

Т.Н. Хмелевская¹, Д.Ю. Вандышев²

**Применение флуоресцентных зондов
как перспективный подход в диагностике
и терапии заболеваний**

¹ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России; ²ФГБОУ ВО ВГУ

Резюме. Физиологические и паталогические процессы организма определяют формирование метаболитов определенного состава и концентрации, их качественная и количественная оценка позволяет диагностировать общее состояние и выявлять заболевания. Известные на сегодняшний день методы инструментального анализа биопроб характеризуются рядом недостатков, в соответствии с чем актуален поиск новых тест-систем. В статье содержится информация об известных биомаркерах заболеваний, а также проведена оценка актуальных сенсоров для диагностики биопроб. Рассмотрена специфика поведения флуорохрома в качестве аналитической тест-системы. Отмечен уже существующий прогресс и перспективы развития поиска новых сенсоров для доклинической и клинической диагностики.

Ключевые слова: малоинвазивные и неинвазивные методы, квантовые точки, амины.

Актуальность. Малоинвазивные и неинвазивные подходы, включая методы адресной доставки лекарств, являются важными направлениями в медицинской терапии и диагностике. В клинической практике широко применяются различные инструментальные методы анализа биологических образцов, среди которых наиболее точными являются ВЭЖХ-МС, ГХ-МС и ЯМР [1]. Важно подчеркнуть, что такие способы требуют дорогостоящего оборудования, сложны в пробоподготовке, времязатратны, что делает их непригодными для экспресс-диагностики.

В свете последних научных открытий использование низкомолекулярных органических, полимерных и белковых наноразмерных систем, способных к химическим модификациям и обладающих улучшенными свойствами взаимодействия с биологическими объектами (адсорбция, распределение, метаболизм, элиминация, токсичность), становится наиболее перспективным подходом для достижения высоких терапевтических результатов в диагностике и лечении.

Органические флуоресцентные метки играют особую роль в диагностике злокачественных опухолей, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний и психоневрологических отклонений, что становится возможным вследствие связывания их с основными метаболитами воспалительных процессов и других патологий (преимущественно, азотсодержащими низкомолекулярными соединениями) [2].

Цель данной работы - анализ современных методов ранней диагностики заболеваний, основанных на использовании синтетических каркасов с явным аналитическим откликом на азотсодержащие низкомолекулярные соединения.

Биомаркеры. Исторически биомаркерами в медицине считались физиологические параметры, такие как температура тела, кровяное давление и сердечный ритм. Их отклонения фиксировали для выявления нарушений в работе органов. В современной медицине диагностические маркеры представляют собой определенные соединения или группы соединений, уровень которых указывает на

наличие болезни, в отдельных случаях позволяет выявить ее стадию. Такого рода маркеры особенно важны для ранней диагностики заболеваний, эффективность лечения которых на поздних стадиях практически отсутствует. В частности, к таким заболеваниям можно отнести онкологические.

Среди всего многообразия, отдельную категорию маркеров составляют низкомолекулярные органические вещества. Эти вещества включают разнообразные классы химических соединений, такие как углеводороды, ароматические соединения, спирты, альдегиды, кислоты, сложные эфиры, амины и тиолы [3]. Являясь конечным продуктом клеточного метаболизма, они могут предоставлять информацию о состоянии внутриклеточного обмена веществ. Кроме того, некоторые микроорганизмы, участвующие в развитии заболеваний, также синтезируют такие соединения.

Современные аналитические методы позволяют анализировать низкомолекулярные органические вещества в различных биологических матрицах, таких как выдыхаемый воздух, моча, слюна, кровь, фекалии, пот, сперма, выдыхаемый воздух и, в зависимости от концентраций, определять первоисточник нарушения того или иного биохимического процесса [4].

На сегодняшний день существуют базы данных, содержащие информацию о более чем 2000 идентифицированных низкомолекулярных соединениях, которые выделяются различными микроорганизмами и образуются в процессе различных заболеваний. Однако, следует отметить, что некоторые вещества из этого списка могут присутствовать в нормальном (здоровом) состоянии человека, поэтому оценка концентрации играет важную роль при определении их патогенности [5].

Анализ современной научной литературы в области химии, биологии и медицины показал, что одними из наиболее информативных маркеров воспалительных процессов являются азотсодержащие органические соединения - амины, ряд гормонов и аммиак. Так, к примеру, последний, образуется в ходе метаболизма бактерий и может быть обнаружен в выдыхаемом воздухе пациентов при диагностике пневмонии и бактериальных инфекций желудочно-кишечного тракта [6].

Использование азотсодержащих низкомолекулярных соединений в качестве биомаркеров имеет свои сложности, так как они не всегда специфичны (одни и те же соединения могут быть синтезированы различными видами бактерий). Их уровень также может сильно изменяться в зависимости от различных факторов, включая диету, возраст, пол и общее состояние пациента. Несмотря на эти вызовы, азотсодержащие низкомолекулярные соединения продолжают привлекать внимание ученых благодаря своему потенциалу в экспресс-диагностике воспалений.

Известные типы сенсоров для диагностики биопроб. Среди всего многообразия способов детекции азотсодержащих веществ особого внимания заслуживают методы, использующие молекулярные зонды, хемосенсоры и наносенсоры (рис. 1), аналитическим откликом для которых может служить цветовая инверсия или флуоресценция (соответствующие зонды называются «флуоресцентные») [7]. В связи с этим на их основе возможна разработка надежных, экономически выгодных,

эффективных и быстрореагирующих систем для применения в биомедицинских и биохимических исследованиях.

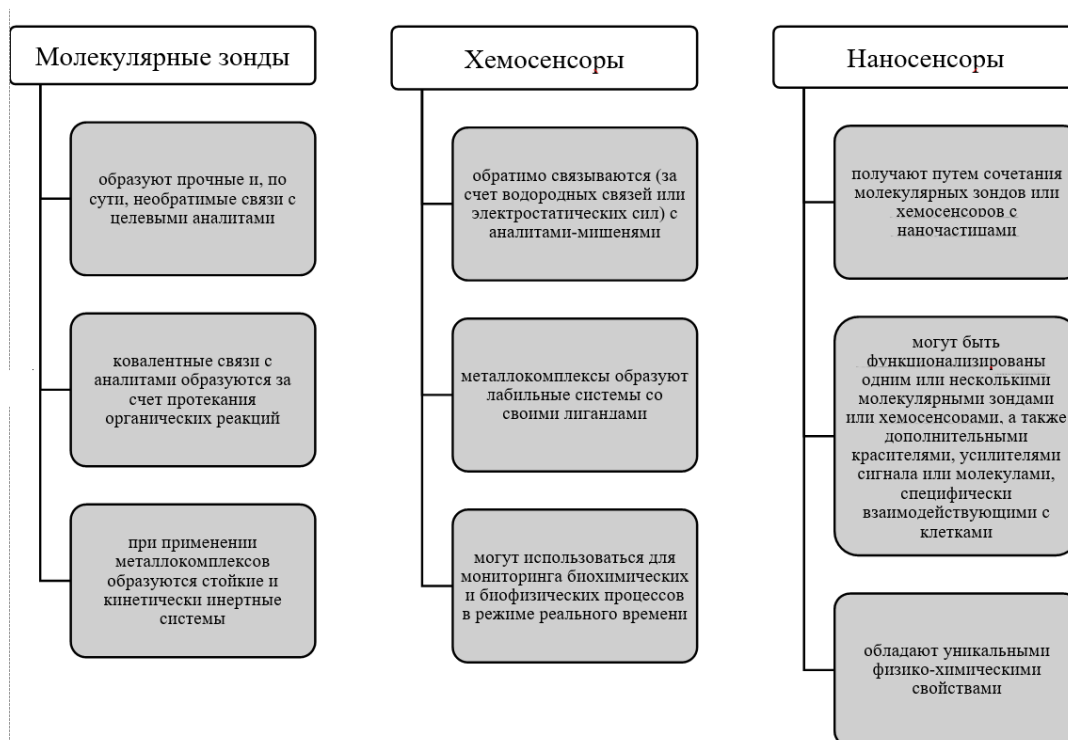


Рис. 1. Типы сенсоров для диагностики биопроб

Среди недостатков, можно отметить следующее: аналитический сигнал в виде изменения цвета или флуоресценции статичен и не реагирует на внешние изменения, что ограничивает сферы использования (для молекулярных зондов); слабый аналитический отклик, высокая чувствительность к стороннему воздействию, приводящая к ложным результатам (для хемосенсоров); ограничения в применении для биологических жидкостей (для наносенсоров).

Наибольшие достижения использования такого рода сенсоров установлены для детектирования первичных аминов и аммиака. Специфика строения детектирующего флуорохрома определяется функциональными группами, способными образовывать, как было отмечено выше, связи ковалентной и нековалентной природы. При этом целевое взаимодействие зонда с аналитом может базироваться на следующих реакциях: образование оснований Шиффа, реакции аминоллиза сложных эфиров, реакции нуклеофильного присоединения, обмена аминов и циклизации, и др. Примеры отражены на рисунках 2, 3, 4. В результате таких взаимодействий эффект может проявляться в усилении, цветовой инверсии или тушении люминесценции.

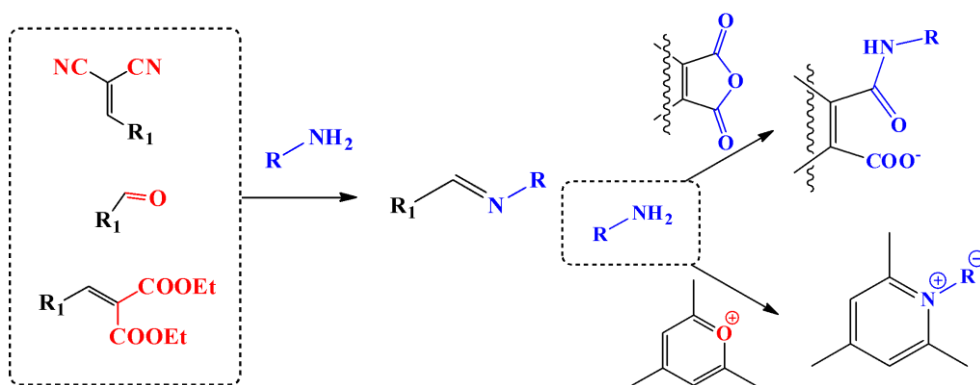


Рис. 2. Якорные группы, реагирующие на первичные амины

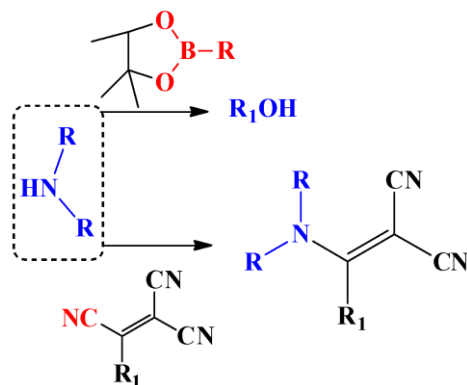


Рис. 3. Якорные группы, реагирующие на вторичные амины

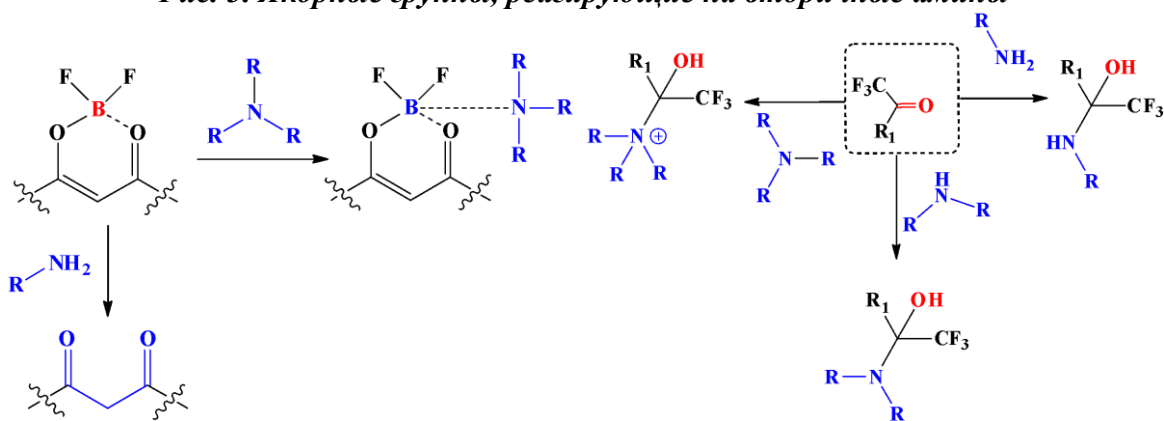


Рис. 4. Якорные группы реагирующие на различные амины

В качестве примеров достигнутого прогресса в результате применения флуоресцентных зондов в области биохимии, биофизики и медицины можно выделить следующие.

Изучены процессы пространственного распределения аминов в живых системах [8]; созданы биосенсоры для оценки уровней нейротрансмиттеров, таких как глутамат, играющих ключевую роль в нейродегенеративных заболеваниях, в частности, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [9]; выявлена и оценена γ -глутамилтранспептидазы (фермента, связанного с клеточной поверхностью, повышенная концентрация которого наблюдается при появлении опухолей различной природы) в реальном времени в сложных биологических системах [10]; осуществлена флуоресцентная детекция дофамина и тирозиназы в режиме «на месте» [11]; показано применение для диагностики ранних стадий рака груди [12], оценки

распространенных линий раковых клеток и кишечных бактерий [13]; осуществлена диагностика лекарственно-индуцированного поражения печени [14]; выявлены воспалительные заболевания кишечника [15].

При этом, несмотря на значимые результаты, подавляющее большинство флуорофоров пригодны лишь для научных исследований. Это обусловлено сложностью при создании оптимальных тест-систем для экспресс-диагностики с точки зрения легкости использования, интерпретации результатов и селективности к выбранному аналиту.

Выводы. Оценка метаболитов воспалительных процессов представляет собой важную диагностическую задачу, решение которой делает возможным начать борьбу с заболеванием на ранних стадиях. В соответствии с этим необходимо создание устройств, удобных в использовании и выполняющих быстрый анализ биопроб. В качестве основ таких тест-систем возможно применение сенсоров с детектирующим флуорохромом. При разработке новых флуоресцентных материалов следует учитывать следующее: протекание реакции с аналитом должно быть эффективным и не требовать дополнительной активации или катализа; реакция должна проходить за очень короткое время; структуры продуктов взаимодействия и исходного флуорохрома должны иметь четкие различия для получения явной люминесценции с длительным временем жизни. Тест-системы должны быть способны к регенерации. На сегодняшний день это задача остается актуальной с перспективой замены используемых методов забора крови.

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-4978.2022.1.3)

Литература / References.

1. Кокорина Н.О., Новоселов В.П., Ханина М.А. Определение лекарственных препаратов в жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сибирский медицинский журнал. – 2008. - №4. – С. 51-53.
2. Bunge M., Araghipour N., Mikoviny T., Dunkl J., Schnitzhofer R., Hansel A. et al. On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry // Applied and environmental microbiology. – 2008. – V. 74, №7. – P. 2179-2186.
3. Filipiak W., Sponring A., Mikoviny T., Ager C., Schubert J., Miekisch, W. Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro // Cancer cell international. - 2012. -V.12, №1. - P. 1-11.
4. Gardenhire D. S., Ely E. W., Massaro A. F., Hess D. R. A guide to aerosol delivery devices for respiratory therapists // American Association for Respiratory Care. – 2018. – 55p.
5. Lemfack M.C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., Piechulla B. mVOC: a database of microbial volatiles // Nucleic Acids Research. 2014. № 42. - P. 744-748.
6. Sethi S., Nanda R., Chakraborty T. Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases // Clinical microbiology reviews. -2013. – V. 26, №3. - P. 462-475.
7. Balasubramania M., Sriraman R., Sindhuja P., Mohideen K., Parameswar R.A., Muhamed Haris K.T. Autofluorescence based diagnostic techniques for oral cancer // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2015. – V.7. - P. 374-377.
8. Jin F., Zhao L. Fluorescence Probe Based on Pyrimidine Applied for Rapid Identification of Different Amino Acids // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2023. -V.49. – P. 306–313.
9. Yao H., Zhang Y., Xiao F., Xia Z., Rao J. Quantum dot/bioluminescence resonance energy transfer based highly sensitive detection of proteases // Angewandte Chemie International Edition. – 2007. V. 46, №23. - P. 4346-4349.

10. Wang K., Wang W., Chen X.Y., Yang Y.S. Constructing a novel fluorescence detection method for γ -glutamyltranspeptidase and application on visualizing liver injury // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2022. – V. 219. – P.1-18.

11. Mao G., Du M., Wang X., Ji X., He Z.-K Simple construction of ratiometric fluorescent probe for the detection of dopamine and tyrosinase by the naked eye // *Analyst*. – 2018. – V.143, №21. - P. 5295-5301.

12. Liu J., Sun Y.Q., Zhang H., Shi H., Shi Y., Guo W. A turn-on fluorescent probe for rapid and selective detection of hydrogen sulfide and its bio-imaging in living cells and mice // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. -V. 242. - P. 1-7.

13. Yu Z., Zhang J., Chen J., Zhao L., Yu D., Liu L. et. al. A new fluorescent probe tool: ERNathG // *Analytical Chemistry*. – 2023. -V. 95, № 9. - P. 4261-4265.

14. Huang Y., Qi Yu, Zhan C., Zeng F., Wu S. Diagnosing drug-induced liver injury by multispectral optoacoustic tomography and fluorescence imaging using a leucine- aminopeptidase-activated probe // *Analytical Chemistry*. – 2019. – V.91, №13. – P. 8085-8092.

15. Zheng B., Pan B., Xu S., Xu Z., Lu G., Wang F. Y., Fang B., Xu C.L. Detection of inflammatory bowel disease (IBD)-associated microRNAs by two color DNA-templated silver nanoclusters fluorescent probes // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2022. - V.276., № 121185.

Abstract.

T.N. Khmelevskaya¹, D.Yu. Vandyshv¹

**APPLICATION OF FLUORESCENT PROBES AS A PROMISING APPROACH
IN DIAGNOSIS AND THERAPY OF DISEASES**

¹Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko; ²Voronezh State University

Physiological and pathological processes of the body determine the formation of metabolites of a certain composition and concentration, their qualitative and quantitative assessment makes it possible to diagnose the general condition and identify diseases. The currently known methods of instrumental analysis of biosamples are characterized by a number of disadvantages, according to which the search for new test systems is urgent. The article contains information about known biomarkers of diseases, and also evaluates current sensors for diagnosing bioassays. The specific behavior of fluorochrome as an analytical test system is considered. Already existing progress and prospects for the development of the search for new sensors for preclinical and clinical diagnostics are noted.

Keywords: minimally invasive and non-invasive methods, quantum dots, amines.

Сведения об авторах: Хмелевская Татьяна Николаевна – к.хим.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, tatiana_ilinova@mail.ru; Вандышев Дмитрий Юрьевич – к.хим.н., доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО ВГУ francy_2007@mail.ru.