

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
Химический факультет (кафедра аналитической химии)*

# **Оптические сенсорные системы для определения маркеров нейромедиаторного обмена: от простого к сложному**

***доцент, к.х.н. Веселова Ирина Анатольевна***

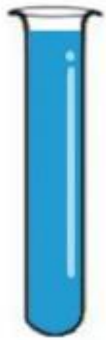
*e-mail: irina.veselova@mail.ru*



***Неделя науки в МГУ, Москва, 27-30 ноября 2017 г.***

*Зависимость состояния и настроения человека от гормонального фона*

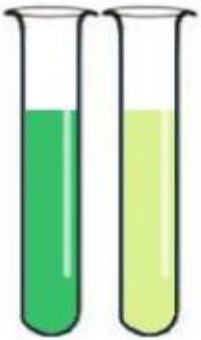
мания



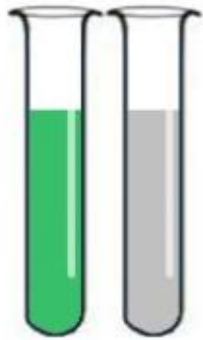
тревога



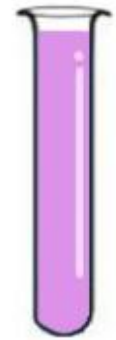
счастье



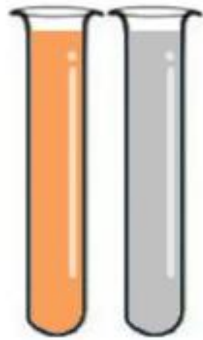
интерес



гнев



азарт



стресс



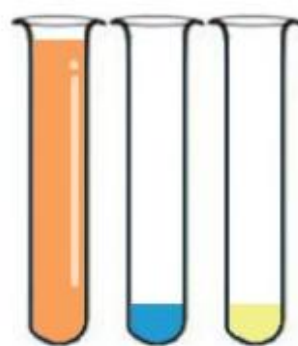
депрессия



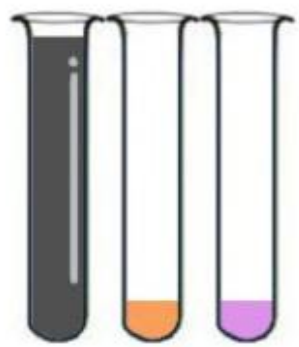
аутизм



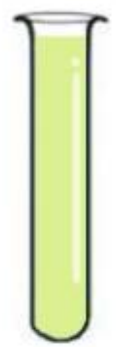
страх



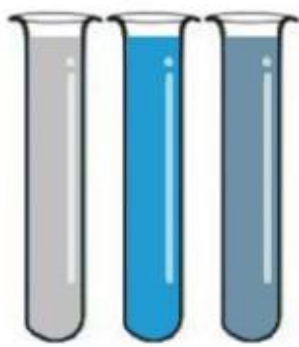
апатия



эйфория



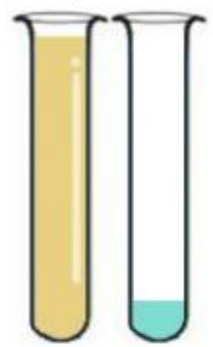
озарение



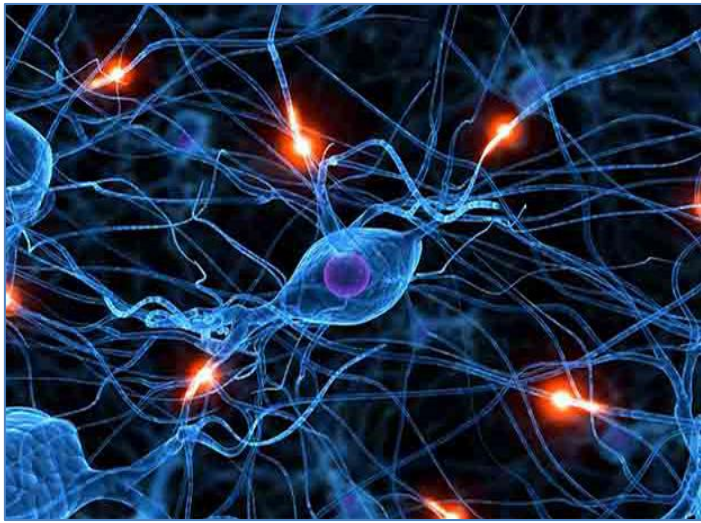
грусть



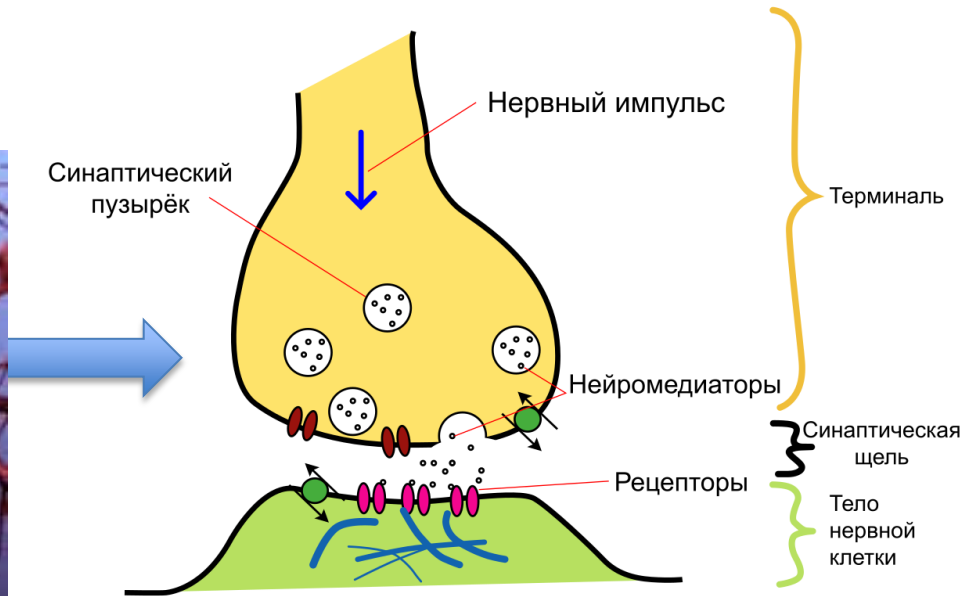
раздражение



-  допамин
-  серотонин
-  эндорфин
-  окситоцин
-  норадреналин
-  адреналин
-  эстрадиол
-  тестостерон
-  фенилэтиламин
-  мелатонин
-  вазопрессин
-  прогестерон
-  пролактин
-  ацетилхолин
-  тироксин



**Нейромедиаторы:** биологически активные вещества, посредством которых осуществляется передача электрохимического импульса от нервной клетки



**Синапс -**  
 Место контакта нейронов друг с другом и с другими клетками

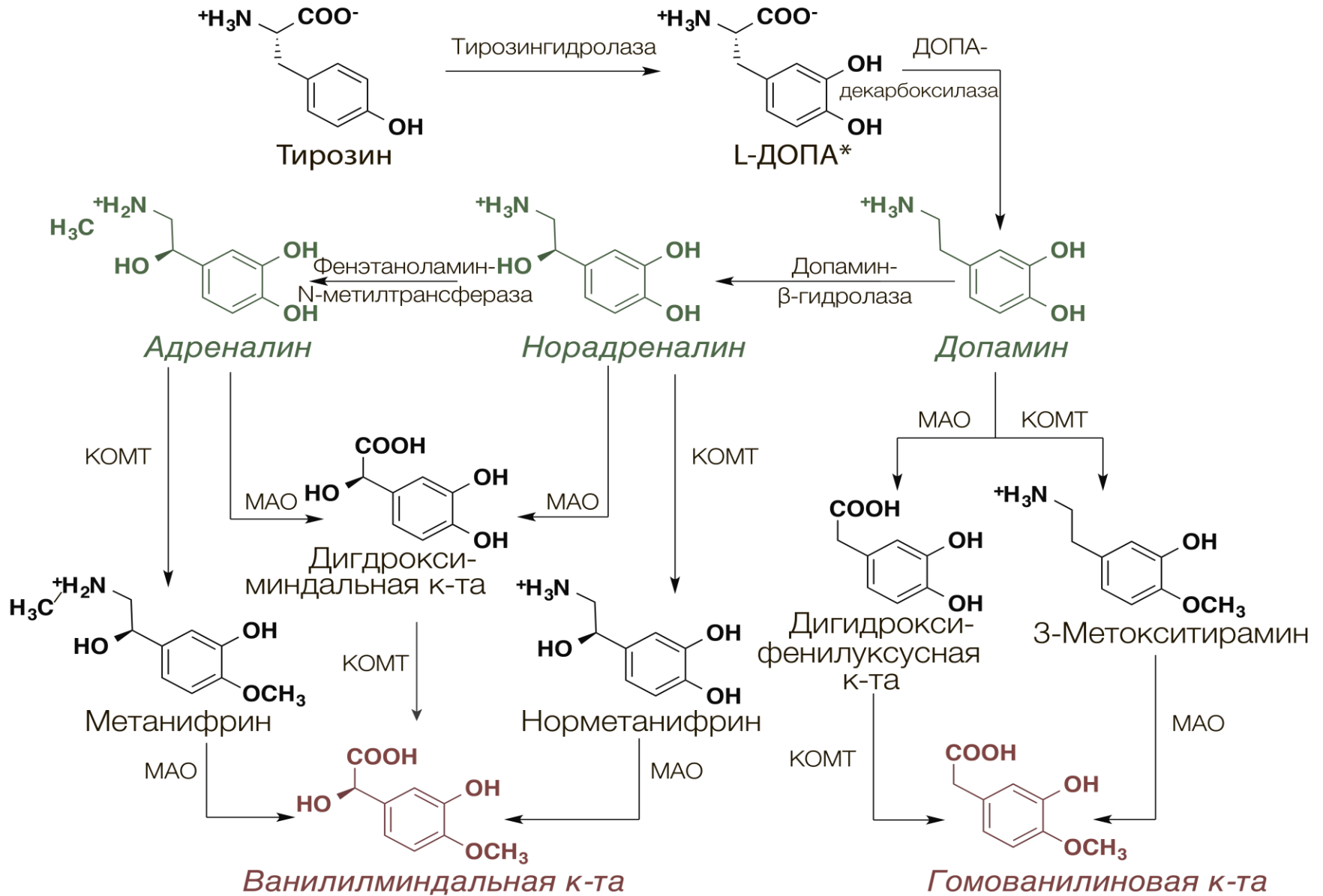
Пузырьки с медиатором

Синаптическая щель

**Катехоламины и их метаболиты –**  
 важнейшие маркеры  
 нейромедиаторного обмена!

<https://youtu.be/ZTF4u-GbB94>

# Катехоламины - основные маркеры нейромедиаторного обмена



На сердечно-сосудистую систему:  
повышает пульс, проводимость и  
сократимость в сердце, сокращение  
артерий, повышение давления.

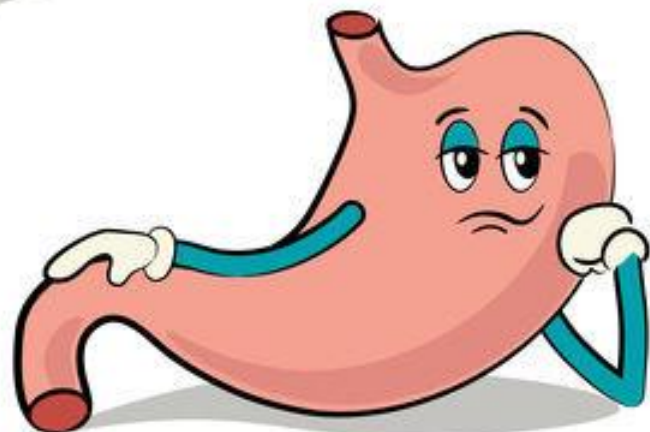
На дыхательную систему:  
расширение бронхов.

На пищеварительную систему: снижение  
моторики кишечника и желудка, снижение  
секреции поджелудочной железы.

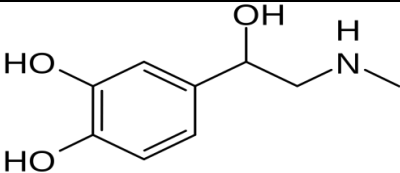
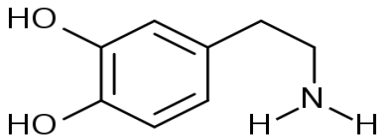
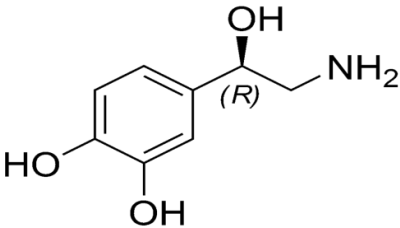
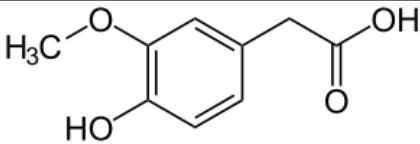
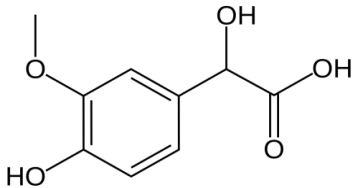
Глаза: расширение зрачка.

Кожа: повышение потоотделения.

**Катехоламины** –  
основные маркеры  
нейромедиаторного обмена



# Катехоламины, метаболиты и их референсные значения в моче и крови

Название	Формула	Содержание в моче, мкМ	Содержание в крови, нМ
Эпинефрин (АД)		0 – 0.2	0.07 – 0.6
Дофамин (ДА)		0.34 – 2.6	0.05 – 0.5
Норэпинефрин (НА)		0.1 – 0.4	0.6 – 2.7
Гомованилиновая кислота (ГВК)		0 – 45	9000 – 18000
Ванилилминдальная кислота (ВМК)		0 – 72	15000 – 25000

## Диагностика заболеваний по изменению/повышению концентраций катехоламинов и их метаболитов в биологических жидкостях

Название	Карциноид	Феохромоцитома	Нейробластома
АД	Увеличивается в <b>3 – 5</b> раз	Увеличивается в <b>10 – 100</b> раз	–
ДА	–	–	Увеличивается в <b>10<sup>3</sup> - 10<sup>5</sup></b> раз
НА	Увеличивается в <b>3 – 5</b> раз	Увеличивается в <b>10 – 100</b> раз	Увеличивается
ГВК	–	Увеличивается в <b>10 – 100</b> раз	Увеличивается в <b>10<sup>3</sup> - 10<sup>5</sup></b> раз
ВМК	–	–	Увеличивается в <b>10<sup>3</sup> - 10<sup>5</sup></b> раз

# Диагностика заболеваний по изменению/понижению концентраций катехоламинов и их метаболитов в биологических жидкостях

Метаболизм катехоламинов (КА) является одной из важнейших составляющих **нервной медиации**, как в периферической, так и центральной нервной системе.



Изменения в синтезе и метаболизме КА в организме связаны с этиологией когнитивных нарушений, в том числе болезней **Альцгеймера и Паркинсона**.

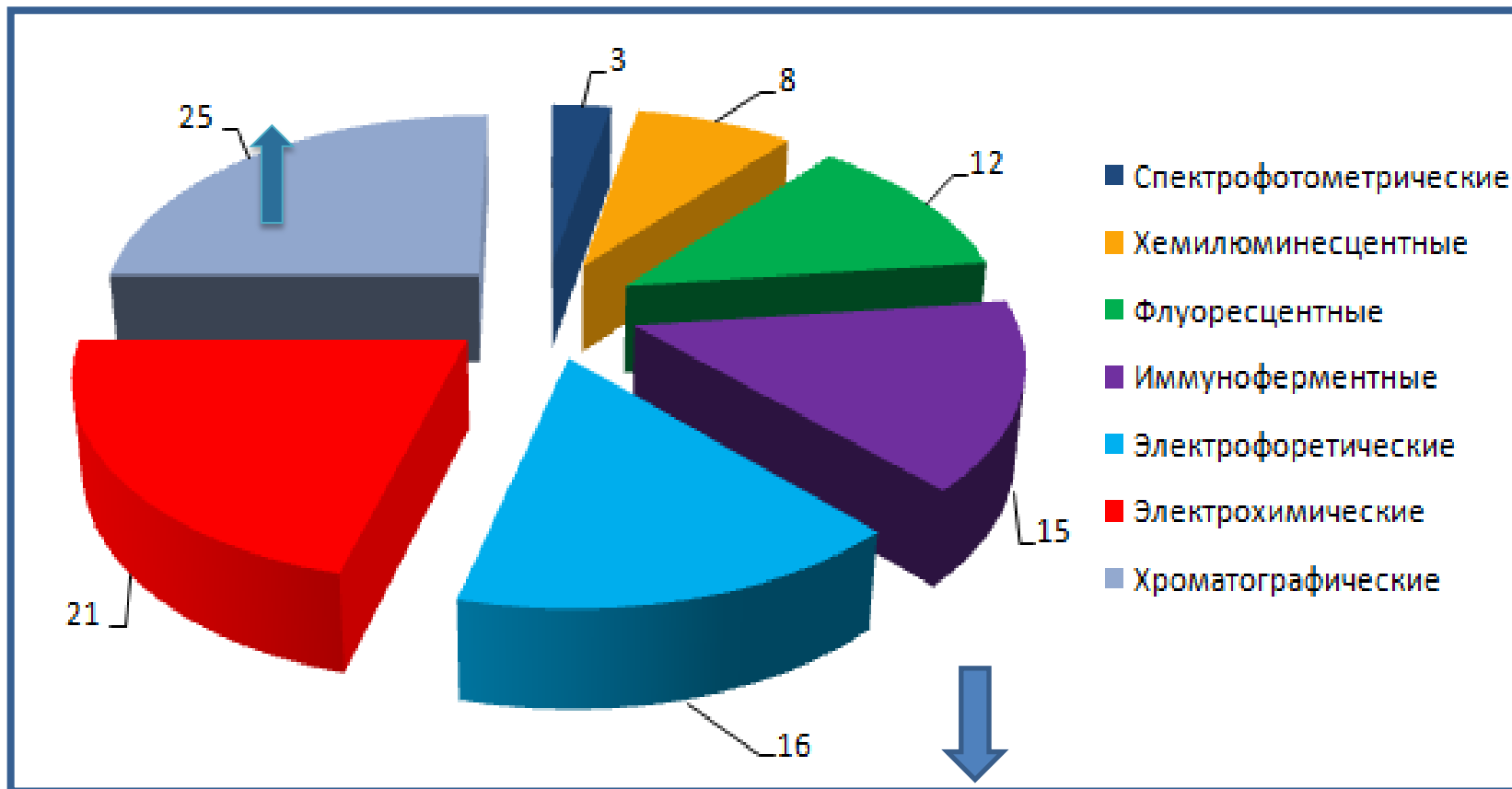


Сложность определения маркеров нейромедиаторного связана с их многообразием, неустойчивостью и низкими концентрациями в биообъектах - на уровне 1 нМ (и ниже) в плазме крови.



# Методы определения катехоламинов и их метаболитов

Высокая чувствительность и селективность **ВЭЖХ-МС** - не обеспечивает **нужной экспрессности и требует пробоподготовки** к анализу, а также высокая стоимость оборудования ограничивает применимость этого метода.



**Иммунохимические методы:** недостаточная чувствительность, селективность, экспрессность, сложная пробоподготовка, а также **высокий процент ложноположительных результатов.**

## Проблемы определения катехоламинов и их метаболитов различными методами:

В связи с этим существует потребность в чувствительных, селективных, при этом простых, точных и экспрессных (длительность анализа не должна превышать 15 – 30 мин) методиках их определения в биологических объектах.

Кроме того:

Определение катехоламинов и их метаболитов в целях клинической диагностики должно быть

**мультиплексным** – единовременное определение нескольких аналитов в образце биообъекта.

# Методы спектроскопии

Эмиссионная  
спектроскопия

Спектроскопия  
рассеяния

Испускание

Рассеяние

Взаимодействие  
ЭМИ с веществом

**e** – Emission,  
испускание

**s** – Scattering,  
рассеяние

Поглощение

$E_e$

Абсорбционная  
спектроскопия

$I_s$

$\lambda_a$

**a** – Absorption, поглощение

# Аппаратурное оформление

Спектрофотометр



Спектрофлуориметр



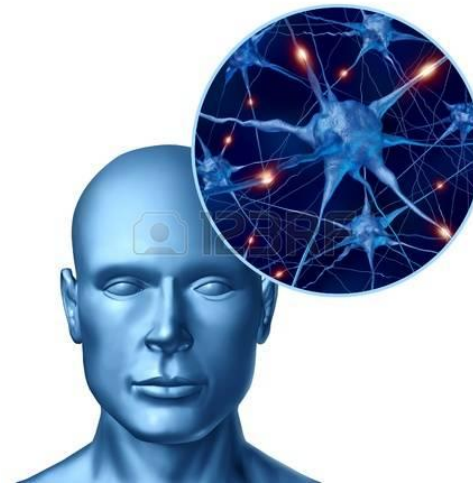
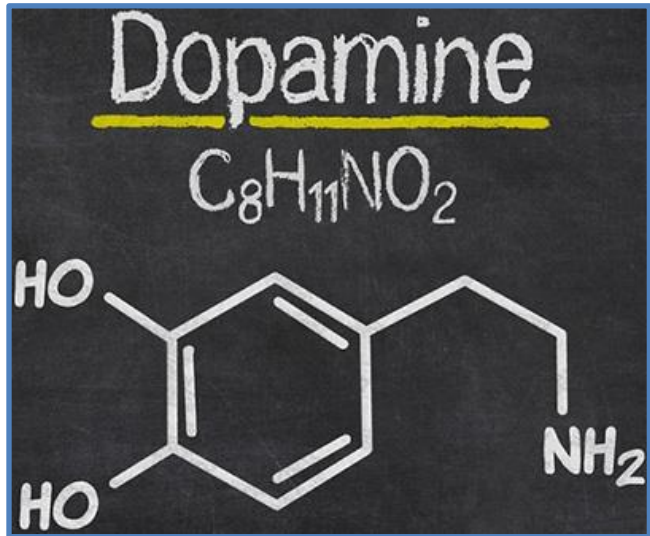
Рамановский спектрометр



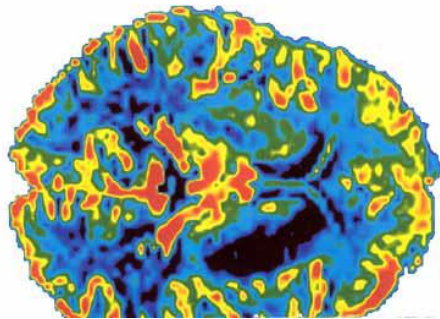
И это тоже  
оптический прибор!



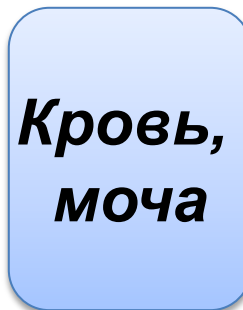
# Определение дофамина



## Объекты исследования



**Мозг человека**



**Кровь,  
моча**



**Клетка**

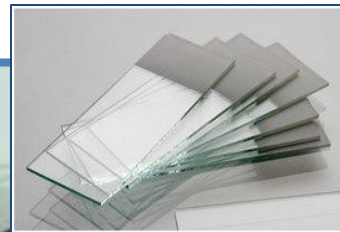


**Лекарственный  
препарат**

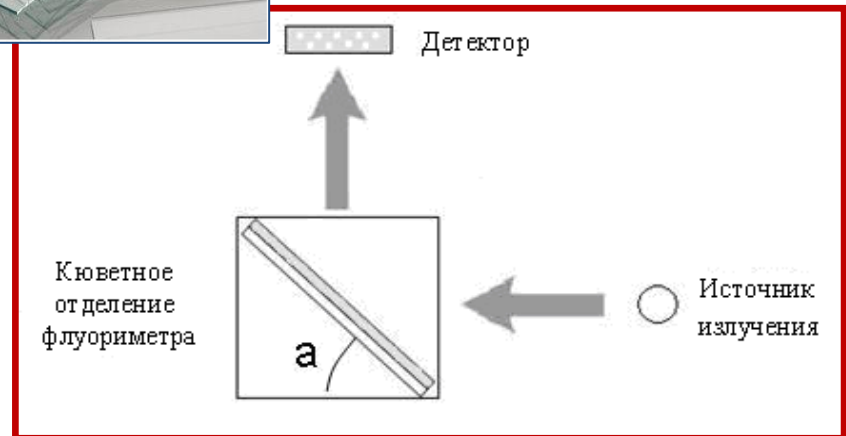
# Перспективное направление исследований:

Создание новых твердофазных оптических сенсорных систем (устройств), **аналитический сигнал** (спектрофотометрический, флуориметрический, гигантского комбинационного рассеяния - ГКР) которых формируется не в матрице анализируемого образца, а **непосредственно в распознающем (индикаторном) полимерном слое на поверхности носителя** – стекле, планшете.

## Регистрация аналитического сигнала:



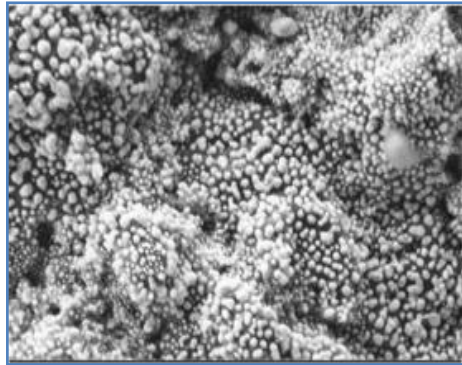
### Флуориметрический



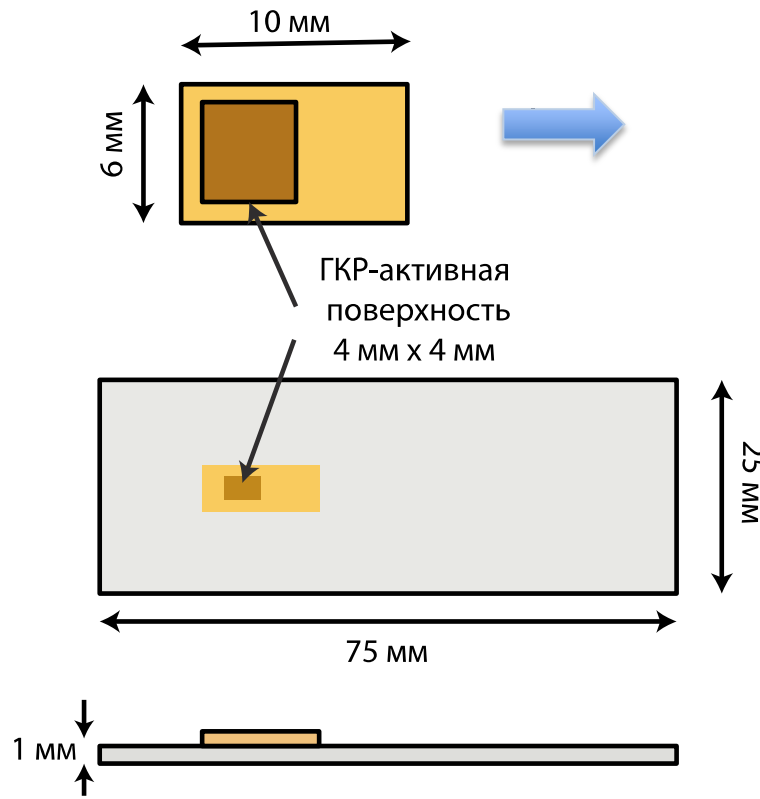
# Перспективное направление исследований:

Создание новых твердофазных оптических сенсорных систем (устройств), **аналитический сигнал** (спектрофотометрический, **флуоресцентный**, **гигантского комбинационного рассеяния - ГКР**) которых формируется не в матрице анализируемого образца, а **непосредственно в биораспознающем слое на поверхности носителя** (оптического стекла, полимера).

## Регистрация ГКР-сигнала:



1  $\mu\text{m}$



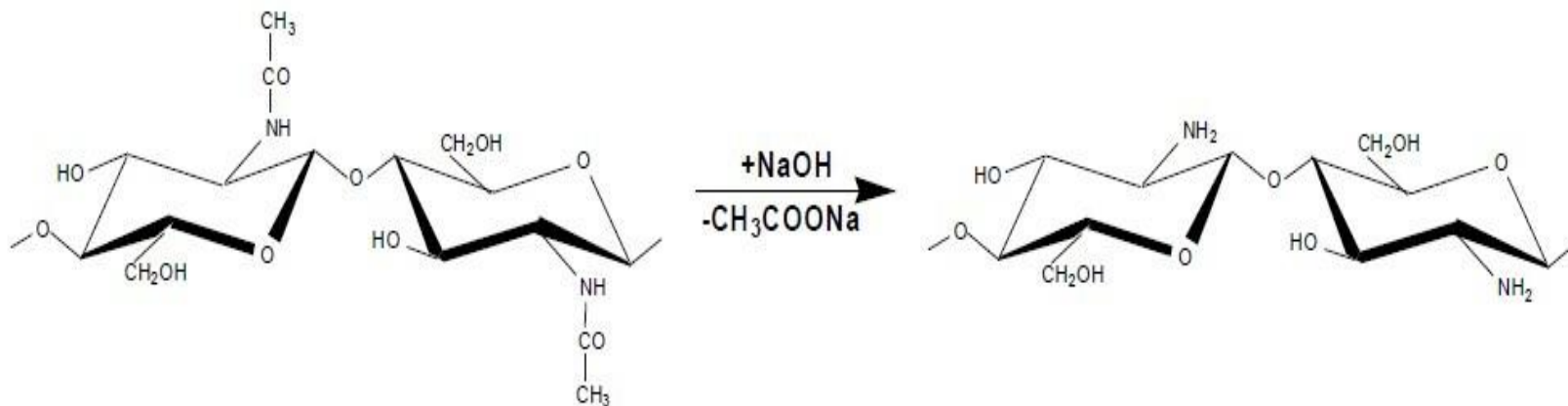
## Преимущества предложенного подхода:

Получение твердофазных оптических сенсорных систем на основе **гибридных материалов**, со следующими характеристиками:

- ✓ **распознающие свойства** к актуальным для каждого объекта маркерам нейромедиаторного обмена,
- ✓ генерирование аналитического сигнала в полимерном слое **независимо от матрицы анализируемого объекта**,
- ✓ возможность их **количественного определения**, в том числе **мультиплексного**,
- ✓ возможность **одновременного анализа** нескольких проб.



# Матричный элемент гибридных материалов: хитозан



Источники:



Свойства биополимера:

- Высокие сорбционные характеристики, биосовместимость.
- Механическая прочность, возможность химической модификация полимера.
- Способность формировать структурированные пленки, гели, мембраны.
- Отсутствие поглощения в ближней УФ- и видимой областях спектра!

# Индикаторные реакции и матрицы для определения биологически активных соединений: подходы к созданию высокочувствительных и селективных твердофазных сенсорных систем

1

## Хитозан как компонент индикаторной реакции

- Предложены **фотометрическая** твердофазные индикаторная системы для определения **катехоламинов и их метаболитов**, основанные на взаимодействии продуктов их ферментативного окисления с функциональными группами хитозана.

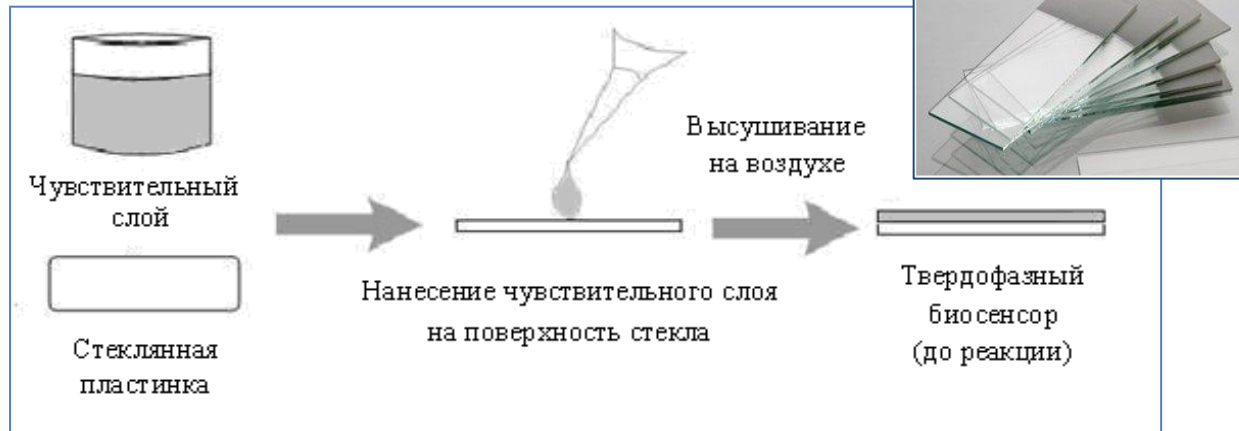
2

## Импрегнирование компонентов индикаторной системы в матрицу биораспознающего слоя

- Предложена **высокочувствительная флуориметрическая** индикаторная система, основанная на приеме ферментативной дериватизации, для определения **катехоламинов и их метаболитов**.

# Формирование биочувствительного слоя на поверхности оптического стекла или в ячейках планшета

Спектрофотометрия/Флуоресценция/  
флуоресцентная микроскопия



ГКР

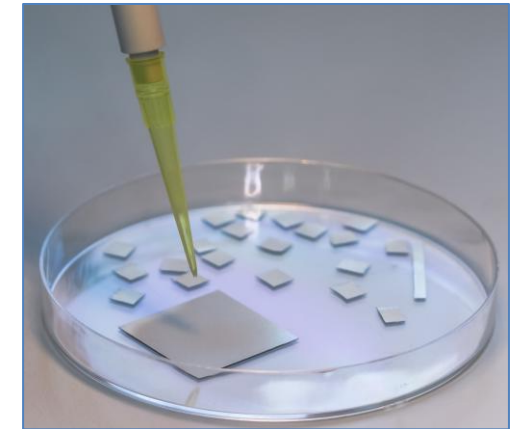
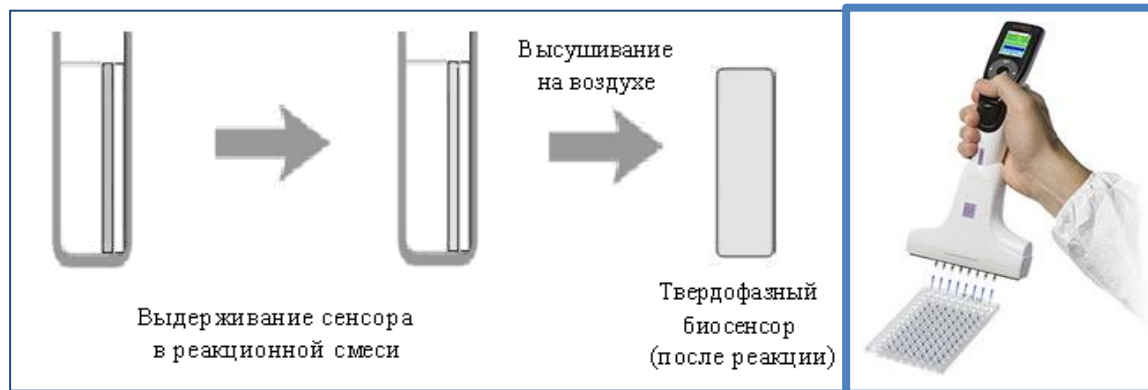


Схема проведения анализа



# Принцип действия флуоресцентных сенсорных устройств:

**молекулярное распознавание** определяемых соединений (аналитов) биологическим катализатором – ферментом.

## Пероксидаза из корней хрена

катализирует окисление катехоламинов пероксидом водорода

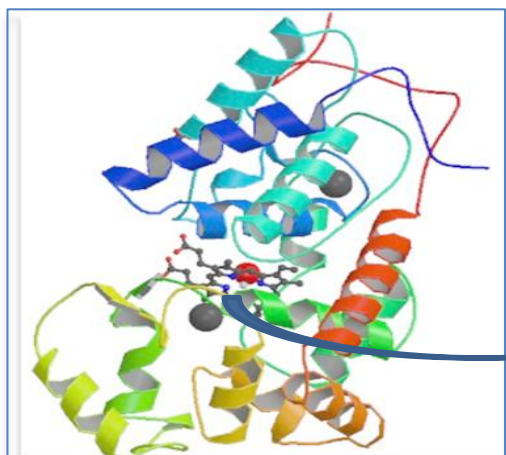
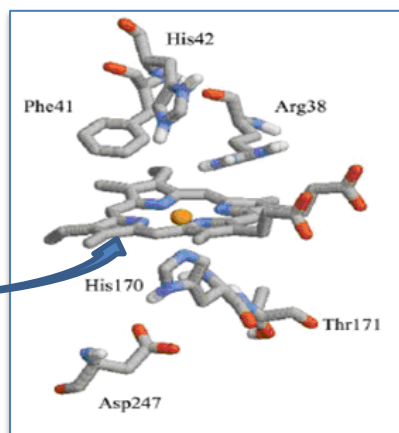


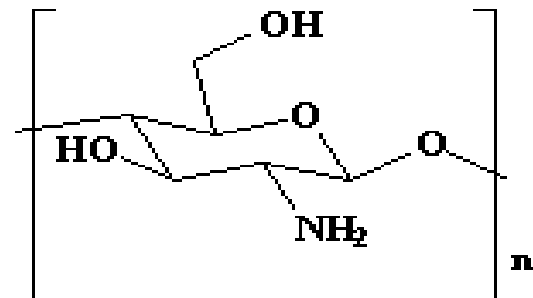
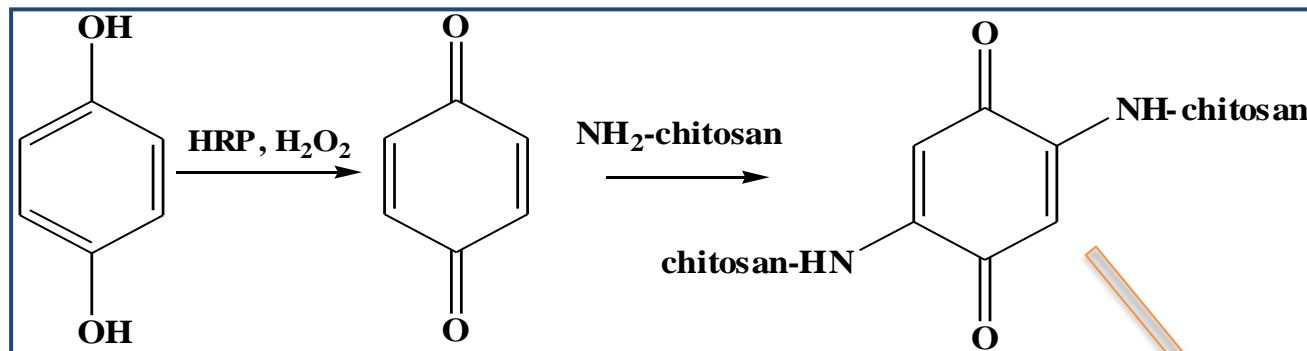
Figure 2: Three dimensional view of horseradish peroxidase. The heme group is located in the center and is mostly black with the iron atom in red. The calcium ions are black spheres and the  $\alpha$ -Helical and  $\beta$ -sheets are surrounding the heme group.



**Гликопротеид**, состоящий из полипротеидной цепи, формирующей двухдоменную глобулу, и активного центра, главную роль в котором играет группа с атомом железа.

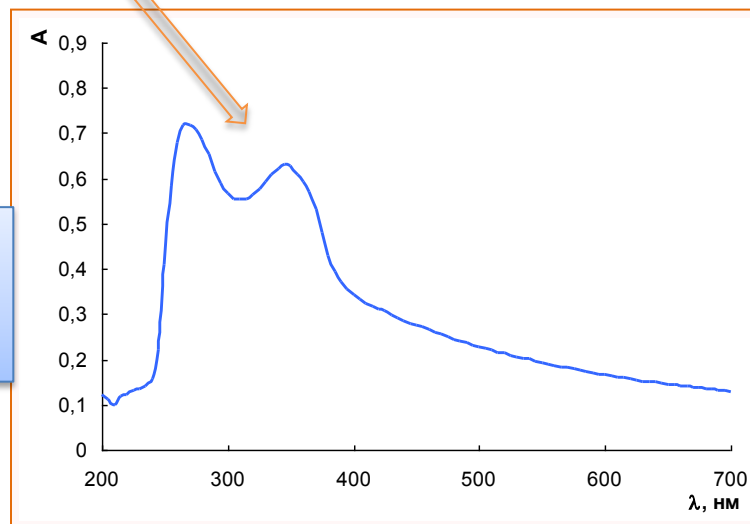
# Хитозан как компонент фотометрической индикаторной реакции

Индикаторная система биосенсора (на примере гидрохинона):



[Dr. Gregory F. Payne, Univ. of Maryland Biotechnology Institute](#)

Аналитический сигнал регистрировали **спектрофотометрически** по поглощению продукта индикаторной реакции в пленке хитозана при 365 нм.



I.A. Veselova, L.I. Malinina, P.V. Rodionov, T.N. Shekhovtsova. Properties and analytical applications of the self-assembled complex {peroxidase–chitosan}. *Talanta*. 2012. V.102. p.101-109.

## Хитозан как компонент фотометрической индикаторной реакции

Оптический сенсор для определения фенольных соединений  
в водонерастворимых объектах – инъекционные эмульсии

Аналитические характеристики биосенсора для  
определения **дофамина**  
объемы проб 2,5 мл (I) и 5 мл (II)

Характеристика биосенсора	Объем пробы	
	I	II
Диапазон линейности, мкМ	1 - 100	1 - 100
$r$	0,9981	0,9995
Коэффициент чувствительности, $M^{-1}$	$3,8 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^4$
$C_{min}$ , мкМ	0,3	0,3
$s_r$ (при $c_H$ , $n=5$ )	0,06	0,17



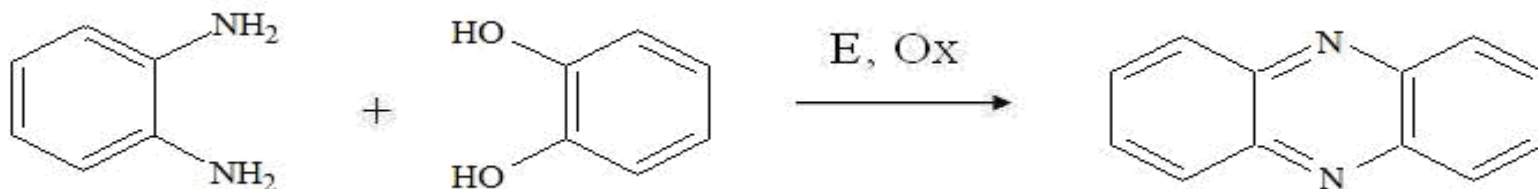
Содержание  
дофамина, %:  
**(1,5 ± 0,2)**

# Импрегнирование компонентов индикаторной реакции в биораспознающий слой (хитозан + E)



- Возможности повышения чувствительности и селективности определения аналитов.
- Расширение круга анализируемых веществ и объектов.

Дериватизация нейромедиаторов – катехоламинов, а так же их метаболитов ароматическими аминами – дифенилэтилендиамином и бензиламином



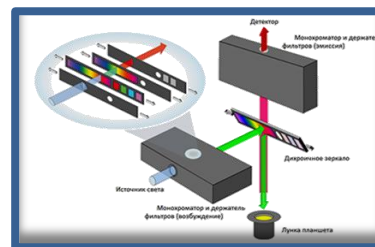
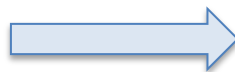
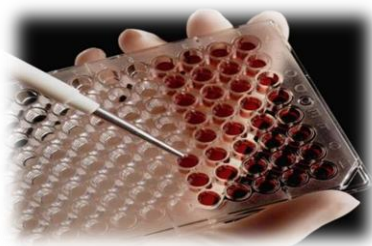
Параметр	Условия дериватизации с бензиламином	
	$K_3[Fe(CN)_6]$	<b>Пероксидаза</b>
Растворитель	Метанол, 70 об. %	Вода
Буферный раствор, pH	Глициновый, 8,0-9,0	
Температура, °C	50	25
Время дериватизации, мин	30	5



Предел обнаружения катехоламинов составил 3 нМ.

# Разработка методик для экспрессного мультиплексного определения нейромедиаторов из одной пробы в 96-луночном планшете

## Схема детектирования флуоресцентного сигнала



Параметр	ДА, НА	Метилдофа	АД, НА	ГВК	ВМК	
	Дериватизирующий реагент				-	-
	<b>ДЭД</b>		<b>БА</b>		-	-
Буферный раствор	глициновый		CAPS		фосфатный	
рН	8.0		11.0		7.0	
Растворитель	<b>Вода</b>					
Температура	<b>25°C</b>					
Среагента, мМ	3		33		-	
$C_{H_2O_2}$ , мМ	0.1					
$\lambda_{ex}$ , нМ	340	300	356 (АД), 340 (НА)	315	270	
$\lambda_{em}$ , нМ	458 (ДА), 462 (НА)	440	485 (АД), 462 (НА)	425	315	



# Аналитические характеристики методик флуоресцентного мультиплексного определения катехоламинов и их метаболитов

Определяемое соединение	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон определяемых содержаний, мкМ	$C_{min}$ , мкМ	Коэффициент корреляции, r	$S_r$ (при $s_n$ , $n = 4$ , $P = 0.95$ )
<b>Дериватизирующий агент – 1,2-дифенилэтилендиамин (ДЭД)</b>					
Дофамин	$I = (2.9 \pm 0.2) \times 10^7 c + (18 \pm 1)$	0.25 – 2.5	0.01	0.992	0.01
Норэпинефрин	$I = (1.14 \pm 0.04) \times 10^9 c + (438 \pm 2)$	0.025 – 0.25	0.003	0.996	0.01
Метилдофа	$I = (5.7 \pm 0.22) \times 10^6 c + (201 \pm 1)$	1 – 10	0.5	0.996	0.01
<b>Дериватизирующий агент – бензиламин (БА)</b>					
Норэпинефрин	$I = (2.4 \pm 0.08) \times 10^8 c + (196 \pm 1)$	0.05 – 0.5	0.01	0.997	0.01
Гомованилиновая кислота	$I = (2.31 \pm 0.03) \times 10^7 c + (204 \pm 1)$	0.5 – 5	0.1	0.999	0.01
Эпинефрин	$I = (9.6 \pm 0.3) \times 10^8 c + (190 \pm 1)$	0.005 – 0.075	0.003	0.998	0.01
<b>Дериватизирующий агент – бензиламин (БА)</b>					
Ванилилминдальная кислота	$I = (2.2 \pm 0.97) \times 10^5 c + (16 \pm 1)$	25 – 250	13	0.994	0.02

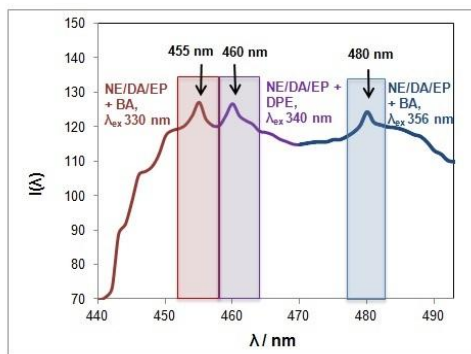
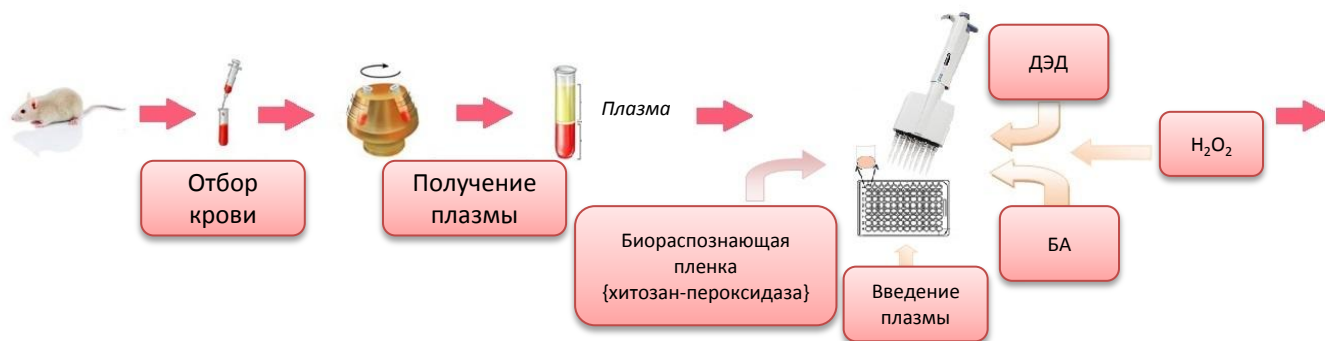
**Диагностика:** нейробластома, феохромоцитома и карциноидные опухоли

# Диагностические возможности разработанных методик при рассмотрении перекрестной селективности катехоламинов и их метаболитов

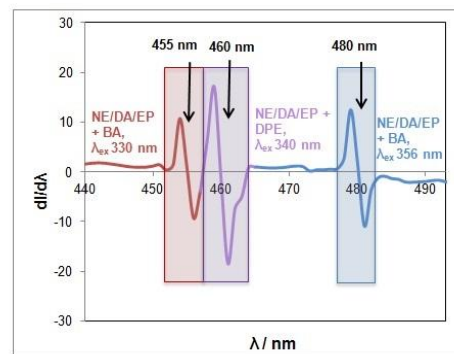
Рассматриваемые соединения	Дериватирующий агент	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	Идентифицируемое соединение	Диагностируемое заболевание
ДА / АД	ДЭД	340	458	ДА	Феохромоцитома
	БА	356	485	АД	
ДА / НА	ДЭД	340	458	ДА	Феохромоцитома и нейробластома
ДА / ГВК	ДЭД	340	458	ДА	
	БА	315	425	ГВК	
ДА / ВМК	ДЭД	340	458	ДА	Нейробластома
	БА	315	410	ВМК	
АД / НА	ДЭД	340	462	НА	Карциноид
	БА	356	485	АД	
ГВК / Метилдофа	ДЭД	300	440	Метилдофа	Феохромоцитома и нейробластома
	БА	315	425	ГВК	
ГВК / АД	БА	356	485	АД и ГВК	Феохромоцитома
		315	425	ГВК	
ВМК / АД	БА	356	485	АД и ВМК	Феохромоцитома и нейробластома
		315	410		
	ДЭД	356	485	АД	

# Схема мультиплексного определения ряда маркеров нейромедиаторного обмена - катехоламинов методом производной флуоресценции в биологических жидкостях

Индикаторная система: ферментативная дериватизация катехоламинов с дифенилэтилендиамином (ДЭД) или бензиламином (БА) с образованием флуоресцирующих продуктов реакции:



Исходный спектр флуоресценции продуктов дериватизации допамина (DA), адреналина (EP) и норадреналина (NE)



Первая производная спектра флуоресценции продуктов дериватизации допамина (DA), адреналина (EP) и норадреналина (NE)

Предложенный подход позволяет анализировать до 20 проб одновременно в течение 15-20 мин!

Разработка **ГКР (гигантское комбинационное рассеяние)** –  
сенсорных методик для экспрессного и **мультиплексного**  
определения катехоламинов и их метаболитов  
в целях диагностики заболеваний, связанных с этиологией  
КОГНИТИВНЫХ нарушений

**Комбинационное рассеяние света (эффект Рамана)** — неупругое рассеяние  
оптического излучения на молекулах вещества (твёрдого, жидкого или  
газообразного), сопровождающееся заметным изменением частоты излучения.

### **Ключевая проблема:**



Катехоламины и их метаболиты, поглощают в УФ-области (250-350 нм),  
что намного выше по энергии по сравнению с плазмонной полосой  
поглощения Ag (420 нм) и Au (550 нм).

### **Решение:**

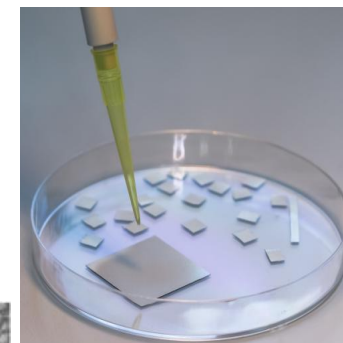
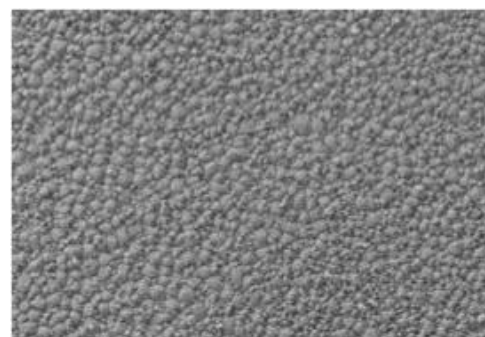
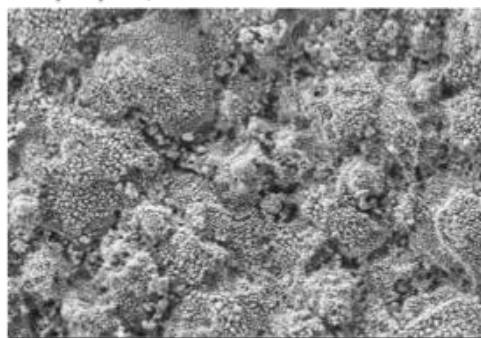
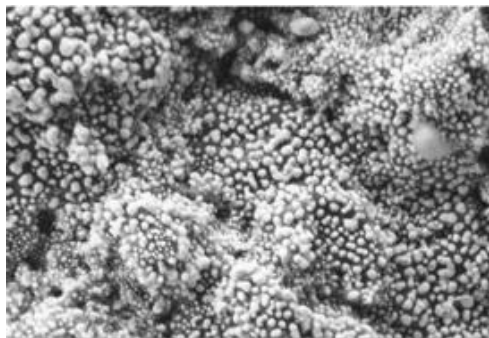
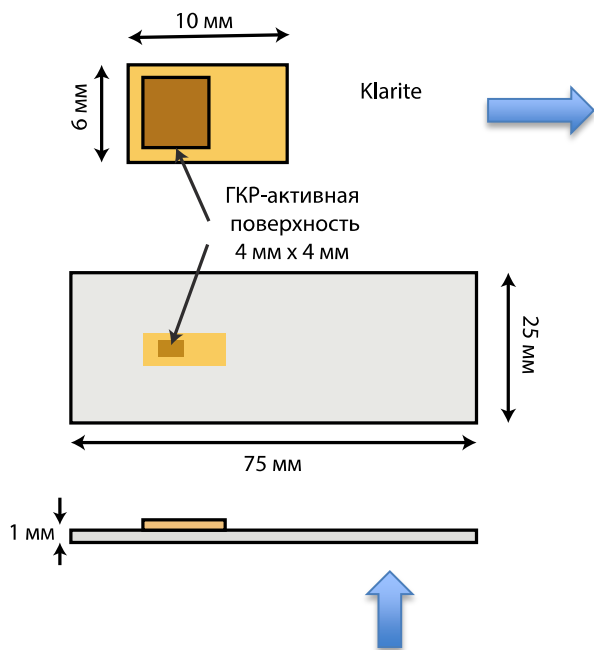


Направленное химическое модифицирование поверхности с  
использованием "распознающих" соединений – акцепторов  
– разработка новых **ГКР-индикаторных систем.**

# ГКР (гигантское комбинационное рассеяние)-сенсорное устройство

**ГКР** - это явление усиления сигнала КР молекулы (аналита) вблизи поверхности металлов, обладающих плазмонным резонансом – **метод оптических отпечатков!**

Схема сенсора



КР-спектрометр

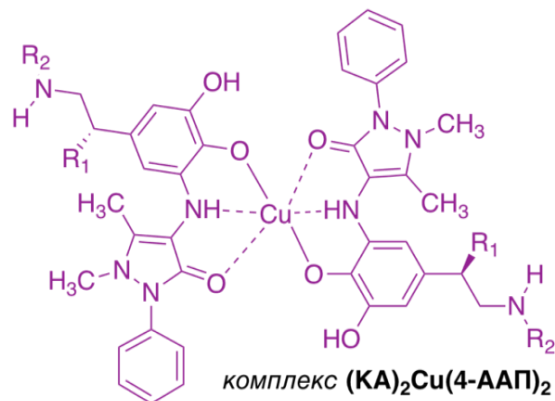
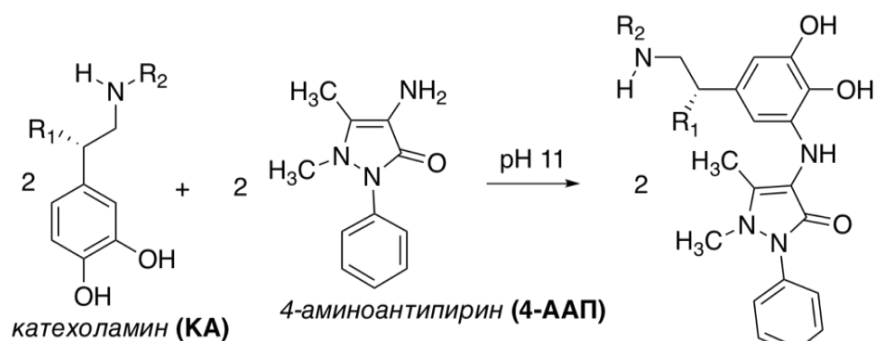
Магнетронное  
напыление  
наночастиц Ag

ППР  $\approx 420$  нм



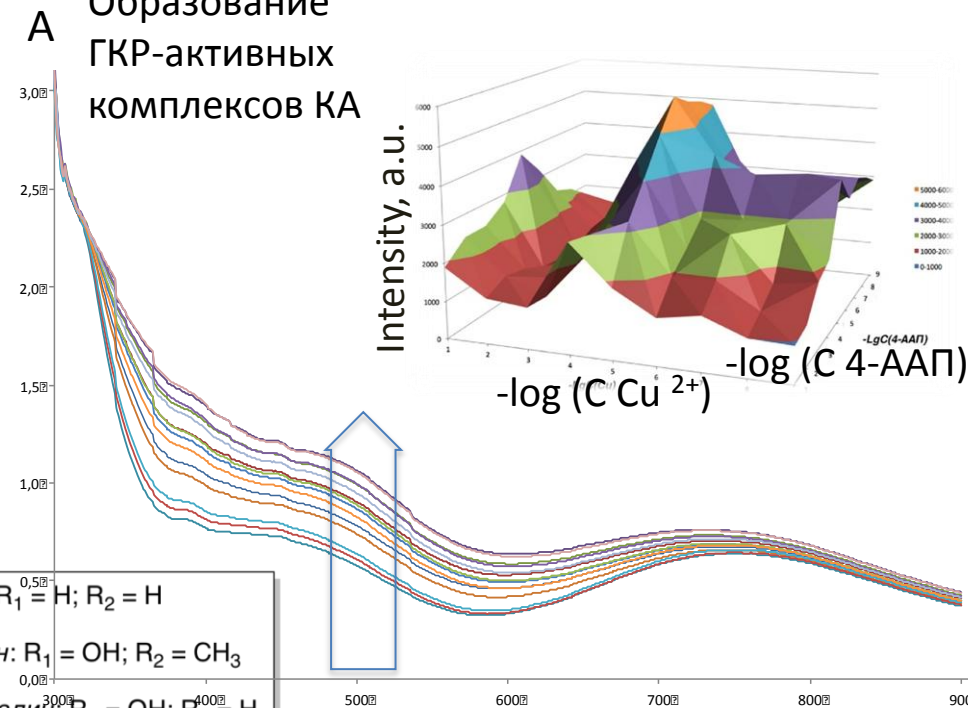
# ГКР (гигантское комбинационное рассеяние)-сенсорная система для определения катехоламинов:

## Образование тройного комплекса катехоламин-4-ААП-Cu(II)



Дофамин: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H  
 Адреналин: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
 Норадреналин: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H

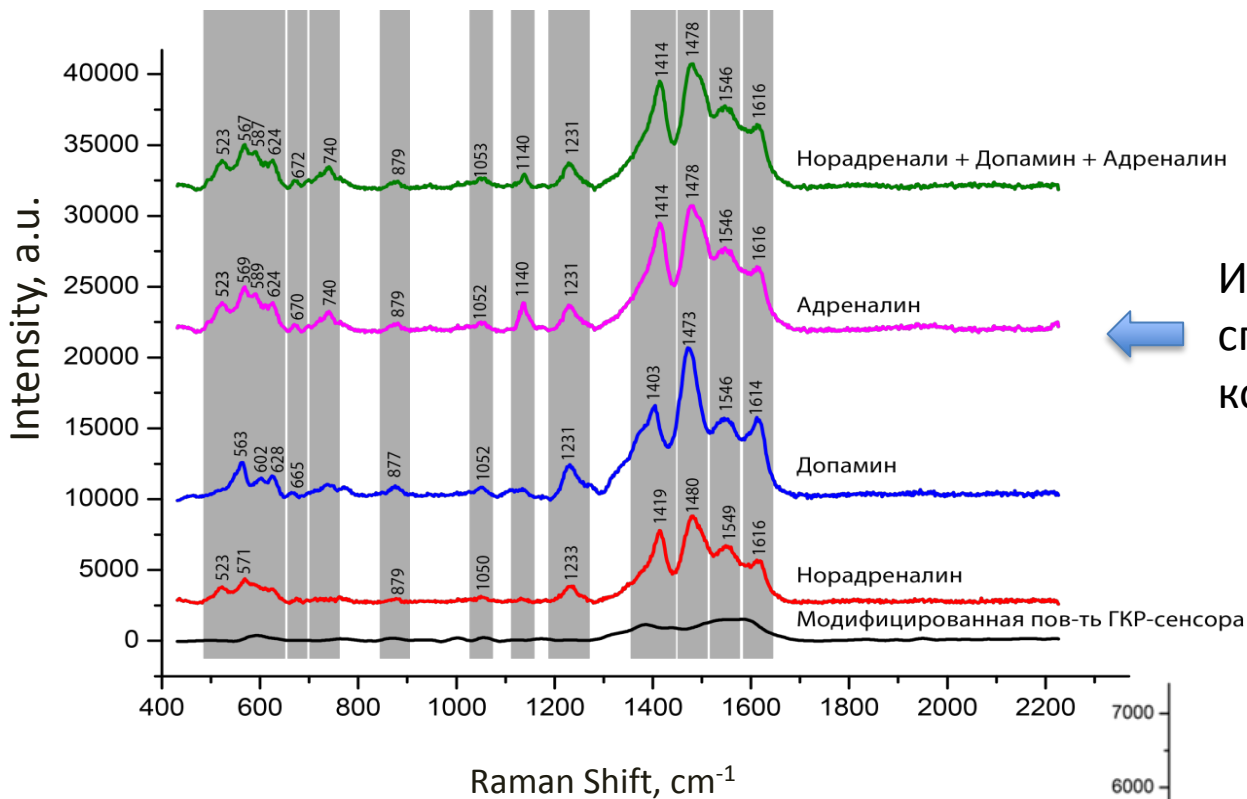
А Образование ГКР-активных комплексов КА



Комплекс	$\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^3, \text{M}^{-1}$	$K_f \cdot 10^7$	R <sup>2</sup>
(DA) <sub>2</sub> Cu(4-AAP) <sub>2</sub>	1.39 ± 0.07	9.49 ± 0.47	0.9330
(E) <sub>2</sub> Cu(4-AAP) <sub>2</sub>	1.25 ± 0.06	2.37 ± 0.12	0.9966
(NE) <sub>2</sub> Cu(4-AAP) <sub>2</sub>	1.42 ± 0.07	2.24 ± 0.11	0.9963

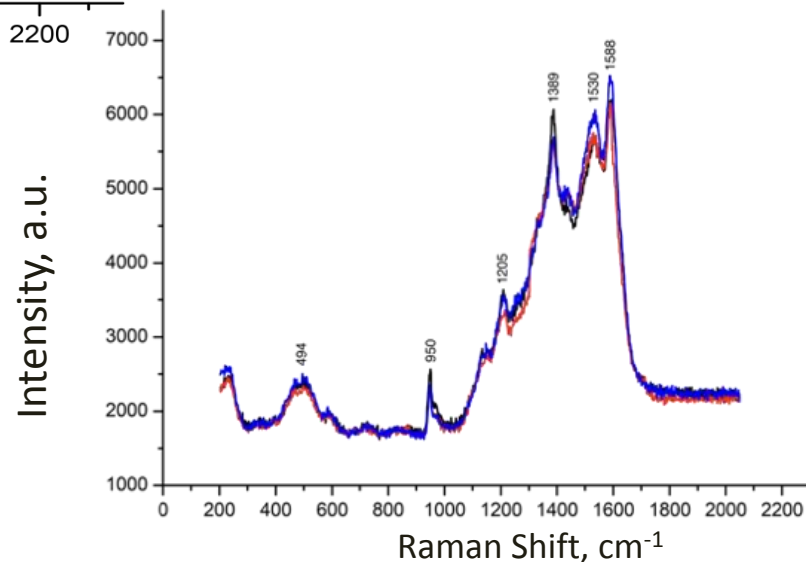


# Мультиплексное определение катехоламинов (КА) методом спектроскопии ГР



Индивидуальные и суммарный спектры ГР КА в составе комплекса с 4-ААП-Сu(II)

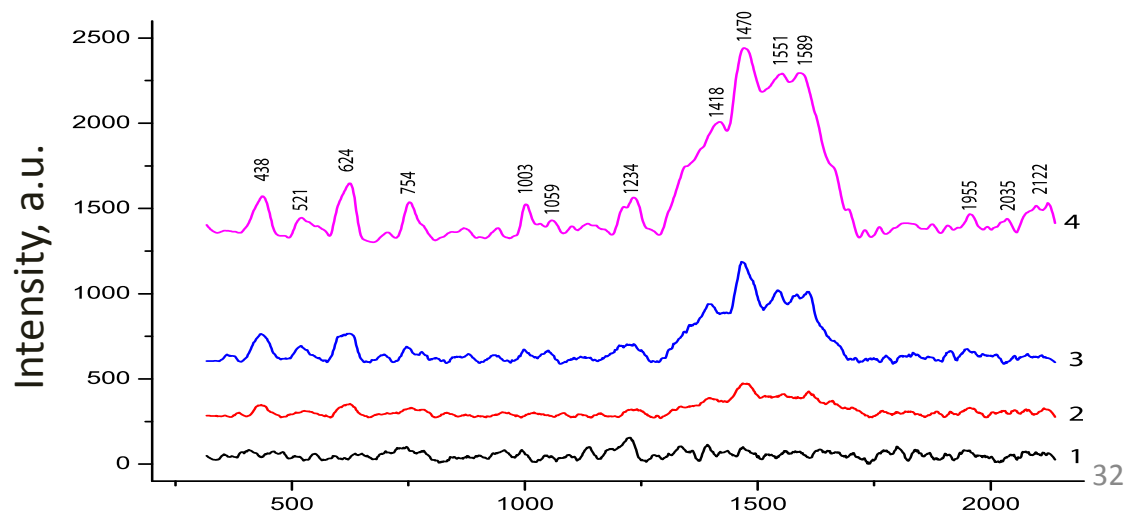
Воспроизводимость спектра ГР комплекса дофамин-4-ААП-Сu(II)



# Аналитические характеристики методики мультиплексного определения катехоламинов (КА) методом спектроскопии ГКР по образованию тройного комплекса 4-ААП-Cu(II)

КА	$\nu$ , см <sup>-1</sup>	Диапазон определяемых концентраций, нМ	Предел обнаружения, нМ
Дофамин	1478	0,01-10	0,004
Норадреналин	523	0,1-100	0,03
Адреналин	1140	0,1-100	0,03

## Апробация методики мультиплексного определения катехоламинов методом ГКР в плазме крови крыс после депривации





# Применение оптических сенсорных систем для определения катехоламинов и их метаболитов в анализе биологических объектов:

## Объекты анализа

*in vitro:*

Плазма крови, моча животных и человека



*ex vivo:*

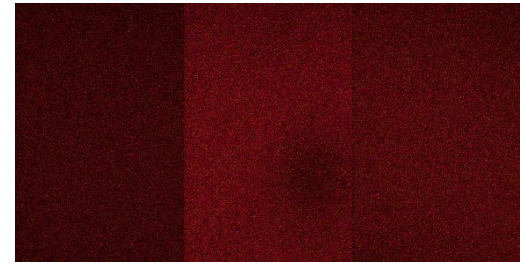
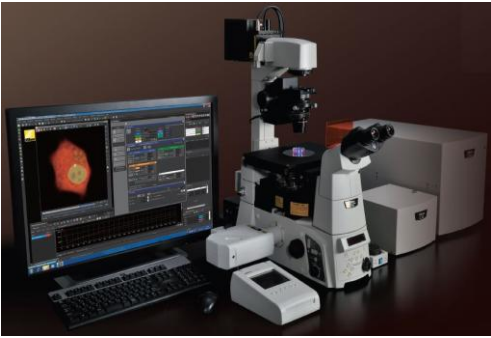
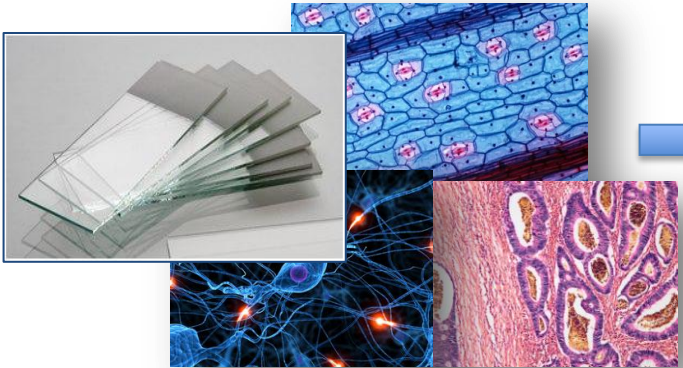
Живые клеточные культуры, ткани



Ганглии нервной ткани

Клетки: эритроциты, железистые эпителиальные клетки

## *in vivo: флуоресцентная конфокальная микроскопия*

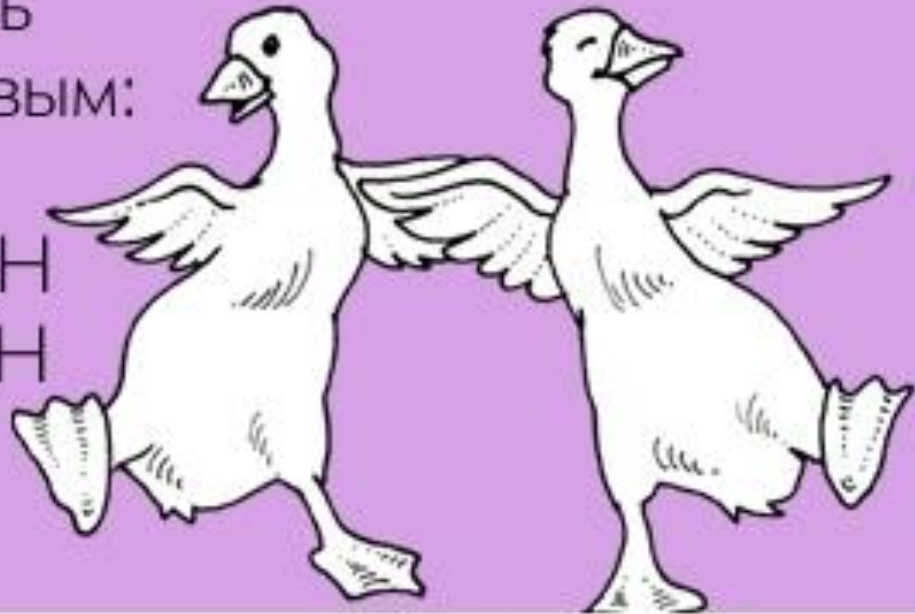


0 нМ    0.1 нМ    5 нМ

# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

На самом деле только две вещи  
могут сделать  
тебя счастливым:

СЕРОТОНИН  
и ДОФАМИН



tkritka.com