

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Македонская Мария Игоревна**



**Флуоресцентные твердофазные индикаторные системы  
для определения нейромедиаторов и их метаболитов  
в биологических объектах**

02.00.02 – Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

**Научные руководители:**

доцент, д.х.н. Веселова И.А.

профессор, д.х.н. Шеховцова Т.Н.

Москва — 2019

# Содержание

<b>Использованные в работе сокращения .....</b>	<b>4</b>
<b>Введение .....</b>	<b>6</b>
<b>Обзор литературы .....</b>	<b>12</b>
Глава 1. Метаболизм нейромедиаторов и их метаболитов и диагностика заболеваний по изменению содержания этих маркеров в биологических объектах.....	12
Глава 2. Методы определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах .....	20
2.1. Хроматографические методы .....	21
2.2. Иммунохимические методы.....	22
2.3. Электрофоретические методы .....	27
2.4. Электрохимические методы .....	28
2.5. Спектроскопические методы .....	31
2.5.1. Спектрофотометрические методы .....	31
2.5.2. Флуориметрические методы.....	36
2.6. Определение нейромедиаторов и их метаболитов с помощью сенсорных устройств .....	57
2.7. Мультиплексный анализ и мультиплексное определение нейромедиаторов и их метаболитов в биологических образцах.....	62
Глава 3. Методы подготовки проб биологических жидкостей и выделения нейромедиаторов и их метаболитов из матрицы реальных объектов .....	65
<b>Экспериментальная часть .....</b>	<b>72</b>
Глава 4. Исходные вещества, посуда, аппаратура, обработка результатов измерений, методики эксперимента.....	72
4.1. Исходные вещества.....	72
4.2. Посуда и аппаратура .....	74
4.3. Методики эксперимента .....	74
4.4. Обработка результатов измерений .....	81
<b>Обсуждение результатов .....</b>	<b>82</b>
Глава 5. Обоснование выбора индикаторной системы и условий получения флуоресцирующих производных нейромедиаторов и их метаболитов с мезо-1,2-дифенилэтилендиамином и бензиламином.....	82

Глава 6. Твердофазное флуоресцентное мультиплексное определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции их ферментативной дериватизации с ароматическими аминами.....	95
6.1. Изучение влияния матричных компонентов мочи и плазмы крови на определение нейромедиаторов и их метаболитов .....	97
6.2. Одновременное определение нейромедиаторов и их метаболитов в биологических жидкостях с применением производной флуоресцентной спектрометрии.....	100
Глава 7. Определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции ферментативной дериватизации в реальных объектах.....	110
Глава 8. Обоснование выбора индикаторной системы и условий получения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов и их метаболитов с европием и окситетрациклином.....	119
Глава 9. Определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции комплексообразования с европием и окситетрациклином .....	130
9.1. Определение нейромедиаторов и их метаболитов в растворе.....	130
9.2. Расчет условных констант устойчивости комплексов {Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-НМ/метаболит}.....	132
9.3. Изучение влияния матричных компонентов мочи и плазмы крови на определение нейромедиаторов и их метаболитов с использованием их комплексов с европием и окситетрациклином .....	136
9.4. Твердофазное флуоресцентное определение нейромедиаторов и их метаболитов с использованием иммобилизованного комплекса {Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ} .....	139
9.5. Определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции образования ими комплексов с европием и окситетрациклином в плазме крови крыс .....	147
Глава 10. Определение нейромедиаторов по образованию ими комплексов с европием(III) и окситетрациклином в 3D (объемных) клеточных культурах .....	151
<b>Заключение .....</b>	<b>166</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>167</b>
<b>Благодарности .....</b>	<b>169</b>
<b>Приложение .....</b>	<b>170</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>192</b>

## Использованные в работе сокращения

- АД – эpineфрин (адреналин)<sup>1</sup>  
АТФ – 5'-трифосфат аденозина  
АЦХ – ацетилхолин  
БА – бензиламин  
БСА – бычий сывороточный альбумин  
БСВАМ – быстрая сканирующая циклическая вольтамперометрия  
ВАМ – вольтамперометрия  
ВМК – ванилилминдальная кислота  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГВК – гомованилиновая кислота  
5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота  
ГКР – гигантское комбинационное рассеяние  
ГЭП – 2-(2-гидроксиэтил)пиридин  
ДА – дофамин  
ДДБС – додецилбензолсульфоната натрия  
ДДС – додецилсульфат натрия  
ДИВАМ – дифференциальная импульсная вольтамперометрия  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДОС – диапазон определяемых содержаний  
*L*-ДОФА – *L*-диоксифенилаланин  
ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота  
ДПК – дипиколиновая кислота  
ДСА – дофамин-связывающий аптамер  
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия  
ДЭД – 1,2-дифенилэтилендиамин  
ЖХ – жидкостная хроматография  
ИФА – иммуноферментный анализ  
КБ[7] – кукурбит[7]урил  
КВВАМ – квадратно-волновая вольтамперометрия  
КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез  
КК – коэффициент корреляции  
КОМТ – катехол-*O*-метилтрансфераза  
КС – кальцеин синий

---

<sup>1</sup> Для более употребляемых в научной литературе названий нейромедиаторов – норэpineфрина и эpineфрина приведены аббревиатуры более привычных названий – норадреналина (НА) и адреналина (АД).

КЭ – капиллярный электрофорез  
МАО – метиламинооксидаза  
Метил-ДОФА – метил-диоксифенилаланин  
МН – метанефрин  
МС – масс-спектрометрия  
МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография  
НА – норэпинефрин (норадреналин)  
НМ – нейромедиаторы  
НМН – норметанефрин  
ОТЦ – окситетрациклин  
ОФ – обращено-фазовый  
ПАВ – поверхностно-активное вещество  
ПВАМ – прямоугольная вольтамперометрия  
ПИА – проточно-инжекционный анализ  
ПО – предел обнаружения  
ПХ – пероксидаза из корней хрена  
РИА – радиоиммунный анализ  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
СФ – спектрофотометрический  
ТАМЛ – тетра-аминомакроциклический лиганд  
ТДПО – бис [2-(3,6,9-триоксадеканилоксикарбо-нил)-4-нитрофенил] оксалат  
ТММБ-*S*-И – тетраметил-8-(*N*-гидроксисукцинимидный масляный эфир)-дифлуоробора-  
диаза-*s*-индацен  
УНЧ – углеродные наночастицы  
УФ – ультрафиолетовый  
ФБК – фенилборную кислоту  
ФБР – фосфатный буферный раствор  
ФИА – флуороиммунохимический анализ  
ФЛ – флуоресцентный  
ХЛ – хемилюминесценция  
ХСТА – хлорсульфонилтеноилтрифторацетон  
ЦВАМ – циклическая вольтамперометрия  
ЦСВАМ – циклическая сканирующая вольтамперометрия  
ЦТАБ – цетилтриметиламмоний-*N* бромид  
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия  
ЭХ – электрохимический  
ЭХЛ – электрохемилюминесценция

# Введение

## **Актуальность работы.**

Основу регуляции деятельности центральной и периферической нервной систем, а также сердечно-сосудистой системы человека составляют нейромедиаторы, участвующие в энергетическом обмене, микроциркуляции и снабжении тканей кислородом, передавая нервные импульсы от клетки к клетке. Вследствие того, что уровень нейромедиаторов и их метаболитов в организме здорового человека и пациента с патологией, связанной с нарушением нейромедиаторного обмена, различен, они являются маркерами для диагностики, в том числе ранней, ряда заболеваний. Патологические нарушения метаболизма нейромедиаторов подразделяют на два типа: нейроэндокринные (например, феохромоцитома, нейробластома, карциноидные опухоли, сопровождающиеся повышением уровня маркеров в организме) и нейродегенеративные (например, болезни Паркинсона и Альцгеймера, приводящие к понижению содержания маркеров в организме). К настоящему времени наиболее хорошо изучена роль в патогенезе указанных заболеваний низкомолекулярных маркеров, таких как биогенные амины – дофамин, эпинефрин, норэпинефрин, серотонин и их метаболиты. Сложность определения нейромедиаторов в плазме крови, клетках и других биологических объектах заключается в том, что их нормальные концентрации у человека крайне низки (от 10 пМ), а при некоторых нейродегенеративных нарушениях они становятся еще на порядок ниже. Кроме того, нейромедиаторы подвержены окислению кислородом и матричными компонентами биообъектов, а также быстрому разрушению, поэтому определять их необходимо быстро (в течение 15 – 30 мин после отбора пробы). Важным аспектом является возможность одновременного селективного определения нескольких аналитов в одной пробе. Современные инструментальные методы анализа не решают эту проблему комплексно: высокая чувствительность и селективность метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием не обеспечивают нужную экспрессность из-за необходимости длительной и трудоемкой пробоподготовки образцов и продолжительного анализа, а биосенсоры, электрохимические и иммунохимические методы определения

указанных аналитов не достигают нужной чувствительности и селективности. В связи с этим, актуальной задачей аналитической химии является разработка новых чувствительных, селективных и экспрессных методик определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических жидкостях и клетках с целью диагностики нарушения их метаболизма.

**Цель работы** – создание флуоресцентных твердофазных индикаторных систем для чувствительного, селективного, экспрессного, в ряде случаев мультиплексного, определения низкомолекулярных нейромедиаторов и их метаболитов, основанных на образовании ими флуоресцирующих продуктов реакций дериватизации и комплексообразования, в биологических объектах.

Для достижения поставленной цели в работе необходимо было решить следующие **задачи**:

- получить интенсивно флуоресцирующие производные и комплексы нейромедиаторов и их метаболитов по реакциям дериватизации продуктов их ферментативного окисления с ароматическими аминами и образования комплексов с европием(III) и окситетрациклином;
- разработать методики иммобилизации комплекса  $\{Eu^{3+}-OTC\}$  в пленках и гидрогелях биосовместимых природных полимеров в ячейках полистирольного микропланшета с целью стабилизации компонентов индикаторной системы и повышения чувствительности и воспроизводимости результатов анализа;
- разработать флуоресцентные методики мультиплексного, высокочувствительного, селективного и экспрессного определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах на уровне их референсных концентраций в организме здорового человека и ниже с использованием предложенных индикаторных систем.

#### **Научная новизна работы**

- Предложен комплексный подход к чувствительному, селективному, экспрессному и мультиплексному определению нейромедиаторов и их метаболитов, основанный на направленном варьировании природы

дериватирующего агента (ароматического амина) при получении интенсивно флуоресцирующих производных аналитов в присутствии пероксидазы, иммобилизованной в пленке хитозана в микропланшете, спектральных характеристик возбуждающего и испускаемого излучения, а также на применении производной флуоресцентной спектроскопии 1-го порядка.

- Разработана новая твердофазная индикаторная система, основанная на образовании интенсивно флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов и их метаболитов с европием(III) и окситетрациклином, иммобилизованных в пленках и гидрогелях биополимеров; система положена в основу флуоресцентного высокочувствительного, селективного и экспрессного определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах.
- Разработаны способы иммобилизации комплекса  $\{Eu^{3+}-OTC\}$  в пленках хитозана, альгината и желатина, а также в альгинатном, альбуминовом, желатиновом, коллагеновом гидрогелях в ячейках 96-луночного полистирольного микропланшета. Показано, что для создания пленок наилучшей матрицей является хитозан, а для гидрогелей – комбинация альгината и коллагена.

### **Практическая значимость работы.**

Разработаны флуоресцентные методики мультиплексного, высокочувствительного, селективного и экспрессного определения нейромедиаторов (дофамина (ДА), эpineфрина (АД), норэpineфрина (НА), серотонина, *L*-диоксифенилаланина (*L*-ДОФА)) и их метаболитов (норметанефрина (НМН), 5-гидроксииндолуксусной (5-ГИУК), гомованилиновой (ГВК) и ванилилминдальной (ВМК) кислот) в ячейках микропланшета в виде дериватизатов продуктов их пероксидазного окисления с 1,2-дифенилэтилен-диамином и бензиламином, а также в виде их тройных комплексов с европием(III) и окситетрациклином. Диапазоны определяемых содержаний (ДОС) аналитов по реакции дериватизации составили 0.005 – 7.5 мкМ, пределы обнаружения (ПО) – 0.003 – 0.2 мкМ; по реакции комплексообразования ДОС – 0.01 – 10000 пМ, ПО – 0.005 – 300 пМ. ДОС указанных аналитов включают в себя их референсные концентрации в биологических жидкостях здорового человека, а также их

пониженные и повышенные концентрации, фиксируемые у людей с различными патологиями. Предложенные методики успешно апробированы при определении нейромедиаторов и их метаболитов в плазме крови крыс и мышей, в моче здорового человека, в раковых клетках и нейронах.

**Автор выносит на защиту:**

- условия получения пленочных и гидрогелевых структур в ячейках 96-луночного полистирольного микропланшета с иммобилизованными в них компонентами индикаторных систем (пероксидазой или комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$ ) для флуоресцентного определения маркеров нейромедиаторного обмена;
- способ флуоресцентного мультиплексного определения нейромедиаторов и их метаболитов по реакции дериватизации с ароматическими аминами продуктов их пероксидазного окисления, основанный на иммобилизации фермента в пленке хитозана в ячейках микропланшета, направленном варьировании природы дериватирующего агента, спектральных характеристик возбуждающего и испускаемого излучения, а также на применении производной спектроскопии 1-го порядка;
- способ твердофазного высокочувствительного определения аналитов по реакции образования ими тройных комплексов с  $Eu^{3+}$  и ОТЦ, иммобилизованных в пленках хитозана, альгината, желатина и в гидрогелях альгината, альбумина, желатина и коллагена;
- результаты изучения влияния матричных компонентов мочи и крови на определение маркеров нейромедиаторного обмена по реакциям дериватизации и комплексообразования; результаты определения нейромедиаторов и их метаболитов в моче здорового человека, в плазме крови мышей и крыс, в нейронах ганглий пиявок и раковых клетках кишечника человека.

**Степень достоверности.** Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса современных инструментальных методов анализа (молекулярной абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии), статистической оценкой погрешностей и сходимости результатов измерений, а также высокой

воспроизводимостью полученных результатов и их согласованностью с данными альтернативных методов анализа (ВЭЖХ-ЭХ).

**Апробация работы.** Результаты представленной работы доложены на XXII – XXV Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва, 2015 – 2018 гг.), II и III Всероссийских конференциях по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2015 г. и г.п. Московский, 2017 г.), XXVI Ежегодном всемирном конгрессе по биосенсорам «Biosensors» (Швеция, Гетеборг, 2016 г.), XIV Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школе (Москва, 2016 г.), Научной конференции грантодержателей РНФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века» (Москва, 2016 г.), V Международной конференции по биосенсорным технологиям «Bio-Sensing Technology» (Италия, Рива дель Гарда, 2017 г.), симпозиуме Европейского общества исследования материалов «E-MRS: Spring meeting» (Франция, Страсбург, 2017 г.), XIX Европейской конференции по аналитической химии «Euroanalysis» (Швеция, Стокгольм, 2017 г.), IV Международной конференции по биохимии и биоматериалам «NICE» (Франция, Ницца, 2018 г.), Международном конгрессе по биотехнологиям «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2019 г.), Международной конференции по сенсорам «Single-Molecule Sensors and NanoSystems» (Германия, Мюнхен, 2019 г.).

**Публикации.** Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 3 статьях в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, изданиях из перечня, рекомендованных Минобрнауки РФ, 1 заявке на патент и 15 тезисах докладов на международных и российских конференциях.

**Личный вклад автора.** В диссертационной работе представлены результаты научных исследований, выполненных непосредственно автором. Личный вклад соискателя заключался в поиске, систематизации и анализе данных литературы по теме работы; планировании, постановке и проведении экспериментов; обработке и интерпретации полученных данных; подготовке к публикации результатов проведенных исследований; а также в формулировке научных положений, выносимых на защиту, и выводов.

**Структура и объем работы.** Представленная диссертационная работа изложена на 225 страницах машинописного текста, включает 132 рисунка и 53 таблицы. Состоит из введения, 3 глав обзора литературы, 7 глав, представляющих результаты исследований и их обсуждение, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 392 источника, и приложения.

# Обзор литературы

## Глава 1. Метаболизм нейромедиаторов и их метаболитов и диагностика заболеваний по изменению содержания этих маркеров в биологических объектах

Биогенные амины (*L*-диоксифенилаланин (*L*-ДОФА), серотонин, катехоламины (КА): дофамин (ДА), норэпинефрин (НА), эпинефрин (АД)), а также их метаболиты (норметанефрин (НМН), метанефрин (МН), гомованилиновая (ГВК), ванилилминдальная (ВМК) и 5-гидроксииндолуксусная (5-ГИУК) кислота) относятся к физиологически активным веществам. Они являются ключевыми маркерами метаболизма нейромедиаторов (НМ) или, так называемого, нейромедиаторного обмена; кроме того, некоторые из них действуют на организм как гормоны.

Нейромедиаторный обмен из-за многочисленности функций и разветвленности катехоламинергических путей в организме составляет основу нервной медиации, как периферической, так и центральной нервной систем. Нейромедиаторы осуществляют основные регуляторные функции через мозговое вещество надпочечников, дофаминергические и адренергические рецепторы и специализированные адренергические нейроны. Нейроны используют катехоламины и другие биогенные амины в качестве медиаторов (посредников), передающих нервный импульс. Метаболизм нейромедиаторов в организме является ключевым фактором, как в умственной, так и в физической работоспособности человека. НМ прямо или косвенно повышают активность эндокринных желез, стимулируют гипофиз и гипоталамус. Они принимают участие в регуляции эмоциональных и умственных процессов, реакции на стресс, психомоторной активности, поведенческих реакций, обучения, памяти и сна. При любой напряженной работе, особенно физической, уровень НМ в крови повышается.

В организме нейромедиаторы образуются в результате декарбоксилирования аминокислоты *L*-дигидроксифенилаланина (*L*-ДОФА), которую синтезирует фермент тирозингидроксилаза из тирозина, а дофамин формируется при

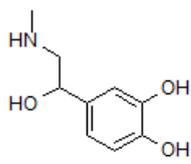
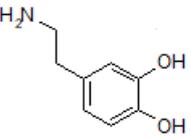
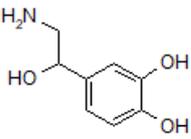
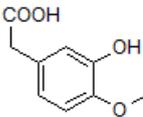
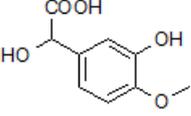
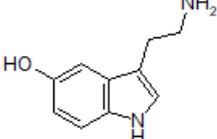
дальнейшем декарбоксилировании *L*-ДОФА ферментом – декарбоксилазой ароматических *l*-аминокислот. Дофамин является предшественником норэпинефрина и эпинефрина. Норэпинефрин синтезируется из дофамина под воздействием дофамингидроксилазы, а эпинефрин – из норэпинефрина с помощью фенилэтаноламин-*N*-метилтрансферазы. Норэпинефрин в основном синтезируется в периферических симпатических нервных окончаниях, где он функционирует в качестве нейромедиатора, а эпинефрин преимущественно синтезируется в надпочечниках, где он хранится в специализированных гранулах вместе с меньшими количествами норэпинефрина. ДА синтезируют преимущественно клетки головного мозга. Распад катехоламинов протекает под влиянием двух ферментных систем: катехол-*O*-метилтрансферазы (КОМТ) и моноаминоксидазы (МАО). Под действием КОМТ катехоламины метоксилируются в норметанефрин и метанефрин, которые в присутствии МАО окислительно дезаминируются в основной продукт распада норэпинефрина и эпинефрина – ванилилминдальную кислоту (ВМК). В другом случае, когда катехоламины вначале подвергаются действию МАО, они превращаются в 3,4-дигидроксиминдальную кислоту, а затем в присутствии КОМТ – в ВМК. Распад дофамина протекает аналогично, но вместо ВМК в качестве конечного продукта образуется гомованилиновая кислота (ГВК), которая экскретируется почками и выводится из организма вместе с мочой.

Серотонин же образуется из аминокислоты триптофана путём её последовательного 5-гидроксилирования ферментом 5-триптофангидроксилазой (в результате чего получается 5-гидрокситриптофан) и затем декарбоксилирования получившегося гидрокситриптофана ферментом триптофандекарбоксилазой. Под действием фермента моноаминоксидазы (МАО) серотонин превращается в 5-гидроксииндолальдегид, который, в свою очередь, в присутствии ацетальдегиддегидрогеназы метаболизируется в 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-ГИУК), которая затем выводится с мочой (рис. 1).



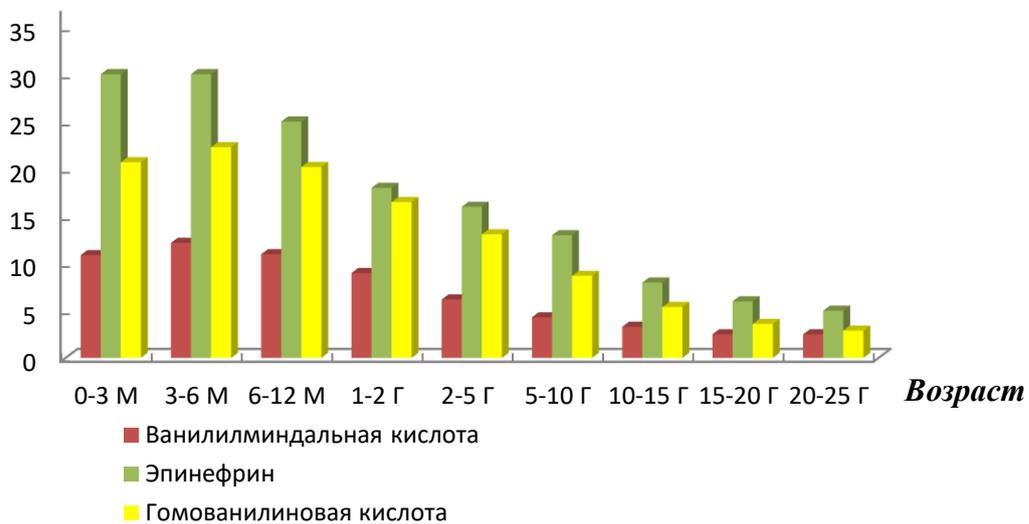
периферии замедляется, что, вероятно, связано со старением клеточных мембран и общим замедлением синтеза белков в организме. В результате снижения уровня нейромедиаторов в организме скорость мыслительных процессов понижается, ухудшается настроение, усиливается депрессия. Таким образом, с возрастом отношение концентрации НМ к концентрации креатинина падает и при достижении 25-летнего возраста достигает некоторого постоянного значения. эpineфрина у мужчин.

**Таблица 1.** Основные нейромедиаторы, их метаболиты и референсные значения в моче и крови [3, 4].

Нейромедиаторы и их метаболиты	Структурная формула	Референсные содержания в моче, мкМ	Референсные содержания в крови, нМ
АД		0 – 0.2	0.07 – 0.6
ДА		0.3 – 2.6	0.05 – 0.5
НА		0.1 – 0.4	0.6 – 2.7
ГВК		0 – 45	9000 – 18000
ВМК		0 – 72	15000 – 25000
Серотонин		0 – 1.2	300 – 1300

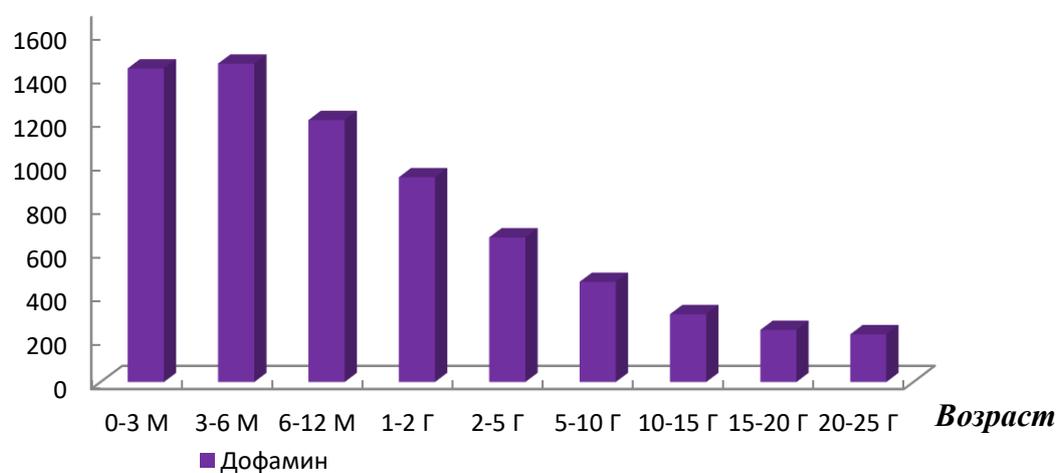
5-ГИУК		10 – 36	–
МН		0 – 1.6	0.5
НМН		0 – 1.8	0.9

**С, мкг/г  
креатинина**

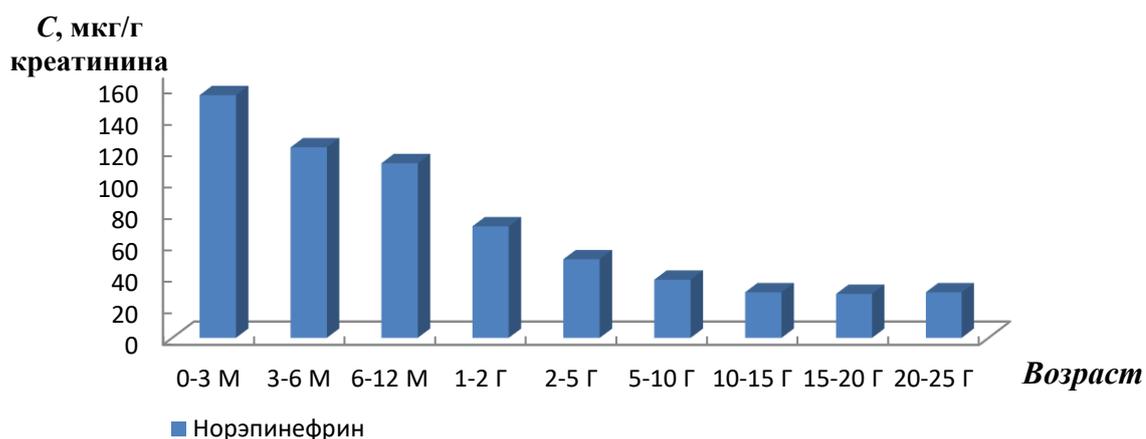


(а)

**С, мкг/г  
креатинина**



(б)



(в)

**Рис. 2.** Референсные значения НМ и их метаболитов в моче для разных возрастных групп людей [3].

***Заболевания, сопровождающиеся нарушением нейромедиаторного обмена***

Нарушение нейромедиаторного обмена в организме сопровождается отклонением от нормы уровня нейромедиаторов в моче, крови, клетках, спинномозговой жидкости. В связи с этим, их возможно использовать в качестве диагностических маркеров как при проведении фундаментальных исследований, так и в клинической практике.

Заболевания, связанные с нарушениями нейромедиаторного обмена, делят на две основные группы: нейроэндокринные нарушения (характеризующиеся избыточным синтезом нейромедиаторов из-за возникновения опухолевых новообразований) и нейродегенеративные расстройства (сопровождающиеся прогрессирующей гибелью нервных клеток и уменьшением содержания нейромедиаторов в организме). К основным нейроэндокринным катехоламин-продуцирующим опухолям относят феохромоцитому, параганглиому, нейробластому и карциноидные опухоли, а к нейродегенеративным заболеваниям – болезни Альцгеймера и Паркинсона. В табл. 1 представлены основные нейромедиаторы и их метаболиты, а также их референсные содержания в таких биологических жидкостях как кровь и моча, по которым диагностируют заболевания, а в табл. 2 – изменение их уровня при развитии и прогрессировании различных нейроэндокринных и нейродегенеративных нарушений.

**Таблица 2.** Изменение содержаний нейромедиаторов и их метаболитов при различных заболеваниях [4 – 13].

Нейроэндокринные заболевания					Нейродегенеративные заболевания	
Название	Карциноид	Феохромоцитома	Нейробластома	Параганглиома	Болезнь Альцгеймера	Болезнь Паркинсона
Кратность увеличения					Кратность уменьшения	
АД	3 – 5	10 – 100	– *	5 – 10	2 – 10**	–
ДА	–		10 <sup>3</sup> – 10 <sup>5</sup>		3 – 5	1.5 – 3**
НА	3 – 5			1.5 – 3.5***		
ГВК	–			2.5 – 4.5**		
ВМК	–	–	–	3 – 5	–	–
Серотонин	> 20					
5-ГИУК	> 15					
МН	–					
НМН	–	3 – 20	–	3 – 10	–	–
				5 – 10		

\* – данные отсутствуют

\*\* – в Caudate Nucleus

\*\*\* – в гиппокампе

**Феохромоцитома** диагностируется путем биохимического подтверждения избытка НМ с измерением уровня ДА, НА и АД или их метаболитов (норметанефрина и метанефрина) в плазме крови или моче [14]. Содержание метанефринов в моче и плазме крови определяют методом ВЭЖХ с различными видами детектирования (электрохимическим, флуориметрическим, масс-спектрометрическим) [15]. Прямое определение НМ в плазме крови уступает по чувствительности определению их метаболитов по их деструкции, а также по недостаточной секреции маленькими опухолями [16], кроме того, у многих опухолей уровень выделяемых НМ колеблется, что также может дать ложный

отрицательный результат в период низкой секреции НМ. Поэтому, для исключения ложноположительных результатов на повышенные содержания НМ и их метаболитов рекомендуют дополнительно анализировать суточную мочу.

Диагностика *параганглиомы* основана на определении свободных метанефринов плазмы или фракционированных метанефринов суточной мочи, а также нейромедиаторов в моче и крови методом ВЭЖХ-МС или ВЭЖХ-ЭХ [17, 18].

Биохимическая диагностика *нейробластомы* и нейроэндокринных опухолей у детей в возрасте до 5 лет основана на определении уровня ванилилминдальной и гомованилиновой кислот в моче [19, 20]. Определение уровня ВМК и ГВК методами ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-МС в одном образце сыворотки крови, вместо анализа суточной мочи повышает точность анализа, ускоряет и упрощает отбор образца.

Диагностика, прогностика и варианты лечения *карциноидных опухолей* основываются на результатах анализов на биохимические маркеры и на снимках пораженных органов [21]. Высокая концентрация в моче 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК), повышенное содержание серотонина, АД и НА в плазме крови позволяет установить первоначальный диагноз карциноидных опухолей.

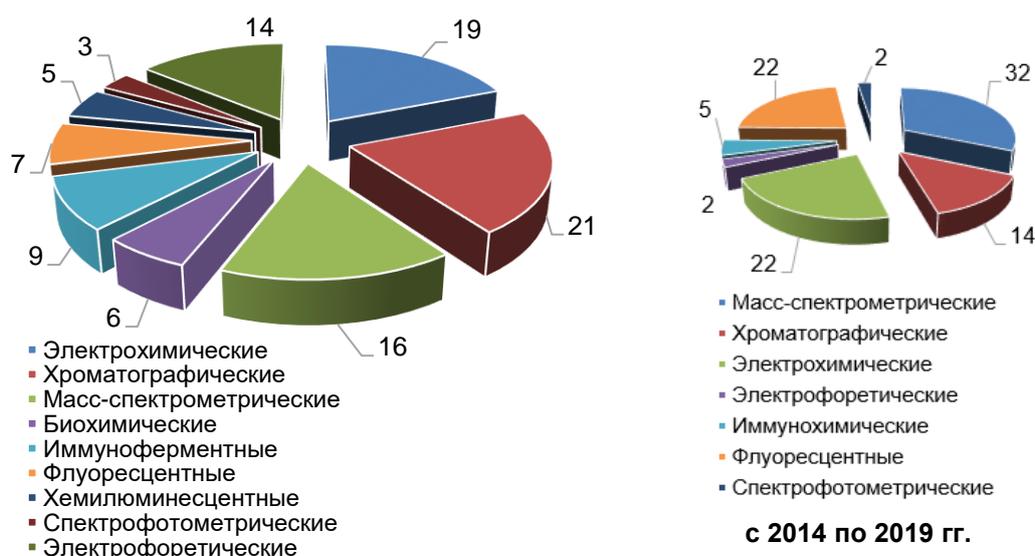
ДА, АД, НА и их метаболиты могут также выступать в качестве маркеров при диагностике *болезней Альцгеймера и Паркинсона*: эти заболевания можно диагностировать по уменьшению их содержаний в биологических жидкостях [22 – 26].

Нарушение нейромедиаторного обмена наблюдается также и при стрессе. Возможен выброс или резкое снижение уровня АД и НА [27 – 30]. Биологические реакции, вызванные физическими и психологическими стрессами, включают выделение нейромедиаторов (например, секреция норэпинефрина симпатическими нейронами и высвобождение эпинефрина из мозгового вещества надпочечников) в кровь [31 – 34]. Хроническое воздействие этих гормонов стресса приводит к увеличению риска заболеваний и смертности [35 – 43].

## Глава 2. Методы определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах

В настоящее время нейробластома, феохромоцитомы, различные виды карциноидных опухолей, болезни Альцгеймера и Паркинсона диагностируются методами ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-МС, но подобные методы имеют свои недостатки и ограничения. Поэтому создаются все новые и новые подходы к определению содержания НМ и их метаболитов в биологических жидкостях различными методами: иммуноферментными, капиллярного электрофореза с различными типами детектирования, электрохимическими, спектрофотометрическими, флуоресцентными [44].

На рис. 3 приведена диаграмма, представляющая долю различных инструментальных методов в определении нейромедиаторов в биологических жидкостях. Данные для построения диаграммы получены в результате анализа публикаций за период с 1990 – 2019 гг. Из диаграммы видно, что наиболее часто для определения нейромедиаторов используют хроматографические и электрофоретические методы с различными видами детектирования, электрохимические и иммуноферментные методы. Доля спектроскопических методов заметно ниже. В этой главе рассмотрим наиболее распространенные методы определения НМ и их метаболитов в биообразцах.



**Рис. 3.** Статистические данные по использованию различных инструментальных методов для определения нейромедиаторов и их метаболитов в

биологических жидкостях (с указанием процента (%) от общего числа проанализированных методик за период с 1990 по 2019 гг.).

## 2.1. Хроматографические методы

Одним из наиболее распространенных методов определения нейромедиаторов в клинической практике является ВЭЖХ с электрохимическим (особенно с амперометрическим) [45 – 48], а в фундаментальных исследованиях – с масс-спектрометрическим детектированием [49 – 56].

Для повышения селективности и чувствительности определения НМ и их метаболитов хроматографическими методами применяют доколоночную дериватизацию аналитов различными агентами [57 – 60]. Благодаря предварительному разделению нейромедиаторов, существующие на сегодняшний день хроматографические методики их определения обеспечивают возможность мультиплексного анализа их смесей. Несмотря на низкие пределы обнаружения НМ по существующим хроматографическим методикам – порядка 1 нМ (табл. 3), перед их определением необходима тщательная подготовка проб реального объекта, а методика пробоподготовки зависит от природы биообразца (ткани, биологические жидкости, клетки), используемого для извлечения НМ и их метаболитов. Иначе не удастся обеспечить высокую селективность и необходимую чувствительность определения НМ в биообъектах, что ограничивает возможность анализа *in vivo* [61]. Существенными недостатками хроматографических методов являются длительность анализа (до 15 мин без учета времени на пробоподготовку образца) [62], использование токсичных растворителей (метанола, ацетонитрила), необходимость термостатирования колонки, тщательного ее промывания после каждого анализа, а также плохая воспроизводимость результатов. Несмотря на широкий выбор применяемых электрохимических детекторов, результаты измерения характеризуются плохой воспроизводимостью, чувствительностью к флуктуациям потока подвижной фазы, загрязнением электрода, повышенными требованиями к природе подвижной фазы [63]. Для метода ВЭЖХ-ЭХ свойственны, кроме того, высокие значения фонового сигнала шума по сравнению с полезным сигналом, не всегда достаточная чувствительность и низкая эффективность разделения определяемых соединений [64, 65]. Метод ВЭЖХ-

МС/МС характеризуется значительно большей чувствительностью определения НМ и их метаболитов, однако является недостаточно экспрессным и имеет свои ограничения, связанные с элюированием аналитов в мертвое время, значительным фоновым сигналом и сложностью разрешения пиков, а также немаловажными факторами является высокая стоимость такого анализа и необходимость его проведения высококвалифицированным персоналом [66 – 69].

## 2.2. Иммунохимические методы

На сегодняшний день наряду с развитием классических инструментальных методов (ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-МС) актуальна разработка различных *иммунохимических методов* определения нейромедиаторов и их метаболитов. Уже в конце 1990-х годов несколько компаний – Beckman Coulter (Чешская Республика), Immuno Biological Laboratories, Labor Diagnostika Nord (Германия), Immunodiagnostic Systems (Великобритания) и др. – стали выпускать коммерческие иммунохимические тест-наборы для диагностики нейроэндокринных опухолевых заболеваний [91]. В настоящее время широко используют наборы для иммуноферментного (ИФА, ферментная метка – пероксидаза из корней хрена, щелочная фосфатаза, биотин-стрептавидин), радиоиммунохимического (РИА, изотопная метка ( $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ )) и флуороиммунохимического методов анализа (ФИА, флуоресцентная метка – родамин, флуоресцеин, европий) [92] (табл. 4).

**Таблица 3.** Характеристики хроматографических методик определения нейромедиаторов и их метаболитов.

Аналит	Объект анализа	Метод определения	Детектор	ПО, нМ	Литература
МН, НМН	Моча, плазма крови	ВЭЖХ	Амперометрический	2.4, 2.2, 2.6, 2.0, 2.2	[70]
НА, АД, ДА				Моча	37, 52, 46
ДА, <i>L</i> -ДОФА	Плазма крови			–	[71]
ДА, ГВК, <i>L</i> -ДОФА, ДОФУК (дигидроксифенилуксусная кислота)	Диализат тканей крысы		Кулонометрический	5.0, 3.0, 2.5, 0.1	[47]
НА, АД, ДА	Моча		Вольтамперометрический	70	[72]
	Моча, плазма крови			–	[73]
<i>L</i> -ДОФА, МН, НМН	3.0			[74]	
Серотонин, 5-ГИУК	Кровь			0.5	[75, 76]
НА, АД, ДА	Плазма крови			1.0	[77, 78]
МН, НМН			0.03	[56]	
Серотонин, 5-ГИУК			0.04, 0.08	[79, 80]	
			0.003	[81]	
ВМК	Моча	МС	25	[82]	

				0.7	[83]
НА, АД, ДА				3, 0.5, 6.5	[84, 85]
НА, АД		Ион-парная ЖХ		5	[86]
	Ткани мозга крысы	ВЭЖХ		3, 10	[53]
НА, АД, ДА; ГВК, ВМК	Ткани из надпочечников крыс			100; 50	[51]
Серотонин, ДА, НА	Внеклеточная жидкость из микродиализата мозга крысы	ЖХ		0.06 – 0.1	[58]
НА, АД, ДА, НМН	Сыворотка крови			0.004 – 0.1	[57]
	Пятна мочи			–	[59]
НА, АД, ДА	Плазма крови	УЭЖХ	МС/МС	3, 12, 13	[87]
НА, АД				0.03, 0.1, 0.25	[50]
ДА	0.14, 0.15	[88]			
НА, ДА, L-ДОФА, ДОФУК	Спинально-мозговая жидкость	ВЭЖХ		38	[52]
	Моча			Флуориметрический	0.06, 5, 0.04, 2.8, 0.12
				2.5, 4.7, 2.0, 1.1, 6.5	[11]
НА, АД, ДА	Моча		Хемиллюминесцентный	4.0, 1.4, 5.0	[60]
				3 – 30	[90]

**Таблица 4.** Характеристики иммунохимических методик определения нейромедиаторов и их метаболитов в биообъектах.

Аналит	Объект анализа	Метод	ПО, нМ	Литература
НА, АД, ДА	Моча	ИФА	1, 3, 9	[93]
МН, НМН	Плазма крови		0.13, 0.09	[94]
	Кровь		0.5	[95]
ДА	Моча, кровь		1.0	[96 – 98]
МН, НМН	Моча		100 – 150	[99]
ВМК			100	[100]
НА, АД	Плазма крови, моча		0.06	[101]
НА, АД, МН, НМН			-	[102, 103]
			0.5	[104]
МН, НМН	Моча		РИА	346, 119, 9, 27
	Плазма крови	-		[105]

Активно разрабатываются методики, основанные на биотинилировании (биотиновом мечении) молекул НМ с целью создания нерадиоактивного зонда [93]. В качестве распознающего элемента применяют, например, магнитные частицы с иммобилизованными на их поверхности антителами, специфичными для каждого нейромедиатора, что обеспечивает мультиплексность анализа. Альтернативой подобного подхода является биотинилирование моноклональных и поликлональных антител, их взаимодействие с НМ, а затем иммуномагнитное разделение с помощью магнитных частиц, покрытых стрептавидином или авидином [106].

Широко применяют разновидность ИФА на основе иммуносорбентов с ферментной меткой [96 – 98]. Пределы обнаружения НМ по таким методикам – от 0.5 до 1.0 нМ. Однако перекрестная селективность между определяемыми соединениями – до 20 %. Таким образом, в иммунохимических методах до сих пор не решена проблема получения специфических антител к отдельным молекулам НМ. Зачастую, используемые антитела, индуцируемые конъюгатами БСА-катехоламин, распознают только функциональные группы бензольного кольца, но не специфичны к изменениям в структуре цепи в непосредственной близости от концевой аминокислотной группы НМ. Они практически равноценно связывают как АД, так и НА [107]. Коммерческие ИФА наборы также позволяют, в основном, определять

лишь отдельные НМ и их метаболиты, реже группу нескольких аналитов, из-за низкой селективности антител. Чувствительность определения НМ и их метаболитов с использованием таких наборов довольно низкая (ПО 100 – 150 нМ), а правильность определения (65 – 90 %) и воспроизводимость результатов анализа ( $s_r$  до 0.1) в подобных наборах свидетельствуют о большом проценте диагностических ошибок [99]. Таким образом, иммунохимические методы не обеспечивают необходимую для диагностики заболеваний селективность и чувствительность определения НМ и их метаболитов.

В большинстве случаев РИА проводят конкурентный иммуноанализ с  $^{125}\text{I}$ -меченым антигеном [91]. Первичное антитело получают против ацилированного производного метанефрина или норметанефрина. Подобное мечение метаболитов нейромедиаторов изотопами  $^{125}\text{I}$  позволяет получить соединение с высокой удельной радиоактивностью и регистрировать  $\gamma$ -излучение наиболее простыми и доступными способами. К сожалению, этот метод зачастую небезопасен, и существует риск радиоактивного заражения организма. Также необходимо разрабатывать индивидуальные процедуры йодирования, так как введение метки  $^{125}\text{I}$  в ацилированные метаболиты НМ вызывает значительное видоизменение молекулярной структуры, что негативно воздействует на иммуногенность меченого соединения.

Еще один из недостатков иммунохимических методов заключается в том, что все нейромедиаторы должны быть предварительно извлечены из пробы и подвержены метилированию для превращения их в МН и НМН с их последующим ацилированием [99, 105]. Например, в работе [91] НМ предварительно экстрагируют боратным аффинным гелем, а в [105] проводят цисдиол-специфичную аффинную экстракцию из матричного образца, что значительно усложняет и удлиняет процедуру анализа.

В связи с этим разрабатываются различные комбинированные подходы к определению НМ и их метаболитов, сочетающие предварительное хроматографическое разделение с последующим иммунохимическим детектированием аналитов в биологических объектах. В работе [94] при сравнении результатов определения НМН и МН в плазме крови пациентов с параганглиомой

или феохромоцитомой, методами ИФА и ВЭЖХ-МС было зафиксировано, что чувствительность определения этих метаболитов методом ИФА на 20 – 25 % ниже, чем чувствительность их определения методом ВЭЖХ-МС. Следовательно, очень высок риск получения ложноотрицательных результатов при диагностике заболеваний, что может привести к неправильному диагнозу и лечению, а также к смерти пациентов. Однако селективность определения метанефринов методом ВЭЖХ-МС на 5 – 10 % ниже, чем методом ИФА. Таким образом, для получения правильных и достоверных результатов диагностики заболеваний целесообразно только комбинирование методов ИФА и ВЭЖХ-МС.

Таким образом, низкая антигенность (специфичность) и воспроизводимость, относительная длительность анализа, в течение которого определяемые соединения нестабильны и могут окисляться или разрушаться, и высокая стоимость, большой процент ложноположительных и ложноотрицательных результатов приводят к многочисленным диагностическим ошибкам при использовании иммунохимических методов для определения НМ и их метаболитов в биологических образцах.

### **2.3. Электрофоретические методы**

Еще одним методом разделения нейромедиаторов и их метаболитов, помимо ВЭЖХ, является КЭ (капиллярный электрофорез) или КЗЭ (капиллярный зонный электрофорез) [108 – 111]. При разработке методов КЭ стало очевидно, что высокая селективность может быть достигнута лишь простым изменением в составе буферного раствора [109, 112], а также при модификации внутренней стенки капилляра [108].

Метод КЭ позволяет определять НМ, выделенные из отдельных клеток, благодаря тому, что для анализа необходимы очень малые объемы пробы (порядка нл). Чувствительность определения НМ методом КЭ очень высока за счет выбора наиболее выгодных условий определения и наилучшего способа детектирования. Для повышения чувствительности и селективности определения НМ используют дериватизирующие агенты [109], специфические хемилюминесцентные реакции [110, 111].

Жидкостную хроматографию или капиллярный электрофорез в сочетании с различными методами детектирования, такими как спектрофотометрический (СФ) [113], флуоресцентный [109, 114], электрохимический (ЭХ) [47, 115, 116] и масс-спектрометрический (МС) [50, 108, 117, 118], широко используют для определения нейромедиаторов и их метаболитов (табл. 5). Эти методы имеют свои ограничения. Например, СФ-детекторы не чувствительны к моноаминам, а результаты ЭХ-детектирования недостаточно воспроизводимы из-за загрязнения электрода. Масс-спектрометрический метод детектирования имеет преимущества по селективности, но требует длительной и трудоемкой пробоподготовки, которая не всегда позволяет избавиться от мешающего влияния на чувствительность определения НМ матрицы реального объекта. Флуоресцентное детектирование обеспечивает достаточную чувствительность, но довольно часто необходим предварительный этап получения различных производных: например, производных НМ и их метаболитов с 1,2-дифенилэтилендиамином [119 – 122], бензиламином и другими дериватизирующими агентами [120 – 140]. Получение производных, несмотря на высокую чувствительность их определения, включает в себя трудоемкие и время затратные процедуры пробоподготовки, и часто приводит к таким проблемам, как неустойчивость продуктов, длительное время удерживания (до 40 мин), или обязательное использование внутреннего стандарта.

#### **2.4. Электрохимические методы**

При проведении фундаментальных исследований нейромедиаторы также определяют с помощью различных электрохимических методов, в том числе амперометрии и вольтамперометрии [144]. Все НМ в той или иной степени подвержены окислению. Для получения количественных характеристик этого процесса традиционно используют метод вольтамперометрии.

**Таблица 5.** Характеристики электрофоретических методик определения нейромедиаторов и их метаболитов.

Аналит	Объект анализа	Метод определения	Детектор	ПО, нМ	Литература
НА, АД, ДА, НМН	Моча	КЭ	СФ	5 – 10	[113]
НА, АД, ДА, серотонин	Клетки	МЭКХ (мицеллярная электрокинетическая хроматография)		100 – 900	[141]
ГВК, ВМК, ДОФУК	Моча	КЗЭ		550, 500, 1500	[112]
НА, АД, ДА, МН, НМН		КЭ		150, 140, 160, 130, 140	[70]
НА, АД, ДА, L-ДОФА		КЭ	Хемиллюминесцентный	100	[142]
АД, ДА				180, 55	[110]
НА, АД, ДА	КЗЭ	Хемиллюминесцентный	80, 100, 70	[111]	
НА, АД, ДА			1.0, 0.3, 0.9	[109]	
ДА	Диализат крысиного стриатума	КЭ	Флуориметрический	36	[125]
АД, ДА	Гомогенизат мозга, моча			Амперометрический	1700, 450

*Метод вольтамперометрии (ВАМ)* целесообразно использовать для одновременного определения НМ в одной пробе. Для каждого вещества характерен уникальный набор окислительных и восстановительных пиков при заданных потенциалах, кроме того, можно использовать различные способы разделения пиков нескольких аналитов, например, путем модификации поверхности электродов или с применением статистических методов. Во всех электрохимических методах определения НМ основным мешающим компонентом матрицы биообъекта является аскорбиновая кислота – электроактивное вещество, мешающее влияние которого необходимо устранять для обеспечения правильности результатов анализа. Нивелировать влияние аскорбиновой кислоты удастся на немодифицированных пиролитических графитовых электродах [145]; электродах, модифицированных, например, многослойными углеродными нанотрубками с полиэтиленгликолем [146]; и электродах, модифицированных композитом графит-хитозан-полиэтиленгликоль [147] или 5-гидрокситриптофаном [148]. Модификации поверхности электродов, например, многослойными нанотрубками с полиметиленовым голубым [149], поли (*l*-глутаминовой кислотой) с серебром [150], Au-электрода - 2,3-димеркаптосукциновой кислотой [151], используют для получения пиков с хорошим разрешением для определения ДА, АД и аскорбиновой кислоты.

Также встречаются работы по определению дофамина на уровне 0.1 – 1 нМ вольтамперометрически с использованием электродов, модифицированных наночастицами различных металлов [152 – 154]. Разработки различных модифицированных электродов для определения НМ и их метаболитов составляют большой пласт работ: [155 – 158]. Встречаются работы по определению НМ с помощью электродов, модифицированных полимерами с молекулярными отпечатками [159, 160].

*Быстрая сканирующая циклическая вольтамперометрия (БСВАМ)* является вариантом вольтамперометрии, который оказался эффективным для мультиплексного определения нейромедиаторов. Быстрая сканирующая циклическая вольтамперометрия наиболее часто выполняется с использованием немодифицированных электродов, отличающихся более высокой скоростью передачи

электронов и меньшим тушением сигнала, чем модифицированные электроды [161], а высокая частота цикличности минимизирует загрязнение электрода [162].

Таким образом, можно заключить, что электрохимические методики определения НМ основаны на использовании электродов разного рода: на основе композитов нанотрубок с металлами и их оксидами, ионными жидкостями, комплексами металл-лиганд, полисахаридами; на основе различных полимеров с наночастицами металлов (табл. 6). Но у всех электрохимических методов есть один общий недостаток – значительное мешающее влияние аскорбиновой кислоты. Ее концентрации в моче в 1000 – 10000 раз выше, чем концентрации НМ и их метаболитов, а ее негативное воздействие не всегда удается устранить. Также все электрохимические системы содержат довольно сложные распознающие элементы, требующие долгого, трудоемкого и дорогостоящего синтеза. Пределы обнаружения нейромедиаторов в моче электрохимическими методами составляют около 1 мкМ. Кроме того, при определении концентрации НМ методом добавок результаты сильно занижены и не воспроизводятся при введении добавок разной концентрации. Большинство электрохимических методов, позволяет определять лишь единичные аналиты, то есть не обеспечивает мультиплексность анализа, что ограничивает возможность их использования для диагностики заболеваний.

## **2.5. Спектроскопические методы**

Благодаря высокой чувствительности и селективности, а также разнообразию современных детектирующих систем, для определения нейромедиаторов и их метаболитов в биообразцах весьма часто используют спектроскопические методы.

### **2.5.1. Спектрофотометрические методы**

Среди спектроскопических методов определения НМ и их метаболитов в биологических образцах встречаются спектрофотометрические (табл. 7). Однако, НМ и их метаболиты имеют широкие перекрывающиеся спектры поглощения в диапазоне длин волн 200 – 300 нм, что затрудняет их прямое спектрофотометрическое детектирование без предварительного разделения [70, 113, 173] и отделения

**Таблица 6.** Характеристики электрохимических методик определения нейромедиаторов и их метаболитов.

Аналит	Объект анализа	Метод определения	Электроды	ПО, мкМ	Литература
ДА	Сыворотка крови	ВАМ	Модифицированные многослойными углеродными нанотрубками с полиэтиленимином	0.9	[146]
ДА, серотонин	Лошадиная кровь		Немодифицированные пиролитические графитовые	0.09, 0.06	[145]
	–	ЦВАМ (циклическая ВАМ), ДИВАМ (дифференциальная импульсная ВАМ)	Модифицированные иммобилизованным 5-гидрокситриптофаном	0.3, 1.7	[148]
ДА	Плазма крови, моча		Модифицированные композитом графит-хитозан-полиэтиленгликоль	0.01	[147]
	Моча		Стеклоуглеродный электрод, модифицированный полимерной пленкой с синим Эванса	0.25	[163]
ДА, АД, ВМК			Стеклоуглеродный электрод, модифицированный композитами углеродных нанотрубок с ацетатом целлюлозы	1 – 10	[164]
ДА, ДОФУК	–	ЦВАМ	Алмазный электрод, легированный бором и модифицированный катионной полимерной пленкой из <i>N,N</i> -диметиланилина	0.2, 2.0	[165]
ДА, АД			Планарный электрод, модифицированным углеродной пастой, состоящей из графитового порошка, диспергированного в ионных жидкостях (Со (III) тетраакис-(трет-бутил)-фталоциан)	1.2, 0.13	[156]

НА, АД, ДА		ДИВАМ	Углеродный электрод, модифицированный нановолокнами полипиррола с молекулярными отпечатками или пленкой <i>o</i> -фелиндиамина с молекулярными отпечатками	13	[159]
	Дофаминергические клетки		Стеклянный электрод, модифицированный пленкой структурированного оксида никеля	0.006	[166]
ДА, серотонин	Сыворотка крови, моча		Золотой электрод, модифицированный смешанным оксидом индия и олова	0.0005, 0.003	[167]
ВМК	Моча		Алмазный электрод, легированный бором и модифицированный жидкой мембраной из бутилбензоата	0.5	[168]
ДА			Стеклоуглеродный электрод, модифицированный полимерной пленкой с сульфоназо III	0.03	[169]
НА, ДА			Стеклоуглеродный электрод с фуллерен-функционализированными углеродными нанотрубками с ионной жидкостью	0.018, 0.015	[157]
ДА, АД			ЦВАМ, КВВАМ (квадратно-волновая ВАМ)	Модифицированные многослойными нанотрубками с полиметиленовым голубым	96, 9
ДА, серотонин		БСВАМ	Стеклянные капилляры, модифицированные углеродными волокнами	1.0	[162]
ДА	Мозг крысы		Поверхность опто-волоконного микроэлектрода, протравленная пламенем		[161]
НА, АД, ДА,	Препарат для инфузий	Амперометрия	Проточный мини-реактор, модифицированный мезопористым диоксидом кремния и ферментом (лакказой)	5.5 – 15.5	[170]

L-ДОФА					
НА	Хромафинные клетки		Электрохимически осажденные пленки оксида иридия на плоском тонкопленочном платиновом электроде	–	[171]
ДА	Моча		Платиновый электрод, модифицированный ферментом (тирозиной)	0.03	[172]
ДА, АД		ЦСВАМ (циклическая сканирующая ВАМ)	Au-электрод с иммобилизованным на поверхности комплексом $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{MTBOK})_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_2]$	0.08	[155]
ДА		Потенциометрия	Стеклоэлектрод, покрытый золотом и модифицированный наностержнями оксида цинка с полимерными мембранами, включающими $\beta$ -циклодекстрин и калий тетраакис (4-хлорфенил) борат	1.0	[158]
НА, АД, ДА, ГВК		–	–	Пьезокварцевый электрод, модифицированный кремний-алюминиевым гелем с молекулярными отпечатками	–

от матрицы объекта или без перевода в другое интенсивно поглощающее соединение в другом диапазоне длин волн [141].

Известны спектрофотометрические методики с использованием проточно-инжекционного анализа в качестве метода разделения [174, 175] и окисления аналитов метапериодатом натрия [175], *n*-толуидином и периодатом натрия [174], висмутатом натрия [176], кислородом воздуха в присутствии тирозиназы [177] для повышения чувствительности определения нейромедиаторов. Все разработанные методики такого типа могут обеспечить селективное определение НМ только при их предварительном разделении, поэтому их применение для анализа биообъектов ограничено.

Для более широкого применения спектрофотометрических методик разрабатываются различные подходы с использованием наночастиц или наностержней металлов. В работе [178] предложено сдвигать максимум спектра поглощения раствора наностержней золота в присутствии ионов серебра и нейромедиатора в более коротковолновую область за счет восстановления ионов серебра и осаждения его на поверхности наностержней. Нейромедиаторы в свою очередь окисляются до хинонов, но различия в структуре боковой цепи не вносят вклада в изменение положения максимума спектра. Такие приемы обеспечивают лишь групповую селективность, поэтому без предварительного разделения невозможно определение отдельных аналитов в биологических образцах.

**Таблица 7.** Характеристики спектрофотометрических методик определения нейромедиаторов и их метаболитов.

Аналит	Объект анализа	Способ повышения селективности и чувствительности	Метод разделения	ПО, мкМ	Литература
НА, АД, ДА, серотонин	Клетки феохромоцитомы	б-аминохинолил- <i>N</i> -гидроксисукцинимидилкарбамат	МЭКХ	100 – 900	[141]
ВМК, ГВК, <i>L</i> -ДОФА, 5-ГИУК	Моча	–		3 – 16	[173]
МН, НМН			КЗЭ	0.13 – 0.16	[70]
НА, АД, ДА	Моча, кровь	Волокна с	КЭ	0.007	[113]

		молекулярными отпечатками			
ДА, АД, метил-ДОФА,	–	<i>n</i> -Толуидин и периодат натрия	ПИА (проточно-инжекционный анализ)	1.9, 1.3, 3.8	[174]
АД, изопреналин		Метапериодат натрия		2.0, 3.0	[175]
НА, АД		Висмутат натрия	–	0.3, 2.5	[176]
НА, АД, ДА, добутамин		Наностержни золота, покрытые серебром		0.08 – 0.10	[178]
НА, АД, ДА		Ag <sup>+</sup> , 3,3',5,5'-тетраметилбензидин		0.05, 0.10, 0.15	[179]
<i>L</i> -ДОФА	Плазма крови	Тирозиназа		3.0	[177]

Таким образом, спектрофотометрические методики без предварительного разделения не обеспечивают селективное мультиплексное определение НМ и их метаболитов, а чувствительность существующих методик недостаточна для их применения в анализе биообъектов в целях клинической диагностики.

### 2.5.2. Флуориметрические методы

На сегодняшний день среди спектроскопических методов определения НМ наиболее перспективны флуориметрические методы.

Молекулы нейромедиаторов обладают собственной флуоресценцией с  $\lambda_{ex} = 280$  нм,  $\lambda_{em} = 324$  нм и наиболее интенсивно флуоресцируют в кислой области рН, где аминогруппы их молекул находятся в протонированной форме. В щелочной области при увеличении рН флуоресценция нейромедиаторов постепенно уменьшается из-за самопроизвольного окисления кислородом воздуха. К сожалению, чувствительность и селективность определения НМ в биологических образцах (плазме крови, моче) по их собственной флуоресценции невысоки из-за наличия в объекте других флуоресцирующих органических соединений. Поэтому для повышения селективности определения нейромедиаторов и их метаболитов в

биологических жидкостях необходимо либо их предварительное разделение методами капиллярного электрофореза или ВЭЖХ, либо переводение аналитов в интенсивно флуоресцирующие или хемиллюминесцирующие производные, или комплексы. Вследствие вышесказанного предложены несколько подходов к определению НМ флуориметрическими методами: определение по их хемиллюминесценции (ХЛ) и электрохемиллюминесценции (ЭХЛ), по собственной флуоресценции НМ и по флуоресценции их производных (дериватизатов и комплексов с ионами металлов).

### *Хемиллюминесцентное определение нейромедиаторов и их метаболитов*

Для высокочувствительного определения НМ и их метаболитов используют хемиллюминесцентные (ХЛ) реакции с участием подкисленного перманганата калия с формальдегидом [90] и люминола [60, 110, 111], а также электрохемиллюминесцентные (ЭХЛ) реакции с участием электрохимически генерируемых ион-радикалов полиароматических углеводов или их производных, трис(2,2'-бипиридин) рутения(II), а также радикалов 3-амино-фталата, получаемых в результате электрохимического окисления люминола в щелочной среде в присутствии пероксида водорода [180, 181].

Широко распространен метод пероксиоксалатной хемиллюминесценции, в основе которой лежит ХЛ продуктов окисления арилоксалатов пероксидом водорода в присутствии НМ [182 – 185], а также хемиллюминесценция продуктов реакции люминола с различными окислителями: периодатом [186], с  $\text{Ag}^{3+}$  [111] и др. в присутствии НМ.

Как правило, хемиллюминесцентное детектирование НМ и их метаболитов применяют в сочетании с методами КЭ или ВЭЖХ, позволяющими повысить селективность определения аналитов в биологических объектах за счет разделения компонентов (табл. 8). С целью повышения селективности применяют различные дериватирующие агенты для ВЭЖХ определения НМ [90, 187] и ферментативные индикаторные реакции, основанные на окислении аналитов пероксидом водорода в присутствии пероксидазы из корней хрена [188 – 191]. Селективное определение НМ и их метаболитов, основанное на их

электрохимическом окислении после хроматографического разделения с хемилюминесцентным детектированием предложено в работах [182 – 185].

ЭХЛ-детектирование в большинстве случаев используют в сочетании с методами проточно-инжекционного анализа (ПИА) [60, 110, 192 – 201] и методами КЭ [202]. Большинство же представленных систем основано на хемилюминесценции продуктов окисления люминола различными агентами и аналитами (табл. 8).

**Таблица 8.** Характеристики хемилюминесцентных методик определения нейромедиаторов и их метаболитов.

Аналит	Объект анализа	Хемилюминесцентная система	Метод разделения	ПО, нМ	Литература
ДА	–	ДА / $\text{KMnO}_4$	ПИА	20000	[192]
НА, АД, ДА	Моча	НМ / $\text{KMnO}_4$ / формальдегид	Ионная ЖХ	3 – 30	[90]
ГКВ, ВМК		Метаболит / $\text{KMnO}_4$		5 – 40	[203]
НА, АД, ДА, МН, НМ	Плазма крови	НМ / ТДПО (бис [2-(3,6,9-триоксадеканилоксикарбонил)-4-нитрофенил] оксалат) / $\text{H}_2\text{O}_2$	ВЭЖХ	0.1 – 0.4	[184]
				0.1 – 0.6	[185]
АД, ДА	–	НМ / 6-Аминометилфталгидразид / $\text{H}_2\text{O}_2$	КЭ	0.09, 28	[187]
	Моча			55, 180	[110]
НА, АД, ДА	–	НМ / люминол / $\text{KIO}_4$	ПИА	0.2, 1.0, 10	[186]
АД				270	[201]
НА, АД, ДА		АД / люминол / полифенолоксидаза		1100	[188]
		НМ / люминол / $\text{KClO}_3$		2 – 7	[198]
ДА		НМ / трипропиламин / 2,2'-бипиридинрутений(II)		7 – 52	[195, 196]
		ДА / люминол		30	[194]
АД		НМ / люминол / $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$		1.0	[197]
		Плазма		3	[199]

	крови				
НА, АД, ДА	Моча		КЭ	90 – 480	[202]
	Экстракт тканей надпочечников и стриатума крыс, клетки	НМ / люминол / лактопероксидаза	–	–	[189]
	Моча	НМ / люминол / Ag <sup>3+</sup>	КЗЭ	80, 100, 70	[111]
ДА	Кровь	ДА / люминол / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / ПХ	Микро-диализ	350	[190]
	Моча	ДА / тирозин / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / ПХ	–	1500	[191]
АД	–	АД / люцигенин		24	[204]

Из данных табл. 8 следует, что селективного определения НМ и их метаболитов удается достичь только в результате предварительного хроматографического или электрофоретического разделения, а также при использовании проточно-инжекционных методов анализа реальных образцов.

### ***Определение нейромедиаторов и их метаболитов по их собственной флуоресценции***

Основой определения нейромедиаторов и их метаболитов по данным работ [205 – 214] является их собственная флуоресценция в ультрафиолетовой (УФ) области спектра. В качестве источника возбуждения флуоресценции используют как ксеноновую лампу [211, 212], так и лазерное излучение для повышения мощности источника и как следствие чувствительности определения аналитов [207 – 209]. Для определения НМ применяют Ag-ионный [215], неоновый (NeCu) [206, 216], ниодимовый [207, 208], криптоновый [217], He-Cd [218] лазеры и твердофазный нанолазер [209].

В целях повышения чувствительности и селективности определения аналитов на фоне матричных компонентов биообъекта, обладающих собственной флуоресценцией при возбуждении в УФ области спектра, их предварительно разделяют с помощью методов КЭ [109, 207 – 209] или ВЭЖХ [219, 220] и

предварительно концентрируют [205, 206]. Интенсивность флуоресценции и хорошее разрешение пиков НМ и их метаболитов зависят от рН и состава фонового электролита и подвижной фазы, их выбор имеет огромное влияние на ПО и селективность методики (табл. 9).

**Таблица 9.** Характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по их собственной флуоресценции.

Аналит	Объект анализа	Метод разделения	Источник возбуждения флуоресценции	ПО, нМ	Литература
МН, НМН, серотонин, L-ДОФА	Кровь креветок	ВЭЖХ	Xe-лампа ( $\lambda_{ex} = 220$ нм)	250 – 2500	[210]
НА, АД, ДА					
L-ДОФА, ГВК	Ткани мозга крыс	–	Xe-лампа ( $\lambda_{ex} = 279$ нм)	2.5, 26, 30, 5.5, 5.5	[221]
ДА					
ГВК, ВМК, 5-ГИУК, серотонин	Моча	КЭ	Nd-YAG лазер ( $\lambda_{ex} = 266$ нм)	–	[207]
5-ГИУК, ГВК, ВМК	Клетки бычьих надпочечников	КЭ	KrF-лазер ( $\lambda_{ex} = 248$ нм)	7, 170, 150	[217]
АД, серотонин, L-ДОФА					
НА, АД, ДА	–	Микрочип на основе борной кислоты	Твердофазный нанолазер ( $\lambda_{ex} = 266$ нм)	9, 0.15, 115	[209]
ДА, серотонин					
НА, АД, ДА	–	Микрочип на основе метакри-	Ag-ионный лазер ( $\lambda_{ex} = 275$ нм)	–	[215]
НА, АД, ДА	–	Микрочип на основе метакри-	Ag-лазер ( $\lambda_{ex} = 257$ нм)	8000, 21	[216]
НА, АД, ДА	–	Микрочип на основе метакри-	NeCu-лазер ( $\lambda_{ex} = 248.6$ нм)	8000, 27	[205]
НА, АД, ДА	–	Микрочип на основе метакри-	–	5000	[205]
НА, АД, ДА	–	Микрочип на основе метакри-	–	55000	[206]

		ловой кислоты			
НА, ДА	Микродиализат мозга крыс	КЗЭ	He-Cd-лазер ( $\lambda_{ex} = 442 \text{ нм}$ )	0.375	[218]

Из данных табл. 9 следует, что для обеспечения более высокой чувствительности определения НМ использование в качестве источника возбуждения флуоресценции лазерного излучения более перспективно, чем применение ксеноновой лампы. Однако в обоих случаях анализ сложных биологических матриц невозможен без предварительного разделения их компонентов методами КЭ или ВЭЖХ, поскольку большинство органических компонентов матрицы биообразцов создает высокий сигнал фона при длинах волн возбуждения флуоресценции НМ и их метаболитов (200 – 300 нм), а также из-за мешающего взаимного влияния аналитов.

Таким образом, можно заключить, что использование лазера в качестве источника возбуждения флуоресценции нейромедиаторов и их метаболитов обеспечивает высокую чувствительность методик их определения, но не решает проблем повышения селективности и устранения мешающего влияния компонентов матрицы биообъектов, что ограничивает круг объектов анализа и возможность использования разработанных методик для диагностики заболеваний.

***Определение нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции их производных, полученных с применением дериватирующих агентов***

Чувствительность и селективность определения нейромедиаторов и их метаболитов в биообразцах можно повысить за счет получения их производных, обладающих флуоресценцией существенно большей интенсивности, т.е. проведения дериватизации. Длины волн возбуждения флуоресценции дериватизатов указанных аналитов лежат в области 340 – 360 нм в зависимости от выбранного дериватирующего агента и определяемого соединения, а спектры их флуоресценции находятся в длинноволновой области спектра, что позволяет частично устранить мешающее влияние матричных компонентов биообъектов.

Для дериватизации НМ и их метаболитов используют большое количество различных дериватирующих агентов [125, 222], структурные формулы которых представлены в табл. 10. В большинстве случаев это производные аминов и альдегидов [223], поскольку молекулы аналитов, имеющие в своем составе *o*-дифенольную и аминогруппы, обладают по отношению к ним высокой реакционной способностью.

При использовании ВЭЖХ или КЭ в качестве метода разделения возможно проведение как доколоночной, так и постколоночной дериватизации. Первый вариант применяют чаще, так как чувствительность определения в этом случае выше (табл. 11). Как правило, реакцию дериватизации проводят в щелочной среде (рН 9 – 11) в присутствии значительного количества органического растворителя (метанола, этанола, ацетонитрила). Для повышения скорости реакции и выхода флуоресцирующего продукта реакцию проводят при нагревании (до 30 – 60°C, реже 100 – 120°C) в течение 5 – 20 мин.

Так, в работе [224] предложен простой и чувствительный флуоресцентный метод определения эпинефрина по реакции его дериватизации с 1,2-фенилендиамин в щелочной среде. Длины волн возбуждения и флуоресценции системы составляли 455 и 500 нм, соответственно, при этом сам 1,2-фенилендиамин сильно флуоресцирует при 345 нм при длине волны возбуждения 305 нм. В оптимальных условиях дериватизации предел обнаружения эпинефрина – 9.3 нМ.

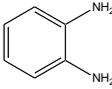
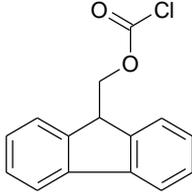
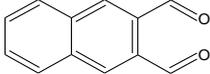
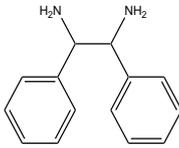
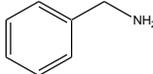
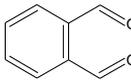
В работе [225] в качестве дериватирующего агента НМ использовали 9-флуоренилметилхлорформат. Определение проводили методом обращено-фазовой (ОФ) ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием с доколоночной дериватизацией. Пределы обнаружения НА, АД и ДА составили 2.7, 2.9 и 3.6 пМ, соответственно.

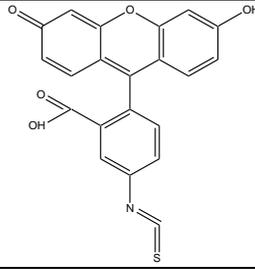
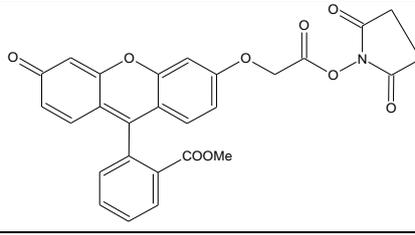
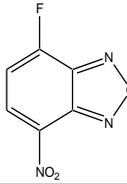
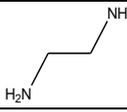
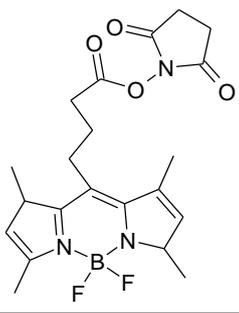
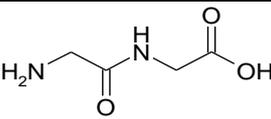
В некоторых работах [126 – 128, 226] в качестве дериватирующего агента используют нафталин-2,3-дикарбоксиальдегид. Для повышения чувствительности определения НА и ДА авторы [226] применили лазерно-индуцируемую флуоресценцию ( $\lambda_{\text{ex}} = 442$  нм), а для повышения селективности – КЭ. Предложенная методика позволяет достичь пределов обнаружения НА и ДА

равных 0.02 и 0.05 нМ, соответственно. Подход был апробирован в анализе спинномозговой жидкости крыс после микродиализа образца.

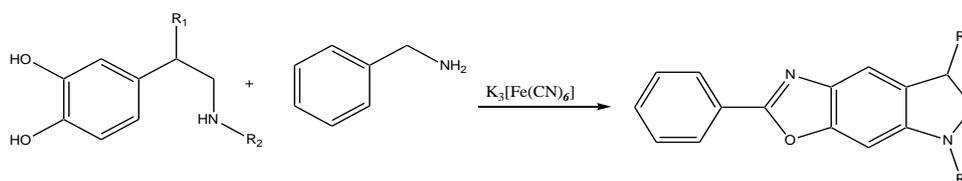
Для дериватизации аналитов чаще других применяют бензиламин (БА) и 1,2-дифенилэтилендиамин (ДЭД), так как методы определения НМ с их использованием отличаются высокой селективностью. Как было отмечено в работах [119, 123], огромное количество различных по природе и структуре биологически активных соединений (аминокислоты, креатинин, мочева и аскорбиновая кислоты, глюкоза и др.), содержащихся в матрицах мочи, крови и в клетках, не образуют с ними флуоресцирующих производных, что обеспечивает высокую селективность определения нейромедиаторов и их метаболитов в матрицах реальных объектов. Схемы реакций дериватизации НМ с использованием ДЭД и БА представлены на рис. 4.

**Таблица 10.** Структурные формулы агентов, применяемых для дериватизации нейромедиаторов и их метаболитов.

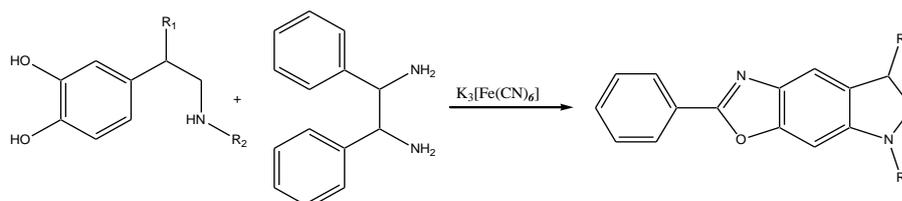
Дериватирующий агент	Структурная формула
1,2-Фенилендиамин	
9-Флуоренилметил хлорформиат	
Нафталин-2,3-дикарбоксиальдегид	
1,2-Дифенилэтилендиамин (ДЭД)	
Бензиламин (БА)	
o-Фталальдегид	

Флуоресцеин изотиоцианат	
N-Гидроксисукцинимидилфлуоресцеин- <i>O</i> -ацетат	
4-Фторо-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол	
Этилендиамин	
Тетраметил-8-(N-гидроксисукцинимидный масляный эфир)-дифлуороборадиазо- <i>s</i> -индацен (ТММБ- <i>S</i> -И)	
Глицилглицин	

(1)



(2)



**Рис. 4.** Схемы реакций получения флуоресцентных производных НМ с использованием БА (1) и ДЭД (2).

Серотонин и 5-ГИУК образуют сильно флуоресцирующие производные при взаимодействии с БА, а ДА, НА, L-ДОФА и ДОФУК – с ДЭД. Поэтому для одновременного определения ДА, НА, серотонина и 5-ГИУК используют двухступенчатую дериватизацию с ДЭД и БА. Основным преимуществом использования двухступенчатой дериватизации НМ с последующим определением производных методом ОФ-ФЭЖХ с ФЛ-детектированием является возможность достижения высокой чувствительности. Пределы обнаружения ДА, НА, серотонина, 5-ГИУК, L-ДОФА и ДОФУК составляют 20, 12, 30, 36, 848 и 36 пМ, соответственно [89].

Сравнение характеристик методик флуориметрического определения аналитов по реакциям их дериватизации представлены в табл. 11.

**Таблица 11.** Характеристики флуориметрических методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по реакции их дериватизации.

Аналит	Объект анализа	Дериватизирующий агент	Метод разделения	ПО, нМ	Литература
АД	–	1,2-Фенилендиамин	–	9.3	[224]
ДА				2100	[227]
ДА	Диализат крысиного стриатума	<i>o</i> -Фталальдегид	КЭ	36	[125]
НА, ДА	Спинномозговая жидкость крыс	Нафталин-2,3-дикарбоксиальдегид	КЭ, микродиализ	0.02, 0.05	[226]
НА, АД, ДА, L-ДОФА	Моча, диализат крысиного таламуса		КЭ, МЭЖХ	1 – 31	[126 – 128]
	Экстракт клеток феохромоцитомы	Флуоресцеин изотиоцианат	КЭ, ВЭЖХ	0.08 – 1.2	[129 – 131]
	Печень и образцы мозга мыши	ТММБ-S-И	ВЭЖХ	0.1	[228]
НА, ДА, серотонин, 5-ГИУК, L-ДОФА,	Микродиализат мозга крыс	ДЭД, БА		0.01 – 0.85	[89]

ДОФУК				
НА	Микродиализат мозга мышей	БА	0.004	[120 – 123]
НА, АД, ДА, ДОФУК	Экстракты мозгового вещества и клеток	ДЭД	0.002 – 3	[119 – 122]
НА, АД, ДА	Плазма крови		0.02	[229]
	Моча	9-флуоренилметил хлорформат	0.003 – 0.004	[225]
		<i>N</i> -Гидроксисукцин- имидилфлуоресце- ин- <i>O</i> -ацетат	1.5 – 28	[132]
		Глицилглицин	–	[230]
	–	4-Фторо-7-нитро- 2,1,3-бензоксадиазол	0.5	[133]
ДА, ГВК, ДОФУК	Ткани крыс, моча	Этилендиамин	5 – 120	[134 – 139]

Из табл. 11 следует, что для разделения НМ и их метаболитов обычно используют метод ВЭЖХ чаще с доколоночной [119 – 133, 139, 140, 227], реже – с постколоночной [134 – 138] дериватизацией. Наиболее чувствительными являются методики определения НМ с использованием в качестве дериватирующих агентов ДЭД и БА. При этом следует отметить, что по чувствительности и селективности флуориметрические методики определения НМ по реакции их дериватизации в значительной степени превосходят методики определения НМ по их собственной флуоресценции, что делает их более перспективными для анализа сложных биологических матриц. К сожалению, серьезным недостатком существующих методик при их использовании в анализе биологических объектов является необходимость длительного термостатирования реакционной смеси при повышенных температурах в присутствии токсичных растворителей, что приводит к частичному изменению состава пробы и деструкции аналитов и, как следствие, к искажению результатов анализа.

В качестве альтернативы процессам дериватизации НМ и их метаболитов кислородом воздуха в присутствии неорганического катализатора (например, ферроцианида калия [120]) разрабатывают различные способы ферментативной

дериватизации [231, 232]. В таких случаях в качестве окислителя нейромедиатора используют кислород (или пероксид водорода), а в качестве катализатора окисления – фермент (например, пероксидазу из корней хрена [233]). Замена неорганического окислителя на окислительную систему с участием биологического катализатора – фермента позволяет значительно сократить время реакции (до 5 мин) и повысить стабильность состава пробы при проведении анализа (исключить необходимость термостатирования при высоких температурах и использования токсичных органических растворителей), повысить селективность и чувствительность определения НМ и их метаболитов (ДА, АД, ВМК, ГВК) вплоть до 1.5 нМ [233]. Следует отметить, что работы по этой теме единичны [125, 231, 232]. Чувствительность флуоресцентного определения НМ и их метаболитов с использованием реакций ферментативной дериватизации гораздо выше чувствительности их спектрофотометрического, хемилюминесцентного определения. Также применение подобных реакций позволяет значительно повысить селективность определения аналитов без их предварительного разделения. Таким образом, подходы на основе ферментативной дериватизации с флуоресцентным детектированием особенно перспективны для разработки методик мультиплексного определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических образцах.

#### ***Определение нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции их комплексов с ионами металлов***

Значительными преимуществами среди разнообразия флуориметрических методов исследования и анализа обладают методы определения нейромедиаторов по флуоресценции их комплексов с различными ионами металлов, такими как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  и др., так как они обеспечивают исключительно высокую чувствительность определения НМ и их метаболитов (на уровне 1 пМ и ниже). В работе [234] флуоресценция кальцеина синего (КС) тушится при образовании комплекса с железом, а при добавлении ДА он заменяет лиганд (КС), что приводит к возникновению флуоресцирующего продукта, по усилению флуоресценции которого судят о количестве введенного НМ. Предел обнаружения ДА составляет 10 мкМ. Именно железо обладает наиболее селективным действием по отношению

к ДА. Комплексы КС с другими ионами металлов ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) в меньшей степени тушили его флуоресценцию и обладали гораздо меньшей селективностью. Это достаточно простой и экономичный способ анализа по сравнению с иммуноферментным анализом.

Предложен подход к определению НМ, основанный на образовании их комплексов с  $\text{Tb}^{3+}$ . В разработанной методике аналитический сигнал определяют по усилению флуоресценции комплекса в мицеллярной среде (додецилбензолсульфоната натрия (ДДБС)) [235]. При введении ДДБС получается тройной комплекс  $\text{Tb}^{3+}$ -НМ-ДДБС, флуоресценция которого в несколько раз выше, чем флуоресценция комплекса  $\text{Tb}^{3+}$ -НМ. Пределы обнаружения ДА, АД и НА составляют 10 – 100 нм. Такой способ позволяет с высокой селективностью определять НМ в сыворотке крови без предварительного разделения методом ВЭЖХ.

В последнее время для оценки содержания нейромедиаторов в биологических жидкостях с высокой чувствительностью и селективностью широко используют спектрофлуориметрические методы на основе комплексов аналитов с ионами лантанидов, таких как  $\text{Tb}^{3+}$  или  $\text{Eu}^{3+}$ . Они имеют особые характеристики люминесценции, которые возникают в результате перехода между их  $f$ -орбиталью, экранированной подболочкой  $5s^2$  и  $5p^6$ . Растворы ионов лантанидов демонстрируют большой Стоксов сдвиг и обладают узкой спектральной полосой флуоресценции с длительным временем жизни флуоресценции и сильным взаимодействием, особенно  $\text{Tb}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , поскольку их энергетические уровни перекрываются с областью ультрафиолетового излучения. Вышеуказанные характеристики координационных комплексов редкоземельных ионов (особенно  $\text{Tb}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ ) позволяют использовать их в качестве зонда флуоресценции для определения НМ. Также образование комплексов нейромедиаторов с ионами металлов позволяет повысить стабильность аналитов в пробе и получать более достоверные и воспроизводимые результаты.

В работе [236] предложена методика определения АД, НА и ДА по флуоресценции их комплексов с ионом тербия. Установлено, что флуоресценция этих комплексов существенно усиливается в присутствии коллоидных наночастиц

серебра. Раствор соли тербия сам по себе имеет очень слабую собственную флуоресценцию из-за слабого поглощения иона металла. Тербий может выступать в качестве акцептора энергии органического лиганда, находящегося в нижнем триплетном состоянии и сильно поглощающего в УФ-области. Это взаимодействие лиганд-тербий способствует усилению интенсивности флуоресценции НМ. Сферические частицы могут усиливать передачу резонансной энергии флуорофорам за счет их взаимодействия в возбужденном состоянии с поверхностным плазмонным электроном в наночастицах металла. Разработанная методика позволяет получить пределы обнаружения АД, НА и ДА равные 0.25, 0.64 и 0.42 нМ, соответственно. Этот метод очень эффективен для простого и быстрого определения АД, НА, ДА в моче, дает удовлетворительные результаты: низкие пределы обнаружения (порядка 0.1 нМ), хорошую воспроизводимость ( $s_r = 0.01$ ). Сравнительные характеристики методик определения НМ с ионами металлов представлены в табл. 12.

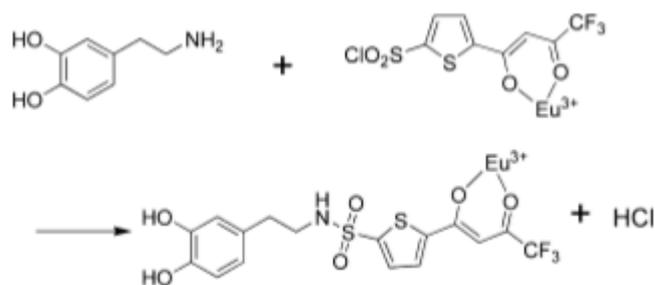
**Таблица 12.** Характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции их комплексов с ионами металлов.

Аналит	Объект анализа	Флуоресцентная система	ПО, нМ	Литература
ДА, ГВК, L-ДОФА	–	$Fe^{3+}$ –КС–НМ/метаболит	10000	[234]
ДА	Сыворотка крови, моча	$Fe^{3+}$ –углеродные наночастицы–ДА	68	[237]
	Плазма крови, моча	$Eu^{3+}$ – $La^{3+}$ –ДДБС–ДА	0.027	[238]
	Плазма крови	$Eu^{3+}$ –ХСТА–ДА	32	[239]
АД		$(Fe_3O_4+SiO_2-NH-ЭДТА-Tb^{3+})$ –ДА	200	[240]
		$Tb^{3+}$ – $Gd^{3+}$ –АД	4.5	[241]
НА, АД, ДА	Моча	$Tb^{3+}$ – НМ	0.25, 0.64, 0.42	[236]
		$Tb^{3+}$ –ЭДТА–НМ	10, 40, 70	[242]
		$NaLuGdF_4:Yb^{3+}/Er^{3+}-Fe^{3+}/Cu^{2+}/Li^+$ –НМ	2.8, 2.4, 2.5	[247]
	Сыворотка	$Tb^{3+}$ –ДДБС–НМ	10 –	[235]

	крови		100	
НА, АД		$Tb^{3+}-La^{3+}-HM$ $Na_2SO_3$	3.2, 3.4	[243]
ДА		$Tb^{3+}-HCOO^-$ -наночастицы Ag-ДА	0.15	[244]
		$Tb^{3+}-Y^{3+}$ -наночастицы Ag-ДА	0.57	[245]
		$Tb^{3+}-Ac^-$ -нанопризмы Ag-ДА	0.22	[246]

Помимо отдельных ионов металлов для увеличения интенсивности флуоресценции применяют тройные комплексы на основе двух ионов металлов и НМ. Так, в работе [238] использована система европий (III) – дофамин – лантан (III). Метод основан на усилении люминесценции  $Eu^{3+}$  за счет образования тройного комплекса с ДА в присутствии  $La^{3+}$  в качестве дополнительного агента, усиливающего люминесценцию, и додецилбензолсульфоната натрия в качестве поверхностно-активного вещества. Экспериментальные результаты показали, что сигнал люминесценции максимален при pH 8.0 – 8.5 при использовании в качестве буферного раствора 0.03 М Tris-HCl, т.к. молекула Tris-HCl может легко связываться с  $Eu^{3+}$  в комплекс и высвободить молекулы воды, повышая тем самым интенсивность люминесценции за счет уменьшения потерь энергии безызлучательных переходов. Предел обнаружения ДА по разработанной методике составляет 27 пМ.

Для определения следовых количеств ДА был разработан новый спектрофлуориметрический метод [239]. Установлено, что использование комплекса хлорсульфонилтеноилтрифторацетон (ХСТА) –  $Eu^{3+}$  при определении ДА заметно усиливает флуоресценцию, причём интенсивность флуоресценции комплекса пропорциональна концентрации ДА. Активный хлорид в группе сульфонилхлорида ковалентно связывается с аминогруппой ДА, в результате чего образуется тройной комплекс  $Eu^{3+}-ХСТА-ДА$ . Авторами предложен возможный механизм реакции (рис. 5).

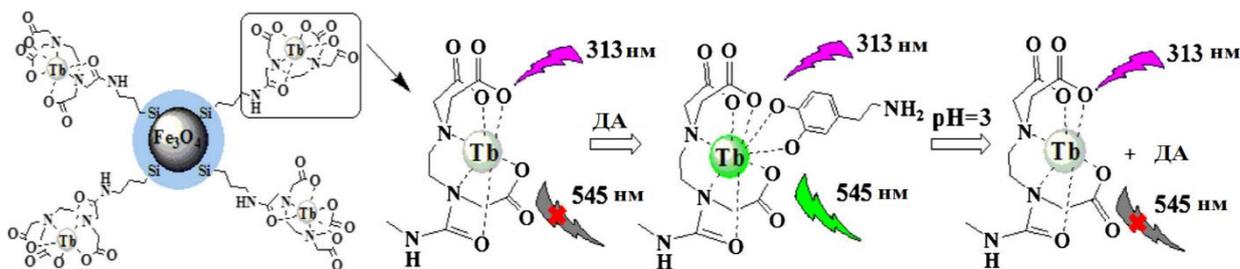


**Рис. 5.** Возможный механизм реакции образования тройного комплекса  $\text{Eu}^{3+}$ –ХСТА–ДА [239].

Судя по результатам исследований, чувствительность определения ДА можно дополнительно увеличить при использовании поверхностно-активного вещества Тритон Х-100. Предел обнаружения ДА по данной методике составил 32 нМ.

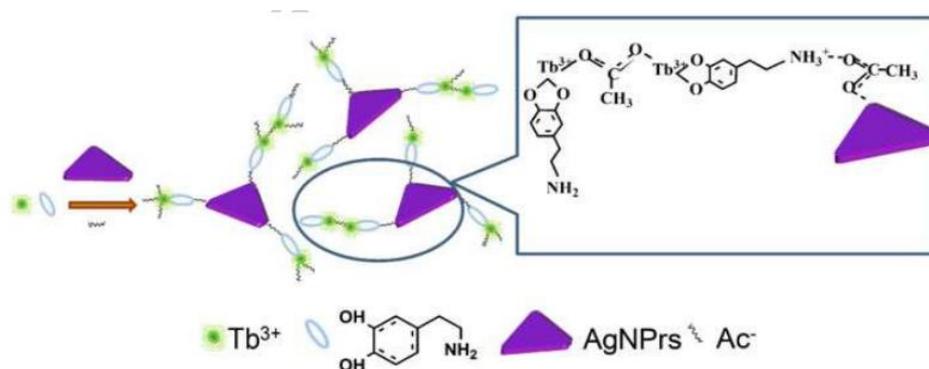
Авторами [242] был разработан флуоресцентный метод определения норэпинефрина, эпинефрина и дофамина на основе образования ими комплекса с ионами тербия (III), в результате которого наблюдаются большой стоксовый сдвиг и узкая полоса поглощения в спектре. Этот метод требует предварительного концентрирования НМ, для чего в работе используют твердофазную экстракцию. Преимуществами методики являются высокая чувствительность (ПО 10 – 70 нМ), селективность, хорошая воспроизводимость.

Разработана [240] флуоресцентная методика определения дофамина в моче с использованием системы  $\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{SiO}_2\text{-NH-ЭДТА-Tb}^{3+}$ . ДА образует комплекс с этой системой, который флуоресцирует при 546 нм (рис. 6). Предел обнаружения ДА составил 0.2 мкМ.



**Рис. 6.** Механизм определения ДА по флуоресценции его комплекса с  $\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{SiO}_2\text{-NH-ЭДТА-Tb}^{3+}$ .

Авторы [246] предложили новый способ высокоселективного и чувствительного определения дофамина с использованием нанопризм серебра (AgNPrs) и  $Tb^{3+}$ . Синтезированные серебряные нанопризмы с подходящей локализованной поверхностью действовали как оптимальные платформы для поверхностно-усиленной флуоресценции. Ацетат натрия ( $Ac^-$ ) в этой системе играет роль со-лиганда комплекса  $Tb^{3+}$ -ДА. В присутствии  $Ac^-$  и AgNPrs в системе  $Tb^{3+}$ -ДА интенсивность флуоресценции резко возрастала, следовательно, усиление сигнала в системе достигается в результате синергического действия AgNPrs и  $Ac^-$  (рис. 7). Предел обнаружения ДА по разработанной методике составил 0.22 нМ.

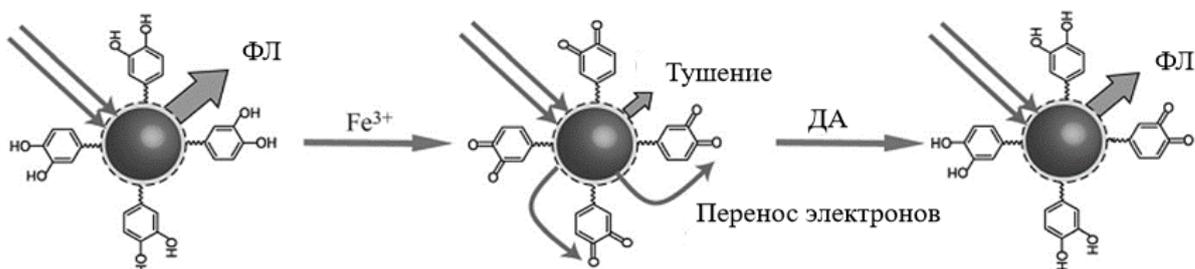


**Рис. 7.** Схема синергического действия нанопризм серебра и  $Ac^-$  на комплекс  $Tb^{3+}$ -ДА.

Флуориметрический метод определения эpineфрина разработан авторами [241] с использованием эффекта со-люминесценции в системе  $Tb^{3+}$ - $Gd^{3+}$ -АД. Было обнаружено, что  $Gd^{3+}$  повышает интенсивность флуоресценции системы  $Tb^{3+}$ -АД при рН 10, поскольку происходит межмолекулярный перенос энергии от  $Gd^{3+}$  к  $Tb^{3+}$ . Предел обнаружения эpineфрина составляет 4.5 нМ.

Авторами [237] предложен новый тип сенсора на основе углеродных наночастиц (УНЧ) для обнаружения  $Fe^{3+}$  и ДА с высокой чувствительностью и селективностью. Дофамин использован в качестве источника фотолуминесцентных углеродных наночастиц. Схема наночастиц представлена на рис. 8. Подготовленные УНЧ содержат своеобразные группы катехола на их поверхностях. Метод основан на том, что  $Fe^{3+}$  может окислять гидрохиноновые группы на поверхностях УНЧ до хинона, вследствие чего гасится флуоресценция

углеродных наночастиц, и ДА конкурирует с наночастицами за взаимодействие с железом. Предел обнаружения ДА по этой методике составляет 68 нМ.



**Рис. 8.** Схематическое изображение флуоресцентных углеродных наночастиц для определения ДА в присутствии ионов Fe<sup>3+</sup>.

Таким образом, подходы к определению НМ и их метаболитов, основанные на образовании их комплексов с ионами металлов, являются перспективными вследствие увеличения стабильности аналитов во время анализа, благодаря связыванию их в устойчивые комплексы, а также вследствие простоты, высокой чувствительности (на уровне 1 пМ) и селективности этих методик.

### ***Определение нейромедиаторов и их метаболитов с использованием твердофазных флуоресцентных систем***

Твердофазная флуоресценция – это флуоресценция в гелях, на пленках, мембранах или любой твердой поверхности. По сравнению с флуоресценцией в растворе, она имеет такие преимущества как простая пробоподготовка, стабилизация аналитов в образце, и, соответственно, уменьшение погрешности анализа, а также возможность анализа матриц сложного состава, повышение экспрессности анализа за счет предварительной иммобилизации компонентов реакции.

В работах [248, 249] рассматривается возможность определения *L*-ДОФА в коллагеновом геле. Авторы выяснили, что *L*-ДОФА и другие производные НМ стабилизируются в коллагеновой матрице. В работе [250] описана методика определения НМ методом флуоресценции в тканях мозга эмбрионов крыс. Процедура сочетает метод перфузии в системе магний - формальдегид - глутаровый альдегид с дегидратацией и введением

полиэтиленгликоля. Несколько примеров иллюстрируют чувствительность метода и хорошее сохранение целостности секций тканей. Флуоресцентный сигнал детектируют в тканях, метод прост и не требует специального оборудования. Авторы отметили, что образцы тканей можно хранить в течение нескольких недель без заметной потери интенсивности флуоресценции.

Авторы работы [251] предложили высокочувствительную методику определения ДА (ПО 45 пМ) с использованием функционализированных аптамерами квантовых точек  $\text{MoS}_2$  и наночастиц  $\text{MoS}_2$ . Модифицированные квантовые точки обладают собственной флуоресценцией, при их абсорбции на наночастицах сигнал флуоресценции пропадает. При добавлении ДА он связывается с аптамерами, квантовые точки отделяются от наночастиц, и сигнал флуоресценции от модифицированных аптамерами с ДА квантовых точек восстанавливается.

Известна методика определения ДА в моче с использованием липидных пленок [252]. Липидные пленки имеют собственную флуоресценцию, но при добавлении рецептора резорцинарена она тушится. При введении в систему ДА флуоресценция вновь усиливается, что и позволяет его определять. Авторы работы обратили внимание на то, что другие компоненты мочи не мешают определению ДА, так как они не способствуют усилению флуоресценции.

В работе [253] изучена возможность флуоресцентного определения ДА, АД и НА в трехфазном тонком слое (алюминиевая пленка, 5-*N,N*-диметиламино-нафталин-1-сульфонированная, целлюлозная пленка и силикагель). Интенсивность сигнала измеряли с помощью сканирующего флуориметра, при этом слой был накрыт стеклом.

Разрабатывается множество подходов, основанных на тушении нейромедиаторами или продуктами их окисления флуоресценции различных полимеров, наночастиц, нанокристаллов, квантовых точек и др. Например, в работе [254] НМ в присутствии фермента (пероксидазы) окисляют пероксидом водорода, а продукт их окисления служит тушителем фотолюминесценции водорастворимого полимера – поли(2,5-бис(3-сульфонатопропокси)-1,4-фенил-этинилена-1,4-поли(фениленэтинилена)). Чувствительность определения НМ по этой методике

невысока (порядка 0.1 мкМ), но возможно групповое высокоселективное определение нескольких нейромедиаторов [255].

Существуют методики, в которых один или несколько компонентов системы иммобилизованы в геле, пленке или на поверхности, а остальные в растворе. Встречаются методики, основанные на использовании наночастиц, например, на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Их применяют как аналог пероксидазы из корней хрена. Такой подход базируется на ингибировании нейромедиаторами реакции окисления коммерческого реагента *Amplex UltraRed* (субстрата пероксидазы) в присутствии пероксида водорода и наночастиц оксида железа(III). Несмотря на довольно высокую чувствительность (до 3 нМ), эта методика обладает лишь высокой групповой селективностью по отношению к НМ и их метаболитам, но не позволяет осуществлять мультиплексное определение аналитов [256].

Твердофазный флуоресцентный биосенсор для определения фенольных соединений, таких как простые замещенные фенолы и катехоламины, а также пероксидов был разработан авторами [233]. Аналитический сигнал измеряли непосредственно в биочувствительном слое, содержащем полиэлектrolитный комплекс {пероксидаза-хитозан}, на поверхности сенсора. Были предложены 2 флуоресцентные индикаторные реакции для косвенных (основанных на взаимодействии фенольных соединений с меченым хитозаном) и прямых (на основе катализируемой пероксидазой дериватизации фенольных соединений) определений.

Известны работы, основанные на тушении нейромедиаторами флуоресценции квантовых точек на основе полипиррола с графеном [257], тиогликолевой кислоты, функционализированной CdTe квантовыми точками [258], графена [259], на основе CuInS<sub>2</sub>, функционализированных 3-аминофенилборной кислотой [260].

Существуют методы определения нейромедиаторов, основанные на тушении флуоресценции наноструктур металла при добавлении НМ в систему. Авторы [261] разработали подход к определению ДА в спинномозговой жидкости по тушению флуоресценции нанокластеров золота с бычьим сывороточным альбумином (БСА). В работе [262] изучен процесс тушения флуоресценции

нанокристаллов CdSe в присутствии ДА. Одна из причин тушения флуоресценции заключается в том, что аминогруппа в молекуле дофамина может связываться с поверхностью нанокристаллов CdSe, выступая в качестве акцептора дырок, тем самым гася флуоресценцию. А в работе [263] рассмотрено тушение дофамином флуоресценции нанокластеров золота. Это возможно, благодаря процессу фотоиндуцированного переноса электронов при взаимодействии ДА с нанокластерами золота. Для селективного определения ДА и АД, основанного на тушении флуоресценции водного раствора флуоресцеина в работе [264] использовали наночастицы диоксида титана, модифицированного фосфатом (P-TiO<sub>2</sub>).

Сравнение аналитических характеристик методик определения НМ и их метаболитов с использованием твердофазной флуоресценции представлено в табл. 13.

**Таблица 13.** Характеристики методик определения нейромедиаторов по их твердофазной флуоресценции.

Аналит	Фаза, в которой детектируется флуоресценция	Флуоресцентная система	ПО, нМ	Литература
L-ДОФА	Гель	Коллаген – L-ДОФА	1000	[248, 249]
НМ	Ткань	Ткани органов крыс – магний – формальдегид – глутаровый альдегид – НМ	–	[250]
	Трехфазный слой	Трехфазный слой (алюминиевая пленка, 5-N,N-диметиламино-нафталин-1-сульфонилированная, целлюлозная пленка и силикагель) – НМ	24	[253]
ДА	Пленка	Липидная пленка – резорцинарен – ДА	10	[252]
	Нанокластеры	Нанокластеры золота – БСА – ДА	0.8	[261]
		Нанокластеры золота – ДА	10	[263]
Нанокристаллы	Нанокристаллы CdSe – ДА	58	[262]	
АД, ДА	Наночастицы	Флуоресцеин – P-TiO <sub>2</sub> – НМ	20, 34	[264]

НА, АД, ДА, L-ДОФА		Наночастицы Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> – Amplex UltraRed – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – НМ	3 – 6	[256]
ДА	Квантовые точки	Функционализированные аптамерами квантовые точки MoS <sub>2</sub> – нанолисты MoS <sub>2</sub> – ДА	0.045	[251]
		Графеновые квантовые точки – ДА	220	[259]
F-CuInS <sub>2</sub> – ДА		200	[260]	
Тиогликолевая кислота, функционализированная квантовыми точками CdTe – НМ		360, 240, 200	[258]	
НА, ДА, L-ДОФА				

Таким образом, в литературе описано большое количество спектроскопических систем для определения нейромедиаторов в биообъектах [265]. Однако работы, основанные на определении НМ и их метаболитов по тушению флуоресценции, не находят широкого применения в анализе биологических образцов, так как компоненты матрицы могут влиять на результаты определения (тушить или усиливать сигнал). В настоящее время чувствительность большинства из них не достигает наномолярных содержаний нейромедиаторов, что также ограничивает применимость разработанных методик в анализе биообъектов. При этом твердофазные флуоресцентные системы, основанные на детектировании усиления интенсивности флуоресценции НМ и их метаболитов в твердой фазе, становятся все более перспективными, благодаря стабилизации аналитов в пробе, повышению чувствительности и экспрессности их определения, нивелированию возможного мешающего влияния матрицы образца.

## **2.6. Определение нейромедиаторов и их метаболитов с помощью сенсорных устройств**

Одной из основных тенденций развития аналитических систем является упрощение, удешевление их конструкции, уменьшение их размеров. Этого удается достичь за счет создания сенсоров различных типов: электрохимических, спектрофотометрических, флуориметрических и др. (табл. 14).

Самую распространенную группу составляют *электрохимические сенсоры*, благодаря разнообразию возможностей модификации рабочего электрода [266]. Среди модифицированных сенсоров часто встречаются сенсоры с молекулярными

отпечатками [267]: с молекулярными биоотпечатками ДНК [268]. с импрегнированным в липидную мембрану резорцин[4]арен-рецептором [269].

В [270] предложен *биомиметический* сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного комплексом  $[\text{Cu}(\mu_2\text{-ГЭП})(\text{ГЭП-Н})_2 \cdot 2\text{ClO}_4$  (ГЭП = 2-(2-гидроксиэтил)пиридин) и наночастицами серебра. *Электрохемилюминесцентный* сенсор на основе мультислойных нанотрубок оксида графита и наночастиц золота был использован в работе [271] для определения дофамина.

Совершенствование *амперометрических* и *кондуктометрических* устройств позволяет нивелировать мешающее влияние (как отмечалось выше в обзоре литературы) аскорбиновой кислоты при определении НМ [272], [273]. Новые способы модификации электродов дают возможность мультиплексного определения нескольких аналитов, и в результате, позволяют достичь пределов обнаружения ниже характерных для традиционных способов (порядка мкМ), однако также недостаточных для анализа биологических жидкостей.

В то время как направленная модификация поверхности электрода позволяет значительно уменьшить мешающее влияние матрицы биологических объектов, она часто снижает эффективность переноса электронов к поверхности электрода. В связи с этим, в настоящее время в литературе предложены различные пути модификации поверхностей электродов с целью повышения чувствительности определения НМ и их метаболитов [274]. Например, А. Германс и соавторы [275] предложили для определения ДА микроэлектроды из золотых и углеродных волокон. А авторы [276] создали электрохимический биосенсор путем электроосаждения нанокластеров палладия на полифурановые пленки на базе платинового электрода. Такой сенсор позволяет определять только ДА на фоне аскорбиновой кислоты.

Следует отметить разработку золь-гель полимеров с молекулярными отпечатками для селективного определения, например, ДА или НА [277]. Авторы использовали для определения дофамина *биомиметический* сенсор, функционализированный оксидами индия и олова с молекулярными отпечатками на основе аминопропил-триэтоксисилана.

В последнее время при разработке электрохимических сенсоров, стали активно использовать ионные жидкости [157]. Например, авторы [278] использовали восстановленный графеноксидный композитный стеклоуглеродный электрод, модифицированный ионной жидкостью (1-бутил-1-метилпиперидиний гексафторфосфат) и циклодекстрином. В работе [156] для электрохимического определения ДА, АД и добутамина в водных растворах использовали печатные электроды, модифицированные углеродной пастой, состоящей из графитового порошка, диспергированного в ионных жидкостях.

Для повышения селективности определения НМ и их метаболитов в некоторых случаях модифицируют электрод ферментом. Увеличение времени жизни таких датчиков достигается путем направленного выбора биосовместимого полимера для адгезии фермента (тирозины), например, таких, как гуаровая камедь, агарозные композиционные мембраны для селективного определения L-ДОФА и ДА с ПО 1.0 и 0.9 мкМ, соответственно [279], или магнитный ксерогель из оксида кремния с оксидом титана для определения ДА и АД с ПО 0.7 и 2.9 мкМ, соответственно [280].

В литературе предложены единичные работы по определению нейромедиаторов с использованием оптических сенсоров. В работе [281] разработали спектрофотометрический сенсор на основе наночастиц золота, модифицированных лигандами с концевым бензальдегидом для распознавания аминокислотного остатка и N-ацетилцистеином для распознавания фенольной гидроксильной группы в НМН с ПО 0.2 мкМ. Авторы работы [282] для определения дофамина предложили *иммуноферментный* биосенсор на основе дофамин-связывающих аптамеров (ДСА) в качестве распознающих элементов и немодифицированных наночастиц золота в качестве зондов. Аналитический сигнал детектировали *спектрофотометрически (СФ)*.

**Таблица 14.** Характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов с использованием различных сенсоров.

Аналит	Объект анализа	Сенсор	Метод детектирования	ПО, мкМ	Литература	
НА, серотонин	–	Электрохими- ческий	ЦВАМ, КВВАМ	0.2, 0.01	[283]	
ДА, АД			ДСК (дифференциальная сканирующая калориметрия)	0.6, 25	[269]	
ДА			ДИВАМ	0.7, 2.9	[280]	
НА, ДА	Моча, сыворотка крови			0.05	[276]	
НА	–			0.018, 0.015	[157]	
				0.1	[267]	
НА	Моча, кровь		ЦВАМ, ДИВАМ, импеданс	0.006	[268]	
	Моча, сыворотка крови		ПВАМ (прямоугольная ВАМ), импеданс, ЦВАМ	0.5 нМ	[284]	
НА, АД, ДА, L-ДОФА	Моча, сыворотка крови		ЦВАМ, КВВАМ, импеданс	0.85, 2.4, 0.4, 0.35 нМ	[270]	
ДА	–		БСВА	0.5	[275]	
			Амперометрия и кондуктометрия	0.1	[272]	
			Амперометрия	0.2	[274]	
НА, АД, ДА	Моча			0.2, 0.3, 0.4	[273]	
ДА				Потенциометрия	0.001	[286]
НА, АД, ДА, серотонин,				ЦВАМ	0.01 нМ	[278]

<i>L</i> -ДОФА, ДОФУК					
НА, ДА				2	[277]
ДА, <i>L</i> -ДОФА	–			0.9, 1	[279]
АД, ДА, добутамин				1.2, 0.13, 0.05	[156]
ДА	Сыворотка крови кролика			260	[287]
	Моча и плазма крови	Электрохемилюминесцентный		0.067	[271]
	Спинномозговая жидкость	Флуоресцентный	ФЛ	46 нМ	[285]
	–	Имуноферментный		0.4	[282]
НМН	Искусственная моча	Спектрофотометрический	СФ	0.2	[281]

К сожалению, большинство сенсоров имеет довольно сложную конструкцию распознающего элемента. Результаты анализов с использованием сенсоров не всегда воспроизводимы из-за загрязнения их поверхности. Чувствительность большинства из них недостаточна для определения наномолярных содержаний нейромедиаторов, что ограничивает применимость разработанных сенсорных систем в анализе биообъектов. Также для разработанных сенсорных устройств необходима длительная и трудоемкая пробоподготовка образца. Существующие сенсоры не обеспечивают мультиплексное определение сразу нескольких НМ и их метаболитов в образце. В большинстве случаев они дают возможность определять лишь один аналит.

## **2.7. Мультиплексный анализ и мультиплексное определение нейромедиаторов и их метаболитов в биологических образцах**

Мультиплексный анализ – вид анализа, обеспечивающий одновременное определение сразу нескольких соединений (например, биомолекул) одного класса в одном образце в течение одного цикла анализа.

Основой мультиплексного биоанализа стали технологии, использующие для узнавания аналитов:

- высокую специфичность взаимодействий аптамеров или синтетических рецепторов с определенными функциональными группами аналитов;
- специфичные взаимодействия антиген-антитело;
- другие виды специфичных взаимодействий (фермент – субстрат и др.).

Для обеспечения мультиплексного анализа разрабатывают особые высокопроизводительные технологии (на основе микрочипов, датчиков, сенсоров) и оборудование, включающее специализированные системы детектирования (например, планшетные ридеры) и компьютерное обеспечение. А микрочипы представляют из себя специальные матрицы с нанесёнными молекулами нуклеиновых кислот, белков или других биомолекул для одновременного проведения большого числа анализов [96 – 98, 288 – 292]. В клинической практике применение мультиплексного анализа открывает возможности для качественного

улучшения биохимического обследования пациентов в интересах ранней диагностики и контроля эффективности лечения.

В связи с этим разрабатывают новые способы мультиплексного определения НМ и их метаболитов в диагностических целях. Примером таких разработок может служить подход, основанный на использовании флуоресцентных микросфер (магнитных или полистирольных) в качестве носителя специфических биореагентов на каждый биомаркер, отличающихся соотношениями красителей внутри них. Функциональной особенностью флуориметрического детектирования в этой методике является наличие двух лазеров, управляемых компьютерными алгоритмами, которые позволяют анализировать каждую микросферу и идентифицировать индивидуальные вещества по их уникальным спектрам флуоресценции, а также определять сразу несколько аналитов из одной аликвоты образца [290, 291].

Аналогичную технику использовали для мультиплексного определения НМ и их метаболитов [93]. Нейромедиаторы из мочи экстрагировали с использованием цис-диол-специфического аффинного геля. Бiotинилирование проводили с использованием реакции между аминной группой НМ и сложным эфиром с биотином с последующим ферментативным *O*-метилением. Экстракт, содержащий модифицированные нейромедиаторы, инкубировали со спектрально различимыми наборами магнитных шариков, каждый из которых имел специфическое антитело к эпинефрину, норэпинефрину или дофамину. Модифицированные НМ, связанные с конкретными антителами, визуализировали с помощью стрептавидина-*R*-фикоэритрина. Для идентификации каждой микросферы, красный лазер внутри анализатора Lumiplex возбуждает внутренние красные и инфракрасные красители. Зеленый лазер возбуждает любую оранжевую флуоресценцию, вызванную связыванием целевых аналитов. Разработанная методика позволяет определять АД, НА и ДА с ПО 1.0, 3.1, 11.6 нМ, соответственно.

Авторы [292] предложили новый биовизуализационный датчик для одновременного детектирования пространственного и временного распределения мультинейротрансмиттеров. Он состоит из нескольких мембран с

иммобилизованным ферментом на матрице размером  $128 \times 128$  пикселей со схемой считывания. Апиразу и ацетилхолинэстеразу в качестве чувствительных элементов используют для распознавания 5'-трифосфата аденозина (АТФ) и ацетилхолина (АЦХ), соответственно. При воздействии этих ферментов на АТФ и АЦХ выделяются ионы водорода, по диффузии которых можно определить эти соединения в режиме реального времени с ПО 0.43 и 0.07 мМ, соответственно. Этого достаточно для детектирования АТФ и АЦХ в коре головного мозга человека и крови. С предложенным биовизуализационным датчиком возможен настраиваемый мониторинг активности различных биохимических маркеров с использованием различных видов протон-потребляющих или генерирующих ферментов.

Создаются новые спектроскопические методики для мультиплексного определения НМ. Например, в работе [293] авторы разработали подход на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР-спектроскопии). АД, ДА и серотонин образуют комплексы состава 1 : 1 с макроциклическим хозяином, кукурбит[7]урилом (КБ[7]). Добавление КБ[7] к коллоидному раствору золота приводит к немедленному соединению соседних наночастиц на равномерных расстояниях между ними для получения четких горячих точек, которые позволяют мгновенно детектировать аналитический сигнал методом ГКР-спектроскопии. Аналиты, уже присутствующие в коллоидном растворе, локализуются в горячей точке через их сродство к полости КБ[7]. Каждый аналит имеет полосы с характеристичной для него частотой, что обеспечивает селективность их определения. Предложенная методика была апробирована для определения нейромедиаторов в моче с ПО  $< 1$  нМ.

Небольшая часть хроматографических и электрохимических методик также позволяет осуществлять мультиплексное определение НМ и их метаболитов, однако только 2 – 3-х представителей этого класса, а не сразу всех. Например, авторам [294] удалось разработать методику одновременного определения ДА, серотонина, 5-ГИУК в моче методом ЖХ-МС/МС с ПО 9, 18 и 11 нМ, соответственно. А в [148] с помощью модифицированного 5-гидрокситриптофаном стеклоуглеродного электрода одновременно определили ДА и серотонин с ПО 0.3 и 1.7 мкМ, соответственно.

Однако сложная подготовка пробы образца, шумовые помехи, длительность анализа, разрушение аналитов в ходе анализа, а в иммунохимических методах – низкая специфичность антител к изменениям в структуре нейромедиаторов ограничивают применение существующих методов мультиплексного определения НМ и их метаболитов в целях диагностики заболеваний. Таким образом, проблема комплексного определения НМ и их метаболитов в биологических объектах различной природы по-прежнему чрезвычайно актуальна. Для проведения большого количества анализов в целях диагностики и прогностики различных заболеваний требуются новые методики, которые бы одновременно сочетали высокую чувствительность, селективность, экспрессность, простоту с экологичностью, низкой стоимостью, возможностью автоматизации и мультиплексности анализа.

### **Глава 3. Методы подготовки проб биологических жидкостей и выделения нейромедиаторов и их метаболитов из матрицы реальных объектов**

В качестве анализируемых биологических жидкостей для диагностики заболеваний, связанных с нарушением нейромедиаторного обмена, используют кровь, мочу, спинномозговую жидкость [283, 295], а также клетки [296 – 298]. Для достоверности анализа пациенту в течение нескольких дней до сдачи анализа необходимо соблюдать определенную диету [299]. После отбора проб биологических жидкостей для проведения анализа необходима их предварительная подготовка, так как матрица имеет очень сложный состав, компоненты которой так или иначе могут оказывать влияние на правильность результатов анализа.

Большинство предложенных методик применяют для определения НМ и их метаболитов в сыворотке крови, для получения которой диализом удаляют белки через мембраны [300]. Также для осаждения белковой матрицы крови образцы центрифугируют [284]. Еще одним способом устранения матричных белковых эффектов крови на результаты анализа является обработка ее сыворотки 20 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты [235]. Для нивелирования мешающего влияния сложной матрицы мочи и крови применяют 0.2 М фосфатный буферный раствор (ФБР) pH 7.2 [301]. Кроме того, в мочу добавляют 6 М HCl для

предотвращения деструкции НМ [302], выпаривают в вакууме при комнатной температуре, а затем растворяют в метаноле [303].

Для определения НМ в биологических жидкостях возможно использование сухой плазмы и пятен мочи [304]. В свежесобранные образцы мочи и крови, в ряде случаев, добавляют консерванты, например,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , для предотвращения окисления биологических жидкостей. Для получения сухой плазмы в кровь добавляют ЭДТА в качестве коагулянта, центрифугируют и замораживают при температуре  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , затем высушивают при комнатной температуре. Для получения пятен мочи ее наносят на специальную бумагу и высушивают при комнатной температуре. Образцы крови хранят при температуре  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , а образцы мочи – при  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . А в некоторых работах подготовка образцов мочи и крови не требуется [257, 286] из-за высокой специфичности разработанных сенсорных систем.

Существует множество способов отделения НМ и устранения мешающего влияния матрицы с целью повышения селективности и чувствительности их определения в биологических жидкостях: твердофазная, жидкость-жидкостная экстракция; комплексообразование и др. Широко распространенным вариантом выделения НМ и их метаболитов из реальных объектов является *твердофазная экстракция*. Например, в методе ВЭЖХ в 90-х гг. использовали два способа выделения НМ, которые можно подразделить на методы, использующие фенилборную кислоту (ФБК), и экстракцию активированным оксидом алюминия [305 – 309]. Необходимость химической активации оксида алюминия (результаты которой трудно воспроизводимы) и десорбция НМ кислотами [310 – 313], являются основными причинами того, что этот способ не нашел широкого применения в ВЭЖХ [314].

Так как все большую популярность при анализе НМ получает МС-детектирование, необходима особенно тщательная очистка аналитов от матрицы биологических жидкостей. Для этого авторы конструируют различные планшеты для твердофазной экстракции [50], картриджи [45], колонки на основе различных сорбентов [315, 316].

Встречаются и методики капиллярного электрофореза с использованием отделения НМ от матрицы биологических жидкостей оксидом алюминия [142]. В методе КЭ также распространены различные картриджи на основе катионообменных сорбентов для твердофазной экстракции НМ [108], а также микроэкстракция с помощью волокон с молекулярными отпечатками и без них [113].

Во флуоресцентных методах раньше использовали катионообменные колонки [317]. Сейчас имеется широкий выбор способов отделения НМ от матрицы, например, квантовые точки [257], полимерные мембраны [318]. Еще одним перспективным высокоспецифичным способом отделения НМ является использование каликсаренов карбоновых кислот. [319]. Особенно популярными в последнее время стали различные микрочипы на основе фенилборной или метакриловой кислот [205, 206].

В электрохимических методах НМ выделяют с помощью молекулярно-импринтированных полимеров [284, 286]. Также используют полимерные мембраны, включающие в себя  $\beta$ -циклодекстрин и калий тетраакс-(4-хлорфенил)-борат [158]. Но воспроизводимость и селективность таких способов оставляет желать лучшего.

Кроме того, для выделения нейромедиаторов из биологических объектов активно применяют *распознающие биологические молекулы*. Для повышения чувствительности и селективности их определения все большее применение находят антитела. В иммунных методах используют моноклональные антитела [96] и поликлональные антитела, меченные пероксидазой [97, 98]. Все большее распространение получает использование аптамеров – небольших молекул нуклеиновых кислот (например, рибонуклеиновой кислоты с биотином для иммобилизации на авидиновую пластину из биотин-связывающего белка), которые могут выполнять функции высокоспецифичных рецепторов низкомолекулярных органических соединений, в том числе и НМ [300].

Немаловажным способом выделения НМ из крови является *образование комплексов с ионами металлов*. Например, использование ионов  $Tb^{3+}$  в мицеллярной среде (додецилбензолсульфонат натрия (ДДБС)) с образованием тройного флуоресцирующего комплекса  $Tb^{3+}$ -ДДБС-НМ [235] – это довольно

простой и эффективный способ извлечения АД, НА, ДА из сыворотки крови, кроме того, этот процесс является и индикаторной системой для определения аналитов, что значительно упрощает анализ и повышает его точность.

*Жидкость-жидкостная экстракция* меньше распространена среди способов пробоподготовки из-за высокой трудоемкости и менее высоких степеней извлечения, чем при других подходах для отделения аналитов от матрицы. Например, в работе [320] для пробоподготовки тканей мозга крыс, плазмы крови и клеток была использована дисперсионная ультразвуковая микроэкстракция ионной жидкостью.

Следует отметить, что не существует универсального подхода к подготовке проб биологических жидкостей и выделению из них НМ. Все предложенные способы занимают от 15 мин до нескольких часов, эффективность выделения НМ из реальных объектов составляет от 80 до 100 %. Зачастую в процессе такой длительной и трудоемкой подготовки проб к анализу часть аналитов, а иногда и все, подвергаются деструкции. С использованием разработанных приемов выделения НМ удастся обеспечить пределы их обнаружения в ряде случаев на уровне 1 нМ, но чаще на уровне 1 мкМ (табл. 15). Поэтому экспрессность, чувствительность, точность и правильность определения НМ и их метаболитов после пробоподготовки не всегда может соответствовать требованиям, предъявляемым к методам биохимической диагностики заболеваний.

Исходя из анализа литературы, можно сделать вывод, что разработка подходов к мультиплексному определению маркеров нейромедиаторного обмена в биологических объектах в целях диагностики заболеваний является актуальным научным направлением. Наиболее перспективными подходами к решению поставленной задачи являются твердофазные флуоресцентные индикаторные системы в сочетании с ферментативной дериватизацией или образованием комплексов с ионами металлов, так как они способны обеспечить стабилизацию состава пробы, мультиплексное, точное, воспроизводимое, высокочувствительное, селективное и экспрессное определение НМ и их метаболитов в биологических образцах без или с минимальной пробоподготовкой.

**Таблица 15.** Характеристики методик подготовки проб биологических образцов для определения нейромедиаторов и их метаболитов различными методами.

Способ пробоподготовки	Метод выделения	Выделяемые и определяемые соединения	Объект анализа	Метод определения	Детектор	ПО, нМ	Литература	
Твердофазная экстракция	Картридж на основе полимерной смолы, модифицированной краунэфиром	НА, АД, ДА	Моча, кровь	ВЭЖХ	Амперометрический	50	[45]	
	Активированный оксид алюминия					0.008	[310]	
	Картридж с ФБК	НА, АД, ДА, МН, НМН, ВМК, ГВК	Моча		Кулонометрический	8, 11, 15	[307]	
	Колонка на основе сорбента C <sub>18</sub>					30	[316]	
	Газонепроницаемый шприц с сорбентом Si-C <sub>18</sub>		Сухая плазма и пятна мочи			0.5	[304]	
	Насадочная капиллярная колонка на основе сорбента с полимерной ионной жидкостью и дифенилборной кислотой	НА, АД, ДА	Микродиализат крови крыс		ВЭЖХ	Вольтамперометрический	0.24, 0.11, 0.20	[315]
	Планшет с мембранными фильтрами из пористого полиэтилена с		Плазма крови				УЭЖХ	МС/МС

	активированным оксидом алюминия в лунках							
Жидкость-жидкостная экстракция	Дисперсионная ультразвуковая микроэкстракция ионной жидкостью	НА, АД, ДА, серотонин, ГВК, L-ДОФА, ДОФУК	Ткани мозга крысы, плазма крови, клетки			0.1 – 6.4	[320]	
Комплексообразование	Поли- и моноклональные антитела, меченные пероксидазой	ДА	Моча, кровь	ИФА	СФ	1.0	[96 – 98]	
	Аптамеры		Сыворотка крови			0.001	[300]	
Твердофазная экстракция	Волокна на основе полимера с молекулярными отпечатками	НА, АД, ДА	Моча, кровь	КЭ			7	[113]
	Картриджи на основе катионообменных сорбентов	НА, АД, ДА, МН, НМН	Моча				МС	100 – 300
	Активированный оксид алюминия	НА, АД, ДА, L-ДОФА				Хемиллюминесцентный	100	[142]
	Подложки на основе полимеров с молекулярными отпечатками (o-аминофенола)	НА	Моча, плазма крови	ЭХ	Вольтамперометрический	0.5	[284]	

	Полимерные мембраны, включающие в себя $\beta$ -циклодекстрин и калий тетраакс-(4-хлорфенил)-борат		Моча		Потенциометрический	1000	[158]
	Каликсарены		–			–	[319]
	Квантовые точки на основе полипиррола с графеном	ДА	Моча, кровь			0.01	[257]
	Полимерные мембраны на основе борной кислоты, функционализированной дипиррометеном бора		Плазма крови	Флуориметрический	Флуориметрический	10	[318]
	Катионообменные колонки	НА, АД	Моча			0.6, 1	[317]
	Микрочипы на основе фенилборной и метакриловой кислот	НА, АД, ДА	–			5000, 55000	[205, 206]
Комплексообразование	Комплексы с ионами металлов		Сыворотка крови			0.3	[235]

# Экспериментальная часть

## Глава 4. Исходные вещества, посуда, аппаратура, обработка результатов измерений, методики эксперимента

### 4.1. Исходные вещества

В работе использовали твердые препараты пероксидазы из корней хрена (К.Ф. 1.11.1.7) («Sigma», США) ( $RZ = 2.9$ , активность по пурпурогаллину – 325 уд.ед. на 1 мг фермента). Растворы с содержанием пероксидазы 15 мкМ готовили растворением навески твердого препарата в фосфатном буферном растворе (рН 7.0). Точную концентрацию пероксидазы устанавливали спектрофотометрически ( $\varepsilon_{403} = 9.4 \cdot 10^4$  моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [321]). Твердый препарат и растворы фермента хранили в холодильнике при 4°C.

Буферные растворы готовили по известной методике [322]. Фосфатный буферный раствор (рН 7.0) готовили смешением необходимых объемов 0.1 М раствора гидрофосфата аммония, ч.д.а. и 0.1 М дигидрофосфата аммония, ч.д.а.; глициновый (рН 8.0) – 0.5 М раствора глицина, ч.д.а. и 2.0 М раствора гидроксида калия, ос.ч.; CAPS – КОН буферный раствор (рН 11.0) – 0.1 М раствора CAPS («Sigma», США) и 2.0 М раствора гидроксида калия, ос.ч. Буферные растворы MOPS, HEPES, TRIS, MES (коммерческие препараты «Sigma», США, ос.ч.) готовили растворением их точных навесок в воде и добавлением необходимого объема 2.0 М раствора гидроксида калия ос.ч. или концентрированной соляной кислоты ос.ч. Реконструирующий буфер для создания коллагенового геля готовили растворением точных навесок гидроксида натрия, гидрокарбоната натрия и HEPES в воде (NaOH 0.05 М, NaHCO<sub>3</sub> 0.26 М, HEPES 0.2 М).

Использовали 35 % раствор пероксида водорода («Sigma», США). Точную концентрацию раствора устанавливали перманганатометрически [323]. Растворы с меньшим содержанием пероксида водорода готовили ежедневно разбавлением исходного раствора водой. Растворы нейромедиаторов (НМ) (дофамина гидрохлорида, эpineфрина гидрохлорида, норэpineфрина гидрохлорида, *L*-диоксифенилаланина, серотонина), их метаболитов (норметанефрина, гомованилиновой, ванилилминдальной и 5-гидроксииндолуксусной кислот), органических кислот

(аскорбиновой и мочевиной), аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), мочевины, креатинина, глюкозы и поверхностно-активных веществ (ПАВ): неионогенных (Тритон X-100, Бридж 35, ТВИН 20, ТВИН 80), анионогенного (додецилсульфат натрия (ДДС)), катионогенного (цетилтриметиламмоний-*N*-бромид (ЦТАБ)) готовили растворением их точных навесок в воде. Растворы ароматических аминов (бензиламина и 1,2-дифенилэтилендиамина) также готовили растворением их точных навесок в воде и ДМСО, соответственно. Раствор хлорида кальция готовили растворением точной навески в воде. Все используемые препараты были коммерческими («Sigma», США) и имели степень очистки ос.ч.

Раствор 0.05 М окситетрациклина готовили растворением точной навески окситетрациклина гидрохлорида («Sigma», США, ос.ч.) в этаноле. Раствор 0.08 М европия (III) готовили растворением точной навески гексагидрата хлорида европия (III) («Sigma-Aldrich», США, ос.ч.) в воде. Растворы с меньшим содержанием европия (III) и окситетрациклина готовили разбавлением исходного раствора водой.

В работе использовали хитозан марки «low molecular weight» («Sigma» США). Раствор хитозана готовили растворением точной навески в разбавленной 0.5% уксусной кислоте.

Раствор альгината готовили растворением точной навески альгината натрия марки «medium viscosity» («Sigma», США) в воде.

Использовали бычий сывороточный альбумин («Sigma», США). Раствор альбумина готовили растворением точной навески в воде при постоянном перемешивании.

Растворы желатина готовили растворением точной навески пищевого желатина («Dr. Oetker», Польша) в воде при постоянном перемешивании и термостатировании при температуре  $\approx 40$  °С.

Использовали коллаген из хвостиков крыс тип I («Sigma», США). Раствор коллагена готовили растворением точной навески в 0.1 М растворе уксусной кислоты при постоянном перемешивании в холодильнике.

Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду с электропроводностью не менее 18.2 МОм, очищенную на установке «Milipore» (Франция).

#### **4.2. Посуда и аппаратура**

При определении ультрамалых количеств веществ большое внимание уделяли материалу и чистоте используемой посуды.

В работе использовали градуированные стеклянные пробирки и мерные колбы с притертыми пробками, которые предварительно очищали конц. азотной кислотой, обрабатывали паром в течение 10 – 15 мин и тщательно промывали деионизированной водой, а также пластиковые пробирки («Eppendorf», Германия и «Greiner», Австрия). Для отбора малых объемов растворов использовали микродозаторы («Eppendorf», Германия и «Biohit», Финляндия).

Оптическую плотность растворов во времени и спектры поглощения в УФ и видимой областях регистрировали с использованием спектрофотометра UV-1240 («Shimadzu», Япония) с точностью  $\pm 0.003$  опт. ед. Интенсивность флуоресценции, спектры возбуждения и флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse («Agilent», США). Для измерения поглощения и флуоресцентного сигнала использовали кварцевую микрокювету (объем 600 мкл,  $l = 1$  см) и 96-луночные полистирольные (ПС) микропланшеты («Costar», США и «Greiner», Австрия).

Измеряли pH буферных растворов на pH-милливольтметре «Hanna Instruments» (Германия). Для смешения компонентов индикаторной реакции использовали магнитную мешалку («Экрос», Россия). Для взвешивания препаратов использовали аналитические весы «OHAUS» (Швейцария) с точностью измерения массы  $\pm 1 \times 10^{-4}$  г. Время проведения индикаторных реакций фиксировали с помощью секундомера фирмы «Агат» (Россия) с погрешностью  $\pm 0.2$  с. Для приготовления коллагенового геля использовали термошейкер для планшетов («Biosan», Латвия).

#### **4.3. Методики эксперимента**

**Методика 1** иммобилизации пероксидазы в ячейках микропланшета. В ячейки микропланшета вводили по 30 мкл 1%-го раствора хитозана, 15 мкл 15 мкМ

раствора пероксидазы и деионизованной воды (общий объем 60 мкл). Для получения тонких пленок выдерживали микропланшет в течение суток на воздухе. Препараты иммобилизованной пероксидазы хранили при температуре 4°C.

**Методика 2** получения флуоресцирующих производных нейромедиаторов и их метаболитов с *мезо-1,2*-дифенилэтилендиамином и бензиламином, катализируемого ПХ. В стеклянную пробирку вводили последовательно: 2.0 мл 0.5 М глицинового буферного раствора с рН 8.0 (0.1 М CAPS-КОН буферного раствора, рН 11.0), 1.0 мл 1 мкМ раствора НМ/метаболита, 0.1 мл раствора ДЭД (0.1 мл 1.0 М раствора БА), 0.1 мл 30 мкМ раствора пероксидазы и 0.1 мл 3 мМ раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. После чего реакционную смесь тщательно перемешивали, переносили в кварцевую кювету и измеряли интенсивность флуоресценции по истечении 5 мин. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо НМ вводили воду. В ячейку микропланшета с иммобилизованной в пленке хитозана пероксидазой (15 мкл 15 мкМ раствора пероксидазы) последовательно вводили 125 мкл 0.5 М глицинового буферного раствора с рН 8.0 (115 мкл 0.1 М CAPS-КОН буферного раствора, рН 11.0), 10 мкл 0.05 – 100 мкМ раствора НМ/метаболита, 30 мкл 20 мМ раствора ДЭД (40 мкл 0.2 М раствора БА) и 20 мкл 1.0 мМ раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). После чего содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и измеряли интенсивность флуоресценции через 5 мин. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо НМ вводили воду.

**Методика 3** подготовки проб мочи для определения в ней нейромедиаторов/метаболитов по их флуоресцирующим производным в присутствии ПХ. В пластиковый сосуд для сбора мочи собирали суточное количество мочи и хранили в холодильнике при 4°C до момента анализа. При необходимости образцы мочи разбавляли водой для получения нужной концентрации аналитов.

**Методика 4** подготовки проб плазмы крови для определения в ней нейромедиаторов и метаболитов по их флуоресцирующим производным в присутствии ПХ. Аликвоту крови разбавляли 0.9 % раствором хлорида натрия, в

пробирку с разбавленной кровью вводили 2.0 мг ЭДТА (или 50 ед. гепарина) на 1 мл крови, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 мин [324].

**Методика 5 подготовки образцов раковых клеток для определения в них эпинефрина по его флуоресцирующему производному.** В лунку микропланшета с клетками и надклеточной культуральной жидкостью вводили ДМСО 20 % об./об. [325] для разрушения клеточной мембраны и высвобождения остатков АД.

**Методика 6 подготовки образцов нейронов ганглий пиявок для определения в них серотонина по его флуоресцирующему производному.** Для разрушения клеточной мембраны и полного высвобождения серотонина к 22 мкл нейронов прибавляли 22 мкл деионизированной воды и тщательно перемешивали [326].

**Методика 7 определения дофамина в моче по его флуоресцирующему производному методом внешних стандартов (градуировочного графика)** [327]. В ячейку микропланшета последовательно вводили 60 мкл 0.5 М глицинового буферного раствора с рН 8.0, 75 мкл подготовленной к анализу мочи, 30 мкл 20 мМ раствора ДЭД, 20 мкл 10 мкМ раствора пероксидазы и 20 мкл 1.0 мМ раствора  $H_2O_2$ . После чего содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и измеряли интенсивность флуоресценции через 5 мин.

**Методика 8 мультиплексного определения нейромедиаторов и метаболитов в моче по их флуоресцирующим производным методом добавок** [328]. В ячейку микропланшета с иммобилизованной в пленке хитозана пероксидазой (15 мкл 15 мкМ раствора пероксидазы) последовательно вводили 105 мкл 0.5 М глицинового буферного раствора с рН 8.0 (95 мкл 0.1 М CAPS-КОН буферного раствора, рН 11.0), 20 мкл подготовленной к анализу мочи, 10 мкл добавки 0.05 – 100 мкМ раствора НМ/метаболита, 30 мкл 20 мМ раствора ДЭД (40 мкл 0.2 М раствора БА) и 20 мкл 1.0 мМ раствора  $H_2O_2$ . После чего содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и измеряли интенсивность флуоресценции через 5 мин.

**Методика 9 мультиплексного определения нейромедиаторов и метаболитов в плазме крови по их флуоресцирующим производным методом добавок.** В ячейку микропланшета с иммобилизованной в пленке хитозана пероксидазой (15 мкл 15 мкМ раствора пероксидазы) последовательно вводили

105 мкл 0.5 М глицинового буферного раствора с рН 8.0 (95 мкл 0.1 М CAPS-КОН буферного раствора, рН 11.0), 20 мкл подготовленной к анализу плазмы крови, 10 мкл добавки 0.05 – 100 мкМ раствора НМ/метаболита, 30 мкл 20 мМ раствора ДЭД (40 мкл 0.2 М раствора БА) и 20 мкл 1.0 мМ раствора  $H_2O_2$ . После чего содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и измеряли интенсивность флуоресценции через 5 мин.

**Методика 10 определения эpineфрина в раковых клетках по его флуоресцирующему производному методом внешних стандартов (градуировочного графика).** В ячейку микропланшета с иммобилизованной в пленке хитозана пероксидазой (15 мкл 15 мкМ раствора пероксидазы) последовательно вводили 120 мкл 0.1 М CAPS-КОН буферного раствора, рН 11.0, 10 мкл надклеточной жидкости (без или с ДМСО 20 % об./об.), 40 мкл 0.2 М раствора бензиламина и 15 мкл 2.0 мМ раствора  $H_2O_2$ . После чего содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и измеряли интенсивность флуоресценции через 5 мин.

**Методика 11 определения серотонина в нейронах ганглий пиявок по его флуоресцирующему производному методом внешних стандартов (градуировочного графика).** В ячейку микропланшета с иммобилизованной в пленке хитозана пероксидазой (15 мкл 15 мкМ раствора пероксидазы) последовательно вводили 120 мкл 0.1 М CAPS-КОН буферного раствора, рН 11.0, 10 мкл раствора нейронов, 40 мкл 0.2 М раствора бензиламина и 15 мкл 2.0 мМ раствора  $H_2O_2$ . После чего содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и измеряли интенсивность флуоресценции через 5 мин.

**Методика 12 получения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов и их метаболитов с европием и окситетрациклином.** В ячейку полистирольного микропланшета последовательно вводили 110 мкл 0.01 М MOPS буферного раствора с рН 7.5, 25 мкл 0.8 мМ раствора  $Eu^{3+}$ , 20 мкл 1.0 мМ раствора ОТЦ, 20 мкл раствора КА различной концентрации (0.5 – 50 нМ) и 25 мкл 80 мМ раствора ТВИН 80. Содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали. Интенсивность флуоресценции измеряли по истечении 10 мин. Контрольный опыт проводили аналогично вышеописанной методике за исключением того, что вместо НМ/метаболита вводили воду.

**Методика 13 иммобилизации комплекса {Eu<sup>3+</sup>–ОТЦ} в пленке хитозана в ячейках микропланшета.** В ячейки микропланшета вводили по 25 мкл 0.8 мМ раствора Eu<sup>3+</sup>, 20 мкл 1.0 мМ раствора ОТЦ, 30 мкл 1%-го раствора хитозана. Для получения тонких пленок выдерживали микропланшет в течение суток на воздухе. Микропланшет с иммобилизованным комплексом хранили при температуре 4°С.

**Методика 14 иммобилизации комплекса {Eu<sup>3+</sup>–ОТЦ} в пленке альгината в ячейках микропланшета.** В ячейки микропланшета вносили по 25 мкл 0.8 мМ раствора Eu<sup>3+</sup>, 20 мкл 1.0 мМ раствора ОТЦ, 30 мкл 1%-го раствора альгината натрия. Для получения тонких пленок выдерживали микропланшет в течение суток на воздухе. Микропланшет с иммобилизованным комплексом хранили при температуре 4°С.

**Методика 15 иммобилизации комплекса {Eu<sup>3+</sup>–ОТЦ} в пленке желатина в ячейках микропланшета.** Готовили раствор, состоящий из 4%-го желатина, 0.8 мМ европия и 1.0 мМ окситетрациклина. В ячейку микропланшета вводили 75 мкл полученного раствора. Для получения тонких пленок выдерживали микропланшет в течение суток на воздухе. Микропланшет с иммобилизованным комплексом хранили при температуре 4°С.

**Методика 16 определения норэпинефрина в плазме крови по его флуоресцирующему комплексу методом добавок.** В ячейку микропланшета с иммобилизованным в пленке хитозана комплексом Eu<sup>3+</sup>–ОТЦ (25 мкл 0.8 мМ раствора Eu<sup>3+</sup>, 20 мкл 1.0 мМ раствора ОТЦ) последовательно вводили 100 мкл 0.01 М MOPS буферного раствора с рН 7.5, 20 мкл подготовленной к анализу плазмы крови, 10 мкл добавки 1 – 10 пМ раствора НА и 25 мкл 80 мМ раствора ТВИН 80. Микропланшет тщательно перемешивали. Интенсивность флуоресценции измеряли по истечении 10 мин. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо разбавленной плазмы крови вводили воду.

**Методика 17 определения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов с европием и окситетрациклином в альгинатном гидрогеле.** В ячейку полистирольного микропланшета последовательно вводили по 20 мкл 1.0 мМ раствора Eu<sup>3+</sup> и 1.0 мМ раствора ОТЦ, 10 мкл НМ различной концентрации (0.1 – 100 нМ), 140 мкл 2.5% раствора альгината и 10 мкл 5.0 % раствора Ca<sup>2+</sup>.

Содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали. Интенсивность флуоресценции измеряли по истечении 10 мин. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо НМ вводили воду.

**Методика 18 определения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов с европием и окситетрациклином в альбуминовом гидрогеле.** В ячейку полистирольного микропланшета последовательно вводили по 20 мкл 1.0 мМ раствора  $\text{Eu}^{3+}$  и 1.0 мМ раствора ОТЦ, 10 мкл НМ различной концентрации (0.1 – 100 нМ), 131 мкл раствора альбумина 100 мг/мл и 19 мкл 2.7 М раствора гидроксида натрия. Содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали. Интенсивность флуоресценции измеряли по истечении 10 мин. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо НМ вводили воду.

**Методика 19 определения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов с европием и окситетрациклином в коллагеновом гидрогеле.** В ячейку полистирольного микропланшета последовательно вводили 160 мкл 3 мг/мл раствора коллагена, 6 мкл 3.3 мМ раствора  $\text{Eu}^{3+}$ , 6 мкл 3.4 мМ раствора ОТЦ, 8 мкл раствора НМ различной концентрации ( $10^{-4}$  –  $10^{-1}$  нМ) и 20 мкл реконструирующего буферного раствора (NaOH 0.05 М,  $\text{NaHCO}_3$  0.26 М, HEPES 0.2 М). Содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и нагревали на термошейкере для планшетов в течение 20 минут при 37 °С. Интенсивность флуоресценции измеряли сразу после окончания нагревания. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо НМ вводили воду.

**Методика 20 определения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов с европием и окситетрациклином в желатиновом гидрогеле.** В ячейку полистирольного микропланшета последовательно вводили 10 мкл НМ различной концентрации ( $10^{-4}$  –  $10^{-1}$  нМ) и 190 мкл 2%-ого раствора желатина, содержащего 0.1 мМ  $\text{Eu}^{3+}$  и 0.1 мМ ОТЦ. Содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали. Интенсивность флуоресценции измеряли по истечении 10 мин. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо НМ вводили воду.

**Методика 21** определения дофамина в коллагеновом гидрогеле по реакции комплексообразования с комплексом  $\{Eu^{3+}-OTC\}$ , иммобилизованным в альгинатном гидрогеле. В ячейку полистирольного микропланшета последовательно вводили 25 мкл 0.8 мМ раствора  $Eu^{3+}$ , 20 мкл 1.0 мМ раствора ОТС, 30 мкл 2.5% раствора альгината, 5 мкл 5.0 % раствора  $Ca^{2+}$ , тщательно перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем в ячейку последовательно вводили по 96 мкл 3 мг/мл раствора коллагена, 12 мкл ДА различной концентрации (2 – 8 нМ), и 12 мкл реконструирующего буферного раствора (NaOH 0.05 М,  $NaHCO_3$  0.26 М, HEPES 0.2 М). Содержимое лунок микропланшета тщательно перемешивали и нагревали на термошейкере для планшетов в течение 20 минут при 37 °С. Интенсивность флуоресценции измеряли сразу после окончания нагревания. Контрольный опыт проводили по аналогичной вышеописанной методике за исключением того, что вместо ДА вводили воду.

*Определение НМ/метаболитов методом внешних стандартов (градуировочного графика) по реакции дериватизации и комплексообразования.*

Концентрацию НМ/метаболита рассчитывали по уравнению градуировочной зависимости  $y = ax + b$ , где  $y$  – интенсивность сигнала флуоресценции дериватизата НМ/метаболита по истечении 5 мин от начала реакции;  $x$  – концентрация НМ/метаболита (мкМ) (система, основанная на получении дериватизатов аналитов); либо  $y$  – интенсивность сигнала флуоресценции комплекса  $Eu^{3+}-OTC$ –НМ/метаболит по истечении 10 мин от начала реакции;  $x$  – концентрация НМ/метаболита (нМ) (система, основанная на образовании комплекса).

*Определение НМ/метаболитов методом добавок по реакции дериватизации и комплексообразования.*

С использованием математической обработки данных, получали первые производные спектров флуоресценции дериватизатов всех аналитов. Все пики в образцах мочи/плазмы были идентифицированы по положению максимумов пиков, соответствующим максимумам пиков на спектрах индивидуальных продуктов дериватизации каждого НМ и метаболита. Концентрацию НМ/метаболита рассчитывали по уравнению градуировочной зависимости  $y = ax + b$ , где  $y$  – максимальное значение первой производной ( $dI/d\lambda$ ) сигнала флуоресценции

дериватизата НМ/метаболита по истечении 5 мин от начала реакции;  $x$  – сумма концентраций НМ/метаболита в моче/плазме и добавки НМ/метаболита (мкМ).

При использовании второй системы, основанной на образговании комплекса, концентрацию НА рассчитывали по уравнению градуировочной зависимости  $y = ax + b$ , где  $y$  – интенсивность сигнала флуоресценции комплекса  $\text{Eu}^{3+}$ –ОТЦ–НА по истечении 10 мин от начала реакции;  $x$  – сумма концентраций НА в плазме крови и добавки раствора НА (нМ).

#### 4.4. Обработка результатов измерений

Результаты измерений обрабатывали с применением методов математической статистики.

Нижнюю границу определяемых содержаний ( $c_n$ ) характеризовали минимально определяемой концентрацией при заданной вероятности  $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ,  $s_r \leq 0.33$ .

Предел обнаружения веществ ( $c_{\text{мин}}$ ) определяли, как наименьшую концентрацию, при которой по данной методике можно обнаружить статистически значимое присутствие определяемого компонента в анализируемом веществе при заданной доверительной вероятности. Предел обнаружения рассчитывали по формуле:

$$c_{\text{мин}} = 3s_{\text{контр}}/S, \text{ где}$$

$s_{\text{контр}}$  – стандартное отклонение контрольного опыта;

$S$  – коэффициент чувствительности, равный тангенсу угла наклона градуировочной зависимости. Для обработки экспериментальных данных использовали пакетные программы «Excel 2016».

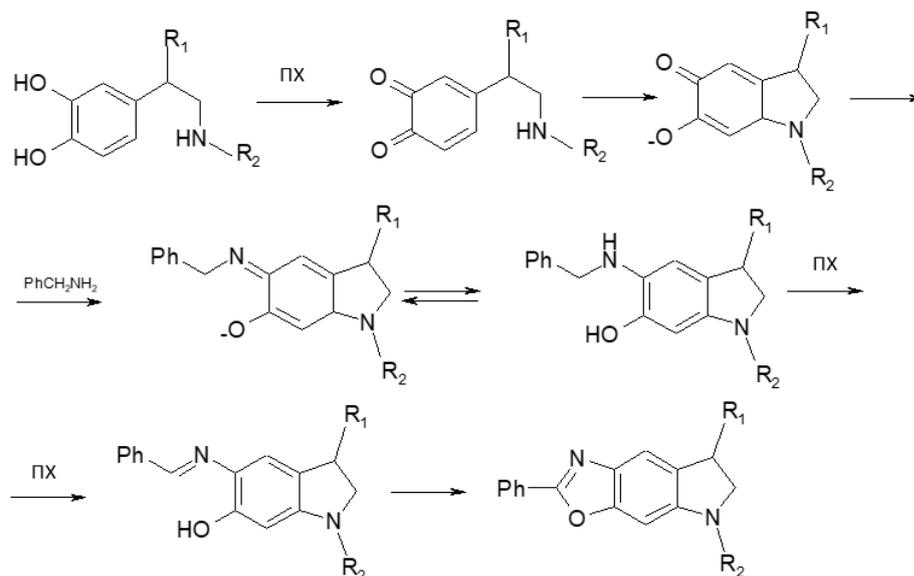
## Обсуждение результатов

В обзоре литературы отмечено, что наиболее перспективным подходом к мультиплексному, высокочувствительному, селективному и экспрессному определению нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах является использование твердофазных флуоресцентных индикаторных систем, сочетающих ферментативное окисление аналитов с дериватизацией получаемых продуктов с ароматическими аминами (особенно *мезо-1,2*-дифенилэтилендиамином и бензиламином) или образованием ими комплексов с ионами металлов. Указанные системы обеспечивают стабилизацию состава пробы за счет образования устойчивых интенсивно флуоресцирующих в длинноволновой области спектра производных аналитов с ароматическими аминами и комплексами ионов металлов. Поэтому для решения поставленных задач были применены именно эти подходы к разработке методик определения нейромедиаторов и их метаболитов в пробах биообразцов с целью прогностики и диагностики заболеваний.

### **Глава 5. Обоснование выбора индикаторной системы и условий получения флуоресцирующих производных нейромедиаторов и их метаболитов с *мезо-1,2*-дифенилэтилендиамином и бензиламином**

Ранее в лаборатории кинетических методов анализа химического факультета МГУ была показана возможность получения интенсивно флуоресцирующих производных НМ с ароматическими аминами в присутствии пероксидазы из корней хрена (ПХ) в качестве биокатализатора вместо неорганического катализатора ферроцианида калия [120]. Ферментативная дериватизация протекает в гораздо более мягких условиях: не требуется длительное термостатирование при 50°C и использование агрессивных токсичных растворителей (ацетонитрила, метанола); кроме того, время реакции снижается с 20 мин до 5 мин. При использовании и ферроцианида калия, и пероксидазы молекулы НМ окисляются до катехоламин-*о*-хинонов, которые дериватизируются ароматическими аминами *мезо-1,2*-дифенилэтилендиамином (ДЭД) или бензиламином (БА) по реакции Михаэля (рис. 9). Продукты дериватизации НМ с ДЭД и БА (2-фенил(4,5-

дигидропирроло)[2,3-*f*]бензоксазольные производные) обладают гораздо более интенсивной флуоресценцией, чем сами НМ.



**Рис. 9.** Механизм дериватизации НМ с БА в присутствии ПХ.

На основании такого подхода в лаборатории кинетических методов были предложены методики определения дофамина, эpineфрина и гомованилиновой кислоты по реакции дериватизации продуктов их ферментативного окисления с регистрацией аналитического сигнала – интенсивности флуоресценции находящегося в кювете реакционного раствора. Была показана перспективность подобных систем для определения этих аналитов, однако, на практике было реализовано определение только единичных НМ и их метаболитов, что ограничивало (или делало невозможным) их применение в клинической диагностике.

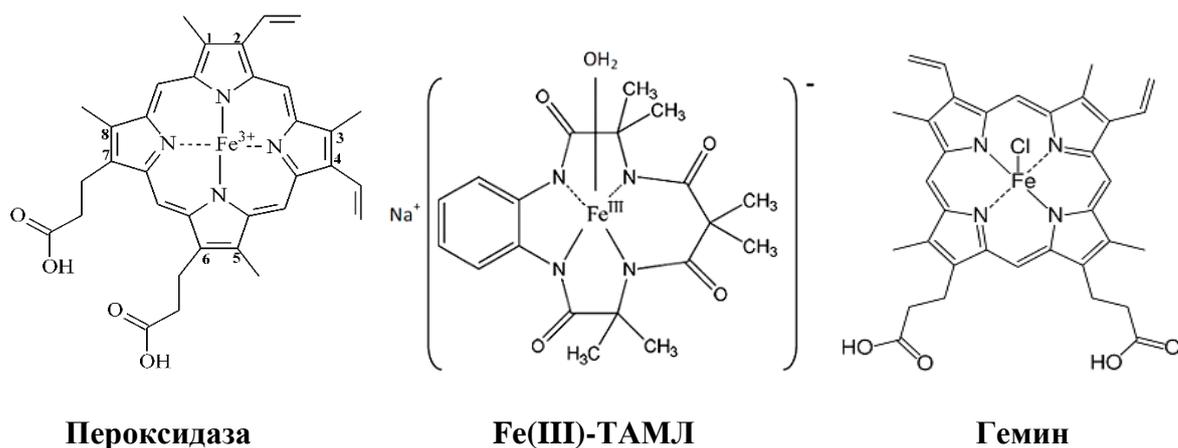
Альтернативным подходом, который позволит выполнить обязательные требования при определении указанных аналитов, является проведение флуориметрического определения НМ и их метаболитов в 96-луночном полистирольном микропланшете. Подобный переход (от кюветы к микропланшету) может обеспечить не только экспрессность анализа, но и мультиплексность определения этих соединений в биологических образцах в целях диагностики заболеваний.

Поскольку процесс получения флуоресцирующих производных нейромедиаторов с применением ароматических аминов (ДЭД и БА) протекает в две стадии, то большое значение имеет выбор условий, обеспечивающих высокую скорость и воспроизводимость каждой стадии индикаторной реакции. В связи с этим были тщательно подобраны условия получения флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов, обеспечивающих возможность мультиплексного определения аналитов в биообъектах.

### ***Выбор природы катализатора реакций дериватизации нейромедиаторов и их метаболитов***

Известно, что окисление нейромедиаторов и их метаболитов катализируют ПХ, грибная тирозиназа и лакказа [177, 329, 330]. В работе [331] было показано, что среди указанных ферментов оптимальным биокатализатором дериватизации НМ и их метаболитов в присутствии ДЭД и БА является пероксидаза. Это связано с тем, что лакказа проявляет максимальную каталитическую активность при pH 3 – 4, в то время как 2-я стадия реакции дериватизации НМ протекает при pH 7 – 8 с ДЭД и при pH 10 – 11 с БА. Кроме того, скорость процесса дериватизации НМ в присутствии пероксидазы в 2 – 3 раза выше, чем в присутствии тирозиназы [331]. Помимо этого, при лакказном или тирозиназном катализе основным их субстратом выступает растворенный кислород воздуха, а при пероксидазном катализе субстратом-окислителем является пероксид водорода, который вводится в реакцию в строго определенном количестве, что позволяет контролировать кинетику процесса дериватизации НМ и их метаболитов по 2-м взаимозависимым стадиям.

Однако в последние годы особое внимание уделяется поиску новых эффективных катализаторов – миметиков, синтетических аналогов ферментов. Для выбора наиболее подходящего катализатора для реакции дериватизации, обеспечивающего максимальное превращение определяемых соединений с достаточной для анализа скоростью, определение нейромедиаторов проводили в присутствии биокатализатора – пероксидазы хрена и его синтетических аналогов – Fe(III)-ТАМЛ и гемина (рис. 10).

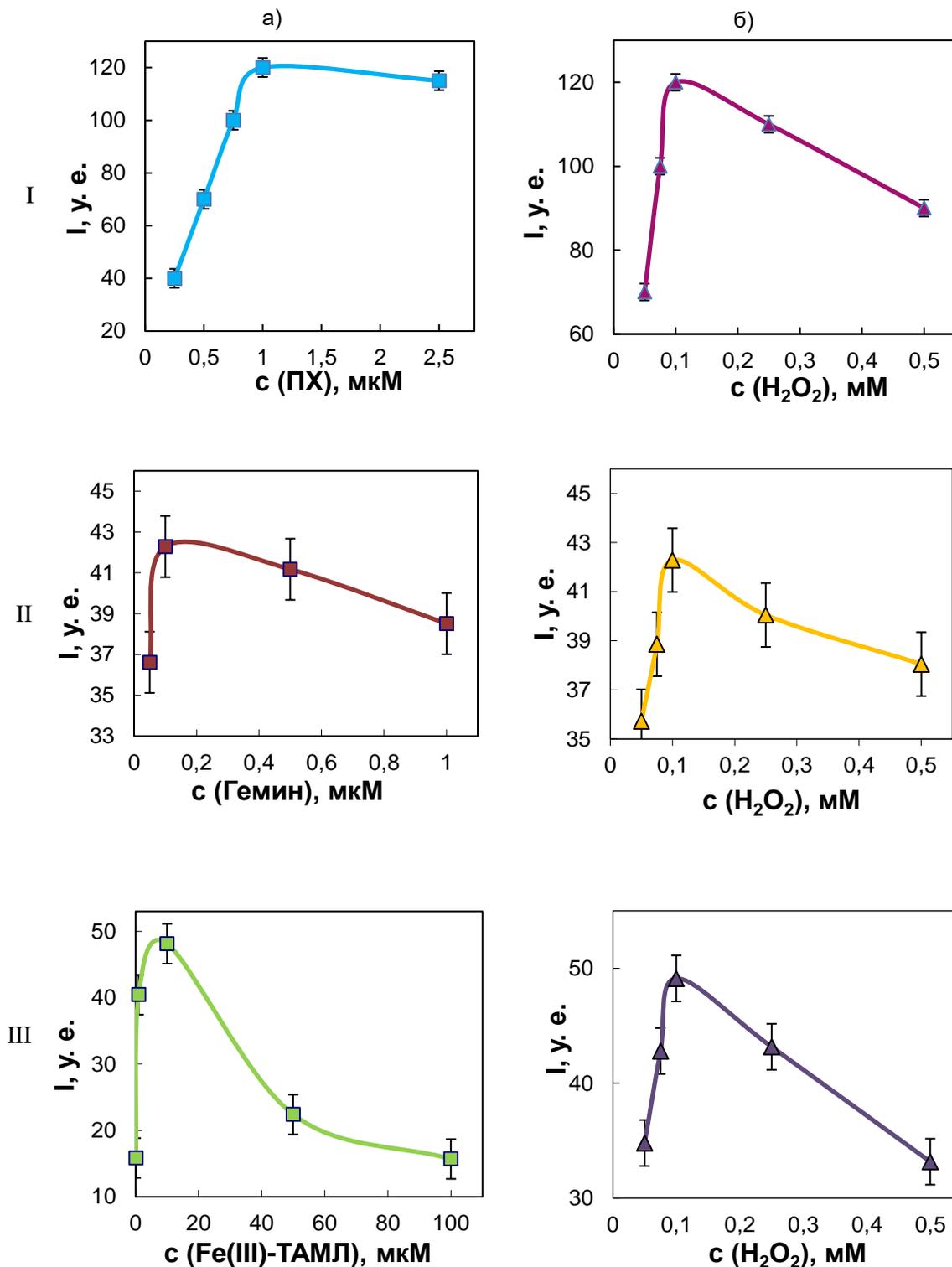


**Рис. 10.** Структурные формулы активного центра пероксидазы, Fe(III)-ТАМЛ, гемина.

Такой выбор катализаторов обусловлен схожим строением и выявленной каталитической активностью в реакциях превращения определенного круга субстратов (фенольных соединений). Необходимо было изучить, протекает ли окисление аналитов в присутствии того или иного катализатора; является ли скорость такого процесса удобной для проведения анализа и какие количества катализатора для этого требуются, подобрать такие условия проведения эксперимента, которые обеспечивают наиболее чувствительное и селективное определение нейромедиаторов (ДА, НА).

На примере реакции дериватизации ДА изучили зависимость аналитического сигнала от концентрации катализатора и пероксида водорода в реакционной системе (рис. 11). С увеличением концентрации пероксида водорода в системе от 0.05 мМ до 0.1 мМ возрастали скорость индикаторной реакции и количество индикаторного соединения (дериватизата ДА с ДЭД), при дальнейшем увеличении концентрации пероксида водорода интенсивность флуоресценции во всех случаях уменьшалась, что, очевидно, связано с инактивацией фермента избытком пероксида. Зависимость интенсивности флуоресценции при окислении и дериватизации нейромедиатора от концентрации фермента имела вид кривой с насыщением. При концентрациях пероксидазы хрена более 1 мкМ дальнейший рост скорости процесса прекращался, а в присутствии гемина и Fe(III)-ТАМЛ наблюдалось тушение флуоресценции, начиная с их концентраций 0.1 мкМ и с 10 мкМ, соответственно. В результате аналогичных экспериментов подобрали

условия для получения интенсивно флуоресцирующих производных для НА. Наиболее подходящие условия для проведения реакций дериватизации в ячейках 96-луночного микропланшета для определения ДА, НА приведены в табл. 16.



**Рис. 11.** Зависимости интенсивности флуоресценции получаемых производных ДА по реакции его дериватизации с ДЭД от концентраций катализатора (I – III) и пероксида водорода: I – ПХ; II – Гемин; III – Fe(III)-ТАМЛ, а) с (катализатора), б) С (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Условия реакции: с(ДА) = 1 мкМ, время реакции: I

– 5 мин; II – 7 мин; III – 15 мин. 0.5 М глициновый буферный раствор,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм,  $t^{\circ}C$  25.

**Таблица 16.** Выбранные условия определения исследуемых нейромедиаторов по реакции их дериватизации с ДЭД в микропланшете с использованием различных катализаторов.

$c$  (ДЭД) = 3 мМ, 0.5 М буферный раствор глицин – КОН, pH 8.0,  $c$  ( $H_2O_2$ ) = 0.1 мМ

Аналит	$c$ (катализатора), мкМ	$t$ , мин	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм
Пероксидаза хрена				
ДА	1.0	5	340	460
НА			330	455
Гемин				
ДА	0.1	7	340	460
НА			330	455
Fe(III)-ТАМЛ				
ДА	10.0	15	340	460
НА			330	455

В указанных условиях разработали методики определения ДА и НА с ДЭД с метрологическими характеристиками, представленными в табл. 17. При использовании в качестве катализатора пероксидазы хрена удалось достичь пределов обнаружения дофамина, норэпинефрина на уровне концентраций 1 – 100 нМ, высокой воспроизводимости результатов измерений и широких диапазонов определяемых концентраций. При использовании в качестве катализатора Fe(III)-ТАМЛ воспроизводимость результатов определения обоих аналитов была наименьшей.

**Таблица 17.** Метрологические характеристики методик определения нейромедиаторов по реакции их дериватизации с ДЭД при использовании различных катализаторов ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон определяемых содержаний (ДОС), мкМ	$c_{min}$ , мкМ	Коэффициент корреляции (КК), $r$	$s_r$ (при $c_n$ )
Катализатор – пероксидаза из корней хрена					
ДА	$I = (2.7 \pm 0.1) \times 10^7 c + (16 \pm 1)$	0.25 – 2.5	0.1	0.992	0.03
НА	$I = (1.21 \pm 0.04) \times 10^9 c + (334 \pm 2)$	0.025 – 0.25	0.003	0.996	0.01
Катализатор – гемин					
ДА	$I = (9 \pm 1) \times 10^6 c + (67 \pm 1)$	0.1 – 1	0.08	0.987	0.04

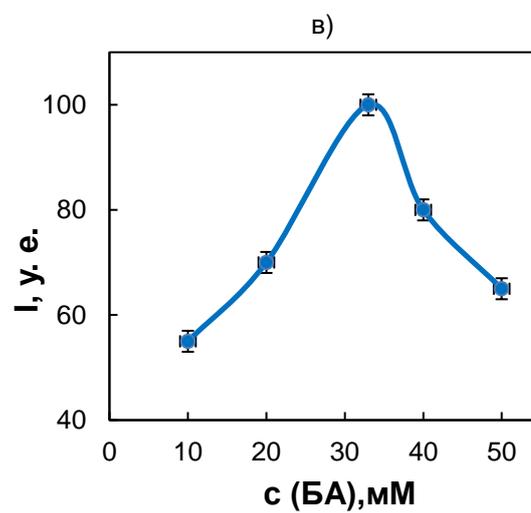
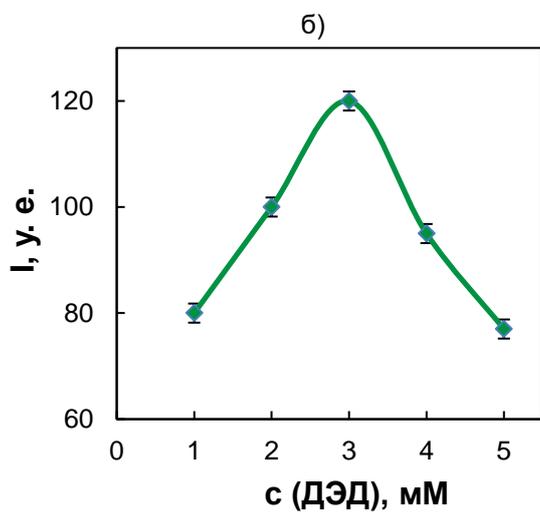
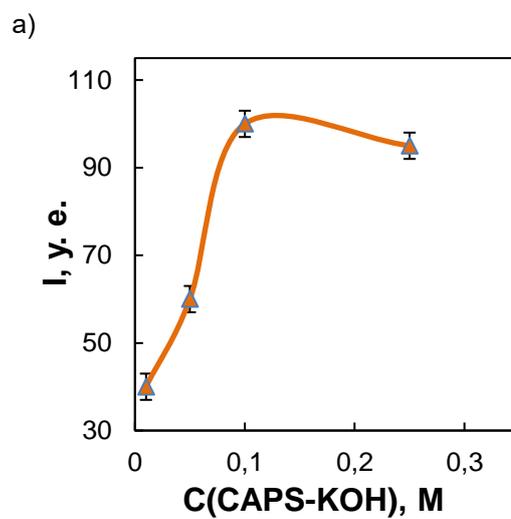
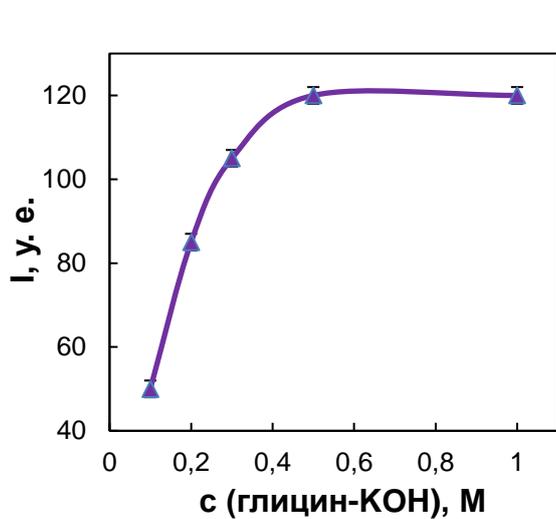
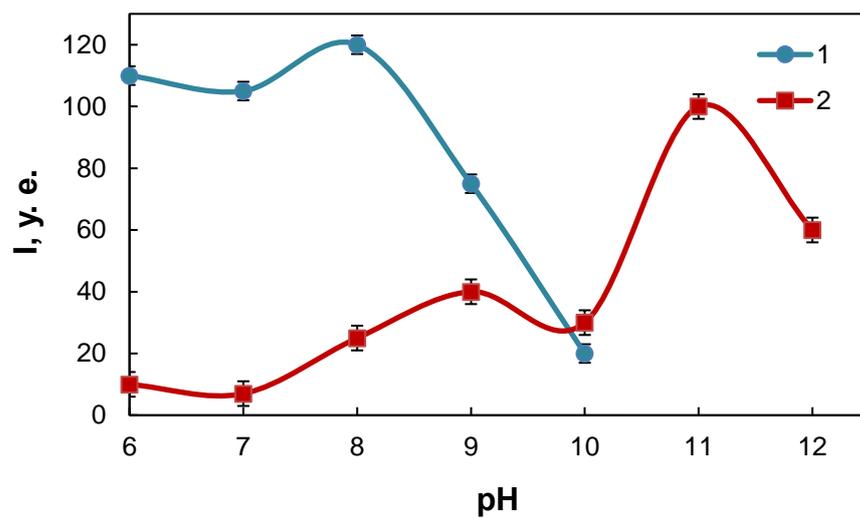
НА	$I = (63 \pm 4) \times 10^6 c + (70 \pm 1)$	0.025 – 0.25	0.02	0.986	0.03
Катализатор – Fe(III)-ТАМЛ					
ДА	$I = (10 \pm 1) \times 10^6 c + (37 \pm 2)$	0.25 – 2.5	0.1	0.992	0.07
НА	$I = (25 \pm 1) \times 10^6 c + (41 \pm 1)$	0.075 – 0.75	0.05	0.987	0.07

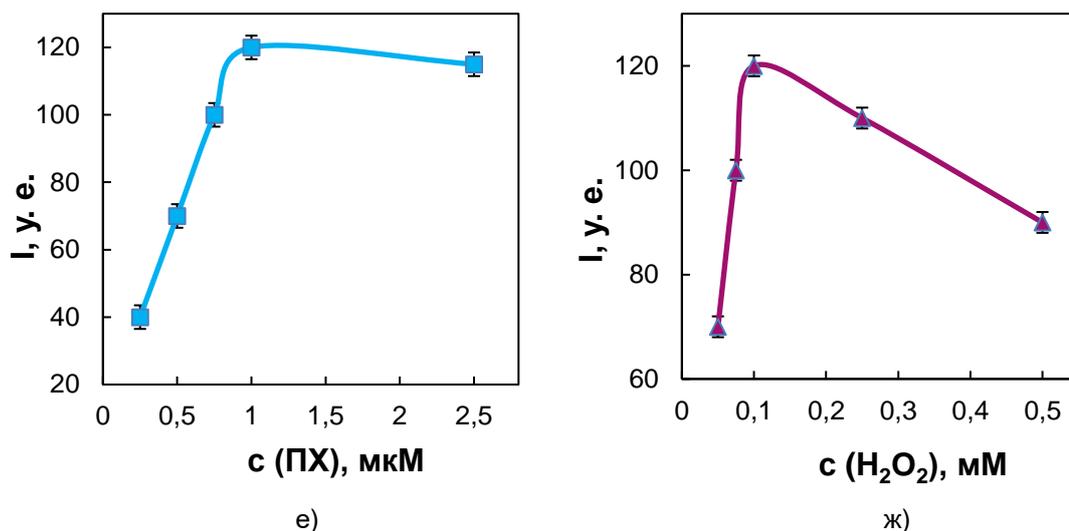
Таким образом, наиболее эффективным катализатором реакции дериватизации нейромедиаторов и их метаболитов (на примере ДА и НА) оказалась *пероксидаза из корней хрена* (более низкие ПО (до 3 нМ), более высокие воспроизводимость ( $s_f = 0.01$ ) и коэффициенты корреляции (до 0.996).

***Выбор условий проведения реакций дериватизации и регистрации аналитического сигнала для мультиплексного определения флуоресцирующих производных нейромедиаторов и их метаболитов***

Для выполнения поставленной перед нами задачи было необходимо подобрать такие условия проведения эксперимента, которые обеспечивают одновременное (мультиплексное), селективное, чувствительное, достоверное и экспрессное определение в большом количестве проб всех наиболее актуальных нейромедиаторов (ДА, АД, НА, ГВК, ВМК, L-ДОФА, серотонина, 5-ГИУК, НМН) в организме человека.

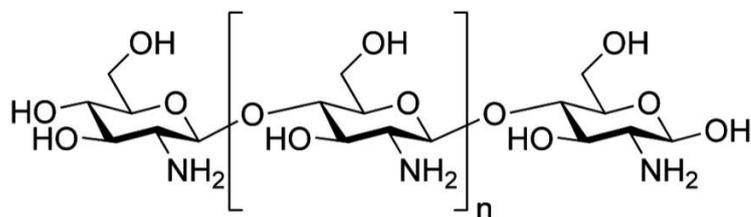
Сначала изучили реакции дериватизации НМ и их метаболитов в ячейках 96-луночного микропланшета в присутствии нативной пероксидазы, для этого были тщательно подобраны природа и рН буферного раствора, концентрации реагентов и длины волн возбуждения и испускания, время реакции и растворитель. Основные зависимости, изученные для выбора условий получения флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов представлены на примере ДА и АД (рис. 12). В результате аналогичных экспериментов подобрали условия для получения интенсивно флуоресцирующих производных остальных НМ и их метаболитов, длины волн возбуждения и регистрации аналитического сигнала. Из литературных данных известно, что дериватизация нейромедиаторов и метаболитов с ДЭД и БА наиболее эффективно протекает в буферных растворах глицин-КОН и CAPS-КОН, соответственно [332, 333], поэтому варьировали концентрацию и рН именно этих буферных систем. Выбранные условия определения НМ и их метаболитов приведены в табл. 18.





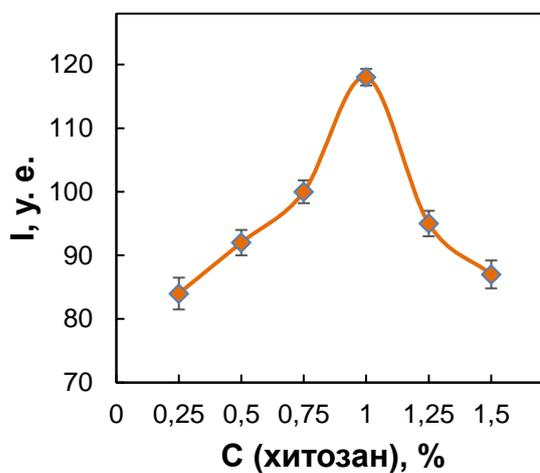
**Рис. 12.** Зависимости интенсивности флуоресценции получаемых производных ДА по реакции его ферментативной дериватизации с ДЭД и АД с БА от концентрации и рН буферного раствора, концентраций фермента, дериватирующего агента и пероксида водорода: а) (1) рН (глицин-КОН) и (2) рН (CAPS-КОН), б) с(глицин-КОН), в) с(CAPS-КОН), г) с(ДЭД), д) с(БА), е) с(ПХ), ж) с(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Условия реакций: с(ДА) = 1 мкМ,  $\lambda_{ex}$  = 340 нм,  $\lambda_{em}$  = 460 нм, с(АД) = 0.05 мкМ,  $\lambda_{ex}$  = 356 нм,  $\lambda_{em}$  = 480 нм, время реакции – 5 мин, t°С 25.

Для реализации твердофазного варианта ферментативной дериватизации нами была разработана методика создания в ячейках 96-луночного микропланшета пленок на основе хитозана, содержащих фермент (методика 1). Для иммобилизации пероксидазы из корней хрена выбрали природный полисахарид – хитозан (рис. 13), имеющий плоскую структуру и состоящий из случайно связанных  $\beta$ -(1-4)-D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина [334]. Он является биосовместимой матрицей для ферментов, образует оптически прозрачные пленки и, кроме того, уже был изучен и многократно использован в лаборатории кинетических методов анализа при создании различных спектроскопических сенсорных систем [335].

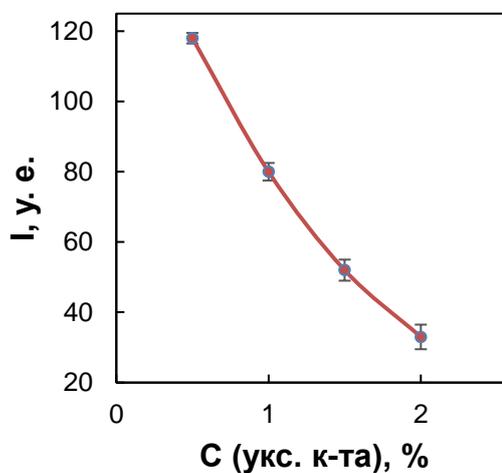


**Рис. 13.** Структурная формула хитозана.

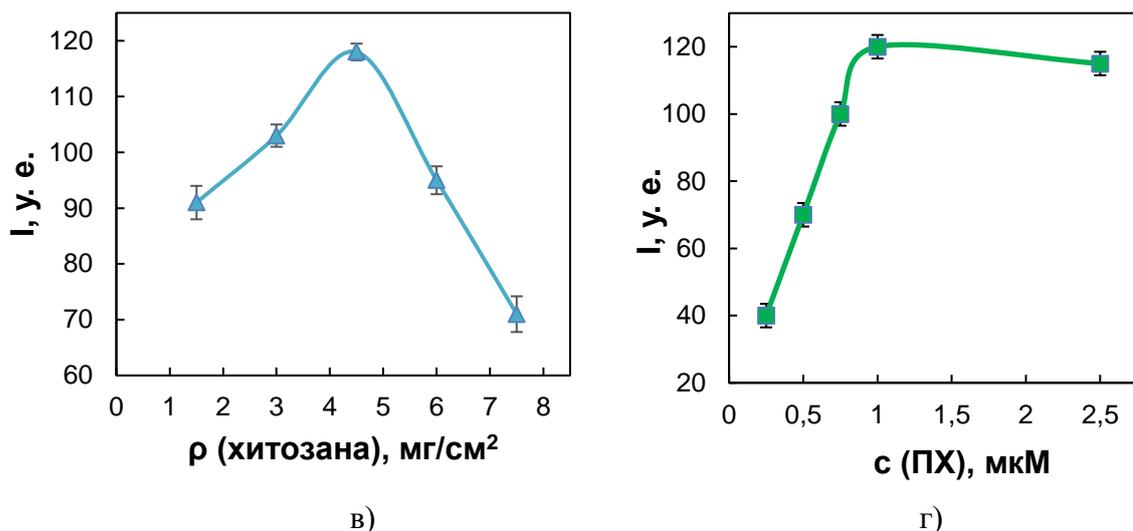
При разработке методики иммобилизации пероксидазы в пленке хитозана варьировали концентрацию полимера в диапазоне 0.25 – 1.5 % (рис. 14 а), концентрацию уксусной кислоты, в которой его растворяли, в диапазоне 0.5 – 2.0 % (рис. 14 б), плотность нанесения полимера в диапазоне 1.5 – 7.5 мг/см<sup>2</sup> (рис. 14 в), а также концентрацию фермента в диапазоне 0.25 – 2.5 мкМ (рис. 14 г). Для создания пленок выбрали низкомолекулярный хитозан (150 kDa), так как в его матрице пероксидаза проявляет наибольшую каталитическую активность и стабильность [233]. Полученные зависимости представлены на примере определения ДА по реакции его дериватизации с ДЭД. При увеличении концентрации хитозана выше 1.5 % снижалась его растворимость в 0.5 % уксусной кислоте, а более высокие концентрации уксусной кислоты инактивировали фермент. В результате были подобраны наиболее подходящие условия для создания твердофазного биочувствительного слоя, которые обеспечивают наибольшую интенсивность флуоресценции, стабильность фермента, а также воспроизводимость результатов измерений: концентрации хитозана, уксусной кислоты и пероксидазы 1.0 %, 0.5 %, 1.0 мкМ, соответственно, плотность нанесения полимера 4.5 мг/см<sup>2</sup>.



а)



б)



**Рис. 14.** Зависимости интенсивности флуоресценции получаемого производного ДА по реакции его ферментативной дериватизации с ДЭД от а) концентрации хитозана, б) концентрации уксусной кислоты, в) плотности нанесения полимера, г) концентрации иммобилизованного фермента. Условия реакции:  $c(\text{ДА}) = 1 \text{ мкМ}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ нм}$ ,  $0.5 \text{ М}$  глицин-КОН pH 8.0,  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.1 \text{ мМ}$ , время реакции – 5 мин,  $t^\circ\text{C} 25$ .

Проведение ферментативной дериватизации в микропланшете с использованием предварительно иммобилизованной в ячейках пероксидазы обеспечивало введение малых количеств реагентов, что давало возможность упрощения и ускорения методики определения НМ и их метаболитов, а также способствовало стабильности фермента во времени, сохранению высокой каталитической активности на протяжении 3-х месяцев при хранении в холодильнике при  $4^\circ\text{C}$  и хорошей воспроизводимости результатов измерений.

С целью выбора условий определения НМ и их метаболитов с использованием иммобилизованной пероксидазы были проведены исследования, аналогичные описанным выше. Выбранные условия определения НМ и их метаболитов в твердофазном варианте, совпавшие с условиями, выявленными для нативного фермента, представлены в табл. 18.

**Таблица 18.** Условия определения основных НМ и их метаболитов в микропланшете с использованием нативной и иммобилизованной пероксидазы.

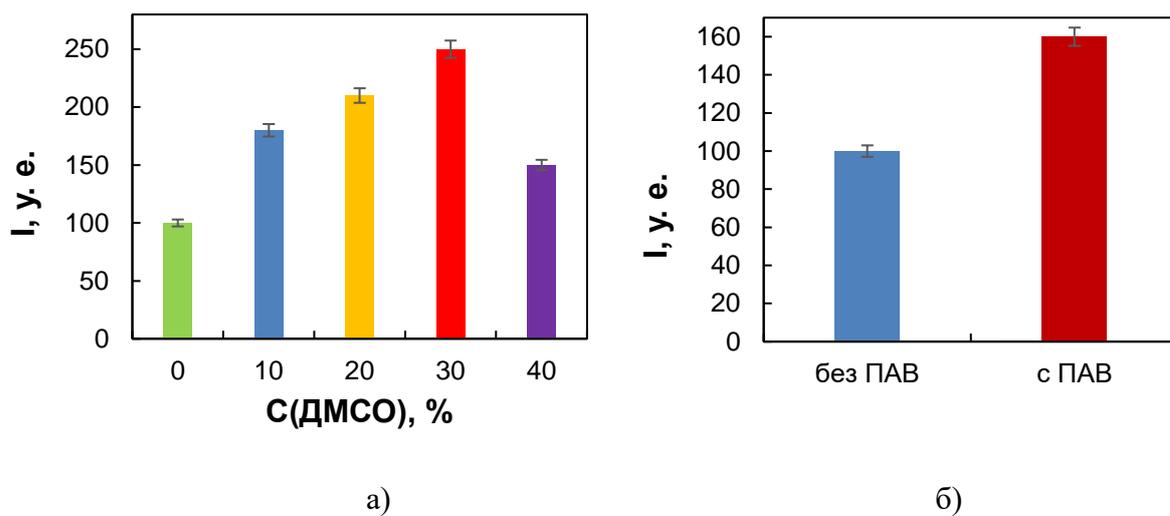
Растворитель – вода,  $t^{\circ}\text{C} = 25$ ,  $t = 5$  мин,  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.1$  мМ,  $c(\text{ПХ}) = 1.0$  мкМ

Аналит	Дериватизирующий агент	с (дериватирующего агента), мМ	Буферный раствор	рН	$\lambda_{\text{ex}}$ , нМ	$\lambda_{\text{em}}$ , нМ
ВМК	ДЭД	3	0.5 М глицин-КОН	8.0	305	420
НА					330	455
ДА					340	460
ГВК	БА	33	0.1 М CAPS-КОН	11.0	315	425
НА					330	455
L-ДОФА					335	458
НМН					340	463
Серотонин					346	468
5-ГИУК					346	475
АД	356	480				

Также нами было исследовано влияние органических и мицеллярных сред на интенсивность флуоресцентного сигнала в присутствии иммобилизованного фермента. Из анализа литературы следует, что ДМСО повышает интенсивность флуоресценции дериватизата ДА [139] и в меньшей степени ингибирует ПХ по сравнению с другими полярными растворителями [336], поэтому мы изучили влияние ДМСО на интенсивность флуоресцентного сигнала продукта дериватизации ДА с ДЭД. Установили, что в присутствии ДМСО (менее 30 % об./об.) интенсивность флуоресценции дериватизата ДА с ДЭД возрастает в 2.5 раза (рис. 15 а). При большем содержании органического растворителя интенсивность флуоресценции продукта дериватизации уменьшается вследствие инактивации фермента органическим растворителем.

Другим способом увеличения интенсивности флуоресцентного сигнала является создание организованных сред за счет введения различных по природе и строению поверхностно-активных веществ (ПАВ), способных упорядочить структуру растворителя в результате образования мицелл, с заключенными в них молекулами флуорофора, которые обладают меньшим числом вращательных степеней свободы, что понижает долю их безызлучательных переходов. Использование ПАВ в ферментативных методах позволяет повысить скорость катализируемой реакции за счет изменения конформации биомолекулы и увеличения доступности её активного центра для субстрата. В работе [337]

обнаружено, что использование цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) усиливает флуоресценцию продуктов фотохимического окисления эпинефрина в щелочной среде в 1.5 раза. В [329] исследовано влияние природы и концентрации ПАВ на эффективность процессов дериватизации дофамина с ДЭД и эпинефрина с БА; выяснено, что ЦТАБ в наибольшей степени увеличивал интенсивность флуоресцентного сигнала продуктов дериватизации НМ; поэтому в своей работе мы использовали именно это ПАВ (рис. 15 б).



**Рис. 15.** Зависимость интенсивности флуоресценции продукта дериватизации ДА с ДЭД в присутствии иммобилизованной ПХ и а) органического растворителя (ДМСО), б) ПАВ (ЦТАБ). Условия реакции: с (Е) = 1 мкМ, с (глицин-КОН) = 0.5 М, с (ДЭД) = 3 мМ, с (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) = 0.1 мМ, с (ДА) = 1 мкМ, рН 8.0, t°С 25, время реакции 5 мин, а) с (ДМСО) 10 – 40% об., б) с(ЦТМА) = 5 мМ.

Таким образом, мы установили, что и введение органического растворителя, и ПАВ повышало интенсивность флуоресцентного сигнала, однако, усиливался не только полезный, но и фоновый сигнал, вследствие чего ухудшалось соотношение сигнал-шум ( $I_c / I_{ш} = 3 / 2$ , вместо  $3 / 1$ ). Поэтому впоследствии реакции дериватизации НМ и их метаболитов проводили в водной среде.

Исходя из данных, приведенных в табл. 18, можно сделать вывод, что благодаря различию в структурах НМ и их метаболитов (табл. 1) и специфичности их взаимодействия с ДЭД и БА (ДА, ВМК и НА дериватируются с ДЭД, остальные аналиты – с БА), образующиеся продукты реакции дериватизации характеризуются различными спектральными характеристиками: длинами волны возбуждения и положением максимумов флуоресценции. При варьировании длины

волны возбуждения от 305 до 356 нм удастся разрешить спектры флуоресценции дериватизатов НМ и их метаболитов и получить максимумы их спектров флуоресценции при различных длинах волн: ВМК при 420 нм, ГВК – при 425 нм, НА – при 455 нм, *L*-ДОФА – при 458 нм, НМН – при 463 нм, серотонина – при 468 нм, 5-ГИУК – при 475 нм и АД – при 480 нм. Таким образом, показана возможность мультиплексного определения нейромедиаторов и их метаболитов по реакции дериватизации с ДЭД и БА продуктов их ферментативного окисления при возбуждении их дериватизатов в диапазоне длин волн 305 – 356 нм и регистрации аналитического сигнала в диапазоне длин волн 420 – 480 нм.

## **Глава 6. Твердофазное флуоресцентное мультиплексное определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции их ферментативной дериватизации с ароматическими аминами**

В условиях, подобранных для мультиплексного определения НМ и их метаболитов (табл. 18) были разработаны методики их определения (методика 2) с метрологическими характеристиками, приведенными в табл. 19. Так как при иммобилизации ферменты, как правило, теряют свою активность по сравнению с нативным [338], то для сопоставления приведены характеристики чувствительности методик определения НМ и их метаболитов в присутствии как иммобилизованного, так и нативного фермента (табл. 19). При соотнесении метрологических характеристик методик, разработанных с применением нативной и иммобилизованной ПХ в кюветном и планшетном вариантах проведения флуоресцентного анализа, различий в пределах обнаружения и в диапазонах определяемых содержаний выявлено не было. Следовательно, чувствительность предложенных нами методик определения нейромедиаторов и метаболитов в присутствии иммобилизованной пероксидазы остается на том же уровне, что и в присутствии нативного фермента. В обоих случаях она достаточна для их применения в анализе мочи здорового человека, крови людей с различными опухолевыми заболеваниями, но недостаточна – для крови здорового человека. (табл. 20). По сравнению с методиками, разработанными для определения нескольких индивидуальных нейромедиаторов (ДА, АД и ГВК) в присутствии нативной пероксидазы в кюветном варианте в работе [331], чувствительность

определения всех НМ и метаболитов сохраняется на том же уровне, за исключением ДА – чувствительность стала выше на порядок. Наибольшая чувствительность определения большинства НМ и их метаболитов достигалась при дериватизации с БА, а ДА, ВМК и НА – с ДЭД. Диапазоны определяемых содержаний НМ и их метаболитов по реакции дериватизации как с ДЭД, так и с БА согласуются с диапазонами их референсных содержаний в моче здоровых людей и в крови и моче больных с нейроэндокринными нарушениями. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что разработанные нами методики определения НМ и их метаболитов могут быть использованы для анализа проб мочи и крови в целях диагностики таких заболеваний, как феохромоцитома, параганглиома, нейробластома и карциноидные опухоли. Время сканирования одного микропланшета составляет не более 20 мин, что соответствует требованиям для получения достоверных результатов при работе с биологическими образцами при определении в них указанных ранее маркерных соединений.

**Таблица 19.** Метрологические характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по реакции их ферментативной дериватизации с БА и ДЭД в присутствии нативной (\*) и иммобилизованной пероксидазы (P = 0.95, n = 4).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, мкМ	С <sub>мин</sub> , мкМ	КК, г	S <sub>r</sub> (при с <sub>n</sub> )
<b>Дериватирующий агент – 1,2-дифенилэтилендиамин (ДЭД)</b>					
ДА*	$I = (2.7 \pm 0.1) \times 10^7 c + (16 \pm 1)$	0.25 – 2.5	0.1	0.992	0.030
ДА	$I = (2.9 \pm 0.2) \times 10^7 c + (18 \pm 1)$	0.25 – 2.5	0.1	0.992	0.010
НА*	$I = (1.21 \pm 0.04) \times 10^9 c + (334 \pm 2)$	0.025 – 0.25	0.003	0.996	0.010
НА	$I = (1.14 \pm 0.04) \times 10^9 c + (438 \pm 2)$	0.025 – 0.25	0.003	0.996	0.010
ВМК*	$I = (4.5 \pm 0.3) \times 10^6 c + (81 \pm 1)$	0.5 – 5	0.2	0.991	0.020
ВМК	$I = (4.7 \pm 0.3) \times 10^6 c + (95 \pm 1)$	0.5 – 5	0.2	0.997	0.010
<b>Дериватирующий агент – бензиламин (БА)</b>					
НА*	$I = (4.4 \pm 0.1) \times 10^8 c + (66 \pm 1)$	0.05 – 0.5	0.007	0.997	0.010
НА	$I = (2.4 \pm 0.1) \times 10^8 c + (196 \pm 1)$	0.05 – 0.5	0.01	0.997	0.010
ГВК*	$I = (1.44 \pm 0.03) \times 10^7 c + (73 \pm 1)$	0.5 – 5	0.2	0.998	0.020
ГВК	$I = (2.31 \pm 0.03) \times 10^7 c + (204 \pm 1)$	0.5 – 5	0.1	0.999	0.010
АД*	$I = (3.8 \pm 0.2) \times 10^8 c + (60 \pm 1)$	0.005 – 0.075	0.005	0.992	0.020
АД	$I = (9.6 \pm 0.3) \times 10^8 c + (190 \pm 1)$	0.005 – 0.075	0.003	0.998	0.010
НМН*	$I = (6.0 \pm 0.2) \times 10^8 c + (195 \pm 1)$	0.005 – 0.05	0.003	0.994	0.012
НМН	$I = (6.1 \pm 0.3) \times 10^8 c + (205 \pm 1)$	0.005 – 0.05	0.003	0.996	0.010
L-ДОФА*	$I = (1.7 \pm 0.1) \times 10^8 c + (264 \pm 1)$	0.025 – 0.25	0.01	0.993	0.010
L-ДОФА	$I = (1.8 \pm 0.1) \times 10^8 c + (287 \pm 1)$	0.025 – 0.25	0.01	0.995	0.010

Серотонин*	$I = (5.5 \pm 0.2) \times 10^7 c + (232 \pm 8)$	0.5 – 7.5	0.1	0.991	0.010
Серотонин	$I = (5.6 \pm 0.2) \times 10^7 c + (240 \pm 5)$	0.5 – 7.5	0.1	0.996	0.010
5-ГИУК*	$I = (2.3 \pm 0.2) \times 10^8 c + (179 \pm 9)$	0.1 – 1	0.01	0.991	0.010
5-ГИУК	$I = (2.4 \pm 0.1) \times 10^8 c + (190 \pm 7)$	0.1 – 1	0.01	0.994	0.010

**Таблица 20.** Сравнение пределов обнаружения и диапазонов определяемых концентраций НМ и их метаболитов по разработанным методикам и их референсных содержаний в моче и крови [4].

Аналит	$c_{\text{мин}}$ , мкМ	ДОС, мкМ	Содержание в моче, мкМ	Содержание в крови, нМ
<b>В присутствии нативной пероксидазы</b>				
ДА	0.1	0.25 – 2.5	0.34 – 2.6	0.05 – 0.5
АД	0.005	0.005 – 0.075	0 – 0.2	0.07 – 0.6
ГВК	0.2	0.75 – 5	0 – 45	9000 – 18000
НА (с ДЭД)	0.003	0.025 – 0.25	0.1 – 0.4	0.6 – 2.7
НА (с БА)	0.007	0.05 – 0.5		
ВМК	0.2	0.5 – 5	0 – 72	15000 – 25000
НМН	0.003	0.005 – 0.05	0 – 1.8	0.9
Серотонин	0.1	0.5 – 7.5	0 – 1.2	300 – 1300
5-ГИУК	0.01	0.1 – 1	10 – 36	–
<b>В присутствии иммобилизованной пероксидазы</b>				
ДА	0.1	0.25 – 2.5	0.34 – 2.6	0.05 – 0.5
АД	0.003	0.005 – 0.075	0 – 0.2	0.07 – 0.6
ГВК	0.1	0.75 – 5	0 – 45	9000 – 18000
НА (с ДЭД)	0.003	0.025 – 0.25	0.1 – 0.4	0.6 – 2.7
НА (с БА)	0.01	0.05 – 0.5		
ВМК	0.2	0.5 – 5	0 – 72	15000 – 25000
НМН	0.003	0.005 – 0.05	0 – 1.8	0.9
Серотонин	0.1	0.5 – 7.5	0 – 1.2	300 – 1300
5-ГИУК	0.01	0.1 – 1	10 – 36	–

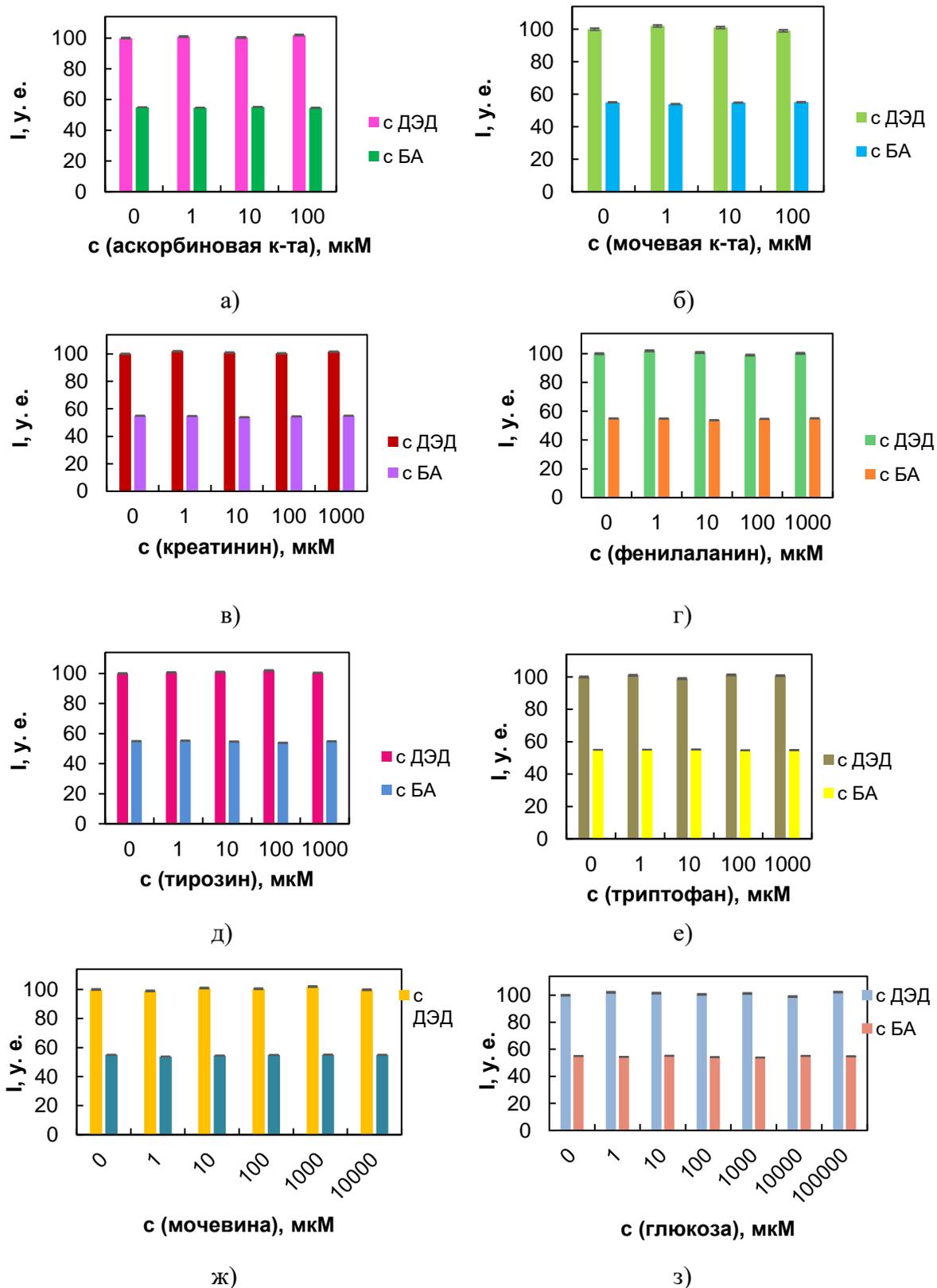
### **6.1. Изучение влияния матричных компонентов мочи и плазмы крови на определение нейромедиаторов и их метаболитов**

Биологические жидкости здорового человека обладают интенсивной собственной флуоресценцией, что может оказывать некоторое мешающее влияние на определение НМ и их метаболитов. Это обусловлено тем, что матрицы мочи и плазмы крови содержат множество веществ различной природы (органические и аминокислоты, соли, амины, белки, гормоны, ферменты и т. п.). Поэтому мы изучили покомпонентный состав мочи и плазмы (табл. 21) и выбрали те их составляющие, которые флуоресцируют в исследуемой области длин волн, а также

те компоненты, содержание которых в биологических жидкостях во много раз превышает содержание НМ и их метаболитов. Из литературы [97, 339] также известно, что в некоторых индикаторных системах мешающее влияние оказывают мочева и аскорбиновая кислоты. На примере дофамина и эpineфрина (1 – 100 мкМ) изучили, как их избыточное содержание по отношению ко всем другим НМ и их метаболитам влияет на интенсивность флуоресценции последних (рис. 16 а, б). Аналогичные опыты были проделаны с креатинином (рис. 16 в) и аминокислотами (фенилаланином, тирозином, триптофаном) (1 – 1000 мкМ) (рис. 16 г – е), мочевиной (1 – 10000 мкМ) (рис. 16 ж), глюкозой (1 – 100000 мкМ) (рис. 16 з). При изучении влияния матричных компонентов на определение НМ и их метаболитов считали, что матричный компонент мешает существенно, если в его присутствии интенсивность флуоресценции соответствующего нейромедиатора изменяется более, чем на 5%.

**Таблица 21.** Диапазоны концентраций матричных компонентов мочи и плазмы (литературные данные) и их концентрации, не мешающие определению нейромедиаторов и их метаболитов.

Матричные компоненты мочи и плазмы крови	Содержание в моче, мМ [340]	Содержание в плазме, мкМ [341]	$\lambda_{ex/em}$ , нМ	Диапазоны концентраций, не мешающие определению НМ/метаболитов, М
Мочевая кислота	0.2 – 0.4	150 – 450	–	$10^{-6} – 10^{-4}$
Аскорбиновая кислота	0 – 0.6	30 – 100	337/440	$10^{-6} – 10^{-4}$
Мочевина	333.0 – 588.0	2500 – 8300	550/630	$10^{-6} – 10^{-2}$
Креатинин	7.1 – 18.0	55 – 115	390/495	$10^{-6} – 10^{-3}$
Фенилаланин	< 0.1	–	255/282	$10^{-6} – 10^{-3}$
Тирозин	0.1 – 0.3	–	280/303	$10^{-6} – 10^{-3}$
Триптофан	0.03 – 0.20	–	295 – 305/348	$10^{-6} – 10^{-3}$
Глюкоза	–	4400 – 6600	–	$10^{-6} – 10^{-1}$



**Рис. 16.** Зависимости интенсивности флуоресценции дериватизатов ДА с ДЭД и АД с БА от концентрации: а) аскорбиновой кислоты, б) мочевой кислоты, в) креатинина, г) фенилаланина, д) тирозина, е) триптофана, ж) мочевины, з) глюкозы при совместном присутствии (с (ДА) = 1 мкМ, с (АД) = 0.05 мкМ).

Как видно из полученных зависимостей, даже 100-кратный избыток мочевины и аскорбиновой кислот по отношению к ДА и их 2000-кратный избыток по отношению к АД (такой же их избыток содержится в моче), 1000-кратные избытки креатинина и аминокислот по отношению к ДА и  $2 \cdot 10^4$ -кратные по отношению к АД,  $1 \cdot 10^4$ -кратный избыток мочевины по отношению к ДА и  $2 \cdot 10^5$ -кратный по отношению к АД,  $1 \cdot 10^5$ -кратный избыток глюкозы по отношению к ДА и  $2 \cdot 10^6$ -кратные по отношению к АД не оказывают никакого влияния на интенсивность флуоресценции производных ДА с ДЭД и АД с БА. Аналогичные эксперименты были проведены с остальными нейромедиаторами и их метаболитами и были получены аналогичные результаты. Таким образом, на определение НМ и их метаболитов ни один из матричных компонентов мочи и плазмы крови не оказывает мешающего влияния.

## **6.2. Одновременное определение нейромедиаторов и их метаболитов в биологических жидкостях с применением производной флуоресцентной спектроскопии**

Помимо матричных эффектов биологических жидкостей оказывать влияние на мультиплексное определение нейромедиаторов и их метаболитов в реальных объектах могут структурно-родственные соединения того же класса. Для реализации возможности определения НМ и их метаболитов при совместном присутствии нами были изучены подходы к повышению селективности, основанные: на различии спектральных характеристик продуктов дериватизации аналитов ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) и на различной специфичности взаимодействия определяемых соединений с дериватизирующими агентами.

Спектры флуоресценции дериватов нейромедиаторов и их метаболитов сильно перекрываются, так как их спектральные характеристики довольно близки (рис. 1П). Практически полное их перекрывание создает сложности для отдельной идентификации и определения НМ и их метаболитов в смеси. Мы предположили, что комбинирование реакции дериватизации ароматическими аминами с применением методов первой и второй производной флуоресцентной спектроскопии приведет к полному разделению нейромедиаторов и их метаболитов в смеси. Производная спектроскопия сужает полосу испускания и улучшает

разрешение максимумов с близкими спектральными характеристиками, тем самым улучшая селективность определения каждого соединения по спектрам многокомпонентных смесей. Производные спектры давно использовались в спектроскопических методах [342], но редко применялись для флуоресцентных систем. Однако подобный подход уже встречался в нескольких работах, посвященных определению отдельных представителей класса нейромедиаторов и других анализов [343 – 346]. Такой подход позволяет улучшить селективность определения НМ и их метаболитов, достигаемую за счет разрешения максимумов флуоресценции, без модификации флуоресцентного спектрометра. В нашей работе мы представили сравнительную оценку первой и второй производной флуоресцентной спектроскопии для определения НМ и их метаболитов в биологических матрицах.

Эту методику изначально применили для определения индивидуальных дериватизатов нейромедиаторов – НА, ДА и АД. На первом этапе регистрировали спектры флуоресценции дериватизатов НМ ( $I(\lambda)$ ). На втором этапе с использованием математической обработки данных, получали первые ( $dI(\lambda)/d\lambda$ ) и вторые ( $d^2I(\lambda)/d\lambda^2$ ) производные спектров флуоресценции дериватизатов индивидуальных соединений. По спектрам первой и второй производных для разных концентраций индивидуальных соединений строили градуировочные зависимости и рассчитывали метрологические характеристики, чтобы сравнить их с метрологическими характеристиками, полученными по спектрам флуоресценции (табл. 22). Оказалось, что пределы обнаружения анализов по методикам с использованием производных спектров лишь незначительно выше (в пределах погрешности измерения), что позволяет использовать этот подход для обеспечения селективного, высокочувствительного и мультиплексного определения сразу нескольких нейромедиаторов в смеси. Использование спектров первой производной дает меньшую погрешность при определении НМ, поэтому для дальнейших исследований использовали именно первую производную.

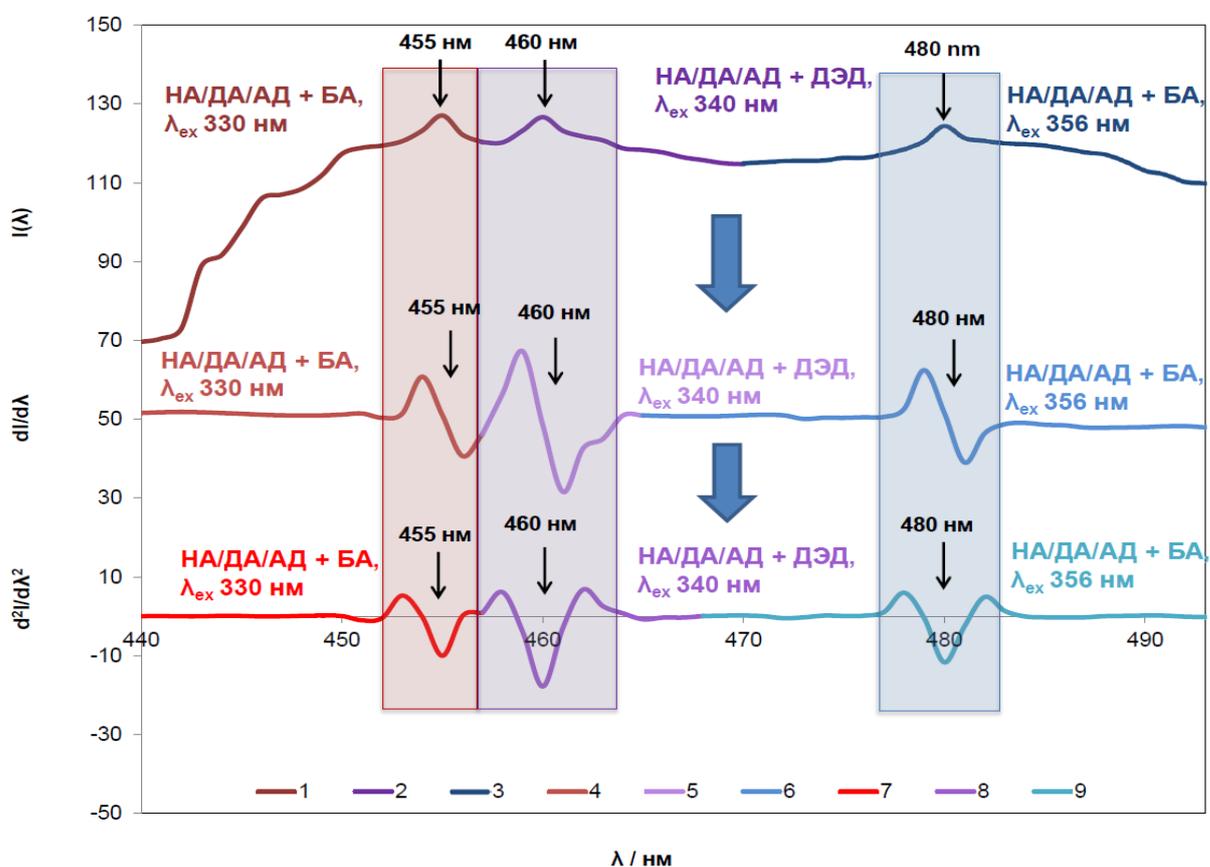
**Таблица 22.** Метрологические характеристики методик определения НМ в присутствии иммобилизованной пероксидазы с использованием спектров флуоресценции (а) и производных спектров флуоресценции 1-го (б) и 2-го (в) порядка.

Аналит	ДОС, мкМ	$s_{\text{мин}}$ , мкМ	$s_{\text{r}}$ (n = 4, P = 0.95)
Дериватирующий агент – ДЭД			
ДА <sup>а</sup>	0.25 – 2.5	0.09	0.01
ДА <sup>б</sup>	0.25 – 2.5	0.10	0.01
ДА <sup>в</sup>	0.25 – 2.5	0.11	0.01
Дериватирующий агент – БА			
НА <sup>а</sup>	0.05 – 0.5	0.008	0.01
НА <sup>б</sup>	0.05 – 0.5	0.011	0.01
НА <sup>в</sup>	0.05 – 0.5	0.013	0.01
АД <sup>а</sup>	0.005 – 0.075	0.0026	0.01
АД <sup>б</sup>	0.005 – 0.075	0.0031	0.01
АД <sup>в</sup>	0.005 – 0.075	0.0032	0.01

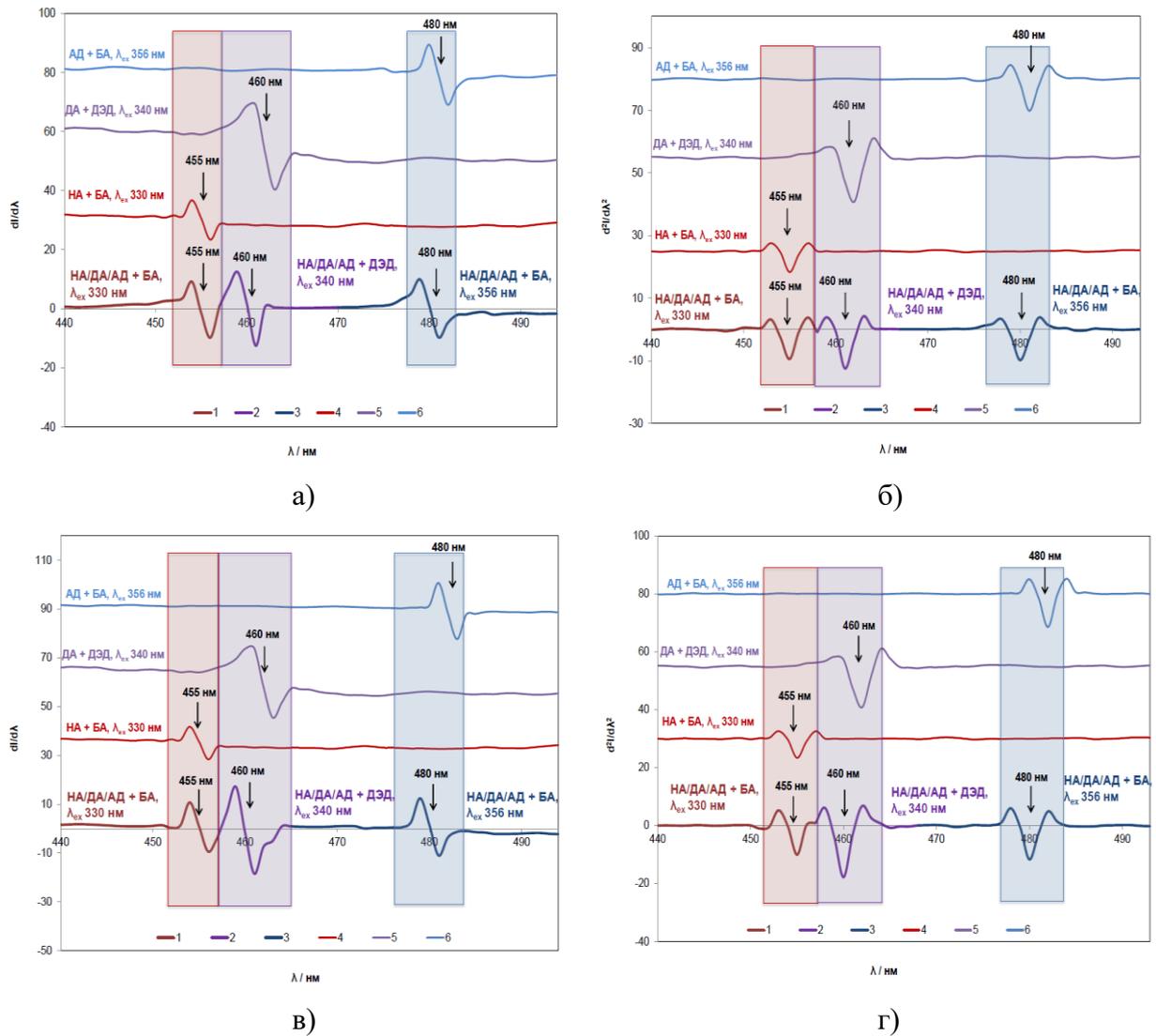
Аналогичную схему обработки спектров использовали и для тройной системы нейромедиаторов НА / ДА / АД (рис 17). Регистрировали спектры флуоресценции индивидуальных производных НМ и смеси из трех производных НМ с соотношениями компонентов 1 : 1 : 1 (0.1 мкМ каждого) и с соотношениями компонентов, аналогичными для референсных содержаний нейромедиаторов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для НА, ДА, АД, соответственно). Тщательно варьировали длину волны возбуждения и природу дериватирующего агента. Далее рассчитали спектры первой и второй производных, они представлены на рис. 18, 19.

Аналогично зарегистрировали, рассчитали и построили производные спектры для 84-х тройных систем нейромедиаторов и их метаболитов (см. Приложение рис. 2П – 85П). Аналиты вводили в соотношениях, аналогичных референсным содержаниям их в моче здорового человека [4] (т. о. с (ДА) = 1 мкМ, с (АД) = 0.05 мкМ, с (НА) = 0.1 мкМ, с (ГВК) = 1 мкМ, с (ВМК) = 1 мкМ, с (НМН) = 0.01 мкМ, с (серотонин) = 1 мкМ, с (L-ДОФА) = 0.1 мкМ, с (5-ГИУК) = 0.5 мкМ). Различия в структуре определяемых соединений, специфичность их взаимодействия с тем или иным дериватирующим агентом, дополнительная обработка сигнала позволили добиться распознавания как спектрально далеко расположенных дериватизатов (например, ВМК / НМН / АД, ГВК / L-ДОФА / серо-

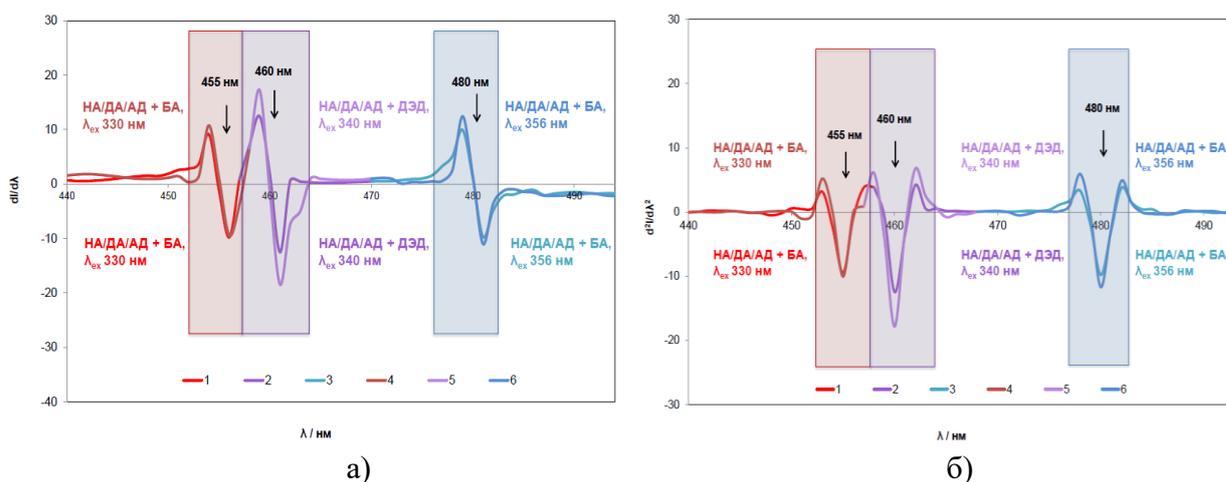
тонин), так и близко расположенных (например, серотонин / 5-ГИУК / АД, НА / ДА / НМН). Таким образом, направленное варьирование длины волны возбуждения, природы дериватирующего агента и использование производной спектроскопии первого порядка позволило селективно идентифицировать и количественно определить НМ и их метаболиты при совместном присутствии в каждой из 84-х тройных систем и использовать разработанную методику для диагностики заболеваний (табл. 23, 24). Все дальнейшие определения НМ и их метаболитов проводили с использованием производных спектров первого порядка. В результате, использование производной спектроскопии позволило увеличить спектральную селективность разделения нейромедиаторов и их метаболитов в смеси без потери чувствительности.



**Рис. 17.** 1–3 Спектры флуоресценции, производные спектры флуоресценции 4–6 первого и 7–9 второго порядка системы флуоресцирующих производных НМ – НА / ДА/ АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для НА, ДА, АД, соответственно): 1, 4, 7 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{\text{ex}} = 330$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 455$  нм; 2, 5, 8 НА / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  нм; 3, 6, 9 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{\text{ex}} = 356$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 480$  нм.



**Рис. 18.** Производные спектры флуоресценции а), в) первого и б), г) второго порядков системы флуоресцирующих производных НМ – НА / ДА / АД в соотношениях а), б) 1 : 1 : 1 (0.1 мкМ каждого), в), г) аналогичных референсным концентрациям НМ в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для НА, ДА, АД, соответственно) и индивидуальных флуоресцирующих производных НА, ДА, АД: 1 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ нм}$ ; 2 НА / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ нм}$ ; 3 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ нм}$ ; 4 НА с БА,  $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ нм}$ ; 5 ДА с ДЭД,  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ нм}$ ; 6 АД с БА,  $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ нм}$ .



**Рис. 19.** Сравнение производных спектров флуоресценции 1-го и 2-го порядка при одинаковых и аналогичным референсным содержаниям соотношениях. Производные спектры флуоресценции первого а) и второго б) порядка системы флуоресцирующих производных НМ – НА / ДА / АД 1–3 в соотношениях 1 : 1 : 1 (0.1 мкМ каждого) и 4–6 в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для НА, ДА, АД, соответственно): 1, 4 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2, 5 НА / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3, 6 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.

**Таблица 23.** Группы нейромедиаторов и их метаболитов, по увеличению концентрации которых можно диагностировать определенные опухолевые заболевания (карциноид, феохромоцитому и нейробластому) [4 – 13].

Группы маркеров	Диагностируемые заболевания
АД / НА / серотонин	Карциноид
АД / НА / 5-ГИУК	Карциноид
АД / 5-ГИУК / серотонин	Карциноид
НА / 5-ГИУК / серотонин	Карциноид
НА / ГВК / АД	Феохромоцитома
ДА / АД / ГВК	Феохромоцитома
ДА / АД / НМН	Феохромоцитома
НА / ДА / НМН	Феохромоцитома
АД / НА / НМН	Феохромоцитома
ГВК / НА / НМН	Феохромоцитома
АД / ГВК / НМН	Феохромоцитома
ДА / ГВК / НМН	Феохромоцитома
НА / ДА / АД	Феохромоцитома, нейробластома
ДА / НА / ГВК	Феохромоцитома, нейробластома
ДА / НА / ВМК	Нейробластома
НА / ГВК / ВМК	Нейробластома
ДА / ГВК / ВМК	Нейробластома

**Таблица 24.** Одновременное флуоресцентное определение НМ и их метаболитов в тройных системах ( $c$  (ДА) = 1 мкМ,  $c$  (АД) = 0.05 мкМ,  $c$  (НА) = 0.1 мкМ,  $c$  (ГВК) = 1 мкМ,  $c$  (ВМК) = 1 мкМ,  $c$  (НМН) = 0.01 мкМ,  $c$  (серотонин) = 1 мкМ,  $c$  (*L*-ДОФА) = 0.1 мкМ,  $c$  (5-ГИУК) = 0.5 мкМ).

Исследованные системы	Дериватирующий агент	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	Исследованные системы	Дериватирующий агент	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм
НА / ДА / АД	ДЭД	340	460	АД / НА / ВМК	ДЭД	305	420
	БА	330	455			330	455
		356	480			330	455
НА / ГВК / АД	БА	315	425	НМН / <i>L</i> -ДОФА / серотонин	БА	356	480
		330	455			335	458
		356	480			340	463
НА / ГВК / ВМК	ДЭД	305	420	НМН / <i>L</i> -ДОФА / 5-ГИУК	БА	346	468
	БА	315	425			335	458
		330	455			340	463
ДА / НА / ГВК	ДЭД	340	460	НМН / серотонин / 5-ГИУК	БА	346	475
	БА	315	425			340	463
		330	455			346	468
ДА / НА / ВМК	ДЭД	305	420	<i>L</i> -ДОФА / серотонин / 5-ГИУК	БА	346	475
		340	460			335	458
		340	460			346	468
ДА / АД / ВМК	ДЭД	305	420	НМН / <i>L</i> -ДОФА / ДА	ДЭД	346	475
		340	460			340	460
		356	480			335	458
ДА / АД / ГВК	ДЭД	340	460	НМН / <i>L</i> -ДОФА / АД	БА	340	463
		315	425			335	458
		356	480			340	463
ДА / ГВК / ВМК	ДЭД	305	420	НМН / <i>L</i> -ДОФА / НА	БА	356	480
		340	460			330	455
		315	425			335	458
АД / ВМК / ГВК	ДЭД	305	420	НМН / <i>L</i> -ДОФА / ВМК	ДЭД	340	463
	БА	315	425			305	420
		356	480			335	458
					БА	340	463

НМН / L-ДОФА / ГВК	БА	315	425	НМН / 5-ГИУК / ВМК	ДЭД	305	420
		335	458		БА	340	463
		340	463			346	475
НМН / серотонин / ДА	ДЭД	340	460	НМН / 5-ГИУК / ГВК	БА	315	425
	БА	340	463			340	463
		346	468			346	475
НМН / серотонин / АД	БА	340	463	Серотонин / 5-ГИУК / ДА	ДЭД	340	460
		346	468		БА	346	468
		356	480			346	475
НМН / серотонин / НА	БА	330	455	Серотонин / 5-ГИУК / АД	БА	346	468
		340	463			346	475
		346	468			356	480
НМН / серотонин / ВМК	ДЭД	305	420	Серотонин / 5-ГИУК / НА	БА	330	455
	БА	340	463			346	468
		346	468			346	475
НМН / серотонин / ГВК	БА	315	425	Серотонин / 5-ГИУК / ВМК	ДЭД	305	420
		340	463		БА	346	468
		346	468			346	475
НМН / 5-ГИУК / ДА	ДЭД	340	460	Серотонин / 5-ГИУК / ГВК	БА	315	425
	БА	340	463			346	468
		346	475			346	475
НМН / 5-ГИУК / АД	БА	340	463	L-ДОФА / серотонин / ДА	ДЭД	340	460
		346	475		БА	335	458
		356	480			346	468
НМН / 5-ГИУК / НА	БА	330	455	L-ДОФА / серотонин / АД	БА	335	458
		340	463			346	468
		346	475			356	480
L-ДОФА / серотонин / НА	БА	330	455	НА / ДА / НМН	ДЭД	340	460
		335	458		БА	330	455
		346	468			340	463
L-ДОФА / серотонин / ВМК	ДЭД	305	420	НА / ДА / серотонин	ДЭД	340	460
	БА	335	458		БА	330	455
		346	468			346	468

<i>L</i> -ДОФА / серотонин / ГВК	БА	315	425	НА / ДА / 5-ГИУК	ДЭД	340	460
		335	458		БА	330	455
		346	468			346	475
<i>L</i> -ДОФА / 5-ГИУК / ДА	ДЭД	340	460	ДА / АД / <i>L</i> -ДОФА	ДЭД	340	460
	БА	335	458		БА	335	458
		346	475			356	480
<i>L</i> -ДОФА / 5-ГИУК / АД	БА	335	458	ДА / АД / НМН	ДЭД	340	460
		346	475		БА	340	463
		356	480			356	480
<i>L</i> -ДОФА / 5-ГИУК / НА	БА	330	455	ДА / АД / серотонин	ДЭД	340	460
		335	458		БА	346	468
		346	475			356	480
<i>L</i> -ДОФА / 5-ГИУК / ВМК	ДЭД	305	420	ДА / АД / 5-ГИУК	ДЭД	340	460
	БА	335	458		БА	346	475
		346	475			356	480
<i>L</i> -ДОФА / 5-ГИУК / ГВК	БА	315	425	НА / АД / <i>L</i> -ДОФА	БА	330	455
		335	458			335	458
		346	475			356	480
НА / ДА / <i>L</i> -ДОФА	ДЭД	340	460	НА / АД / НМН	БА	330	455
	БА	330	455			340	463
		335	458			356	480
НА / АД / серотонин	БА	330	455	ДА / ГВК / 5-ГИУК	ДЭД	340	460
		346	468		БА	315	425
		356	480			346	475
НА / АД / 5-ГИУК	БА	330	455	АД / ВМК / <i>L</i> -ДОФА	ДЭД	305	420
		346	475		БА	335	458
		356	480			356	480
ДА / ВМК / <i>L</i> -ДОФА	ДЭД	305	420	АД / ВМК / НМН	ДЭД	305	420
	БА	340	460		БА	340	463
		335	458			356	480
ДА / ВМК / НМН	ДЭД	305	420	АД / ВМК / серотонин	ДЭД	305	420
		340	460		БА	346	468
		340	463			356	480

ДА / ВМК / серотонин	ДЭД	305	420	АД / ВМК / 5-ГИУК	ДЭД	305	420
		340	460		БА	346	475
	БА	346	468			356	480
ДА / ВМК / 5-ГИУК	ДЭД	305	420	АД / ГВК / L-ДОФА	БА	315	425
		340	460			335	458
	БА	346	475			356	480
ДА / ГВК / L-ДОФА	ДЭД	340	460	АД / ГВК / НМН	БА	315	425
	БА	315	425			340	463
		335	458			356	480
ДА / ГВК / НМН	ДЭД	340	460	АД / ГВК / серотонин	БА	315	425
	БА	315	425			346	468
		340	463			356	480
ДА / ГВК / серотонин	ДЭД	340	460	АД / ГВК / 5-ГИУК	БА	315	425
	БА	315	425			346	475
		346	468			356	480
НА / ВМК / L-ДОФА	ДЭД	305	420	НА / ГВК / серотонин	БА	315	425
	БА	330	455			330	455
		335	458			346	468
НА / ВМК / НМН	ДЭД	305	420	НА / ГВК / 5-ГИУК	БА	315	425
	БА	330	455			330	455
		340	463			346	475
НА / ВМК / серотонин	ДЭД	305	420	ВМК / ГВК / L-ДОФА	ДЭД	305	420
	БА	330	455		БА	315	425
		346	468			335	458
НА / ВМК / 5-ГИУК	ДЭД	305	420	ВМК / ГВК / НМН	ДЭД	305	420
	БА	330	455		БА	315	425
		346	475			340	463
НА / ГВК / L-ДОФА	БА	315	425	ВМК / ГВК / серотонин	ДЭД	305	420
		330	455		БА	315	425
		335	458			346	468
НА / ГВК / НМН	БА	315	425	ВМК / ГВК / 5-ГИУК	ДЭД	305	420
		330	455		БА	315	425
		340	463			346	475

Таким образом, нами впервые был разработан комплексный подход, основанный на иммобилизации биокатализатора в пленке хитозана в ячейках 96-луночного микропланшета, направленном варьировании природы дериватирующего агента и спектральных характеристик возбуждающего и испускаемого излучения, а также на применении производной спектроскопии 1-го порядка, позволяющий качественно и количественно, мультиплексно, селективно, чувствительно и экспрессно определять НМ и их метаболиты в биологических образцах.

## **Глава 7. Определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции ферментативной дериватизации в реальных объектах**

### ***Определение нейромедиаторов и их метаболитов в моче здоровых людей***

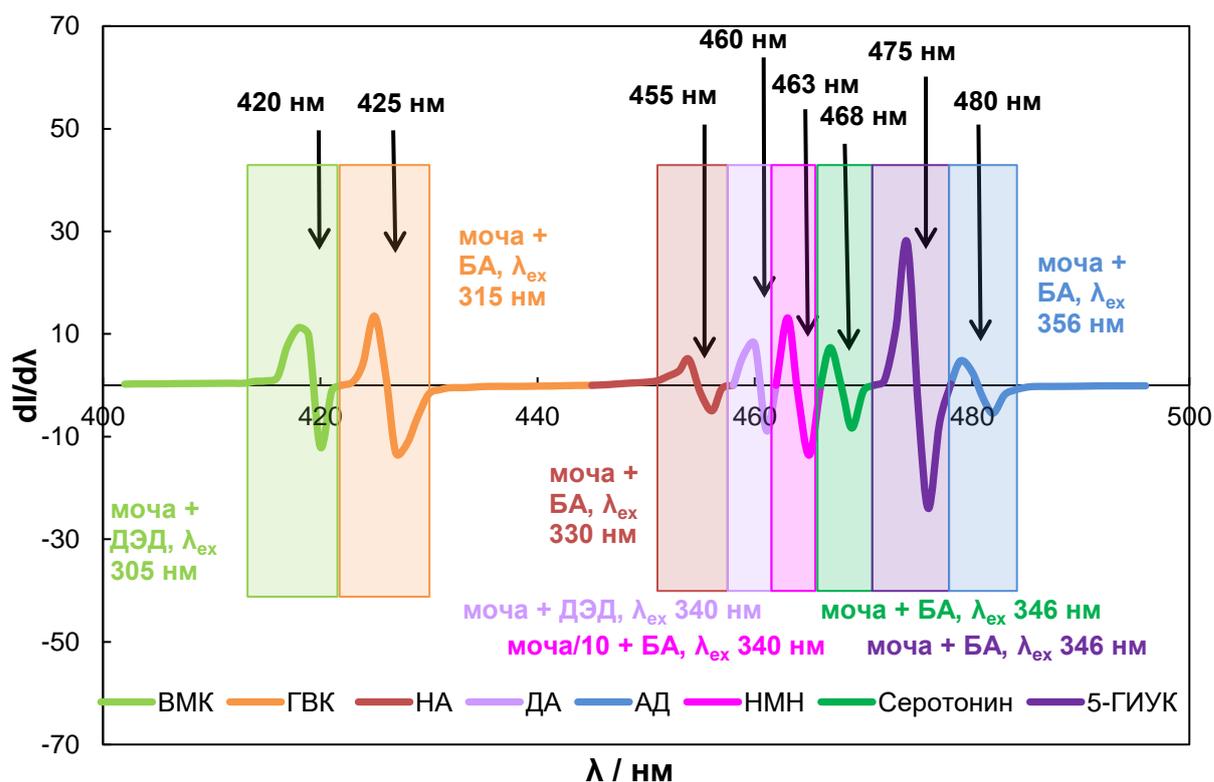
Разработанные и изложенные выше методики были апробированы в анализе мочи здорового человека, на примере определения дофамина – самого распространенного диагностического маркера заболеваний, связанных с нарушением нейромедиаторного обмена, чье флуоресцирующее производное с ДЭД дает наиболее интенсивный сигнал. Пробы мочи готовили по методике 3. С использованием метода внешних стандартов (градуировочного графика) [327] и метода добавок [328] определяли ДА в образцах мочи двух здоровых людей по методикам 7 и 8. Полученные результаты определения ДА в образцах мочи хорошо согласуются с его референсными содержаниями в этом объекте (табл. 25). Результаты были получены по разности полезного сигнала продукта индикаторной реакции в присутствии анализируемого объекта и сигнала собственной флуоресценции мочи и с применением производной спектрофлуориметрии первого порядка.

**Таблица 25.** Результаты определения дофамина в образцах мочи здоровых людей по реакции ферментативной дериватизации с ДЭД методом внешних стандартов и методом добавок ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Объект анализа	Найдено ДА, мкМ		Референсные содержания ДА в моче, мкМ
	Метод внешних стандартов	Метод добавок	
Моча (образец №1)	$1.2 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.1$	0.34 – 2.6 [4]

Моча (образец №2)	$1.3 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.1$	
-------------------	---------------	---------------	--

Аналогичным образом в моче здорового человека (образец №3) по методике 8 определяли все НМ и их метаболиты методом добавок, из-за меньшей погрешности определения и наличия собственной интенсивной флуоресценции мочи (табл. 26, рис. 20). Все результаты анализа мочи хорошо согласуются с результатами, полученными методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием (ВЭЖХ-ЭХ) в лаборатории «In vitro», а также с референсными значениями НМ и их метаболитов в моче здорового человека. Кроме того, для всех аналитов для сравнения результатов, полученных предложенным нами методом, и методом ВЭЖХ-ЭХ, были проведены F-тест и t-тест для двух выборок с одинаковыми дисперсиями. Результаты испытаний представлены в табл. 26. Они показывают, что между результатами нет существенных различий ( $F_{0.95,10} < 5.05$ ,  $t_{0.95,10} < 2.23$ ).



**Рис. 20.** Производные спектры флуоресценции первого порядка флуоресцирующих производных нейромедиаторов и их метаболитов в моче здорового человека.

**Таблица 26.** Результаты определения НМ и их метаболитов в образце мочи человека (образец №3), полученные двумя различными методами – разработанным (ФЛ), ВЭЖХ-ЭХ ( $P = 0.95$ ,  $n = 6$ ), и референсные содержания этих маркеров в моче здорового человека.

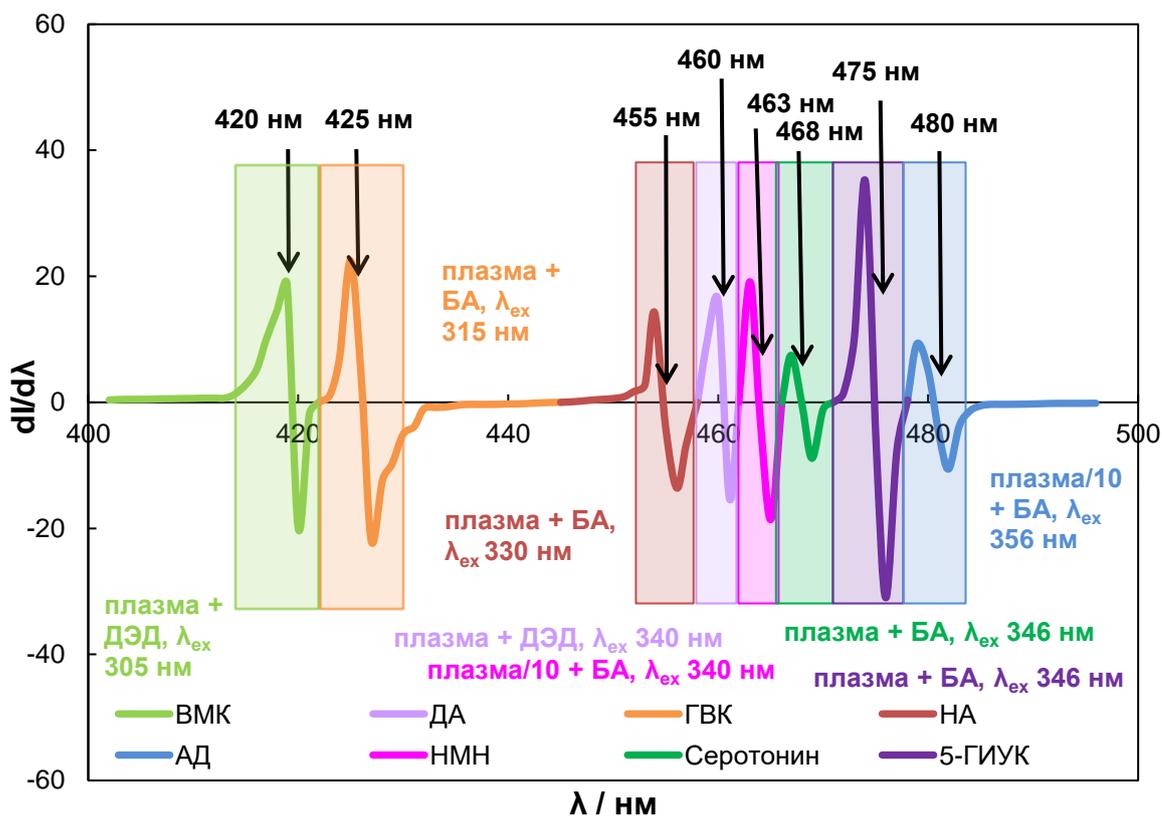
Аналиты	Полученные концентрации (мкМ)		F-тест для дисперсий	t-тест для одинаковых дисперсий	Референсные концентрации в моче (мкМ) [4]
	ФЛ	ВЭЖХ-ЭХ			
ДА	$0.58 \pm 0.03$	$0.60 \pm 0.05$	2.78	0.34	0.3 – 3
НА	$0.22 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.02$	4.00	0.89	0.1 – 0.4
АД	$0.035 \pm 0.006$	$0.029 \pm 0.004$	2.25	0.83	0 – 0.2
ГВК	$6.8 \pm 0.3$	$6.9 \pm 0.2$	2.25	0.28	0 – 45
ВМК	$4.9 \pm 0.2$	$4.8 \pm 0.1$	4.00	0.45	0 – 72
НМН	$1.2 \pm 0.1$	–*	–	–	0 – 1.8
Серотонин	$1.11 \pm 0.04$	–	–	–	0 – 1.2
5-ГИУК	$16.8 \pm 0.4$	$16.9 \pm 0.3$	1.78	0.20	10 – 36

\* – показатель не входит в перечень анализа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что направленное варьирование длины волны возбуждения дериватизатов аналитов с ДЭД и БА, полученных в присутствии иммобилизованного фермента в совокупности с использованием производной флуоресцентной спектроскопии позволяет мультиплексно, селективно, чувствительно, экспрессно и достоверно определять нейромедиаторы и их метаболиты в моче.

#### ***Определение нейромедиаторов и их метаболитов в плазме крови мышей***

Предложенные нами методики были также использованы для анализа другой биологической жидкости – плазмы крови мышей. Пробы плазмы крови мышей готовили по методике 4. НМ и их метаболиты определяли в образцах плазмы крови мышей по методике 9 аналогично тому, как анализировали образцы мочи здорового человека. Результаты мультиплексного определения нейромедиаторов и их метаболитов в плазме крови представлены в табл. 27 и на рис. 21.



**Рис. 21.** Производные спектры флуоресценции первого порядка флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов в плазме крови мышей.

**Таблица 27.** Результаты определения нейромедиаторов и их метаболитов в образцах плазмы крови необлученных мышей ( $P = 0.95$ ,  $n = 6$ ).

Аналиты	Полученные концентрации (мкМ)
ДА	$5.8 \pm 0.1$
НА	$2.10 \pm 0.03$
АД	$3.40 \pm 0.03$
ГVK	$10.9 \pm 0.1$
ВМК	$7.7 \pm 0.1$
НМН	$6.8 \pm 0.1$
Серотонин	$1.16 \pm 0.03$
5-ГИУК	$19.6 \pm 0.1$

На примере определения дофамина в плазме крови оценили влияние на организм мышей  $\gamma$ -излучения. Изучили 2 группы мышей по 4 особи – необлученные и облученные  $\gamma$ -излучением мощностью 5 зиверт в течение 2.5 мин. Полученные результаты (табл. 28) свидетельствуют о том, что при воздействии излучения у мышей наблюдается резкий скачок ДА в крови, что соответствует состоянию организма при облучении [347]. Аналогично, по изменению уровня НМ

и их метаболитов в крови возможно диагностировать наличие таких нейроэндокринных заболеваний, как феохромоцитома, нейробластома и карциноидных опухолей.



**Рис. 22.** Образец крови мышей, подвергшихся воздействию  $\gamma$ -излучения.

**Таблица 28.** Сравнение результатов определения дофамина у двух групп мышей (необлученные и облученные  $\gamma$ -излучением) ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	Полученные концентрации (мкМ)	
	Необлученные	Облученные
ДА	$5.8 \pm 0.1$	$34.4 \pm 0.2$

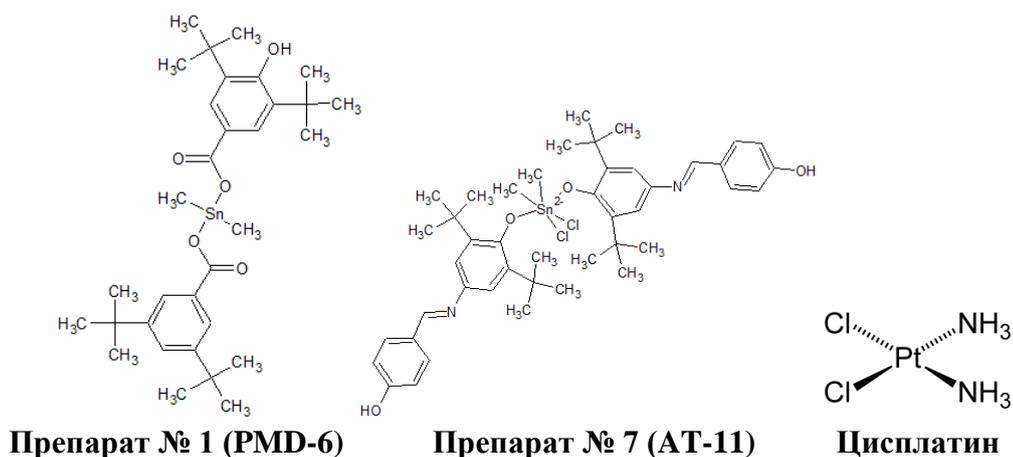
#### ***Определение эпинефрина в раковых клетках кишечника человека***

Помимо биологических жидкостей в работе были исследованы клетки, выделенные из опухоли кишечника человека (HCT116). Клетки доращивали в течение 5 дней в коммерческой стерильной культуральной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с глюкозой 4.5 г/л без *L*-глутамин в прозрачном иммунохимическом микропланшете (рис. 23). В каждой ячейке находилось около  $5 \cdot 10^4$  клеток. Из литературы известно, что этот тип раковых клеток продуцирует эпинефрин [348].



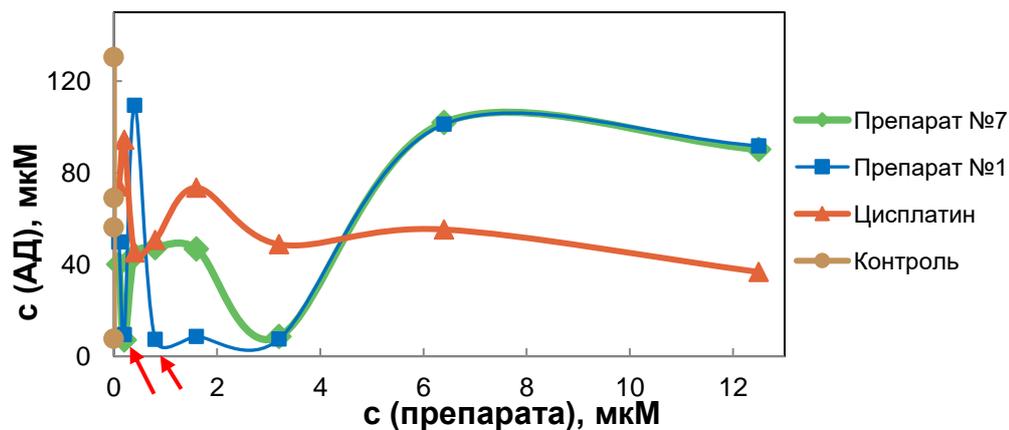
**Рис. 23.** Иммунохимический микропланшет с клетками, выделенными из опухоли кишечника человека (НСТ116), в культуральной среде DMEM.

Через 5 дней в ячейки с клетками были введены добавки противоопухолевых препаратов: экспериментальных (№ 1, № 7) и цисплатина, с концентрациями 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.5 мкМ (рис. 24 – 26).



**Рис. 24.** Структурные формулы препаратов, обладающих противоопухолевой активностью, протестированные в работе.

Пробы образцов готовили по методике 5. Далее отбирали надклеточную жидкость, вводили ее в систему и определяли зависимость концентрации АД от концентрации вводимой добавки препарата по сравнению с контрольными образцами (методика 10, рис. 25, табл. 29). Также изучили изменение концентрации АД при разрушении клеток с помощью 20 % ДМСО, вводимого в ячейки с клетками (рис. 26, табл. 30).

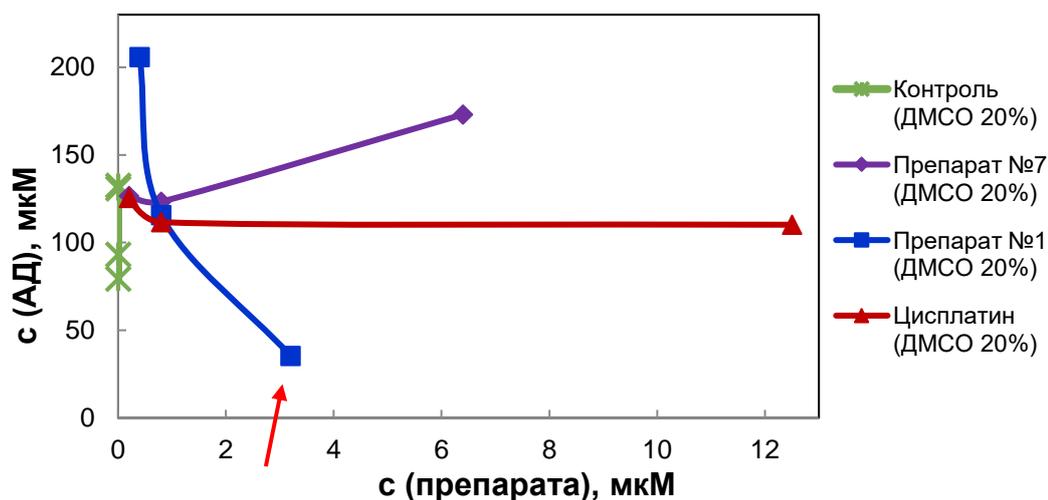


**Рис. 25.** Зависимость концентрации эpineфрина в надклеточной жидкости раковых клеток от концентрации и природы противоопухолевого препарата.

**Таблица 29.** Зависимость концентрации эпинефрина в надклеточной жидкости раковых клеток от концентрации и природы противоопухолевого препарата (P = 0.95, n = 4).

Препарат	Концентрация препарата, мкМ	c (АД), мкМ
Контроль	0	7.6 ± 0.3
	0	56 ± 5
	0	69 ± 5
	0	131 ± 2
№7	0.1	40 ± 1
	0.2	7 ± 1
	0.4	44 ± 1
	0.8	47 ± 4
	1.6	47 ± 2
	3.2	8.6 ± 0.2
	6.4	102 ± 3
	12.5	90 ± 1
№1	0.1	50 ± 4
	0.2	9.5 ± 0.3
	0.4	109 ± 2
	0.8	7.3 ± 0.3
	1.6	8.7 ± 0.1
	3.2	7.5 ± 0.3
	6.4	101 ± 1
	12.5	92 ± 9
Цисплатин	0.1	74 ± 2
	0.2	94 ± 9
	0.4	45 ± 2
	0.8	51 ± 1
	1.6	74 ± 1
	3.2	49 ± 2
	6.4	55 ± 5
	12.5	37 ± 1

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее эффективное воздействие оказывает препарат №7 в концентрации 0.2 мкМ и препарат №1 в концентрации 0.8 мкМ, так как именно при таких концентрациях этих препаратов наблюдается наибольшее снижение концентрации АД по сравнению с контролем.



**Рис. 26.** Зависимость концентрации эpineфрина в надклеточной жидкости после разрушения раковых клеток от концентрации и природы противоопухолевого препарата.

**Таблица 30.** Зависимость концентрации эpineфрина в надклеточной жидкости после разрушения раковых клеток от концентрации и природы противоопухолевого препарата ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Препарат	Концентрация препарата, мкМ	с (АД), мкМ
Контроль	0	93 ± 2
	0	133 ± 7
	0	79 ± 3
	0	131 ± 2
№7	0.2	127 ± 7
	0.8	123 ± 10
	6.4	173 ± 4
№1	0.4	206 ± 3
	0.8	116 ± 9
	3.2	35 ± 1
Цисплатин	0.2	126 ± 9
	0.8	112 ± 8
	12.5	110 ± 6

В этом случае наиболее эффективное воздействие оказывает препарат №1 в концентрации 3.2 мкМ. так как именно при такой концентрации этого препарата наблюдается наибольшее снижение концентрации АД, по сравнению с контролем. Полученные результаты продемонстрировали, что предложенные методики определения НМ и их метаболитов могут быть использованы и в анализе клеточных культур с целью оценки эффективности применения различных противоопухолевых препаратов.

### ***Определение серотонина в нейронах ганглий пиявок***

Так как целью исследования является диагностика нейроэндокринных заболеваний, нами были исследованы нейроны ганглий пиявок. По литературным данным известно, что эти клетки выделяют серотонин в концентрации  $10^{-7} - 10^{-6}$  М [349]. При проведении соответствующих экспериментов в пластиковую пробирку отбирали 60 клеток (22 мкл). Для высвобождения серотонина из клеточной мембраны ее разрушали деионизованной водой (методика 6). Далее отбирали аликвоту и вводили в индикаторную систему (методика 11). В результате проведенных экспериментов убедились, что эти клетки выделяют только серотонин. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными о содержании серотонина в нейронах ганглий пиявок (табл. 31) [349].

**Таблица 31.** Результаты определения серотонина в нейронах ганглий пиявок по реакции получения его дериватизата с БА ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Образец	с (серотонин), мкМ
Нейроны пиявок	$32 \pm 2$

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что разработанные нами твердофазные флуоресцентные методики мультиплексного определения НМ и их метаболитов по реакции дериватизации продуктов их ферментативного окисления в планшетном варианте регистрации аналитического сигнала могут быть использованы для экспресс-диагностики по анализу мочи, плазмы крови и клеток таких заболеваний, как карциноид, феохромоцитомы, нейробластома и других опухолевых заболеваний, а также для определения содержания НМ и их метаболитов в моче здорового человека. Чувствительность и селективность разработанных нами методик гораздо выше, чем у электрохимических, иммуноферментных, флуоресцентных, электрофоретических и хроматографических методик с электрохимическим, флуоресцентным и СФ детектированием [51, 68, 110, 158, 282]. Сопоставимы предложенные методики по чувствительности лишь с методиками определения НМ и их метаболитов методом ВЭЖХ-МС, но значительно выигрывают у них по экспрессности и простоте проведения анализа, по отсутствию или минимальной подготовке проб мочи,

плазмы крови, клеток, а также по числу определяемых соединений. Кроме того, они обеспечивают стабилизацию состава пробы за счет получения устойчивых к деградации дериватизатов [52, 53] (табл. 32).

## **Глава 8. Обоснование выбора индикаторной системы и условий получения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов и их метаболитов с европием и окситетрациклином**

В описанной выше части исследования был рассмотрен подход для осуществления мультиплексного определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах с целью диагностики нейроэндокринных заболеваний. Однако существуют задачи, для решения которых необходимо более чувствительное определение именно индивидуальных НМ или их метаболитов, например, в живых клеточных системах. Остановимся на этом более подробно.

Все процессы в организме человека, в том числе и заболевания, связанные с нарушением нейромедиаторного обмена, зарождаются еще на клеточном уровне, и только потом могут проследиваться в биологических жидкостях. Внешние импульсы регулируют различные биохимические превращения внутри клеток, определяющие их функциональную активность, выживаемость и гибель. Основопологающим этапом межклеточного взаимодействия является передача сигнала от клетки к клетке. В зависимости от наличия или отсутствия рецепторов на поверхности клеток все механизмы их коммуникации можно разделить на две группы:

1) взаимодействие, протекающее без участия рецепторов, – обеспечивается благодаря наличию особых контактов между клетками в пределах одной ткани;

2) взаимодействие, для реализации которого необходимы рецепторы, – протекает как между клетками в пределах одной ткани, так и между клетками разных тканей.

Ко второй группе относятся 3 типа механизмов передачи импульсов между клетками, связанных с выделением определенного соединения клеткой, генерирующей импульс, во внеклеточную среду:

**Таблица 32.** Сравнение характеристик различных методик определения нейромедиаторов и их метаболитов.

Определяемые соединения	Метод определения	Детектор	Объект анализа	Предварительная пробоподготовка образцов	ПО, мкМ	Ссылка
НА, АД, ДА, ГВК, ВМК, НМН, L-ДОФА, серотонин, 5-ГИУК	Флуориметрический	Флуоресцентный	Моча, плазма крови, клетки	Нет или минимальная	0.003 – 0.2	Наша работа
ДА, ГВК, L-ДОФА			–*			
ДА	Иммуоферментный	СФ	Моча	Есть	10	[68]
	Электрохимический	Потенциометрический			0.4	[282]
		МС / МС			0.04	[52]
НА, АД, ДА; ГВК, ВМК	ВЭЖХ	МС	Ткани из надпочечников крыс		0.1; 0.05	[51]
АД, ДА	КЭ	Хемилюминесцентный	Моча	–	0.1, 0.05	[110]

\* – не указано

- **эндокринный:** в кровоток экскретируется *гормон* и переносится на значительные расстояния, влияя на клетки, расположенные в разных тканях;
- **паракринный:** во внеклеточную среду выделяется *парагормон*, где он диффундирует на незначительные расстояния, воздействуя на близкорасположенные клетки;
- **нейронный:** – в узкую область специфичного контакта двух взаимодействующих клеток – синапс – экскретируется *нейромедиатор*, который взаимодействует лишь с одной клеткой из множества возможных.

Определенные типы клеток (клеточные линии или структуры) направленно вырабатывают конкретный нейромедиатор и выделяют его в заданный участок организма. Например, большую часть норэпинефрина (около 0.8 – 3 нМ) выделяют симпатические постганглионарные нейроны в синаптическую щель. Этот тип нейронов находится в паравертебральных и превертебральных ганглиях – скоплениях нервных клеток, волокон и тканей, которые располагаются в периферической нервной системе по ходу нервных стволов. А основным источником эpineфрина в организме человека являются эндокринные клетки мозгового вещества надпочечников периферической нервной системы. Надпочечники (эндокринные железы) расположены над верхней частью почек в непосредственной близости к их верхнему полюсу. Они экскретируют эpineфрин и норэпинефрин, который действует как локальный нейротрансмиттер, в соотношении 80 к 20 %, соответственно, но не в синаптическую щель, как в случае постганглионарных симпатических волокон, а в кровоток. Концентрация выделенного клетками надпочечников эpineфрина в основной циркулирующей крови составляет около 0.15 – 0.3 нМ [350]. Мозговое вещество надпочечников на самом деле представляет собой увеличенный и специализированный ганглий симпатической нервной системы. Симпатические постганглионарные нейроны являются гомологами хромоафинных клеток мозгового вещества надпочечников, которые также получают входы от симпатических преганглионарных нервных волокон из спинного мозга на нижнем уровне грудной клетки, возбуждаются в присутствии ацетилхолина и высвобождают нейромедиаторы, поэтому ряд

эффектов в организме человека, которые оказывают норэпинефрин и норэпинефрин, схожи [350 – 352].

Норэпинефрин секретируется в широко распределенной сети через преганглионарные симпатические волокна, которые используют ацетилхолин в качестве нейромедиатора для активации постганглионарных волокон, которые высвобождают норэпинефрин через синаптическую щель на локальные клетки-мишени. Большая его часть восстанавливается либо до-, либо постсинаптической клеткой, но некоторые его молекулы избегают немедленного поглощения и утечки в общий кровоток. Эффекты, вызванные норэпинефрином как нейромедиатором, определяются распределением рецепторов в определенной ткани и биохимическими свойствами клеток в ней. Он связывается с конкретными рецепторами на клеточных мембранах эффекторной ткани. Норэпинефрин может стимулировать один и тот же тип рецептора на двух разных типах тканей и вызывать два разных ответа из-за наличия различных биохимических путей в каждой ткани. Зачастую симпатическая система активируется во время чрезвычайных реакций и во время физических упражнений. Все изменения в функции органов и тканей, вызванные симпатической системой, работают вместе, чтобы поддерживать напряженную физическую активность [353].

Эпинефрин, высвобождаемый в кровообращение из надпочечников, является нейроэндокринным гормоном. Вместе с небольшим количеством норэпинефрина из хромаффинных клеток они оказывают разнообразное воздействие на несколько органов. Сигнал высвобождения активируется стрессорами, такими как беспокойство, страх, боль, травма и др. Эпинефрин оказывает прямое воздействие на сердце, вызывая увеличение частоты сердечных сокращений. Напротив, норэпинефрин снижает сердечный ритм косвенно, в результате рефлекторной брадикардии из-за ее сосудосуживающих эффектов. Комбинированное действие эпинефрина и норэпинефрина заключается в увеличении сердечного выброса, сердечного ритма, артериального давления и дыхания. Они увеличивают приток крови к мышцам, повышают бдительность (хроническая стимуляция приводит к тревоге). В печени эти гормоны стимулируют распад гликогена и липидов. Эпинефрин также стимулирует высвобождение глюкозы в кровоток, в скелетных мышцах – распад гликогена, а в жировой ткани – липолиз, увеличивая активность

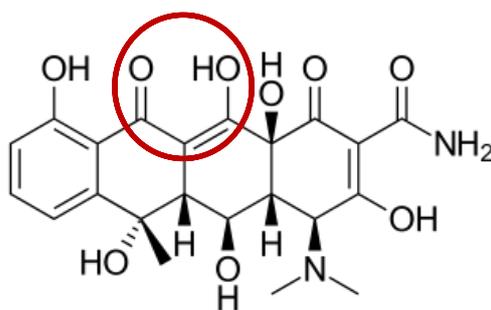
гормонально-чувствительной липазы и повышает уровень жирных кислот в крови. Эпинефрин и норэпинефрин уменьшают продукцию поджелудочной железы инсулина. Все эти действия служат основой для экстренной реакции организма, а также помогают спасти организм от травмы или гипогликемии [350, 351].

Однако существуют нейроны некоторых областей мозга – черного вещества и полосатого тела (*substantia nigra* и *corpus striatum*), которые содержат дофамин и не содержат норэпинефрина; также дофамин экскретируется нейронами периферической нервной системы [352]. Прогрессирующая потеря клеток, производящих дофамин в черном веществе и последующее резкое снижение уровня дофамина в полосатом теле, является наиболее характерной невропатологической особенностью при болезнях Паркинсона и Альцгеймера и шизофрении, которая коррелирует с кардинальными симптомами акинезии, ригидности и тремора. Возможны и неконтролируемые чрезмерно высокие уровни дофамина, которые могут являться результатом сосудистой опухоли хромаффинной ткани мозгового вещества надпочечников и хромаффинных клеток периферической нервной системы [351]. Клетки PC12, выделенные из феохромоцитомы, способны синтезировать, хранить в везикулах и выделять большие количества дофамина (около 0.5 мкМ) в межклеточное пространство [354, 355]. В течение длительного времени избыточная экскреция дофамина опасна для организма. Он постоянно находится в состоянии повышенной активности и психического перевозбуждения. Повышенные количества дофамина нарушают нейромедиаторный обмен, так как метаболизируясь, он превращается в избыточные концентрации норэпинефрина и эпинефрина, и как следствие, нервные клетки организма получают неверные импульсы, происходит сбой в работе организма. В связи с этим развиваются различные психические отклонения и заболевания [356].

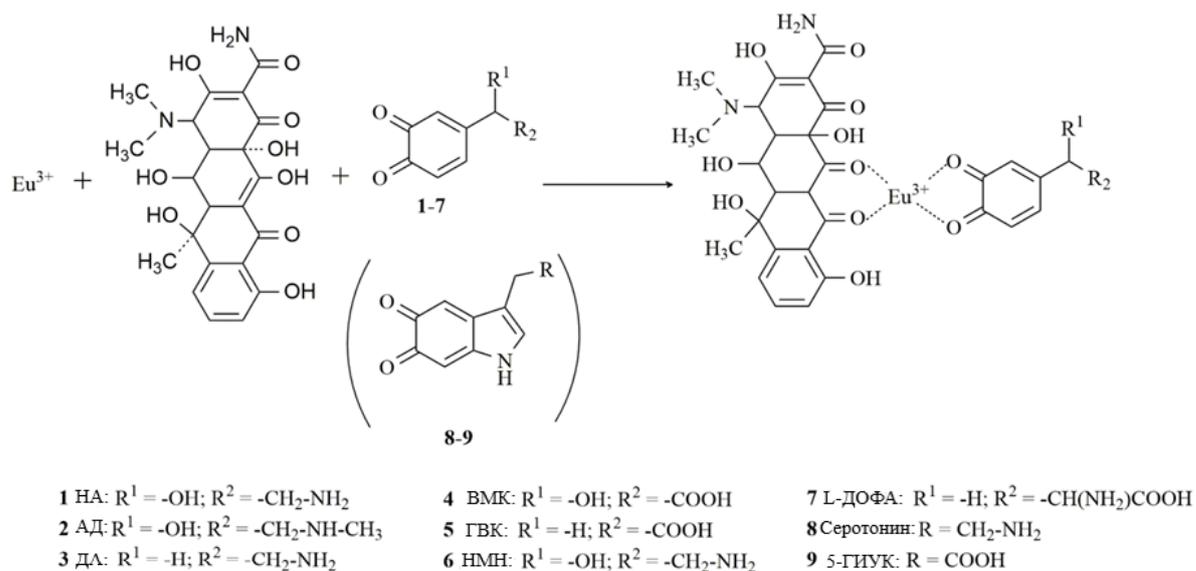
Изучение всех процессов, начиная с определенных клеточных структур, повышает эффективность ранней диагностики заболеваний и позволяет понять картину протекающих процессов и их влияния на организм. Для решения этих задач не требуется абсолютная селективность, так как только нейроэндокринные клетки надпочечников вырабатывают эпинефрин с норэпинефрином в соотношении 4 к 1 в кровотоке, а остальные рассматриваемые нами типы выделяют

норэpineфрин (симпатические постганглионарные нейроны) и дофамин (PC12) индивидуально в синаптическую щель и в межклеточное пространство, соответственно, а метаболизм до метаболитов в этих клеточных структурах еще не протекает. Однако требуется чрезвычайно высокая чувствительность, так как содержание НМ на клеточном уровне очень низкое (вплоть до 0.1 нМ). НМ и их метаболиты слабо флуоресцируют в коротковолновой области спектра; в свободном виде они окисляются и разрушаются, поэтому для правильного и достоверного определения их необходимо стабилизировать в пробе за счет образования устойчивого во времени соединения, интенсивно флуоресцирующего в длинноволновой области спектра.

Для решения поставленной задачи – высокочувствительного, экспрессного определения отдельных нейромедиаторов и их метаболитов в клеточных культурах и биологических образцах – было предложено использовать широко известную в литературе для определения пероксида водорода флуоресцентную систему европий-окситетрациклин. Европий с окситетрациклином образует устойчивый хелатный комплекс за счет взаимодействия  $\beta$ -дикетонной группы окситетрациклина с европием посредством вытеснения одного из ионов водорода из ОН-группы. Как было показано в обзоре литературы, известно использование для определения нейромедиаторов комплексов европия, но не с окситетрациклином. Окситетрациклин (рис. 27) является хорошим лигандом для образования комплексов с лантанидами из-за наличия  $\beta$ -дикетонной группы, которая позволяет достаточно эффективно передавать энергию от лиганда к иону металла, то есть к европию, с высоким квантовым выходом и большим временем жизни флуоресценции, а также с большим стоксовым сдвигом. Кроме того, образующиеся комплексы стабилизируют НМ в образце при их определении.



На основании литературных данных мы предположили, что механизм образования тройного комплекса европий-окситетрациклин-нейромедиатор/метаболит аналогичен механизму связывания с этим комплексом пероксида водорода или липопротеинов [357, 358]: нейромедиатор/метаболит, легко окисляемый на воздухе, пристраивается к европию с окситетрациклином своими дикетоновыми группами, образуя устойчивый хелатный комплекс с ионом европия (рис. 28).



**Рис. 28.** Реакция образования тройного комплекса {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит}.

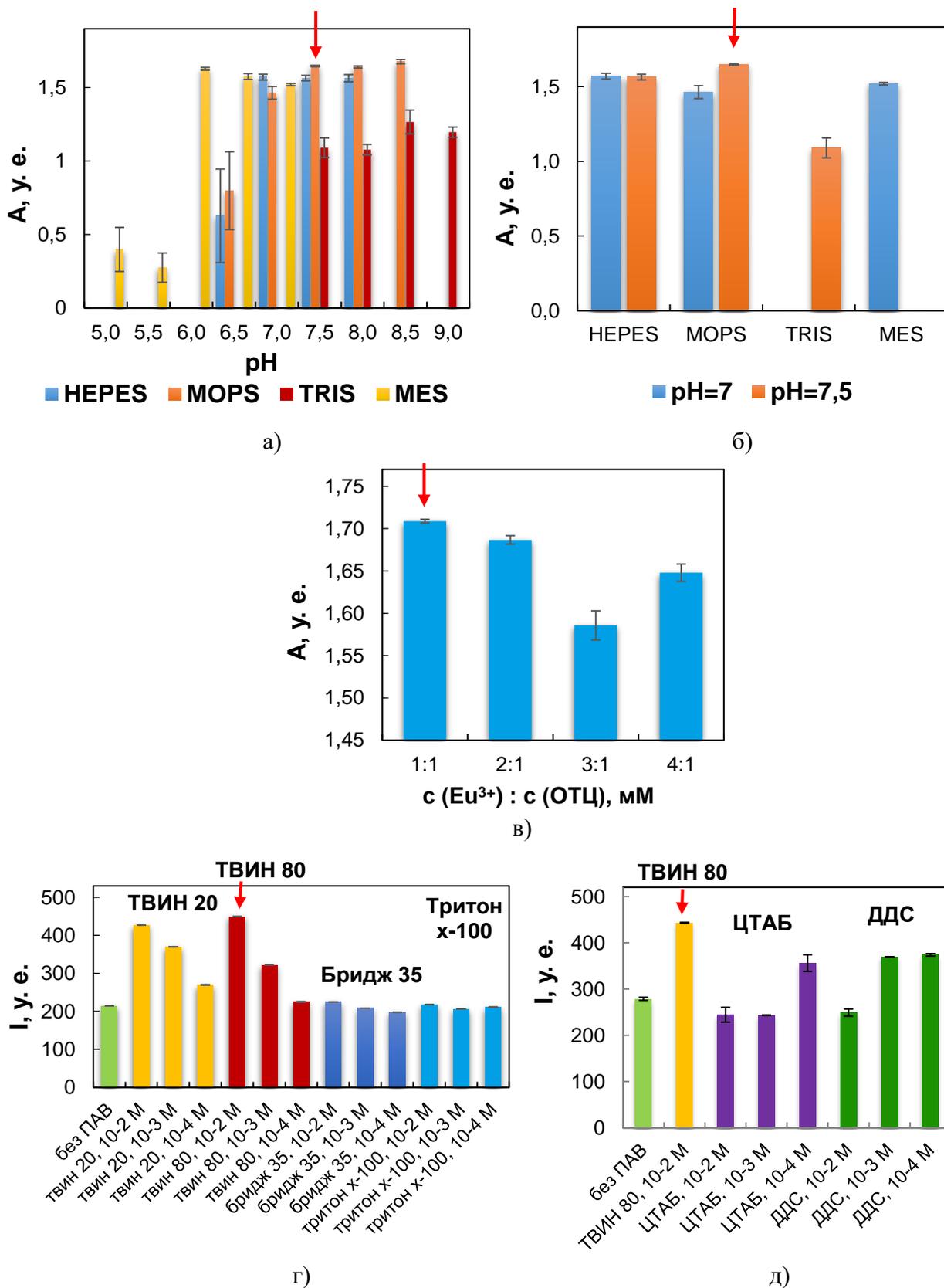
**Выбор условий получения флуоресцирующих комплексов нейромедиаторов и их метаболитов с европием и окситетрациклином**

Для обеспечения высокочувствительного, достоверного и экспрессного определение наиболее важных нейромедиаторов и их метаболитов (ДА, АД, НА, ГВК, ВМК, L-ДОФА, серотонина, 5-ГИУК, НМН) в организме человека в большом количестве проб было необходимо тщательно подобрать условия проведения эксперимента. Для осуществления реакций комплексообразования в ячейках 96-луночного микропланшета были подобраны природа и pH буферного раствора, концентрации реагентов, природа и концентрации поверхностно-активного вещества (ПАВ), длины волн возбуждения и испускания, время реакции (табл. 34, рис. 29).

Для создания определенного значения pH при анализе биообъектов мы выбрали группу так называемых биологических буферов (MOPS, MES, Tris, HEPES). Из литературы известно, что наиболее подходящей концентрацией буферного раствора для определения нейромедиаторов с ионами лантанидов, в основном является 0.01 М [359 – 362]. В щелочной среде (pH > 8.5) комплекс разрушается с образованием гидроксида европия, а в кислой среде (pH < 4.0) степень образования комплекса очень мала [362]. pH буферного раствора 7.0 – 7.5 соответствует рКа ОН-группы  $\beta$ -дикетонной группировки окситетрациклина, что позволяет ему образовывать внутрикомплексное соединение с ионом европия. По интенсивности и воспроизводимости сигнала как поглощения, так и флуоресценции наиболее подходящим оказался MOPS буферный раствор с pH 7.5 (рис. 29 а, б). Также варьировали концентрацию европия при постоянной концентрации ОТЦ (0.1 мМ). Увеличение концентрации ОТЦ приводило к значительному снижению интенсивности сигнала, как поглощения, так и флуоресценции вплоть до полного его исчезновения. Таким образом, наиболее подходящим соотношением концентраций  $\text{Eu}^{3+}$  и ОТЦ по интенсивности и воспроизводимости сигналов поглощения и флуоресценции оказалось соотношение 1 : 1 (рис. 29 в).

В растворах ионов лантанидов квантовый выход флуоресценции уменьшается с увеличением количества молекул воды во внутренней координационной сфере иона металла [359]. Поэтому для повышения интенсивности флуоресцентного сигнала, его стабильности и воспроизводимости необходимо создание мицеллярных сред за счет введения ПАВ. Из анализа литературных данных выяснили, что для создания организованных сред в реакциях комплексообразования с ионами лантанидов чаще используют неионогенные ПАВ [359, 363], однако встречаются и работы, в которых используют ионогенные ПАВ [235, 238]. Поэтому было выбрано 4 неионогенных (ТВИН 20, ТВИН 80, Бридж 35, Тритон х-100), анионогенное (ДДС) и катионогенное (ЦТАБ) ПАВ в диапазоне концентраций  $10^{-4}$  –  $10^{-2}$  М. Наиболее интенсивный сигнал флуоресценции проявлялся при использовании ТВИН 80 с концентрацией  $10^{-2}$  М (рис. 29 г, д). Таким образом были тщательно подобраны условия проведения реакции комплексообразования НМ и их метаболитов с европием и окситетрациклином,

обеспечивающие наиболее интенсивный и воспроизводимый флуоресцентный сигнал (табл. 33).



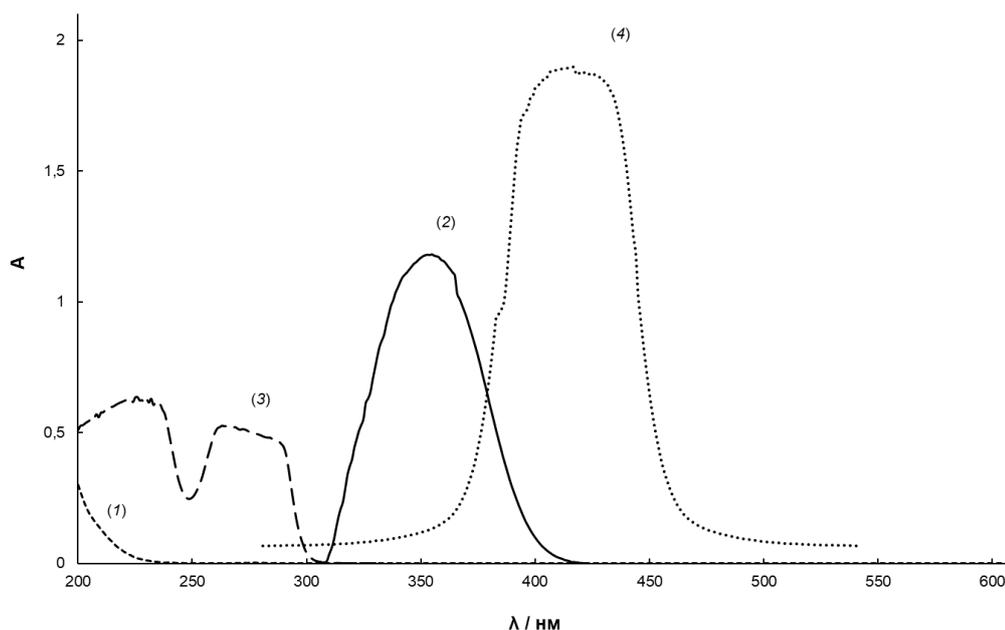
**Рис. 29.** Сравнение интенсивности поглощения комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-OTC}\}$  а) при различных pH буферных растворов, б) при оптимальном значении pH в

различных буферных растворах ( $c(\text{буферов}) = 0.01 \text{ М}$ ,  $c(\text{Eu}^{3+}) = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $c(\text{ОТЦ}) = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $\lambda_{\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}} = 392 \text{ нм}$ ), в) при различных соотношениях  $\text{Eu}:\text{ОТЦ}$  в буферном растворе MOPS pH 7.5 ( $c(\text{MOPS}) = 0.01 \text{ М}$ , pH 7.5,  $c(\text{Eu}^{3+}) = 0.1 - 0.4 \text{ мМ}$ ,  $c(\text{ОТЦ}) = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $\lambda_{\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}} = 392 \text{ нм}$ ) и флуоресценции комплекса  $\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ}$  в различных ПАВ г) – неионогенных, д) – неионогенном, катионогенном и анионогенном в диапазоне концентраций  $10^{-4} - 10^{-2} \text{ М}$  ПАВ ( $c(\text{MOPS}) = 0.01 \text{ М}$ , pH 7.5,  $c(\text{Eu}^{3+}) = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $c(\text{ОТЦ}) = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 416 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ нм}$ ).

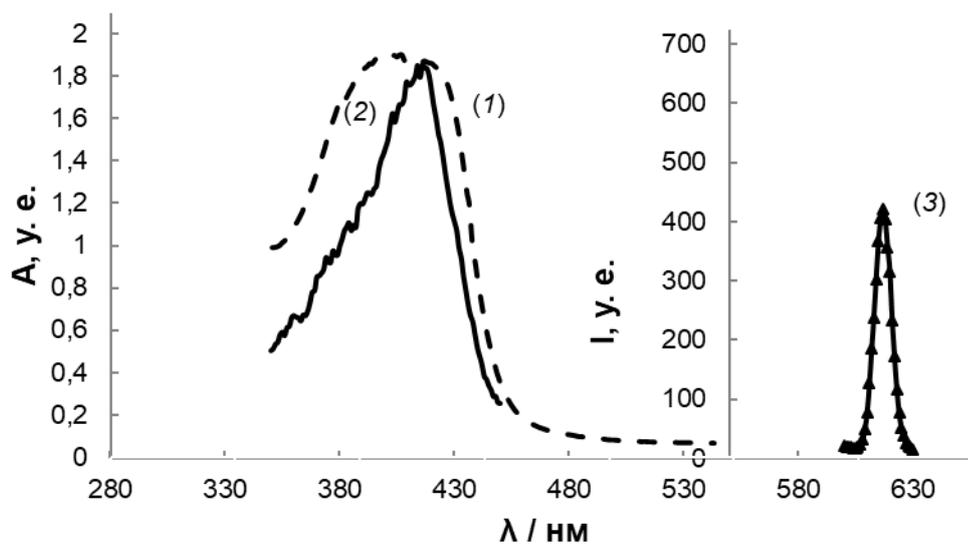
**Таблица 33.** Выбранные условия формирования флуоресцентного комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$ .

$c(\text{MOPS}), \text{ М}$	0.01 (pH 7.5)
$c(\text{Eu}^{3+}), \text{ мМ}$	0.1
$c(\text{ОТЦ}), \text{ мМ}$	0.1
$c(\text{ТВИН } 80), \text{ мМ}$	10
$t, \text{ мин}$	10
$\lambda_{\text{ex}}, \text{ нм}$	416
$\lambda_{\text{em}}, \text{ нм}$	617

В выбранных условиях формирования тройных комплексов на примере ДА показали (рис. 30), что максимумы спектров поглощения индивидуальных растворов европия, ОТЦ, ДА и комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  находятся при различных длинах волн ( $\lambda_{\text{max}(\text{ОТЦ})} = 355 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{max}(\text{ДА})} = 226, 263 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{max}(\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-ДА})} = 416 \text{ нм}$ ), что подтверждает образование нового продукта – тройного комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$ . Аналогичные данные были получены и для других НМ и их метаболитов. Были зарегистрированы также спектры возбуждения ( $\lambda_{\text{ex}} = 416 \text{ нм}$ ) и испускания флуоресценции ( $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ нм}$ ) полученных комплексов. Следует отметить, что спектры поглощения и возбуждения всех флуорофоров фактически совпадают, как показано на примере ДА (рис. 31). Спектры испускания и рассчитанные относительные квантовые выходы флуоресценции не зависят от длины волны возбуждающего света (табл. 34) [364]. Полученные значения квантовых выходов свидетельствуют о том, что они не зависят от строения молекул НМ и их метаболитов. Совокупность полученных данных в выбранных условия проведения реакции комплексообразования позволяет сделать вывод о том, что образуется тройной комплекс  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$ .



**Рис. 30.** Спектры поглощения растворов  $\text{Eu}^{3+}$  (1), ОТЦ (2), ДА (3) и комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  (4) ( $c(\text{Eu}^{3+}) = c(\text{ОТЦ}) = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $c(\text{ДА}) = 1.0 \text{ нМ}$ ,  $\lambda_{\text{max}(2)} = 355 \text{ нМ}$ ,  $\lambda_{\text{max}(3)} = 226, 263 \text{ нМ}$ ,  $\lambda_{\text{max}(4)} = 416 \text{ нМ}$ ).



**Рис. 31.** Спектры поглощения (1), возбуждения (2) и испускания флуоресценции (3) на примере комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  ( $c(\text{Eu}^{3+}) = c(\text{ОТЦ}) = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $c(\text{ДА}) = 1.0 \text{ нМ}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 416 \text{ нМ}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 416 \text{ нМ}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ нМ}$ ).

**Таблица 34.** Значения относительных квантовых выходов флуоресценции тройных комплексов  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$  ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

$\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}$	$\varphi \pm \Delta\varphi$
$\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-НМН}$	$0.0026 \pm 0.0003$

Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-НА	0.0022 ± 0.0001
Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-ГВК	0.0025 ± 0.0002
Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-5-ГИУК	0.0021 ± 0.0001
Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-Серотонин	0.0022 ± 0.0001
Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-АД	0.0023 ± 0.0002
Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-ДА	0.0020 ± 0.0001
Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-ВМК	0.0027 ± 0.0003
Eu <sup>3+</sup> -ОТЦ-L-ДОФА	0.0022 ± 0.0002

## Глава 9. Определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции комплексообразования с европием и окситетрациклином

### 9.1. Определение нейромедиаторов и их метаболитов в растворе

В выбранных условиях проведения реакции комплексообразования разработали методики определения нейромедиаторов и их метаболитов в растворе (методика 12) с метрологическими характеристиками, приведенными в табл. 35. Использование металлокомплексных соединений НМ и их метаболитов с европием и окситетрациклином весьма перспективно, так как позволяет повысить интенсивность флуоресценции аналитов в 200 – 400 раз по сравнению с собственной флуоресценцией этих молекул и смещает максимум спектра флуоресценции в более длинноволновую область спектра, что позволяет нивелировать мешающее влияние матриц биологических объектов.

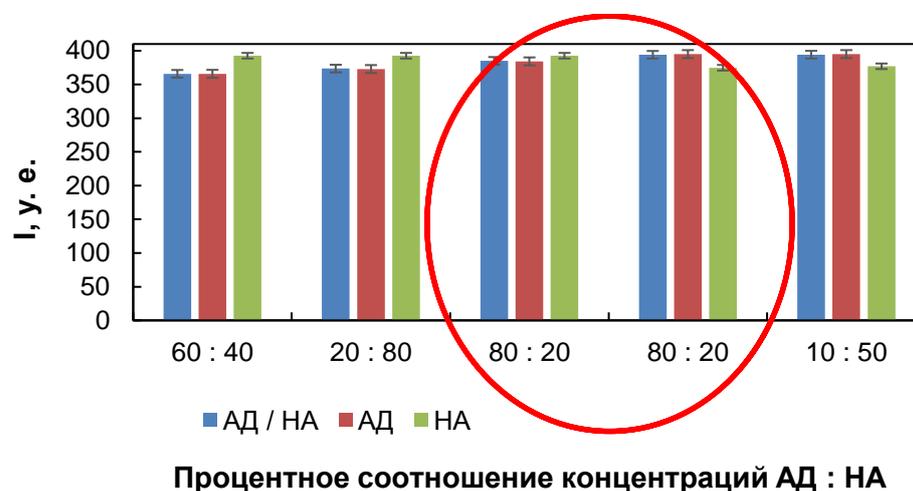
**Таблица 35.** Метрологические характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции комплекса {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит} в растворе (P = 0.95, n = 4).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	c <sub>мин</sub> , пМ	КК, r	s <sub>r</sub> (при c <sub>n</sub> )
ДА	$I = (6.2 \pm 0.3) \times 10^9 c + (372 \pm 1)$	100 – 5000	30	0.994	0.010
НА	$I = (8.8 \pm 0.3) \times 10^{12} c + (384 \pm 1)$	0.5 – 5	0.2	0.998	0.010
АД	$I = (5.0 \pm 0.3) \times 10^{10} c + (366 \pm 1)$	50 – 1000	20	0.992	0.010
ГВК	$I = (4.2 \pm 0.2) \times 10^{12} c + (359 \pm 1)$	1 – 10	0.3	0.996	0.013
ВМК	$I = (3.4 \pm 0.2) \times 10^{10} c + (443 \pm 1)$	100 – 1000	40	0.991	0.013
Серотонин	$I = (5.5 \pm 0.3) \times 10^{11} c + (454 \pm 1)$	5 – 50	1.0	0.991	0.015

5-ГИУК	$I = (2.5 \pm 0.1) \times 10^{12}c + (433 \pm 1)$	1 – 10	0.3	0.994	0.010
L-ДОФА	$I = (1.2 \pm 0.1) \times 10^9c + (362 \pm 1)$	500 – 10000	300	0.990	0.010
НМН	$I = (9.9 \pm 0.6) \times 10^{12}c + (388 \pm 1)$	0.1 – 1	0.05	0.992	0.010

Таким образом, индикаторная система на основе реакции образования комплексов НМ и их метаболитов с европием и окситетрациклином была предложена нами впервые. Разработанные на ее основе методики могут быть использованы для определения маркеров нейромедиаторного обмена в плазме крови и клетках, как здоровых людей, так и с нейродегенеративными и нейроэндокринными заболеваниями с ПО вплоть до 50 фМ.

А для обеспечения возможности детектирования в крови эpineфрина в присутствии норэpineфрина при их экскреции из мозгового вещества надпочечников в соотношении 80 к 20 % нами были изучены различные соотношения АД : НА в системе с европием и ОТЦ (60:40 (1.5 / 1.0 пМ), 20:80 (0.25 / 1.0 пМ), 80:20 (4.0 / 1.0 пМ), (0.5 / 0.125 нМ), 10:50 (0.5 / 2.5 нМ)). Показано, что при целевом соотношении 4 к 1, норэpineфрин не мешает определению эpineфрина (рис. 32).



**Рис. 32.** Сравнение интенсивности флуоресценции индивидуальных тройных комплексов  $\{Eu^{3+}-ОТЦ\}$  с АД и НА и при совместном присутствии (АД / НА) при различных соотношениях (60:40, 20:80, 80:20, 10:50).

## 9.2. Расчет условных констант устойчивости комплексов {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит}

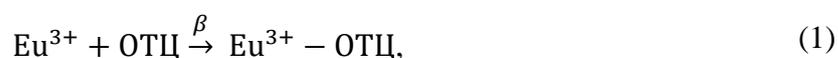
С целью подтверждения возможности использования комплексов НМ с европием(III) и ОТЦ для их определения в биологических объектах необходимо было изучить устойчивость образующихся тройных комплексов. Чувствительность определения нейромедиаторов и их метаболитов различна, при этом пределы обнаружения (ПО) ряда модельных соединений достигают ультранизких фемтомолярных концентраций (табл. 35). Вероятно, это связано с разной устойчивостью комплексов {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит}, которая, в свою очередь, обусловлена различиями в структуре молекул аналитов (табл. 1), оказывающими влияние на прочность их связывания с комплексом {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ}. Мы предположили, что чем выше чувствительность определения того или иного НМ или метаболита (чем ниже ПО), тем выше константа устойчивости его комплекса с европием и ОТЦ. Тогда ряд уменьшения величины константы устойчивости должен быть таким: НМН > НА > ГВК / 5-ГИУК > серотонин > АД > ДА / ВМК > L-ДОФА.

Существует ряд методов для расчета констант устойчивости, не требующих предварительного определения состава комплексного соединения, например, использованный нами метод Фостера-Хаммика-Ворли [365]. Исследование проводили на основе модели, адаптированной для реакции образования комплекса {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит}.

На первом этапе регистрировали интенсивность флуоресценции комплекса {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ} при постоянной концентрации ОТЦ 0.1 мМ, и варьируемой концентрации европия в диапазоне 10 – 40 мМ.

По результатам экспериментов, а также по литературным данным комплекс {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ} формируется при соотношении металл:лиганд = 1 : 1 [358, 360].

Для реакции



При равновесии можно записать константу устойчивости этого комплекса:

$$\beta = \frac{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]}{([\text{Eu}^{3+}]_0 - [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}])([\text{ОТЦ}]_0 - [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}])} \quad (2)$$

При большом избытке  $\text{Eu}^{3+}$ , ( $[\text{Eu}^{3+}]_0 \gg [\text{ОТЦ}]_0$ ) получаем:

$$[\text{Eu}^{3+}]_0 - [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}] \approx [\text{Eu}^{3+}]_0 \quad (3)$$

Подставим выражение (3) в уравнение (2) константы скорости реакции:

$$\beta \cong \frac{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]}{[\text{Eu}^{3+}]_0([\text{ОТЦ}]_0 - [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}])} \quad (4)$$

$$\beta \cdot [\text{Eu}^{3+}]_0 \cong \frac{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]}{[\text{ОТЦ}]_0 - [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]} \quad (5)$$

$$\frac{[\text{ОТЦ}]_0 - [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]}{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]} \cong \frac{1}{\beta \cdot [\text{Eu}^{3+}]_0} \quad (6)$$

$$\frac{[\text{ОТЦ}]_0}{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]} - 1 \cong \frac{1}{\beta \cdot [\text{Eu}^{3+}]_0} \quad (7)$$

Интенсивность флуоресценции вещества количественно может быть условно описана как:

$$I = k'c, \quad (8)$$

где  $k' = 2.303\phi_k I_0 k$  (считаем, что доля поглощенного флуорофором возбуждающего излучения мала ( $k'c < 0.05$ ),  $I_0$  – интенсивность возбуждающего излучения,  $k$  – коэффициент поглощения флуорофора при длине возбуждающего излучения,  $\phi_k$  – квантовый выход) [366].

Объединив уравнения (7) и (8), получаем:

$$\frac{[\text{ОТЦ}]_0 \cdot k'}{I} \cong \frac{1}{\beta \cdot [\text{Eu}^{3+}]_0} + 1 \quad (9)$$

или

$$\frac{[\text{ОТЦ}]_0}{I} \cong \left(\frac{1}{k' \cdot \beta}\right) \cdot \left(\frac{1}{[\text{Eu}^{3+}]_0}\right) + \frac{1}{k'} \quad (10)$$

Уравнение (10) является уравнением линейного вида  $y = kx + b$ , где

$$\begin{cases} y = \frac{[\text{ОТЦ}]_0}{I} \\ x = \frac{1}{[\text{Eu}^{3+}]_0} \end{cases}, \quad \begin{cases} k = \frac{1}{k' \cdot \beta} \\ b = \frac{1}{k'} \end{cases} \quad (11)$$

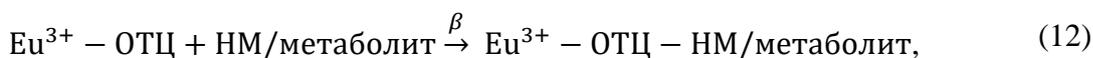
Полученную константу устойчивости комплекса комплекса  $\beta$  ( $\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}$ ) =  $338.84 \pm 2.57$  ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ) использовали для расчета равновесной концентрации комплекса в растворе, а полученную величину – для определения

констант устойчивости комплексов  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$  с различными нейромедиаторами и их метаболитами.

На втором этапе работы мы регистрировали интенсивность флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$ . Концентрацию НМ или метаболита поддерживали постоянной (1.0 нМ), а концентрации европия и ОТЦ варьировали симбатно в интервале 0.1 – 0.4 мМ, чтобы пропорционально менялась равновесная концентрация комплекса  $Eu^{3+}\text{-ОТЦ}$ . По полученным данным строили графики в координатах  $\frac{[\text{НМ/метаболит}]_0}{I} - \left(\frac{1}{[Eu^{3+}\text{-ОТЦ}]_0}\right)$ , и по ним рассчитывали константу устойчивости для каждого комплекса, как  $\beta = \frac{b}{k} \cdot b$ ;  $k$  рассчитывали с помощью метода наименьших квадратов [367].

На основе литературных данных о комплексе европия с ОТЦ и другими анализатами предположили, что комплекс  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$  образуется в соотношении 1 : 1 : 1 [368].

Для реакции



где  $Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит$  – рассматриваемый комплекс, при равновесии можно записать константу устойчивости этого комплекса:

$$\beta = \frac{[Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит]}{([Eu^{3+} - ОТЦ]_0 - [Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит])([НМ/метаболит]_0 - [Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит])} \quad (13)$$

Если взять большой избыток  $Eu^{3+} - ОТЦ$ , т.е.  $[Eu^{3+} - ОТЦ]_0 \gg [НМ/метаболит]_0$ , то при таких условиях получаем:

$$[Eu^{3+} - ОТЦ]_0 - [Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит] \approx [Eu^{3+} - ОТЦ]_0 \quad (14)$$

Подставим (3) в уравнение (2) константы скорости реакции:

$$\beta \cong \frac{[Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит]}{[Eu^{3+} - ОТЦ]_0([НМ/метаболит]_0 - [Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит])} \quad (15)$$

и преобразуем,

$$\beta \cdot [Eu^{3+} - ОТЦ]_0 \cong \frac{[Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит]}{[НМ/метаболит]_0 - [Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит]} \quad (16)$$

$$\frac{[НМ/метаболит]_0 - [Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит]}{[Eu^{3+} - ОТЦ - НМ/метаболит]} \cong \frac{1}{\beta \cdot [Eu^{3+} - ОТЦ]_0} \quad (17)$$

$$\frac{[\text{НМ/метаболит}]_0}{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ} - \text{НМ/метаболит}]} - 1 \cong \frac{1}{\beta \cdot [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]_0} \quad (18)$$

Интенсивность флуоресценции вещества количественно может быть описана условно как:

$$I = k'c, \quad (19)$$

где  $k' = 2.303\phi_k I_0 k$  (считаем, что доля поглощенного флуорофором возбуждающего излучения мала ( $k'c < 0.05$ ),  $I_0$  – интенсивность возбуждающего излучения,  $k$  – коэффициент поглощения флуорофора при длине возбуждающего излучения,  $\phi_k$  – квантовый выход).

Объединив уравнения, получаем:

$$\frac{[\text{НМ/метаболит}]_0 \cdot k'}{I} \cong \frac{1}{\beta \cdot [\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]_0} + 1 \quad (20)$$

или

$$\frac{[\text{НМ/метаболит}]_0}{I} \cong \left(\frac{1}{k' \cdot \beta}\right) \cdot \left(\frac{1}{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]_0}\right) + \frac{1}{k'} \quad (21)$$

Уравнение (21) является уравнением линейного вида  $y = kx + b$ , где

$$\begin{cases} y = \frac{[\text{НМ/метаболит}]_0}{I} \\ x = \frac{1}{[\text{Eu}^{3+} - \text{ОТЦ}]_0} \end{cases}, \quad \begin{cases} k = \frac{1}{k' \cdot \beta} \\ b = \frac{1}{k'} \end{cases} \quad (22)$$

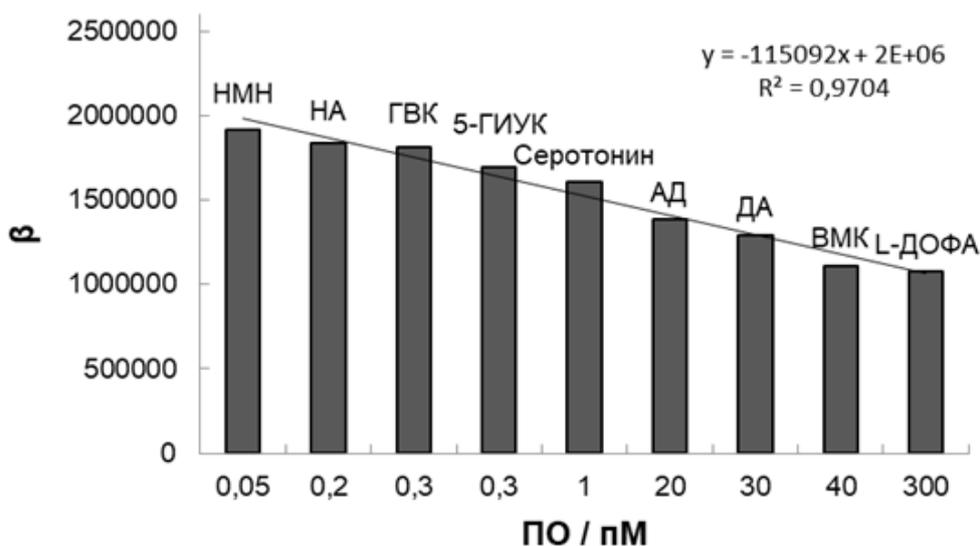
Для каждого комплекса по полученным зависимостям рассчитали константы устойчивости, как  $\beta = \frac{b}{k}$ .  $b$  и  $k$  рассчитывали с помощью метода наименьших квадратов. Результаты расчётов представлены в табл. 36.

**Таблица 36.** Значения констант устойчивости комплексов  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$  для различных нейромедиаторов и их метаболитов ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

НМ/метаболит	НМН	НА	ГВК	5-ГИУК	Серотонин	АД	ДА	ВМК	L-ДОФА
$\beta \cdot 10^6$	$1.92 \pm 0.02$	$1.83 \pm 0.01$	$1.820 \pm 0.001$	$1.690 \pm 0.003$	$1.610 \pm 0.004$	$1.39 \pm 0.01$	$1.29 \pm 0.02$	$1.110 \pm 0.003$	$1.07 \pm 0.01$

Полученные данные (табл. 36) свидетельствуют о том, что устойчивость комплексов  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$  на 1 – 2 порядка выше устойчивости комплексов меди с креатинином и аминокислотами [369], а также на 1 – 3 порядка выше устойчивости ряда комплексов НМ с кальцием или лантаном, которые давно

успешно используют для определения НМ в биообразцах [370, 371]. Таким образом, высокая устойчивость полученных нами тройных комплексов позволяет использовать их для определения НМ и их метаболитов в биологических жидкостях без учета конкурирующих взаимодействий с матричными компонентами образцов. Несмотря на близкие значения констант устойчивости комплексов (табл. 36), наблюдается зависимость между чувствительностью определения НМ и их метаболитов и значениями констант устойчивости их комплексов с европием и ОТЦ (рис. 33): чем выше константа устойчивости комплекса ( $\beta$ ), тем ниже ПО нейромедиаторов и метаболитов. Таким образом, даже небольшие различия в структуре этих аналитов позволяют определять их с различной чувствительностью.



**Рис. 33.** Зависимость пределов обнаружения (ПО) нейромедиаторов и их метаболитов от значений констант устойчивости их комплексов с европием и ОТЦ.

### **9.3. Изучение влияния матричных компонентов мочи и плазмы крови на определение нейромедиаторов и их метаболитов с использованием их комплексов с европием и окситетрациклином**

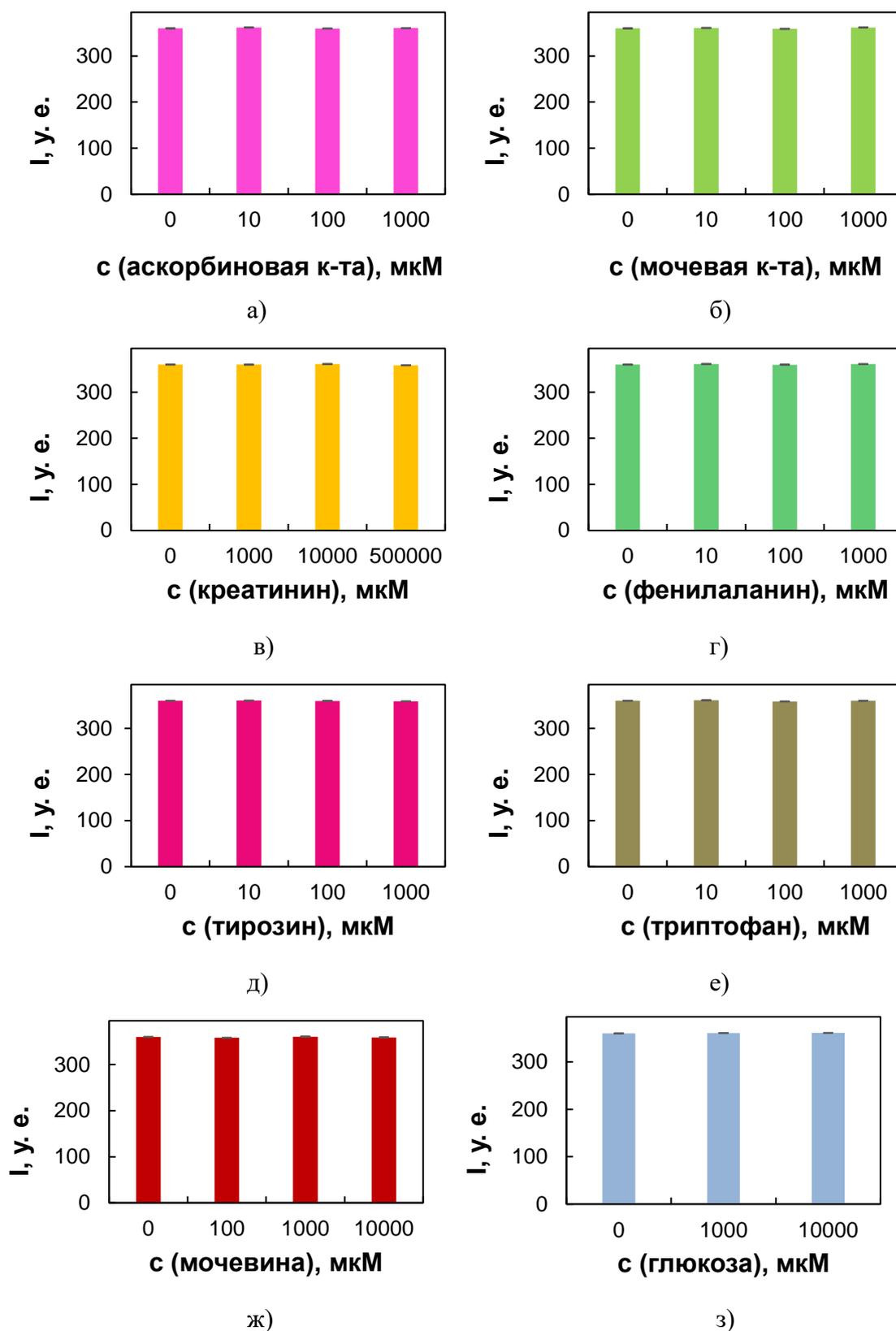
По аналогии с исследованием индикаторной системы, основанной на дериватизации аналитов, мы изучили возможное мешающее влияние матричных компонентов биологических образцов при определении нейромедиаторов и их метаболитов с применением их комплексов с европием и ОТЦ. Были выбраны те вещества, которые флуоресцируют в исследуемой области длин волн, а также те

компоненты, содержание которых в биообъектах во много раз превышает содержание нейромедиаторов (табл. 37). На примере дофамина показали, как их избыточное содержание по отношению ко всем другим НМ и их метаболитам влияет на интенсивность флуоресценции последнего ДА. При проведении экспериментов считали, что матричный компонент существенно мешает, если в его присутствии интенсивность флуоресценции соответствующего НМ изменяется более, чем на 5%.

**Таблица 37.** Диапазоны концентраций матричных компонентов мочи и плазмы (литературные данные) и их концентрации, не мешающие определению НМ и их метаболитов.

Матричные компоненты мочи и плазмы крови	Содержание в моче, мМ [340]	Содержание в плазме, мкМ [341]	$\lambda_{ex/em}$ , нм	Диапазоны концентраций, не мешающие определению НМ/метаболитов, М
Мочевая кислота	0.2 – 0.4	150 – 450	–	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$
Аскорбиновая кислота	0 – 0.6	30 – 100	337/440	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$
Мочевина	333.0 – 588.0	2500 – 8300	550/630	$1 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-1}$
Креатинин	7.1 – 18.0	55 – 115	390/495	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$
Фенилаланин	< 0.1	–	255/282	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$
Тирозин	0.1 – 0.3	–	280/303	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$
Триптофан	0.03 – 0.20	–	295 – 305/348	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$
Глюкоза	–	4400 – 6600	–	$1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2}$

Изучили влияние аскорбиновой и мочевой кислот (10 – 1000 мкМ) на определение ДА (рис. 34 а, б). Аналогичные эксперименты были проделаны с креатинином (100 – 10000 мкМ) (рис. 34 в) и аминокислотами (фенилаланином, тирозином, триптофаном) (10 – 1000 мкМ) (рис. 34 г – е), мочевиной (1000 – 500000 мкМ) (рис. 34 ж), глюкозой (1000 – 10000 мкМ) (рис. 34 з).



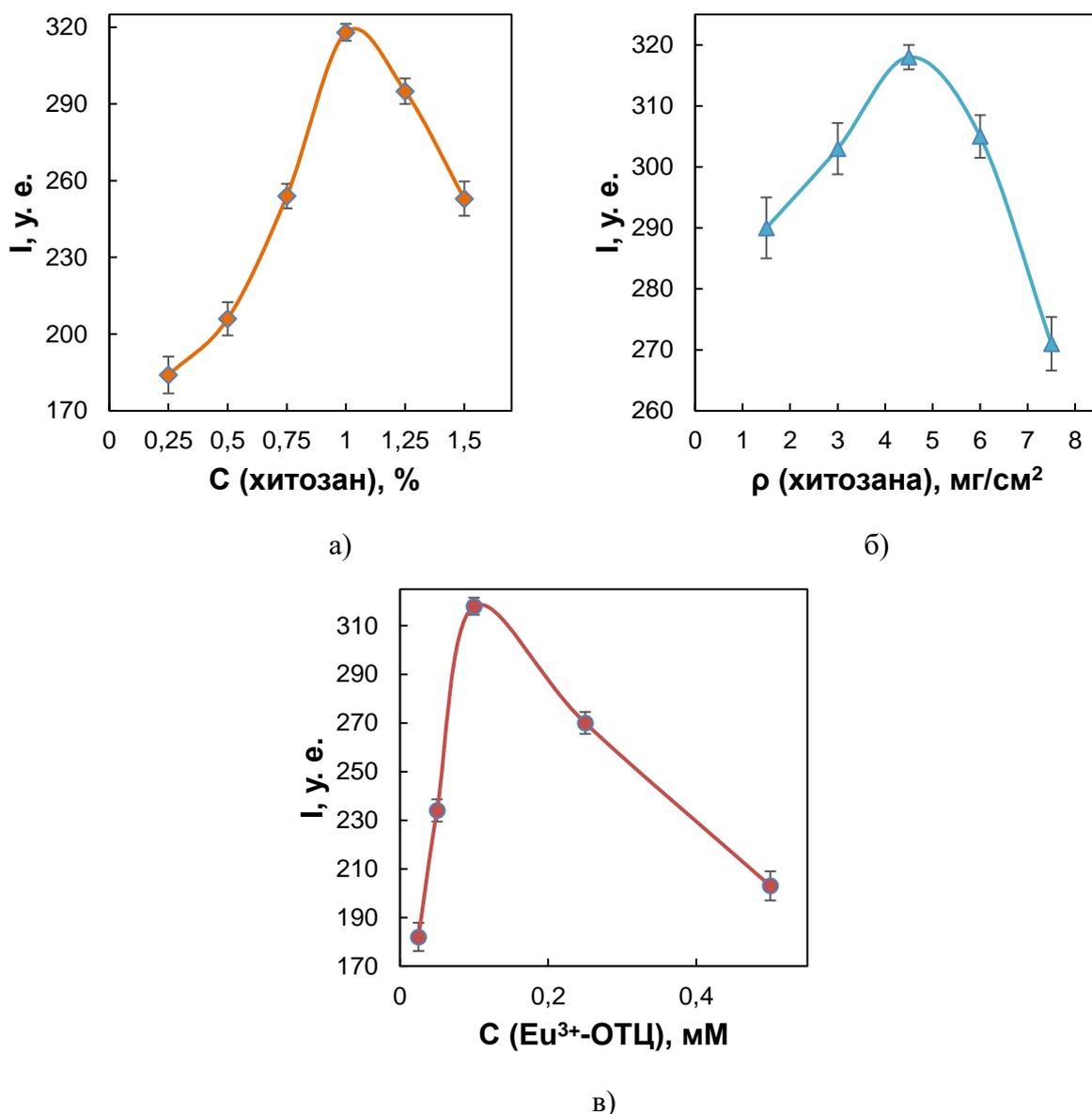
**Рис. 34.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-OTC-DA}\}$  от концентрации а) аскорбиновой кислоты, б) мочевой кислоты, в) креатинина, г) фенилаланина, д) тирозина, е) триптофана, ж) мочевины, з) глюкозы при совместном присутствии ( $c(\text{ДА}) = 1 \text{ нМ}$ ).

Полученные зависимости (рис. 34) свидетельствуют о том, что ни  $10^6$ -кратный избыток мочевого и аскорбиновой кислот, ни  $10^7$ -кратный избыток креатинина, ни  $10^6$ -кратный избыток аминокислот, ни  $5 \cdot 10^8$ -кратный избыток мочевины, ни  $10^7$ -кратный избыток глюкозы по отношению к ДА не оказывают влияния на интенсивность флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}-OTC-DA\}$ . Аналогичные эксперименты были проведены с остальными нейромедиаторами и их метаболитами и были получены аналогичные результаты. Таким образом, на определение НМ и их метаболитов в виде их комплексов с  $\{Eu^{3+}-OTC\}$  ни один из матричных компонентов мочи и плазмы крови не оказывает мешающего влияния, а значит и матричные компоненты клеток не будут влиять на определение нейромедиаторов и их метаболитов, так как их содержание гораздо меньше.

#### **9.4. Твердофазное флуоресцентное определение нейромедиаторов и их метаболитов с использованием иммобилизованного комплекса $\{Eu^{3+}-OTC\}$**

Из литературы известно, что европий более устойчив, когда в его координационной сфере нет молекул воды. В растворе мы нивелировали влияние воды, используя мицеллярную среду. Предположили, что переход в твердую фазу, а именно в пленку полимера, будет способствовать дополнительной стабилизации системы по сравнению с раствором. При выборе наиболее подходящей биосовместимой матрицы для иммобилизации комплекса  $\{Eu^{3+}-OTC\}$  исходили из того, что для анализа биологических объектов приоритетными матрицами могут служить природные биополимеры, такие как хитозан, альгинат, желатин. На первой стадии исследования для иммобилизации комплекса выбрали хитозан. Разработали методику иммобилизации комплекса  $\{Eu^{3+}-OTC\}$  в пленку хитозана в ячейках 96-луночного полистирольного микропланшета (методика 13), изучив влияние концентрации хитозана [233] (рис. 35 а), плотности нанесения полимера (рис. 35 б) и концентрации иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTC\}$  (рис. 35 в) и подобрав условия создания твердофазного препарата металлокомплекса, которые обеспечивают наибольшую интенсивность аналитического сигнала, стабильность комплекса и воспроизводимость результатов измерений: концентрации хитозана и комплекса  $\{Eu^{3+}-OTC\}$  1.0 % и 0.1 мМ, соответственно, плотность нанесения полимера 4.5 мг/см<sup>2</sup>. Полученные зависимости представлены на примере

определения ДА по реакции его комплексообразования с европием и ОТЦ. Также изучили стабильность пленок хитозана с комплексом европия и ОТЦ в течение 3-х месяцев: 1-й месяц – каждую неделю, 2-й и 3-й месяцы – 1 раз в месяц. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интенсивность флуоресцентного сигнала от комплекса европия с ОТЦ в пленке хитозана сохраняется в течение 36 дней, так как в последующие 2 месяца она начинает значительно снижаться, следовательно, комплекс  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$ , иммобилизованный в пленке хитозана, стабилен 36 дней.



**Рис. 35.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ-ДА\}$  от а) концентрации хитозана, б) плотности нанесения полимера, в) концентрации иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$ . Условия реакции:  $c(MOPS) = 0.01$  М,  $pH = 7.5$ ,  $c(ТВИН\ 80) = 10$  мМ,  $c(ДА) = 50$  пМ,  $\lambda_{ex} = 416$  нм,  $\lambda_{em} = 617$  нм, время реакции 10 мин.

С целью выбора условий определения НМ и их метаболитов с использованием иммобилизованного в матрице хитозана  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ}\}$  пероксидазы были проведены исследования, аналогичные описанным в гл. 8. Выбранные условия определения НМ и их метаболитов в твердофазном варианте, совпали с условиями, выявленными для нативного комплекса (табл. 33). В этих условиях были разработаны методики определения нейромедиаторов и их метаболитов с использованием иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ}\}$  в пленках хитозана в ячейках микропланшета с метрологическими характеристиками, приведенными в табл. 38.

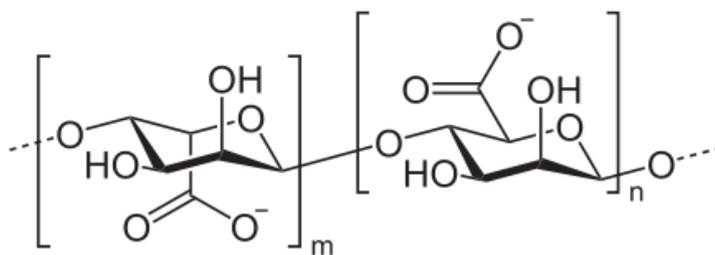
**Таблица 38.** Метрологические характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ}\}$ -НМ/метаболит в пленке хитозана ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	$c_{\text{мин}}$ , пМ	КК, r	$s_r$ (при $c_n$ )
НА	$I = (2.4 \pm 0.1) \times 10^{14} + (266 \pm 1)$	0.025 – 0.1	0.01	0.991	0.010
ДА	$I = (1.0 \pm 0.1) \times 10^{11} + (252 \pm 1)$	25 – 75	9.0	0.997	0.010
АД	$I = (1.9 \pm 0.1) \times 10^{11} + (319 \pm 1)$	10 – 50	5.0	0.993	0.015
ВМК	$I = (1.8 \pm 0.1) \times 10^{10} + (260 \pm 1)$	100 – 500	40	0.997	0.011
ГВК	$I = (9.9 \pm 0.5) \times 10^{12} + (241 \pm 1)$	0.75 – 2.5	0.4	0.994	0.010
Серотонин	$I = (1.1 \pm 0.1) \times 10^{13} + (259 \pm 1)$	1 – 2.5	0.7	0.996	0.010
5-ГИУК	$I = (4.0 \pm 0.4) \times 10^{12} + (265 \pm 1)$	0.25 – 2.5	0.08	0.993	0.010
L-ДОФА	$I = (9.9 \pm 0.6) \times 10^{10} + (277 \pm 1)$	25 – 250	8.0	0.991	0.011
НМН	$I = (5.9 \pm 0.4) \times 10^{14} + (266 \pm 1)$	0.01 – 0.05	0.04	0.991	0.010

Разработанные методики позволяют достичь ПО НМ и их метаболитов вплоть до 10 фМ. Таким образом, иммобилизация комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ}\}$  позволила повысить чувствительность определения аналитов до 40 раз, по сравнению с определением в растворе, упростить методики определения НМ и их метаболитов, ускорить анализ, а также способствовала повышению стабильности комплекса во времени.

На втором этапе исследования в качестве полимерной матрицы для иммобилизации был выбран альгинат. Он так же, как и хитозан является

природным полисахаридом (рис. 36), имеющим линейную структуру, но без аминогрупп, представляющим собой длинные цепи полиуроновых кислот (*D*-маннуроновой и *L*-гулуруновой) [372].



**Рис. 36.** Структурная формула альгината.

Для разработки методики иммобилизации комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  в пленке альгината в ячейках 96-луночного полистирольного микропланшета (методика 14) по аналогии с иммобилизацией в хитозане было изучено влияние концентрации альгината (0.25 – 1.5 %), плотности его нанесения (1.5 – 7.5 мг/см<sup>2</sup>) и концентрации иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  (0.025 – 0.5 мМ). Изученные зависимости имели вид, аналогичный тому, что наблюдали в случае применения хитозана. Выбранные условия оказались теми же: концентрации альгината и комплекса  $Eu^{3+}-OTЦ$  1.0 % и 0.1 мМ, соответственно, плотность нанесения полимера 4.5 мг/см<sup>2</sup>. Наиболее подходящая концентрация иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  в альгинате совпала с концентрацией в хитозане (0.1 мМ). Результаты изучения стабильности пленок альгината с комплексом европия и ОТЦ в течение 1.5 месяцев свидетельствуют о том, что комплекс европия и ОТЦ в пленке альгината испускает аналитический сигнал одинаковой интенсивности в течение 7 дней, а в последующий период времени интенсивность сигнала сильно падает, значит, иммобилизованный в пленке альгината комплекс  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  сохраняет свою стабильность лишь в течение 1 недели.

В выбранных условиях проведения реакции комплексообразования (табл. 33) разработали методики определения нейромедиаторов и их метаболитов с использованием комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$ , иммобилизованного в пленках альгината в ячейках микропланшета, с метрологическими характеристиками, приведенными в табл. 39.

К сожалению, с альгинатом удалось разработать только методики определения ДА, НА, ГВК, АД (табл. 39). Для остальных аналитов наблюдалось либо отсутствие линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации определяемого компонента, либо наблюдалось тушение интенсивности флуоресценции при увеличении концентрации аналита. Также нами зафиксирована сильная зависимость воспроизводимости результатов измерений от температуры. Была проведена серия экспериментов в микропланшете, который 1) только что вытащили из морозильной камеры, 2) только что вытащили из холодильной камеры, 3) в течение часа был выдержан при комнатной температуре. Более явные различия в результатах измерений были зарегистрированы в микропланшетах из морозильной камеры и выдержанных при комнатной температуре. При определении всех аналитов наблюдалось улучшение коэффициента корреляции и ухудшение воспроизводимости результатов в микропланшете из морозильной камеры, по сравнению с результатами, полученными с использованием микропланшетов из холодильной камеры и выдержанного в течение часа при комнатной температуре. При определении ДА в микропланшете из морозильной камеры удалось расширить диапазон линейности и в 2 раза повысить чувствительность определения, а в случаях определения НА и ГВК сузился диапазон линейности.

В целом, использование иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  в пленке альгината также позволяет повысить чувствительность определения НМ и их метаболитов до 8 раз и улучшить метрологические характеристики методик их определения, по сравнению с их определением в растворе.

На следующем этапе исследования выбрали природный полимер желатин (рис. 37). Желатин – это производное самого распространенного животного белка – коллагена. Его приблизительный аминокислотный состав: глицин – 21%, гидроксипролин – 12%, пролин – 12%, глутаминовая кислота – 10%, аланин – 9%, аргинин – 8%, аспарагиновая кислота – 6%, серин – 4%, лизин – 4%, лейцин – 3%, фенилаланин – 2%, валин – 2%, треонин – 2%, гидроксизин – 1%, изолейцин – 1%, метионин и гистидин < 1%, тирозин < 0.5%. В зависимости от источника сырья

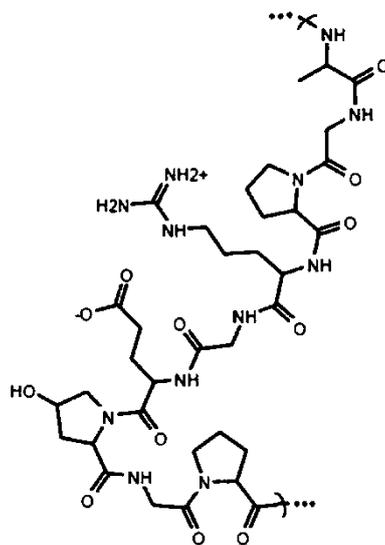
**Таблица 39.** Метрологические характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции комплекса {Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит} в пленке альгината (P = 0.95, n = 4).

Аналит	Уравнения градуировочных зависимостей		ДОС, пМ		с <sub>мин</sub> , пМ		КК, r		s <sub>r</sub> (при с <sub>n</sub> )	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
ДА	$I = (1.3 \pm 0.1) \times 10^{11} + (192 \pm 1)$	$I = (9.8 \pm 0.1) \times 10^{10} + (279 \pm 1)$	25 – 100	7.5 – 100	8.5	4.0	0.988	0.999	0.010	0.010
НА	$I = (1.3 \pm 0.1) \times 10^{14} + (193 \pm 1)$	$I = (3.2 \pm 0.1) \times 10^{14} + (297 \pm 1)$	0.025 – 0.1	0.025 – 0.05	0.01	0.01	0.994	0.999	0.010	0.025
ГВК	$I = (1.5 \pm 0.1) \times 10^{13} + (235 \pm 1)$	$I = (2.5 \pm 0.1) \times 10^{13} + (295 \pm 1)$	0.25 – 1	0.25 – 0.5	0.1	0.1	0.992	0.997	0.010	0.018
АД	$I = (2.0 \pm 0.2) \times 10^{11} + (236 \pm 1)$	–	25 – 100	–	10	–	0.992	–	0.010	–

1 – Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит-альгинат (+25°C)

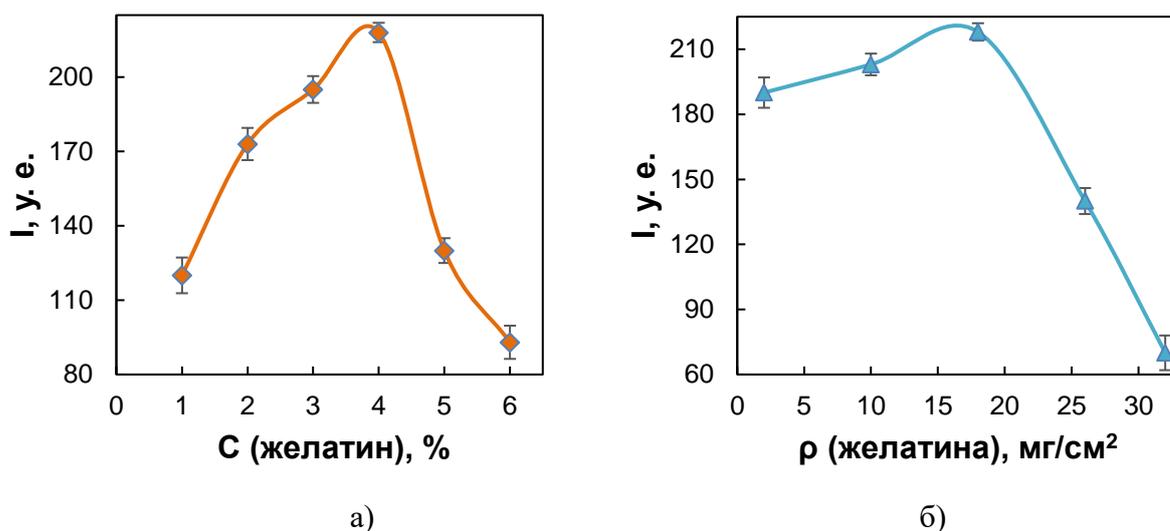
2 – Eu<sup>3+</sup>-ОТЦ-НМ/метаболит-альгинат (-18°C)

и способа обработки эти значения могут меняться. Желатин склонен к образованию пространственных структур нелинейного типа [373].



**Рис. 37.** Структурная формула желатина.

Для иммобилизации комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  в пленке желатина в ячейках 96-луночного полистирольного микропланшета разработали методику 15, изучив, по аналогии с иммобилизацией в хитозане и альгинате, влияние концентрации желатина (рис. 38 а), плотности его нанесения (рис. 38 б) и концентрации иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  (она совпала с описанными выше – 0.1 мМ) на стабильность комплекса, интенсивность флуоресценции и воспроизводимость результатов измерений. Кроме того, при приготовлении пленок желатина оценили воспроизводимость результатов измерений в зависимости от способа смешения компонентов (желатина, растворов соли европия и ОТЦ), так как раствор желатина очень вязкий. Оказалось, что воспроизводимость результатов улучшалась при заблаговременном приготовлении раствора желатина с комплексом  $Eu^{3+}-OTЦ$  и введении его в ячейки микропланшета по сравнению с тем, что была при введении компонентов в ячейки по отдельности с дальнейшим перемешиванием в каждой ячейке. Выбранные условия иммобилизации комплекса  $Eu^{3+}-OTЦ$  в пленке желатина оказались следующими: концентрации желатина и комплекса  $Eu^{3+}-OTЦ$  4.0 % и 0.1 мМ, соответственно, плотность нанесения полимера 18 мг/см<sup>2</sup>.



**Рис. 38.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  от а) концентрации желатина, б) плотности нанесения полимера. Условия реакции:  $c(\text{MOPS}) = 0.01 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $c(\text{ТВИН } 80) = 10 \text{ mM}$ ,  $c(\text{ДА}) = 50 \text{ пМ}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 416 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ нм}$ , время реакции 10 мин.

Результаты изучения стабильности пленок желатина с комплексом европия и ОТЦ в течение 1 месяца свидетельствуют о том, что интенсивность флуоресцентного сигнала от комплекса европия и ОТЦ в пленке желатина сохраняется в течение 7 дней, в последующие 3 недели она начинает снижаться, следовательно, комплекс  $Eu^{3+}\text{-ОТЦ}$ , иммобилизованный в пленке желатина, стабилен в течение 1 недели.

В выбранных условиях проведения реакции комплексообразования были разработаны методики определения нейромедиаторов и их метаболитов с метрологическими характеристиками, приведенными в табл. 40.

**Таблица 40.** Метрологические характеристики методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ/метаболит}\}$  в пленке желатина ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	$c_{\text{мин}}$ , пМ	КК, r	$s_r$ (при $c_n$ )
ДА	$I = (5.8 \pm 0.3) \times 10^{11} c + (407 \pm 1)$	7.5 – 50	1.9	0.991	0.010
АД	$I = (1.9 \pm 0.7) \times 10^{12} c + (300 \pm 1)$	7.5 – 25	2.6	0.997	0.020
НА	$I = (2.9 \pm 0.1) \times 10^{13} c + (408 \pm 1)$	0.25 – 0.75	0.1	0.994	0.010
ГВК	$I = (5.4 \pm 0.3) \times 10^{12} c + (320 \pm 1)$	0.5 – 1	0.3	0.992	0.010
ВМК	$I = (7.7 \pm 0.4) \times 10^9 c + (379 \pm 1)$	250 – 750	100	0.996	0.016

L-ДОФА	$I = (1.8 \pm 0.1) \times 10^{11}c + (326 \pm 1)$	50 – 100	30	0.992	0.010
НМН	$I = (5.7 \pm 0.2) \times 10^{14}c + (408 \pm 1)$	0.0075 – 0.025	0.005	0.996	0.013
Серотонин	$I = (1.2 \pm 0.3) \times 10^{13}c + (369 \pm 3)$	0.75 – 2.5	0.3	0.997	0.017

Использование иммобилизованного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  в пленке желатина также позволяет повысить чувствительность определения НМ и их метаболитов до 16 раз и улучшить метрологические характеристики методик их определения, по сравнению с их определением в растворе.

В табл. 41 приведены метрологические характеристики всех твердофазных флуоресцентных методик определения НМ и их метаболитов с использованием нативного и иммобилизованного комплексов европия и ОТЦ. По результатам проведенного исследования наиболее подходящим полимером был выбран хитозан, так как при иммобилизации в нем комплекс  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  стабилен более месяца, удастся добиться увеличения чувствительности определения аналитов до 40 раз с лучшей воспроизводимостью ( $s_r$  не более 0.015). Вероятнее всего, эти достоинства обусловлены структурой хитозана – линейное строение и наличие большого числа аминогрупп стабилизирует иммобилизованный комплекс. Из литературы известно, что при иммобилизации лантанидов или их комплексов за счет устранения из окружения иона металла молекул воды наблюдается увеличение интенсивности флуоресцентного аналитического сигнала и квантовых выходов флуоресценции [359]. Таким образом, использование иммобилизованного в матрице хитозана комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  позволяет добиться высокой чувствительности и воспроизводимости при определении маркеров нейромедиаторного обмена.

### **9.5. Определение нейромедиаторов и их метаболитов по реакции образования ими комплексов с европием и окситетрациклином в плазме крови крыс**

Разработанные методики апробировали на примере определения норэпинефрина в плазме крови крыс, подверженных различным стрессам с варьируемой продолжительностью: обезвоживанию (водной депривации), голоду

**Таблица 41.** Сравнение метрологических характеристик методик определения нейромедиаторов и их метаболитов по флуоресценции их комплексов с  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$  в нативном и в иммобилизованном состоянии ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	ДОС, пМ					$c_{мин}$ , пМ					КК, r					$s_r$ (при $c_H$ )				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ДА	100 – 5000	25 – 75	25 – 100	7.5 – 100	7.5 – 50	30	9	8.5	4	1.9	0.994	0.997	0.988	0.999	0.991	0.010	0.011	0.010	0.010	0.010
НА	0.5 – 5	0.25 – 1	0.025 – – 0.1	0.025 – 0.05	0.25 – 0.75	0.2	0.01	0.01	0.01	0.1	0.998	0.991	0.994	0.999	0.994	0.010	0.010	0.010	0.025	0.010
АД	50 – 1000	10 – 50	25 – 100	-	7.5 – 25	20	5	10	-	2.6	0.992	0.993	0.992	-	0.997	0.010	0.015	0.010	-	0.020
ГВК	1 – 10	0.75 – 2.5	0.25 – 1	0.25 – 0.5	0.5 – 1	0.3	0.4	0.1	0.1	0.3	0.996	0.994	0.992	0.997	0.992	0.013	0.010	0.010	0.018	0.010
ВМК	100 – 1000	100 – 500	-	-	250 – 750	40	40	-	-	100	0.991	0.997	-	-	0.996	0.013	0.011	-	-	0.016
Серотонин	5 – 50	1 – 2.5	-	-	0.75 – 2.5	1	0.7	-	-	0.3	0.991	0.996	-	-	0.997	0.015	0.010	-	-	0.017
5-ГИУК	1 – 10	0.25 – 2.5	-	-	-	0.3	0.08	-	-	-	0.994	0.993	-	-	-	0.010	0.010	-	-	-
L-ДОФА	500 – 10000	25 – 250	-	-	50 – 100	300	8	-	-	30	0.990	0.991	-	-	0.992	0.010	0.011	-	-	0.010
НМН	0.1 – 1	0.01 – 0.05	-	-	0.0075 – – 0.025	0.05	0.04	-	-	0.005	0.992	0.991	-	-	0.996	0.010	0.010	-	-	0.013

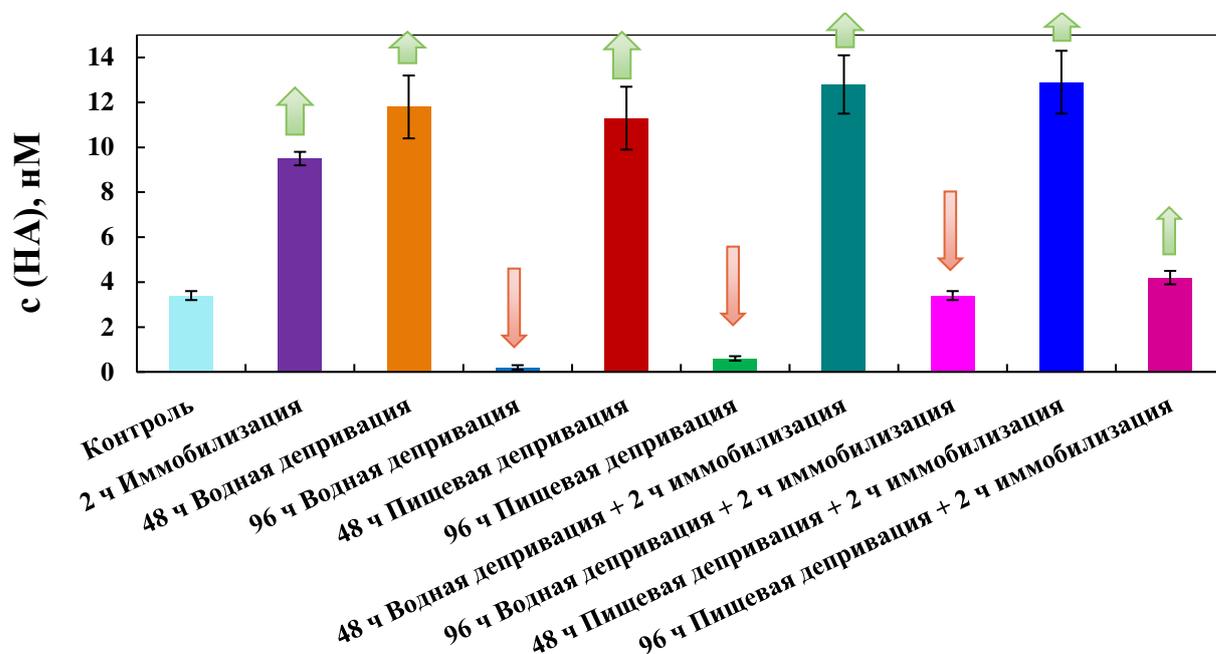
1 –  $Eu^{3+}$ - ОТЦ-НМ/метаболит (нативный); 2 –  $Eu^{3+}$ - ОТЦ-НМ/метаболит-хитозан; 3 –  $Eu^{3+}$ - ОТЦ-НМ/метаболит-альгинат (+25°C);

4 –  $Eu^{3+}$ - ОТЦ-НМ/метаболит-альгинат (-18°C); 5 –  $Eu^{3+}$ - ОТЦ-НМ/метаболит-желатин

(пищевой депривации) и обездвиживанию (иммобилизации). Анализировали плазму крови нескольких групп подопытных животных: 1 – контрольная, 2 – подверженная иммобилизации в течение 2 ч., 3 – подверженная водной депривации в течение 48 ч., 4 – подверженная водной депривации в течение 96 ч., 5 – подверженная пищевой депривации в течение 48 ч., 6 – подверженная пищевой депривации в течение 96 ч., 7 – подверженная иммобилизации в течение 2 ч. и водной депривации в течение 48 ч., 8 – подверженная иммобилизации в течение 2 ч. и водной депривации в течение 96 ч., 9 – подверженная иммобилизации в течение 2 ч. и пищевой депривации в течение 48 ч., 10 – подверженная иммобилизации в течение 2 ч. и пищевой депривации в течение 96 ч. (табл. 42, рис. 39). Вводили плазму, разбавленную в 100 раз физиологическим раствором, прямо в реакционную систему. Определение НА проводили методом добавок по методике 16 с использованием комплекса европия с ОТЦ в пленке хитозана.

**Таблица 42.** Результаты определения норэпинефрина в плазме крови крыс, подвергшихся иммобилизации водной и пищевой депривации ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Группа	C (НА), нМ
Контроль	$3.0 \pm 0.2$
2 ч. Иммобилизация	$10.0 \pm 0.3$
48 ч. Водная депривация	$12 \pm 1$
96 ч. Водная депривация	$0.2 \pm 0.1$
48 ч. Пищевая депривация	$11 \pm 1$
96 ч. Пищевая депривация	$1.0 \pm 0.1$
48 ч. Водная депривация + 2 ч. иммобилизация	$13 \pm 1$
96 ч. Водная депривация + 2 ч. иммобилизация	$3.0 \pm 0.2$
48 ч. Пищевая депривация + 2 ч. иммобилизация	$12 \pm 1$
96 ч. Пищевая депривация + 2 ч. иммобилизация	$4.0 \pm 0.3$



### Группы подопытных крыс

**Рис. 39.** Результаты определения норэпинефрина в плазме крови крыс (с(MOPS) = 0.01 М, рН 7.5, с( $\text{Eu}^{3+}$ ) = 0.1 мМ, с(ОТЦ) = 0.1 мМ, с(ТВИН 80) = 10 мМ,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 416 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  = 617 нм, время реакции 10 мин).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что воздействие обездвиживания, голода и обезвоживания вызывает стресс у подопытных крыс, и, как следствие, или выброс НА в кровь, или резкое уменьшение его уровня в крови. Выявили, что иммобилизация крыс в течение 2 ч. и водная и пищевая депривации крыс в течение 48 ч. вызывают стресс и выброс НА в кровь, водная и пищевая депривации крыс в течение 96 ч. вызывают стресс и снижение НА в крови. Наибольший стресс вызывает обезвоживание и голод в течение 48 ч. и обездвиживание в сочетании с обезвоживанием и голодом в течение 48 ч. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [374].

Также исследовали влияние ограничения питания на уровень норэпинефрина в крови крыс (табл. 43). Изучили 2 группы подопытных животных: контрольная группа – неограниченное количество подходов к еде и опытная группа – корм 1 час в день в течение 4 дней. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ограничение режима питания также негативно сказывается на состоянии организма крыс – уровень НА снижается из-за недостатка поступающего с пищей тирозина, и у животных возникает стресс, депрессия, апатия [375].

**Таблица 43.** Результаты определения норэпинефрина в плазме крови крыс с ограниченным режимом питания ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Группы крыс	C (НА), нМ
Контроль	$1.93 \pm 0.02$
Корм 1 час в день 4 дня	$0.08 \pm 0.01$

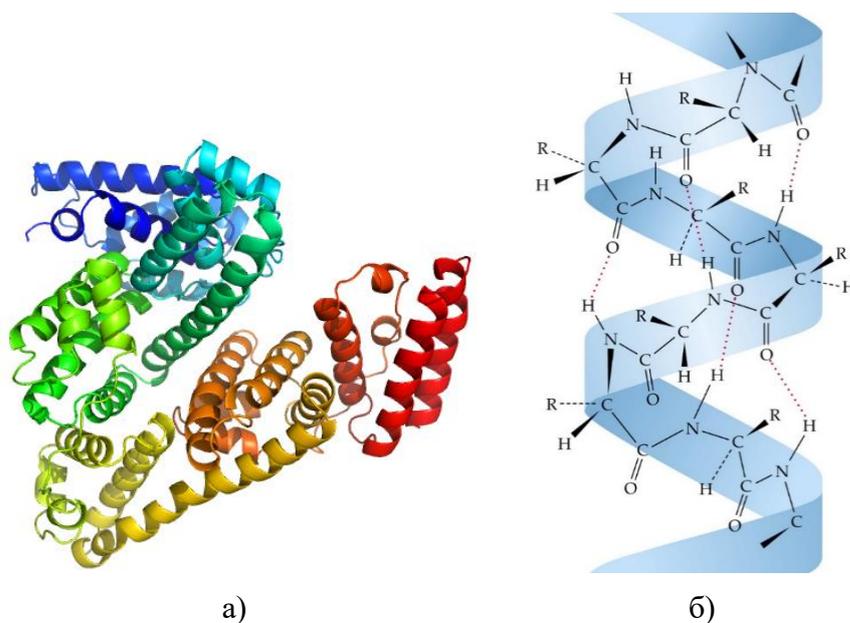
### **Глава 10. Определение нейромедиаторов по образованию ими комплексов с европием(III) и окситетрациклином в 3D (объемных) клеточных культурах**

Для определения нейромедиаторов и их метаболитов в 3D (объемных) клеточных культурах, которые по своим свойствам максимально близки к клеткам живых организмов и могут быть использованы для решения разнообразных медико-биологических проблем, необходимо было выбрать гелевые матрицы, пригодные для выращивания клеточных структур. Методы культивирования клеток млекопитающих *ex vivo* все чаще требуются для изучения физиологии клеток и тканей, для диагностики и прогностики заболеваний и для выращивания замещающей ткани для регенеративной медицины. Клетки ведут себя более естественным образом при культивировании в трехмерных средах, а не в двумерных, так как в организме они растут именно в трехмерном пространстве [376]. Природные гидрогели стали перспективными как матрицы для трехмерного культивирования клеток. Среди них активно используют гидрогели, которые имеют высокое содержание воды, демонстрируют высокую эффективность в качестве матриц для 3D-культуры клеток, повторяют структуру и свойства нативного микроокружения для клеточной культуры *in vitro*. Природные гели для клеточной культуры обычно формируют из белков, таких как коллаген [377], фибрин, желатин [378], альбумин [379], помимо них в качестве матриц используют полимеры из других биологических источников, таких как хитозан [380], альгинат [381] или фибровые волокна шелка. Поскольку они получены из природных источников, эти гели по своей природе являются биосовместимыми и биоактивными [382]. Они также способствуют естественному функционированию клеточных систем из-за множества эндогенных факторов, что особенно важно для

жизнеспособности, пролиферации и развития клеток. В связи с этим, для определения нейромедиаторов и их метаболитов в клеточных культурах необходимо было разработать твердофазные флуоресцентные 3D гелевые системы на основе реакции образования аналитами комплексов с европием и ОТЦ. На основе литературных данных были выбраны 4 гидрогелевые матрицы, в которых возможно выращивание клеточных структур, – желатин, альгинат, альбумин, коллаген. Это природные биополимеры растительного и животного происхождения. Они являются биосовместимыми матрицами для роста различных клеточных культур [378, 379, 383 – 386]. Структуры альбумина и коллагена представлены на рис. 40 а и б, соответственно. Описание состава и структура альгината и желатина представлены в п. 9.4.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) — наиболее широко изученный и распространённый протеин крови (70% от общего протеинового состава). Он представляет собой глобулу в форме сплюснутого эллипсоида, состоящую из 607 аминокислотных остатков аланина, цистеина, аспарагина, глицина, фенилаланина, гистидина, глутаминовой кислоты, изолейцина, лизина, аспарагиновой кислоты, метионина, серина, аргинина, лейцина, пролина, глутамина, тирозина, триптофана, валина и треонина. БСА обладает довольно сложной пространственной структурой, образующей три домена, каждый из которых, в свою очередь подразделяется на два поддомена. Каждый поддомен можно разбить на 3 спирали. Вторичную структуру БСА на 50 – 68% составляют альфа-спирали, 16 – 18% – бета-складки. Третичная структура образована дисульфидными связями, которых в молекуле БСА насчитывается 17 (по количеству цистеиновых аминокислотных остатков) [387].

Молекула коллагена представляет собой спираль из трёх  $\alpha$ -цепей, один виток которой содержит три аминокислотных остатка – третья аминокислота всегда глицин, вторая – пролин или лизин, первая – любая другая аминокислота, кроме трёх перечисленных. Коллаген на 78 % состоит из глицина и небольшого количества серосодержащих аминокислот и на 21 % из остатков 3-гидроксипролина, 4-гидроксипролина и 5-гидроксилизина. Волокна коллагена формируются при агрегации микрофибрилл, поэтому он склонен к образованию пространственных структур нелинейного типа [388].

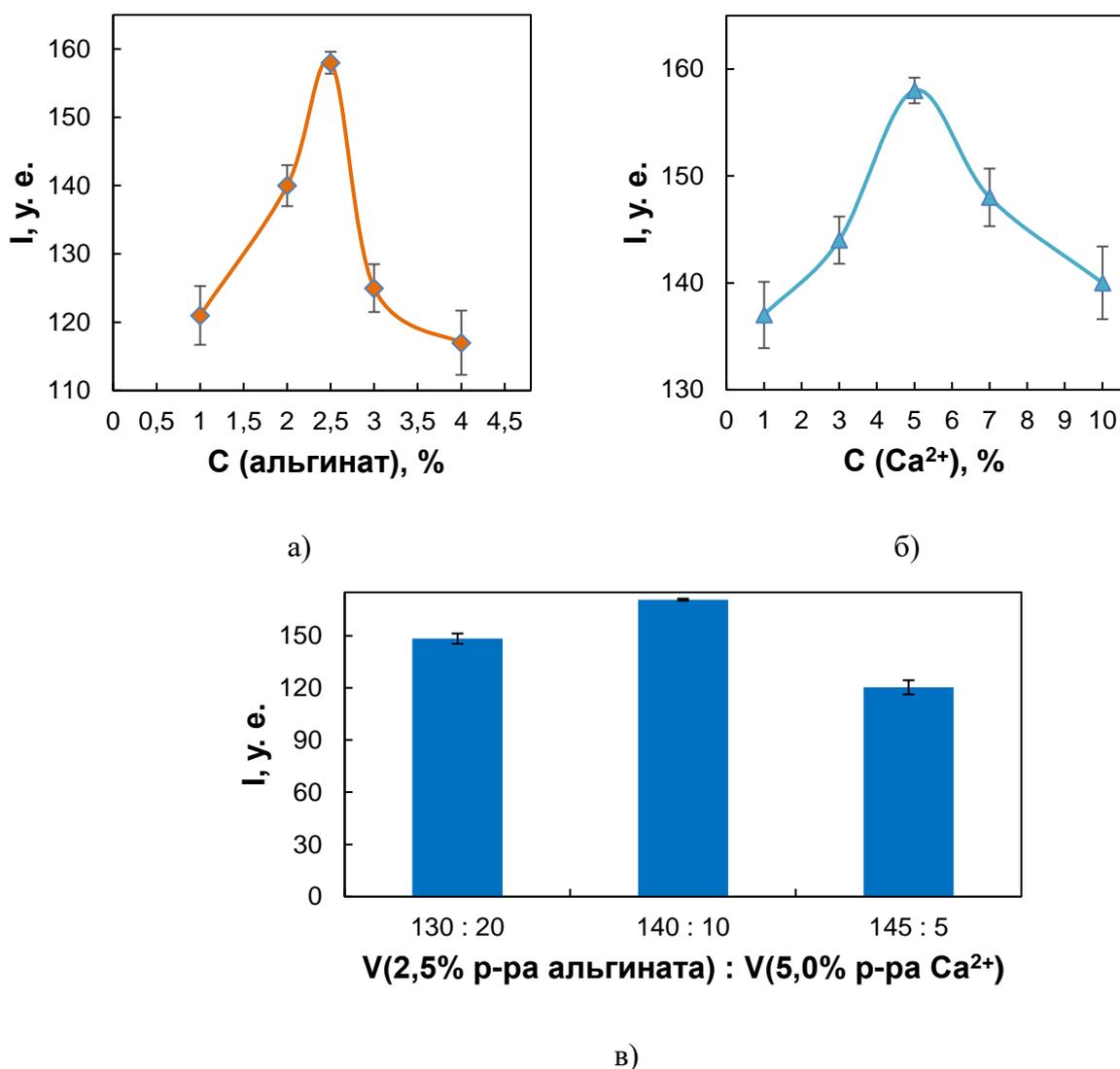


**Рис. 40.** Структурная формула а) альбумина и б) коллагена.

Целью исследования было разработать методики определения НМ в гидрогелях. Для этого было необходимо разработать методики создания гидрогелей и способ импрегнирования в него всех компонентов реакции. Клетки сохраняют жизнеспособность при 37 °С, как в организме человека, поэтому температура инкубирования микропланшетов с гелевыми структурами во всех случаях именно такая.

Первым полимером для разработки гелевых систем стал уже изученный при формировании пленок альгинат натрия, но в комбинации с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  для сшивания молекул альгината в гелевую структуру [384]. Концентрации компонентов гидрогеля подбирали на основе литературных данных [389]. Исследовали влияние на интенсивность флуоресценции в присутствии комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ}\}$  и воспроизводимость результатов измерений при определении ДА концентрации альгината натрия (рис. 41 а) и ионов кальция (рис. 41 б). Наиболее подходящими по этим показателям оказались 2.5 % раствор альгината натрия и 5.0 % раствор ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Поэтому далее варьировали соотношение 2.5 % раствора альгината и 5.0 % раствора кальция для получения гидрогелей оптимальной структуры, наиболее интенсивного сигнала флуоресценции и хорошей воспроизводимости результатов определения ДА по флуоресценции комплекса  $\{\text{Eu}^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  (рис. 41 в). По структуре гель, полученный при соотношении растворов альгината и кальция 140 : 10, был аналогичен коллагеновому гидрогелю,

однородным, в меру плотным. При формировании альгинатного гидрогеля наиболее подходящей концентрацией комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ\}$ , как и ранее, оказалась 0.1 мМ. Кроме того, при таком соотношении удалось получить более интенсивный сигнал и наименьшее относительное стандартное отклонение результатов измерения сигнала. Таким образом, были подобраны наиболее подходящие условия для формирования тройного комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ-НМ\}$  (табл. 44) и разработаны методики определения НМ в альгинатном гидрогеле (методика 17) с метрологическими характеристиками, представленными в табл. 45.



**Рис. 41.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}-OTЦ-ДА\}$  от а) концентрации альгината, б) концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , в) соотношения 2.5 % раствора альгината и 5.0 % раствора кальция при формировании гидрогелей.

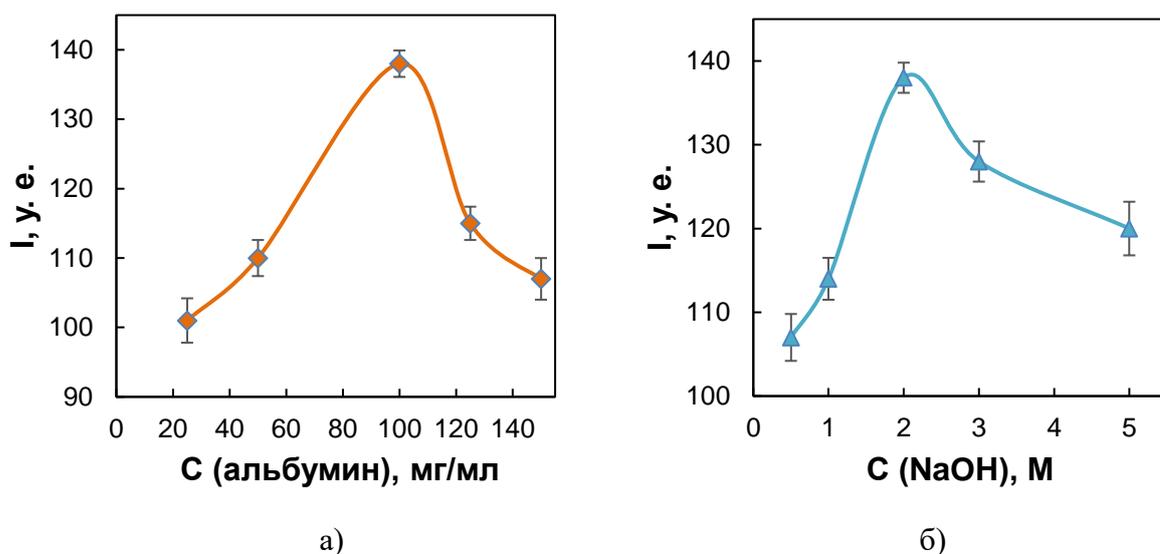
**Таблица 44.** Выбранные условия определения НМ по реакции комплексообразования с ионом европия и ОТЦ в альгинатном гидрогеле.

С(альгината), %	2.5
С (Ca <sup>2+</sup> ), %	5.0
Порядок смешения	Раствор альгината, раствор соли европия, раствор ОТЦ, раствор НМ, раствор соли Ca <sup>2+</sup>
Соотношение V (альгината) : V (Ca <sup>2+</sup> )	140 : 10
С(Eu <sup>3+</sup> ), мМ	0.1
С(ОТЦ), мМ	0.1
Время инкубирования, мин	10
Температура инкубирования, °С	37
$\lambda_{ex}$ , нМ	416
$\lambda_{em}$ , нМ	617

**Таблица 45.** Метрологические характеристики методик определения НМ по реакции комплексообразования с ионом европия и ОТЦ в альгинатном гидрогеле (P = 0.95, n = 4).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	С <sub>мин</sub> , пМ	КК, r	s <sub>r</sub> (при с <sub>n</sub> )
ДА	$(4.1 \pm 0.3) \times 10^9 c + (183 \pm 1)$	500 – 5000	300	0.991	0.01
АД	$(4.8 \pm 0.5) \times 10^{11} c + (159 \pm 2)$	5 – 50	2	0.988	0.01
НА	$(3.9 \pm 0.3) \times 10^{11} c + (156 \pm 1)$	5 – 50	3	0.987	0.01

Следующей матрицей для создания геля стал альбумин. Концентрации компонентов альбуминового гидрогеля (альбумина и гидроксида натрия) подбирали на основе литературных данных [379] на примере определения ДА (рис. 42). При выборе концентрации комплекса, наиболее подходящей, как и ранее, оказалась концентрация 0.1 мМ. В результате подобрали наиболее подходящие условия для формирования тройного комплекса {Eu<sup>3+</sup>–ОТЦ–НМ} (табл. 46) и разработали методики определения НМ в альбуминовом гидрогеле (методика 18) с метрологическими характеристиками, представленными в табл. 47.



**Рис. 42.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  от а) концентрации альбумина, б) концентрации NaOH при формировании гидрогелей.

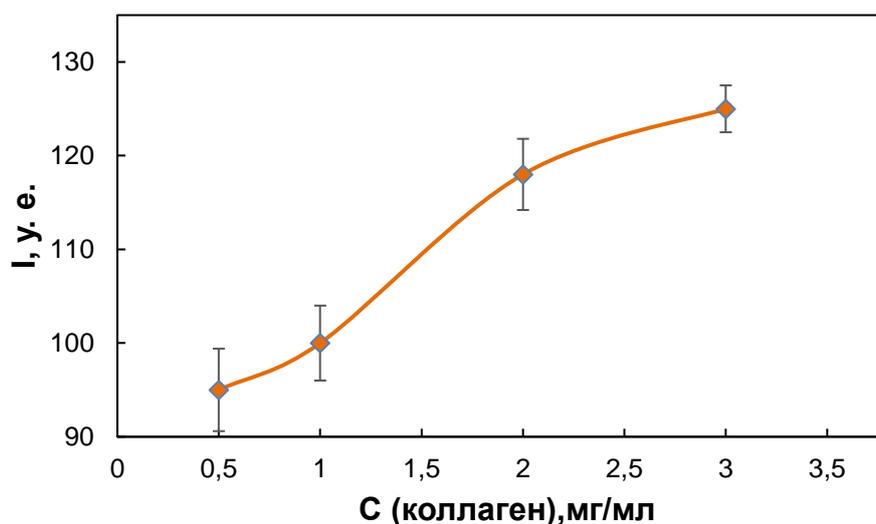
**Таблица 46.** Выбранные условия определения НМ по реакции комплексообразования с ионом европия и ОТЦ в альбуминовом гидрогеле.

С(альбумина), мг/мл	100
С (NaOH), М	2.0
Порядок смешения	Раствор альбумина, раствор соли европия, раствор ОТЦ, раствор НМ, раствор NaOH
С( $Eu^{3+}$ ), мМ	0.1
С(ОТЦ), мМ	0.1
Время инкубирования, мин	10
Температура инкубирования, °С	37
$\lambda_{ex}$ , нМ	416
$\lambda_{em}$ , нМ	617

**Таблица 47.** Метрологические характеристики методик определения НМ по реакции комплексообразования с ионом европия и ОТЦ в альбуминовом гидрогеле ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	$c_{\text{мин}}$ , пМ	КК, r	$s_r$ (при $c_H$ )
ДА	$(4.5 \pm 0.4) \times 10^9 c + (108 \pm 1)$	500 – 5000	280	0.987	0.010
АД	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{10} c + (110 \pm 2)$	10 – 100	65	0.984	0.010
НА	$(3.5 \pm 0.3) \times 10^{11} c + (98 \pm 1)$	5 – 50	3	0.981	0.011

Наиболее распространенной средой для выращивания клеток, особенно нервных, является коллаген. При создании коллагенового гидрогеля за основу взяли коммерческую методику [390], изучив влияние концентрации коллагена на интенсивность флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ}\}$  на примере определения ДА (рис. 43). Дальнейшее увеличение концентрации коллагена оказалось невозможным по причине его низкой растворимости в 0.1 М уксусной кислоте, поэтому наиболее подходящим стал раствор коллагена с концентрацией 3 мг/мл. Основными характеристиками коллагенового геля при его формировании являются концентрация коллагена, состав и pH реконструирующего буферного раствора, соотношение растворов коллагена, реконструирующего буферного раствора и компонентов реакции, порядок смешения, время и температура инкубирования микропланшета с гелем. При варьировании концентрации комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ}\}$ , наилучшей также оказалась концентрация 0.1 мМ. В результате были подобраны условия для формирования тройного комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ}\}$  (табл. 48) и разработаны методики определения НМ в коллагеновом гидрогеле (методика 19) с метрологическими характеристиками, представленными в табл. 49.



**Рис. 43.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  от концентрации коллагена при формировании гидрогелей.

**Таблица 48.** Выбранные условия определения НМ по реакции образования ими комплексов с ионом европия и ОТЦ в коллагеновом гидрогеле.

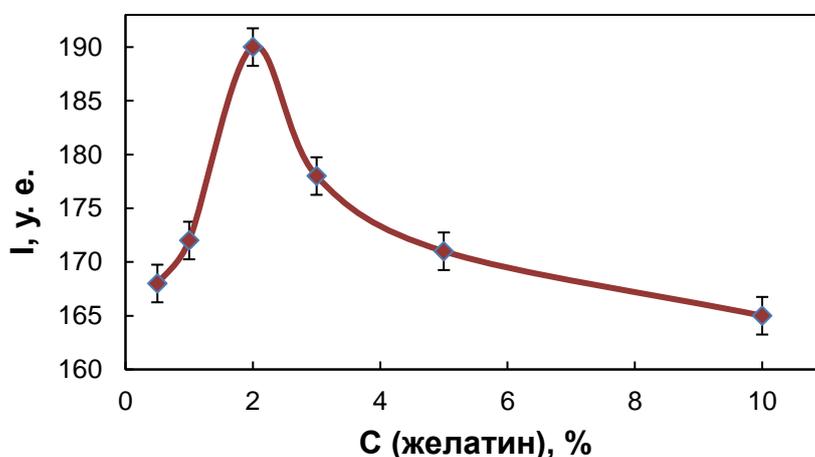
С(коллагена), мг/мл	3.0
Реконструирующий буферный раствор	NaOH 0.05 M, NaHCO <sub>3</sub> 0.26 M, HEPES 0.2 M
Соотношение объемов раствора коллагена, реконструирующего буфера, и комплекса $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ}\}$	8 : 1 : 1
Порядок смешения	Раствор коллагена, раствор соли европия, раствор ОТЦ, раствор НМ, реконструирующий буфер
С(Eu <sup>3+</sup> ), мМ	0.1
С(ОТЦ), мМ	0.1
Время инкубирования, мин	20
Температура инкубирования, °С	37
$\lambda_{ex}$ , нМ	416
$\lambda_{em}$ , нМ	617

**Таблица 49.** Метрологические характеристики методик определения НМ по реакции образования ими комплексов с ионом европия и ОТЦ в коллагеновом гидрогеле ( $P = 0.95$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	$c_{\text{мин}}$ , пМ	КК, г	$s_r$ (при $c_H$ )
ДА	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^{10} c + (68 \pm 1)$	100 – 1000	60	0.986	0.030
АД	$(7.1 \pm 0.7) \times 10^{10} c + (64 \pm 2)$	50 – 500	25	0.979	0.044
НА	$(3.6 \pm 0.3) \times 10^{10} c + (64 \pm 2)$	100 – 1000	70	0.983	0.037

Более доступной альтернативой коллагену является желатин. Для создания гидрогелевой структуры с целью определения НМ мы варьировали концентрацию желатина, порядок смешения, время инкубирования содержимого ячеек микропланшета и концентрацию комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ}\}$  (она совпала с вышеописанными – 0.1 мМ) на примере определения ДА (табл. 50).

Концентрацию желатина варьировали от 0.5 до 10.0 %. В результате установили, что тройной комплекс  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  формировался и давал наиболее интенсивный сигнал в 2.0 % растворе желатина (рис. 44).



**Рис. 44.** Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-ДА}\}$  от концентрации желатина при формировании гидрогелей.

В результате подобрали наиболее подходящие условия для формирования тройного комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-НМ}\}$  (табл. 50) и разработали методики определения НМ в желатиновом гидрогеле (методика 20) с метрологическими характеристиками, представленными в табл. 51.

**Таблица 50.** Выбранные условия определения НМ по реакции образования ими комплексов с ионом европия и ОТЦ в желатиновом гидрогеле.

С(желатина), %	2.0
Порядок смешения	Раствор желатина, раствор соли европия, раствор ОТЦ, раствор НМ
С(Eu <sup>3+</sup> ), мМ	0.1
С(ОТЦ), мМ	0.1
Время инкубирования, мин	10
Температура инкубирования, °С	37
$\lambda_{ex}$ , нМ	416
$\lambda_{em}$ , нМ	617

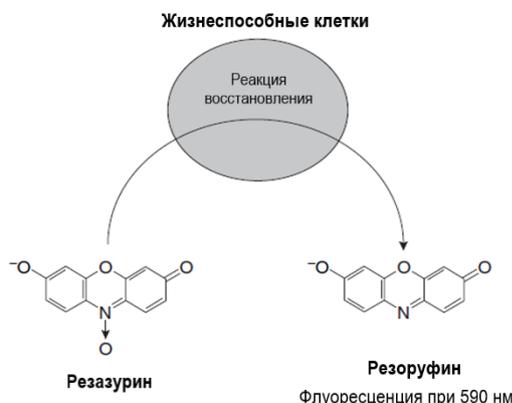
**Таблица 51.** Метрологические характеристики методик определения НМ по реакции комплексообразования с ионом европия и ОТЦ в желатиновом гидрогеле (P = 0.95, n = 4).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	$c_{мин}$ , пМ	КК, r	$s_r$ (при $c_n$ )
ДА	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^9 c + (160 \pm 1)$	500 – 5000	210	0.987	0.010
АД	$(7.2 \pm 0.9) \times 10^9 c + (142 \pm 1)$	100 – 500	30	0.983	0.012
НА	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{10} c + (153 \pm 1)$	100 – 500	50	0.982	0.015

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее подходящими матрицами для клеток в разработанных вариантах определения НМ в гидрогелевых структурах являются альгинатный и коллагеновый гидрогели. Это связано с тем, что желатиновый гель имеет очень плотную структуру, не слишком подходящую для благоприятного роста и жизнеспособности клеток, а альбуминовый гидрогель имеет в составе щелочь и без промывки его использование для роста клеток также нежелательно. Однако результаты, полученные в коллагеновом гидрогеле, имеют более низкую воспроизводимость ( $s_r$  0.030 – 0.044), чем в альгинатном гидрогеле ( $s_r$  0.01), поэтому необходимо было разработать методику, комбинирующую хорошую воспроизводимость результатов измерений в альгинатном геле, и наибольшую совместимость коллагена по структуре с живыми клеточными системами.

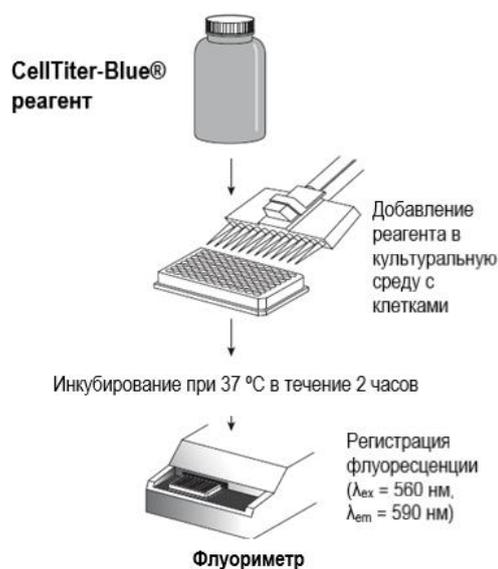
В дальнейшем мы апробировали разработанные подходы на примере определения ДА в клеточной линии РС12, выращиваемой в коллагеновом гидрогеле. Клетки РС 12 клонируются из феохромоцитомы – опухоли хромоаффинной ткани надпочечников, и схожи по способности синтезировать, накапливать и секретировать нейромедиаторы с хромоаффинным клеткам. Их используют в качестве модельных структур для изучения различных процессов в жизнедеятельности клеток.

Для начала изучили токсичность компонентов индикаторной реакции на клетки РС12. Изначально при разработке методик определения НМ в гидрогелях пришлось отказаться от ТВИН 80, поскольку имеются литературные сведения, свидетельствующие о том, что все ПАВ разрушают клеточные мембраны [391]. Жизнеспособность клеток определяли с помощью флуориметрического метода «CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega)» [392]. Он основан на определении жизнеспособности клеток по флуоресценции восстановленной формы индикаторного красителя резазурина (резорубина). Жизнеспособные клетки сохраняют способность восстанавливать резазурин, который имеет очень слабую собственную флуоресценцию и максимум поглощения при  $\lambda_{\text{max}} = 605$  нм, до резорубина, имеющего сильную флуоресценцию при  $\lambda_{\text{ex}} = 579$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 584$  нм и максимум поглощения при  $\lambda_{\text{max}} = 573$  нм (рис. 45). Нежизнеспособные клетки быстро теряют метаболическую способность, как следствие, не восстанавливают индикаторный краситель и, таким образом, не генерируют флуоресцентный сигнал. Получаемая интенсивность флуоресценции пропорциональна числу жизнеспособных клеток.



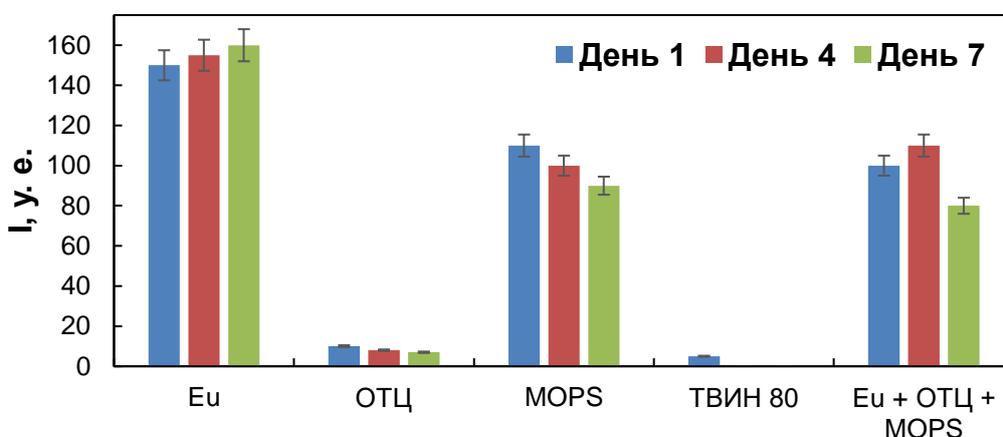
**Рис. 45.** Преобразование резазурина в резорубин жизнеспособными клетками.

Токсичность компонентов индикаторной реакции контролировали следующим образом. Клетки РС12 высевали в чашку Петри диаметром 10 см с плотностью  $1.0 \times 10^6$  клеток в культуральной среде (DMEM, 10 % фосфатный буферный раствор и 1 % раствор пенициллин-стрептомицина). Культуральную жидкость заменяли каждые 2 дня. Через 5 дней выращенные клетки помещали в ячейки 96-луночного полистирольного микропланшета. Жизнеспособность клеток проверяли в 1-й, 4-й и 7-й день. Для контроля строили градуировочную зависимость сигнала от количества клеток. Помещали в каждую лунку по 0, 5000, 10000, 15000, 20000 клеток. Далее исследовали образцы с 10000 клеток в ячейке. Для проверки жизнеспособности выполняли следующие операции: добавляли в каждую лунку по 100 мкл среды, которая содержит реагент 0.1 мМ раствор  $\text{Eu}^{3+}$ , или 0.1 мМ раствор ОТЦ, или 0.01 М MOPS, или 0.01 М ТВИН 80 по отдельности, или  $\text{Eu}^{3+}$ , ОТЦ и MOPS вместе. Инкубировали микропланшет с клетками при 37 °С в течение 30 минут, удаляли среду и добавляли по 80 мкл новой культуральной жидкости и 20 мкл CellTiter-Blue®. Затем инкубировали микропланшет при 37 °С в течение 2 часов, переносили полученную смесь в другой 96-луночный микропланшет и измеряли флуоресценцию ( $\lambda_{\text{ex}} = 560$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 590$  нм) с помощью флуориметра с планшетной приставкой (рис. 61).



**Рис. 46.** Определение количества жизнеспособных клеток при проверке токсичности.

При исследовании воздействия компонентов индикаторной реакции по отдельности и в совокупности было подтверждено резко негативное влияние ТВИН 80 на жизнеспособность клеток. Следующим по силе негативного воздействия на жизнеспособность клеток был ОТЦ, однако при формировании комплекса с европием это влияние практически полностью нивелировалось (рис. 47). Поэтому в целом использование системы на основе комплекса  $\{Eu^{3+}-ОТЦ\}$  для определения дофамина в этом типе клеточных структур возможно, так как жизнеспособность клеток сохраняется в течение 7 дней, а этого достаточно для отслеживания протекающих процессов в клеточной среде.



**Рис. 47.** Исследование токсичности компонентов индикаторной реакции ( $Eu^{3+}$ , ОТЦ, MOPS, ТВИН 80 и  $Eu^{3+} + ОТЦ + MOPS$ ) на жизнеспособность клеток РС12.

Тем не менее полученные результаты свидетельствуют о том, что жизнеспособность нервных клеток на 7-й день снижается и для повышения их жизнеспособности, необходимо комплекс  $\{Eu^{3+}-ОТЦ\}$  инкапсулировать, чтобы отделить от гидрогеля с клеточными культурами, а также, чтобы улучшить метрологические характеристики методики определения ДА в коллагеновом геле. Для этого мы разработали методику 21, комбинирующую альгинатный и коллагеновый гидрогели – в альгинатном гидрогеле иммобилизовали комплекс  $\{Eu^{3+}-ОТЦ\}$ , а в коллагеновый гидрогель поместили ДА (или нервные клетки, выделяющие ДА) (табл. 52) с метрологическими характеристиками, представленными в табл. 53. Альгинат биосовместим с различными клеточными культурами, а также показал хорошие метрологические характеристики при разработке методик определения НМ в альгинатном гидрогеле (табл. 45). Условия

подбирали на основе разработанных методик, описанных ранее в этой главе, и таким образом, чтобы в них сохранялась жизнеспособность клеток.

**Таблица 52.** Выбранные условия определения ДА в коллагеновом гидрогеле по реакции комплексообразования с комплексом  $\{Eu^{3+}-OTC\}$ , иммобилизованным в альгинатном гидрогеле.

С(альгината), %	2.5
С ( $Ca^{2+}$ ), %	5.0
Порядок смешения	Раствор соли европия, раствор ОТС, раствор альгината, раствор соли $Ca^{2+}$
Соотношение V (альгината) : V ( $Ca^{2+}$ )	30 : 5
Время инкубирования альгинатного гидрогеля, мин	10
Температура инкубирования, °С	25
С( $Eu^{3+}$ ), мМ	0.1
С(ОТС), мМ	0.1
С(коллагена), мг/мл	3.0
Реконструирующий буферный раствор	NaOH 0.05 М, $NaHCO_3$ 0.26 М, HEPES 0.2 М
Соотношение объемов раствора коллагена, реконструирующего буфера, ДА	8 : 1 : 1
Порядок смешения	Раствор коллагена, раствор ДА, реконструирующий буфер
Время инкубирования системы, мин	20
Температура инкубирования, °С	37
$\lambda_{ex}$ , нМ	416
$\lambda_{em}$ , нМ	617

**Таблица 53.** Метрологические характеристики методики определения ДА в коллагеновом гидрогеле по реакции комплексообразования с комплексом  $\{Eu^{3+}-OTC\}$ , иммобилизованным в альгинатном гидрогеле ( $P = 0.95, n = 4$ ).

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	ДОС, пМ	$c_{мин}$ , пМ	КК, r	$s_r$ (при $c_n$ )
ДА	$(4.6 \pm 0.4) \times 10^{10} c + (52 \pm 1)$	100 – 500	26	0.991	0.020

В результате проведенных исследований удалось добиться улучшения воспроизводимости определения ДА по сравнению с определением в коллагеновом гидрогеле на 1 % и снижения предела его обнаружения до 26 пМ (в альгинатном гидрогеле – 300 пМ, в коллагеновом гидрогеле – 60 пМ). Разработанная методика была апробирована при определении ДА в клетках РС12 феохромоцитомы крысы.

Таким образом, нами разработана новая индикаторная система для определения нейромедиаторов и их метаболитов с использованием их флуоресцирующих комплексов с европием и окситетрациклином. Разработанные твердофазные флуоресцентные методики на основе пленок и гелей биополимеров обладают высокой чувствительностью, требуемой для диагностики нейродегенеративных заболеваний, воспроизводимостью, селективностью на фоне матричных компонентов биологических объектов и экспрессностью и могут быть в дальнейшем использованы для диагностики ранних патологических изменений свойств клеток в целях прогностики, ранней диагностики и лечения социально-значимых заболеваний (болезней Альцгеймера, Паркинсона, сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых видов онкологии и пр.).

## Заключение

Предложены два новых подхода к определению методом флуоресцентной спектроскопии нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах. Первый, комплексный, подход основан на образовании интенсивно флуоресцирующих дериватизатов аналитов, полученных при взаимодействии продуктов их пероксидазного окисления с ароматическими аминами (*1,2*-дифенилэтилендиамином или бензиламином). Подход сочетает иммобилизацию биокатализатора в пленке хитозана в ячейках 96-луночного полистирольного микропланшета, направленное варьирование природы дериватирующего агента и спектральных характеристик возбуждающего и испускаемого излучения, а также применение производной спектроскопии 1-го порядка. Такой подход обеспечивает мультиплексное, селективное, чувствительное, воспроизводимое и экспрессное определение нейромедиаторов и их метаболитов в биообъектах. Разработанные методики позволяют определять маркеры нейромедиаторного обмена на уровне их референсных концентраций в моче здоровых людей; они пригодны для использования в диагностике **нейроэндокринных** опухолевых заболеваний.

Другой подход заключается в получении интенсивно флуоресцирующих тройных комплексов нейромедиаторов и их метаболитов с европием(III) и ОТЦ, иммобилизованных в пленках хитозана, альгината и желатина, а также в гидрогелевых структурах альгината, альбумина, желатина и коллагена. Он позволяет чувствительно, экспрессно и селективно определять нейромедиаторы и их метаболиты в биологических объектах на уровне референсных концентраций в крови и клетках здоровых людей и диагностировать **нейродегенеративные** заболевания. Разработанные подходы успешно апробированы в анализе реальных объектов: моче здоровых людей, плазме крови мышей и крыс, в раковых и нервных клетках.

## Выводы

1. Для чувствительного, селективного, экспрессного и мультиплексного определения маркеров нейромедиаторного обмена предложен комплексный подход, заключающийся в стабилизации компонентов индикаторной реакции получения интенсивно флуоресцирующих производных аналитов в пленке хитозана в ячейках 96-луночного микропланшета, направленном варьировании природы дериватирующего агента (ароматического амина) и спектральных характеристик возбуждающего ( $\lambda_{ex} = 305 - 356$  нм) и испускаемого излучения ( $\lambda_{em} = 420 - 480$  нм), а также на применении производной спектроскопии 1-го порядка.
2. Разработаны флуоресцентные методики определения дофамина, эpineфрина, норэpineфрина, серотонина, *L*-диоксифенилаланина, норметанефрина, 5-гидроксииндолуксусной, гомованилиновой и ванилилминдальной кислот с ДОС – 0.005 – 7.5 мкМ, ПО – 0.003 – 0.2 мкМ в твердофазном варианте; методики апробированы в анализе мочи здорового человека, плазмы крови мышей, раковых клеток кишечника человека и нейронов ганглий пиявок.
3. Предложена твердофазная индикаторная система, основанная на образовании интенсивно флуоресцирующих в длинноволновой области спектра ( $\lambda_{em} = 617$  нм) комплексов нейромедиаторов и их метаболитов с европием(III) и окситетрациклином. Установленная высокая устойчивость полученных тройных комплексов  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ-нейромедиатор/метаболит}\}$  ( $\beta (1.1 - 1.9) \cdot 10^6$ ) свидетельствует о том, что возможно их использование для определения нейромедиаторов и их метаболитов в биообъектах.
4. Разработаны методики иммобилизации комплекса  $\{Eu^{3+}\text{-ОТЦ}\}$  в пленках хитозана, альгината и желатина, а также в альгинатном, альбуминовом, желатиновом, коллагеновом гидрогелях в ячейках микропланшета. Наибольшая стабильность комплекса, чувствительность и воспроизводимость результатов определения нейромедиаторов и их метаболитов достигалась в хитозановой пленке. При создании гидрогелей наилучшей оказалась комбинация альгината и коллагена, позволившая повысить чувствительность и воспроизводимость результатов определения аналитов по сравнению с индивидуальными матрицами.

5. Разработаны флуоресцентные методики высокочувствительного, селективного и экспрессного определения нейромедиаторов и их метаболитов в биологических объектах по реакции образования ими тройных комплексов с  $\text{Eu}^{3+}$  и ОТЦ, иммобилизованных в пленках и гидрогелях биополимеров (ДОС – 0.01 – 10000 пМ, ПО – 0.005 – 300 пМ). Предложенные методики апробированы при определении нейромедиаторов и их метаболитов в плазме крови крыс и в клетках РС12 феохромоцитомы крысы.

## **Благодарности**

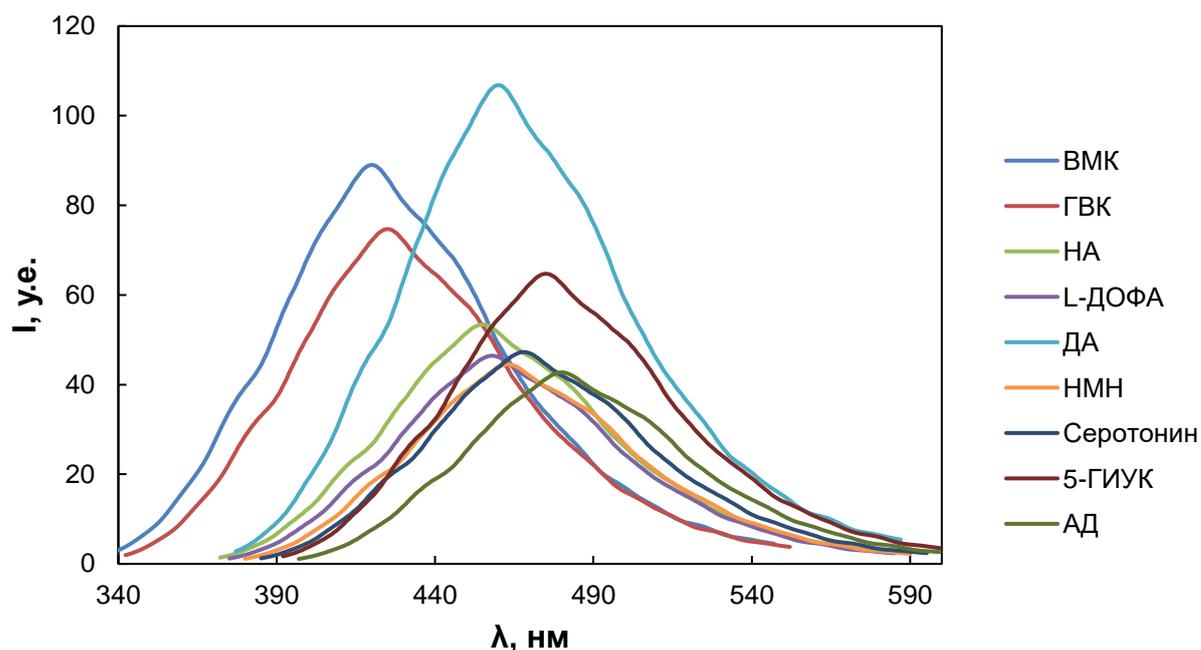
*Автор выражает огромную благодарность своим научным руководителям д.х.н., доц. Веселовой И.А. и д.х.н., проф. Шеховцовой Т.Н. за поддержку в научно-исследовательской деятельности и на жизненном пути.*

*Автор выражает благодарность чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Калмыкову С.Н. за предоставленные образцы крови мышей, д.х.н, проф. Милаевой Е.Р. за предоставленные образцы раковых клеток кишечника человека, к.х.н., м.н.с. Ереминой О.Е. за совместную работу над подготовкой патента и обзорной статьи, ст. 5 курса Михайловой А.М. за помощь в проведении экспериментов, к.б.н., с.н.с. Байжуманову А.А. за предоставленные образцы крови крыс, к.х.н. Мясниковой Д.А. за помощь при исследовании токсичности клеток, Казаковой Т.А. за предоставленные образцы нейронов ганглий пиявок.*

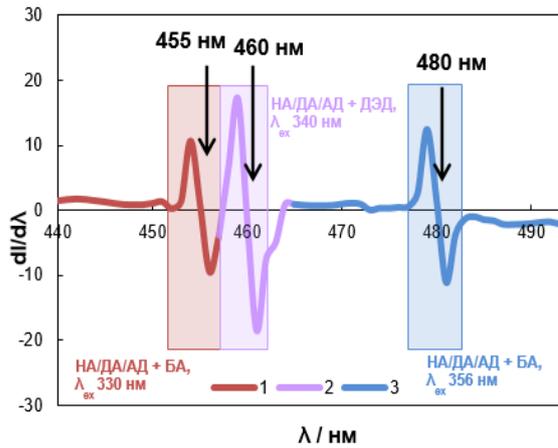
*Особая благодарность родным и близким за неоценимую моральную поддержку и веру в диссертанта.*

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского государственного университета.

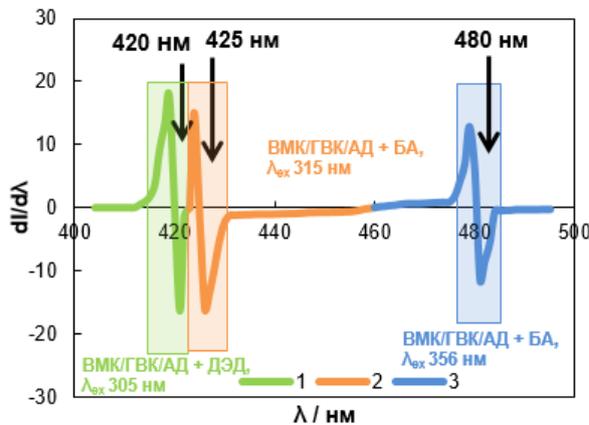
## Приложение



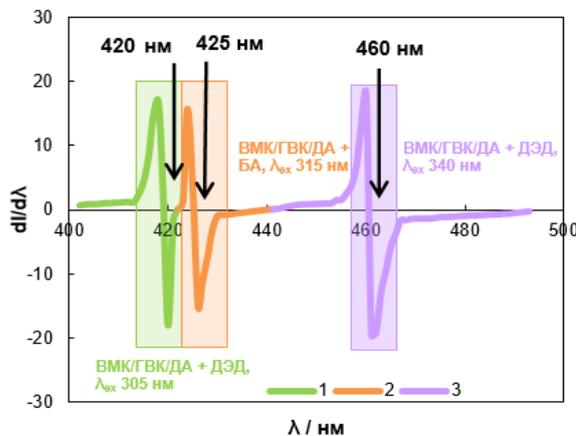
**Рис. 1П.** Спектры флуоресценции дериватизатов нейромедиаторов и их метаболитов. Условия реакций и регистрации аналитического сигнала: растворитель – вода,  $t^{\circ}\text{C} = 25$ ,  $t = 5$  мин,  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.1$  мМ,  $c(\text{ПХ}) = 1.0$  мкМ,  $0.5$  М глицин-КОН pH 8.0,  $c(\text{ДЭД}) = 3$  мМ ( $c(\text{ДА}) = 1$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  нм,  $c(\text{ВМК}) = 1$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 305$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 420$  нм),  $0.1$  М CAPS-КОН pH 11.0,  $c(\text{БА}) = 33$  мМ, ( $c(\text{АД}) = 0.05$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 356$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 480$  нм,  $c(\text{НА}) = 0.1$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 330$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 455$  нм,  $c(\text{ГВК}) = 1$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 315$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 425$  нм,  $c(\text{НМН}) = 0.01$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 463$  нм,  $c(\text{серотонин}) = 1$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 455$  нм  $c(\text{L-ДОФА}) = 0.1$  мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 335$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 458$  нм,  $c(\text{5-ГИУК}) = 0.5$  мкМ),  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 475$  нм).



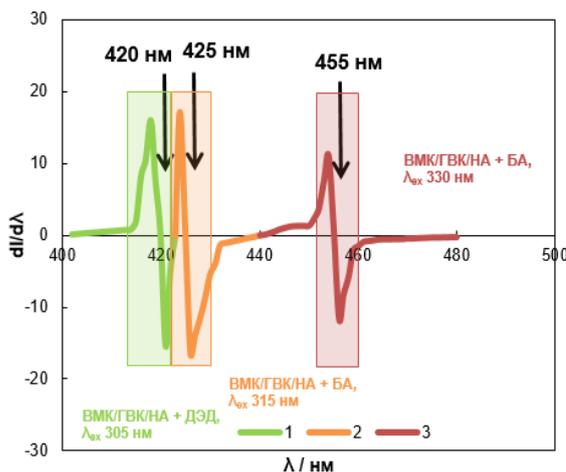
**Рис. 2П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ – НА / ДА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для НА, ДА, АД, соответственно): 1 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 НА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



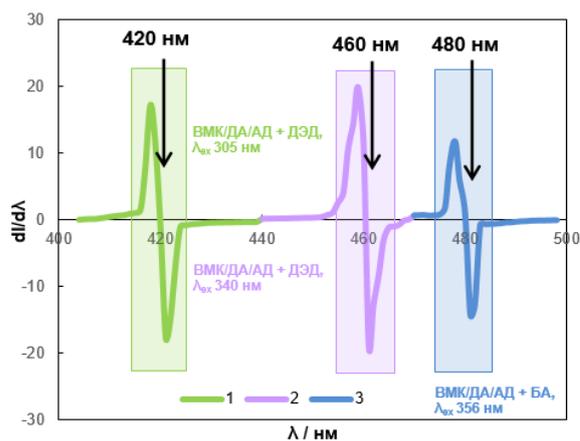
**Рис. 3П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / ГVK / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.05 мкМ для ВМК, ГVK, АД, соответственно): 1 ВМК / ГVK / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ГVK / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 3 ВМК / ГVK / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



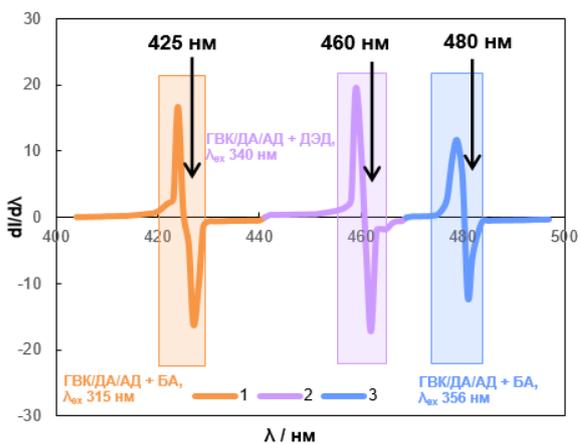
**Рис. 4П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / ГVK / ДА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 1.0 мкМ для ВМК, ГVK, ДА, соответственно): 1 ВМК / ГVK / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ГVK / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 3 ВМК / ГVK / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм.



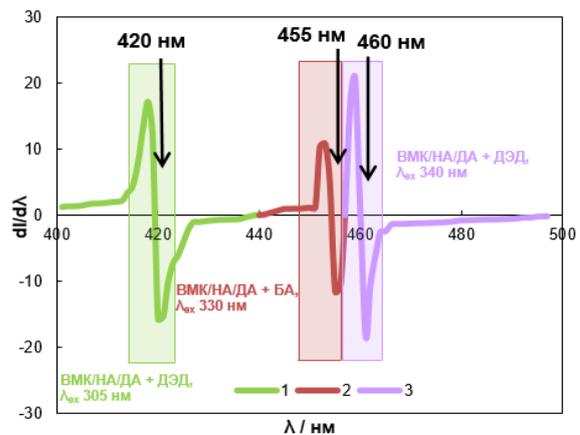
**Рис. 5П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / ГVK / НА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.1 мкМ для ВМК, ГVK, НА, соответственно): 1 ВМК / ГVK / НА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ГVK / НА с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 3 ВМК / ГVK / НА с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм.



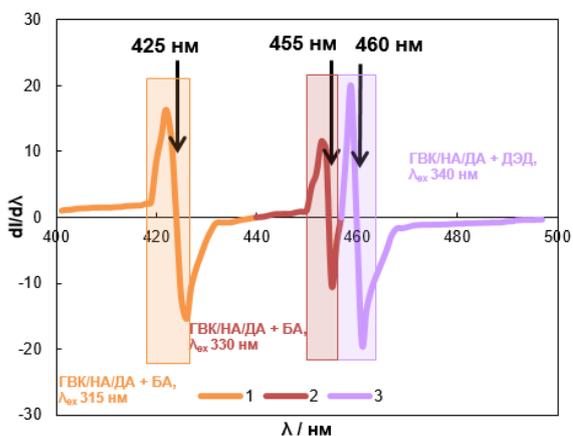
**Рис. 6П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / ДА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.05 мкМ для ВМК, ДА, АД, соответственно): 1 ВМК / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ВМК / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



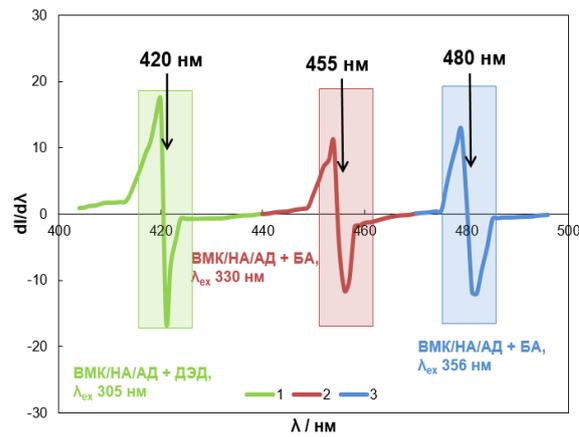
**Рис. 7П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГВК / ДА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.05 мкМ для ГВК, ДА, АД, соответственно): 1 ГВК / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ГВК / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



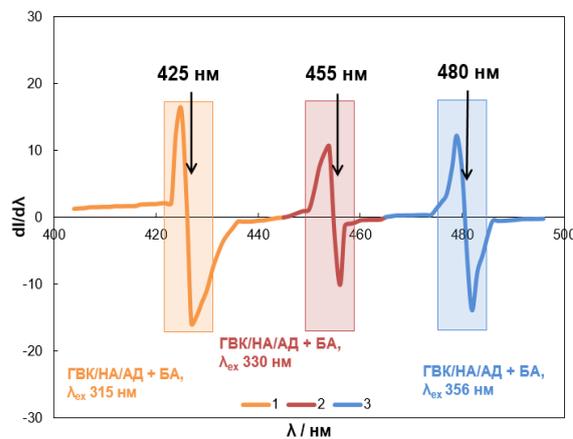
**Рис. 8П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / НА / ДА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ВМК, НА, ДА, соответственно): 1 ВМК / НА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ВМК / НА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм.



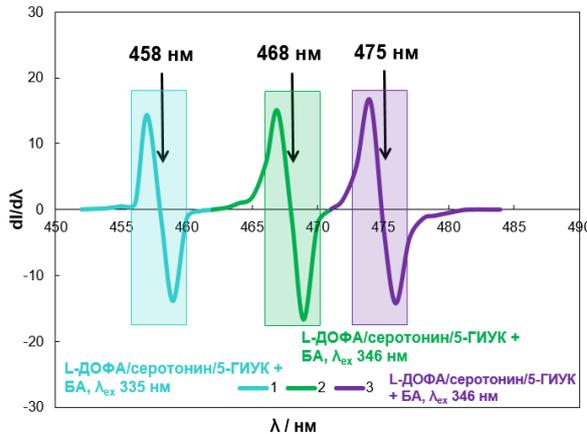
**Рис. 9П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГВК / НА / ДА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ГВК, НА, ДА, соответственно): 1 ГВК / НА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / НА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ГВК / НА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм.



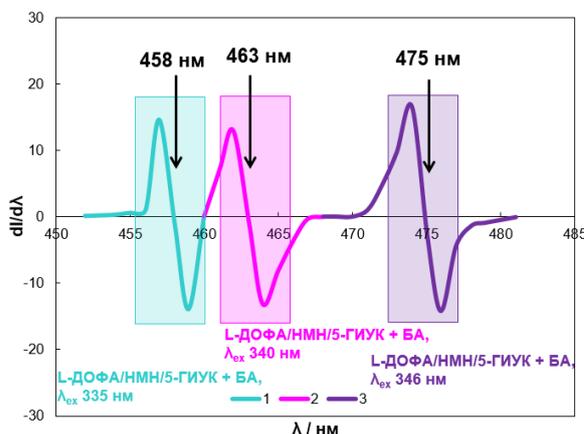
**Рис. 10П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / НА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.05 мкМ для ВМК, НА, АД, соответственно): 1 ВМК / НА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ВМК / НА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



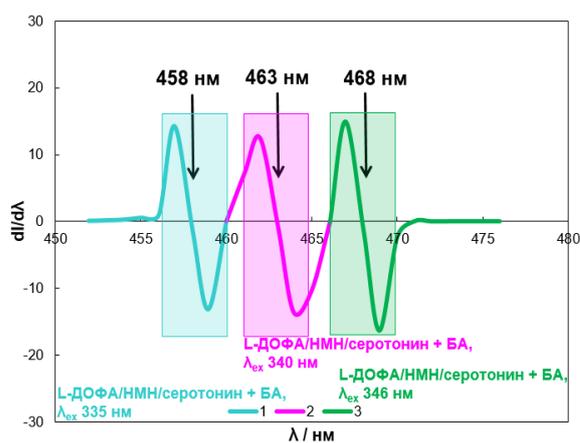
**Рис. 11П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГВК / НА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.05 мкМ для ГВК, НА, АД, соответственно): 1 ГВК / НА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / НА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ГВК / НА / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



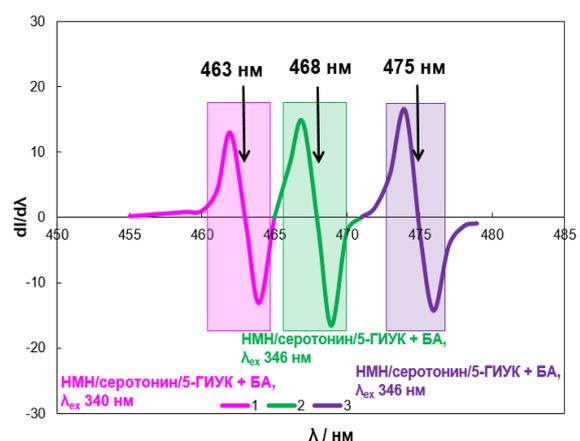
**Рис. 12П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – L-ДОФА / серотонин / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.5 мкМ для L-ДОФА, серотонина, 5-ГИУК, соответственно): 1 L-ДОФА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 2 L-ДОФА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 L-ДОФА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



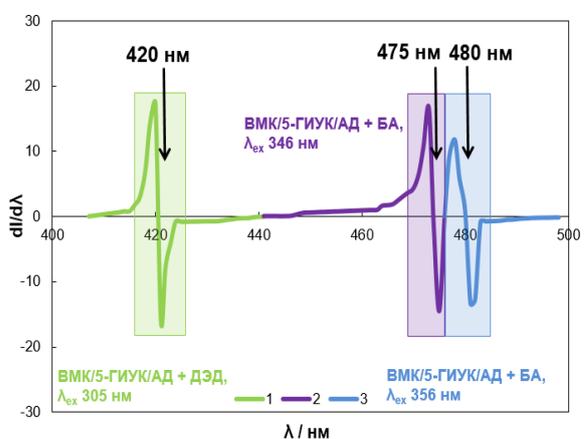
**Рис. 13П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – L-ДОФА / НМН / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.01 и 0.5 мкМ для L-ДОФА, НМН, 5-ГИУК, соответственно): 1 L-ДОФА / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 2 L-ДОФА / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 L-ДОФА / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



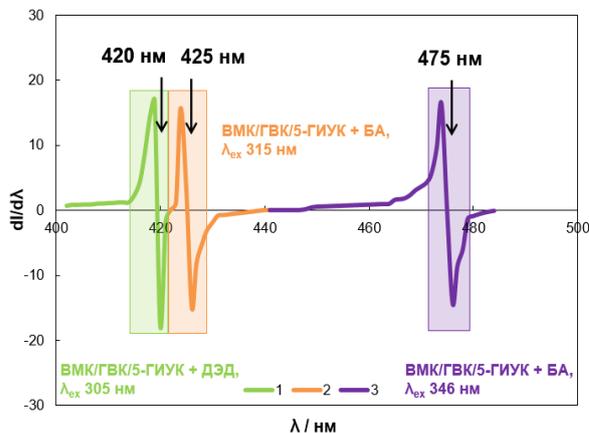
**Рис. 14П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – *L*-ДОФА / НМН / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.01 и 1.0 мкМ для *L*-ДОФА, НМН, серотонина, соответственно): 1 *L*-ДОФА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 2 *L*-ДОФА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 *L*-ДОФА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



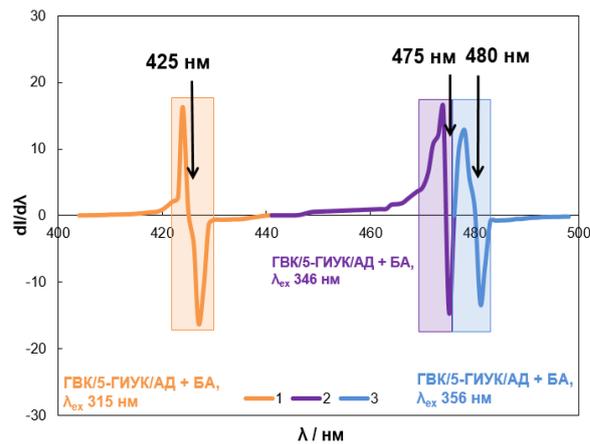
**Рис. 15П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – НМН / серотонин / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (0.01, 1.0 и 0.5 мкМ для НМН, серотонина, 5-ГИУК, соответственно): 1 НМН / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 2 НМН / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 НМН / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



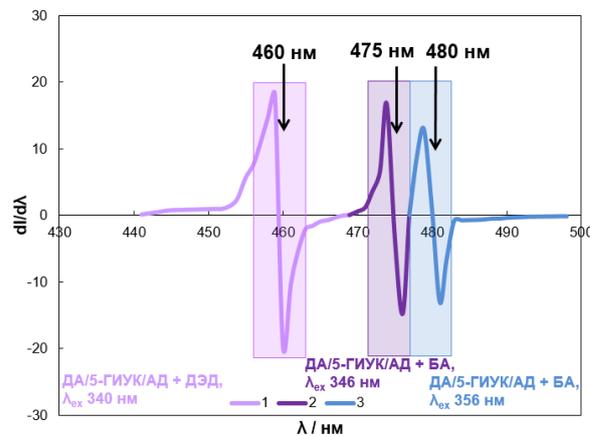
**Рис. 16П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и метаболитов – ВМК / 5-ГИУК / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.5 и 0.05 мкМ для ВМК, 5-ГИУК, АД, соответственно): 1 ВМК / 5-ГИУК / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм; 3 ВМК / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



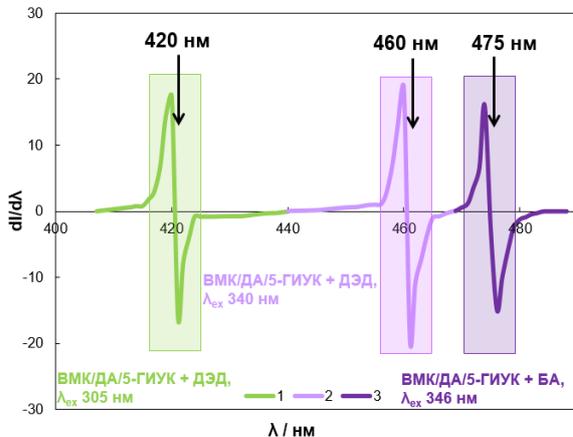
**Рис. 17П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / ГVK / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.5 мкМ для ВМК, ГVK, 5-ГИУК, соответственно): 1 ВМК / ГVK / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ГVK / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 3 ВМК / ГVK / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



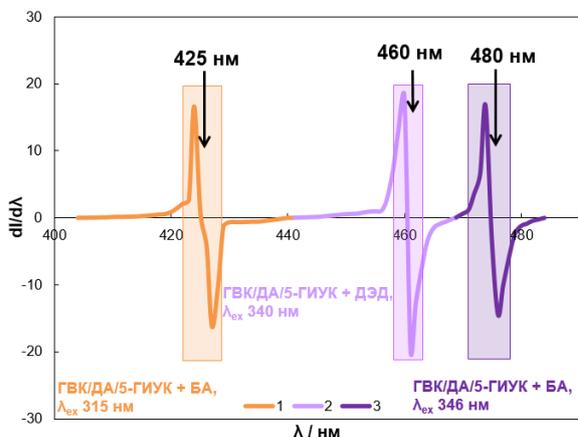
**Рис. 18П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / 5-ГИУК / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.5 и 0.05 мкМ для ГVK, 5-ГИУК, АД, соответственно): 1 ГVK / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм; 3 ГVK / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



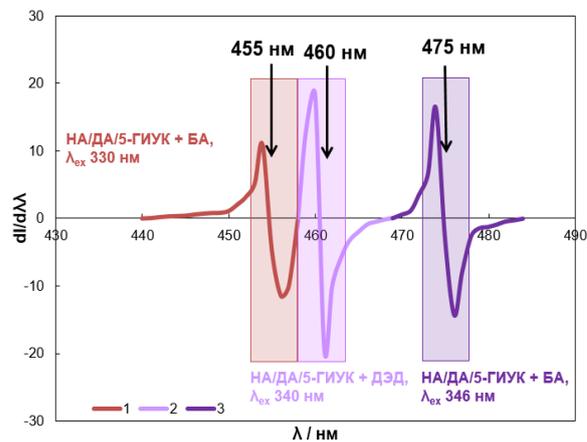
**Рис. 19П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ДА / 5-ГИУК / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.5 и 0.05 мкМ для ДА, 5-ГИУК, АД, соответственно): 1 ДА / 5-ГИУК / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 2 ДА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм; 3 ДА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



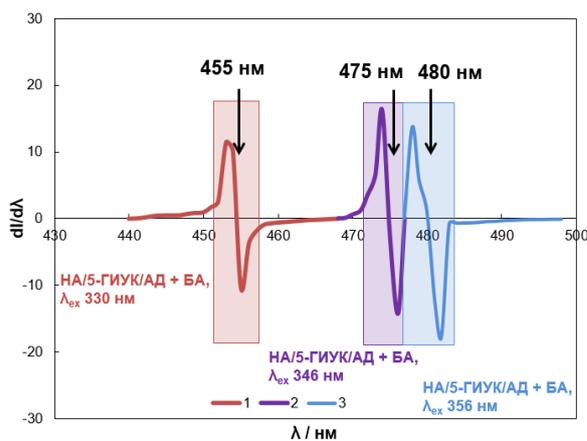
**Рис. 20П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / ДА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.5 мкМ для ВМК, ДА, 5-ГИУК, соответственно): 1 ВМК / ДА / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ДА / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ВМК / ДА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



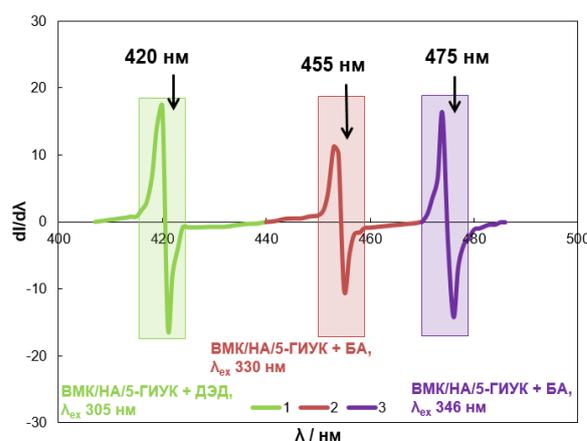
**Рис. 21П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / ДА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.5 мкМ для ГVK, ДА, 5-ГИУК, соответственно): 1 ГVK / ДА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / ДА / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ГVK / ДА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



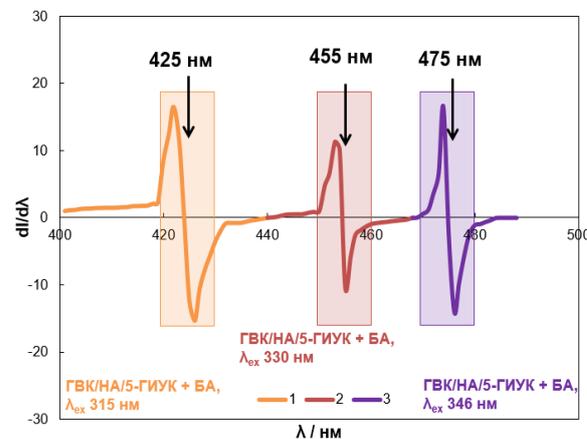
**Рис. 22П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / ДА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.5 мкМ для НА, ДА, 5-ГИУК, соответственно): 1 НА / ДА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / ДА / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 НА / ДА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



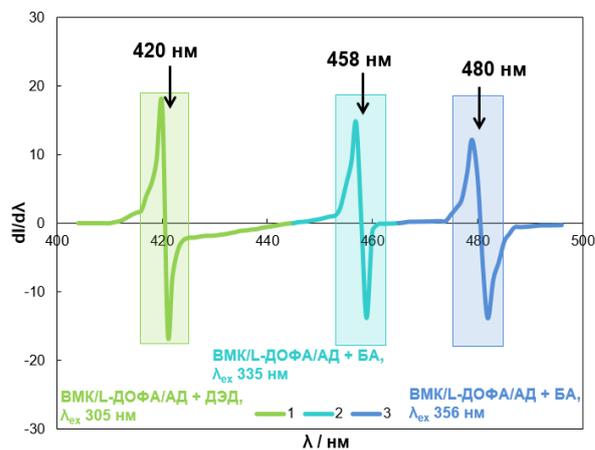
**Рис. 23П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / 5-ГИУК / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.5 и 0.05 мкМ для НА, 5-ГИУК, АД, соответственно): 1 НА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм; 3 НА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



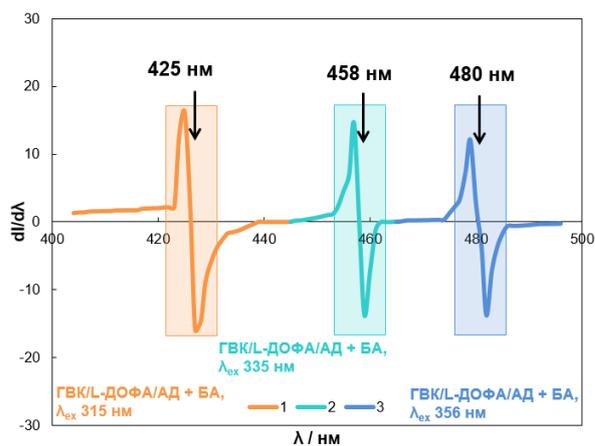
**Рис. 24П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / НА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.5 мкМ для ВМК, НА, 5-ГИУК, соответственно): 1 ВМК / НА / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ВМК / НА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



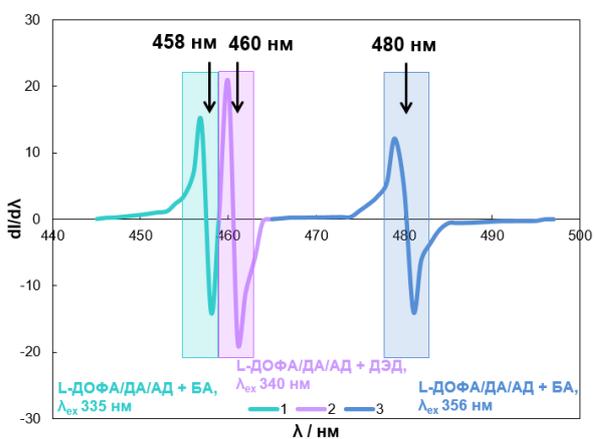
**Рис. 25П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГВК / НА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.5 мкМ для ВМК, НА, 5-ГИУК, соответственно): 1 ГВК / НА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / НА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ГВК / НА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



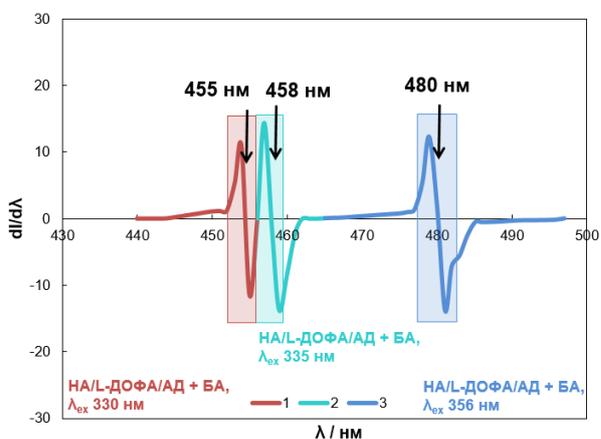
**Рис. 26П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / *L*-ДОФА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.05 мкМ для ВМК, *L*-ДОФА, АД, соответственно): 1 ВМК / *L*-ДОФА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex}$  = 305 нм,  $\lambda_{em}$  = 420 нм; 2 ВМК / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 335 нм,  $\lambda_{em}$  = 458 нм; 3 ВМК / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 356 нм,  $\lambda_{em}$  = 480 нм.



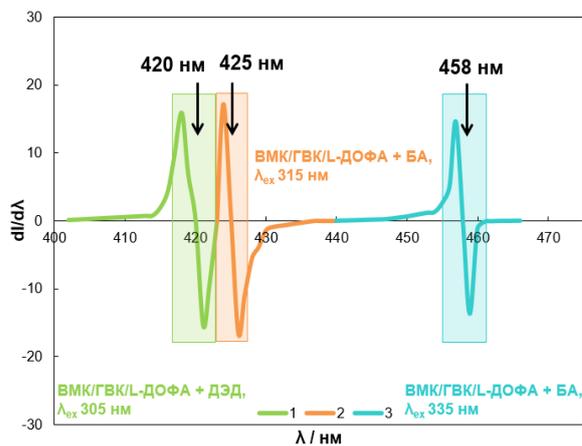
**Рис. 27П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / *L*-ДОФА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.05 мкМ для ГVK, *L*-ДОФА, АД, соответственно): 1 ГVK / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 315 нм,  $\lambda_{em}$  = 425 нм; 2 ГVK / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 335 нм,  $\lambda_{em}$  = 458 нм; 3 ГVK / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 356 нм,  $\lambda_{em}$  = 480 нм.



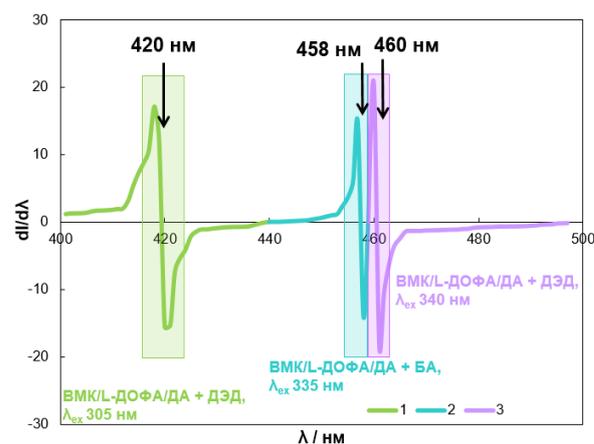
**Рис. 28П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – *L*-ДОФА / ДА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для *L*-ДОФА, ДА, АД, соответственно): 1 *L*-ДОФА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 335 нм,  $\lambda_{em}$  = 458 нм; 2 *L*-ДОФА / ДА / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex}$  = 340 нм,  $\lambda_{em}$  = 460 нм; 3 *L*-ДОФА / ДА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 356 нм,  $\lambda_{em}$  = 480 нм.



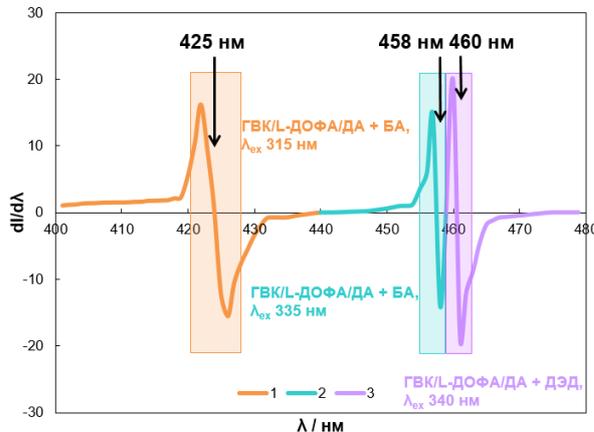
**Рис. 29П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / *L*-ДОФА / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.1 и 0.05 мкМ для НА, *L*-ДОФА, АД, соответственно): 1 НА / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 330 нм,  $\lambda_{em}$  = 455 нм; 2 НА / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 335 нм,  $\lambda_{em}$  = 458 нм; 3 НА / *L*-ДОФА / АД с БА,  $\lambda_{ex}$  = 356 нм,  $\lambda_{em}$  = 480 нм.



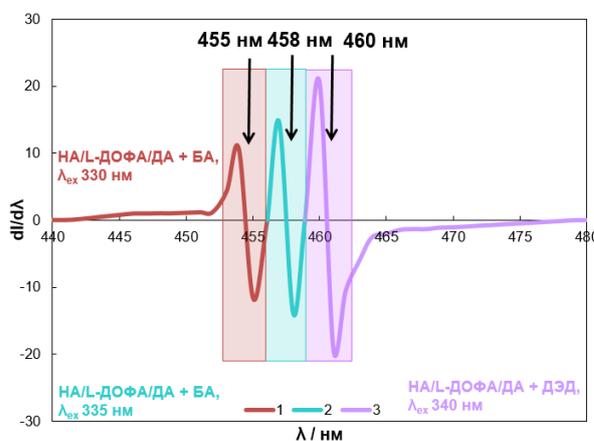
**Рис. 30П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / ГVK / L-ДОФА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.1 мкМ для ВМК, ГVK, L-ДОФА, соответственно): 1 ВМК / ГVK / L-ДОФА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ГVK / L-ДОФА с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 3 ВМК / ГVK / L-ДОФА с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм.



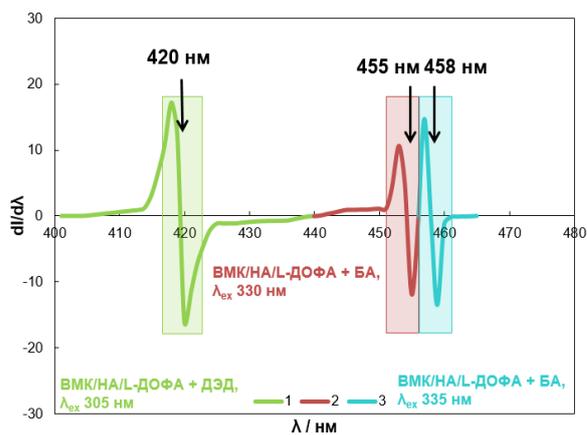
**Рис. 31П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / L-ДОФА / ДА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ВМК, L-ДОФА, ДА, соответственно): 1 ВМК / L-ДОФА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / L-ДОФА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 ВМК / L-ДОФА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм.



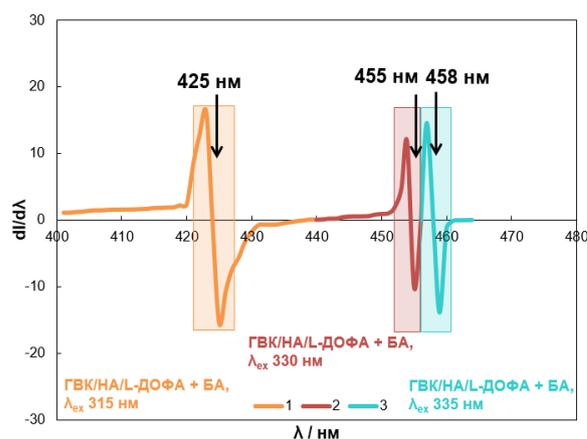
**Рис. 32П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / L-ДОФА / ДА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ГVK, L-ДОФА, ДА, соответственно): 1 ГVK / L-ДОФА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / L-ДОФА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 ГVK / L-ДОФА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм.



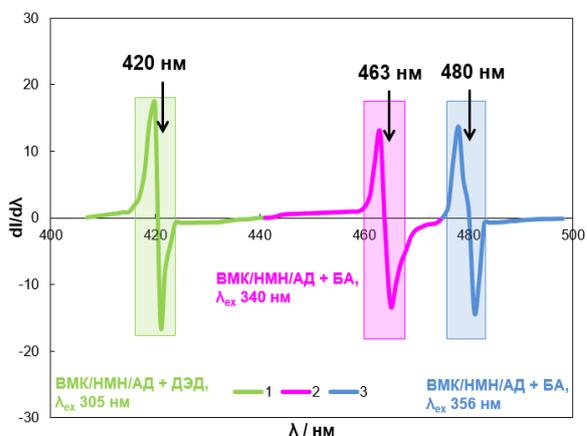
**Рис. 33П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / L-ДОФА / ДА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.1 и 1.0 мкМ для НА, L-ДОФА, ДА, соответственно): 1 НА / L-ДОФА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / L-ДОФА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 НА / L-ДОФА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм.



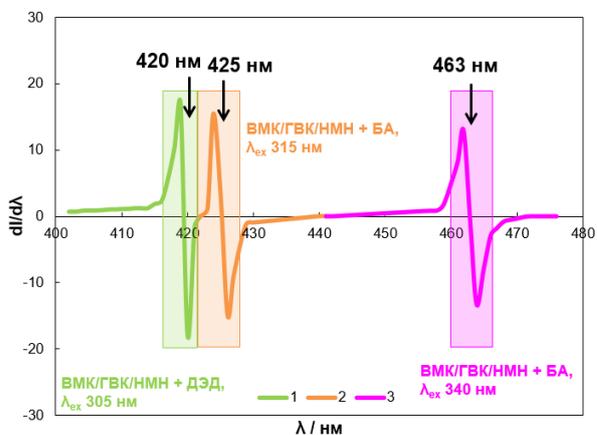
**Рис. 34П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / *L*-ДОФА / ДА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.1 и 1.0 мкМ для НА, *L*-ДОФА, ДА, соответственно): 1 НА / *L*-ДОФА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / *L*-ДОФА / ДА с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 НА / *L*-ДОФА / ДА с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм.



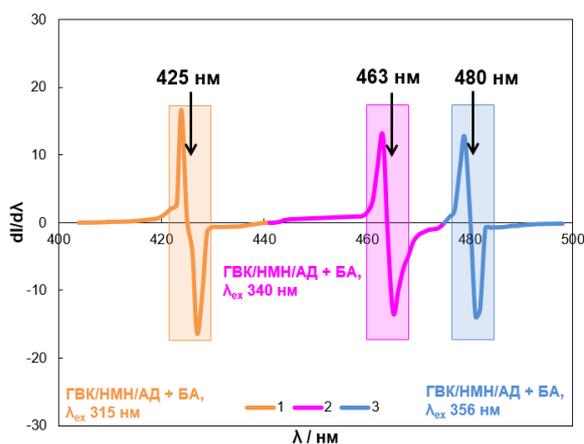
**Рис. 35П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / НА / *L*-ДОФА в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.1 мкМ для ГVK, НА, *L*-ДОФА, соответственно): 1 ГVK / НА / *L*-ДОФА с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / НА / *L*-ДОФА с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ГVK / НА / *L*-ДОФА с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм.



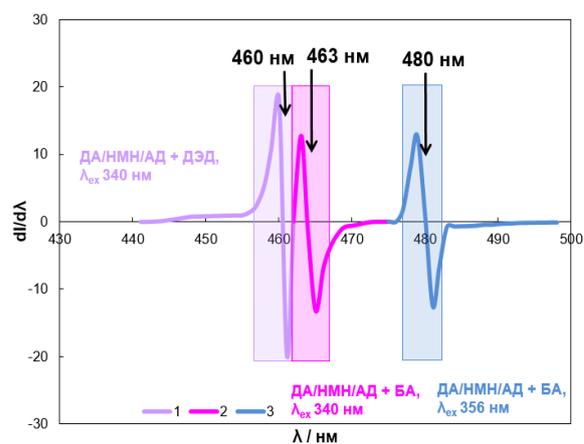
**Рис. 36П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / НМН / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.01 и 0.05 мкМ для ВМК, НМН, АД, соответственно): 1 ВМК / НМН / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ВМК / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



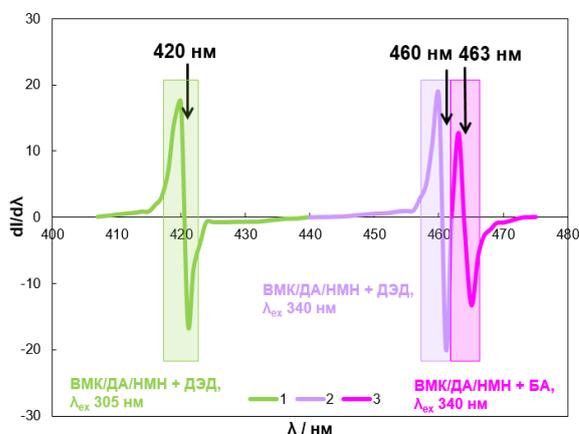
**Рис. 37П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / ГVK / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.01 мкМ для ВМК, ГVK, НМН, соответственно): 1 ВМК / ГVK / НМН с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ГVK / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 3 ВМК / ГVK / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм.



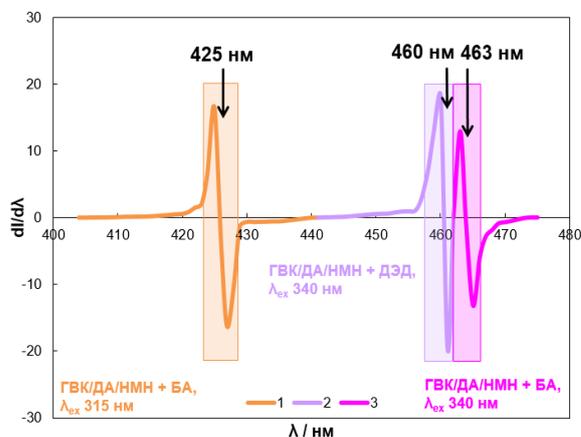
**Рис. 38П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / НМН / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.01 и 0.05 мкМ для ГVK, НМН, АД, соответственно): 1 ГVK / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ГVK / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



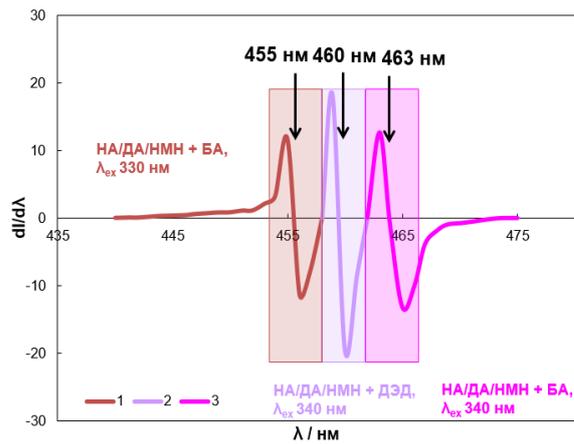
**Рис. 39П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ДА / НМН / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.01 и 0.05 мкМ для ГVK, НМН, АД, соответственно): 1 ДА / НМН / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 2 ДА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ДА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



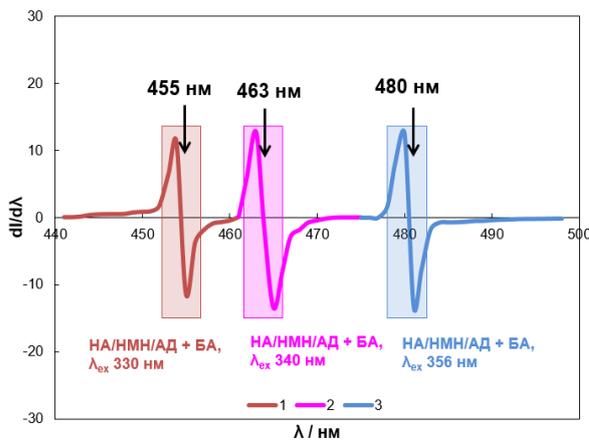
**Рис. 40П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / ДА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.01 мкМ для ВМК, ДА, НМН, соответственно): 1 ВМК / ДА / НМН с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ДА / НМН с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ВМК / ДА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм.



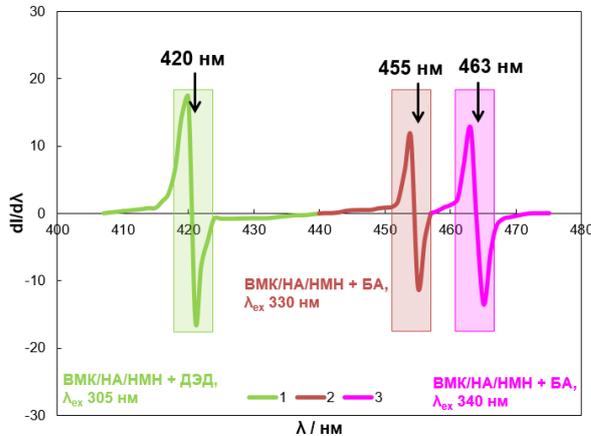
**Рис. 41П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / ДА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.01 мкМ для ГVK, ДА, НМН, соответственно): 1 ГVK / ДА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / ДА / НМН с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ГVK / ДА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм.



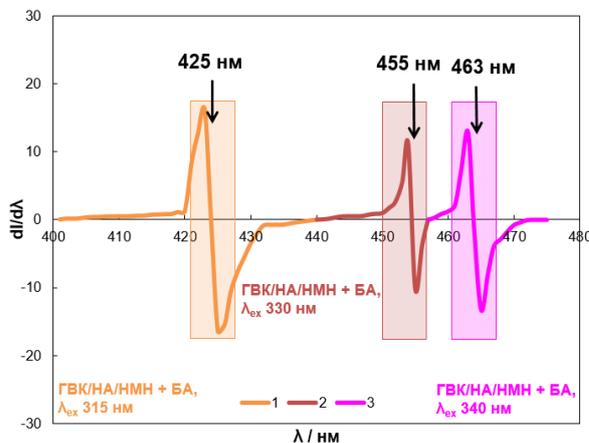
**Рис. 42П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / ДА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.01 мкМ для НА, ДА, НМН, соответственно): 1 НА / ДА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / ДА / НМН с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 НА / ДА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм.



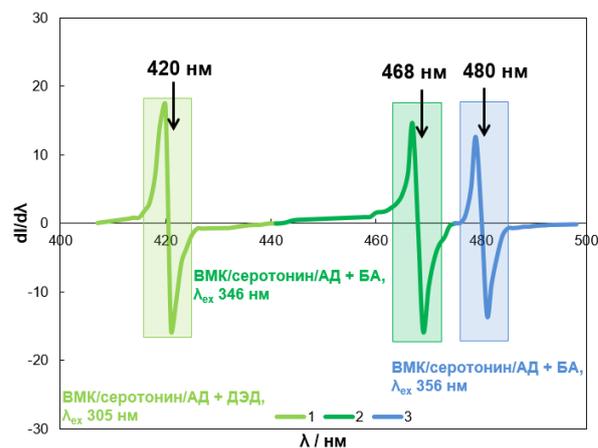
**Рис. 43П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / НМН / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.01 и 0.05 мкМ для НА, НМН, АД, соответственно): 1 НА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 НА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



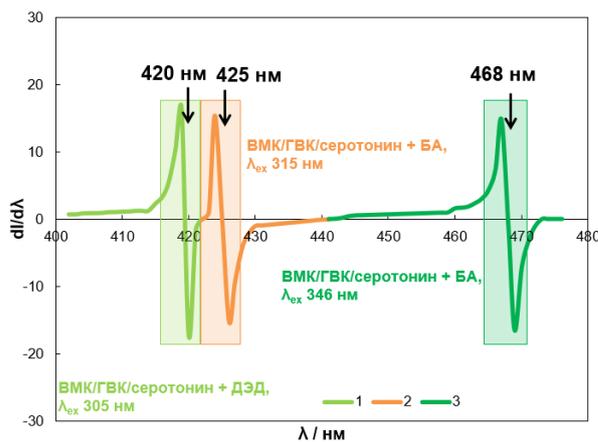
**Рис. 44П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / НА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.01 мкМ для ВМК, НА, НМН, соответственно): 1 ВМК / НА / НМН с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ВМК / НА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм.



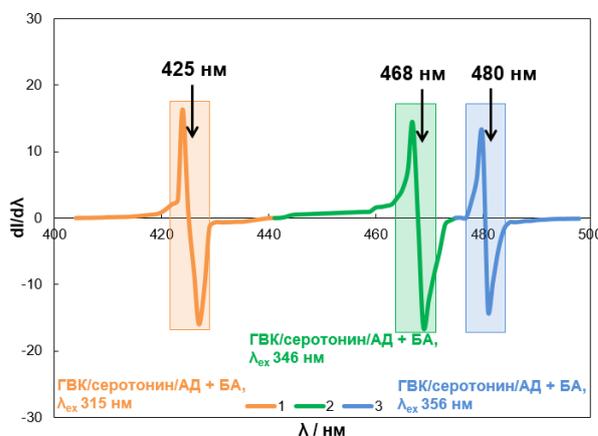
**Рис. 45П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГВК / НА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.01 мкМ для ГВК, НА, НМН, соответственно): 1 ГВК / НА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / НА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ГВК / НА / НМН с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм.



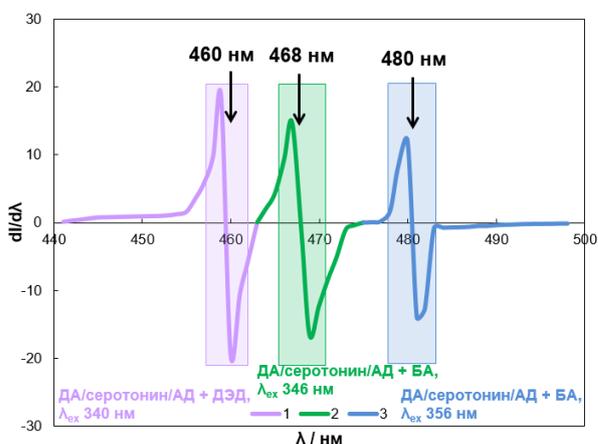
**Рис. 46П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / серотонин / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.05 мкМ для ВМК, серотонина, АД, соответственно): 1 ВМК / серотонин / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 ВМК / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



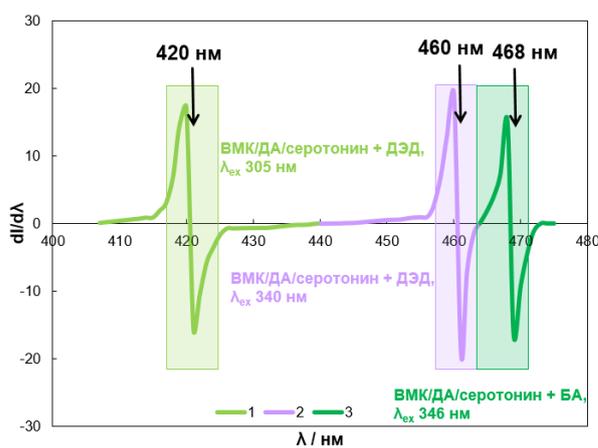
**Рис. 47П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / ГВК / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 1.0 мкМ для ВМК, ГВК, серотонина, соответственно): 1 ВМК / ГВК / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ГВК / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 3 ВМК / ГВК / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



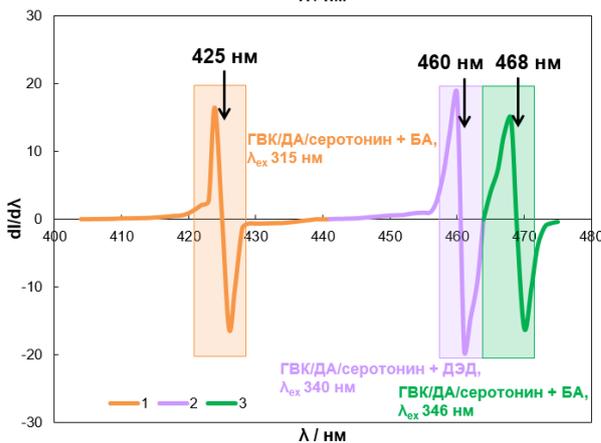
**Рис. 48П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГВК / серотонин / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.05 мкМ для ГВК, серотонина, АД, соответственно): 1 ГВК / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 ГВК / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



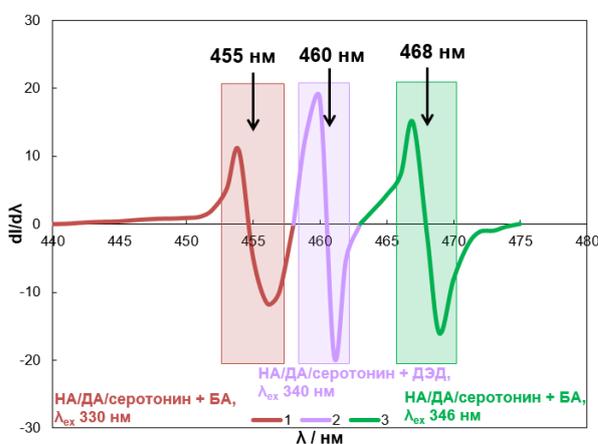
**Рис. 49П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ДА / серотонин / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.05 мкМ для ДА, серотонина, АД, соответственно): 1 ДА / серотонин / АД с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 2 ДА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 ДА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



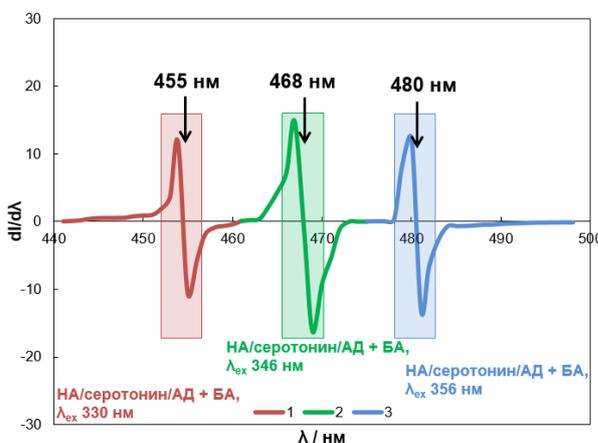
**Рис. 50П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / ДА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 1.0 мкМ для ВМК, ДА, серотонина, соответственно): 1 ВМК / ДА / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / ДА / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ВМК / ДА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



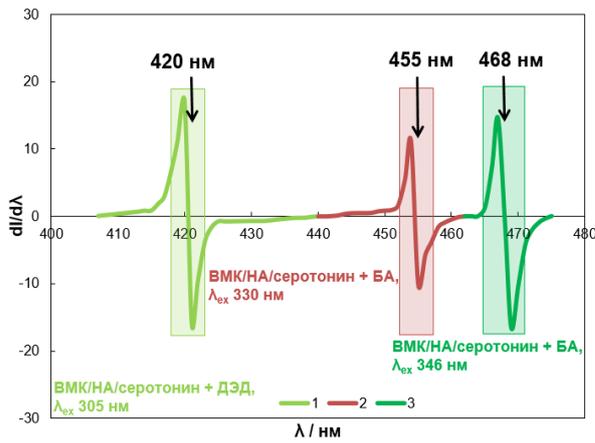
**Рис. 51П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГВК / ДА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 1.0 мкМ для ГВК, ДА, серотонина, соответственно): 1 ГВК / ДА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / ДА / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 ГВК / ДА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



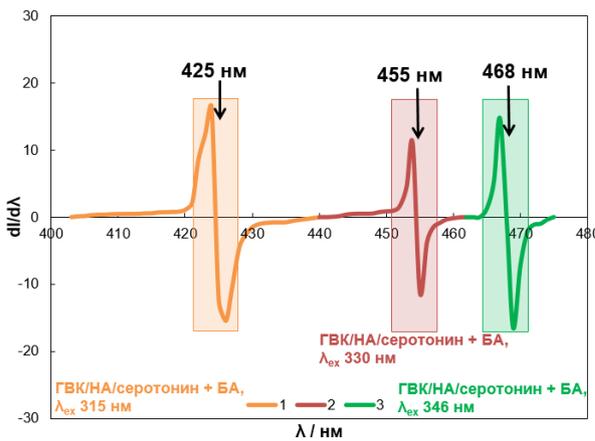
**Рис. 52П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / ДА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 1.0 мкМ для НА, ДА, серотонина, соответственно): 1 НА / ДА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / ДА / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 НА / ДА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



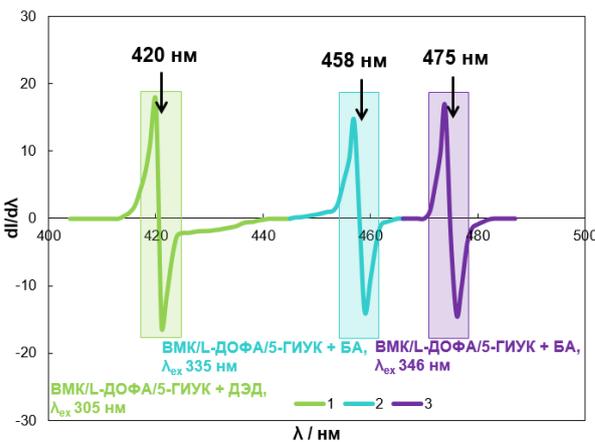
**Рис. 53П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / серотонин / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для НА, серотонина, АД, соответственно): 1 НА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 НА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



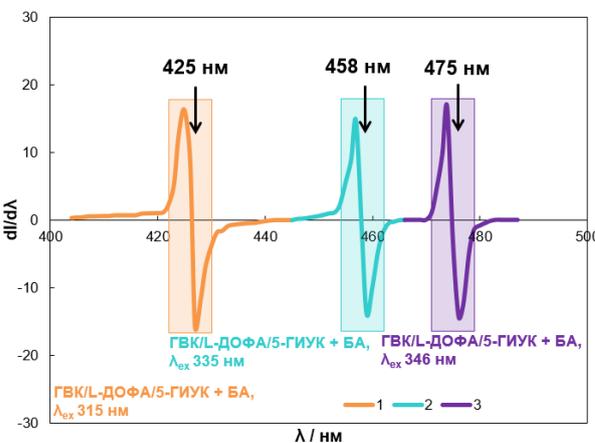
**Рис. 54П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ВМК / НА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ВМК, НА, серотонина, соответственно): 1 ВМК / НА / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ВМК / НА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



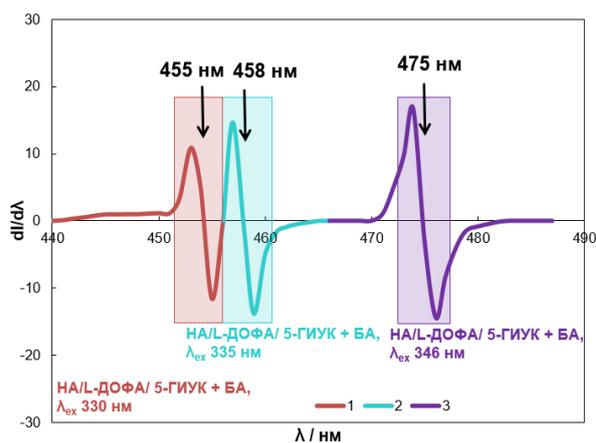
**Рис. 55П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ГVK / НА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ГVK, НА, серотонина, соответственно): 1 ГVK / НА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / НА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 3 ГVK / НА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



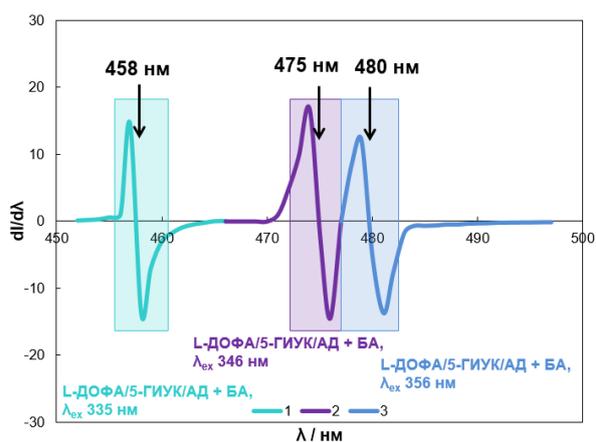
**Рис. 56П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / L-ДОФА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.5 мкМ для ВМК, L-ДОФА, 5-ГИУК, соответственно): 1 ВМК / L-ДОФА / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / L-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 ВМК / L-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



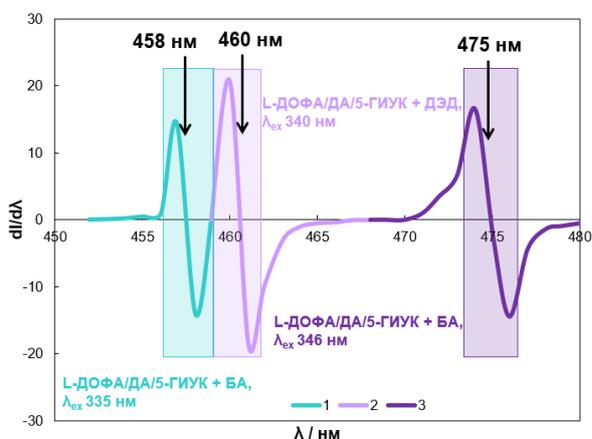
**Рис. 57П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ГVK / L-ДОФА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.5 мкМ для ГVK, L-ДОФА, 5-ГИУК, соответственно): 1 ГVK / L-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / L-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 ГVK / L-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



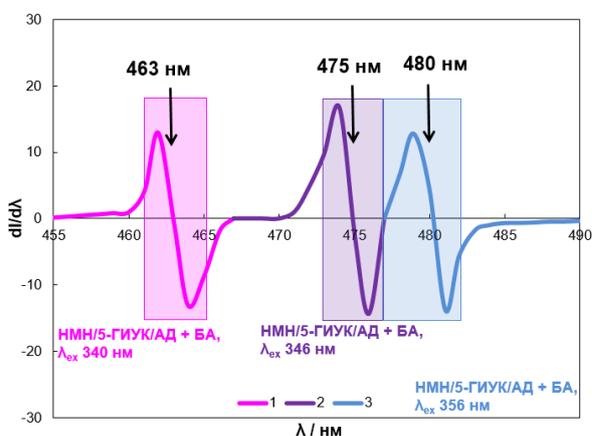
**Рис. 58П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / *L*-ДОФА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.1 и 0.5 мкМ для НА, *L*-ДОФА, 5-ГИУК, соответственно): 1 НА / *L*-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / *L*-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 НА / *L*-ДОФА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



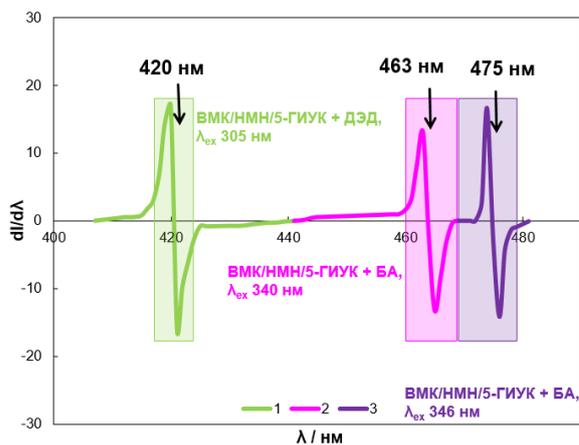
**Рис. 59П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – *L*-ДОФА / 5-ГИУК / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.5 и 0.05 мкМ для *L*-ДОФА, 5-ГИУК, АД, соответственно): 1 *L*-ДОФА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 2 *L*-ДОФА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм; 3 *L*-ДОФА / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



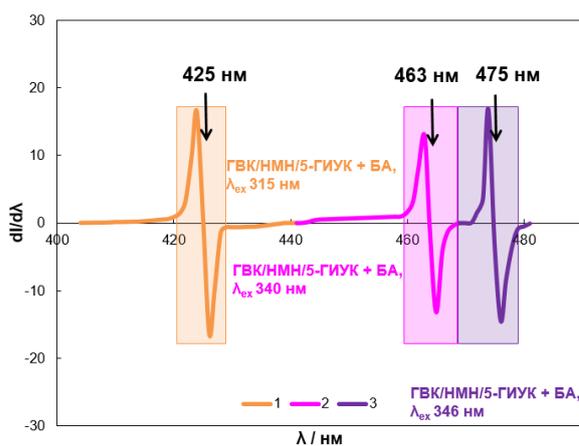
**Рис.609П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – *L*-ДОФА / ДА / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.5 мкМ для *L*-ДОФА, ДА, 5-ГИУК, соответственно): 1 *L*-ДОФА / ДА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 2 *L*-ДОФА / ДА / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 3 *L*-ДОФА / ДА / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



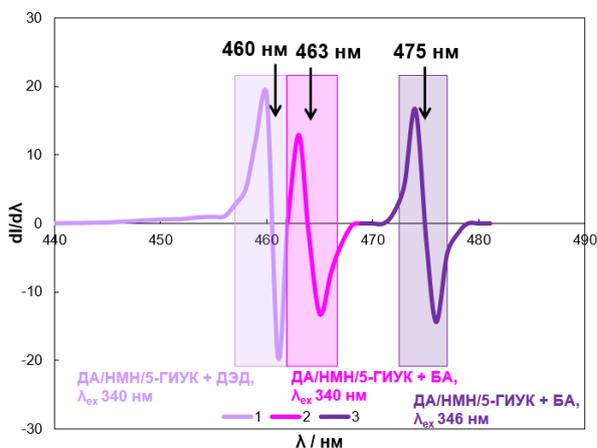
**Рис. 61П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НМН / 5-ГИУК / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.01, 0.5 и 0.05 мкМ для НМН, 5-ГИУК, АД, соответственно): 1 НМН / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 2 НМН / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм; 3 НМН / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



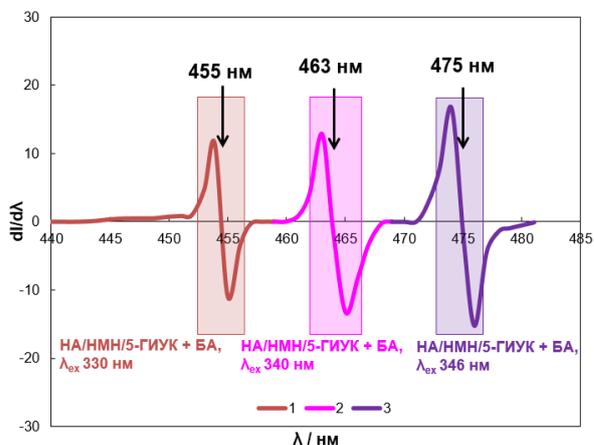
**Рис. 62П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / НМН / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.01 и 0.5 мкМ для ВМК, НМН, 5-ГИУК, соответственно): 1 ВМК / НМН / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НМН / 5-ГИУК с БА  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ВМК / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



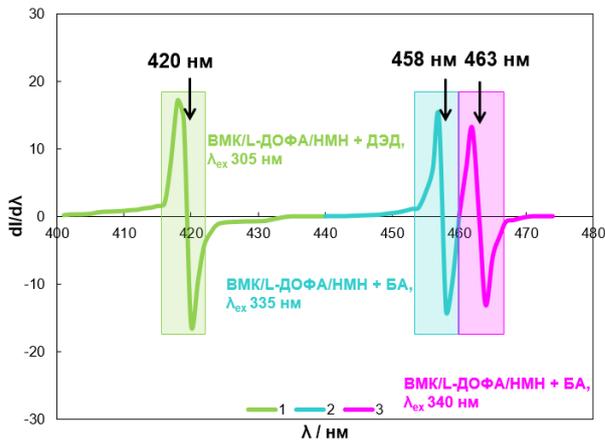
**Рис. 63П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ГВК / НМН / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.01 и 0.5 мкМ для ГВК, НМН, 5-ГИУК, соответственно): 1 ГВК / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / НМН / 5-ГИУК с БА  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ГВК / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



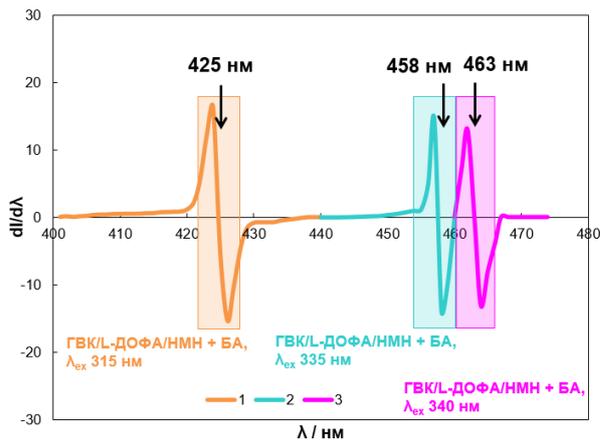
**Рис. 64П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ДА / НМН / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.01 и 0.5 мкМ для ДА, НМН, 5-ГИУК, соответственно): 1 ДА / НМН / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 2 ДА / НМН / 5-ГИУК с БА  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ДА / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



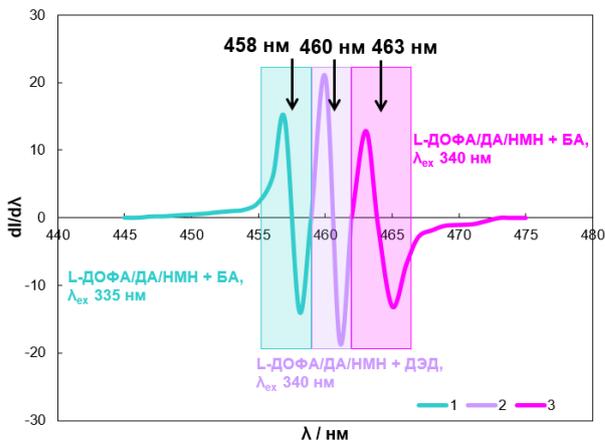
**Рис. 65П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / НМН / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.01 и 0.5 мкМ для НА, НМН, 5-ГИУК, соответственно): 1 НА / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 НА / НМН / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



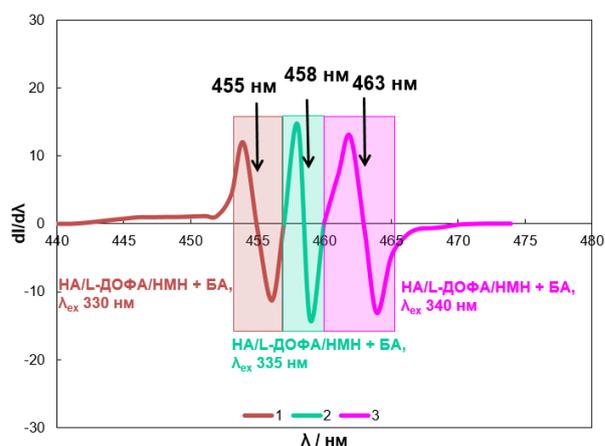
**Рис. 66П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / *L*-ДОФА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.01 мкМ для ВМК, *L*-ДОФА, НМН, соответственно): 1 ВМК / *L*-ДОФА / НМН с ДЭД, λ<sub>em</sub> = 420 нм; 2 ВМК / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 335 нм, λ<sub>em</sub> = 458 нм; 3 ВМК / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 340 нм, λ<sub>em</sub> = 463 нм.



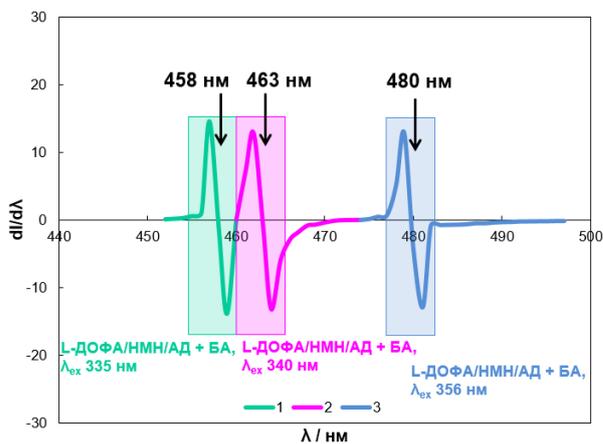
**Рис. 67П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ГВК / *L*-ДОФА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 0.01 мкМ для ГВК, *L*-ДОФА, НМН, соответственно): 1 ГВК / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 315 нм, λ<sub>em</sub> = 425 нм; 2 ГВК / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 335 нм, λ<sub>em</sub> = 458 нм; 3 ГВК / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 340 нм, λ<sub>em</sub> = 463 нм.



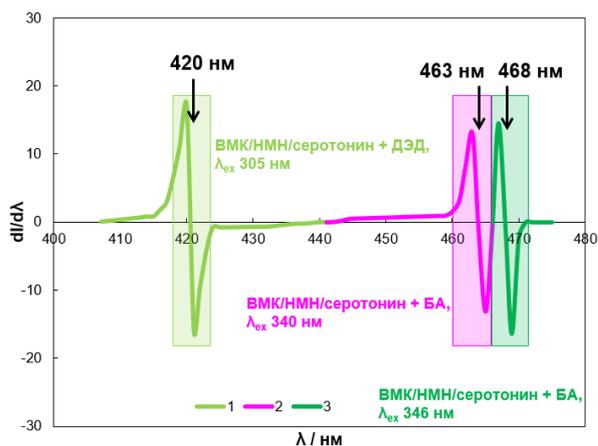
**Рис. 68П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – *L*-ДОФА / ДА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.01 мкМ для *L*-ДОФА, ДА, НМН, соответственно): 1 *L*-ДОФА / ДА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 335 нм, λ<sub>em</sub> = 458 нм; 2 *L*-ДОФА / ДА / НМН с ДЭД, λ<sub>ex</sub> = 340 нм, λ<sub>em</sub> = 460 нм; 3 *L*-ДОФА / ДА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 340 нм, λ<sub>em</sub> = 463 нм.



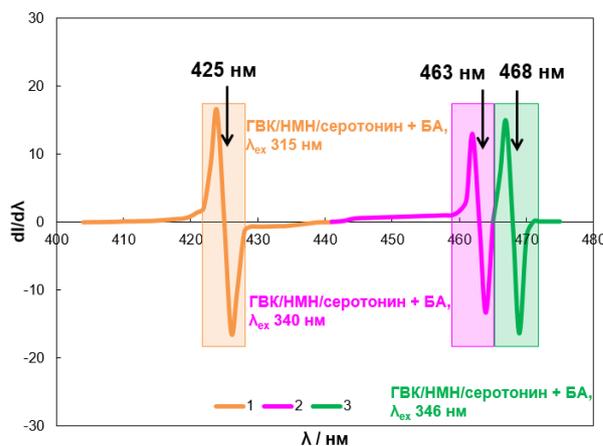
**Рис. 69П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / *L*-ДОФА / НМН в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.1 и 0.01 мкМ для НА, *L*-ДОФА, НМН, соответственно): 1 НА / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 330 нм, λ<sub>em</sub> = 455 нм; 2 НА / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 335 нм, λ<sub>em</sub> = 458 нм; 3 НА / *L*-ДОФА / НМН с БА, λ<sub>ex</sub> = 340 нм, λ<sub>em</sub> = 463 нм.



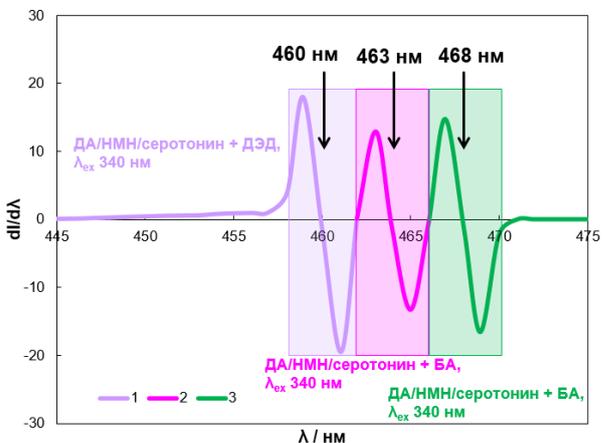
**Рис. 70П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – *L*-ДОФА / НМН / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.01 и 0.05 мкМ для *L*-ДОФА, НМН, АД, соответственно): 1 *L*-ДОФА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 2 *L*-ДОФА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 *L*-ДОФА / НМН / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



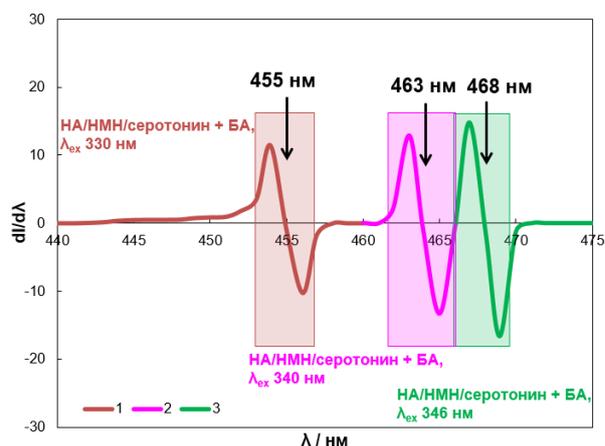
**Рис. 71П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / НМН / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ВМК, НМН, серотонина, соответственно): 1 ВМК / НМН / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ВМК / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



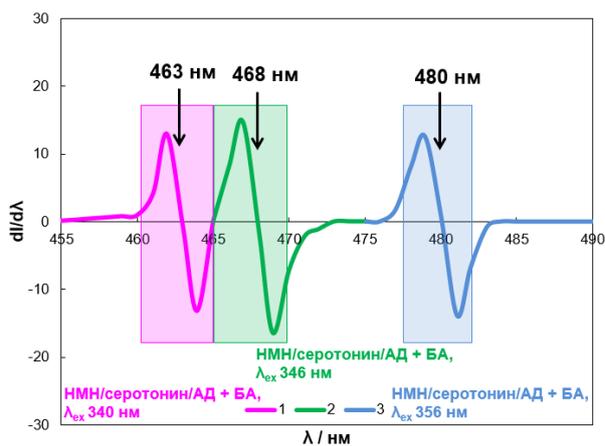
**Рис. 72П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ГВК / НМН / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ГВК, НМН, серотонина, соответственно): 1 ГВК / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ГВК / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



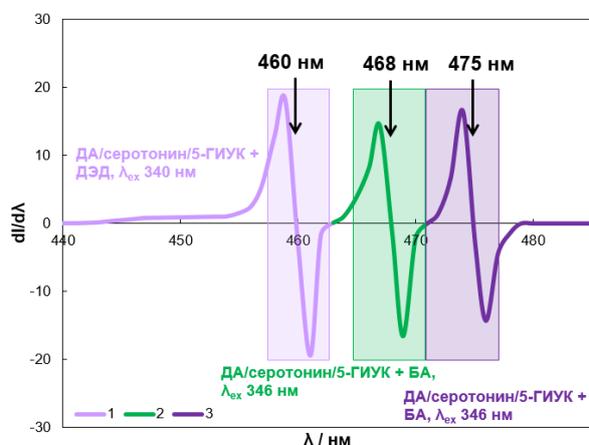
**Рис. 73П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ДА / НМН / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ДА, НМН, серотонина, соответственно): 1 ДА / НМН / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 2 ДА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 ДА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



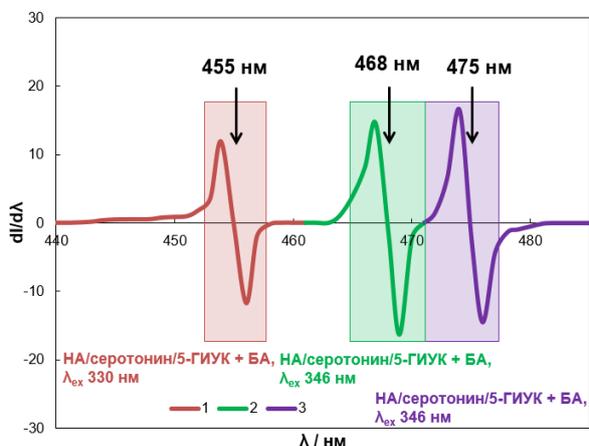
**Рис. 74П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / НМН / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.1 и 1.0 мкМ для НА, НМН, серотонина, соответственно): 1 НА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 3 НА / НМН / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



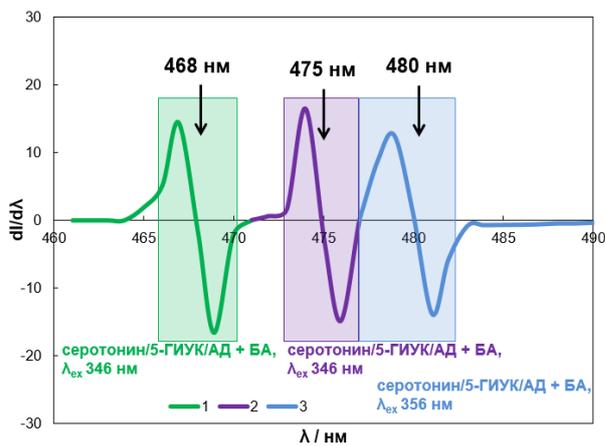
**Рис. 75П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НМН / серотонин / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для НМН, серотонина, АД, соответственно): 1 НМН / серотонин / АД с БА  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 463$  нм; 2 НМН / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 НМН / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



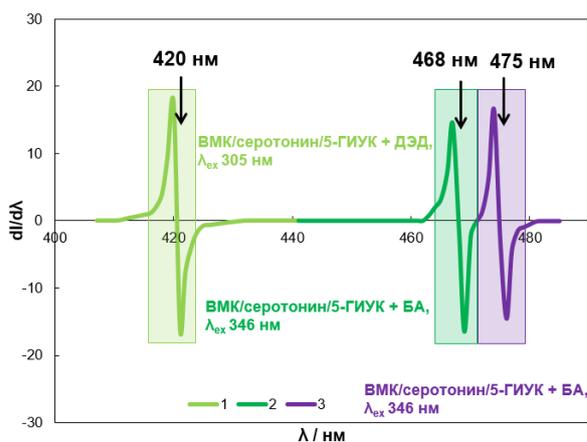
**Рис. 76П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – ДА / серотонин / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.5 мкМ для ДА, серотонина, 5-ГИУК, соответственно): 1 ДА / серотонин / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 460$  нм; 2 ДА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 ДА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



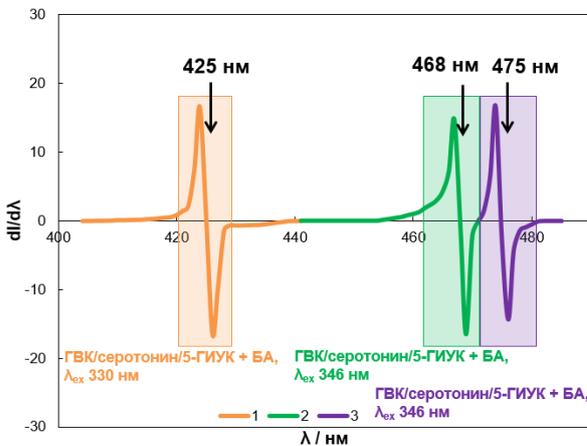
**Рис. 77П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / серотонин / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.5 мкМ для НА, серотонина, 5-ГИУК, соответственно): 1 НА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 НА / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



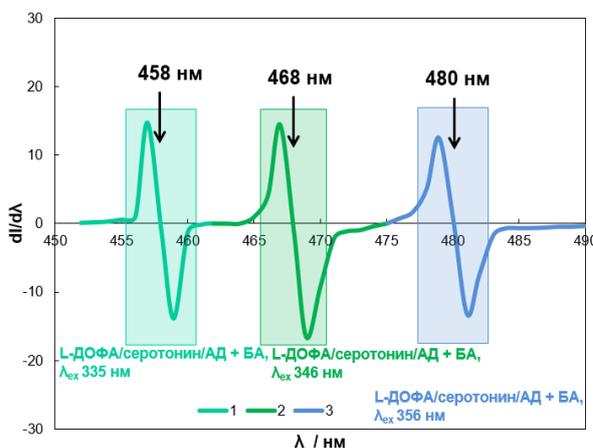
**Рис. 78П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – серотонин / 5-ГИУК / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.5 и 0.05 мкМ для серотонина, 5-ГИУК, АД, соответственно): 1 серотонин / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 2 серотонин / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм; 3 серотонин / 5-ГИУК / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



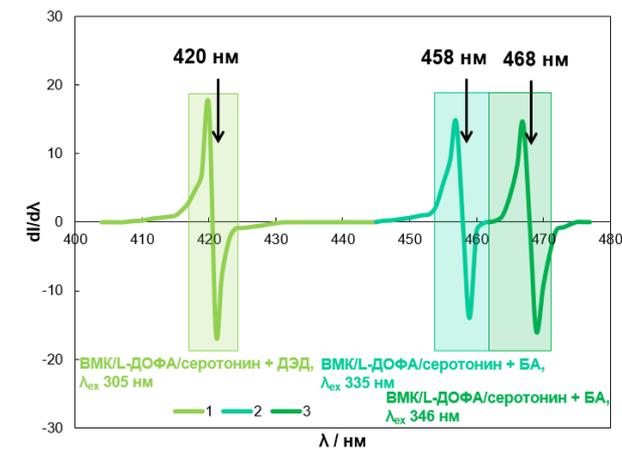
**Рис. 79П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / серотонин / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.5 мкМ для ВМК, серотонина, 5-ГИУК, соответственно): 1 ВМК / серотонин / 5-ГИУК с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 ВМК / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



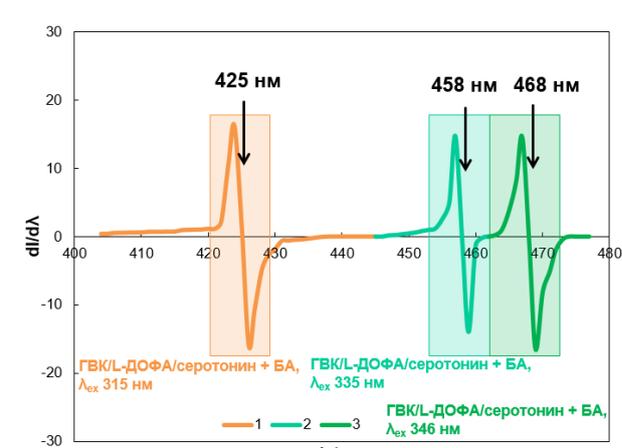
**Рис. 80П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ГВК / серотонин / 5-ГИУК в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 1.0 и 0.5 мкМ для ГВК, серотонина, 5-ГИУК, соответственно): 1 ГВК / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГВК / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 ГВК / серотонин / 5-ГИУК с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 475$  нм.



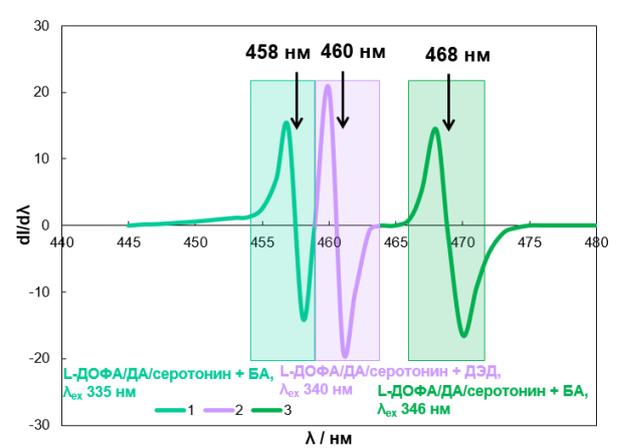
**Рис. 81П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – L-ДОФА / серотонин / АД в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 0.05 мкМ для L-ДОФА, серотонина, АД, соответственно): 1 L-ДОФА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 2 L-ДОФА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм; 3 L-ДОФА / серотонин / АД с БА,  $\lambda_{ex} = 356$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм.



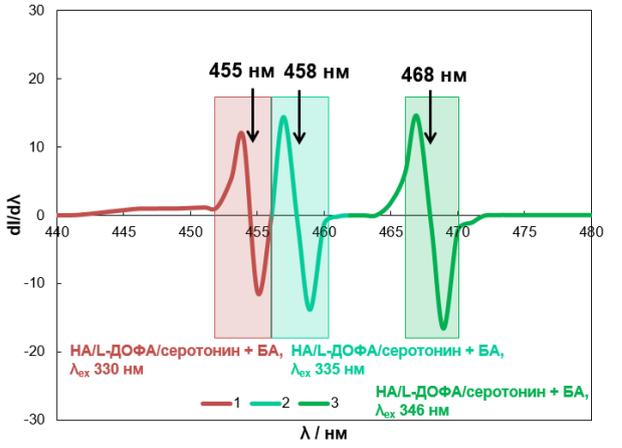
**Рис. 82П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ВМК / *L*-ДОФА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ВМК, *L*-ДОФА, серотонина, соответственно): 1 ВМК / *L*-ДОФА / серотонин с ДЭД,  $\lambda_{ex} = 305$  нм,  $\lambda_{em} = 420$  нм; 2 ВМК / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 ВМК / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



**Рис. 83П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных метаболитов – ГVK / *L*-ДОФА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям метаболитов в моче здорового человека (1.0, 0.1 и 1.0 мкМ для ГVK, *L*-ДОФА, серотонина, соответственно): 1 ГVK / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 315$  нм,  $\lambda_{em} = 425$  нм; 2 ГVK / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 ГVK / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



**Рис. 84П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – *L*-ДОФА / ДА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 1.0 и 1.0 мкМ для НА, *L*-ДОФА, серотонина, соответственно): 1 НА / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 НА / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.



**Рис. 85П.** Производные спектры флуоресценции первого порядка системы флуоресцирующих производных НМ и их метаболитов – НА / *L*-ДОФА / серотонин в соотношениях, аналогичных референсным концентрациям НМ и метаболитов в моче здорового человека (0.1, 0.1 и 1.0 мкМ для НА, *L*-ДОФА, серотонина, соответственно): 1 НА / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 330$  нм,  $\lambda_{em} = 455$  нм; 2 НА / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{em} = 458$  нм; 3 НА / *L*-ДОФА / серотонин с БА,  $\lambda_{ex} = 346$  нм,  $\lambda_{em} = 468$  нм.

## Список литературы

1. Barnes M.A., Carson M.J., Nair M.G. Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. // *Cytokine*. 2015. V. 72. № 2. P. 210–219.
2. Garcha A.S., Cohen D.L. Catecholamine excess: pseudopheochromocytoma and beyond. // *Adv. Chronic Kidney Dis*. 2015. V. 22. № 3. P. 218–223.
3. Pussard E., Neveux M., Guigueno N. Reference intervals for urinary catecholamines and metabolites from birth to adulthood. // *Clin. Biochem*. 2009. V. 42. № 6. P. 536–539.
4. Pagana K.D. *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*. // St. Louis: Mosby Inc. 1998.
5. Tsirlin A., Oo Y., Sharma R., Kansara A., Gliwa A., Banerji M.A. Pheochromocytoma: A review. // *Maturitas*. 2014. V. 77. № 3. P. 229–238.
6. Barco S., Gennai I., Reggiardo G., Galleni B., Barbagallo L., Maffia A., Viscardi E., De Leonardis F., Cecinati V., Sorrentino S., Garaventa A., Conte M., Cangemi G. Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: Report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. // *Clin. Biochem*. 2014. V. 47. № 9. P. 848–852.
7. Yangong H., Shi C., Shahbaz M., Zhengchuan N., Wang J., Liang B., Ruliang F., Gao H., Bo Q., Niu J. Diagnosis and treatment experience of rectal carcinoid (a report of 312 cases). // *Int. J. Surg*. 2014. V. 12. № 5. P. 408–411.
8. Gianni M., Dentali F., Grandi A.M., Sumner G., Hiralal R., Lonn E. Apical ballooning syndrome or takotsubo cardiomyopathy: a systematic review. // *Eur. Heart J*. 2006. V. 27. № 13. P. 1523–1529.
9. Pham T.H., Moir C., Thompson G.B., Zarroug A.E., Hamner C.E., Farley D., Heerden J., Lteif A.N., Young W.F. Pheochromocytoma and paraganglioma in children: a review of medical and surgical management at a tertiary care center. // *Pediatrics*. 2006. V. 118. № 6. P. 1109–1117.
10. Peaston R.T., Graham K.S., Chambers E., Molen J.C., Ball S. Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma. // *Clin. Chim. Acta*. 2010. V. 411. № 7–8. P. 546–552.
11. Liu L., Li Q., Li N., Ling J., Liu R., Wang Y., Sun L., Chen X.H., Bi K. Simultaneous determination of catecholamines and their metabolites related to Alzheimer's disease in human urine. // *J. Sep. Sci*. 2011. V. 34. № 10. P. 1198–1204.

12. *Nazarali A.J., Reynolds G.P.* Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: a postmortem study. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 1992. V. 12. № 6. P. 581–587.
13. *Scatton B., Javoy-Agid F., Rouquier L., Dubois B., Agid Y.* Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. // *Brain Res.* 1983. V. 275. № 2. P. 321–328.
14. *Subramaniam R.* Pheochromocytoma – Current concepts in diagnosis and management. // *Trends Anaesth. Crit. Care.* 2011. V. 1. № 2. P. 104–110.
15. *Hickman P.E., Leong M., Chang J., Wilson S.R., Mcwhinney B.* Plasma free metanephrines are superior to urine and plasma catecholamines and urine catecholamine metabolites for the investigation of phaeochromocytoma. // *Pathology.* 2009. V. 41. № 2. P. 173–177.
16. *Lenders J.W.M., Eisenhofer G., Mannelli M., Pacak K.* Phaeochromocytoma. // *Lancet.* 2005. V. 366. № 9486. P. 665–675.
17. *Colen T.Y., Mihm F.G., Mason T.P., Roberson J.B.* Catecholamine-secreting paragangliomas: recent progress in diagnosis and perioperative management. // *J. Neurol. Surg. Part B Skull Base.* 2009. V. 19. № 6. P. 377–386.
18. *Weingarten T.N., Welch T.L., Moore T.L., Walters G.F., Whipple J.L., Cavalcante A., Bancos I., Young W.F. Jr., Gruber L.M., Shah M.Z., McKenzie T.J., Schroeder D.R., Sprung J.* Preoperative levels of catecholamines and metanephrines and intraoperative hemodynamics of patients undergoing pheochromocytoma and paraganglioma resection. // *Urology.* 2017. V. 100. P. 131–138.
19. *Sadilkova K., Dugaw K., Benjamin D., Jack R. M.* Analysis of vanillylmandelic acid and homovanillic acid by UPLC–MS/MS in serum for diagnostic testing for neuroblastoma. // *Clin. Chim. Acta.* 2013. V. 424. P. 253–257.
20. *Verly I.R., van Kuilenburg A.B., Abeling N.G., Goorden S.M., Fiocco M., Vaz F.M., van Noesel M.M., Zwaan C.M., Kaspers G.L., Merks J.H., Caron H.N., Tytgat G.A.* Catecholamines profiles at diagnosis: Increased diagnostic sensitivity and correlation with biological and clinical features in neuroblastoma patients. // *Eur. J. Cancer.* 2017. V. 72. P. 235–243.
21. *Maroun J., Kocha W., Kvols L., Bjarnason G., Chen E., Germond C., Hanna S., Poitras P., Rayson D., Reid R., Rivera J., Roy A., Shah A., Sideris L., Siu L., Wong R.* Guidelines for the diagnosis and management of carcinoid tumours. Part 1: The gastrointestinal tract. A statement from a Canadian National Carcinoid Expert Group. // *Curr. Oncol.* 2006. V. 13. № 2. P. 67–76.
22. *Andersen A.D., Blaabjerg M., Binzer M., Kamal A., Thagesen H., Kjaer T.W., Stenager E., Gramsbergen J.B.P.* Cerebrospinal fluid levels of catecholamines and its metabolites in

Parkinson's disease: effect of *L*-DOPA treatment and changes in levodopa-induced dyskinesia. // *J. Neurochem.* 2017. V. 41. № 4. P. 614–625.

23. *Ahlskog J.E., Uitti R.J., Tyce G.M., O'Brien J.F., Petersen R.C., Kokmen E.* Plasma catechols and monoamine oxidase metabolites in untreated Parkinson's and Alzheimer's diseases. // *J. Neurol. Sci.* 1996. V. 136. № 1–2. P. 162–168.

24. *Kelm-Nelson C.A., Trevino M.A., Ciucci M.R.* Quantitative analysis of catecholamines in the pink1 *-/-* rat model of early-onset Parkinson's disease. // *Neuroscience.* 2018. V. 379. P. 126–141.

25. *Stefani A., Olivola E., Liguori C., Hainsworth A.H., Saviozzi V., Angileri G., D'Angelo V., Galati S., Pierantozzi M.* Catecholamine-based treatment in AD patients: expectations and delusions. // *Front Aging Neurosci.* 2015. V. 7. № 67. P. 1–7.

26. *Weller J., Budson A.* Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. // *F1000Res.* 2018. V. 7. P. 1–9.

27. *Watts A.G., Donovan C.M.* Sweet talk in the brain: glucosensing, neural networks, and hypoglycemic counterregulation. // *Front. Neuroendocrinol.* 2010. V. 31. № 1. P. 32–43.

28. *Everly Jr. G.S., Lating J.M.* The anatomy and physiology of the human stress response. // *A Clinical Guide to the Treatment of the Human Stress Response.* 2013. P. 17–51.

29. *Grässel S., Muschter D.* Peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in osteoarthritis pathology. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 5. P. 931–954.

30. *Almeida D.M., Piazza J.R., Stawski R.S., Klein L.C.* The Speedometer of Life: Stress, Health and Aging. // In K. W. Schaie & S. L. Willis (Eds.). *The handbooks of aging consisting of three Vols. Handbook of the psychology of aging.* 2011. P. 191–206.

31. *Januszewicz W., Sznajderman M., Wocial B., Feltynowski T., Klonowicz T.* The effect of mental stress on catecholamines, their metabolites and plasma renin activity in patients with essential hypertension and in healthy subjects. // *Clin. Sci.* 1979. V. 57. P. 229–231.

32. *Klein L.C., Corwin E.J.* Homeostasis and the stressresponse. // In E. J. Corwin (Ed.), *Handbook of pathophysiology* (3<sup>rd</sup> ed.). 2007. P. 159–172.

33. *Stratakis C.A., Chrousos G.P.* Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. // In G. P. Chrousos, R. McCarty, K. Pacák, G. Cizza, E. Sternberg, P. W. Gold, & R. Kvetňanský (Eds.), *Stress: Basic mechanisms and clinical implications.* 1995. V. 771. P. 1–18.

34. *Taylor S.E., Klein L.C., Lewis B.P., Gruenewald T.L., Gurung R.A.R., Updegraff J.A.* Female responses to stress: Tend and befriend, not fight-or-flight. // *Psychol. Rev.* 2000. V. 107. № 3. P. 411–429.

35. *McEwen B.S., Stellar E.* Stress and the individual: Mechanisms leading to disease. // *Arch. Intern. Med.* 1993. V. 153. № 18. P. 2093–2101.

36. *Kiecolt-Glaser J., McGuire L., Robles T.F., Glaser R.* Emotions, morbidity, and mortality: New perspectives from psychoneuroimmunology. // *Annual Review of Psychology.* 2002. V. 53. P. 83–107.
37. *Dayan P., Yu A.J.* Phasic norepinephrine: A neural interrupt signal for unexpected events. // *Network: Computation in Neural Systems.* 2006. V. 17. № 4. P. 335–350.
38. *Juszczak K., Drewa T.* Adrenergic crisis due to pheochromocytoma – practical aspects. A short review. // *Cent. European. J. Urol.* 2014. V. 67. № 2. P. 153–155.
39. *Arnsten A.F.T.* Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex, structure and function. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. № 6. P. 410–422.
40. *Hains A.B., Arnsten A.F.T.* Molecular mechanisms of stress-induced prefrontal cortical impairment: Implications for mental illness. // *Learn. Mem.* 2008. V. 15. № 8. P. 551–564.
41. *Arnsten A.F.T.* Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 10. P. 1376–1385.
42. *Jobe T., Vimal R., Kovilparambil A., Port J., Gaviria M.* A theory of cooperativity modulation in neural networks as an important parameter of CNS catecholamine function and induction of psychopathology. // *Neurolog. Res.* 1994. V. 16. № 5. P. 330–341.
43. *Ulrich-Lai Y.M., Herman J.P.* Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. № 6. P. 397–409.
44. *Bergquist J., Ściubisz A., Kaczor A., Silberring J.* Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids. // *J. Neurosci. Methods.* 2002. V. 113. № 1. P. 1–13.
45. *Lee M., Oh S.Y., Pathak T.S., Paeng I.R., Cho B.-Y., Paeng K.-J.* Selective solid-phase extraction of catecholamines by the chemically modified polymeric adsorbents with crown ether. // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1160. № 1–2. P. 340–344.
46. *Durstewitz D., Kelc M., Gunturkun O.* A neurocomputational theory of the dopaminergic modulation of working memory functions. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 7. P. 2807–2822.
47. *Cannazza G., Di Stefano A., Mosciatti B., Braghioli D., Baraldia M., Pinnen F., Sozio P., Benatti C., Parenti C.* Detection of levodopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of *L-DOPA* prodrugs by mean of HPLC–EC. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. V. 36. № 5. P. 1079–1084.
48. *Qiao T., Wu Y., Jin J., Gao W., Xie Q., Wang S., Zhang Y., Deng H.* Conjugation of catecholamines on magnetic nanoparticles coated with sulfonated chitosan. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2011. V. 380. № 1–3. P. 169–174.

49. Azaryan A., Ligor T., Buszewski B., Temerdashev A., Dmitrieva E., Gashimova E. LC-MS/MS determination of catecholamines in urine using FMOC-Cl derivatization on solid-phase extraction cartridge. // *Chromatographia*. 2018. V. 81. № 11. P. 1487–1494.
50. Dunand M., Gubian D., Stauffer M., Abid K., Grouzmann E. High-Throughput and sensitive quantitation of plasma catecholamines by ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a solid phase microwell extraction plate. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 7. P. 3539–3544.
51. Gu Q., Shi X., Yin P., Gao P., Lu X., Xu G. Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 609. № 2. P. 192–200.
52. Nichkova M., Wynveen P.M., Marc D.T., Huisman H., Kellermann G.H. Validation of an ELISA for urinary dopamine: applications in monitoring treatment of dopamine-related disorders. // *J. Neurochem.* 2013. V. 125. № 5. P. 724–735.
53. Törnkvist A., Sjöberg P.J.R., Markides K.E., Bergquist J. Analysis of catecholamines and related substances using porous graphitic carbon as separation media in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 801. № 2. P. 323–329.
54. Barco S., Verly I., Corrias M.V., Sorrentino S., Conte M., Tripodi G., Tytgat G., van Kuilenburg A., van der Ham M., de Sain-van der Velden M., Garaventa A., Cangemi G. Plasma free metanephrines for diagnosis of neuroblastoma patients. // *Clin. Biochem.* 2019. In press.
55. Ma J.-B., Qiu H.-W., Rui Q.-H., Liao Y.-F., Chen Y.-M., Xu J., Zhan P.-P., Zhao Y.-G. Fast determination of catecholamines in human plasma using carboxyl-functionalized magnetic-carbon nanotube molecularly imprinted polymer followed by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1429. P. 86–96.
56. Franscini L.C., Vazquez-Montes M., Buclin T., Perera R., Dunand M., Grouzmann E., Beck-Popovic M. Pediatric reference intervals for plasma free and total metanephrines established with a parametric approach: relevance to the diagnosis of neuroblastoma. // *Pediatr. Blood Cancer.* 2015. V. 62. № 4. P. 587–593.
57. Zheng J., Mandala R., Wishart D.S. A sensitive, high-throughput LC-MS/MS method for measuring catecholamines in low volume serum. // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1037. P. 159–167.
58. Zhang M., Fang C., Smagin G. Derivatization for the simultaneous LC/MS quantification of multiple neurotransmitters in extracellular fluid from rat brain microdialysis. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. V. 100. P. 357–364.

59. Ellis A.G., Zeglinski P.T., Coleman K.E., Whiting M.J. Dilute, derivatise and shoot: Measurement of urinary free metanephrines and catecholamines as ethyl derivatives by LC-MS/MS. // Clin. Mass Spec. 2017. V. 4–5. P. 34–41.
60. Nalewajko E., Wiszowata A., Kojło A. Determination of catecholamines by flow-injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. V. 43. № 5. P. 1673–1681.
61. Sabioni C., Saracino M.A., Mandrioli R. Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plasma. Comparison of amperometric and coulometric detection. // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1032. № 1–2. P. 65–71.
62. Lee N.S., Hsieh Y.Z., Paisley R.F., Morris M.D. Surface-enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds. // Anal. Chem. 1988. V. 60. № 5. P. 442–446.
63. Bicker J., Fortuna A., Alves G., Falcão A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples-a review. // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 768. P. 12–34.
64. Hubbard K.E., Wells A., Owens T., Tagen M., Fraga C.H., Stewart C.F. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. // Biomed. Chromatogr. 2010. V. 24. № 6. P. 626–631.
65. Parrot S., Neuzeret P., Denoroy L. A rapid and sensitive method for the analysis of brain monoamine neurotransmitters using ultra-fast liquid chromatography coupled to electrochemical detection. // J. Chromatogr. B. 2011. V. 879. № 32. P. 3871–3878.
66. Nirogia R., Komarnenia P., Kandikerea V., Boggavarapua R., Bhyrapunenia G., Benadea V., Gorentlab S. A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 2013. V. 913–914. P. 41–48.
67. Syslová K., Rambousek L., Kuzma M., Najmanová V., Bubeniková-Valešová V., Slambergová R., Kačer P. Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: method combining freeze-drying with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. № 21. P. 3382–3391.
68. Zhu K., Fu Q., Leung K., Wong Z., Choi R., Tsim K. The establishment of a sensitive method in determining different neurotransmitters simultaneously in rat brains by using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 2011. V. 879. № 1–2. P. 737–742.

69. *Eisenhofer G., Peitzsch M., Kaden D., Langton K., Mangelis A., Pamporaki C., Masjkur J., Geroula A., Kurlbaum M., Deutschbein T., Beuschlein F., Prejbisz A., Bornstein S.R., Lenders J.W.M.* Reference intervals for LC-MS/MS measurements of plasma free, urinary free and urinary acid-hydrolyzed deconjugated normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine. // *Clin. Chim. Acta.* 2019. V. 490. P. 46–54.
70. *Сидорова А.А., Карцова Л.А.* Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови. // *Сорб. Хроматогр. Процессы.* 2009. Т. 9. Вып. 6. С. 774–782.
71. *Glód B.K., Stańczak K.I., Woźniak A., Pakszys W.* Determination of catecholamines and the total antioxidant potential of blood plasma by use of an improved RPHPLC–ED assay. // *Acta Chromatogr.* 2004. № 14. P. 142–148.
72. *Raggi M.A., Sabbioni C., Casamenti G., Gerra G., Calonghi N., Masotti L.* Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999. V. 730. № 2. P. 201–211.
73. *Kumar A., Hart J., McCalley D.* Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection. // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 25. P. 3854–3861.
74. *Сидорова А.А., Карцова Л.А.* Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови. // *Сорб. Хроматогр. Процессы.* 2010. Т. 10. Вып. 4. С. 533–542.
75. *Yubero-Lahoz S., Rodríguez J., Faura A., Pascual J., Oliveras A., Cao H., Farré M., Torre R.* Determination of free serotonin and its metabolite 5-HIAA in blood human samples with consideration to pre-analytical factors. // *Biomed. Chromatogr.* 2014. V. 28. № 12. P. 1641–1646.
76. *Kim J.H., Jin S.-Y., Hong S.S., Lee T.H.* A carcinoid tumour arising within a tailgut cyst: a diagnostic challenge. // *Scott. Med. J.* 2014. V. 59. № 1. P. 14–17.
77. *Därr R., Pamporaki C., Peitzsch M., Miehle K., Prejbisz A., Peczkowska M., Weismann D., Beuschlein F., Sinnott R., Bornstein S.R., Neumann H.P., Januszewicz A., Lenders J., Eisenhofer G.* Biochemical diagnosis of pheochromocytoma using plasma-free normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine: importance of supine sampling under fasting conditions. // *Clin. Endocr.* 2014. V. 80. № 4. P. 478–486.
78. *Martucci V.L., Pacak K.* Pheochromocytoma and paraganglioma: diagnosis, genetics, management, and treatment. // *Curr. Probl. Cancer.* 2014. V. 38. № 1. P. 7–41.

79. *Adaway J.E., Peitzsch M., Keevil B.G.* A novel method for the measurement of plasma metanephrines using online solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry. // *Ann. Clin. Biochem.* 2014. V. 52. № 3. P. 361–369.
80. *Gupta P., Khurana M.L., Khadgawat R., Bal C.S., Kumar G., Sharma S.C., Tandon N.* Plasma free metanephrine, normetanephrine, and 3-methoxytyramine for the diagnosis of pheochromocytoma/paraganglioma. // *Indian J. Endocr. Metab.* 2015. V. 19. № 5. P. 633–638.
81. *Khan M.U., Coleman R.E.* Diagnosis and therapy of carcinoid tumors-current state of the art and future directions. // *Nucl. Med. Biol.* 2008.V. 35. № 1001. P. 77–91.
82. *Shen Y., Lu J., Tang Q., Guan Q., Sun Z., Li H., Cheng L.* Rapid, easy analysis of urinary vanillylmandelic acid for diagnostic testing of pheochromocytoma by liquid chromatography tandem mass spectrometry.// *J. Chromatogr. B.* 2015. V. 1002. P. 92–97.
83. *Tohmola N., Itkonen O., Turpeinen U., Joenväärä S., Renkonen R., Hämäläinen E.* Preanalytical validation and reference values for a mass spectrometric assay of serum vanillylmandelic acid for screening of catecholamine secreting neuroendocrine tumors. // *Clin. Chim. Acta.* 2015. V. 446. P. 206–212.
84. *Li X., Li S., Wynveen P., Mork K., Kellermann G.* Development and validation of a specific and sensitive LC-MS/MS method for quantification of urinary catecholamines and application in biological variation studies. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 28. P. 7287–7297.
85. *Hodin R., Lubitz C., Phitayakorn R., Stephen A.* Diagnosis and management of pheochromocytoma. // *Curr. Probl. Surg.* 2014. V. 51. № 4. P. 151–187.
86. *Bergmann M.L., Sadjadi S., Schmedes A.* Analysis of catecholamines in urine by unique LC/MS suitable ion-pairing chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1057. P. 118–123.
87. *Lia X., Li S., Kellermann G.* An integrated liquid chromatography–tandem mass spectrometry approach for the ultra-sensitive determination of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells to assess neural-immune communication. // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1449. P. 54–61.
88. *Ji C., Walton J., Sub Y., Tella M.* Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC–MS/MS. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 670. № 1–2. P. 84–91.
89. *Yoshitake T., Kehr J., Todoroki K., Nohta H., Yamaguchi M.* Derivatization chemistries for determination of serotonin, norepinephrine and dopamine in brain microdialysis samples by liquid chromatography with fluorescence detection. // *Biomed. Chromatogr.* 2006. V. 20. № 3. P. 267–281.

90. Wu H.W., Chen M.L., Shou D., Zhu Y. Determination of catecholamines by ion chromatography coupled to acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. // *Chin. Chem. Let.* 2012. V. 23. № 7. P. 839–842.
91. Wassell J., Reed P., Kane J., Weinkove C. Freedom from drug interference in new immunoassays for urinary catecholamines and metanephrines. // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. № 12. P. 2216–2223.
92. Пивень Н. В., Бураковский А. И. Методы иммунохимического анализа с использованием меченых реагентов. // *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2012. № 1. С. 93–102.
93. Baur N., Schneiderhan-Marra N., Booltink E., Manz G., Joos T., Manz B. / Ast. of the rep. “The Tenth International Catecholamine Symposium”. Pacific Grove, CA, USA, 2012.
94. Weismann D., Peitzsch M., Raida A., Prejbisz A., Gosk M., Riester A., Willenberg H.S., Klemm R., Manz G., Deutschbein T., Kroiss M., Därr R., Bidlingmaier M., Januszewicz A., Eisenhofer G., Fassnacht M. Measurements of plasma metanephrines by immunoassay vs liquid chromatography with tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. // *Eur. J. Endocrinol.* 2015. V. 172. № 3. P. 251–260.
95. Procopiou M., Finney H., Akker S.A., Chew S.L., Drake W.M., Burrin J., Grossman A.B. Evaluation of an enzyme immunoassay for plasma-free metanephrines in the diagnosis of catecholamine-secreting tumors. // *Eur J. Endocr.* 2009. V. 161. № 1. P. 131–140.
96. Murphy J.F., Davies D.H., Smith C.J. The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenalin and noradrenalin. // *J. Immunol. Methods.* 1992. V. 154. № 1. P. 89–98.
97. Kim J., Park H., Ryu J., Jeon O., Paeng I.R. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for a selective and sensitive determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. // *J. Immunoassay Immunochem.* 2010. V. 31. № 1. P. 33–44.
98. Kim J., Jeon M., Paeng K.-J., Paeng I.R. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of catecholamine, dopamine in serum. // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 619. № 1. P. 87–93.
99. Srithunyarat T., Svensson A., Hanås S., Höglund O.V., Hagman R., Lilliehöök I., Olsson U., Ljungvall I., Häggström J., Ström H.B., Pettersson A., Höglund K. Evaluation of an ELISA for metanephrines in feline urine. // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2018. V. 30. № 6. P. 887–893.
100. Taran F., Bernard H., Valleix A., Créminon C., Grassi J., Olichon D., Deverre J.-R., Pradelles P. Competitive enzyme immunoassay for urinary vanillylmandelic acid. // *Clin. Chim. Acta.* 1997. V. 264. № 2. P. 177–192.

101. *Westermann J., Hubl W., Kaiser N., Salewski L.* Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method. // *Clin. Lab.* 2002. V. 48. № 1–2. P. 61–71.
102. *Christensen T.T., Frystyk J., Poulsen P.L.* Comparison of plasma metanephrines measured by a commercial immunoassay and urinary catecholamines in the diagnosis of pheochromocytoma. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2011. V. 71. № 8. P. 695–700.
103. *Eisenhofer G.* Screening for pheochromocytomas and paragangliomas. // *Curr. Hypertens. Rep.* 2012. V. 14. № 2. P. 130–137.
104. *Pussard E., Chaouch A., Said T.* Radioimmunoassay of free plasma metanephrines for the diagnosis of catecholamine-producing tumors. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. V. 52. № 3. P. 437–444.
105. *Francis R.C.E., Pickerodt P.A., Salewski L., Boemke W., Höhne C.* Detection of catecholamines and metanephrines by radio-immunoassay in canine plasma. // *The Vet. J.* 2010. V. 183. № 2. P. 228–231.
106. *www.sileks.com*
107. *Spector S.* Catecholamine antigens and antibodies specific therefor. Patent USA, Int.01. C08G20/38; C08H1/00, 3.704.282, 1972.
108. *Peterson Z.D., Collins D.C., Bowerbank C.R., Lee M.L., Graves S.W.* Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002. V. 776. № 2. P. 221–229.
109. *Diao P., Yuan H., Huo F., Chen L., Xiao D., Paau M.C., Choi M.M.F.* A simple and sensitive CE method for the simultaneous determination of catecholamines in urine with in-column optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detection. // *Talanta.* 2011. V. 85. № 3. P. 1279–1284.
110. *Wang C.Q., Wang H., Liu Y.M.* Capillary electrophoresis with direct chemiluminescence detection for the analysis of catecholamines in human urine. // *Chin. Chem. Lett.* 2007. V. 18. № 4. P. 452–454.
111. *Xu X., Zhang H., Shi H., Ma C., Cong B., Kang W.* Determination of three major catecholamines in human urine by capillary zone electrophoresis with chemiluminescence detection. // *Anal. Biochem.* 2012. V. 427. № 1. P. 10–17.
112. *Miękus N., Kowalski P., Olędzka I., Plenis A., Bień E., Miękus A., Krawczyk M., Adamkiewicz-Drożyńska E., Bączek T.* Cyclodextrin-modified MEKC method for quantification

- of selected acidic metabolites of catecholamines in the presence of various biogenic amines. Application to diagnosis of neuroblastoma. // *J. Chromatogr. B.* 2015. V. 1003. P. 27–34.
113. *Kolobova E., Kartsova L., Kravchenko A., Bessonova E.* Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines. // *Talanta.* 2018. V. 188. P. 183–191.
114. *Kamahori M., Taki M., Watanabe Y., Miura J.* Analysis of plasma catecholamines by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: simple sample preparation for pre-column fluorescence derivatization. // *J. Chromatogr. B.* 1991. V. 567. № 2. P. 351–358.
115. *Komendová M., Metelka R., Urban J.* Monolithic capillary column with an integrated electrochemical detector. // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1509. P. 171–175.
116. *Ferreira F.D.P., Silva L.I.B., Freitas A.C., Rocha-Santosa T.A.P., Duarte A.C.* High performance liquid chromatography coupled to an optical fiber detector coated with laccase for screening catecholamines in plasma and urine. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 42. P. 7049–7054.
117. *Diniz M.E.R., Vilhena L.S., Paulo B.P., Barbosa T.C.C., Mateo E.C.* Simultaneous determination of catecholamines and metanephrines in urine by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry: successful clinical application. // *J. Braz. Chem. Soc.* 2015. V. 26. № 8. P. 1684–1691.
118. *Vuorensola K., Sirén H., Kostianen R., Kotiaho T.* Analysis of catecholamines by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis–nanospray mass spectrometry. Use of aqueous and non-aqueous solutions compared with physical parameters. // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 979. № 1–2. P. 179–189.
119. *Siméon N., Myers R., Bayle C., Nertz M., Stewart J.K., Couderc F.* Some applications of near-ultraviolet laser-induced fluorescence detection in nanomolar- and subnanomolar-range high-performance liquid chromatography or micro-high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 913. № 1–2. P. 253–259.
120. *Fujino K., Yoshitake T., Kehr J., Nohta H., Yamaguchi M.* Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1012. № 2. P. 169–177.
121. *Yoshitake T., Yoshitake S., Fujino K., Nohta H., Yamaguchi M., Kehr J.* High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex. // *J. Neurosci. Methods.* 2004. V. 140. № 1–2. P. 163–168.

122. Yoshitake T., Kehr J., Yoshitake S., Fujino K., Nohta H., Yamaguchi M. Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 807. № 2. P. 177–183.
123. Kehr J., Yoshitake T., Wang F.H., Wynick D., Holmberg K., Lendahl U., Bartfai T., Yamaguchi M., Hokfelt T., Ogren S.O. Microdialysis in freely moving mice: determination of acetylcholine, serotonin and noradrenaline release in galanin transgenic mice. // *J. Neurosci. Methods.* 2001. V. 109. № 1. P. 71–80.
124. Kehr J. Determination of catecholamines by automated pre-column derivatization and reversed-phase column liquid chromatography with fluorescence detection. // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 661. № 1–2. P. 137–142.
125. Nohta H., Watanabe T., Nagaoka H., Ohkura Y. Assay for peroxidase using 1,2-diarylethylenediamines and catechol compounds as fluorogenic substrates. // *Anal. Sci.* 1991. V. 7. № 3. P. 437–441.
126. Tsai C.H., Huang H.M., Lin C.H. Violet light emitting diode-induced fluorescence detection combined with on-line sample concentration techniques for use in capillary electrophoresis. // *Electrophoresis.* 2003. V. 24. № 17. P. 3083–3088.
127. Parrot S., Sauvinet V., Riban V., Depaulis A., Renaud B., Denoroy L. High temporal resolution for in vivo monitoring of neurotransmitters in awake epileptic rats using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. // *J. Neurosci. Methods.* 2004. V. 140. № 1–2. P. 29–38.
128. Huang H.M., Lin C.H. Methanol plug assisted sweeping-micellar electrokinetic chromatography for the determination of dopamine in urine by violet light emitting diode-induced fluorescence detection. // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 816. № 1–2. P. 113–119.
129. Xiong S.X., Han H.W., Zhao R., Chen Y., Liu G.Q. Capillary electrophoresis of catecholamines with laser-induced fluorescence intensified charge-coupled device detection. // *Biomed. Chromatogr.* 2001. V. 15. № 2. P. 83–88.
130. Zhang J.Y., Chen X.G., Hu Z.D., Ma X. Quantification of noradrenaline and dopamine in *Portulaca oleracea* L by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 471. № 2. P. 203–209.
131. Du M., Flanigan V., Ma Y.F. Simultaneous determination of polyamines and catecholamines in PC-12 tumor cell extracts by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. // *Electrophoresis.* 2004. V. 25. № 10–11. P. 1496–1502.

132. Wang H., Li J., Liu X., Yang T.X., Zhang H.S. *N*-hydroxysuccinimidyl fluorescein-*O*-acetate as a fluorescent derivatizing reagent for catecholamines in liquid chromatography. // *Anal. Biochem.* 2000. V. 281. № 1. P. 15–20.
133. Zhu X.L., Shaw P.N., Barrett D.A. Catecholamines derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole: characterization of chemical structure and fluorescence properties. // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 478. № 2. P. 259–269.
134. Tsunoda M., Takezawa K., Masuda M., Imai K. Rat liver and kidney catechol-*O*-methyltransferase activity measured by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. // *Biomed. Chromatogr.* 2002. V. 16. № 8. P. 536–541.
135. Tsunoda M., Mitsuhashi K., Masuda M., Imai K. Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid using high performance liquid chromatography-fluorescence detection and application to rat kidney microdialysate. // *Anal. Biochem.* 2002. V. 307. № 1. P. 153–158.
136. Hirano Y., Tsunoda M., Funatsu T., Imai K. Rapid assay for catechol-*O*-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 819. № 1. P. 41–46.
137. Tsunoda M., Imai K. An assay for determination of rat adrenal catechol-*O*-methyltransferase activity: Comparison of spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 380. № 7–8. P. 887–890.
138. Masuda M., Tsunoda M., Imai K. High-performance liquid chromatography-fluorescent assay of catechol-*O*-methyltransferase activity in rat brain. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 376. № 7. P. 1069–1073.
139. Wang H.Y., Hui Q.S., Xu L.X., Jiang J.G., Sun Y. Fluorimetric determination of dopamine in pharmaceutical products and urine using ethylenediamine as the fluorogenic reagent. // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 497. № 1–2. P. 93–99.
140. Yoshitake T., Fujino K., Kehr J., Ishida J., Nohta H., Yamaguchi M. Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. // *Anal. Biochem.* 2003. V. 312. № 2. P. 125–133.
141. Liu G., Chen J., Ma Y. Simultaneous determination of catecholamines and polyamines in PC-12 cell extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography with ultraviolet absorbance detection. // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 805. № 2. P. 281–288.
142. Zhu R., Kok W.T. Determination of catecholamines and related compounds by capillary electrophoresis with postcolumn terbium complexation and sensitized luminescence detection. // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. № 19. P. 4010–4016.

143. *Vickova M., Schwarz M.A.* Determination of cationic neurotransmitters and metabolites in brain homogenates by microchip electrophoresis and carbon nanotube-modified amperometry. // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1142. № 2. P. 214–221.
144. *Perry M., Li Q., Kennedy R.T.* Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 653. № 1. P. 1–22.
145. *Kachoosangi R.T., Compton R.G.* A simple electroanalytical methodology for the simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid using an unmodified edge plane pyrolytic graphite electrode. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 387. № 8. P. 2793–2800.
146. *Rodriguez M.C., Rubianes M.D., Rivas G.A.* Highly selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2008. V. 8. № 11. P. 6003–6009.
147. *Manbohi A., Ahmadi S.H.* Sensitive and selective detection of dopamine using electrochemical microfluidic paper-based analytical nanosensor. // *Sens. Biosensing Res.* 2019. V. 23. Article 100270.
148. *Li Y.X., Huang X., Chen Y.L., Wang L., Lin X.Q.* Simultaneous determination of dopamine and serotonin by use of covalent modification of 5-hydroxytryptophan on glassy carbon electrode. // *Microchim. Acta.* 2009. V. 164. № 1–2. P. 107–112.
149. *Yogeswaran U., Chen S.M.* Multi-walled carbon nanotubes with poly(methylene blue) composite film for the enhancement and separation of electroanalytical responses of catecholamine and ascorbic acid. // *Sens. Actuators B Chem.* 2008. V. 130. № 2. P. 739–749.
150. *Hu W.N., Sun D.M., Ma W.* Simultaneous electrochemical determination of dopamine and epinephrine with a silver-doped poly(L-glutamic acid) modified electrode. // *Chem. Anal.* 2008. V. 53. № 5. P. 703–716.
151. *Kang W.J., Niu L.M., Ma L.* 2,3-Dimercaptosuccinic acid self-assembled gold electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine. // *Chin. Chem. Lett.* 2012. V. 20. № 2. P. 221–224.
152. *Шайдарова Л.Г., Челнокова И.А., Романова Е.И., Гедмина А.В., Будников Г.К.* Совместное вольтамперометрическое определение дофамина и мочевой кислоты на электроде, модифицированном самоорганизующимся монослоем цистамина с наночастицами золота. // *Журн. Прикл. Хим.* 2011. Т. 84. № 2. С. 222–228.
153. *Шайдарова Л.Г., Гедмина А.В., Артамонова М.Л., Челнокова И.А., Будников Г.К.* Вольтамперометрическое определение дофамина по электрокаталитическому отклику электрода, модифицированного полианилиновой пленкой с включенным тетрасульфоталоцинином меди(II). // *Журн. аналит. хим.* 2013. Т. 68. № 6. С. 575–584.

154. Шайдарова Л.Г., Гедмина А.В., Челнокова И.А., Будников Г.К. Совместное вольтамперометрическое определение дофамина и аскорбиновой кислоты на электроде, модифицированном бинарной системой золото-палладий. // Журн. аналит. хим. 2009. Т. 64. № 1. С. 43–51.
155. Jiang G., Gu X., Jiang G., Chen T., Zhan W., Tian S. Application of a mercapto-terminated binuclear Cu(II) complex modified Au electrode to improve the sensitivity and selectivity for dopamine detection. // Sens. Actuators B Chem. 2015. V. 209. P. 122–130.
156. Chernyshov D., Shvedene N., Antipova E., Pletnev I. Ionic liquid-based miniature electrochemical sensors for the voltammetric determination of catecholamines. // Anal. Chim. Acta. 2008. V. 621. № 2. P. 178–184.
157. Mazloun-Ardakani M., Khoshroo A. High performance electrochemical sensor based on fullerene-functionalized carbon nanotubes/ionic liquid: Determination of some catecholamines. // Electrochem. Comm. 2014. V. 42. P. 9–12.
158. Elhag S., Ibupoto Z.H., Nur O., Willander M. Incorporating  $\beta$ -Cyclodextrin with ZnO nanorods: a potentiometric strategy for selectivity and detection of dopamine. // Sensors. 2014. V. 14. № 1. P. 1654–1664.
159. Si B., Song E. Molecularly imprinted polymers for the selective detection of multi-analyte neurotransmitters. // Microelectron. Eng. 2018. V. 187–188. P. 58–65.
160. Ling T.-R., Syu Y.Z., Tasi Y.-C., Chou T.-C., Liu C.-C. Size-selective recognition of catecholamines by molecular imprinting on silica–alumina gel. // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 21. № 6. P. 901–907.
161. Strand A.M., Venton B.J. Flame etching enhances the sensitivity of carbon-fiber microelectrodes. // Anal. Chem. 2008. V. 80. № 10. P. 3708–3715.
162. Anastassiou C.A., Patel B.A., Arundell M., Yeoman M.S., Parker K.H., O'Hare D. Subsecond voltammetric separation between dopamine and serotonin in the presence of ascorbate. // Anal. Chem. 2006. V. 78. № 19. P. 6990–6998.
163. Lin L., Chen J., Yao H., Chen Y., Zheng Y., Lin X. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at poly (Evans Blue) modified glassy carbon electrode. // Bioelectrochemistry. 2008. V. 73. № 1. P. 11–17.
164. Casella I.G., Gioia D., Rutilo M. A multi-walled carbon nanotubes/cellulose acetate composite electrode (MWCNT/CA) as sensing probe for the amperometric determination of some catecholamines. // Sens. Actuators B Chem. 2018. V. 255. P. 3533–3540.
165. Roy P.R., Saha M.S., Okajima T., Park S.-G., Fujishima A., Ohsakaa T. Selective detection of dopamine and its metabolite, DOPAC, in the presence of ascorbic acid using

diamond electrode modified by the polymer film. // *Electroanalysis*. 2004. V. 16. № 21. P. 1777–1784.

166. *Emran M.Y., Shenashen M.A., Mekawy M., Azzam A.M., Akhtar N., Gomaa H., Selim M.M., Faheem A., El-Safty S.A.* Ultrasensitive in-vitro monitoring of monoamine neurotransmitters from dopaminergic cells. // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 259. P. 114–124.

167. *Goyal R.N., Gupta V.K., Oyamab M., Bachheti N.* Gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode for the simultaneous determination of dopamine and serotonin: Application in pharmaceutical formulations and biological fluids. // *Talanta*. 2007. V. 72. № 3. P. 976–983.

168. *Hrdlička V., Navrátil T., Barek J.* Application of hollow fibre based microextraction for voltammetric determination of vanillylmandelic acid in human urine. // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 835. P. 130–136.

169. *Ensafi A.A., Taei M., Khayamian T., Arabzadeh A.* Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(sulfonazo iii) modified glassy carbon electrode. // *Sens. Actuators B Chem.* 2010. V. 147. № 1. P. 213–221.

170. *Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.* Amperometric determination of catecholamines by enzymatic biosensors in flow systems. // *Electroanalysis*. 2018. V. 30. № 6. P. 1163–1171.

171. *Ges I.A., Currie K.P.M., Baudenbacher F.* Electrochemical detection of catecholamine release using planar iridium oxide electrodes in nanoliter microfluidic cell culture volumes. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 34. № 1. P. 30–36.

172. *Hasebe Y., Hirano T., Uchiyama S.* Determination of catecholamines and uric acid in biological fluids without pretreatment, using chemically amplified biosensors. // *Sens. Actuators B Chem.* 1995. V. 24–25. № 1–3. P. 94–97.

173. *Sirén H., Mielonen M., Herlevi M.* Capillary electrophoresis in the determination of anionic catecholamine metabolites from patients' urine. // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1032. № 1–2. P. 289–297.

174. *Abdulrahman L.K., Al-Abachi A.M., Al-Qaissy M.H.* Flow injection-spectrophotometric determination of some catecholamine drugs in pharmaceutical preparations via oxidative coupling reaction with *p*-toluidine and sodium periodate. // *Anal. Chim. Acta*. 2005. V. 538. № 1–2. P. 331–335.

175. *Nevado J.J.B., Gallego J.M.L., Laguna P.B.* Spectrophotometric determination of catecholamines with metaperiodate by flow-injection analysis. // *Anal. Chim. Acta*. 1995. V. 300. № 1–3. P. 293–297.

176. *Sorouraddin M.H., Manzoori J.L., Kargarzadeh E., Shabani A.M.H.* Spectrophotometric determination of some catecholamine drugs using sodium bismuthate. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998. V. 18. № 4–5. P. 877–881.
177. *Saini A.S., Kumar J., Melo J.S.* Microplate based optical biosensor for *L*-Dopa using tyrosinase from *Amorphophallus campanulatus*. // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 849. P. 50–56.
178. *Gorbunova M.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Garshev A.V.* Formation of core-shell Au@Ag nanorods induced by catecholamines: A comparative study and an analytical application. // *Anal. Chim. Acta.* 2016. V. 936. P. 185–194.
179. *Zhu S., Yang J., Zhao X., Kong R., Wang H., You J.* Simple and fast determination of catecholamines in pharmaceutical samples using Ag<sup>+</sup>-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a colorimetric probe. // *Anal. Methods.* 2015. V. 7. № 16. P. 6785–6790.
180. *Knight A.W.* A review of recent trends in analytical applications of electrogenerated chemiluminescence. // *Trends Anal. Chem.* 1999. V. 18. № 1. P. 47–62.
181. *Fährnich K.A., Pravda M., Guilbault G.G.* Recent applications of electrogenerated chemiluminescence in chemical analysis. // *Talanta.* 2001. V. 54. № 4. P. 531–559.
182. *Takezawa K., Tsunoda M., Watanabe N., Imai K.* An automatic analyzer for catecholamines and their 3-*O*-methyl metabolites using a micro coulometric flow cell as a postcolumn reactor for fluorogenic reaction. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 17. P. 4009–4014.
183. *Tsunoda M., Takezawa K., Santa T., Imai K.* Simultaneous automatic determination of catecholamines and their 3-*O*-methyl metabolites in rat plasma by high-performance liquid chromatography using peroxyoxalate chemiluminescence reaction. // *Anal. Biochem.* 1999. V. 269. № 2. P. 386–392.
184. *Tsunoda M., Takezawa K., Yanagisawa T., Kato M., Imai K.* Determination of catecholamines and their 3-*O*-methyl metabolites in mouse plasma. // *Biomed. Chromatogr.* 2001. V. 15. № 1. P. 41–44.
185. *Tsunoda M., Nagayama M., Funatsu T., Hosoda S., Imai K.* Catecholamine analysis with microcolumn LC-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 366. № 1–2. P. 168–173.
186. *Yao H., Sun Y., Lin X., Cheng J.* Flow-injection chemiluminescence determination of catecholamines based on their enhancing effects on the luminol–potassium periodate system. // *Luminescence.* 2006. V. 21. № 2. P. 112–117.
187. *Yakabe T., Yoshida H., Nohta H., Yamaguchi M.* HPLC determination of catecholamines based on precolumn derivatization with 6-aminomethylphthalhydrazide followed by chemiluminescence detection. // *Anal. Sci.* 2002. V. 18. № 12. P. 1375–1378.

188. *Michałowski J., Halaćburda P.* Flow-injection chemiluminescence determination of epinephrine in pharmaceutical preparations using raw apple juice as enzyme source. // *Talanta*. 2001. V. 55. № 6. P. 1165–1171.
189. *Israël M., Tomasi M.* A chemiluminescent catecholamine assay: its application for monitoring adrenergic transmitter release. // *J. Neurosci. Methods*. 1999. V. 91. № 1–2. P. 101–107.
190. *Li B., Zhang Z., Jin Y.* Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling. // *Biosens. Bioelectron*. 2002. V. 17. № 6–7. P. 585–589.
191. *Wang H., Feng X.G., Zhang M., Zhao H.* Determination of Dopamine in Injections and Urine by an Enzyme-catalyzed Fluorescence Quenching Method. // *Anal. Sci*. 2007. V. 23. № 11. P. 1297–1300.
192. *Su R.G., Lin J.M., Qu F., Chen Z.F., Gao Y.H., Yamada M.* Capillary electrophoresis microchip coupled with on-line chemiluminescence detection. // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 508. № 1. P. 11–15.
193. *Zheng X.W., Guo Z.H., Zhang Z.J.* Flow-injection electrogenerated chemiluminescence determination of epinephrine using luminol. // *Anal. Chim. Acta*. 2001. V. 441. № 1. P. 81–86.
194. *Zhu L.D., Li Y.X., Zhu G.Y.* Flow injection determination of dopamine based on inhibited electrochemiluminescence of luminol. // *Anal. Lett*. 2002. V. 35. № 2. P. 2527–2537.
195. *Li F., Pang Y.Q., Lin X.Q., Cui H.* Determination of adrenaline by using inhibited  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  electrochemiluminescence. // *Anal. Chim. Acta*. 2002. V. 47. № 2. P. 187–194.
196. *Li F., Pang Y.Q., Lin X.Q., Cui H.* Determination of noradrenaline and dopamine in pharmaceutical injection samples by inhibition flow injection electrochemiluminescence of ruthenium complexes. // *Talanta*. 2003. V. 59. № 3. P. 627–636.
197. *Nalewajko E., Ramirez R.B., Kojło A.* Determination of dopamine by flow-injection analysis coupled with luminol-hexacyanoferrate (III) chemiluminescence detection. // *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2004. V. 36. № 1. P. 219–223.
198. *Sun Y.Y., Tang Y.H., Zheng X.H., Yao H., Xu Z.* Determination of catecholamines by flow injection chemiluminescence method based on their restraining effects on the luminol-potassium chlorate system. // *Anal. Lett*. 2004. V. 37. № 12. P. 2445–2458.
199. *Du J.X., Shen L.H., Lu J.R.* Flow injection chemiluminescence determination of epinephrine using epinephrine-imprinted polymer as recognition material. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 489. № 2. P. 183–189.

200. *Liu H., Zhang L., Zhou J., Hao Y., He P., Fang Y.* Flow injection chemiluminescence determination of dobutamine hydrochloride injection using luminol–ferricyanide/ferrocyanide system. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 541. № 1–2. P. 125–129.
201. *Zhou G.J., Zhang G.F., Chen H.Y.* Development of integrated chemiluminescence flow sensor for the determination of adrenaline and isoprenaline. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 463. № 2. P. 257–263.
202. *Hu Y., Li X., Pang Z.* Indirect chemiluminescence detection for capillary zone electrophoresis of monoamines and catechol using luminol- $K_3[Fe(CN)_6]$  system. // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1091. № 1–2. P. 194–198.
203. *Adcock J.L., Barnett N.W., Costin J.W., Francis P.S., Lewis S.W.* Determination of selected neurotransmitter metabolites using monolithic column chromatography coupled with chemiluminescence detection. // *Talanta.* 2005. V. 67. № 3. 585–589.
204. *Su Y.Y., Wang J.A., Chen G.N.* Determination of epinephrine based on its enhancement for electrochemiluminescence of lucigenin. // *Talanta.* 2005. V. 65. № 2. P. 531–536.
205. *Cakal C., Ferrance J.P., Landers J.P., Caglar P.* Microchip extraction of catecholamines using a boronic acid functional affinity monolith. // *Anal. Chim. Acta.* 2011. V. 690. № 1. P. 94–100.
206. *Altun M., Cakal C., Caglar P.* The development of methacrylic acid based monolithic discs used in the microfluidic chips for in the determination of catecholamines. // *Sens. Actuators B Chem.* 2015. V. 208. P. 164–172.
207. *Hsieh M., Hsu C., Tseng W., Chang H.* Amplification of small analytes in polymer solution by capillary electrophoresis. // *Electrophoresis.* 2002. V. 23. № 11. P. 1633–1641.
208. *Hsieh M., Chang H.* Discontinuous electrolyte systems for improved detection of biologically active amines and acids by capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection. // *Electrophoresis.* 2005. V. 26. № 1. P. 187–195.
209. *Kuo I.T., Huang Y.F., Chang H.T.* Silica nanoparticles for separation of biologically active amines by capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection. // *Electrophoresis.* 2005. V. 26. № 13. P. 2643–2651.
210. *Wood A.T., Hall M.R.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection. // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000. V. 744. № 1. P. 221–225.
211. *Wang H.Y., Sun Y., Tang B.* Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry. // *Talanta.* 2002. V. 57. № 5. P. 899–907.

212. *Pagel P., Blome J., Wolf H.U.* High-performance liquid chromatographic separation and measurement of various biogenic compounds possibly involved in the pathomechanism of Parkinson's disease. // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000. V. 746. № 2. P. 297–304.
213. *Balaji J., Reddy C.S., Kaushalya S.K., Maiti S.* Microfluorometric detection of catecholamines with multiphoton-excited fluorescence. // *Appl. Optics.* 2004. V. 43. № 12. P. 2412–2417.
214. *Aoyama N., Tsunoda M., Imai K.* Improved assay for catechol-O-methyltransferase activity utilizing norepinephrine as an enzymatic substrate and reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. // *J. Chromatogr. A* 2005. V. 1074. № 1–2. P. 47–51.
215. *Tong W., Yeung E.S.* On-column monitoring of secretion of catecholamines from single bovine adrenal chromaffin cells by capillary electrophoresis. // *J. Neurosci. Methods.* 1997. V. 76. № 2. P. 193–201.
216. *Zhang X., Sweedler J.* Ultraviolet native fluorescence detection in capillary electrophoresis using a metal vapor NeCu laser. // *An. Chem.* 2001. V. 73. № 22. P. 5620–5624.
217. *Paquettea D.M., Singb R., Banksa P.R., Waldronb K.C.* Capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection for profiling body fluids. // *J. Chromatogr. B.* 1998. V. 714. № 1. P. 47–57.
218. *Robert F., Bert L., Denoroy L., Renaudt B.* Capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for the determination of nanomolar concentrations of noradrenaline and dopamine: application to brain microdialysate analysis. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. № 11. P. 1838–1844.
219. *De Benedetto G.E., Fico D., Pennetta A., Malitesta C., Nicolardi G., Lofrumento D.D., De Nuccio F., La Pesa V.* A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. V. 98. P. 266–270.
220. *Muzzi C., Bertocci E., Terzuoli L., Porcelli B., Ciari I., Pagani R., Guerranti R.* Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and *α*-methyldopa by HPLC. // *Biomed. Pharm.* 2008. V. 62. № 4. P. 253–258.
221. *Fonseca B.M., Rodrigues M., Cristóvão A.C., Gonçalves D., Fortuna A., Bernardino L., Falcão A., Alvesa G.* Determination of catecholamines and endogenous related compounds in rat brain tissue exploring their native fluorescence and liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1049–1050. P. 51–59.

222. *Tsunoda M.* Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. № 3. P. 506–514.
223. *Ragab G.H., Nohta H., Zaitso K.* Chemiluminescence determination of catecholamines in human blood plasma using 1,2-bis(3-chlorophenyl)ethylenediamine as pre-column derivatizing reagent for liquid chromatography. // *Anal. Chim. Acta.* 2000. V. 403. № 1–2. P. 155–160.
224. *Jinghe Y., Guiling. Z., Xia W., Fang H., Cunguo L.* Fluorimetric determination of epinephrine with *o*-phenylenediamine. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 363. № 1. P. 105–110.
225. *Descombes A.A., Haerdi W.* HPLC Separation of catecholamines after derivatization 9-fluorenylmethyl chloroformate. // *Chromatographia.* 1992. V. 33. № 1–2. P. 83–86.
226. *Zhang Q., Gong M.* On-line preconcentration of fluorescent derivatives of catecholamines in cerebrospinal fluid using flow-gated capillary electrophoresis. // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1450. P. 112–120.
227. *Kundu S., Ghosh S.K., Mandal M., Pal A., Pal T.* Fluorimetric determination of dopamine via its derivatization with 1,2-phenylenediamine. // *J. Indian. Chem. Soc.* 2004. V. 81. № 10. P. 868–873.
228. *Huang X., Guo X.-F., Wang H., Zhang H.-S.* Analysis of catecholamines and related compounds in one whole metabolic pathway with high performance liquid chromatography based on derivatization. // *Arab. J. Chem.* 2014. In press.
229. *Mitsui A., Nohta H., Ohkura Y.* High-Performance Liquid Chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatisation reagent. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 344. P. 61–70.
230. *Seki T., Yamaguchi Y.* Fluorimetric determination of catecholamines using glycylglycine as the reagent for post-column derivatization. // *J. Chromatogr.* 1984. V. 287. P. 407–412.
231. *Веселова И.А., Шеховцова Т.Н., Родионов П.В.* Способ получения флуоресцирующих производных катехоламинов и их метаболитов методом дериватизации. // Патент России № 2546672. 2015. Бюл. № 10.
232. *Fiorentino D., Gallone A., Fiocco D., Palazzo G., Mallardi A.* Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for *o*-diphenols. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. № 9. P. 2033–2037.
233. *Rodionov P.V., Veselova I.A., Shekhovtsova T.N.* A solid-phase fluorescent biosensor for the determination of phenolic compounds and peroxides in samples with complex matrices. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 5. P. 1531–1540.
234. *Seto D., Maki T., Soh N., Nakano K., Ishimatsu R., Imato T.* A simple and selective fluorometric assay for dopamine using a calcein blue-Fe<sup>2+</sup> complex fluorophore. // *Talanta.* 2012. V. 94. P. 36–43.

235. Kamruzzamana M., Alama Al.-M., Lee S.H., Kim Y.H., Kim S.H. A terbium-sensitized spectrofluorimetric method for determination of catecholamines in a serum sample with micelle medium. // *Luminescence*. 2012. V. 27. № 1. P. 84–90.
236. Alam A.-M., Kamruzzaman M., Lee S.H., Kim Y.H., Kim S.Y., Kim G. M., Jo H.J., Kim S.H. Determination of catecholamines based on the measurement of the metal nanoparticle-enhanced fluorescence of their terbium complexes. // *Microchim. Acta*. 2012. V. 176. № 1–2. P. 153–161.
237. Qu K., Wang J., Ren J., Qu X. Carbon dots prepared by hydrothermal treatment of dopamine as an effective fluorescent sensing platform for the label-free detection of iron(III) ions and dopamine. // *Chem. Eur. J.* 2013. V. 19. № 22. P. 7243–7249.
238. Si H., Zhao F., Cai H. Investigation on the co-luminescence effect of europium (III)–lanthanum(III)–dopamine–sodium dodecylbenzene sulfonate system and its application. // *Luminescence*. 2013. V. 28. № 4. P. 510–515.
239. Zhu H., Ge X., Jiang C. Spectrofluorimetric determination of dopamine using chlorosulfonylthenoyltrifluoroacetone–europium probe. // *J. Fluoresc.* 2007. V. 17. № 6. P. 655–661.
240. Chen M., Zheng Y., Gao J., Li C., Yu C., Wang Q. Fluorometric determination of dopamine by using a terbium (III) inorganic-organic network. // *Microchim. Acta*. 2017. V. 184. № 7. P. 2275–2280.
241. Guo Y., Yang J., Wu X., Mao H. Study on the co-luminescence effect of Tb–Gd–epinephrine system and its application to the sensitive determination of epinephrine at nanomol level. // *Talanta*. 2007. V. 73. № 2. P. 227–231.
242. Fotopoulou M.A., Ioannou P.C. Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. // *Anal. Chim. Acta*. 2002. V. 462. № 2. P. 179–185.
243. Shaghghi M., Manzoori J.L., Jouyban A. Development of a simple and sensitive terbium sensitized fluorescence method for determination of epinephrine and norepinephrine in serum. // *Iran. J. Pharm. Sci.* 2007. V. 3. № 2. P. 111–122.
244. Li H., Shen J., Cui R., Sun C., Zhao Y., Wu X., Li N., Tang B. A highly selective and sensitive fluorescence nanosensor for dopamine based on formate bridged Tb(III) complex and silver nanoparticles. // *Analyst*. 2017. V. 142. № 22. P. 4240–4246.
245. Li H., Wu X. Silver nanoparticles-enhanced rare-earth co-luminescence effect of Tb (III)–Y(III)–dopamine system. // *Talanta*. 2015. V. 138. P. 203–208.
246. Shen J, Sun C., Wu. X. Silver nanoprisms-based Tb (III) fluorescence sensor for highly selective detection of dopamine. // *Talanta*. 2016. V. 165. P. 369–376.

247. *Gerelkhuu Z., Jung D., Huy B.T., Tawfik S.M., Conte M.L., Conte E.D., Lee Y.-I.* Highly selective and sensitive detection of catecholamines using NaLuGdF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup> upconversion nanoparticles decorated with metal ions. // *Sens. Actuators B Chem.* 2019. V. 284. P. 172–178.
248. *Usha R., Rajaram A., Ramasami T.* Stability of collagen in the presence of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA). // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2009. V. 97. № 1. P. 34–39.
249. *Gade J.N.* The Mechanism of type I collagen crosslinking with catechol derivatives. Dis. Ph. D. OHSU, 1989. P. 202.
250. *Woerly S., Marchand R.* A fluorescence histochemical method for the demonstration of central catecholamine neurons in young embryonic tissues. // *Brain Res.* 1989. V. 495. № 2. P. 377–381.
251. *Chen J., Li Y., Huang Y., Zhang H., Chen X., Qiu H.* Fluorometric dopamine assay based on an energy transfer system composed of aptamer-functionalized MoS<sub>2</sub> quantum dots and MoS<sub>2</sub> nanosheets. // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. № 58. P. 1–9.
252. *Nikolelis D., Drivelos D., Simantiraki M., Koinis S.* An optical spot test for the detection of dopamine human urine using stabilized in air lipid films. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 8. P. 2174–2180.
253. *Tsuzuki H., Kitani K., Imai K., Tamura Z.* Fluorometric determination of catecholamines on a three-phase thin-layer plate. // *Chem. Pharm. Bul.* 1972. V. 20. № 9. P. 1931–1934.
254. *Poliakov A.E., Dumshakova A.V., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N.* A peroxidase-based method for the determination of dopamine, adrenaline, and  $\alpha$ -methyldopa in the presence of thyroid hormones in pharmaceutical forms. // *Talanta.* 2011. V. 84. № 3. P. 710–716.
255. *Huang H., Gao Y., Shi F., Wang G., Shah S.M., Su X.* Determination of catecholamine in human serum by a fluorescent quenching method based on a water-soluble fluorescent conjugated polymer-enzyme hybrid system. // *Analyst.* 2012. V. 137. № 6. P. 1481–1486.
256. *Liu C., Yu C., Tseng W.* Fluorescence assay of catecholamines based on the inhibition of peroxidase-like activity of magnetite nanoparticles. // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 745. P. 143–148.
257. *Zhou X., Ma P., Wang A., Yu C., Qian T., Wu S., Shen J.* Dopamine fluorescent sensors based on polypyrrole/graphene quantum dots core/shell hybrids. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 64. P. 404–410.
258. *Ghasemi F., Hormozi-Nezhad M.R., Mahmoudi M.* Identification of catecholamine neurotransmitters using fluorescence sensor array. // *Anal. Chim. Acta.* 2016. V. 917. P. 85–92.
259. *Baluta S., Cabaj J., Malecha K.* Neurotransmitter's detection using a fluorescence-based sensor with graphene quantum dots. // *Opt. Appl.* 2017. V. 47. № 2. P. 225–231.

260. *Li H., Wijekoon A., Leipzig N.* Encapsulated neural stem cell neuronal differentiation in fluorinated methacrylamide chitosan hydrogels. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2014. V. 42. № 7. P. 1456–1469.
261. *Govindaraju S., Ankireddy S., Viswanath B., Kim J., Yun K.* Fluorescent gold nanoclusters for selective detection of dopamine in cerebrospinal fluid. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 1–12.
262. *Ma Y., Yang C., Li N., Yang, X.* A sensitive method for the detection of catecholamine based on fluorescence quenching of CdSe nanocrystals. // *Talanta.* 2005. V. 67. № 5. P. 979–983.
263. *Tao Y., Lin Y., Ren J., Qu X.* A dual fluorometric and colorimetric sensor for dopamine based on BSA-stabilized Au nanoclusters. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 42. № 1. P. 41–46.
264. *Wu H., Cheng T., Tseng W.* Phosphate-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles for selective detection of dopamine, levodopa, adrenaline, and catechol based on fluorescence quenching. // *Langmuir.* 2007. V. 23. № 18. P. 7880–7885.
265. *Soleymani J.* Advanced materials for optical sensing and biosensing of neurotransmitters. // *Trends Anal. Chem.* 2015. V. 72. P. 27–44.
266. *Ribeiro J.A., Fernandes P.M.V., Pereira C.M., Silva F.* Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters: A review. // *Talanta.* 2016. V. 160. P. 653–679.
267. *Chen J., Huang H., Zeng Y., Tang H., Li L.* A novel composite of molecularly imprinted polymer-coated PdNPs for electrochemical sensing norepinephrine. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 65. P. 366–374.
268. *Rezaei B., Boroujeni M.K., Ensafi A.A.* Fabrication of DNA, *o*-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer electrochemical sensor for the determination of dopamine. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 66. P. 490–496.
269. *Nikolelis D.P., Petropoulou S.-S.E.* Investigation of interactions of a resorcin[4]arene receptor with bilayer lipid membranes (BLMs) for the electrochemical biosensing of mixtures of dopamine and ephedrine. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1558. № 2. P. 238–245.
270. *Sanghavi B.J., Mobin S.M., Mathur P., Lahiri G.K., Srivastava A.K.* Biomimetic sensor for certain catecholamines employing copper(II) complex and silver nanoparticle modified glassy carbon paste electrode. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 39. № 1. P. 124–132.
271. *Yuan D., Chen S., Yuan R., Zhang J., Liu X.* An ECL sensor for dopamine using reduced graphene oxide/multiwallcarbon nanotubes/gold nanoparticles. // *Sens. Actuators B Chem.* 2014. V. 191. P. 415–420.

272. *Forzani E.S., Li X.L., Tao N.J.* Hybrid amperometric and conductometric chemical sensor based on conducting polymer nanojunctions. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. № 14. P. 5217–5224.
273. *Quan D., Shin W.* Amperometric detection of catechol and catecholamines by immobilized laccase from DeniLite. // *Electroanalysis.* 2004. V. 16. № 19. P. 1576–1582.
274. *Miscoria S.A., Barrera G.D., Rivas G.A.* Enzymatic biosensor based on carbon paste electrodes modified with gold nanoparticles and polyphenol oxidase. // *Electroanalysis.* 2005. V. 17. № 17. P. 1578–1582.
275. *Zachek M.K., Hermans A., Wightman R.M., McCarty G.S.* Electrochemical dopamine detection: comparing gold and carbon fiber microelectrodes using background subtracted fast scan cyclic voltammetry. // *J. Electroanal. Chem.* 2008. V. 614. № 1–2. P. 113–120.
276. *Atta N.F., El-Kady M.F., Galal A.* Palladium nanoclusters-coated polyfuran as a novel sensor for catecholamine neurotransmitters and paracetamol. // *Sens. Actuators B Chem.* 2009. V. 141. № 2. P. 566–574.
277. *Gao N., Xu Z., Wang F., Dong S.J.* Sensitive biomimetic sensor based on molecular imprinting at functionalized indium tin oxide electrodes. // *Electroanalysis.* 2007. V. 19. № 16. P. 1655–1660.
278. *Atta N.F., El-Ads E.H., Ahmed Y.M., Galal A.* Determination of some neurotransmitters at cyclodextrin/ionic liquid crystal/graphene composite electrode. // *Electrochim. Acta.* 2016. V. 199. P. 319–331.
279. *Tembe S., Karve M., Inamdar S., Haram S., Melo J., D'Souza S.F.* Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 349. № 1. P. 72–77.
280. *Morawski F.M., Deon M., Nicolodi S., Menezes E.W., Costa T.M.H., Dias S.L.P., Benvenutti E.V., Arenas L.T.* Magnetic silica/titania xerogel applied as electrochemical biosensor for catechol and catecholamines. // *Electrochim. Acta.* 2018. V. 264. P. 319–328.
281. *Godoy-Reyes T.M., Costero A.M., Gaviña P., Martínez-Mañez R., Sancenón F.* Colorimetric detection of normetanephrine, a pheochromocytoma biomarker, using bifunctionalised gold nanoparticles. // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1056. P. 146–152.
282. *Zheng Y., Wang Y., Yang X.* Aptamer-based colorimetric biosensing of dopamine using unmodified gold nanoparticles. // *Sens. Actuators B Chem.* 2011. V. 156. № 1. P. 95–99.
283. *Wang Y., Wang S., Tao L., Min Q., Xiang J., Wang Q., Xie J., Yue Y., Wu S., Li X., Ding H.* A disposable electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine and serotonin in rat cerebrospinal fluid based on MWNTs-ZnO/chitosan composites modified screen-printed electrode. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 65. P. 31–38.

284. *Chasta R.H., Goyal R.N.* Molecularly imprinted sensor based on *o*-aminophenol for the selective determination of norepinephrine in pharmaceutical and biological samples. // *Talanta*. 2014. V. 125. P. 167–173.
285. *Shi Y., Pang Y., Huang N., Sun C., Pan Y., Cheng Y., Long Y., Zheng H.* Competitive method for fluorescent dopamine detection in cerebrospinal fluid based on the peroxidase-like activity of ficin. // *Spectrochim. Acta A*. 2019. V. 209. P. 8–13.
286. *Thayyath S.A., Sheeba A., Aswathy L.* Surface modified multiwalled carbon nanotube based molecularly imprinted polymer for the sensing of dopamine in real samples using potentiometric method. // *Polymer*. 2014. V. 55. № 19. P. 4820–4831.
287. *Wang K., Liu P., Ye Y., Li J., Zhao W., Huang X.* Fabrication of a novel laccase biosensor based on silica nanoparticles modified with phytic acid for sensitive detection of dopamine. // *Sens. Actuators B Chem*. 2014. V. 197. P. 292–299.
288. *Melnikov A.A., Scholtens D.M., Wiley E.L., Khan S.A., Levenson V.V.* Array-Based Multiplex Analysis of DNA Methylation in Breast Cancer Tissues. // *J. Mol. Diagn*. 2008. V. 10. № 1. P. 93–101.
289. *Laxman B., Morris D.S., Yu J., Siddiqui J., Cao J., Mehra R., Lonigro R.J., Tsodikov A., Wei J.T., Tomlins S.A., Chinnaiyan A.M.* A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. // *Cancer Res*. 2008. V. 68. № 3. P. 645–649.
290. *www.thermofisher.com*
291. *Elshal M.F., McCoy J.P.* Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. // *Methods*. 2006. V. 38. № 4. P. 317–323.
292. *Lee Y.-N., Okumura K., Horio T., Iwata T., Takahashi K., Hattori T., Sawada K.* A bio-image sensor for simultaneous detection of multi-neurotransmitters. // *Talanta*. 2018. V. 179. P. 569–574.
293. *Kasera S., Herrmann L.O., del Barrio J., Baumberg J.J., Scherman O.A.* Quantitative multiplexing with nano-self-assemblies in SERS. // *Sci. Rep*. 2014. V. 4. № 6785. P. 1–6.
294. *Moriarty M., Lee A., O'Connell B., Kelleher A., Keeley H., Furey A.* Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder. // *Anal. Bioanal. Chem*. 2011. V. 401. № 8. P. 2481–2494.
295. *Grouzmann E., Lamine F.* Determination of catecholamines in plasma and urine. // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2013. V. 27. № 5. P. 713–723.
296. *Wightman R.M., Finnegan J.M., Pihel K.* Monitoring catecholamines at single cells. // *Trends Anal. Chem*. 1995. V. 74. № 4. P. 154–158.

297. *Jenei-Lanzl Z., Capellino S., Kees F., Fleck M., Lowin T., Straub R.H.* Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. // *Ann. Rheum. Dis.* 2015. V. 74. № 2. P. 444–451.
298. *Freeman J.G., Ryan J.J., Shelburne C.P., Bailey D.P., Bouton L.A., Narasimhachari N., Domen J., Simeón N., Couderc F., Stewart J.K.* Catecholamines in murine bone marrow derived mast cells. // *J. Neuroimmunol.* 2001. V. 119. № 2. P. 231–238.
299. *www.helix.ru*
300. *Park H., Paeng I.R.* Development of direct competitive enzyme-linked aptamer assay for determination of dopamine in serum. // *Anal. Chim. Acta.* 2011. V. 685. № 1. P. 65–73.
301. *Kannan P., John S.A.* Ultrasensitive detection of *L*-cysteine using gold-5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole core-shell nanoparticles film modified electrode. // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 30. № 1. P. 276–281.
302. *Weng Q., Xu G., Yuan K, Tang P.* Determination of monoamines in urine by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking and amperometric detection. // *J. Chromatogr. B.* 2006. V. 835. № 1–2. P. 55–61.
303. *Wang H.Y., Hui Q.S., Xu L.X., Jiang J.G., Sun Y.* Fluorimetric determination of dopamine in pharmaceutical products and urine using ethylene diamine as the fluorogenic reagent. // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 497. № 1–2. P. 93–99.
304. *Saracino M.A., Santarcangelo L., Raggi M.A., Mercolini L.* Microextraction by packed sorbent (MEPS) to analyze catecholamines in innovative biological samples. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 104. P. 122–129.
305. *Nikolajsen R.P.H, Hansen Å.M.* Analytical methods for determining urinary catecholamines in healthy subjects. // *Anal. Chim. Acta.* 2001. V. 449. № 1–2. P. 1–15.
306. *Grossi G., Bargossi A. M., Lucarelli C., Paradisi R., Sprovieri C., Provieri G.* Improvements in automated analysis of catecholamine and related metabolites in biological samples by column-switching high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 541. № 1–2. P. 273–284.
307. *Pastoris A., Cerutti L., Sacco R., De Vecchi L., Sbaffi A.* Automated analysis of urinary catecholamines by high-performance liquid chromatography and on-line sample pretreatment. // *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 1995. V. 664. № 2. P. 287–293.
308. *Brandsteterova E., Kubalec P., Krajnak K., Skacani I.* SPE-HPLC determination of catecholamines using an affinity principle. // *Neoplasma.* 1996. V. 43. № 2. P. 107–112.
309. *Hansen Å.M., Kristiansen J., Nielsen J.L., Byrialsen, K., Christensen J.M.* Validation of a high performance liquid chromatography analysis for the determination of noradrenaline and

- adrenaline in human urine with an on-line sample purification. // *Talanta*. 1999. V. 50. № 2. P. 367–379.
310. *Smith E.A., Schwartz A.L., Lucot J.B.* Measurement of urinary catecholamines in small samples for mice. // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2013. V. 67. № 1. P. 45–49.
311. *Li W., Rossi D.T., Fountain S.T.* Development and validation of a semi-automated method for *L*-dopa and dopamine in rat plasma using electrospray LC/MS/MS. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000. V. 24. № 2. P. 325–333.
312. *Neubecker T.A., Coombs M.A., Quijano M., O'Neill T.P., Cruze C.A., Dobson R.L.* Rapid and selective method for norepinephrine in rat urine using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B*. 1998. V. 718. № 2. P. 225–233.
313. *Wang Y., Fice D.S., Yeung P.K.F.* A simple high-performance liquid chromatography assay for simultaneous determination of plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999. V. 21. № 3. P. 519–525.
314. *Tsuchiya H., Koike T., Hayashi T.* On-line purification for the determination of catecholamines by liquid chromatography. // *Anal. Chim. Acta*. 1989. V. 218. P. 119–127.
315. *Zhou X., Zhu A., Shi G.* Selective extraction and analysis of catecholamines in rat bloodmicrodialysate by polymeric ionic liquid-diphenylboric acid-packed capillary column and fast separation in high-performance liquid chromatography-electrochemical detector. // *J. Chromatogr. A*. 2015. V. 1409. P. 125–131.
316. *Talwar D., Williamson C., McLaughlin A., Gill A., O'Reilly D.St.J.* Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using C<sub>18</sub> solid-phase extraction sorbent and high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B*. 2002. V. 769. № 2. P. 341–349.
317. *Llaveró M.P., Rubio S., Gomez-Hens A., Perez Bendito D.* Improved trihydroxyindole method for the simultaneous stopped-flow spectrofluorimetric determination of epinephrine and norepinephrine in urine. // *Anal. Chim. Acta*. 1990. V. 229. P. 27–33.
318. *Li Y., Xie Y., Qin Y.* Polymeric membrane sensors with boronic acid functionalized boron dipyrromethene for selective measurement of dopamine. // *Sens. Actuators B Chem.* 2014. V. 191. P. 227–232.
319. *Oshima T., Oishi K., Ohto K., Inoue K.* Extraction of catecholamines by calixarene carboxylic acid derivatives. // *J. Incl. Phenom.* 2006. V. 55. № 1–2. P. 79–85.
320. *Jha R.R., Singh C., Pant A.B., Patel D.K.* Ionic liquid based ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of 15 neurotransmitters in rat brain, plasma and cell samples. // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1005. P. 43–53.

321. Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots. Isolation and physical properties. // J. Biol. Chem. 1966. V. 249. № 9. P. 2166–2172.
322. Сладков А.З. Таблицы буферных растворов. // Заводск. Лаб. 1969. Т. 35. № 9. С. 1146–1148.
323. Кольтгофф И.М., Сендел Е.Б. Количественный анализ. // М.: Госхимиздат. 1948. С. 312–316.
324. Tuck M.K., Chan D.W., Chia D., Godwin A.K., Grizzle W.E., Krueger K.E., Rom W., Sanda M., Sorbara L., Stass S., Wang W., Brenner D.E. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. // J. Proteome. Res. 2009. V. 8. № 1. P. 113 – 117.
325. Gurtuvenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethylsulfoxide. // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 6. № 111. P. 10453–10460.
326. Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д., Уразова О.И. Патофизиология. // М.: ГЭОТАР-Медиа. 2009. Т. 2. С. 640.
327. Гармаш А.В., Сорокина Н.М. Метрологические основы аналитической химии. // М.: МГУ им. М. В. Ломоносова. 2017.
328. Bader M. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. // J. Chem. Educ. 1980. V. 57. № 10. P. 703–706.
329. Nohta H., Lee M.-K., Ohkura Y. Fluorescent products of the reaction for the determination of catecholamines with 1,2-diphenylethylenediamine. // Anal. Chim. Acta. 1992. V. 267. № 1. P. 137–139.
330. Liu L., Wakamatsu K., Ito S., Williamson P. R. Catecholamine oxidative products, but not melanin, are produced by *Cryptococcus neoformans* during neuropathogenesis in mice. // Infect. Immun. 1999. V. 67. № 1. P. 108–112.
331. Яблоцкий К. В. Новые аспекты применения нативной и иммобилизованной пероксидазы хрена для определения ее ингибиторов и субстратов. Дис. канд. хим. Наук. Москва: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2010. С. 186.
332. Chang H.T., Yeung E.S. Determination of catecholamines in single adrenal medullary cells by capillary electrophoresis and laser-induced native fluorescence. // Anal. Chem. 1995. V. 67. № 6. P. 1079–1083.
333. Takezawa K., Tsunoda M., Murayama K., Santa T., Imai K. Automatic semi-microcolumn liquid chromatographic determination of catecholamines in rat plasma utilizing peroxyoxalate chemiluminescence reaction. // Analyst. 2000. V. 125. P. 293–296.

334. *Roberts G.A.* Structure of chitin and chitosan. *Chitin Chemistry.* // Springer. 1992. P. 1–53.
335. *Veselova I.A., Malinina L.I., Rodionov P.V., Shekhovtsova T.N.* Properties and analytical applications of the self-assembled complex {peroxidase–chitosan}. // *Talanta.* 2012. V. 102. P. 101–109.
336. *Gebicka L., Gebicki J.* Dimethyl sulfoxide rather than superoxide is the reactive species in horseradish peroxidase –  $\text{KO}_2/\text{DMSO}$  system. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. V. 37. № 5. P. 1021–1026.
337. *Huang C., Chen H., Qiaohong H.* Determination of adrenaline in pharmaceutical preparations by flow injection photochemical spectrofluorimetry. // *Canadian J. Anal. Sci. Spectr.* 2004. V. 49. № 5. P. 296–301.
338. *Alteriis E., Parascandola P., Pecorella M.A., Scard V.* Effect of gelatin-immobilization on the catalytic activity of enzymes and microbial cells. // *Biotechnol. Tech.* 1988. V. 2. № 3. P. 205–210.
339. *Yang Y.J., Li W.* CTAB functionalized grapheme oxide/multiwalled carbon nanotube composite modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 56. P. 300–306.
340. *Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E.* The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology. // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 45. № 17. P. 1827–1879.
341. *Yeo G.F.* A manual of physiology. // Whitefish: Kessinger Publishing LLC. 2007.
342. *Mirzajani A.R.* Simultaneous determination of phenytoin, barbital and caffeine in pharmaceuticals by absorption (zero-order) UV spectra and first-order derivative spectra – multivariate calibration methods. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. V. 38. № 3. P. 420–427.
343. *Mozo-Villarías A.* Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2002. V. 50. № 2–3. P. 163–178.
344. *Valcárcel M., Gómez-Hens A., Rublo S.* Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in urine by derivative synchronous fluorescence spectroscopy. // *Clin. Chem.* 1985. V. 31. № 11. P. 1790–1794.
345. *Murillo J.A., García L.F.* Application of first derivative fluorescence spectrometry to the simultaneous determination of paracetamol and salicylamide in pharmaceuticals. // *Anal. Lett.* 1996. V. 29. № 3. P. 423–438.
346. *Soliman S.M., El-Agizy H.M.Y., Bayoumi A.A.* Derivative synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of dapoxetine hydrochloride and vardenafil in binary mixtures. // *J. Appl. Spectrosc.* 2014. V. 81. № 3. P. 509–518.

347. *El-Ghazaly M.A., Sadik N.A., Rashed E.R., Abd-El-Fattah A.A.* Neuroprotective effect of EGb761® and low-dose whole-body  $\gamma$ -irradiation in a rat model of Parkinson's disease. // *Toxicol. Ind. Health.* 2015. V. 31. № 12. P. 1128–1143.
348. *Ferrari-Amorotti G., Fragliasso V., Esteki R., Prudente Z., Soliera A.R., Cattelani S., Manzotti G., Grisendi G., Dominici M., Pieraccioli M., Raschellà G., Chiodoni C., Colombo M.P., Calabretta B.* Inhibiting interactions of lysine demethylase LSD1 with snail/slug blocks cancer cell invasion. // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 1. P. 235–245.
349. *Lent C.M., Zundel D., Freedman E., Groome J.R.* Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioral effects. // *J. Comp. Physiol. A.* 1991. V. 168. № 2. P. 191–200.
350. *Feher J.J.* Quantitative human physiology: An introduction. // Academic Press. 2012.
351. [https://www.rose-hulman.edu/~brandt/Chem330/EndocrineNotes/Chapter\\_4\\_Adrenal\\_Medulla.pdf](https://www.rose-hulman.edu/~brandt/Chem330/EndocrineNotes/Chapter_4_Adrenal_Medulla.pdf)
352. *Судоров А.В.* Физиология межклеточной. // Минск: БГУ. 2008.
353. *McCorry L.K.* Physiology of the Autonomic Nervous System. // *Am. J. Pharm. Educ.* 2007. V. 71. № 4. Article 78. P. 1–11.
354. *Roberts T., De Boni U., Sefton M.V.* Dopamine secretion by PC12 cells microencapsulated in a hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate copolymer. // *Biomaterials.* 1996. V. 17. № 3. P. 267–275.
355. *Takashima A., Koike T.* Relationship between dopamine content and its secretion in PC12 cells as a function of cell growth. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 847. № 1. P. 101–107.
356. *Seo D., Patrick C.J., Kennealy P.J.* Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and its Comorbidity with other Clinical Disorders. // *Aggress. Violent. Behav.* 2008. V. 13. № 5. P. 383–395.
357. *Dehaen G., Absillis G., Driesen K., Binnemans K., Parac-Vogt T.N.* (Tetracycline)europium(III) complex as luminescent probe for hydrogen peroxide detection. // *Helv. Chim. Acta.* 2009. V. 92. № 11. P. 2387–2397.
358. *Teixeira L.S., Grasso A.N., Monteiro A.M., Neto A.M.F., Vieira N.D. Jr., Gidlund M., Steffens J., Courrol L.C.* Investigation of the europium emission spectra of the europium–oxytetracycline complex in the presence of human low-density lipoproteins. // *J. Fluoresc.* 2011. V. 21. № 3. P. 887–892.
359. *Parashchenko I.I., Smirnova T.D., Shtykov S.N., Kochubei V.I., Zhukova N.N.* Doxycycline sensitized solid phase fluorescence of europium on silica in the presence of surfactants. // *J. Anal. Chem.* 2013. V. 68. № 2. P. 112–116.

360. *Hirschy L.M., Vangeel T.F., Winefordner J.D., Kelly R.N., Schulman S.G.* Characteristics of the binding of europium(III) to tetracycline. // *Anal. Chim. Acta.* 1984. V. 166. P. 207–219.
361. *Grasso A.N., Teixeira L.S., Vieira N.D.Jr., Courrol L.C.* Optical properties of metacycline, oxytetracycline and chlortetracycline europium complexes in the presence of hydrogen peroxide. // *J. Fluoresc.* 2009. V. 19. № 4. P. 715–721.
362. *Бельтюкова С.В., Витюкова Е.О., Егорова А.В.* Люминесцентное определение пероксида водорода в водах фармацевтических предприятий. // *Труды Одесск. Политехнич. Ун-та.* 2006. Т. 2. № 26. С. 203–207.
363. *Degan P., Abbondandolo A., Montagnoli G.J.* A new fluorescence enhancement solution for europium-based time-resolved fluoroimmunoassays. // *Biolumin. Chemilumin.* 1990. V. 5. № 3. P. 207–212.
364. *Parker C.A.* Photoluminescence of solutions. // Elsevier Publishing Co. 1968.
365. *Foster R., Hammick D.L., Wardley A.A.* Interaction of polynitro-compounds with aromatic hydrocarbons and bases. Part XI. A new method for determining the association constants for certain interactions between nitro-compounds and bases in solution. // *J. Chem. Soc.* 1953. V. 0. P. 3817–3820.
366. *Banwell C.N.* Fundamentals of Molecular Spectroscopy. // McGraw-Hill Inc. 1983.
367. *Aldrich J.* Doing least squares: perspectives from Gauss and Yule. // *Internat. Stat. Rev.* 1998. V. 66. № 1. P. 61–81.
368. *Courrola L.C., Samad R.E.* Applications of Europium Tetracycline Complex: A Review. // *Curr. Pharm. Anal.* 2008. V. 4. № 4. P. 238–248.
369. *Karaderi S., Bilgic D., Dölen E., Pekin M.* Determination of stability constants of mixed ligand complexes of Cu(II) with creatinine and ethylenediamine tetraacetic acid or *L*-glutamic acid: Potentiometric and spectrophotometric methods. // *Rev. Inorg. Chem.* 2007. V. 27. № 6. P. 459–472.
370. *Wu Z.J., Gao F., Wang J.P., Niu C.J., Niu V.J.* Study on the interaction of lanthanum(III) with adrenaline. // *J. Coord. Chem.* 2005. V. 58. № 6. P. 473–478.
371. *Walaas E., Walaas O., Haavaldsen S.* Spectrophotometric and Electron-Spin Resonance Studies of Complexes of Catecholamines with Cu(II) ions and the Interaction of Ceruloplasmin with Catecholamines. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1963. V. 100. № 1. P. 97–109.
372. *Lacroix M., Le Tien C.* Innovations in Food Packaging. // Academic Press. 2005.
373. *Duconseille A., Astruc T., Quintana N., Meersman F., Sante-Lhoutellier V.* Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. // *Food Hydrocoll.* 2015. V. 43. P. 360–376.

374. Гаубова Г.Р., Джафаров Ф.И., Аскеров Ф.Б. Морфологические изменения в некоторых ядрах гипоталамуса при различных сроках пищевой депривации и ее отмене. // Ж. Здоровье. 2002. № 5. С. 46–52.
375. [www.integrativepsychiatry.net/neurotransmitter.html](http://www.integrativepsychiatry.net/neurotransmitter.html)
376. Tibbitt M.W., Anseth K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. // Biotechnol. Bioeng. 2009. V. 103. № 4. P. 655–663.
377. Butcher J.T., Nerem R.M. Porcine aortic valve interstitial cells in three-dimensional culture: Comparison of phenotype with aortic smooth muscle cells. // J. Heart Valve Dis. 2004. V. 13. № 3. P. 478–485.
378. Alho H., Partanen M., Hervonen A. Microfluorimetric quantification of catecholamine fluorescence in rat sympathetic ganglia. // Histochem. J. 1983. V. 15. № 12. P. 1203–1215.
379. Ramasamy R.P., Gordon C., Brink P. A novel soluble hydrogel cell culture bioreactor made using proteins. // Adv. Porous Mater. 2015. V. 3. № 1. P. 1–6.
380. Azab A.K., Orkin B., Doviner V., Nissan A., Klein M., Srebnik M., Rubinstein A. Crosslinked chitosan implants as potential degradable devices for brachytherapy: In vitro and in vivo analysis. // J. Control Release. 2006. V. 111. № 3. P. 281–289.
381. Barralet J.E., Wang L., Lawson M., Triffitt J.T., Cooper P.R., Shelton R.M. Comparison of bone marrow cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels. // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2005. V. 16. № 6. P. 515–519.
382. Dawson E., Mapili G., Erickson K., Taqvi S., Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. V. 60. № 2. P. 215–228.
383. Baldwin S.P., Krewson C.E., Saltzman W.M. PC12 cell aggregation and neurite growth in gels of collagen, laminin and fibronectin. // Int. J. Dev. Neurosci. 1996. V. 14. № 3. P. 351–364.
384. Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M. 3D cell culture in alginate hydrogels. // Microarrays. 2015. V. 4. № 2. P. 133–161.
385. Caliani S.R., Burdick J.A. A practical guide to hydrogels for cell culture. // Nat. Methods. 2016. V. 13. № 5. P. 405–414.
386. Gao W., Lai J.C.K., Leung S.W. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. // Front. Physiol. 2012. V. 3. P. 1–13.
387. Rosenoer V.M., Oratz M., Rothschild M.A. Albumin: Structure, Function and Uses. // Pergamon. 1977.
388. Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen structure and stability. // Annu. Rev. Biochem. 2009. V. 78. P. 929–958.

389. *Mandal S., Kumar S.S., Krishnamoorthy B., Basu S.K.* Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. // *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010. V. 46. № 4. P. 785 – 793.
390. [www.nitta-gelatin.co.jp/ja/labo/biomedical/05/main/03/teaserItems1/01/linkList/00/link/Life%20Science%20Product%20Guide%20r10\\_3%20en.pdf](http://www.nitta-gelatin.co.jp/ja/labo/biomedical/05/main/03/teaserItems1/01/linkList/00/link/Life%20Science%20Product%20Guide%20r10_3%20en.pdf)
391. *Koley D., Bard A.J.* Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 39. P. 16783–16787.
392. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=en>