении сфинганина и сфингозина колонку термостатировали при 50°C, поток – 400 мкл/мин; использовали следующие подвижные фазы: фаза А – вода + 0.1% (по объему) мура-

вьинной кислоты, фаза Б – метанол + 0.1% (по объему) муравьиной кислоты (с 0 до 0.7 мин 55% фазы Б, с 0.7 до 6.7 мин градиент фазы Б от 55 до 100%, с 6.7 до 18 мин 100% фазы Б, с 18 до 20 мин градиент фазы Б от 100 до 55%, с 20 по 25 мин 55% фазы Б). Параметры источника ионизации и квадруполей: температура нагревателя 340°C, температура капилляра 300°C, поток распыляющего газа 45 arb, поток вспомогательного газа 13 arb, поток обдувочного газа 2 arb, напряжение на капилляре 3.5 кВ, разрешение квадруполей Q1/Q3 1.2/1.2 Да, давление газа в ячейке соударений 2 мТорр.

На рис. 2 приведены примеры масс-хроматограмм, полученных при определении сфингозина, сфинганина и молекулярных видов сфингомиелинов и керамидов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ SPSS версия 23.0. Количественные переменные представлены в виде $SE \pm SD$. Для всех количественных переменных выполняли проверку на соответствие нормальному распределению с использованием теста Шапиро-Уилкса. Распределение всех количественных переменных отличалось от нормального. Достоверность различий оценивали для двух независимых выборок по критерию Манн-Уитни, для трех и более – по критерию Крускал-Уолли.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение клинических параметров. У всех групп больных измеряли уровни холестерина и триглицеридов, которые в настоящее время рассматриваются в качестве основных маркеров атеросклероза. Наблюдали резкие колебания уровней этих липидов в крови индивидуальных пациентов с различными видами осложнений атеросклероза. Значения холестерина изменяются от 3.5 до ~20 единиц. Эти колебания могут отражаться на содержании отдельных классов сфинголипидов.

Определение молекулярных видов сфингомиелинов. Рис. 3 иллюстрирует различия в содержании молекулярных видов сфингомиелинов при разнообразных осложнениях ранней клинической манифестации атеросклероза, включая дислипидемию, острый коронарный синдром, острое нарушение мозгового кровообращения и периферический атеросклероз. Определили уровни содержания сфингомиелинов с длинами цепей жирных кислот от C16 до C24 с насыщенными и одной двойной связью. Более высокие уровни сфингомиелинов с жирными кислотами C16:0, C18:0 и C20:0 зарегистрированы в плазме пациентов с диагнозами дислипидемия, ОКС и ОНМК. Во всех случаях сердечно-сосудистых патологий отмечено низкое содержание сфингомиелинов C24:0 и C24:1.

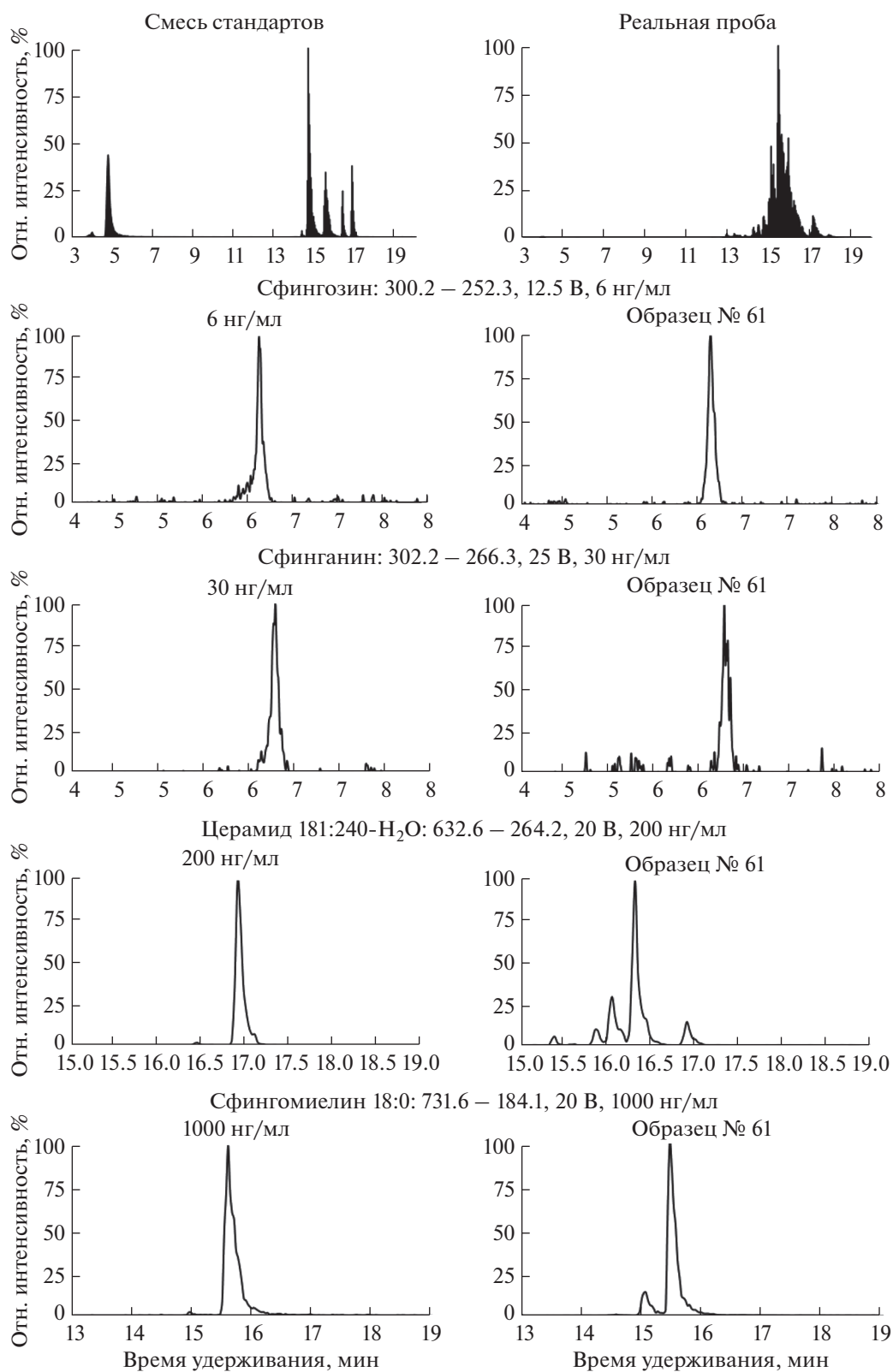


Рис. 2. Масс-хроматограммы сфингозина, сфинганина, сфингомиелина, церамида и соответствующих стандартов.

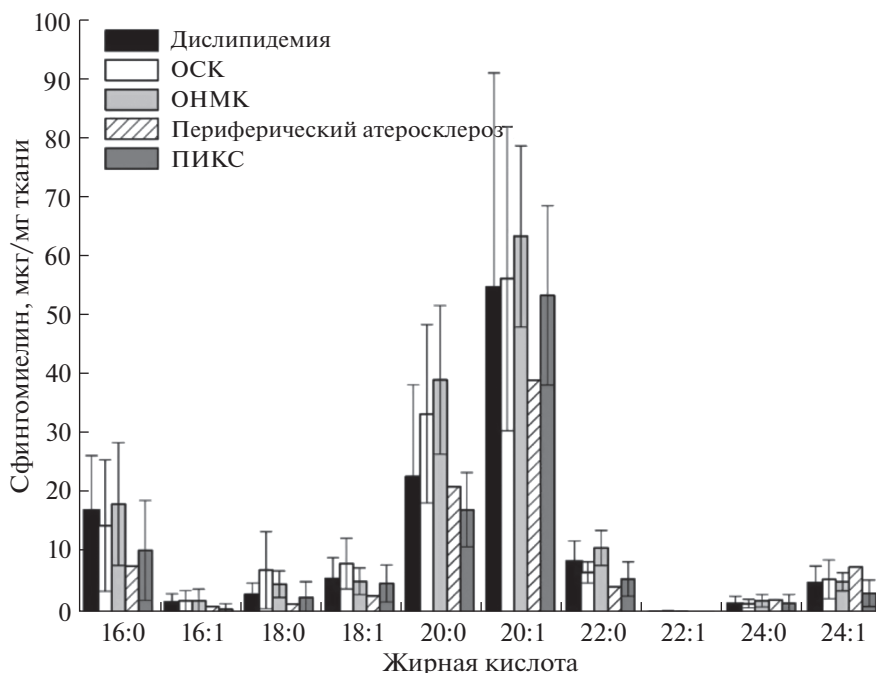


Рис. 3. Различия в уровнях молекулярных видов сфингомиелинов при разнообразных осложнениях ранней клинической манифестации атеросклероза.

Определение молекулярных видов церамидов.

В отличие от сфингомиелинов, длинноцепочечные церамиды (C24:0 и C24:1) в образцах плазмы пациентов присутствуют в значительно большем количестве по сравнению с короткоцепочечными церамидами (рис. 4). Можно предположить, что в случае развития атеросклероза проапоптотические церамиды генерируются именно из молекул сфинголипидов, содержащих длинные углеродные цепи. Известно [15], что окислительный стресс ассоциирован именно с увеличением уровня длинноцепочечных церамидов. Выявлены прямые корреляции уровня холестерина крови и церамидов C24:0 и C24:1. Уровни гексозилцерамидов практически одинаковы для всех типов ССЗ (рис. 5).

Установлено, что содержание общих сфинголипидов и церамидов в окисленных ЛНП существенно выше, что может служить подтверждением роли сфинголипидов в дестабилизации атеросклеротической бляшки и формировании обострения ИБС и других заболеваний [10].

Определение сфингозина и сфинганина. Наблюдаемая динамика сфингозина при разных осложнениях атеросклероза может свидетельствовать о его активном участии в течении этих заболеваний. Больные с отягощенным семейным анамнезом имели более высокий уровень сфингозина, однако уровень сфинганина при этом был очень низким и практически одинаковым при всех типах ССЗ. Вероятно, эти липиды не участвуют в исследуемом патологическом процессе (рис. 6).

Установили связь накопления сфингозина со степенью клинической вероятности семейной гиперлипидемии, т.е. тяжестью заболевания. Как видно из табл. 1, уровень сфингозина у пациентов с отягощенным семейным анамнезом атеросклероза повышен. Участие сфингозина в патогенезе ССЗ установлено нами впервые; повышение его уровня в плазме пациентов с наследственными формами дислипидемии может быть использовано в качестве маркера риска развития ИБС у таких пациентов. Табл. 1 также демонстрирует корреляции между уровнем классических липидов и сфингозина у пациентов с отягощенными и неотягощенными семейными анамнезами. Обращает на себя внимание тот факт, что прямая корреляция между уровнем холестерина ЛНП и сфингозина, выявленная в целом по группе, сильнее проявляется у пациентов с отягощенным семейным анамнезом ($r = 0.536, p = 0.022$). Накопление сфингозина может отражать его способность активировать процессы пероксидного окисления [38] и агрегации Cu^{2+} -пероксидных везикул, ускоряя процессы окисления ЛНП, делая их более атерогенными. Сфинганин также активизирует процессы пероксидного окисления [38]. В нашем исследовании у пациентов с установленной семейной дислипидемией отмечали существенное повышение уровня сфингозина. Уровень сфинганина у пациентов с низкой и высокой вероятностью семейной гиперлипидемии достоверно не отличался. Таким образом, сфингозин может участвовать в патогенезе семейной дисли-

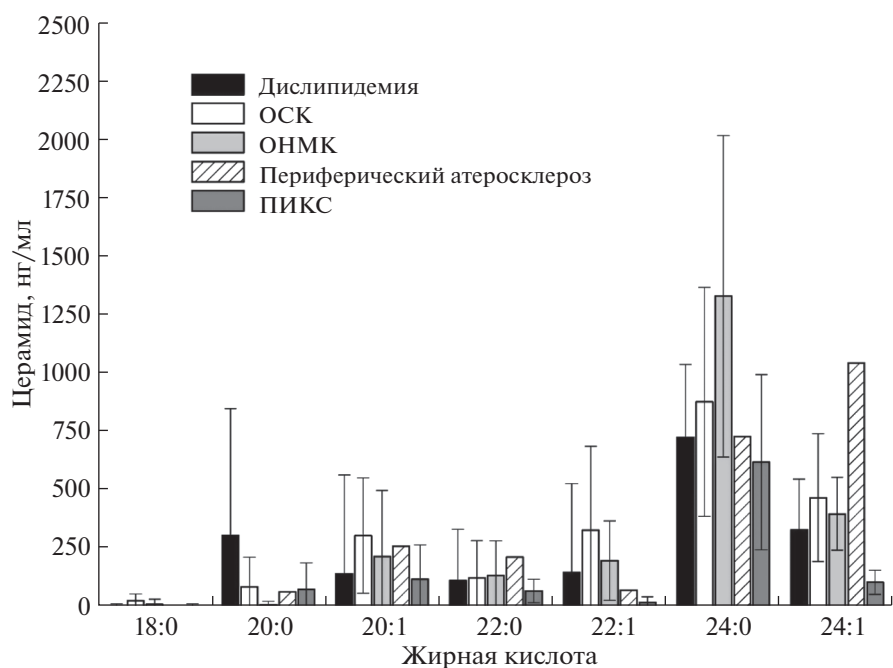


Рис. 4. Различия в уровнях молекулярных видов церамидов при разнообразных осложнениях ранней клинической манифестации атеросклероза.

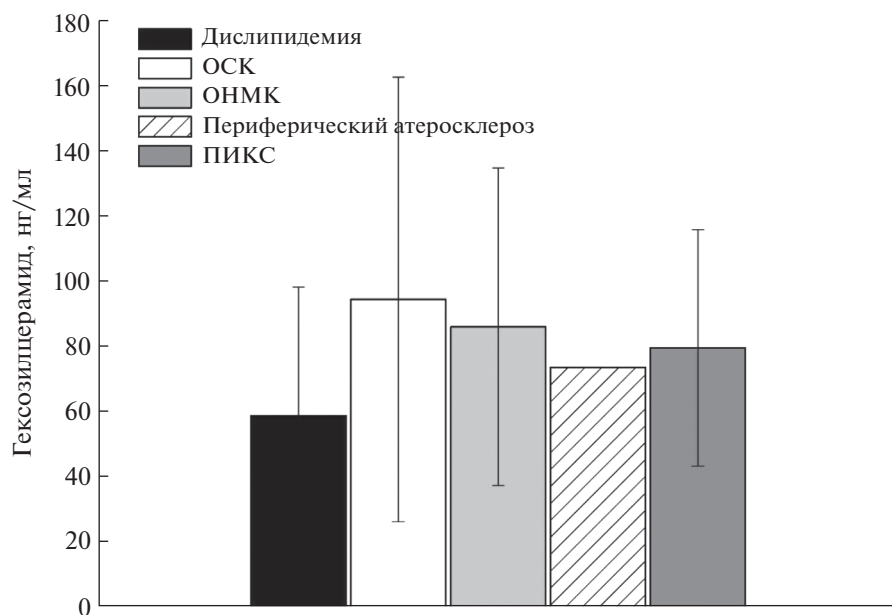


Рис. 5. Различия в уровнях гексозилцерамидов при разнообразных осложнениях ранней клинической манифестации атеросклероза.

пидемии и служить новым маркером сердечно-сосудистых заболеваний.

* * *

В ряде зарубежных клиник уже в течение более десяти лет проводят определение уровня сфинголипидов в плазме крови в качестве маркеров для

ранней диагностики ишемии сердца и гипертонии у людей. Некоторые маркеры из числа сфинголипидов могут быть прогностически более значимыми, чем классические маркеры. Так, сфингозин-1-фосфат оказался более четким маркером периферического атеросклероза, чем уровень холестерина ЛВП. Следует отметить, что интерес к роли липидов в развитии различных патологий,

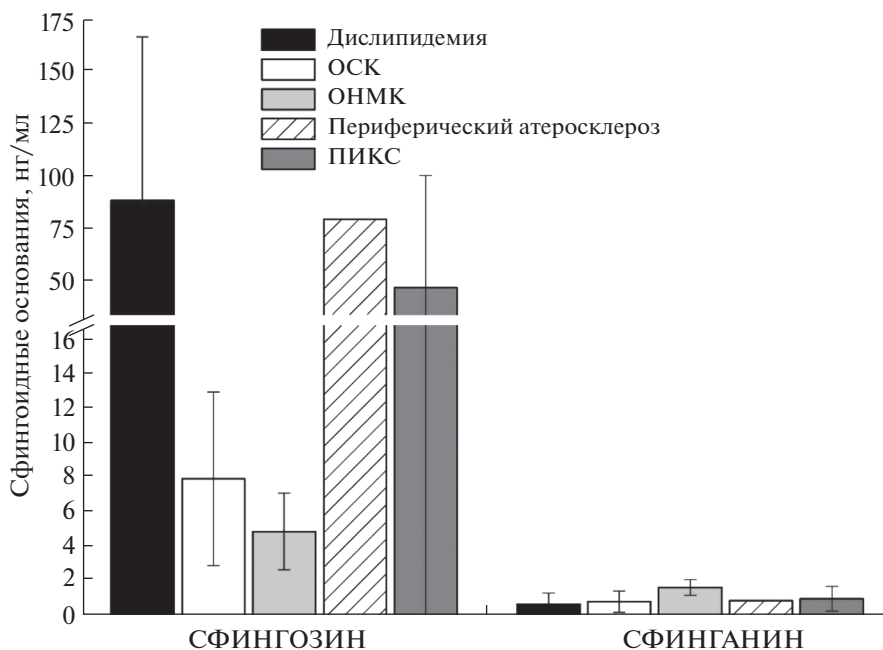


Рис. 6. Различия в уровнях сфингоидных оснований (сфингозина и сфинганина) при разнообразных осложнениях ранней клинической манифестации атеросклероза.

включая сердечно-сосудистые, возрос не только в связи с определяющей ролью липидов в патогенезе этих заболеваний, но и благодаря развитию метода масс-спектрометрии и его успешному применению в липидологии и, в частности, в сфинголипидологии. Применение метода масс-спектрометрии способствовали развитию нового направления в кардиологии – кардиоллипидологии. Проведены пилотные липидомные исследования материала атеросклеротических бляшек человека, а также липидома плазмы крови при ИБС, инфаркте миокарда, гипертонической болезни и т.д. В отечественных клиниках такие исследования пока не ведутся. Мы полагаем, что применение современных методов анализа липи-

дома при ССЗ будет способствовать более успешному лечению этих заболеваний.

В настоящей работе впервые методом ЖХ-МС исследованы новые маркеры семейной гиперхолестеремии из числа сфинголипидов. Определены молекулярные виды сфингомиелинов, церамидов гексозилцерамидов и сфингоидных оснований (сфингозина, сфинганина) в плазме крови пациентов с различными видами ССЗ. Показано, что больные с определенной/вероятной СГЛ имели достоверно более высокий уровень сфингозина по сравнению с больными с низкой клинической вероятностью СГЛ (144.36 ± 107.863 нг/мл и 50.14 ± 62.409 нг/мл, $p = 0.01$). У больных с семейной СГЛ отмечено увеличение доли длинноцепочечного

Таблица 1. Уровень липидов и сфингоидных оснований у пациентов с различной клинической вероятностью семейной гиперлипидемии

Параметр	Низкая вероятность СГХС (n = 10)	Возможная вероятность СГХС (n = 22)	Вероятная/определенная СГХС (n = 3)	p
ОХС, мМ	6.7 ± 0.6	8.0 ± 1.7	12.00 ± 5.3	0.006
ЛНП, мМ	4.3 ± 0.4	5.4 ± 1.0	7.2 ± 1.4	0.001
ЛВП, мМ	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.6	0.713
ТГ, мМ	1.8 ± 1.1	2.4 ± 3.2	5.8 ± 6.1	0.240
Сфингозин, нг/мл	50.1 ± 62.4	83.6 ± 70.8	144.4 ± 107.9	0.051
				0.010
Сфинганин, нг/мл	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.6	1.7 ± 1.4	0.142

Примечание: СГХС – семейная гиперхолестеринемия, ОХС – общий холестерин, ЛНП – липопротеиды низкой плотности, ЛВП – липопротеиды высокой плотности, ТГ – триглицериды.

сфингомиелина SM18:1/22:0, а также выявлено существенное увеличение уровня церамидов с длинной углеродной цепью (C20:1 и C22:1). Установлены значимая прямая корреляция уровня ЛПН и сфингозина ($r = 0.344$, $p = 0.047$) и значимые обратные корреляции уровня ЛВП и сфинганина ($r = -0.52$, $p = 0.002$) и галактозилцерамида ($r = -0.56$, $p = 0.001$). Таким образом, у больных с высокой клинической вероятностью СГЛ повышен уровень сфингозина, обладающего проапоптотическими свойствами, который может рассматриваться в качестве маркера дополнительного риска сердечно-сосудистых осложнений. Уточнение механизмов ускоренного развития атеросклероза, исследование роли наследственных факторов может в этой ситуации позволить совершенствовать персонализированный подход к ведению таких больных и улучшить результаты их лечения. Учитывая отсутствие данных о популяционных частотах известных наследственных нарушений липидного обмена в Российской Федерации, данное исследование позволит предложить новые критерии для выявления ранних признаков семейной гиперхолестеремии, используя в качестве маркеров уровень сфингозина и церамидов. Кроме того, появится возможность обнаружить новые лекарственные мишени из числа белков – участников сфинголипидного метаболизма и создать основу для разработки новых лекарственных средства для предупреждения и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, которые могут быть более эффективными, чем используемые в настоящее время статины.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ 19-04-00870А “Сфинголипидный анализ маркеров сердечно-сосудистых заболеваний”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Choi R.H., Tatum S.M., Symons J.D., Summers S.A., Holland W.L. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease // *Nat. Rev. Cardiol.* 2021. Online ahead of print. Doi 1038/s41569-01-00536-1
2. Алесенко А.В., Лебедев А.Т., Курочкин И.Н. Роль сфинголипидов в сердечно-сосудистых патологиях // *Биомедицинская химия.* 2018. Т. 64. № 6. С. 487. (Alessenko A.V., Lebedev A.T., Kurochkin I.N. The role of sphingolipids in cardiovascular pathologies // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* 2019. V. 13. P. 122. <https://doi.org/10.18097/PBMC20186406487>)
3. Cai F., Ren F., Zhang Y., Ding X., Fu G., Ren D., Yang L., Chen N., Shang Y., Hu Y., Yi L., Zhang H.J. Screening of lipid metabolism biomarkers in patients with coronary heart disease via ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021. V. 1169. P. 122603. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122603>
4. Алесенко А.В., Затеищиков Д.А., Лебедев А.Т., Курочкин И.Н. Участие сфинголипидов в патогенезе атеросклероза // *Кардиология.* 2019. Т. 59. № 8. С. 77. <https://doi.org/10.18087/cardio.2019.8.10270>
5. Zhang D.X., Fryer R.M., Hsu A.K., Zou A.P., Gross G.J., Campbell W.B., Li P.L. Production and metabolism of ceramide in normal and ischemic-reperfused myocardium of rats // *Basic Res. Cardiol.* 2001. V. 96. № 3. P. 267. <https://doi.org/10.1007/s003950170057>
6. Lemaitre P.N., Hoofnagle A., McKnight B., Fretts A., King I.B., Siscovick D., Psaty B. M., Heckbert S.R., Sotoodehnia N. Plasma ceramides and sphingomyelins in relation to heart failure risk // *Circ Heart Fail.* 2019. V. 12. № 7. e005708. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005708>
7. Tong X., Peng H., Liu D., Ji L., Niu C., Ren J., Pan B., Hu J., Zheng L., Huang Y. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin 1-2 release in endothelial cells: relationship with HDL-associated sphingosine-1-phosphate // *Cardiovasc. Diabetol.* 2013. P. 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-27>
8. Spijkers L.J., van den Akker R.F., Janssen B.J., Debets J.J., De Mey J.G., Stroes E.S., van den Born B.J., Wijesinghe D.S., Chalfant C.E., MacAleese L., Eijkel G.B., Heeren R.M., Alewijnse A.E., Peters S.L. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: A potential role for ceramide // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 7. Article e21817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021817>
9. Fenger M., Linneberg A., Jorgensen T., Madsbad S., Sobye K., Eugen-Olsen J., Jeppesen J. Genetics of the ceramide/sphingosine-1-phosphate rheostat in blood pressure regulation and hypertension // *BMC Genetics.* 2011. V. 12. P. 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-44>
10. Gulati S., Liu Y., Munkacsy A.B., Wilcox L., Sturley S.L. Sterols and sphingolipids: Dynamic duo or partners in crime? // *Prog. Lipid Res.* 2010. V. 49. № 4. P. 353. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.03.003>
11. Subbiah P.V., Gesquiere L.R., Wang K. Regulation of the selective uptake of cholesterol esters from high density lipoproteins by sphingomyelin // *J. Lipid Res.* 2005. V. 46. P. 2699. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500263-JLR200>
12. London M.E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): Implication for lipid raft structure and function // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 11. P. 9997–10004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309992200>
13. Slotte J.P., Bierman E.L. Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts // *Biochem J.* 1988. V. 250. № 8. P. 653–658. <https://doi.org/10.1042/bj2500653>
14. Leventhal A.R., Chen W., Tall A.R., Tabas I. Acid sphingomyelinase deficient macrophages have defective cholesterol trafficking and efflux // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 48. P. 44976–44983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106455200>
15. Merrill A. Jr., Sullards M.C. Opinion article on lipidomics: Inherent challenges of lipidomic analysis of sphingolipids // *Biochim. Biophys. Acta: Mol. Cell Bi-*

- ol. *Lipids*. 2017. V. 1862. № 8. P. 774–776.
<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.01.009>
16. Han X., Yang K. Gross R.W. Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses // *Mass Spectrom. Rev.* 2012. V. 31. P. 134–178.
<https://doi.org/10.1002/mas.20342>
 17. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: Техносфера, 2015. С. 702.
 18. Заикин В.Г., Борисов Р.С. Масс-спектрометрия как важнейшая аналитическая основа ряда омиксных наук // *Масс-спектрометрия*. 2021. Т. 18. № 1. С. 4.
 19. Han X., Gross R.W. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples // *Mass Spectrom. Rev.* 2005. V. 24. P. 367.
<https://doi.org/10.1002/mas.20023>
 20. Xu Y., Brenna J.T. Atmospheric pressure covalent adduct chemical ionization tandem mass spectrometry for double bond localization in monoene- and diene-containing triacylglycerols // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 2525.
<https://doi.org/10.1021/ac062055a>
 21. Dreisewerd K., Muthing J., Rohlfing A., Meisen I., Vukelic Z., Peter-Katalinic J., Hillenkamp F., Berkenkamp S. Analysis of gangliosides directly from thin-layer chromatography plates by infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 4098.
<https://doi.org/10.1021/ac048373w>
 22. Porcari A.M., Fernandes G.D., Belaz K.R.A., Schwab N.V., Santos V.G., Alberici R.M., Gromova V.A., Eberlin M.N., Lebedev A.T., Tata A. High throughput MS techniques for caviar lipidomics // *Anal. Methods*. 2014. V. 6. P. 2436.
 23. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. № 7. С. 665. (Lebedev A.T. Ambient ionization mass spectrometry // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. № 7. P. 665.)
 24. Liu X., Wang J., Hu B., Yan P., Jia S., Du Z., Jiang H. Qualitative distribution of endogenous sphingolipids in plasma of human and rodent species by UPLC-Q-Exactive-MS // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021. V. 1173. P. 122684.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122684>
 25. Sullards M.C. Analysis of sphingomyelin, glucosylceramide, ceramide, sphingosine, and sphingosine 1-phosphate by tandem mass spectrometry // *Methods Enzymol.* 2000. V. 312. P. 32.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)12898-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)12898-8)
 26. Shaner R.L., Allegood J.C., Park H., Wang E., Kelly S., Haynes C.A., Sullards M.C., Merrill A.H. Jr. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers // *J. Lipid Res.* 2009. V. 50. № 8. P. 1692.
<https://doi.org/10.1194/jlr.D800051-JLR200>
 27. Kaya I., Sämfors S., Levin M., Borén J., Fletcher J.S. Multimodal MALDI imaging mass spectrometry reveals spatially correlated lipid and protein changes in mouse heart with acute myocardial infarction // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2020. V. 31. P. 2133.
<https://doi.org/10.1021/jasms.0c00245>
 28. Sugiyama E., Hara A., Uemura K., Taketomi T. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with delayed ion extraction to ganglioside analyses // *Glycobiology*. 1997. V. 7. № 5. P. 719.
<https://doi.org/10.1093/glycob/7.5.719>
 29. Chen Y., Ying Liu Y., Sullards M.C., Merrill A.H. Jr. An introduction to sphingolipid metabolism and analysis by new technologies // *Neuromol. Med.* 2010. V. 12. № 4. P. 306.
<https://doi.org/10.1007/s12017-010-8132-8>
 30. Merrill A.H. Jr., Sullards M.C., Allegood J.C., Kelly S., Wang E. Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Methods*. 2005. V. 36. № 2. P. 207.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.01.009>
 31. Houjou T., Yamatani K., Nakanishi H., Imagawa M., Shinuzu T., Taguchi R. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with delayed ion extraction to ganglioside analyses // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004. V. 18. P. 3123.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1737>
 32. O'Connor P.B., Budnik B.A., Ivleva V.B., Kaur P., Moyer S.C., Pittman J.L., Costello C.E. A high pressure matrix-assisted laser desorption ion source for Fourier transform mass spectrometry designed to accommodate large targets with diverse surfaces // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. V. 15. № 1. P. 128.
<https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.10.005>
 33. Forrester J.S., Milne S.B., Ivanova P.T., Brown H.A. Computational lipidomics: A multiplexed analysis of dynamic changes in membrane lipid composition during signal transduction // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 65. P. 813.
<https://doi.org/10.1124/mol.65.4.813>
 34. Han X., Yang J., Cheng H., Ye H., Gross R.W. Toward fingerprinting cellular lipidomes directly from biological samples by two-dimensional electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 2004. V. 330. № 2. P. 317.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.004>
 35. Domon B., Costello C.E. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass // *Biochemistry*. 1998. V. 27. № 5. P. 1534.
<https://doi.org/10.1021/bi00405a021>
 36. Yoo H.H., Son J., Kim D.H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of ceramides and related lipid species in cellular extracts // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006. V. 843. № 2. P. 327.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.06.025>
 37. Han X., Gross R.W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics // *J. Lipid Res.* 2003. V. 44. № 6. P. 1071.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>
 38. Jiménez-Rojo N., Viguera A.R., Collado M.I., Sims K.H., Constance C., Hill K.S., Shaw W.A., Goñi F.M., Alonso A. Sphingosine induces the aggregation of imine containing peroxidized vesicles // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1838. № 8. P. 2071.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.04.028>

УДК 543.9

ПЛАНШЕТНЫЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ микроРНК-141, ОСНОВАННЫЙ НА ПРИМЕНЕНИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СБОРКИ ШПИЛЕК И КОНЬЮГАТА СТРЕПТАВИДИНА И ПОЛИПЕРОКСИДАЗЫ

© 2022 г. О. Л. Бодулев^а, И. Ю. Сахаров^{а, *}^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sakharovivan@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2021 г.

После доработки 11.10.2021 г.

Принята к публикации 12.10.2021 г.

В настоящее время микроРНК привлекают повышенное внимание исследователей как перспективные маркеры различных заболеваний человека. В данной работе представлен гетерогенный хемилюминесцентный метод количественного определения онкомаркера микроРНК-141, основанный на бесферментной амплификационной реакции, получившей название каталитическая сборка шпилек (КСШ). Для дополнительного повышения чувствительности метода применена детектирующая система с двойной амплификацией сигнала, включающая применение конъюгата стрептавидина с полипероксидазой хрена и реакции усиленной хемилюминесценции. Благодаря применению стратегии тройной амплификации метод характеризуется высокой чувствительностью и низким пределом обнаружения. Найдено, что данный метод определения микроРНК-141 за счет применения КСШ характеризуется высокой специфичностью. Указанные особенности метода позволяют надеяться на его успешное применение в клинической диагностике.

Ключевые слова: микроРНК, изотермическая амплификация нуклеиновых кислот, метод каталитической сборки шпилек.

DOI: 10.31857/S0044450222040053

МикроРНК – это эндогенные короткие (17–25 нуклеотидов) РНК-олигонуклеотиды, осуществляющие регуляцию экспрессии генов животных и растений [1]. Большой интерес вызывают также вирусные микроРНК [2, 3]. Исследования последних лет показали, что при широком спектре заболеваний регистрируются изменения концентрации микроРНК в тканях, клетках и биологических жидкостях (кровь, моча, слюна и т.д.) [4–6]. При исследовании различных онкологических патологий экспериментально продемонстрирована вариативность уровня ряда микроРНК у больных [7–9]. Модифицированный профиль экспрессии микроРНК отмечен также у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями [10, 11] и болезнями нервной системы [12]. Хотя такого рода исследования только “набирают свои обороты”, уже сейчас очевидна значимость определения микроРНК при ранней диагностике заболеваний человека.

Подводя итог, можно отметить особую актуальность исследований по разработке новых методов определения микроРНК. Такие методы ос-

новываются на реакции гибридизации нуклеиновых кислот и могут быть подразделены на гомогенные и гетерогенные. Хотя гомогенные методы занимают меньше времени и проще в исполнении, гетерогенные методы характеризуются более высокими чувствительностью и специфичностью и в связи с этим применяются чаще. Различные материалы, такие как наночастицы металлов, магнитные частицы, углеродные нанотрубки, стекла с различными покрытиями и микропланшеты используются в качестве твердых носителей в гетерогенных методах определения микроРНК [13–16].

Следует заметить, что концентрация микроРНК в биологических объектах крайне низкая (в фемто-пикомолярном концентрационном диапазоне) [17, 18], и их определение в клинических образцах является нетривиальной задачей. Первые попытки конструирования методов определения микроРНК без применения их амплификации привели к тому, что такие методы оказались низкочувствительными [19–21]. Введение в схему анализа амплифицирующего(их) этапа(ов)

позволило резко повысить чувствительность определения микроРНК. В первую очередь здесь необходимо отметить полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), широко используемую для копирования последовательности РНК. Метод ОТ-ПЦР считается “золотым стандартом” среди методов определения микроРНК, в связи с чем часто используется для подтверждения данных, полученных другими методами [16]. Однако этот метод не идеален и не лишен ряда недостатков, связанных, в первую очередь, с необходимостью варьировать температуру при проведении анализа, что требует использования дорогостоящего оборудования. Дополнительным недостатком этого метода является синтез довольно большого числа неспецифических продуктов, осложняющий интерпретацию результатов определения [22, 23]. Кроме того, при копировании микроРНК в ОТ-ПЦР из-за небольшой длины последовательностей микроРНК требуется проведение дополнительных стадий для ее увеличения, что усложняет определение [14, 15]. Указанные недостатки метода ОТ-ПЦР требуют поиска альтернативных способов амплификации микроРНК.

В настоящее время активно развиваются изотермические методы амплификации [16, 24, 25]. Известно, что в некоторых изотермических методах амплификации используются ферменты, а в других не применяются. Получение ложноотрицательных и ложноположительных результатов при определении микроРНК многие авторы связывают с применением ферментов. Более того, изотермические методы амплификации, не требующие ферментов, обычно дешевле и проще в исполнении.

Наиболее известным бесферментным методом изотермической амплификации является метод каталитической сборки шпилек (КСШ) [26]. Высокая эффективность, простота и экономичность данного метода – неоспоримые его преимущества. Описано определение олигонуклеотидных анализов, основанное на амплификационном КСШ, с различными методами детектирования [27–30].

Выше отмечено, что одним из главных требований к методам определения микроРНК является низкий предел обнаружения. Именно на этой задаче фокусируется внимание большинства исследователей. Известно, что различие в уровнях экспрессии микроРНК в норме и при патологии часто невелико [31], что еще раз подтверждает справедливость требования к высокой чувствительности методов определения микроРНК.

В настоящей работе описан чувствительный и специфичный метод определения микроРНК-141 (маркер нескольких типов онкологических заболеваний [32]), основанный на реакции КСШ, ис-

пользуемой для амплификации микроРНК. Для повышения чувствительности детектирующая система метода включала реакцию усиленной хемилюминесценции и применение конъюгата стрептавидина, ковалентно связанного с полипероксидазой хрена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Люминол х. ч. (чистота 97%), 4-морфолинопиридин х.ч. (чистота 97%), Твин 20 ос. ч., казеин х. ч. и трис-НCl ос. ч. (чистота >99.9%) (Sigma-Aldrich Chemical Co., США); пероксид водорода ос.ч. (H₂O₂, 30%) (Химмед, Россия). Антитела против флуоресцеина (Флу) приобретали в “Биалекса” (Россия). 3-(10'-Фенотиазинил)пропионовую кислоту синтезировали как описано в работе [33]. Концентрацию H₂O₂ определяли спектрофотометрическим методом ($\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Требуемые разведения H₂O₂ проводили в день использования. Применяли конъюгат стрептавидина с полипероксидазой хрена (SA-PolyHRP80) (SDT GmbH, Германия); 96-луночные черные полистирольные микропланшеты (с высокой сорбционной способностью) (Corning, США). Все микроРНК и ДНК-олигонуклеотиды синтезированы в ООО “Синтол” (Россия).

Иммобилизация антител против флуоресцеина на поверхности планшета. В лунки планшета вносили по 50 мкл раствора антител против флуоресцеина (6 мкг/мл), растворенных в 50 мМ карбонатном буферном растворе с pH 9.5, и инкубировали в течение ночи при 4°C. После трехкратной промывки планшета с помощью 10 мМ трис-НCl с 300 мМ NaCl, pH 7.2 (ТБС), поверхность лунок обрабатывали 100 мкл раствора казеина (1 мг/мл в ТБС) в течение 1 ч при 37°C. Далее лунки планшета промывали трижды ТБС с 0.05% Твин 20 (ТБСТ), высушивали на воздухе и хранили в холодильнике при 4°C.

Определение микроРНК-141. Перед использованием растворы зондов Ш1 и Ш2 с концентрацией 100 нМ в ТБС нагревали до 88°C в течение 15 мин, после чего охлаждали при комнатной температуре в течение 1 ч как описано ранее [34]. Затем 50 мкл 30 нМ зонда Ш1 в ТБС вносили в лунки планшета с иммобилизованными антителами против флуоресцеина. После инкубации в течение 1 ч при 37°C, лунки планшета промывали ТБСТ, после чего в лунки вносили по 50 мкл раствора микроРНК-141 (0–100 пМ) и зонда Ш2 (1–5 нМ) в ТБС, содержащем 0–600 мМ NaCl. Инкубацию проводили в течение 30–120 мин при 25°C. После отмывки планшета ТБСТ в лунки вносили по 50 мкл раствора конъюгата стрептавидина с полипероксидазой хрена (разведение 1 : 200000) в ТБС с 1 мг/мл казеина. Данную реак-

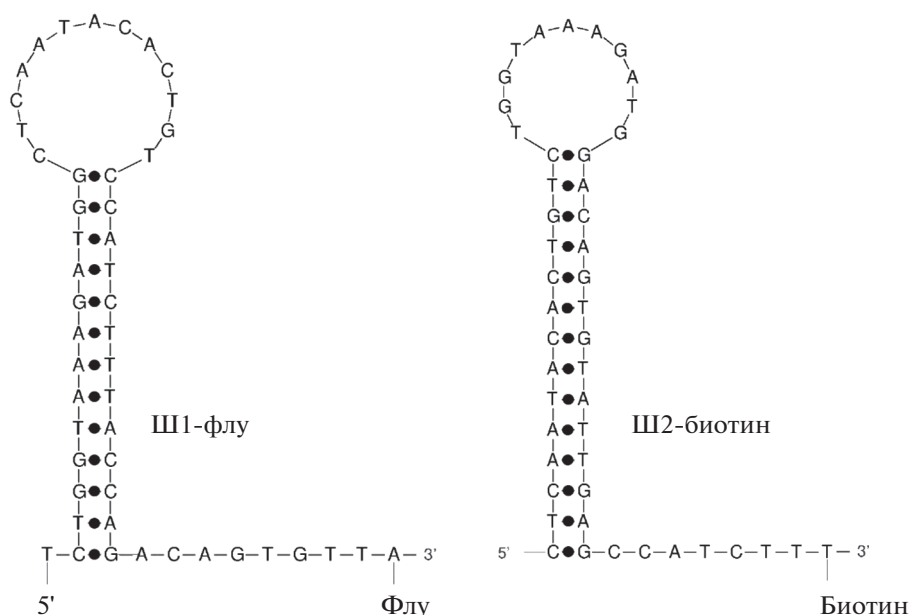


Рис. 1. Вторичная структура шпильчатых олигонуклеотидов Ш1-Флу и Ш2-биотин, используемых в каталитической сборке шпильки. Точками обозначены контакты комплементарных нуклеотидов. Изображение структур получено на сервере UNAFold.

цию проводили в течение 1 ч при 37°C. После отмывки планшета ТБСТ в лунки вносили по 100 мкл свежеприготовленного субстратного раствора пероксидазы (80 мМ трис-НСl, рН 8.3, 0.17 мМ люминол, 8.75 мМ 4-морфолинопиридина, 2.1 мМ 3-(10'-фенотиазинил)пропионовая кислота и 1.75 мМ H₂O₂ [35]). Интенсивность хемилюминесценции регистрировали при комнатной температуре с помощью микропланшетного люминометра SpectraMax L (Molecular Devices, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн метода определения микроРНК-141. Для проведения гетерогенного определения микроРНК-141 зонд Ш1 иммобилизовали на поверхности полистирольного планшета. Для этого зонд Ш1, модифицированный с 3'-конца флуоресцеином, взаимодействовал с антителами против флуоресцеина, предварительно сорбированными в лунках планшета. К иммобилизованному Ш1 в лунки планшета добавляли микроРНК-141 и зонд Ш2, модифицированный с 3'-конца биотином. Химические структуры используемых шпильки (Ш1-Флу и Ш2-биотин, рис. 1) смоделированы согласно теории реакции КСШ [26, 36]. В процессе протекания данной реакции происходила амплификация аналитического сигнала, напрямую зависящего от концентрации микроРНК-141 в реакционной среде. На первом этапе амплификационного цикла молекула аналита за счет ком-

плементарного взаимодействия реагировала с зондом Ш1 (рис. 2). При этом происходил переход Ш1 из закрытой в открытую конформацию с одновременным освобождением последовательности, ранее формировавшей стержень шпильки. Освобожденная последовательность способна гибридизоваться с зондом Ш2-биотин, в результате чего происходило вытеснение аналита из дуплекса. Высвобождение молекулы аналита позволяет ей запустить следующий аналогичный цикл амплификации. В конечном счете одна молекула микроРНК приводила к появлению на поверхности лунки большего числа дуплексов Ш1–Ш2. Следует подчеркнуть, что в отсутствие микроРНК-141 шпильки не должны взаимодействовать друг с другом.

Так как сформированные дуплексы содержали в своей структуре биотин, для оценки их концентрации использовали систему двух последовательных реакций, а именно: (1) реакцию с конъюгатом стрептавидина и полипероксидазы и (2) реакцию усиленной хемилюминесценции с использованием фенотиазиновых усилителей. Следует отметить, что данная стратегия детектирования биотинилированных олигонуклеотидов была нами разработана ранее и показала себя как чрезвычайно чувствительная [37, 38], что является необходимым условием при разработке методов определения микроРНК, находящихся в биологических образцах в следовых количествах [17, 18].

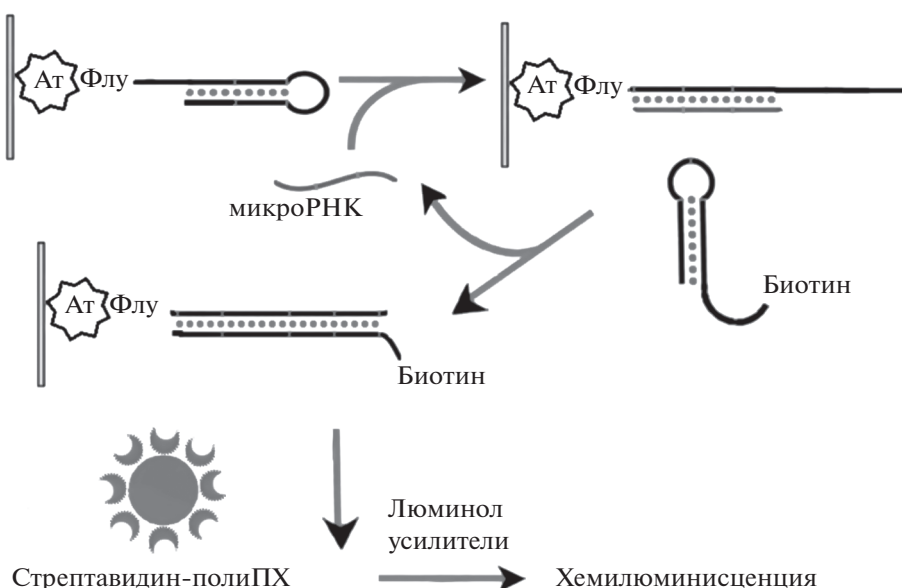


Рис. 2. Схема хемилюминесцентного метода определения микроРНК-141, основанного на амплификационном методе каталитической сборки шпильки. Ат – антитела к флуоресцеину, Флу – флуоресцеин, полиПХ – полипероксидаза хрена.

Оптимизация условий детектирования микроРНК-141. Ранее показано [39], что для получения максимального сигнала иммобилизацию Ш1-Флу на планшете следует проводить при концентрации зонда, равной 30 нМ. При данной фиксированной концентрации зонда Ш1 варьировали концентрацию зонда Ш2 в реакционном растворе. С изменением концентрации зонда Ш2 в интервале 1–5 нМ получили набор градуировочных кривых для определения микроРНК-141. При этом найдено, что при увеличении концентрации зонда Ш2 зависимость интенсивности регистрируемой хемилюминесценции имеет выраженный оптимум, который наблюдался при проведении КСШ с использованием 3 нМ зонда Ш2 (рис. 3). Также отмечено, что повышение концентрации зонда Ш2 приводит к резкому понижению величины предела обнаружения, рассчитанной по методу 3σ . Таким образом, в дальнейших исследованиях концентрация зонда Ш2 составила 3 нМ.

Известно, что конформация олигонуклеотидов и эффективность их взаимодействия сильно зависят от солевого состава среды. В связи с этим изучили влияние концентрации NaCl на величины аналитических параметров разрабатываемого метода анализа. Так, при проведении реакции амплификации в 10 мМ трис-НСl с pH 7.2 значение сигнала во всем использованном диапазоне концентрации аналита практически не превышает значение фона, т.е. в отсутствие NaCl реакция КСШ с использованием зондов Ш1 и Ш2 не протекает. По мере увеличения концентрации NaCl

наблюдали повышение величины регистрируемого сигнала, который достигал максимального значения при концентрации NaCl 300 мМ (рис. 4). В то же время кривая зависимости предела обнаружения микроРНК-141 от концентрации NaCl имеет экстремум, при этом его значение минимально при использовании 10 мМ буферного раствора трис-НСl с pH 7.2, содержащего 300 мМ NaCl (рис. 4).

Таким образом, оптимизация условий определения микроРНК-141 показала, что гетерогенную амплификационную реакцию КСШ следует проводить в 10 мМ трис-НСl с pH 7.2, содержащем 300 мМ NaCl, при этом концентрация зонда Ш2 в реакционном растворе должна составлять 3 нМ.

Аналитические параметры метода. Градуировочная зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации микроРНК-141 в оптимизированных условиях представляет собой кривую (рис. 5), которая описывается уравнением $f = y_0 + a(1 - e^{-bx})$, где $y_0 = 2.4 \times 10^5$, $a = 2.4 \times 10^7$ и $b = 4.3 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0.9943$). Следует отметить, что градуировочные кривые подобного характера описаны ранее для ряда аналитических методов, основанных на применении КСШ [40, 41]. Предел обнаружения и диапазон определяемых содержаний для разработанного метода составили 300 фМ и 1 пМ–100 пМ соответственно. Данные значения близки к значениям аналогичных параметров метода определения микроРНК-141 с применением каталитической сборки шпильки с некомплементарным противостоянием нуклеоти-

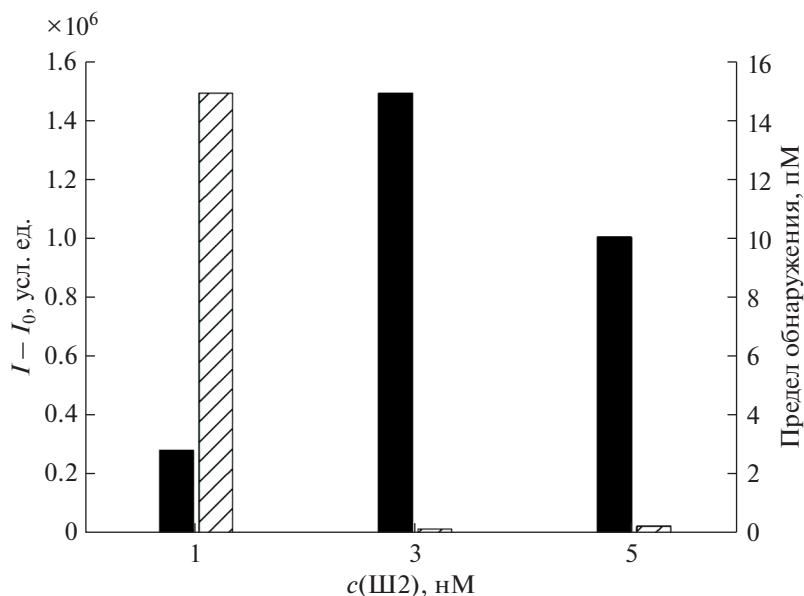


Рис. 3. Эффект концентрации зонда Ш2 в реакционном растворе на величину хемилумinesцентного сигнала ($I - I_0$) (черные столбцы) и предел обнаружения (штрихованные столбцы) амплифицированного метода определения микроРНК-141. Реакцию каталитической сборки шпилек проводили в 10 мМ трис-НСl с рН 7.2, содержащем 300 мМ NaCl при 25°C в течение 1 ч. Величину хемилумinesцентного сигнала ($I - I_0$) рассчитывали как разницу между зарегистрированными сигналами в присутствии (10 пМ микроРНК-141) и в отсутствие аналита.

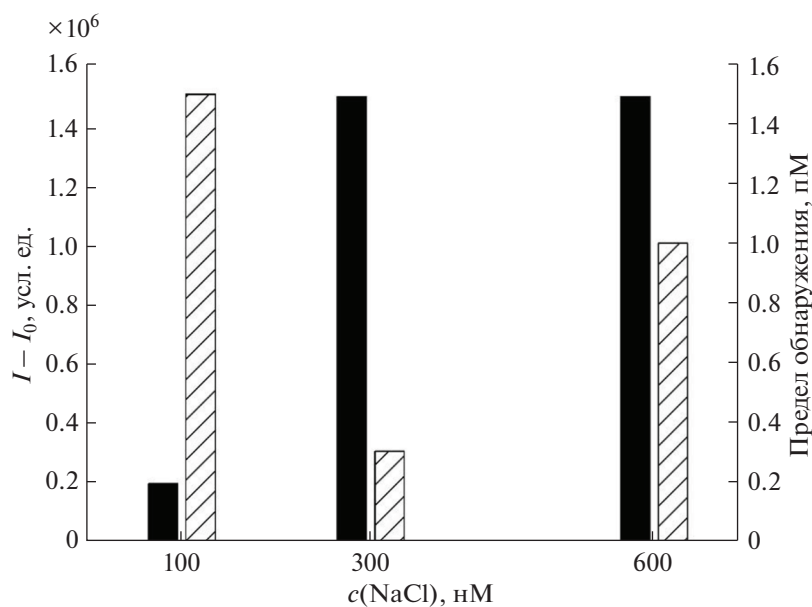


Рис. 4. Эффект концентрации NaCl в реакционном растворе на величину хемилумinesцентного сигнала ($I - I_0$) (черные столбцы) и предел обнаружения (штрихованные столбцы) амплифицированного метода определения микроРНК-141. Реакцию каталитической сборки шпилек проводили в 10 мМ трис-НСl с рН 7.2, содержащем 300 мМ NaCl при 25°C в течение 1 ч; [Ш2] = 3 нМ. Величину хемилумinesцентного сигнала ($I - I_0$) рассчитывали как разницу между зарегистрированными сигналами в присутствии (10 пМ микроРНК-141) и в отсутствие аналита.

дов (Mismatched Catalytic Hairpin Assembly) в качестве амплифицирующей реакции [34].

Анализ полученной кривой показал, что при изменении концентрации микроРНК-141 в пределах рабочего диапазона величина интенсивно-

сти хемилумinesценции возрастает в 5–6 раз. В то же время для многих подобных амплификационных методов определения микроРНК [31, 41–44] аналогичный или даже менее выраженный рост аналитического сигнала наблюдается

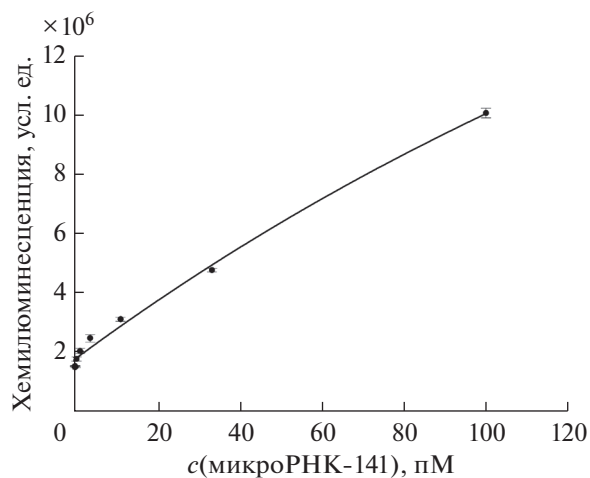


Рис. 5. Градуировочная кривая определения микроРНК-141 планшетным хемилюминесцентным методом, основанным на амплификационной реакции каталитической сборки шпилек ($n = 6$). Реакцию КСШ проводили в 10 мМ трис-НСl с рН 7.2, содержащем 300 мМ NaCl при 25°C в течение 1 ч; [Ш2] = 3 нМ.

при варьировании концентрации аналита на 6–7 порядков. Это указывает на высокую чувствительность разработанного нами метода.

Разработанный метод определения микроРНК-141 характеризуется также высокой вос-

производимостью результатов. Как видно из рис. 6, в пределах диапазона определяемых содержаний значение относительного стандартного отклонения аналитического сигнала (s_r^y) не превышает 5% и снижается с повышением концентрации аналита. Используя значения s_r^y и коэффициент чувствительности метода S (тангенс угла наклона касательной к градуировочной кривой), рассчитали значения относительного стандартного отклонения результатов определения концентрации аналита (s_r^x) [43]. Значения s_r^x , так же как и значения s_r^y , с увеличением концентрации микроРНК-141 понижаются (рис. 6).

Отметим, что высокая воспроизводимость результатов определения аналита предложенным методом напрямую связана с его высокой чувствительностью. Так, значения s_r^x , рассчитанные по ранее опубликованным данным определения микроРНК методом с низкой чувствительностью (с рабочим диапазоном, охватывающим 6–7 порядков величины концентрации аналита) [44, 45], достигали 400% при концентрации аналита 10 пМ. При той же концентрации микроРНК-141 значение s_r^x для предложенного нами метода оказалось в восемь раз ниже.

Специфичность метода. Известно, что последовательности различных микроРНК обладают вы-

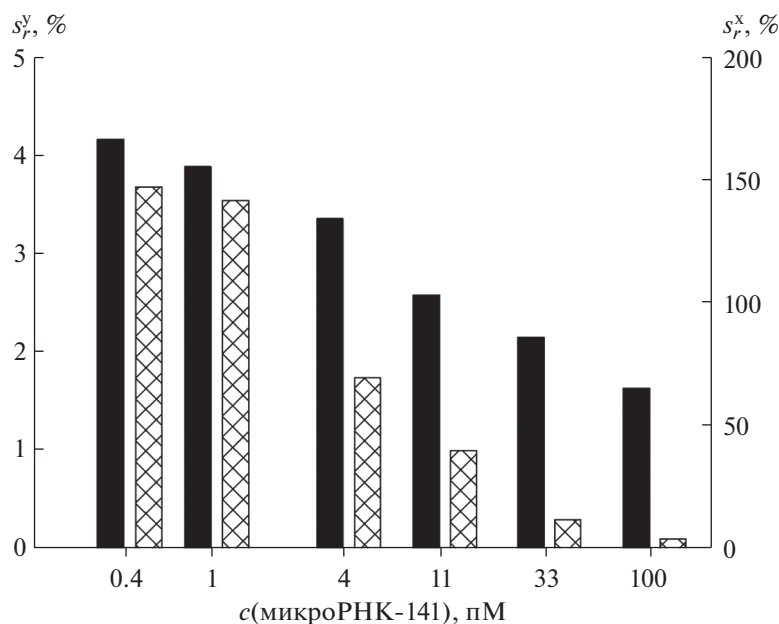


Рис. 6. Зависимости значений относительного стандартного отклонения сигнала (s_r^y , черные столбцы) и относительного стандартного отклонения результатов определения концентрации микроРНК-141 (s_r^x , заштрихованные столбцы), характеризующие основанный на применении каталитической сборки шпилек и конъюгата стрептавидина и полипероксидазы хемилюминесцентный метод, от концентрации аналита.

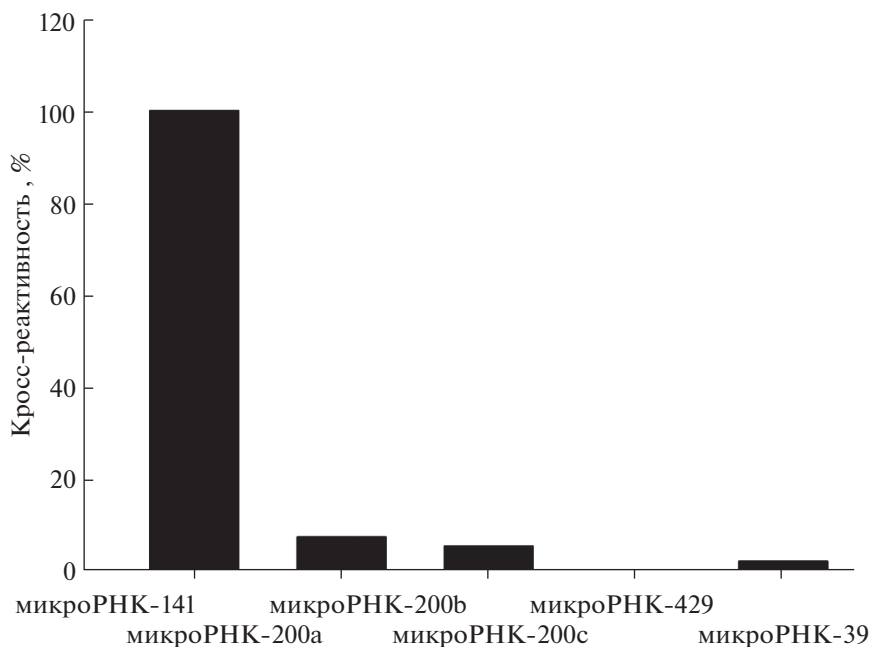


Рис. 7. Специфичность хемилюминесцентного метода определения микроРНК-141, основанного на амплификационной реакции каталитической сборки шпилек. Концентрация исследуемых микроРНК составляла 100 пМ.

сокой степенью гомологии [46], поэтому разрабатываемые методы анализа данных аналитов должны быть высокоспецифичными. Для оценки специфичности разработанного нами метода использовали четыре микроРНК семейства микроРНК-200, обладающих наиболее высокой гомологией с последовательностью микроРНК-141, а именно микроРНК-200а, микроРНК-200b, микроРНК-200с и микроРНК-429 [47]. Как видно из рис. 7, кросс-реактивность разработанного метода для микроРНК-200а и микроРНК-200b составила лишь 7 и 5% соответственно. Для микроРНК-200с и микроРНК-429 кросс-реактивность еще ниже (менее 3%). Полученные результаты позволяют охарактеризовать предлагаемый метод как высокоспецифичный. По-видимому, высокая специфичность метода заложена в применении КСШ, т. к. и другие методы с КСШ характеризуются высокой специфичностью [24].

* * *

Таким образом, представлен высокочувствительный гетерогенный метод определения микроРНК-141. Высокая чувствительность метода обусловлена использованием стратегии тройной амплификации сигнала, основанной на применении конъюгата стрептавидина с полипероксидазой и реакции усиленной хемилюминесценции в сочетании с амплификационным методом КСШ. Высокая чувствительность предложенного метода в совокупности с высокой специфичностью позволяют предположить, что он будет востребо-

ван для определения микроРНК в клинической диагностике. Использование в данном методе коммерчески доступных стандартизированных микропланшетов делает его высокопроизводительным, а применение биоанализаторов для иммуноферментного анализа позволяет его легко автоматизировать.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 21-54-53007 и научно-исследовательской программы “Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды” (грант АААА-А21-121011290089-4).

В качестве объектов исследования в работе не использовали людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J., Chen J., Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics // J. Cell. Physiol. 2016. V. 231. № 1. P. 25.
2. Loureiro D., Tout I., Narguet S., Benazzouz S.M., Mansouri A., Asselah T. miRNAs as potential biomarkers for viral hepatitis B and C // Viruses. 2020. V. 12. № 12. P. 1440.
3. Barbu M.G., Condrat C.E., Thompson D.C., Bugnar O.L., Cretoiu D., Toader O.D., Suciu N., Voinea, S.C. MicroRNA involvement in signaling pathways during viral infection // Front. Cell Development Biol. 2020. V. 8. P. 143.

4. *Abdallah R., Taly V., Zhao S., Pietrasz D., Bachet J.-B., Basile D., Mas L., Zaanan A., Laurent-Puig P., Taieb J.* Plasma circulating tumor DNA in pancreatic adenocarcinoma for screening, diagnosis, prognosis, treatment and follow-up: A systematic review // *Cancer Treatment Rev.* 2020. V. 87. P. 102028.
5. *Guo Q., Yu Y., Zhang H., Cai C., Shen Q.* Electrochemical sensing of exosomal microRNA based on hybridization chain reaction signal amplification with reduced false-positive signals // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 7. P. 5302.
6. *Li X., Zhao J., Xu R., Pan L., Liu Y.-M.* Mass spectrometric quantification of microRNAs in biological samples based on multistage signal amplification // *Analyst.* 2020. V. 145. № 5. P. 1783.
7. *Зборовская И.Б., Комельков А.В.* МикроРНК-155-5p в патогенезе онкологических заболеваний // *Успехи мол. онкологии.* 2017. Т. 4. № 3. С. 27. (*Zborovskaya I.B., Kome'kov A.V.* MicroRNA-155-5p in pathogenesis of cancer // *Adv. Pathol. Oncology.* 2017. V. 4. № 3. P. 27.)
8. *Leong S.M., Tan K.M.-L., Chua H.W., Huang M.-C., Cheong W.C., Li M.-H., Tucker S., Koay E. S.-C.* Paper-based microRNA expression profiling from plasma and circulating tumor cells // *Clin. Chem.* 2017. V. 63. № 3. P. 731.
9. *Torrente-Rodríguez R.M., Montiel V.R.-V., Campuzano S., Farchado-Dinia M., Barderas R., San Segundo-Acosta P., Montoy, J.J., Pingarron J.M.* Fast electrochemical miRNAs determination in cancer cells and tumor tissues with antibody-functionalized magnetic microcarriers // *ACS Sensors.* 2016. V. 1. № 7. P. 896.
10. *Corsten M.F., Dennert R., Jochems S., Kuznetsova T., Devaux Y., Hofstra L., Wagner D.R., Staessen J.A., Heymans S., Schroen B.* Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010. V. 3. № 6. P. 499.
11. *Жиров И.В., Баулина Н.М., Насонова С.Н., Осьмак Г.Ж., Матвеева Н.А., Миндзаев Д.Р., Фаворова О.О., Терещенко С.Н.* Полнотранскриптомный анализ экспрессии микроРНК в мононуклеарных клетках у пациентов с острой декомпенсацией хронической сердечной недостаточности различной этиологии // *Терапевтический архив.* 2019. Т. 91. № 9. С. 62. (*Zhirov I.V., Baulina N.M., Nasonova S.N., Osmak G.Zh., Matveyeva N.A., Mindzaev D.R., Favorova O.O., Tereshchenko S.N.* Full-transcriptome analysis of miRNA expression in mononuclear cells in patients with acute decompensation of chronic heart failure of various etiologies // *Therapeutic Archive.* 2019. V. 91. № 9. P. 62.)
12. *Wen M.M.* Getting miRNA therapeutics into the target cells for neurodegenerative diseases: A mini-review // *Front. Mol. Neurosci.* 2016. V. 9. P. 129.
13. *Kilic T., Erdem A., Ozsoz M., Carrara S.* microRNA biosensors: opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 99. P. 525.
14. *Gilboa T., Garden P.M., Cohen L.* Single-molecule analysis of nucleic acid biomarkers – A review // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1115. P. 61.
15. *Pritchard C.C., Cheng H.H., Tewari M.* MicroRNA profiling: Approaches and considerations // *Nature.* 2012. V. 13. № 5. P. 358.
16. *Deng R., Zhang K., Li J.* Isothermal amplification for microRNA detection: From the test tube to the cell // *Acc. Chem. Res.* 2017. V. 50. № 4. P. 1059.
17. *Iguchi T., Niino N., Tamai S., Sakurai K., Mori K.* Absolute quantification of plasma MicroRNA levels in cynomolgus monkeys, using quantitative real-time reverse transcription PCR // *J. Vis. Exp.* 2018. V. 132. e56850.
18. *Yuan R., Yu X., Zhang Y., Xu L., Cheng W., Tub Z., Ding S.* Target-triggered DNA nanoassembly on quantum dots and DNAzyme-modulated double quenching for ultrasensitive microRNA biosensing // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 92. P. 342.
19. *Wu T., Xu T., Chen Y., Yang Y., Xu L.-P., Zhang X., Wang S.* Renewable superwetttable biochip for miRNA detection // *Sens. Actuators B: Chem.* 2018. V. 258. P. 715.
20. *Tian T., Wang J., Zhou X.* A review: MicroRNA detection methods // *Org. Biomol. Chem.* 2015. V. 13. № 8. P. 2226.
21. *Bodulev O.L., Sakharov I.Yu.* Chemiluminescent determination of microRNA-141 using target-dependent activation of the peroxidase-mimicking DNAzyme // *Anal. Lett.* 2019. V. 52. № 5. P. 813.
22. *Hu B., Wang Y., Sun S., Luo G., Zhang S., Zhang J., Chen L., Huang Z.* Specificity enhancement of deoxyribonucleic acid polymerization for sensitive nucleic acid detection // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 24. P. 15872.
23. *Зырина Н.В., Антипова В.Н.* Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации // *Биохимия.* 2021. Т. 86. № 7. P. 1066. (*Zyrina N.V., Antipova V.N.* Nonspecific synthesis in the reactions of isothermal nucleic acid amplification // *Biochemistry (Moscow).* 2021. V. 86. № 7. P. 887.)
24. *Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю.* Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе // *Биохимия.* 2020. Т. 85. № 2. С. 174. (*Bodulev O.L., Sakharov I.Yu.* Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis // *Biochemistry (Moscow).* 2020. V. 85. № 2. P. 147.)
25. *Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C.* Isothermal amplification of nucleic acids // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 22. P. 12491.
26. *Liu J., Zhang Y., Xie H., Zhao L., Zheng L., Ye H.* Applications of catalytic hairpin assembly reaction in biosensing // *Small.* 2019. V. 15. № 42. P. 1902989.
27. *Jiang Z., Wang H., Zhang X., Liu C., Li Z.* An enzyme-free signal amplification strategy for sensitive detection of microRNA via catalyzed hairpin assembly // *Anal. Methods.* 2014. V. 6. № 23. P. 9477.
28. *Zhang H., Wang K., Bu S., Li Z., Ju C., Wan J.* Colorimetric detection of microRNA based on DNAzyme and nuclease-assisted catalytic hairpin assembly signal amplification // *Mol. Cell. Probes.* 2018. V. 38. P. 13.
29. *Hun X., Meng Y., Wang S., Zhang H., Luo X.* Mismatched catalytic hairpin assembly coupling hydroxyl-

- amine-O-sulfonic acid as oxide for DNA assay // *Sens. Actuators B: Chem.* 2018. V. 254. P. 347.
30. Zhou Q., Tang D. Catalytic hairpin assembly-mediated surface charge density on the electrode for sensitive potentiometric detection of microRNA-21 in IgA-nephropathy // *Biochem. Eng. J.* 2018. V. 140. P. 9.
31. Trinh M. P., Carballo J. G., Adkins G. B., Guo K., Zhong W. Physical and chemical template-blocking strategies in the exponential amplification reaction of circulating microRNAs // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. № 11. P. 2399.
32. Gao Y., Feng B., Han S., Zhang K., Chen J., Li C., Chen L. The roles of MicroRNA-141 in human cancers: From diagnosis to treatment // *Cell. Physiol. Biochem.* 2016. V. 38. № 2. P. 427.
33. Han F., Zhao J. Colorimetric fluoride-anion sensor based on intramolecular hydrogen bonding and enol-keto tautomerization of a phenothiazine derivative // *Helv. Chim. Acta* 2008. V. 91. № 4. P. 635.
34. Bodulev O.L., Zhao S., Sakharov I.Yu. Improving the sensitivity of the miRNA assay coupled with the mismatched catalytic hairpin assembly reaction by optimization of hairpin annealing conditions // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 17. P. 6824.
35. Sakharov I.Yu., Demiyanova A.S., Gribas A.V., Uskova N.A., Efremov E.E., Vdovenko M.M. 3-(10'-Phenothiazinyl) propionic acid is a potent primary enhancer of peroxidase-induced chemiluminescence and its application in sensitive ELISA of methylglyoxal-modified low density lipoprotein // *Talanta.* 2013. V. 115. P. 414.
36. Yin P., Choi H.M., Calvert C.R., Pierce N.A. Programming biomolecular self-assembly pathways // *Nature.* 2008. V. 451. № 7176. P. 318.
37. Bodulev O.L., Burkin K.M., Efremov E.E., Sakharov I.Yu. One-pot microplate-based chemiluminescent assay coupled with catalytic hairpin assembly amplification for DNA detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. № 21. P. 5105.
38. Solovjev A.M., Kurzeev S.A., Sakharov I.Yu. Chemiluminescent microplate-based assay of DNA based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction (ICSDPR) // *Talanta.* 2020. V. 215. Article 120895.
39. Kolosova A.Yu., Sakharov I.Yu. Triple amplification strategy for the improved efficiency of a microplate-based assay for the chemiluminescent detection of DNA // *Anal. Lett.* 2019. V. 52. № 8. P. 1352.
40. Ji D., Mou X., Kwok C.K. Label-free and ratiometric detection of microRNA based on target-induced catalytic hairpin assembly and two fluorescent dyes // *Anal. Methods.* 2019. V. 11. № 37. P. 4808.
41. Wang L.-J., Ren M., Wang H.-X., Qiu J.-G., Jiang B.H., Zhang C.-Y. Construction of a quencher-free cascade amplification system for highly specific and sensitive detection of serum circulating miRNAs // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 12. P. 8546.
42. Jiang L., Yang Y., Lin Y., Chen Z., Xing C., Lu C., Yang H., Zhang S. An electrochemical sensor based on enzyme-free recycling amplification for sensitive and specific detection of miRNAs from cancer cells // *Analyst.* 2020. V. 145. № 9. P. 3353.
43. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. С. 268. (Doerffel K. Statistics in Analytical Chemistry. M.: Mir, 1994. P. 268.)
44. Zhao L.-L., Pan H.-Y., Zhang X.-X., Zhou Y.-L. Ultrasensitive detection of microRNA based on a homogeneous label-free electrochemical platform using G-triplex/methylene blue as a signal generator // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1116. P. 62.
45. Meng T., Zhao D., Ye H., Feng Y., Wang H., Zhang Y. Construction of an ultrasensitive electrochemical sensing platform for microRNA-21 based on interface impedance spectroscopy // *J. Coll. Interface Sci.* 2020. V. 578. P. 164.
46. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miR-Base: from microRNA sequences to function // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D155.
47. Lao T.D., Truong P.K., Le T.A.H. miRNA-141 as the biomarker for human cancers // *Asian J. Pharm. Res. Health Care.* 2018. V. 10. P. 42.

УДК 543.5:543.9

ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ИММУНОСЕНСОР НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА

© 2022 г. Е. В. Бизина^а, О. В. Фарафонова^{а, *}, Н. И. Золотарева^б,
С. С. Гражулене^б, Т. Н. Ермолаева^а

^аЛипецкий государственный технический университет
ул. Московская, 30, Липецк, 398055 Россия

^бИнститут проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов Российской академии наук
ул. Академика Осипьяна, 6, Черногловка, 142432 Россия

*e-mail: farafonova.ov@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2021 г.

После доработки 02.07.2021 г.

Принята к публикации 06.07.2021 г.

Разработан пьезоэлектрический иммуносенсор с распознающим слоем на основе магнитных углеродных наноконструкций для определения ципрофлоксацина. Рецепторное покрытие сенсора сформировано за счет воздействия магнитного поля на магнитные частицы, расположенные на поверхности углеродных нанотрубок, модифицированных конъюгатом ципрофлоксацина. Методом сканирующей электронной микроскопии установлены размеры магнитных частиц, входящих в состав наноконструкта. Показана зависимость массы распознающего покрытия от размера магнитных частиц на поверхности углеродных нанотрубок. Предложена ячейка детектирования с сенсором, расположенным над неодимовым магнитом. Установлены аналитические характеристики иммуносенсора, предел обнаружения ципрофлоксацина составляет 2 нг/мл, линейный диапазон определяемых содержаний — 5–400 нг/мл. Применение магнитных углеродных наноконструкций при создании распознающего слоя позволяет сократить время подготовки сенсора к анализу с 24 до 1.5 ч и продлить срок его службы. Сенсор апробирован для определения антибиотика в молоке и мясе.

Ключевые слова: пьезоэлектрический иммуносенсор, ципрофлоксацин, магнитный углеродный наноконструкт, углеродные нанотрубки, магнитные наночастицы.

DOI: 10.31857/S0044450222040041

Пьезоэлектрические иммуносенсоры положительно зарекомендовали себя в анализе пищевых продуктов, объектов окружающей среды, биологических сред. Практически без предварительной пробоподготовки удается осуществлять экспрессное определение остаточных количеств лекарственных препаратов, пестицидов, природных токсинов в различных пробах [1–3]. Аналитическим сигналом гравиметрического пьезоэлектрического сенсора служит уменьшение частоты его колебаний, вызванное увеличением массы распознающего слоя вследствие образования иммунохимического комплекса на поверхности электрода [4, 5]. Низкомолекулярные соединения, как правило, определяют в конкурентном формате иммуноанализа, основанном на предварительном введении в пробу фиксированного количества антител, образующих в растворе с аналитом гомогенный иммунокомплекс. Аналитический сигнал регистрируют при контакте пробы, содержащей не-

связавшиеся антитела, с иммобилизованным на поверхности сенсора белковым конъюгатом аналита, сопровождающимся образованием гетерогенного иммунокомплекса.

Чувствительность гравиметрического пьезоэлектрического иммуносенсора определяется концентрацией и пространственной доступностью распознающих молекул на поверхности его электрода. В последнее время при разработке сенсоров применяют различные наноматериалы, в частности, одностенные и многостенные углеродные нанотрубки (УНТ), способствующие увеличению удельной поверхности распознающего слоя без существенного увеличения его массы [6–8]. Более того, сенсоры на основе УНТ могут быть функционализированы путем сопряжения нескольких компонентов, что не только потенциально усилит процессы распознавания и передачи сигнала, но и существенно

сократит стадию формирования распознающего слоя [9, 10].

Обычно для получения распознающего покрытия пьезоэлектрического сенсора используют многослойные способы [11, 12], способствующие образованию устойчивых связей между металлическим электродом и слоями модификаторов, что является залогом многократного применения рецепторного слоя в анализе. Однако процесс формирования распознающего покрытия пьезоэлектрического сенсора остается продолжительным, и часто происходит его разрушение вследствие разрыва связей с поверхностью металлического электрода.

Значительная часть современных исследований по созданию биосенсоров – электрохимических [13, 14] или оптических [15, 16] – посвящена применению магнитных наночастиц (МНЧ). Описано применение в электрохимических иммуносенсорах магнитных наночастиц, скомбинированных с углеродными нанотрубками. Такие наноконкомпозиты уже зарекомендовали себя в качестве эффективных сорбентов для извлечения и концентрирования аналитов [17, 18]. Применение магнитных углеродных наноконкомпозитов (МУНК) открывает новые возможности в биосенсорике, позволяет существенно упростить процедуру подготовки сенсора к анализу [19]. Применение МНЧ в пьезоэлектрических иммуносенсорах пока ограничено [20, 21]. Тем не менее, комбинирование углеродных материалов с высокой площадью поверхности, механической прочностью, сверхнизкой массой, химической и термической стабильностью со свойствами магнитных наночастиц с пьезоэлектрическими сенсорами обещает существенное увеличение чувствительности определения аналитов. Кроме этого, появляется возможность создания распознающего слоя сенсора под действием магнитного поля, что может существенно сократить продолжительность его формирования и обеспечить прочную связь с поверхностью электрода сенсора. Важной стадией разработки пьезоэлектрических сенсоров является выбор способа синтеза магнитных углеродных наноконкомпозитов, влияющего на размер МНЧ и, следовательно, на массу рецепторного слоя, которая может лимитировать диапазон определяемых содержаний и даже приводить к срыву аналитического сигнала.

Цель настоящего исследования – разработка пьезоэлектрического иммуносенсора на базе магнитных углеродных наноконкомпозитов для экспрессного определения в продуктах питания остаточных концентраций ципрофлоксацина – противомикробного препарата, широко применяющегося в ветеринарии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Использовали следующие иммунореагенты: ципрофлоксацин (Цип), левофлоксацин (Sigma-Aldrich, США), энорофлоксацин (AlpoVet Ltd., Кипр), тетрациклина гидрохлорид, канамицина сульфат (Алмабион, Россия), пенициллин G (Биохимик, Россия), бычий сывороточный альбумин (БСА) (ПанЭко, Россия). Поликлональные антитела к ципрофлоксацину синтезированы по описанной ранее методике [22] и получены от профессора С.А. Еремина (МГУ им. М.В. Ломоносова).

В ходе исследования применяли следующие реагенты: 30%-ный раствор H_2O_2 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 и $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ (Реахим, Россия); 25%-ный раствор аммиака, $NaCl$ и KCl (База № 1 Химреактивов, Россия). Перевод МУНК в дисперсное состояние осуществляли с использованием диметилформамида (ДМФ) (Sigma, Германия) и Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США). Активационная смесь включала N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (ЭДАК) и N-гидроксисукцинимид (N-ГС) (Sigma-Aldrich, США). Electroды сенсора очищали с применением соляной кислоты ($\rho = 1.198$ г/мл) (Реахим, Россия), ацетона и этанола (Quimica, Испания). Регенерацию распознающего покрытия на поверхности резонатора осуществляли 1 мМ раствором KCNS (Реахим, Россия).

Для синтеза магнитных углеродных наноконкомпозитов использовали многостенные углеродные нанотрубки, полученные в Институте проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН (Черноголовка) методом газофазного пиролиза этанола на поверхности никелевого катализатора при $550^\circ C$ с последующей окислительной модификацией УНТ посредством кипячения в конц. HNO_3 в течение 1.5 ч. Далее нанотрубки промывали водой и этанолом до pH 7 [23].

Для предотвращения агломерации МУНК использовали ультразвуковую ванну (ПСБ-Галас, Россия). Размер и форму магнитных наночастиц на поверхности углеродных нанотрубок изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на электронно-ионном микроскопе Scios 2 DualBeam Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, США). В ходе пробоподготовки использовалась лабораторная центрифуга (MPW-310, Польша).

Образование связей между конъюгатом ципрофлоксацина и МУНК контролировали методом ИК-спектроскопии (ИК-Фурье спектрометр Irtaffinity-1 (Shimadzu, Япония)). ИК-спектры регистрировали после нанесения на подложку (пластина монокристаллического кремния КЭС-0.01, ПРОМТЕХ, Россия) 100 мкл исследуемого раствора и высушивания в потоке теплого воздуха.

В качестве сенсоров применяли пьезокварцевые резонаторы АТ-среза с собственной частотой колебаний 10 МГц с золотыми электродами диаметром 8 мм на двух сторонах, полученными методом магнетронного напыления (ЭТНА, Россия). Аналитический сигнал регистрировали на измерительной установке CPNA-330 (ЭТНА, Россия) после нанесения на распознающий слой капли анализируемого раствора, промывания от несвязавшихся компонентов и высушивания в потоке воздуха до постоянной массы.

Массу покрытия рассчитывали по уравнению Зауэрбрея [24]:

$$\Delta f = \frac{-2.3 f_0^2 10^6 \Delta m}{A}, \quad (1)$$

где Δf – изменение частоты колебаний кристалла кварца, Гц; f_0 – собственная частота колебаний кристалла, 10 МГц; Δm – масса нанесенного на электрод покрытия, г; A – площадь поверхности электрода, 0.10066 см².

Устойчивость биослоя оценивали по числу циклов измерений (N), при котором аналитический отклик сенсора не претерпевал значительного изменения (менее 5%).

Синтез магнитных углеродных нанокompозитов. В работе использовали МУНК, полученные разными способами:

Способ 1. Нанокompозит МУНК 1 получали путем иммобилизации магнитных наносфер Fe₃O₄ на поверхности углеродных нанотрубок по методике, описанной ранее [25]. Для синтеза магнитных наночастиц Fe₃O₄ использовали свежеприготовленные растворы хлоридов железа(III) и (II) в соотношении 2 : 1, содержащие 11.7 г FeCl₃·6H₂O и 4.3 г FeCl₂·4H₂O. Смесь помещали в колбу и интенсивно перемешивали в течение 1 ч при 80°C в атмосфере аргона. Далее в колбу вносили 20 мл 25%-ного раствора аммиака до pH 10 и охлаждали. Удерживая частицы магнитом, промывали их деионизованной водой и этанолом до pH 7, высушивали в сушильном шкафу при 60°C до сухого остатка.

Магнитный углеродный композит МУНК 1 получали в результате смешения 200 мг наночастиц Fe₃O₄ и 100 мг УНТ с 30 мл деионизованной воды. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Образующийся магнитный наноматериал удерживали с помощью магнита, надосадочную жидкость осторожно сливали, после чего нанокompозит дважды промывали деионизованной водой. Смесь высушивали под ИК-лампой.

Способ Фентона. Магнитный углеродный композит по модифицированному методу Фентона [26] получали путем синтеза магнитных частиц Fe₂O₃ непосредственно на поверхности углерод-

ных нанотрубок. Для приготовления раствора Фентона УНТ массой 0.15 мг вносили в 7.5 мл 0.5 М раствора FeSO₄ и тщательно перемешивали в течение 10 мин до образования суспензии. Далее добавляли 37.5 мл 30%-ного раствора H₂O₂, тщательно перемешивали и оставляли на 12 ч. Надосадочную жидкость осторожно сливали и упаривали смесь при 80°C досуха.

Способ 2. Синтез магнитных углеродных нанокompозитов МУНК 2 осуществляли по методу Фентона, однако концентрацию сульфата железа уменьшали в четыре раза ($c_{\text{FeSO}_4} = 0.125 \text{ M}$).

Перевод магнитных углеродных нанокompозитов в дисперсное состояние осуществляли следующими способами: 1 мг МУНК вносили в 1 мл ДМФ (способы А и Б) или в 1 мл 1%-ого водного раствора Тритона X-100 (способ В) и проводили ультразвуковую обработку в течение 1 ч (способы А и В) или 2 ч (способ Б), нагревая до 90°C в течение первых 15 мин.

Синтез белкового конъюгата ципрофлоксацина. Конъюгат ципрофлоксацина с бычьим сывороточным альбумином (Цип-БСА) синтезировали карбодииmidным методом: 5 мг БСА и 2 мг ципрофлоксацина растворяли в 2.5 мл дистиллированной воды и добавляли 30 мг ЭДАК. Реакционную смесь выдерживали 4 ч при комнатной температуре, а затем 16 ч при 4°C. Очистку конъюгата осуществляли путем диализа смеси против дистиллированной воды в течение 4 сут, меняя воду каждые 24 ч.

Формирование иммуноаффинного слоя. Предварительно активировали карбоксильные группы на поверхности МУНК смесью, полученной растворением 2.5 мг ЭДАК и 5 мг N-ГС в 200 мкл 1%-ного водного раствора Тритона X-100.

Для иммобилизации белковых молекул Цип-БСА на поверхности МУНК к 10 мкл дисперсии МУНК в 1%-ном водном растворе Тритона X-100 добавляли 10 мкл активационной смеси и оставляли на 20 мин при комнатной температуре. Далее в систему вводили 10 мкл раствора конъюгата Цип-БСА фиксированной концентрации и оставляли на 10–12 ч при 4°C для получения устойчивого нанокompозита МУНК/Цип-БСА.

Перед формированием слоя МУНК/Цип-БСА поверхность электрода сенсора последовательно очищали 1 М HCl, ацетоном и этанолом. Сенсор помещался в ячейку детектирования над неодимовым магнитом (рис. 1), наносили 2 мкл раствора МУНК/Цип-БСА, оставляли на 90 мин на воздухе при комнатной температуре, после чего промывали сенсор 200 мкл дистиллированной воды для удаления несвязавшихся компонентов и высушивали в потоке теплого воздуха.

Селективность сенсора оценивали по коэффициентам перекрестного реагирования (ПР, %):



Рис. 1. Ячейка детектирования пьезоэлектрического сенсора на основе магнитных углеродных наноконпозитов.

$$\text{ПР}(\%) = (\Delta f_{\text{Меш}} / \Delta f_{\text{Ципп}}) \times 100, \quad (2)$$

где $\Delta f_{\text{Меш}}$, $\Delta f_{\text{Ципп}}$ – аналитический сигнал сенсора при определении мешающего соединения и ципрофлоксацина соответственно, Гц.

Пробоподготовка. К 10 мл молока, предварительно разбавленного в три раза дистиллированной водой, добавляли 5 мл этанола и 2 мл насыщенного раствора сульфата аммония и подвергали центрифугированию в течение 3 мин (скорость 7000 об/мин). Экстракт использовали для анализа.

К 1 г измельченной мышечной ткани (свинина) добавляли 20 мл фосфатного буферного раствора (рН 7.2), тщательно перемешивали, встряхивали в течение 1 ч и центрифугировали в течение 10 мин на скорости 6000 об./мин. Экстракт использовали для анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование распознающего слоя пьезоэлектрического иммуносенсора на основе магнитных углеродных наноконпозитов. На массу и устойчивость распознающего слоя пьезоэлектрического гравиметрического сенсора на основе МУНК существенное влияние оказывает размер магнитных частиц на поверхности углеродных нанотрубок. Использование наноконпозита с МНЧ слишком большого размера приводит к чрезмерному утяжелению рецепторного покрытия, что сопровождается срывом аналитического сигнала сенсора. В то же время отмечено [27], что частицы размером в несколько десятков нанометров проявляют хорошие магнитные свойства, что обеспечивает высокую устойчивость рецепторного слоя, формируемого под действием магнитного поля. В данной работе размер магнитных наночастиц на поверхности углеродных нанотрубок устанавли-

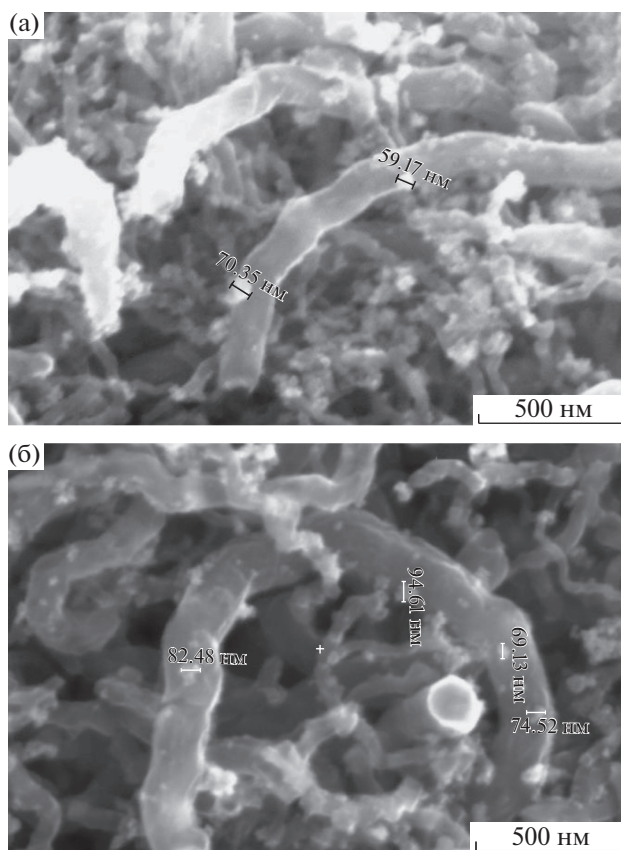


Рис. 2. СЭМ-изображения МУНК 1 (а), МУНК 2 (б).

вали методом сканирующей электронной микроскопии, а методом пьезокварцевого микровзвешивания контролировали массу слоя МУНК, полученных различными способами.

Установлено, что в составе МУНК 1 (способ 1) присутствуют магнитные частицы сферической формы диаметром 64 ± 5 нм, равномерно распределенные на поверхности углеродных нанотрубок (рис. 2а). Применение метода Фентона, описанного в работе [26], приводило к формированию на поверхности УНТ близко расположенных магнитных частиц кубической формы с широким распределением по размерам (298 ± 117 нм), что объясняется применением при синтезе сильного окислителя H_2O_2 , а также избыточной концентрацией ионов OH^- относительно ионов Fe^{2+} [28]. Уменьшение концентрации ионов железа в четыре раза (способ 2) способствовало получению наночастиц диаметром 80 ± 18 нм с формой, близкой к сферической (рис. 2б).

Методом пьезокварцевого микровзвешивания оценивали влияние размера наночастиц и способа перевода наноконпозита в дисперсное состояние на массу слоя на поверхности сенсора (табл. 1). Во всех случаях масса слоя на основе МУНК 2 ниже, несмотря на больший диаметр МНЧ, что, ве-

роятно, связано с менее плотным расположением магнитных частиц на поверхности углеродных нанотрубок, приводящим к уменьшению количества закрепляемого на сенсоре наноматериала.

На массу слоя МУНК существенное влияние оказывает также способ перевода нанокompозита в дисперсное состояние. Так, применение способов А и Б приводит к получению более тяжелого покрытия сенсора, что объясняется недостаточной смачиваемостью МУНК диметилформамидом, сопровождающейся агрегацией частиц и образованием неоднородного слоя. Суспензии на основе Тритона X-100 демонстрируют более высокую стабильность, что связано с наличием в структуре последнего гидрофобных (4-*tert*-октилфенол) групп, за счет которых поверхностно-активные вещества адсорбируются на поверхности УНТ, и гидрофильных фрагментов (из остатков оксида этилена), обеспечивающих хорошую смачиваемость наноматериала водой.

Для определения ципрофлоксацина в конкурентном формате иммуноанализа на поверхности магнитных углеродных нанотрубок после предварительной активации карбоксильных групп раствором ЭДАК и N-ГС проводили иммобилизацию Цип-БСА и формировали распознающий слой сенсора под действием магнитного поля неодимового магнита. Общий процесс формирования распознающего покрытия на основе магнитных углеродных нанокompозитов можно представить в виде схемы, приведенной на рис. 3.

Таблица 1. Зависимость массы слоя на основе магнитных углеродных наноматериалов от размера магнитных наночастиц и способа перевода магнитных углеродных нанокompозитов в дисперсное состояние

Способ перевода в дисперсное состояние	МУНК 1		МУНК 2	
	Δm , мкг	s_r	Δm , мкг	s_r
А	6.8 ± 2.6	0.24	5.6 ± 2.6	0.29
Б	4.2 ± 1.1	0.17	2.7 ± 1.6	0.36
В	1.9 ± 0.1	0.01	0.7 ± 0.1	0.05

Методом ИК-спектроскопии изучали структуру распознающего слоя пьезоэлектрического иммуносенсора на основе магнитных углеродных нанокompозитов. Для выявления связей, образующихся между отдельными компонентами и установления функциональных групп, отвечающих за данное взаимодействие, сравнивали ИК-спектры МУНК, Цип-БСА, и МУНК/Цип-БСА (рис. 4). Уширение и сдвиг пика карбоксильных групп в спектре МУНК/Цип-БСА относительно спектра МУНК с 1740 до 1760 см^{-1} свидетельствует об их участии в образовании связей. Смещение положения и расширение пика аминогрупп в спектре МУНК/Цип-БСА (3345 – 3300 см^{-1}) по отношению к спектру Цип-БСА (3300 см^{-1}) подтверждает участие NH_2 -группы в формировании связей между Цип-БСА и карбоксильными группами МУНК.

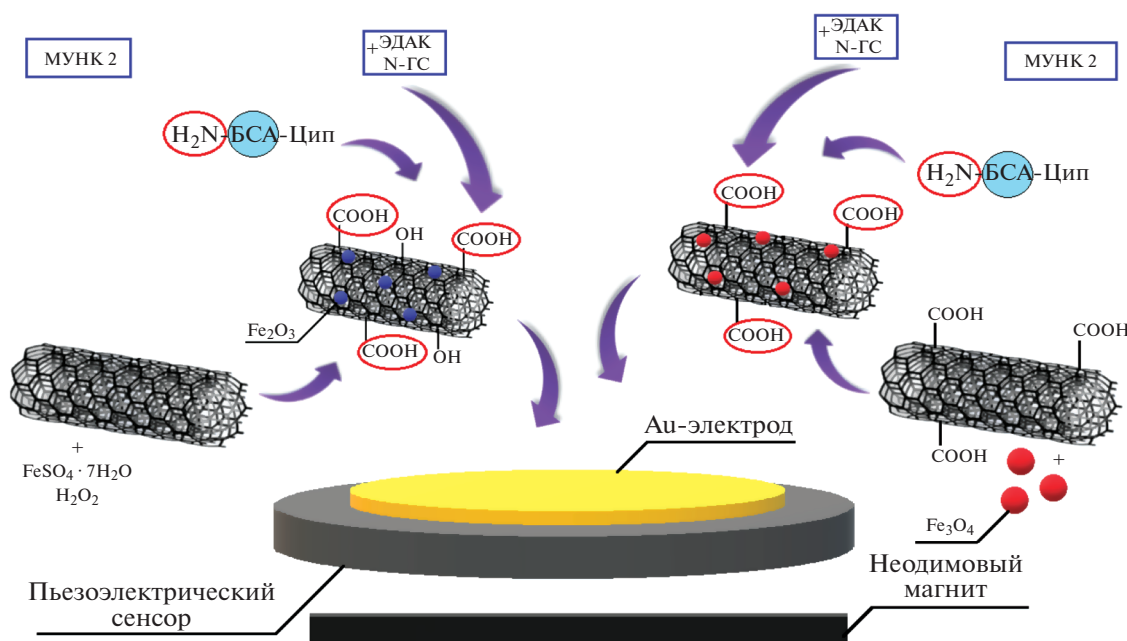


Рис. 3. Формирование распознающего покрытия сенсора на основе магнитных углеродных нанокompозитов МУНК 1 и МУНК 2.

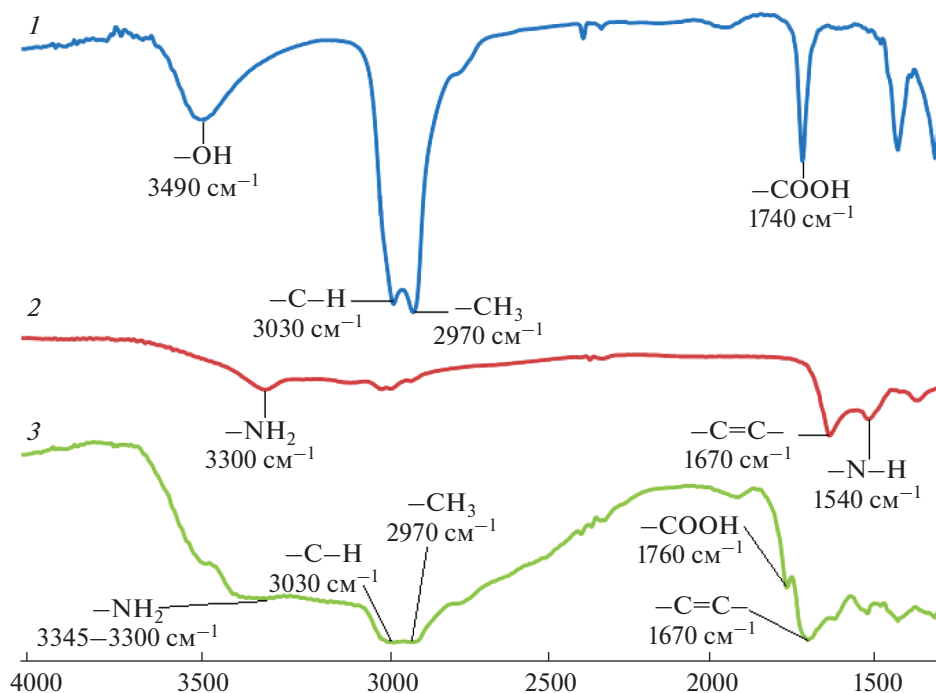


Рис. 4. Изучение образования связи при формировании распознающего слоя методом ИК-спектроскопии: 1 – МУНК, 2 – Цип-БСА, 3 – МУНК/Цип-БСА.

Кроме того, об участии Тритона X-100 в образовании устойчивой суспензии свидетельствует уменьшение интенсивности пиков $-C-H$ (3030 см^{-1}) и $-CH_3$ (2970 см^{-1}) в спектре МУНК/Цип-БСА по сравнению со спектром МУНК, что объясняется способностью Тритона X-100 образовывать с молекулами белков комплексы с сохранением их активности и строения.

Разработка методики определения ципрофлоксацина с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора. На аналитические характеристики пьезоэлектрического сенсора существенно влияет концентрация конъюгата Цип-БСА, определяющая количество активных сайтов связывания на поверхности пьезоэлектрического сенсора. Выбор рабочей концентрации конъюгата ципрофлоксацина осуществляли по максимуму на графике зависимости аналитического сигнала сенсора от концентрации Цип-БСА (рис. 5). Для МУНК 1 она

составила 0.25 мМ , для МУНК 2 – 0.43 мМ , что объясняется различным количеством магнитного углеродного нанокompозита, закрепленного на поверхности сенсора под действием магнитного поля (коррелирует с данными табл. 1) и, следовательно, с концентрацией биомолекул, связанных с ним.

Концентрацию антител, соответствующую 50%-ному связыванию с активными центрами покрытия, определяли на линейном участке зависимости аналитического сигнала от разбавления антител (рис. 6). Разбавление антител для магнитного композита МУНК 1 составило 14/86, для МУНК 2 – 20/80.

Установлены характеристики пьезоэлектрического сенсора с распознающим слоем на базе различных видов МУНК (табл. 2). Наибольшим диапазоном определяемых содержаний характеризуется сенсор с покрытием на основе МУНК 1.

Таблица 2. Сравнение характеристик пьезоэлектрических иммуносенсоров с распознающим покрытием на основе магнитных углеродных нанокompозитов

Особенности формирования подложки	c_{\min} , нг/мл	Диапазон определяемых содержаний, нг/мл	Уравнение градуировочного графика	R^2	N
МУНК 1	2	5–400	$\Delta f = (2234 \pm 316) - (3.5 \pm 1.5)c$	0.97	33
МУНК 2	8	15–240	$\Delta f = (1898 \pm 294) - (6.4 \pm 1.9)c$	0.96	30

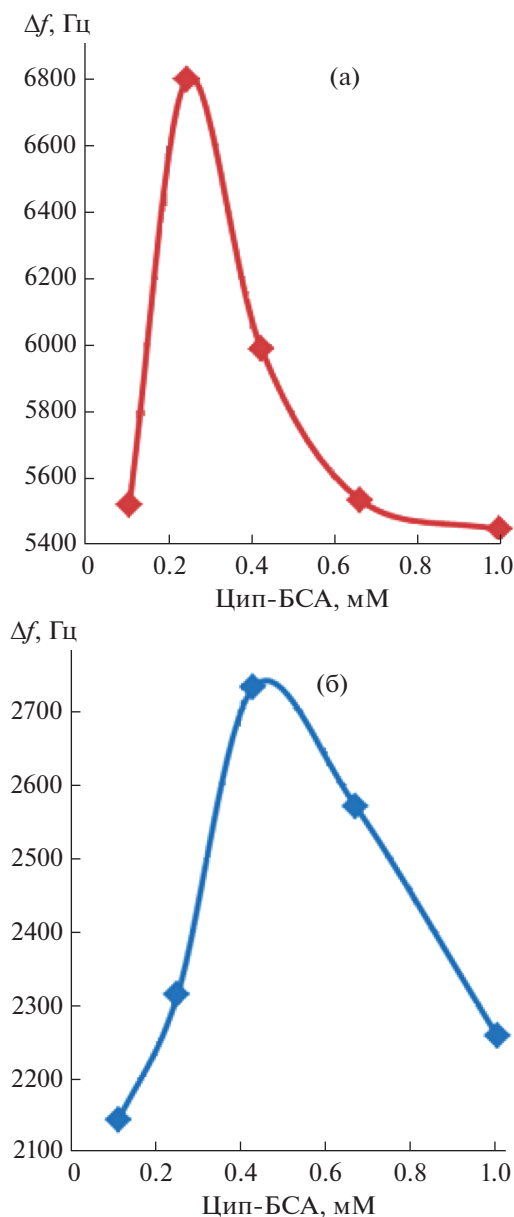


Рис. 5. Выбор рабочей концентрации конъюгата: (а) – МУНК 1/Цип-БСА, (б) – МУНК 2/Цип-БСА.

Более узкий диапазон определяемых содержаний ципрофлоксацина при применении МУНК 2 объясняется меньшим количеством наноматериала, закрепленного на поверхности сенсора. Кроме того, распознающий слой на основе МУНК 1 более устойчив, его можно использовать в 33 циклах измерений.

Коэффициенты перекрестного реагирования для пьезоэлектрического сенсора с распознающим слоем на основе МУНК (табл. 3) свидетельствуют о высокой селективности по отношению к Цип. Присутствующие в пробе фторхинолоны энрофлоксацин и левофлоксацин родственного

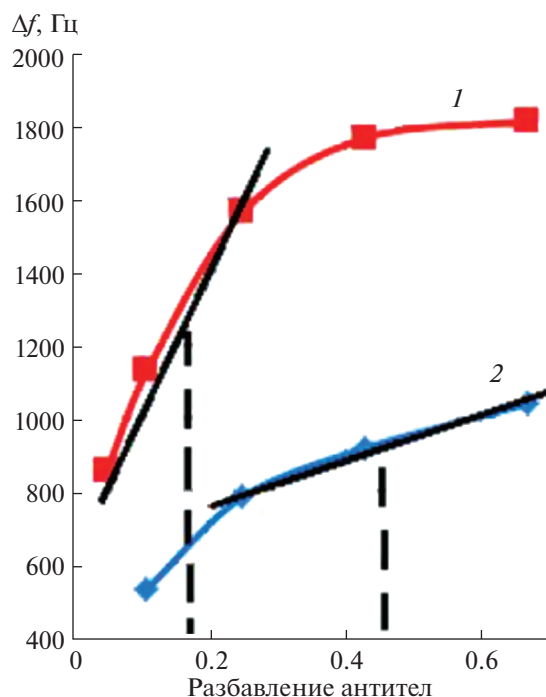


Рис. 6. Выбор разбавления первичной сыворотки антител, соответствующего 50%-ному связыванию: 1 – МУНК 1/Цип-БСА, 2 – МУНК 2/Цип-БСА.

строения могут мешать определению ципрофлоксацина при двукратном (энрофлоксацин) или десятикратном (левофлоксацин) избытке. Другие антибиотики практически не мешают определению Цип даже при 20-кратном избытке.

Сенсор апробирован при определении ципрофлоксацина в молоке и мясе (табл. 4). Установлено, что во всех пробах содержание ципрофлоксацина не превышает значение максимально допустимого уровня препарата (0.1 мг/кг) [29]. Значения s_r свидетельствуют о высокой воспроизводимости результатов измерений.

Таблица 3. Оценка селективности определения ципрофлоксацина с помощью коэффициента перекрестного реагирования (ПР, %; концентрация аналитов 200 нг/мл)

Антибиотик	ПР, %
Ципрофлоксацин	100.0
Энрофлоксацин	57.0
Левофлоксацин	12.4
Пенициллин G	1.6
Канамицина сульфат	2.5
Тетрациклина гидрохлорид	4.5

Таблица 4. Результаты определения ципрофлоксацина в молоке и мясе ($n = 5$, $P = 0.95$)

Введено, нг/мл	Найдено с добавкой, нг/мл	Без добавки		s_T
		нг/мл	мкг/кг	
Молоко				
20	29 ± 2	9 ± 2	9 ± 2	0.05
50	59 ± 3	9 ± 3	9 ± 3	0.03
Свинина				
20	20 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	0.04
50	49 ± 5	2 ± 1	2 ± 1	0.07

* * *

Таким образом, с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора с распознающим слоем на основе магнитных углеродных наноконструкций можно осуществлять чувствительное и селективное определение ципрофлоксацина в пищевой продукции. При этом существенно упрощается процедура создания распознающего слоя за счет применения внешнего магнитного поля, что в свою очередь позволяет сократить время подготовки сенсора к анализу по сравнению с традиционными используемыми многослойными способами (с 24 до 1.5 ч) [30]. Это также способствует увеличению срока службы сенсора (до 33 циклов измерений после регенерации слоя) и резонатора - полное удаление распознающего слоя производится извлечением сенсора из ячейки детектирования и не требует применения кислот и органических растворителей, разрушающих поверхность золотого электрода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Липецкой области в рамках научного проекта № 20-43-480001. В ИПТМ РАН работа выполнена в рамках Госзадания 075-00355-21-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skládal P. Piezoelectric biosensors // Trends Anal. Chem. 2016. V. 79. № 5. P. 127.
2. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Шашканова О.Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и клинической диагностики // Рос. хим. журн. 2008. Т. 52. № 2. С. 17. (Ermolaeva T.N., Kalmykova E.N., Shashkanova O.Y. Piezoquartz biosensors for the analysis of environmental objects, foodstuff and for clinical diagnostic // Russ. J. Gen. Chem. 2008. V. 78. № 12. P. 2430.)
3. Chauhan R., Singh J., Solanki P.R., Basu T., O'Kennedy R., Malhotra B.D. Electrochemical piezoelectric reusable immunosensor for aflatoxin B1 detection // Biochem. Eng. J. 2015. V. 103. № 15. P. 103.
4. Vaughan R.D., Guilbault G.G. Piezoelectric sensor. Piezoelectric immunosensor // Springer Ser. Chem. Sens. Biosens. 2007. V. 5. P. 237.
5. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н. Пьезокварцевые сенсоры: аналитические возможности и перспективы // Успехи химии. 2006. Т. 75. № 5. С. 445. (Ermolaeva T.N., Kalmykova E.N. Piezoelectric immunosensors: analytical potentials and outlooks // Russ. Chem. Rev. 2006. V. 75. № 5. P. 397.)
6. Yanga N., Chena X., Renb T., Zhanga P., Yang D. Carbon nanotube based biosensors // Sens. Actuators B. 2015. V. 207. P. 690.
7. Jithesh V.V., Kaiming Y. Development of immunosensors using carbon nanotubes // Biotechnol. Progr. 2007. V. 23. P. 517.
8. Fama D.W.H., Palaniappana Al., Toka A.I.Y., Liedberga B., Mochhalaa S.M. A review on technological aspects influencing commercialization of carbon nanotube sensors // Sens. Actuators B. 2011. V. 157. P. 1.
9. Wang J., Lin Y. Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications // Trends Anal. Chem. 2008. V. 27. № 7. P. 619.
10. Le J., Ju H. Nanotubes in biosensing // Adv. Rev. 2010. V. 2. P. 496.
11. Hampitak P., Jowitt T.A., Melendrez D., Fresquet M., Hamilton P., Iliut M., Nie K., Spencer B., Lennon R., Vijayaraghavan A. A Point-of-care immunosensor based on a quartz crystal microbalance with graphene biointerface for antibody assay // ACS Sens. 2020. V. 5. № 11. P. 3520.
12. Sassolas A., Prieto-Simon B., Marty J.-L. Biosensors for pesticide detection: New trends // Am. J. Anal. Chem. 2012. V. 3. P. 210.
13. Медянцева Э.П., Брусницын Д.В., Варламова Р.М., Максимов А.А., Коновалова О.А., Будников Г.К. Модификация поверхности электродов углеродными нанотрубками и наночастицами металлов золота и серебра в моноаминоксидазных биосенсорах для определения некоторых антидепрессантов // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 4. С. 305. (Medyantseva E.P., Brusnitsyn D.V., Varlamova R.M., Maksimov A.A., Konovalova O.A., Budnikov H.C. Surface modification of electrodes by carbon nanotubes and gold and silver nanoparticles in monoaminoxidase biosensors for the determination of some antidepressants // J. Anal. Chem. 2017. V. 72. № 4. P. 362.)
14. Zhoua J., Gana N., Li T., Zhoua H., Li X., Caoa Y., Wang L., Sange W., Hu F. Ultratrace detection of C-reactive protein by a piezoelectric immunosensor based on Fe₃O₄@SiO₂ magnetic capture nanoprobe and HRP-antibody co-immobilized nano gold as signal tags // Sens. Actuators B. 2013. V. 178. P. 494.

15. Li Z., Cai P., Fenga Y., Chenga J., Xiang H., Liub J., Wua D., Zhou X. Synthesis and photophysical properties of water-soluble sulfonato-Salen-type Schiff bases and their applications of fluorescence sensors for Cu^{2+} in water and living cells // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 735. P. 96.
16. J., Xu Q., Wei X., Hao Z. Electrogenated chemiluminescence immunosensor for bacillus thuringiensis CryIAc Based on Fe_3O_4 @Au Nanoparticles // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 1435.
17. Gao L., Chen L. Preparation of magnetic carbon nanotubes for separation of pyrethroids from tea samples // *Microchim. Acta.* 2013. V. 180. P. 423.
18. Zarei H., Ghourchian H., Eskandari K., Zeinali M. Magnetic nanocomposite of anti-human IgG/COOH—multiwalled carbon nanotubes/ Fe_3O_4 as a platform for electrochemical immunoassay // *Anal. Biochem.* 2012. V. 421. P. 446.
19. Sánchez-Tirado E., González-Cortés A., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M. Magnetic multiwalled carbon nanotubes as nanocarrier tags for sensitive determination of fetuin in saliva // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 113. P. 88.
20. Zhang Y., Wang H., Yan B., Zhang Y., Li J., Shen G., Yu R. A reusable piezoelectric immunosensor using antibody-adsorbed magnetic nanocomposite // *J. Immunol. Methods.* 2008. V. 332. P. 103.
21. Zhou J., Gan N., Li T., Zhou H., Li X., Cao Y., Wang L., Sang W., Hu F. Ultratrace detection of C-reactive protein by a piezoelectric immunosensor based on Fe_3O_4 @ SiO_2 magnetic capture nanoprobe and HRP-antibody co-immobilized nano gold as signal tags // *Sens. Actuators B.* 2013. V. 178. P. 494.
22. Шанин И.А., Неуен Ти Дуу Тхай, Еремин С.А. Разработка непрямого твердофазного иммуноферментного анализа для детектирования левовращающего стереоизомера офлоксацина (левофлоксацина) в молоке // *Вестн. Моск. ун-та.* 2014. Т. 55. № 3. С. 180.
23. Гражугене С.С., Золотарева Н.И., Редькин А.Н., Шилкина Н.Н., Митина А.А., Ходос И.И. Сорбционные свойства магнитного композита на основе модифицированных углеродных нанотрубок в зависимости от условий синтеза // *Журн. прикл. химии.* 2020. Т. 93. № 1. С. 66. (Grazhulene S.S., Zolotareva N.I., Red'kin A.N., Shilkina N.N., Mitina A.A., Khodos I.I. sorption properties of a magnetic composite based on modified carbon nanotubes: Influence of the synthesis conditions. *Russ. J. Appl. Chem.* 2020. V. 93. № 1. P. 57.)
24. Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wirkung dünner Schichten und zur Mikrowägung // *Zeitschrift für Physik.* 1959. V. 55. P. 206.
25. Гражугене С.С., Золотарева Н.И., Редькин А.Н., Шилкина Н.Н., Митина А.А., Колесникова А.М. Магнитный сорбент на основе магнетита и модифицированных углеродных нанотрубок для извлечения некоторых токсичных элементов // *Журн. прикл. химии.* 2018. Т. 91. № 11. С. 1642. (Grazhulene S.S., Zolotareva N.I., Red'kin A.N., Shilkina N.N., Mitina A.A., Kolesnikova A.M. Magnetic sorbent based on magnetite and modified carbon nanotubes for extraction of some toxic elements // *Russ. J. Appl. Chem.* 2018. V. 91. № 11. P. 1849.)
26. Yu F., Chen J., Chen L., Huai J., Gong W., Yuan Z., Wang J., Ma J. Magnetic carbon nanotubes synthesis by Fenton's reagent method and their potential application for removal of azo dye from aqueous solution // *J. Coll. Interface Sci.* 2012. V. 378. P. 175.
27. Netto C.G.C.M., Toma H.E., Andrade L.H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2013. V. 85. P. 71.
28. Verges A., Costo R., Roca G., Marco J., Goya G., Serna C., Morales M. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain—multidomain limit // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2008. V. 41. P. 1.
29. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28 “О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методиках их определения”. <https://docs.cntd.ru/document/556522984> (20.06.2021 г.)
30. Шукшина Е.И., Фарафонова О.В., Шанин И.А., Гражугене С.С., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Аффинные взаимодействия на поверхности пьезоэлектрического сенсора, модифицированного углеродными нанотрубками, при определении фторхинолонов // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2018. Т. 18. № 3. С. 394.

УДК 535.518;547.588

МЕТОДИКА ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИБУТИЛФТАЛАТА В ВОДЕ

© 2022 г. В. С. Барановская^а, А. Н. Берлина^б, С. А. Еремин^{а, б, *}^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия^бИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

*e-mail: saeremin@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2021 г.

После доработки 12.08.2021 г.

Принята к публикации 14.08.2021 г.

Разработана методика поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) для определения в воде пластификатора дибутилфталата (ДФФ) – токсичного техногенного загрязнителя окружающей среды. Методика основана на конкурентном взаимодействии с антителами ДБФ в пробе и меченного флуорофором ДБФ, возбуждении флуоресценции плоскополяризованным светом и регистрации поляризации флуоресценции излучаемого света. Синтезирован конъюгат аминопроизводного флуоресцеина с сукцинат-дибутилфталатом, подтверждено его связывание с поликлональными антителами. Методика ПФИА характеризуется пределом обнаружения ДБФ 0.35 мкг/мл и диапазоном определяемых концентраций от 0.5 до 7.5 мкг/мл. Продолжительность анализа – 2 мин.

Ключевые слова: поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, фталаты, дибутилфталат.

DOI: 10.31857/S004445022204003X

В настоящее время проблема загрязнения окружающей среды пластификаторами и продуктами их трансформации стоит особенно остро. Ранее последствиям использования таких соединений не уделялось должного внимания, а токсикологические и экологические риски стали оцениваться позже, когда появились данные о нарушении функционирования систем организма человека и обнаружении фталатов в бутилированной воде и продуктах питания [1, 2].

Эфиры фталевой кислоты широко используют в производстве полимерных материалов в качестве пластификаторов [3]. Данные соединения добавляют к материалам на основе поливинилхлорида, полиэтилентерефталата и других полимеров [4]. Введение пластифицирующих компонентов не сопровождается формированием ковалентных связей [5], а ограничивается слабыми межмолекулярными взаимодействиями [6], поэтому пластификаторы со временем экстрагируются в окружающую среду. Основные опасности попадания фталатов в живые организмы обусловлены их влиянием на эндокринную и репродуктивную системы, а также на процессы детоксикации с участием печени, почек [7, 8].

В связи с обнаруженной токсичностью допустимые уровни фталатов в воде и продуктах питания нормативно регулируются. Данные о допустимых уровнях потребления фталатов суммированы, в частности, в недавнем обзоре Кортенкампа и соавт. [9]. Отметим значительное варьирование этих величин для дибутилфталата – от 6.7 до 100 мкг/кг/день [10, 11]. В России предельно допустимая концентрация данного контаминанта в воде составляет 0.2 мг/л [12]. Агентство по охране окружающей среды США (USEPA) установило предельно допустимую концентрацию для ДБФ на уровне 0.45 мг/л [13].

Существующие хроматографические методы определения фталатов (газовая хроматография, ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием) трудоемки, дорогостоящи, анализ занимает несколько часов, включая подготовку пробы чаще всего с использованием твердофазной экстракции [14–16]. По данным хроматографического контроля фталаты присутствуют в воде, почве, молоке, косметических средствах, смывах с игрушек и других объектах [15]. Вследствие высокой гидрофобности фталаты накапливаются в почве, донных отложениях, тканях обитателей водоемов [14, 16].

В качестве альтернативы хроматографическим разрабатываются иммунохимические методы анализа, позволяющие быстро и точно, в том числе и при проведении скрининга, определять аналиты [17]. Преимуществами иммунохимических методов, в частности иммуноферментного анализа, по сравнению с хроматографическими методами анализа являются возможность одновременного анализа многих проб в одинаковых условиях, разнообразие схем анализа, позволяющее выбирать варианты с необходимыми пределами обнаружения, относительная простота подготовки проб, доступность недорогого оборудования, в том числе – портативного для внелабораторного тестирования [17–19].

Среди иммунохимических методов анализа поляризационный флуороиммуноанализ (ПФИА) занимает особое место, поскольку позволяет определять аналит в гомогенной среде в течение нескольких минут [20]. Преимуществом ПФИА является возможность его проведения в одну стадию без разделения реагентов [21]. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ низкомолекулярных соединений основан на использовании конъюгата производного аналита с флуоресцентной меткой [22]. Чаще всего в качестве метки применяют производные флуоресцеина, обеспечивающие интенсивный и воспроизводимый аналитический сигнал [23].

Известно большое количество эфиров фталевой кислоты, используемых в качестве пластификаторов и характеризующихся различной токсичностью по отношению к живым организмам. Среди массово производимых фталатов наиболее опасными и приоритетными для мониторинга являются диэтилфталат, дибутилфталат, диизобутилфталат и ди-(2-этилгексил)фталат [1]. В настоящее время среди всей палитры эфиров фталевой кислоты описано ПФИА-определение только диизобутилфталата и диэтилфталата [20, 24, 25].

Цель данной работы – разработка методики определения дибутилфталата методом ПФИА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование и реагенты. Использовали дибутилфталат (ДБФ), флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), этилендиамин гидрохлорид, тетраборат натрия, N-гидроксисукцинимид (N-ГС), N,N'-дициклогексилкарбодиимид (N,N-ДЦК) (Sigma Aldrich Corporation, США); метанол, диметилформамид (Реахим, Россия); триэтиламин (Merck, Германия); хлороформ ос.ч. (Химмед, Россия); азид натрия (Serva, США). Специфические поликлональные антитела против дибутилфталата, полученные, как описано в работе [26], были предоставлены проф. Сукинг Чжао (Гуандунский технологический университет, Гуанчжоу, Китай).

При проведении экспериментов использовали 2.5 мМ боратный буферный раствор (pH 8.5), содержащий 0.1% NaN_3 .

Для очистки конъюгата использовали тонкослойную хроматографию на пластинах “Silufol” (Чехия). Для измерения поляризации флуоресценции использовали прибор Senty 200 (Ellie, США). Кинетические измерения осуществляли на флуориметре BEACON 2000 фирмы “Panvera” (США). Полученные данные обрабатывали с использованием программного пакета Origin 8.5 (Origin, USA).

Синтез конъюгата дибутилфталата с этилендиаминфлуоресцеинтиокарбаматом (ЭДФ). Флуоресцирующую метку ЭДФ синтезировали из ФИТЦ и этилендиамина дигидрохлорида [27, 28]. Для получения конъюгата 14.9 мг сукцинат-дибутилфталата с активной группой –COOH смешивали с 10.4 мг N-ГС и 18 мг N,N-ДЦК в 1 мл диметилформамида, смесь инкубировали в течение ночи. Далее к 50 мкл раствора полученного активированного производного добавляли 10 мкл триэтиламина и 1 мг ЭДФ. Конъюгат ДБФ-ЭДФ очищали от примесей методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя в качестве элюента систему метанол–хлороформ (1 : 4) (по объему). Основную желтую флуоресцирующую полосу ($R_f = 0.9$) собирали с хроматографической пластины и экстрагировали 1 мл метанола. Концентрацию конъюгата ДБФ-ЭДФ определяли спектрофотометрически по поглощению при 492 нм в 50 мМ карбонатном буферном растворе с pH 9.0, используя молярный коэффициент поглощения флуоресцентного соединения 8.78×10^4 (л/(моль см)), как описано в работе [28].

Определение рабочей концентрации конъюгата ДБФ-ЭДФ. В пробирках для ПФИА готовили серии разведений конъюгата ДБФ-ЭДФ в боратном буферном растворе и регистрировали их поляризацию флуоресценции. Критерием выбора рабочей (оптимальной) концентрации конъюгата ДБФ-ЭДФ являлось десятикратное превышение фонового значения (для буферного раствора) поляризации флуоресценции [27].

Тестирование флуоресцентного конъюгата на связывание с антителами. В объеме 500 мкл готовили серию разведений антител в боратном буферном растворе, начиная с 1 мг/мл. Затем во все пробирки вносили по 500 мкл раствора конъюгата ДБФ-ЭДФ с концентрацией порядка 1 нМ и измеряли поляризацию флуоресценции.

Определение оптимального времени связывания. К 500 мкл конъюгата ДБФ-ЭДФ в выбранном разведении добавляли 500 мкл раствора IgG антител против дибутилфталата в концентрации 1 мкг/мл в боратном буферном растворе. Измерения проводили через каждые 30 с и строили зави-

симось поляризации флуоресценции от времени взаимодействия.

Проведение конкурентного ПФИА. В стеклянные пробирки вносили по 10 мкл стандартных растворов вещества (0, 0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 0.3, 10, 30, 100 мкг/мл) и 500 мкл раствора конъюгата ДБФ-ЭДФ выбранной концентрации. Затем добавляли 500 мкл раствора антител против ДБФ с концентрацией 1 мкг/мл, через 2 мин проводили измерение. Каждое измерение проводили в трех повторях. Получали полулогарифмическую зависимость поляризации флуоресценции от концентрации ДБФ (градуировочную кривую) и аппроксимировали ее с помощью четырехпараметрической сигмоидной функции, используя программное обеспечение Origin 8.5 (OriginLab, США).

Определение аналитических характеристик методики ПФИА. Предел обнаружения ДБФ определяли по $3s$ -критерию [29]. Для этого выполняли 20 измерений растворов с нулевой концентрацией ДБФ. Предел обнаружения соответствовал концентрации ДБФ, выбранной на начальном участке градуировочной кривой с поляризацией флуоресценции, равной:

$$mP_{\min} = mP_0 - 3s,$$

где mP_{\min} – значение степени поляризации флуоресценции для предела обнаружения; mP_0 – средняя величина поляризации флуоресценции, измеренная для раствора с нулевой концентрацией ДБФ; s – стандартное отклонение для результатов 20 измерений поляризации флуоресценции раствора с нулевой концентрацией ДБФ.

Рабочий диапазон определяемых содержаний ДБФ определяли как диапазон от IC20 (концентрация, при которой поляризация флуоресценции снижается на 20% от амплитуды между максимальным и минимальным ее значениями) до IC80 (концентрация, при которой поляризация флуоресценции уменьшается на 80%).

Воспроизводимость результатов ПФИА оценивали для растворов ДБФ с концентрациями, лежащими в рабочем диапазоне определяемых содержаний. Для этого определяли поляризацию флуоресценции смеси из 10 мкл стандартного раствора ДБФ, 500 мкл рабочего раствора конъюгата ДБФ-ЭДФ и 500 мкл рабочего раствора антител. В течение трех дней выполняли по три повторных измерения и вычисляли относительное стандартное отклонение результатов измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор метода определения. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ представляет собой конкурентный метод анализа, который проводят в гомогенной среде. При отсутствии в рас-

творе контролируемого антигена все центры связывания антител заняты только молекулами меченого антигена, и поляризация флуоресценции максимальна. При добавлении к реакционной смеси контролируемого (немеченого) антигена поляризация флуоресценции уменьшается пропорционально росту концентрации добавленного антигена. Это связано с тем, что с увеличением концентрации немеченого антигена в растворе все большая часть молекул конъюгата (антигена с флуоресцентной меткой) остается в не связанном с антителами состоянии, что приводит к уменьшению поляризации флуоресценции. Соответственно регистрируемая поляризация флуоресценции при добавлении пробы отражает концентрацию антигена в пробе, регистрируемую, таким образом, без разделения реагентов. Градуировочная кривая ПФИА представляет собой зависимость поляризации флуоресценции (mP) от концентрации аналита в пробе.

Синтез дибутилфталата, модифицированного ЭДФ (ДБФ-ЭДФ). Для определения дибутилфталата синтезировали конъюгат, содержащий в качестве флуоресцентной метки этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат. Полученное соединение очищали от непрореагировавших компонентов методом ТСХ и собирали конъюгат, соответствующий значению $R_f = 0.9$. Дибутилфталат не имеет функциональных групп для активации и конъюгирования, поэтому получали его производное, содержащее аминогруппу. Добавление к этому производному янтарного ангидрида, как описано в работе [26], обеспечило включение в конъюгат группы $-COOH$, при этом введение остатка янтарной кислоты обеспечило пространственную удаленность флуоресцентной метки от сайта связывания антител [20]. При синтезе дибутилфталата, модифицированного ЭДФ, протекают многие побочные процессы и образуются неопознанные вещества, которые удаляются при ТСХ. Количество и выход искомого вещества не определяли, количество синтезированного дибутилфталата, модифицированного ЭДФ, был достаточным для проведения последующих исследований. Схема синтеза приведена на рис. 1.

Оценка эффективности применения конъюгата ДБФ-ЭДФ. Чувствительность и точность ПФИА зависят от используемой пары иммунореагентов антитела–конъюгат. Выбранная (данные не приведены) рабочая концентрация конъюгата ДБФ-ЭДФ составила 0.7 нМ. Далее тестировали связывание конъюгата с имеющимися специфическими антителами – двумя кроличьими антисыворотками против дибутилфталата. Получение данных антисывороток и их свойства описаны в работе [30], посвященной разработке методики определения ДБФ с помощью иммуноферментного анализа. Полученные зависимости поляризации флуоресценции от концентрации антител

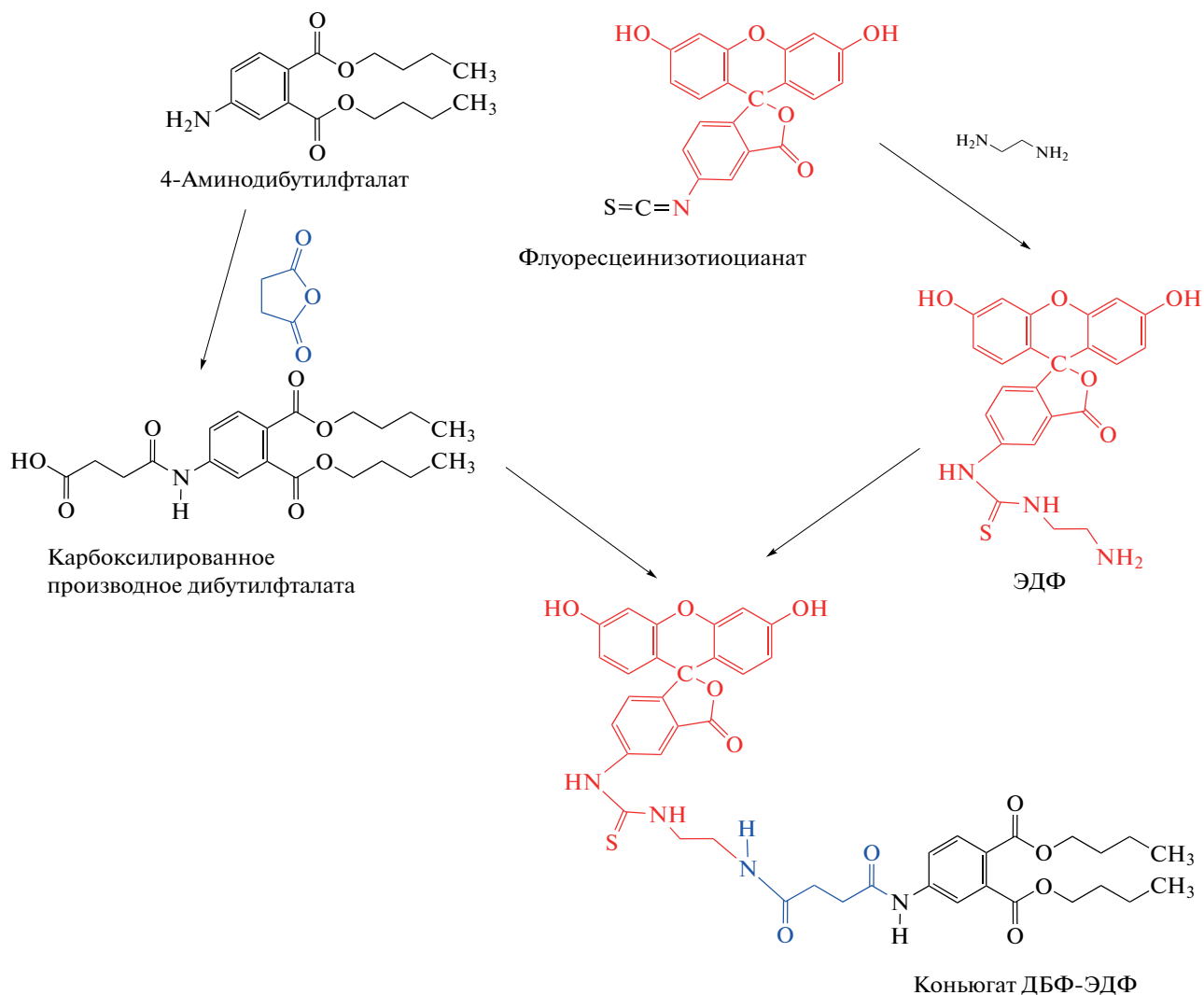


Рис. 1. Схема синтеза конъюгата ДБФ-ЭДФ.

при постоянной концентрации конъюгата ДБФ-ЭДФ (0.7 нМ) представлены на рис. 2. Как видно, максимальное соотношение сигнал–фон наблюдается при использовании антител 1 в концентрации 1 мкг/мл.

Оптимальное время взаимодействия конъюгата ДБФ-ЭДФ и антител. Исследовали зависимость поляризации флуоресценции от продолжительности взаимодействия конъюгата ДБФ-ЭДФ и антител 1 (рис. 3). Установили, что химическое равновесие в системе достигается за 4–5 мин, что подтверждает экспрессность формирования комплексов антитело–меченый антиген в растворе. Это время выбрали для проведения ПФИА.

Градуировочная зависимость для определения дибутилфталата методом ПФИА и аналитические характеристики предложенной методики. В выбранных условиях (конъюгат ДБФ-ЭДФ (0.7 нМ) и раствор антител 1 (1 мкг/мл)) получили зависи-

мость поляризации флуоресценции от концентрации ДБФ (рис. 4). Для расчета аналитических параметров использовали четырехпараметрическое сигмоидное приближение, общепринятое для конкурентных схем иммуноанализа. Рабочий диапазон определяемых концентраций оценивали в соответствии с рекомендациями [31] после линеаризации участка кривой (уравнение прямой $Y = (101.31 \pm 0.43) - (30.09 \pm 0.82)X$).

Предел обнаружения ДБФ составил 0.35 мкг/мл, а диапазон определяемых концентраций – 0.5–7.5 мкг/мл. Относительное стандартное отклонение в этом диапазоне варьировалось от 3.5 до 4.9%, а на всем протяжении градуировочной кривой – от 1.2 до 7.5%. При оценке воспроизводимости результатов ПФИА показано, что относительное стандартное отклонение варьировалось от 1.5 до 9% в течение дня и в диапазоне 0.8–9.5% в течение нескольких дней.

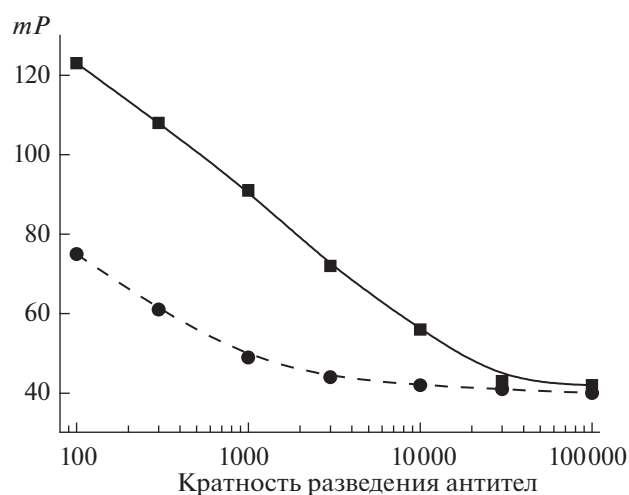


Рис. 2. Зависимость поляризации флуоресценции от разведения поликлональных антител 1 (■) и антител 2 (●) при связывании с конъюгатом ДБФ-ЭДФ (0.7 нМ).

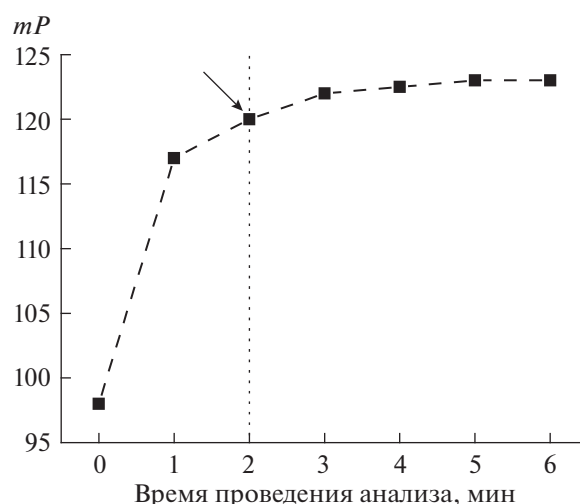


Рис. 3. Зависимость поляризации флуоресценции от времени связывания реагентов ДБФ-ЭДФ (концентрация 0.4 нМ) и поликлональных антител к дибутилфталату (разведение 1 : 1000, концентрация 1 мкг/мл).

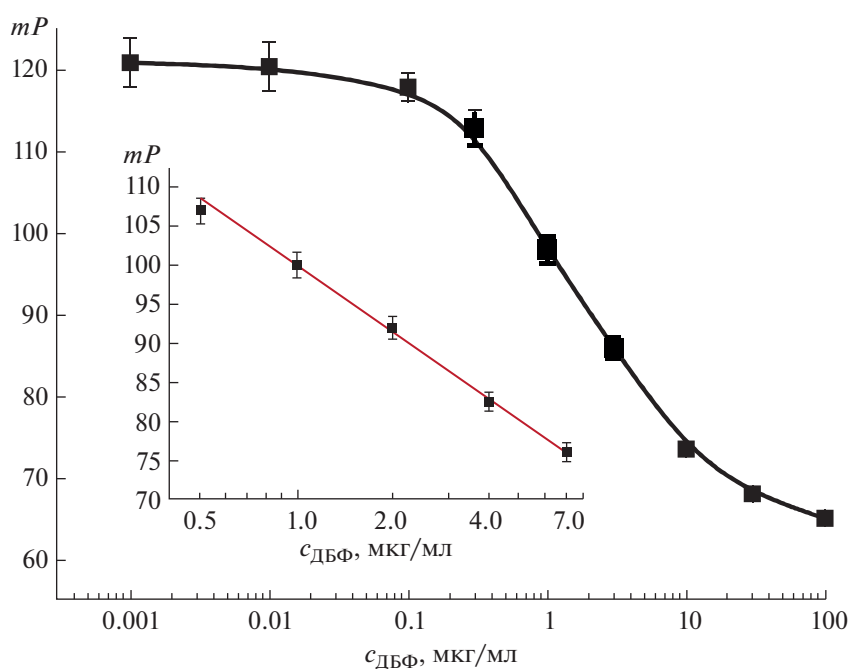


Рис. 4. Градуировочная кривая для определения дибутилфталата и ее линейный участок (на вставке) при рабочих концентрациях конъюгата ДБФ-ЭДФ (0.7 нМ) и раствора антител 1 мкг/мл.

Предложенную методику апробировали в анализе бутилированной питьевой воды. Готовили серию растворов с добавлением в воду дибутилфталата в диапазоне концентраций 0.001–300 мкг/мл и анализировали их. При этом форма градуировочной кривой и положение точек на ней не изменилась; границы диапазона определяемых концентраций остались прежними (рис. 5), что свидетельствует об отсутствии влияния матрицы проб

на результаты определения и пригодности разработанной методики ПФИА для определения дибутилфталата в питьевой воде.

Дополнительное введение бисфенола А – важного загрязнителя водных ресурсов [32] – в пробы с ДБФ не влияет на регистрируемую поляризацию флуоресценции в концентрациях до 300 мкг/мл, что подтверждает специфичность разработанной методики.

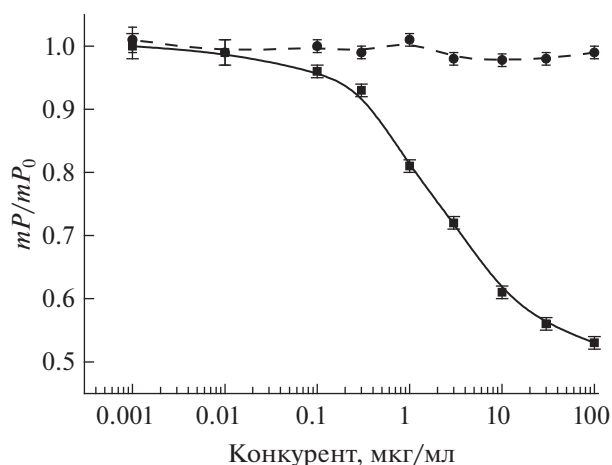


Рис. 5. Результаты определения дибутилфталата (■) в пробах питьевой воды и влияние добавления бисфенола А (●).

Достигнутые значения предела обнаружения (0.35 мкг/мл) и рабочий диапазон определяемых концентраций дибутилфталата (0.5–7.5 мкг/мл) соответствуют требованиям нормативных документов (предельно допустимая концентрация ДБФ 0.45 мг/л по данным Агентства по охране окружающей среды США (USEPA)). Стоит отметить, что увеличение объема пробы с 10 мкл в предложенной методике до 50–100 мкл позволит повысить чувствительность определения аналита. Такой подход применен ранее в работе [33], где увеличение объема пробы позволило снизить предел обнаружения и добиться соответствия требованиям нормативов по содержанию загрязнителя в воде.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-14-00306.

Авторы выражают благодарность проф. Сункин Чжао (Гуандунский технологический университет, Гуанчжоу, Китай) за предоставление 4-аминопроизводного дибутилфталата и поликлональных антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huang S., Qi Z., Ma S., Li G., Long C., Yu Y. A critical review on human internal exposure of phthalate metabolites and the associated health risks // *Environ. Pollut.* 2021. V. 279. Article 116941.
- Xu Z., Xiong X., Zhao Y., Xiang W., Wu C. Pollutants delivered every day: Phthalates in plastic express packaging bags and their leaching potential // *J. Hazard. Mater.* 2020. V. 384. Article 121282.
- Salazar-Beltrán D., Hinojosa-Reyes L., Ruiz-Ruiz E., Hernández-Ramírez A., Guzmán-Mar J.L. Phthalates in beverages and plastic bottles: Sample preparation and determination // *Food Anal. Methods.* 2018. V. 11. № 1. P. 48.
- Wang R., Ma X., Zhang X., Li X., Li D., Dang Y. C8-modified magnetic graphene oxide based solid-phase extraction coupled with dispersive liquid-liquid micro-extraction for detection of trace phthalate acid esters in water samples // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 2019. V. 170. P. 789.
- Pang Y.-H., Yue Q., Huang Y.-Y., Yang C., Shen X.-F. Facile magnetization of covalent organic framework for solid-phase extraction of 15 phthalate esters in beverage samples // *Talanta.* 2020. V. 206. Article 120194.
- Moazzen M., Khaneghah A.M., Shariatifar N., Ahmadloo M., Eş I., Baghani A.N., Yousefinejad S., Alimohammadi M., Azari A., Dobaradaran S. Multi-walled carbon nanotubes modified with iron oxide and silver nanoparticles (MWCNT-Fe₃O₄/Ag) as a novel adsorbent for determining PAEs in carbonated soft drinks using magnetic SPE-GC/MS method // *Arab. J. Chem.* 2019. V. 12. № 4. P. 476.
- Sun R., Wang L., Jiao Y., Zhang Y., Zhang X., Wu P., Chen Z., Feng C., Li Y., Li X. Metabolic process of di-n-butyl phthalate (DBP) by *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from Mollisol region in China // *Environ. Pollut.* 2019. V. 255. Article 113344.
- Zhang Y., Jiao Y., Li Z., Tao Y., Yang Y. Hazards of phthalates (PAEs) exposure: A review of aquatic animal toxicology studies // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 771. Article 145418.
- Kortenkamp A., Koch H.M. Refined reference doses and new procedures for phthalate mixture risk assessment focused on male developmental toxicity // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2020. V. 224. Article 113428.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and material in contact with food (AFC) on a request from the commission related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials question N ° EFSA-Q-2003-19 // *Sci. Panel Food Add.* 2005. P. 1.
- National Research Council. Phthalates and cumulative risk assessment: The tasks ahead. 2009.
- САНПИН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Зарегистрировано в Минюсте России 29 января 2021 г. № 62296. 2021. С. 229.
- US EPA. United States Environmental Protection Agency (US). National primary drinking water regulations. Final rule. Fed. Regist. 1991 Jul 1. V. 56. № 126 Article 30266.
- Fernández-González V., Moscoso-Pérez C., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Prada-Rodríguez D. Reliable, rapid and simple method for the analysis of phthalates in sediments by ultrasonic solvent extraction followed by head space-solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry determination // *Talanta.* 2017. V. 162. P. 648.
- Huysman S., Van Meulebroek L., Janssens O., Vanryckeghem F., Van Langenhove H., Demeestere K., Vanhaecke L. Targeted quantification and untargeted screening of alkylphenols, bisphenol A and phthalates in aquatic matrices using ultra-high-performance liquid chroma-

- tography coupled to hybrid Q-Orbitrap mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1049. P. 141.
16. *Hu H., Li T., Bao J., Zhang X., Sun X., Xu K., Liu Q., Guo Y.* Determination of phthalates in marine sediments using ultrasonic extraction followed by dispersive solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. Sci.* 2021. Article bmab080. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab080>
 17. *Li L., Zhang M.* Development of immunoassays for the determination of phthalates // *Food Agr. Immunol.* 2020. V. 31. № 1. P. 303.
 18. *Sun Q., Chen Y., Li F., Jia M., Shi G.* A one-step incubation ELISA kit for rapid determination of dibutyl phthalate in water, beverage and liquor // *Open Chem.* 2019. V. 17. № 1. P. 392.
 19. *Li M., Cui Y., Liu Z., Xue Y., Zhao R., Li Y., Du D.* Sensitive and selective determination of butyl benzyl phthalate from environmental samples using an enzyme immunoassay // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 687. P. 849.
 20. *Chen Y., Cui X., Wu P., Jiang Z., Jiao L., Hu Q., Eremin S.A., Zhao S.* Development of a homologous fluorescence polarization immunoassay for diisobutyl phthalate in Romaine lettuce // *Food Anal. Methods.* 2017. V. 10. № 2. P. 449.
 21. *Hendrickson O.D., Taranova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A.* Fluorescence polarization-based bioassays: New horizons // *Sensors.* 2020. V. 20. № 24. P. 7132.
 22. *Huang X., Tang X., Jallow A., Qi X., Zhang W., Jiang J., Li H., Zhang Q., Li P.* Development of an ultrasensitive and rapid fluorescence polarization immunoassay for ochratoxin A in rice // *Toxins.* 2020. V. 12. № 11. P. 682.
 23. *Yang H., He Q., Eremin S.A., Pan J., Zou Y., Cui X., Zhao S.* Fluorescence polarization immunoassay for rapid determination of dehydroepiandrosterone in human urine // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021. V. 413. № 17. P. 4459.
 24. *Tian X., Dong Y., Wang Y., Song Z., Meng M., Eremin S.A., Deng C., Yin Y., Xi R.* Quantification of diethyl phthalate by a rapid and homogenous fluorescence polarization immunoassay // *Anal. Lett.* 2015. V. 48. № 18. P. 2843.
 25. *Cui X., Wu P., Lai D., Zheng S., Chen Y., Eremin S.A., Peng W., Zhao S.* Development of a highly specific fluorescence immunoassay for detection of diisobutyl phthalate in edible oil samples // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. № 42. P. 9372.
 26. *Ius A., Bacigalupo M., Meroni G., Pistillo A., Roda A.* Development of a time-resolved fluoroimmunoassay for phthalate esters in water // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1993. V. 345. № 8. P. 589.
 27. *Raysyan A., Moerer R., Coesfeld B., Eremin S.A., Schneider R.J.* Fluorescence polarization immunoassay for the determination of diclofenac in wastewater // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021. V. 413. № 4. P. 999.
 28. *Pourfarzaneh M., White G., Landon J., Smith D.* Cortisol directly determined in serum by fluoroimmunoassay with magnetizable solid phase // *Clin. Chem.* 1980. V. 26. № 6. P. 730–733.
 29. *Long G.L., Winefordner J.D.* Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition // *Anal. Chem.* 1983. V. 55. № 7. P. 712A.
 30. *Lai D., Zheng S., Zhao S.* Synthesis of artificial antigens for immunoassay of four phthalate esters // *Food Sci.* 2016. V. 37. № 5. P. 114.
 31. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), *Compendium of Analytical Nomenclature (Orange Book)*. United Kingdom: Blackwell Science, 1998. P. 223.
 32. *Carr Kinnear E.J., Miller K.Y., Tong A.Z.* Impacts of brewing time, brewing temperature and brands on the leaching of phthalates and bisphenol A in dry tea // *Food Addit. Contam. A.* 2021. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1940307>.
 33. *Berlina A.N., Sharma A.K., Zherdev A.V., Gaur M.S., Dzantiev B.B.* Colorimetric determination of lead using gold nanoparticles // *Anal. Lett.* 2015. V. 48. № 5. P. 766.