

## ПРИМЕНЕНИЕ ЛАНТАНИДНОГО ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ *IN VITRO И IN VIVO*

©2012 г. В. В. ЖЕРДЕВА, А. П. САВИЦКИЙ  
*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва*

I. Введение. II. Комплексные соединения лантанидов в решении проблемы фоновой биологической флуоресценции. III. Биоаналитические исследования с использованием лантанидов. IV. Лантанидные комплексы как сенсоры низкомолекулярных метаболитов. V. FRET-биосенсоры на основе лантанидов. VI. Биоимиджинг на основе лантанидов. VII. Высокоэффективный скрининг лекарств. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Комплексные соединения лантанидов используются с 80-х годов прошлого века как высокочувствительные флуоресцирующие метки для биоаналитических исследований. Основные области применения лантанидного флуоресцентного анализа с временным разрешением (ФАВР) это гетерогенный и гомогенный анализы, включающие иммуноанализ, ДНК-анализ и другие виды биоаналитических иссле-

---

*Принятые сокращения:* FRET – флуоресцентный индуктивно-резонансный перенос энергии (fluorescence resonance energy transfer), TR-FRET – time-resolved (временноразрешенный) FRET, TRLM –микроскопия с временным разрешением (time resolved microscopy), LBT– лантанидсвязывающие пептиды (lanthanide binding peptide), DELFIA – диссоциативный усиленный лантанидный флуоресцентный иммуноанализ (dissociative enhanced lanthanide fluorescence immunoassay), EALL– ферментативно-усиленная лантанидная люминесценция (enzyme amplified lanthanide luminescence), FIAgen (Cyberfluor) – флуоресцентный недиссоциативный иммуноанализ, TRACE – времяразрешенная усиленная эмиссия

*Окончание списка сокращений см. на сл. стр.*

*Адрес для корреспонденции:* [apsavitsky@inbi.ras.ru](mailto:apsavitsky@inbi.ras.ru)

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-02-01532а и государственного контракта № 16.512.11.2137 Минобрнауки в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».

дований. Отличительным свойством лантанидов является микросекундная флуоресценция. Временная задержка при регистрации флуоресценции лантанидов позволяет исключить влияние фоновой биологической флуоресценции, которая, как известно, находится в наносекундном диапазоне. Следствием этого является существенное увеличение соотношения сигнал/фон и повышение чувствительности анализа. Это особенно важно при переходе к прижизненному изучению биологических объектов, когда необходимым условием является сохранение естественного функционирования клетки или организма, и предварительная обработка при этом должна быть сведена к минимуму.

Другим фактором, служащим активному использованию лантанидов в качестве флуоресцентных меток, является возможность конструирования на их основе многообразных FRET-сенсоров, в основе действия которых лежит индуктивно-резонансный перенос энергии. В данных FRET-парах в качестве донора выступают лантанидные комплексы, а в качестве акцепторов – органические флуорофоры, фикобилины, комплексы металлов. Недавно в качестве акцепторов стали использовать квантовые точки и флуоресцентные белки. Внедрение геномных технологий позволило перейти от получения синтетических хелатов к получению генетически кодируемых лантанидсвязывающих пептидов.

На сегодняшний день наряду с традиционным использованием лантанидов в различных аналитических исследованиях, они находят широкое применение в клеточной биологии. Использование генетически кодируемых сенсоров в аналитических реакциях *in vitro* дает возможность получать высокостандартизованные биохимические реагенты со строго определенными точками присоединения доноров и акцепторов к белкам и антигенам. FRET-биосенсоры на основе лантанидсвязывающих генетически кодируемых пептидов могут оказаться перспективными репортерными метками для визуализации внутриклеточной ферментативной активности, белковых взаимо-

*Окончание списка сокращений*

крипатов (time-resolved amplified cryptate emission), GFP – зеленый флуоресцентный белок, FLIM – визуализация времени жизни флуоресценции (fluorescence life-time imaging), HTS – высокоэффективный скрининг (high throughput screening); Ф(И)АВР – флуоресцентный (иммуно)анализ с временным разрешением, ПАБК – полиаминополикарбоновые кислоты, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота, ДТПА – диэтилентриаминпентауксусная кислота, ДОТА – 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N, N', N'', N'''-тетрауксусная кислота, BCPDA – 4,7-бис(хлорсульфофенил)-1,10-фенантролин-2,9-дикарбоновая кислота.

действий, изменения конформации белков в клетке и других процессов. Для реализации данного направления требуется решение задач по получению сенсоров и совершенствованию инструментальных подходов регистрации миллисекундной флуоресценции.

## **II. КОМПЛЕКСНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛАНТАНИДОВ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМЫ ФОНОВОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

Спектры биологической автофлуоресценции охватывают большую часть видимого диапазона, перекрываясь со спектрами флуоресценции многих флуорофоров. Присутствие фоновой флуоресценции приводит к низкому соотношению сигнал/фон, снижает чувствительность детекции сигнала. Так, клеточные структуры, помеченные зеленым флуоресцентным белком GFP, при наблюдении во флуоресцентном микроскопе теряют четкость и контраст из-за высокой фоновой флуоресценции [1]. Источниками фонового сигнала являются биологическая автофлуоресценция [2] и светорассеяние [3, 4].

Помимо автофлуоресценции биологических молекул, фоновую флуоресценцию могут усиливать соединения, используемые для предобработки тканей, например формальдегид. Флуоресценция формальдегида, вызываемая формированием ароматических колец в результате реакции конденсации с аминами [5], имеет максимумы возбуждения в области 355–435 нм и испускания в области 420–470 нм, вследствие чего коллаген, эритроциты и внутриклеточные структуры нейрона становятся особенно яркими [6]. Источники биологической автофлуоресценции в эксперименте подробно проанализированы в обзоре [1]. Обобщая, можно сказать, что основным источником фоновой биологической флуоресценции в организме являются следующие соединения:

- флавины (ФАД) (возбуждение в области 380–490 нм, флуоресценция в области 520–560 нм);
- пиридины (НАД(Ф)Н) (возбуждение в области 360–395 нм, флуоресценция в области 440–510 нм);
- липофусцины (возбуждение в области 345–490 нм, флуоресценция в области 430–680 нм);
- продукты гликирования (возбуждение в области 320–365 нм, флуоресценция в области 385–440 нм);
- коллаген и эластин (возбуждение в области 440–480 нм, флуоресценция в области 470–520 нм и выше);
- протопорфирин IX (с максимумом возбуждения 442 нм и флуоресценции 635 нм).

Поскольку основной диапазон автофлуоресценции приходится на синие-зеленую часть спектра, особую трудность представляет интерпретация результатов при использовании флуоресцентных меток, эмиссия которых приходится на эту же область. Существуют различные способы исключения фонового сигнала, которые можно условно отнести к физическим, химическим или молекулярно-биологическим.

К физическим способам относится ряд методических и инструментальных подходов. При использовании определенного набора фильтров отсекается флуоресценция эндогенных флуорофоров [7]. Поляризация флуоресценции позволяет разделить сигналы некоторых эндогенных флуорофоров от флуоресценции белков, которые часто используются в качестве маркеров. Методика базируется на том, что небольшие молекулы, обладающие малым временем вращения, при облучении линейно-поляризованным светом испускают деполяризованную флуоресценцию, а большие молекулы, например флуоресцентные белки, время вращения молекулы которых больше, чем время жизни в возбужденном состоянии, испускают поляризованную флуоресценцию. Этот метод подходит для отсекающей флуоресценции только небольших эндогенных флуорофоров, к которым не относятся флавины и пиридины, связанные с белками [1, 8]. Важным подспорьем является использование программ, вычитающих в полученных изображениях фоновый сигнал из сигнала флуоресценции экзогенных флуорофоров [9]. Использование металл-лигандных комплексов [10, 11] и хелатов лантанидов [12], обладающих микро- и миллисекундным временем жизни, и метода спектроскопии с временным разрешением, позволяет устранить короткоживущий фоновый сигнал, время жизни которого обычно не превышает 10–15 нс [12, 13].

Среди химических подходов к уменьшению фоновой флуоресценции относятся: правильный подбор среды для культивирования клеток, использование тушителей флуоресценции. Компоненты культуральной среды часто содержат клеточные экстракты, витамины, НАД(Ф)Н. Замена питательной среды на более бедную по содержанию питательных веществ, может приводить к 10-кратному снижению автофлуоресценции [1]. Феноловый краситель, содержащийся в качестве рН-индикатора во многих средах для культивирования клеток млекопитающих, также обладает собственной флуоресценцией; в этом случае для последующих измерений клетки промывают фосфатно-солевым буфером [1]. Для подавления флуоресценции некоторых биологических молекул добавляют тушители флуоресценции. Для флуоресцирующих в окисленном состоянии флавинов такими тушителями являются цианиды [14]. Гипоксия,

облучение светом в присутствии донора электронов ЭДТА также способствуют снижению уровня окисленных флавинов [15]. Добавление раствора сульфата меди в ацетатном буфере или суданового черного в 70% этаноле элиминирует флуоресценцию липофусцина [16]. Тушитель Pontamine Sky Blue используют в иммунофлуоресцентной гистохимии для снижения общего фона флуоресценции [17]. Для тканей, фиксированных формальдегидом, перед добавлением флуоресцирующих меток применяют фотообесцвечивание [18].

При работе с генетически кодируемыми сенсорами используют молекулярно-биологические подходы снижения фонового сигнала флуоресценции. Введение сильного промотора повышает экспрессию флуоресцентных белков, что, в свою очередь, приводит к увеличению соотношения сигнал/фон. Поиск сильного промотора особенно важен для обеспечения достаточно высокого и гомогенного уровня экспрессии гена флуоресцентного белка при создании трансгенных организмов [19, 20]. Для минимизации автофлуоресценции и увеличения глубины проникновения света разрабатываются новые красные и дальнекрасные флуоресцентные белки. На данный момент получено несколько флуоресцентных белков (Katushka, eqFP650), имеющих максимумы флуоресценции более 610 нм [21–23].

Таким образом, использование комплексов лантанидов, обладающих временем жизни порядка микро- и миллисекунд, и спектроскопии с временным разрешением является одним из подходов к устранению фонового сигнала, обусловленного рассеянным светом и автофлуоресценцией биомолекул.

#### ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЛАНТАНИДОВ

В таблице Менделеева лантаниды располагаются в 3 группе VI периода (№№ 58–71). Лантаниды еще иначе называют «редкоземельными» металлами. Все лантаниды образуют координационные соединения с легко изменяемыми степенями окисления от +1 до +7, но наиболее характерны для них трехвалентные ионы. Благодаря заполнению электронами внутренней 4f-оболочки от La (0) до Lu (14), лантаниды обладают различной способностью к поглощению и излучению света [24]. У элементов этой группы происходит постепенное заполнение 4f орбитали, которая эффективно экранирована от внешних воздействий 5s и 5p орбиталями. Флуоресценция лантанидов происходит благодаря d–f-переходам электронов. Такие переходы являются запрещенными по правилу Лапорта [12], вследствие чего лантаниды обладают низким коэффициентом экстинкции и большим значением времени

жизни (порядка микро- и миллисекунд) [25]. Все практические приложения лантанидов, включая биомедицинские и аналитические, основаны на их микросекундной флуоресценции, усиленной за счет переноса энергии с триплетного уровня сенсibilизатора на излучательный уровень лантанида. Среди лантанидов наибольший интерес представляют Tb<sup>3+</sup> и Eu<sup>3+</sup>, благодаря их более интенсивной микросекундной флуоресценции [26, 27].

Для комплексных соединений лантанидов характерны узкополосные спектры испускания, большой Стоксов сдвиг (150–300 нм) и время жизни в возбужденном состоянии порядка микро- и миллисекунд [26, 28]. Значения ферстеровского радиуса при переносе энергии от лантанидных хелатов составляют 50–70 Å [29]. Было показано, что для переноса энергии от Eu<sup>3+</sup> к аллофикоцианину значение R<sub>0</sub> составляет 90 Å [30], а от Tb<sup>3+</sup> к R-фикоэритрину – 97.5 Å [26]. Флуоресценция лантанидов неполяризованная, что снимает ориентационную зависимость при переносе энергии от лантанида к другому флуорофору [31].

Как уже упоминалось, сами лантаниды обладают очень низким по значению коэффициентом экстинкции (1 M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>), которое в 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> меньше коэффициента экстинкции традиционно используемых органических флуорофоров [26]. Поэтому для возбуждения флуоресценции лантанидов требуется либо прямое возбуждение лазером, обладающего большой мощностью, либо перенос энергии от сенсibilизатора. Впервые явление сенсibilизации флуоресценции лантанидов было описано в 1942 г. Вейсманом [32]. Он наблюдал характерную для лантанидов флуоресценцию при облучении солнечным светом их комплексов с β-дикетонами и салициловыми альдегидами. Это явление получило название «антенный эффект» [33, 34].

Механизм «антенного эффекта» был предложен Кросби и Ваном [35, 36].

Возбуждение иона лантанида происходит за счет переноса энергии от возбужденной части органической молекулы. Согласно существующим представлениям, при поглощении кванта света молекула органического соединения переходит на один из высших колебательных уровней в возбужденном синглетном состоянии S<sub>1</sub><sup>\*</sup>. Колебательная энергия быстро (~10<sup>-12</sup> с) диссипирует, молекула оканчивается на низшем колебательном уровне состояния S<sub>1</sub><sup>\*</sup>. Далее возможны несколько путей, среди которых наиболее вероятны следующие: флуоресценция, безызлучательная дезактивация, тушение возбужденного состояния при столкновении и интеркомбинационная конверсия в триплетное (фосфоресцентное) возбужденное состояние T<sub>1</sub><sup>\*</sup> (рис. 1). Если состояния S<sub>1</sub><sup>\*</sup> и T<sub>1</sub><sup>\*</sup> сильно перемешаны, то последний

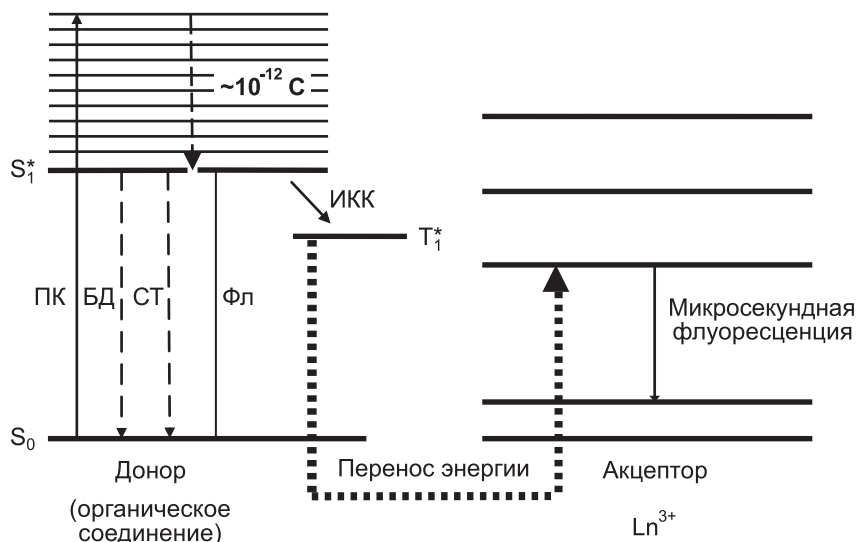


Рис. 1. Схема электронных уровней при переносе энергии от органической молекулы к ионам РЗЭ

Обозначения: ПК – поглощение кванта света, ИКК – интеркомбинационная конверсия, БД – безызлучательная дезактивация, СТ – столкновительное тушение, Фл – флуоресценция,  $S_0$  – синглетное основное состояние,  $S_1^*$  – синглетное возбужденное состояние,  $T_1^*$  – триплетное возбужденное состояние.

процесс может быть достаточно эффективным. Состояние  $T_1^*$  обладает большим временем жизни благодаря энергетическому и спиновому запрету перехода обратно, в состояние  $S_1^*$ , и спиновому запрету перехода в основное (синглетное) состояние  $S_0$ . Далее, в том случае когда энергия триплетного состояния  $\beta$ -дикетона равна или больше резонансного уровня иона лантаниды, может произойти безызлучательный перенос энергии на ион лантанида с последующей его микросекундной флуоресценцией. В том случае, когда энергия триплетного уровня сенсibilизатора равна энергии излучательного уровня лантанида, происходит обратный перенос энергии от лантанида на сенсibilизатор. В результате чего снижается интенсивность флуоресценции лантанида.

Чаще всего сенсibilизация флуоресценции лантанидами происходит путем переноса энергии с триплетного уровня сенсibilизатора на резонансный уровень лантанида. Однако сенсibilизация также может происходить и с синглетного уровня сенсibilизатора. Процесс не настолько эффективен из-за короткого времени жизни возбужден-

ного состояния  $S_1$ . Возбуждение через  $S_1$ -состояние было показано для  $Tb^{3+}$  [37] и  $Eu^{3+}$  [38].

Перенос энергии от сенсibilизатора к иону лантанида может быть результатом двух различных механизмов взаимодействия молекул: механизма Фёрстера или механизма Декстера. При переносе энергии по механизму Декстера необходимо перекрывание электронных оболочек взаимодействующих молекул [39]. При расчете переноса энергии от сенсibilизатора к лантаниду используются различные модели. Так, для изучения расстояний между лигандом и лантанидом в белковых системах была применена модель переноса энергии по Фёрстеру [40]. Наличие механизма переноса энергии по Декстеру было показано для комплексов иттербия в модифицированных белках [41]. В другой работе [42] были получены донорно-акцепторные пары между переходными металлами (Ru, Os) и лантанидами (Yb, Nd, Er), и показано, что перенос энергии происходил по механизму Декстера.

Свечение лантанидов только условно можно назвать «микросекундной флуоресценцией». Это связано с тем, что основное состояние лантанидов не является синглетным, а содержит несколько неспаренных  $f$  электронов. При этом флуоресценция лантанидов возможна только с определенных электронных уровней, называемых резонансными. Ион  $Tb^{3+}$  принимает энергию возбуждения сразу на резонансный излучательный уровень  $^5D_4$ . Ион  $Eu^{3+}$  наиболее вероятно принимает энергию возбуждения на два уровня  $^5D_1$  и  $^5D_2$ , с последующей безызлучательной релаксацией до первого возбужденного состояния  $^5D_0$  с которого и происходит излучение [43].

Ионы лантанидов характеризуются большими координационными числами (6–12). В отсутствие координационной насыщенности в комплексах с лигандами лантаниды присоединяют молекулы воды или других растворителей, число которых определяется дентантностью лиганда. Молекулы воды (в меньшей степени OH-содержащие органические растворители), входящие во внутреннюю координационную сферу комплекса, вследствие высокочастотных колебаний OH-групп являются сильными тушителями флуоресценции лантанидов («OH-осцилляторы»). Другие осцилляторы (N–H, C–H, C=O) также тушат флуоресценцию лантанидов, но менее эффективно [26].

Комплексные соединения лантанидов обладают широким спектром возбуждения благодаря органическому или пептидному хелату и узкими полосами испускания самих лантанидов [26]. Так, для иона тербия характерны полосы флуоресценции с максимумами на 490 нм, 545 нм, 585 нм, и 620 нм. Для иона европия наблюдается три полосы испускания флуоресценции с максимумами на 580 нм,



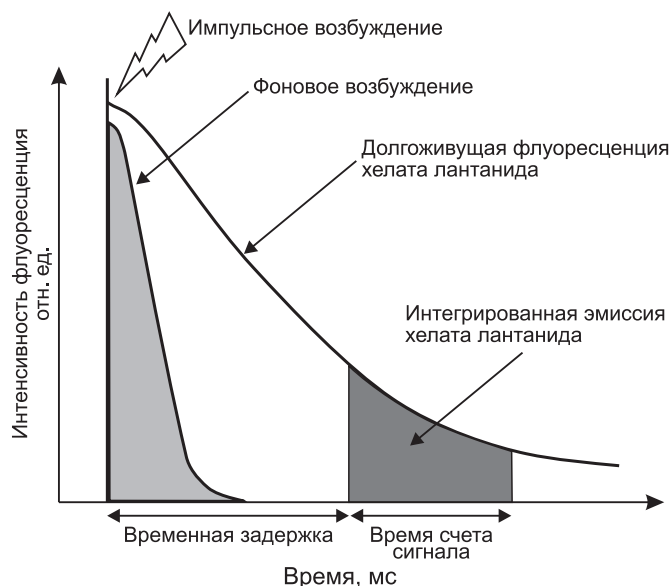


Рис. 2. Принцип спектроскопии с временным разрешением.

617 нм и 690 нм. Время жизни иона тербия составляет 100–1500 мкс, европия – 300–1500 мкс. Каждая полоса испускания флуоресценции обусловлена излучательным переходом с возбужденного состояния на основное [26].

Для регистрации микросекундной флуоресценции лантанидов используют методы спектроскопии с временным разрешением. Флуоресцентной спектроскопией с временным разрешением называется регистрация спектров испускания через определенные времена задержки после возбуждения короткими импульсами света [44], что позволяет эффективно подавить короткоживущее фоновое излучение и повысить чувствительность регистрации сигнала (рис. 2) [12].

### III. БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАНТАНИДОВ

Теоретические предпосылки возможного использования лантанидов в 70-ых годах XX века уже через десять лет реализовались в первую работающую систему – диссоциативный усиленный лантанидный иммуноанализ (DELFIА); затем на основе синтетических лигандов были разработаны другие технологии лантанидного анализа. Лантанидный флуоресцентный анализ с временным разрешением

(ФАВР) нашел применение не только в иммуноанализе, но и в ряде других биоаналитических исследований, включающих анализ нуклеиновых кислот, белок-белковые и лиганд-рецепторные взаимодействия, ДНК и РНК исследования в образцах на определенных носителях (в пробирках, на микропланшетах, на микрочипах, на дисках и т.д.). Все они построены по принципу взаимодействия анализируемого соединения с комплементарным меченым соединением («антиген-антитело», «лиганд-рецептор», «ДНК-ДНК-зонд» и т. д.).

#### ДИССОЦИАТИВНО-УСИЛЕННЫЙ ЛАНТАНИДНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ (DELFLIA)

С момента появления ФАВР велись интенсивные поиски трифункционального хелатирующего агента-сенсibilизатора флуоресценции ионов лантанидов. Не всегда удавалось объединить все три функции в одном соединении. Так, хелат на основе полиаминополикарбоновых кислот, используемый в методе DELFLIA® (англ. Dissociation-Enhanced Lantanide Fluoroimmunoassay), можно отнести к бифункциональным комплексонам, так как он хорошо удерживает лантанид и способен эффективно присоединяться к биологическим молекулам, но при этом не является сенсibilизатором флуоресценции.

Впервые метод DELFLIA был предложен в 1979 г. Соини [45], где в качестве флуоресцентных меток были использованы Eu и Tb. С 1984 г. фирма «Wallac» (Финляндия) производит коммерческие наборы DELFLIA® для клиничко-лабораторной диагностики, в основном для пренатального и неонатального скрининга [46].

В методе DELFLIA ионы лантанидов связываются с белком через производные полиаминополикарбоновых кислот (ПАПК), таких как ЭДТА, ДТПА, содержащих функциональные группы для ковалентного связывания, например, изотиоцианотофенил-ДТПА, циклические диангидриды ДТПА и ЭДТА [47]. Производные ПАПК известны как эффективные хелатирующие агенты лантанидов. Кроме того, они обладают максимальными константами связывания с лантанидами ( $10^{16}$ – $10^{22}$ ) [48]. Для регистрации флуоресценции используют усиливающую систему, в которой первоначально при кислых рН (3–3.3) разрушаются связи с ПАПК. Затем в избытке сенсibilизатора флуоресценции  $\beta$ -дикетона и в присутствии поверхностно-активных веществ и синергетических агентов, удаляющих молекулы воды из сольватной оболочки лантанида, формируются флуоресцирующие комплексы ( $\beta$ -дикетонат(2-нафтоилтрифторацетон)-триоктилфосфиноксиды). Предел детекции европия в усиливающем растворе составляет  $2 \times 10^{-15}$  М [49].

Метод DELFIA позволяет определять в «сэндвич»-варианте поливалентные антигены: гормоны [50–52], онкомаркеры [53–57], антитела к столбнячному токсину [58] и возбудителю краснухи [59], вирусные антигены и бактериальные токсины [60, 61]. DELFIA применяется в программах неонатального скрининга на врожденный гипотиреоз [62], конгенитальную адренальную гиперплазию [63, 64], муковисцидоз (кистозный фиброз) [65] и пренатального скрининга на синдром Дауна и дефект развития нервной трубки плода [66, 67]. Показано использование этого метода для тестирования плазмы крови на наличие опасных инфекционных форм белков прионов при трансплантации тканевых материалов от человека к человеку [68].

Благодаря узким линиям флуоресценции возможно одновременное определение нескольких аналитов с использованием различных редкоземельных меток Eu, Tb, Sm, Dy. Было показано, что в усиливающих растворах с одинаковым сенсбилизатором можно детектировать сигнал одновременно самария и европия с использованием нафтоилфтрифторацетона, а также любые комбинации из 4-х элементов: Sm, Eu, Tb, Dy [69]. Одновременное определение нескольких аналитов позволяет использовать меньшее количество образца и сократить общее время проведения анализа. В качестве примеров можно привести скрининговые тесты на основе Sm и Eu на содержание психотропных препаратов в сыворотке [70], определение киллерной функции эффекторных клеток на трех различных клеточных линиях с использованием Sm, Eu, Tb. Предложен метод ДНК-гибридизации с аллель специфичными ДНК-зондами, мечеными хелатами тербия, самария и европия для определения муковисцидоза [71] и вируса папилломы человека (7 типов в одном анализе) [72]. Также показано применение DELFIA для определения продуктов ПЦР вируса простого герпеса в цереброспинальной жидкости [73].

#### FIAGEN (CYBERFLUOR®) И АНАЛОГИЧНЫЕ НЕДИССОЦИАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ

За два последних десятилетия было получено множество трифункциональных меток, содержащих одновременно хелат, хромофор и активную группу для связывания с биомолекулами, так что для появления флуоресценции не требуется диссоциации комплекса. Существует несколько подходов для синтеза трифункциональных меток. Первый подход заключается в том, что хромофор включается в структуру хелата. К данной группе можно отнести производные пиридина и их структурные аналоги, такие как, N-оксиды [74], криптаты [75], карбостирены [76], или  $\beta$ -дикетонные производные [77–79],

связанные поликарбонowymi кислотами, которые обеспечивают прочную ковалентную связь. Все вышеперечисленные метки связаны через полидентантные связи с ионами лантанидов. Другой подход – мечение белка хромофором и работа с избытком Eu, как, например, в случае производных фенантролина (BCPDA и др.) [80, 81], бипиридина, терпиридина [82, 83]. Некоторые лантанидные комплексы приведены на рис. 3.

На основе существующих меток выросли целые технологии, в настоящее время широко применяемые, в том числе и в медицинской практике. Кроме вышеупомянутой DELFIA®, активно применяются следующие технологии: FIAgen, основанная на бифункциональном 4,7-бис(хлорсульфодифенил)-1,10-фенантролин-2,9-дикарбоксильной кислоте (BCPDA) и  $\text{Eu}^{3+}$  и FIAgen (CyberFluor®), основанная на BCPDA и авидин-биотиновой системе («CyberFluor», Канада) [80], ферментативно усиленная лантанидная люминесценция EALL, основанная на  $\text{Tb}^{3+}$ -ЭДТА-5-фторсалицилате [84]. На основе времязрешенного флуоресцентного переноса энергии TR-FRET разработаны технология усиленной криптанной люминесценции TRACE®, основанная на  $\text{Eu}^{3+}$ -трис-(бипиридин)криптане [75] и LANCE® («Wallac», Финляндия), основанная на 2,2':6',2''-терпиридиновых производных [83].

Измерение концентрации меченого соединения по концентрации метки в технологии DELFIA является традиционным способом флуоресцентного иммуноанализа. Существует также способ регистрации по концентрации сенсбилизатора флуоресценции лантанида. Успешность данного метода зависит от подбора подходящего хелата, который формирует стабильный комплекс и действует как эффективный сенсбилизатор, т.е. в состав комплекса «белок–метка» должен входить и хелат, и сенсбилизатор флуоресценции, а на стадии измерения флуоресценции используется избыток лантанидов. Этот метод получил название FIAgen (Cyberfluor®, «CyberFluor Inc», Канада). Методы типа FIAgen не требуют применения усиливающего раствора, у них отсутствует проблема контаминации лантанидами, свойственная DELFIA, т.к. система работает в избытке лантанидов [87].

Одним из наиболее удачных комплексонов для методов FIAgen является 4,7-бис(хлорсульфофенил)-1,10-фенантролин-2,9-дикарбоновая кислота (BCPDA) [86, 80]. Фенантролин является сенсбилизатором флуоресценции европия. Избыток лантанидов необходим по причине низкой константы связывания BCPDA. В целом система Cyberfluor менее чувствительна, чем DELFIA: в присутствии избытка Eu в системе с меченым стрептавидином предел детекции комплекса BCPDA составляет  $10^{-11}$  М [88].

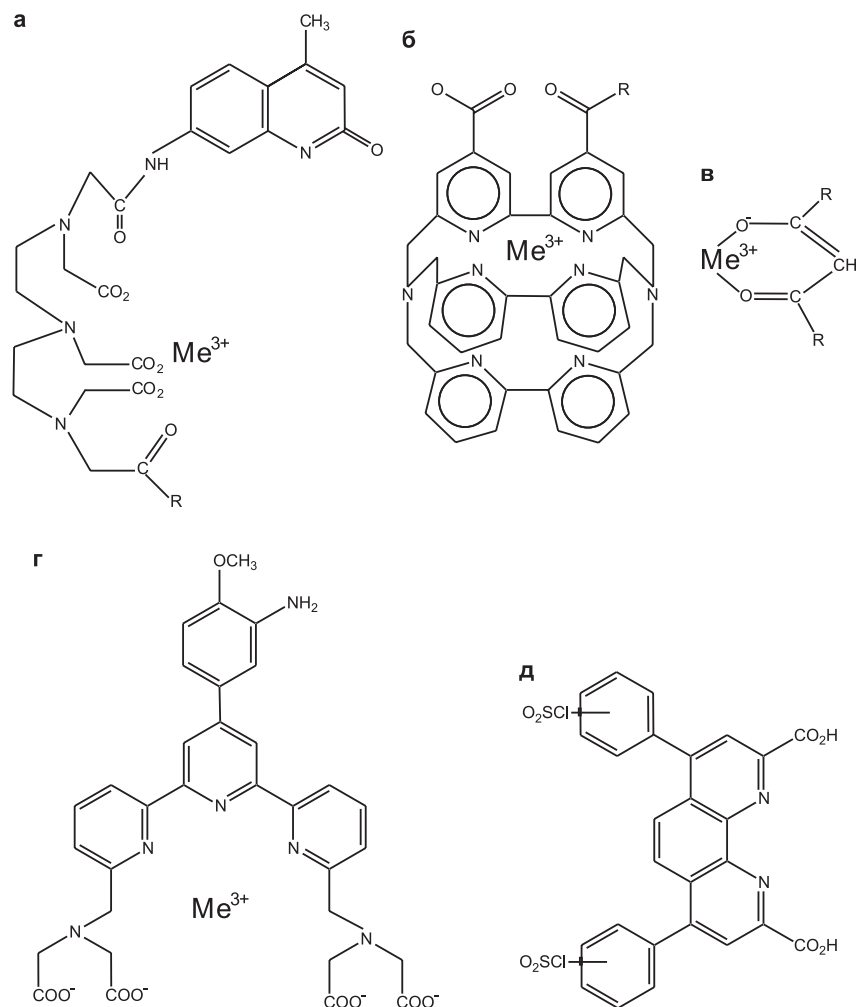


Рис. 3. Наиболее часто используемые органические хелаты лантанидов:

- а – полиаминокарбоксилат-карбостирил [26],
- б – криптат («CIS-Bio Packard», США),
- в – β-дикетонат,
- г – тетрапирин [85],
- д – 4,7-бис(хлорсульфобензил)-1,10-фенантролин-2,9-дикарбоновая кислота (BCPDA) [86].

На основе стрептавидина, меченного ВСПДА, была разработана универсальная система детекции [80]. Эта система была использована в неконкурентных методах анализа альфафетопротеина [89], хорио-надотропина [90], определении кортизола в сыворотке в конкурентной схеме анализе [91], во многопараметрическом «сэндвич»-иммуноанализе для определения нескольких гормонов одновременно [92].

В оптимальном случае к антителу или стрептавидину можно присоединить 14 молекул ВСПДА. Для усиления чувствительности данной системы меченый стрептавидин «сажали» на крупные молекулы [88], такие как тиреоглобулин, поливиниламин. В первом случае предел детекции составил  $10^{-13}$  М, а в системе с поливиниламином было определено до  $3 \times 10^{-18}$  молей простатического специфического антигена на лунку [69, 89]. Эта же метка была использована в иммуногистохимическом определении данного антигена на парафинизированных срезах [93].

Другое направление в развитии FIAgen развивалось в поиске новых более чувствительных меток с более высокой константой связывания лантанидов. Синтезированные комплексы: 1-(*p*-бензиндиазолин)-ЭДТА [94], производные пиридинов, бипиридинов, терпиридинов [82, 83] – обладали слабыми люминесцентными свойствами. Были предложены комплексоны следующего состава: 5-аминосалициловая кислота-ДТПА- $Tb^{3+}$ , комплекс апотрансферрин- $Tb^{3+}$  [95].

Для недиссоциативного ФИАВР нами был предложен новый комплексон, содержащий высокоэффективную хелатирующую часть – ДТПА и эффективный сенсibilизатор флуоресценции европия – 4-аминобензоилтрифторацетон гидрохлорид (АБТФА) [79]. Метка АБТФА-ДТПА- $Eu^{3+}$  была апробирована в твердофазном конкурентном недиссоциативном анализе для определения тироксина. Предел детекции тироксина составил 7 нМ, что соответствовало пределу детекции тироксина с этими же антителами в аналогичной схеме DELFIA [96]. Примерно такая же чувствительность недиссоциативных меток (от  $10^{-7}$  М до  $10^{-9}$  М) была продемонстрирована в работах других авторов [83, 95].

Больших успехов удалось достичь, работая с замещенными олигопиридинами и фенантролинами. Был синтезирован терпиридиновый хелат, координационное число которого составило 9, а предел детекции в конъюгате с моноклональными антителами  $10^{-16}$  М [85].

В ДНК анализе используют как прямое мечение, так и не прямое, основанное на авидин-биотиновой системе [97], что продемонстрировано на микрочипах для определения «mismatch»-мутаций (ошибочного спаривания оснований) [98] и для мультипликативных дот-блота и Southern-блота [99].

## ФЕРМЕНТАТИВНО-УСИЛЕННЫЙ ЛАНТАНИДНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ (EALL)

Ферментативно-усиленный лантанидный иммуноанализ (EALL) – это попытка объединить возможности времяразрешенной детекции лантанидной метки с усилением, которое обеспечивает использование ферментативной метки. Источником флуоресценции служит флуорогенный субстрат, который под действием фермента превращается в люминесцирующий хелат тербия или европия [84].

Таковыми субстратами могут быть нефлуоресцирующие ароматические соединения, содержащие группы, которые удаляются ферментативным гидролизом (фосфаты, сульфаты, ацильные группы, гликозиды). Примером такой системы является превращение субстрата салицилфосфата под действием щелочной фосфатазы в люминесцирующий хелат тербия [84, 100]. Этим способом определяли содержание интерлейкина-6 в сыворотке крови. Чувствительность составила 0.5 нг/л, что превысило предел детекции интерлейкина в других методах [101].

С некоторой модификацией EALL был использован для определения альфа-фетопротейна [102]. Под действием щелочной фосфатазы фосфорный эфир 5-фторсалициловой кислоты превращался в 5-фторсалициловую кислоту и формировал в растворе, содержащем  $Tb^{3+}$ -ЭДТА, сильно флуоресцирующий комплекс  $Tb^{3+}$ -ЭДТА-5-фторсалициловая кислота. Чувствительность данного анализа составила  $1.5 \times 10^5$  молекул в 100 мкл анализируемого образца.

В роли субстратов EALL могут выступать соединения с «замаскированными» хелатирующими лигандами (эфиры, амиды, альдегиды и цианогруппы). В качестве «замаскированных» лигандов могут выступать карбоксильные группы. Маскирующие группы удаляются в результате ферментативного гидролиза в присутствии воды или окисления с помощью оксидоредуктазы в присутствии окисляющего агента, освобождая при этом хелатирующий лиганд – карбоксилат-анион. Примером такой системы является превращение салицилового альдегида в салициловую кислоту под действием ксантиноксидазы в присутствии кислорода и воды [100].

Еще одной ферментативной системой для EALL является двухстадийная система определения глюкозооксидазы: под действием ультрафиолетового облучения и с участием перекиси водорода 1,10-фенантролин-дигидразид дикарбоновой кислоты превращается в 1,10-фенантролин-дикарбоновую кислоту, формирующую люминесцентный комплекс с европием. Перекись водорода образуется в результате окисления глюкозы под действием глюкозооксидазы [100].

EALL на основе щелочной фосфатазы был применен в ДНК-гибридизации [103] в схеме, аналогичной той, что использовалась для определения альфафетопротеина [102].

#### ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛАНТАНИДОВ

Кроме получения новых меток, другое направление в химии лантанидных хелатов – это увеличение чувствительности существующих. Такие усиленные метки, как флуоресцентные наночастицы, эффективно присоединяются к ряду высокомолекулярных соединений, типа нуклеиновых кислот, рецепторов, лектинов, ферментов и антител. Несмотря на большой молекулярный размер и очевидные стерические проблемы, эти метки – частицы успешно используются в твердофазном иммуноанализе [104, 105]. Использование европиевых наночастиц размером 100–200 нм в флуоресцентном иммуноанализе приводит к значительному увеличению сигнала флуоресценции, т.к. каждая наночастица содержит тысячи флуоресцирующих комплексов европия с  $\beta$ -дикетонами. Эта технология была применена для детекции предельно низких концентраций, даже зептомоль вещества. Наночастицы на своей поверхности содержат карбоксильные или аминогруппы для ковалентного связывания [105].

Так, в конкурентном иммунофлуоресцентном анализе тироксина с использованием лантанидных полистирольных наночастиц, меченных стрептавидином, и биотинилированных моноклональных антител, нами было продемонстрировано 70-кратное увеличение чувствительности (1 фемптомоль тироксина на 10 мкл образца) [106] по сравнению с диссоциативным лантанидным анализом тироксина с использованием тех же моноклональных антител [96].

#### ГОМОГЕННЫЙ FRET. TRACE® ТЕХНОЛОГИЯ

Особое направление ФАВР – это развитие гомогенных анализов, основанных на флуоресцентном резонансном переносе энергии между лантанидной меткой-донором и органическим акцептором. В гомогенном анализе разделение свободных и связанных компонентов является необязательным, что упрощает анализ. Для гомогенного лантанидного анализа FRET в качестве доноров используются различные трифункциональные метки.

Впервые данная технология была продемонстрирована для лантанидных крипатов в паре с аллофикоцианином [30] и получила название TRACE® (англ. Time-Resolved Amplification of Cryptate Emission).



Лантанидный криптат – это макроциклический лиганд, содержащий бипиридиновые группы, в интрамолекулярную полость которого включен ион лантанида. Были получены различные криптаты на основе трисбипиридина [107], гексоазомакроциклического лиганда [108], 2.2.1-криптата [109]. Эти криптаты кинетически стабильны, инкапсулированный ион лантанида жестко фиксирован, но люминесцентные свойства у них разные. Люминесцентные свойства тербия максимально проявились в комплексе с калик[4]аренами с квантовым выходом  $\phi = 0.2-0.27$  и временем жизни 1.5 мс [110]. Присоединение криптатов к биомолекулам производилось через тиоловые и аминореактивные группы [111]. TRACE технология как нельзя лучше подходит для ДНК-анализа. Она не требует, в отличие от DELFIA и FIAgen, дополнительных этапов для формирования люминесцирующего комплекса, так как содержит люминесцирующий лантанидный криптат. TRACE подходит как для гомогенных исследований, так и для твердофазного анализа.

На основе аллофикоцианина были разработаны анализы для лиганд-рецепторного взаимодействия, белок-белкового взаимодействия и ДНК-гибридизации [75]. В последующем эти исследования были пополнены рядом работ по гомогенному лантанидному FRET с использованием криптатов и их производных для определения белок-белковых взаимодействий [112, 113], гормонов [114], лиганд-рецепторных взаимодействий [115], а также для определения ПЦР продуктов и олигонуклеотидных сшивок [116]. В гомогенном FRET с успехом применяются не только криптаты. Так, показано использование тетраденатного  $\text{Eu}^{3+}$ - $\beta$ -дикетонного хелата в гомогенной TR-FRET гибридации ДНК [117]. Свойство время-разрешенных систем с переносом энергии было использовано для определения меж- и внутримолекулярных расстояний, кинетики межнуклеотидных структурных изменений, определения расстояния между донором и акцептором в ДНК-анализе [111].

Основные принципы конструирования FRET-пар на основе лантанидов для исследований *in vitro* и *in vivo* приведены в главе V.

#### IV. ЛАНТАНИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК СЕНСОРЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

В соответствии с диаграммой Яблонского квантовый выход sensibilizированных лантанидов зависит от четырех параметров: (1) эффективности заселения триплетного состояния у молекулы-сенсibilизатора лантанидной флуоресценции («антенны»), (2) уровня энергии возбужденного триплетного состояния «антенны» по отно-

шению к уровню  $D_5$  лантанида, (3) расстояния между антенной и ионом лантанида, (4) количеств молекул воды в координационной сфере иона лантанида [12].

Изменяя эти параметры, можно управлять эмиссией лантанидов. По данному принципу работает целый класс лантанидных сенсоров, при этом их эмиссией управляют определяемые аналиты [12].

Так, на принципе изменения расстояния между антенной и ионом лантанида работают сенсор редокс-потенциала [118] и сенсор калия [119]. Для сенсора калия показано 26-кратное увеличение сигнала флуоресценции при накоплении аналита. В бимолекулярном сенсоре меди аналит (глутатион-меди) вызывает ковалентное «схлопывание» двух молекул: азидного производного дансила и Eu-ДОТА, функционализированного алканильными остатками, что ведет к 10-кратному увеличению флуоресцентного сигнала [120].

Длительноживущее возбужденное состояние  $D_5$  лантанидов может подвергаться тушению с безызлучательным переносом энергии на ближайшие низкоэнергетические осцилляторы O–H и N–H. Так как четвертая гармоника осциллятора воды O–H располагается на более низком энергетическом уровне, чем уровень  $D_5$  лантанидов то молекулы воды являются прекрасными тушителями флуоресценции лантанидов. Количество их в координационной сфере является определяющим фактором при дизайне сенсоров. Измеряя время жизни лантанидного комплекса в воде и тяжелой воде, можно рассчитать количество молекул воды в координационной сфере лантанида [12]. При замене молекулы воды на тяжелые анионы, тушащее действие снимается, флуоресценция увеличивается. Это было продемонстрировано для определения ряда анионов, таких как карбонат, карбоксилат, оксалат, малонат, лактат и цитрат [121, 122, 123]. Камнем преткновения остается селективность таких сенсоров. На настоящий день селективность продемонстрирована только для определения бикарбонатов [124, 125]. Свойство малоната и цитрата изменять соотношение пиков эмиссии европия 616/579 также позволяет отличить их от других анионов, но отличить цитрат от малоната этим способом нельзя.

В случае если определяемый аналит является сенсбилизатором флуоресценции и тяжелым лигандом, можно управлять флуоресценцией лантанидов напрямую, по принципу «включения–выключения» (есть «антенный» эффект – нет «антенного» эффекта). Этот подход был использован для определения производных салициловой, бензойной кислот [126], для детекции других ароматических карбоксилатов [12], а также для определения дипиколиновой кислоты – биомаркера спор бактерий *Bacillus* и *Clostridium* [12, 127].

Следующий подход связан с эффективностью сенсibilизации лантанида «антенной». В этом случае флуоресценцией можно управлять путем вмешательства в триплетное состояние «антенны», например, подвергая ее химической модификации аналитом, при этом образуется «антенна» с иным уровнем триплетного состояния. По этому принципу работает сенсор активных форм кислорода: при взаимодействии ароматической кислоты с гидроксид-радикалом образуется гидроксильированная ароматическая кислота, образующая стабильный комплекс с лантанидами и сенсibilизирующая их флуоресценцию. При этом наблюдается 22-кратное увеличение флуоресцентного сигнала. Данный сенсор применим для регистрации и других активных форм кислорода [12].

Сенсоры, использующие в своем действии фотоиндуцированный перенос электронов, относятся к наиболее большому классу лантанидных сенсоров. Для реализации этого подхода требуется комплекс, включающий стабильный лантанидный хелат, работающую «антенну» и «выключатель антенны» – тушитель ее возбужденного состояния – путем фотоиндуцированного переноса электронов. В отсутствие аналита происходит фотоиндуцируемое тушение, в присутствии аналита «выключатель» взаимодействует с ним, блокируется фотоиндуцируемое тушение, и регистрируется флуоресцентный сигнал [12]. По этому принципу работают сенсоры цинка, кальция, магния [128], также показано определение металлов и других групп [12]. На основе на основе европиевого и тербиевого комплексов был получен сенсор для определения протеазной активности [129].

Таким образом, разнообразие способов управления флуоресценцией лантанидов определило их функциональное применение в качестве сенсоров низкомолекулярных метаболитов.

## V. FRET-БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ЛАНТАНИДОВ

FRET с использованием короткоживущих хромофоров не позволяет достигать той чувствительности, которой можно достичь при использовании лантанидных хелатов в качестве доноров. Это объясняется фоновым сигналом флуоресценции акцептора при прямом поглощении им возбуждающего света [130]. Использование донора с продолжительным временем жизни в возбужденном состоянии и акцептора с коротким временем жизни, техники временного разрешения регистрации сигнала и импульсного источника возбуждения позволяют снизить фоновый сигнал флуоресценции [131].

Благодаря большому времени жизни флуоресценции лантаниды используются во FRET-парах в качестве доноров. Преимущество таких FRET-пар в том, что при переносе энергии происходит сенсублизованное увеличение времени жизни флуоресценции акцептора по сравнению с его естественным временем жизни.

Применение спектроскопии с временным разрешением позволяет регистрировать только сенсублизованную флуоресценцию акцептора вместе с флуоресценцией донора. Прямая флуоресценция акцептора, вызванная возбуждением лазера, а также фоновая флуоресценция не регистрируются. Это приводит к тому, что общий фоновый сигнал снижается в 50–100 раз [26]. Перенос энергии с использованием лантанидов в литературе иногда обозначается TR-FRET (Time-Resolved FRET) [26].

С помощью TR-FRET-сенсоров были изучены взаимодействия между белками, между субъединицами олигомерных белков и между доменами одного белка. Метод был использован для определения расстояния между белками и доменами, конформационных изменений, вызванных связыванием с активаторами и репрессорами, анализа ферментативной активности (протеолиз, фосфорилирование и дефосфорилирование) и детекции ДНК-гибридизации как в растворах и экстрактах клеток, так и в клеточных культурах (табл. 1). При этом для исследования процессов, происходящих в клетках, использовали конъюгаты органических хелатов лантанидов с молекулами-мишенями, или слитые конструкции лантанид-связывающих пептидов и генетически кодируемых акцепторов с исследуемой мишенью [132, 194].

Метод TR-FRET может осуществляться как напрямую, так и опосредованно. В первом случае комплексные соединения лантанидов наряду с акцепторами напрямую присоединяют к исследуемому белку. Во втором случае взаимодействие с белком происходит через антитела или через высокоаффинную систему биотин-стрептавидин [13].

Так как спектры флуоресценции лантанидов обладают несколькими максимумами, то для них в качестве акцепторов подходят флуорофоры, которые поглощают в разных областях спектра. Максимум флуоресценции  $Tb^{3+}$  на длине 490 нм (переход  ${}^5D_4-{}^7F_6$ ) имеет хорошее спектральное перекрытие с флуоресцеином, зеленым флуоресцентным белком GFP, флуорофорами BODIPY и AlexaFluor 488. Максимум флуоресценции  $Tb^{3+}$  на длине 545 нм (переход  ${}^5D_4-{}^7F_5$ ) – с фикоэритрином, тетраметилпроламином, Cy3, AlexaFluor 546. У ионов  $Eu^{3+}$  при флуоресценции на длине волны 617 нм (переход  ${}^5D_0-{}^7F_2$ ) наблюдается хорошее спектральное перекрытие с

**Таблица 1. TR-FRET-биосенсоры с использованием лантанидов в качестве донора энергии**

Донорно-акцепторные пары	Практическое применение	Ссылка	
лантаниды-органические флуорофоры	Tb <sup>3+</sup> криптан-AlexaFluor 546	гомогенный анализ взаимодействий G-белка с его регулятором	[167]
	Tb <sup>3+</sup> -флуоресцеин	анализ активности киназы	[160]
	Eu <sup>3+</sup> -AlexaFluor 680	иммуноанализ эстрадиола	[168]
	Eu <sup>3+</sup> -AlexaFluor 700	изучение кальций-зависимой олигомеризации белка Сорсина	[169]
	Eu <sup>3+</sup> -Cy5	иммуноанализ трийодотиронина	[170]
		изучение конформационных изменений РНК-полимеразы	[171]
	Tb <sup>3+</sup> -тетраметилродамин	изучение взаимодействий актина и тропомиозина	[172]
	Eu <sup>3+</sup> -IC5	скрининг антибиотиков, ингибирующих активность РНК-полимеразы (RNAP)	[173]
	Tb <sup>3+</sup> -Cy3	ДНК-гибридизация	[174]
	Tb <sup>3+</sup> -AlexaFluor 633, флуоресцеин	взаимодействие рецептора PPAR (Peroxisome Proliferator-activated Receptor) с его репрессором и индуктором	[139]
Tb <sup>3+</sup> -флуоресцеин, SNAPFL и Cy5	взаимодействия рецептора эстрогена с его лигандами	[140]	
Tb <sup>3+</sup> -QSY7	ПЦР в режиме реального времени	[175]	
лантаниды-переходные металлы	Tb <sup>3+</sup> -Co <sup>2+</sup>	определение внутримолекулярных расстояний в термоллизине	[176]
	Tb <sup>3+</sup> -Ni <sup>2+</sup> , Tb <sup>3+</sup> -Cu <sup>2+</sup>	определение внутримолекулярных расстояний между доменами калиевого канала	[148]
лантаниды-фикобилипротеины	Eu <sup>3+</sup> -АФЦ	ДНК-гибридизация	[75, 177]
		лиганд-рецепторные взаимодействия	
		белок-белковые взаимодействия	
	Eu <sup>3+</sup> -XL665	олигомеризация мембранных рецепторов (дофаминового рецептора D2, хемокиновых рецепторов, $\alpha_{1A-1}$ -адренорецептора)	[178-180]
		детекция биомаркеров (интерлейкина-6 и -8, $\beta$ -амилоида, простагландина E2)	[181-183]
		определение гормонов (прокальцитонина плазмы крови)	[184]
определение ПЦР-продуктов и олигонуклеотидных сшивок	[116]		
ферментативная активность серинтреониновых и тирозиновых киназ	[185]		

Окончание табл. 1 см. на сл. стр.

Окончание табл. 1.

Донорно–акцепторные пары	Практическое применение	Ссылка	
лантаниды– флуоресцентные белки	Tb <sup>3+</sup> –EmGFP	сенсор c-Jun-N-терминальной киназы	[160]
	Tb <sup>3+</sup> –YFP	сенсор деубиквитилирующего фермента (DUB)	[164]
	Tb <sup>3+</sup> –EGFP и Eu <sup>3+</sup> –EYFP	сенсор Rab21 ГТФазы	[165]
	Tb <sup>3+</sup> –GFP	взаимодействие С-терминального YV-домена трансмембранного белка клаудина и PDZ-домена каркасного белка ZO-1	[186]

флуорофорами Cy5 и AlexaFluor 633 [26]. Перенос энергии от лантанидов (Tb<sup>3+</sup> и Eu<sup>3+</sup>) был показан для этих и других органических флуорофоров (табл. 1). Первоначально TR-FRET-пары, используемые в биоаналитических реакциях и в изучении биохимических процессов, были сконструированы с использованием в качестве акцепторов фикобилипротеинов и органических флуорофоров.

#### ОСНОВНЫЕ ВИДЫ АКЦЕПТОРОВ В TR-FRET-БИОСЕНСОРАХ

##### *Фикобилипротеины*

Фикобилипротеины – пигменты, содержащиеся в цианобактериях, в красных и криптофитовых водорослях, в основе которых лежит тетрапиррольная структура. Они характеризуются высокими значениями квантового выхода, коэффициента экстинкции и большим Стоксовым сдвигом [133, 134]. Среди фикобилипротеинов для биоаналитических реакций используется аллофикоцианин [135, 136]. Белок характеризуется большим молекулярным весом 100 кДа и является олигомером. Он поглощает в области 610–650 нм и флуоресцирует в области 660 нм, обладает достаточно высоким квантовым выходом (0,68) и коэффициентом экстинкции (700000 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>). Поскольку при низких концентрациях в растворе аллофикоцианин обладает тенденцией к диссоциации, мономеры белка ковалентно сшиваются химическим способом. Такой аллофикоцианин (cross-linked) получил название XL665 [137].

Так как белок поглощает в области 610–650 нм, было предложено использовать его в качестве акцептора энергии Eu<sup>3+</sup> для разработки метода гомогенного флуоресцентного анализа с временным разрешением [30]. В данном методе для комплексообразования используется криптат, макроциклический лиганд, содержащий бипиридиновые группы, в интрамолекулярную полость которого включен ион Eu<sup>3+</sup> [138]. Для анализа к исследуемой молекуле подбираются два аффин-

ных антитела, одно из которых помечено криптоном  $\text{Eu}^{3+}$ , другое – XL665. При взаимодействии двух антител с антигеном наблюдается перенос энергии.

#### *Органические флуорофоры*

Многие органические флуорофоры, которые обладают интегральным перекрытием с хелатами  $\text{Tb}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , используются в качестве акцепторов (табл. 1). Флуоресцирующие красители характеризуются коротким временем жизни, широкими спектрами возбуждения и флуоресценции и малым Стоксовым сдвигом. Они обладают широкой палитрой флуоресценции в УФ-, видимой и ближнеинфракрасной областях. С использованием нескольких спектрально различающихся флуорофоров было показано, что ион  $\text{Tb}^{3+}$  может являться одновременным донором сразу для двух, трех и четырех акцепторов [139–141]. Это связано с тем, что ион  $\text{Tb}^{3+}$  обладает несколькими максимумами флуоресценции [26].

Помимо флуоресцирующих акцепторов используются тушители флуоресценции (BHQ-2, QSY-7, дансил). Такой метод иногда именуется QRET (Quenching Resonance Energy Transfer) [142], в котором при переносе энергии от донора к акцептору происходит тушение флуоресценции лантанида [143].

#### *Квантовые точки*

Сравнительно новым объектом для конструирования FRET-пар являются квантовые точки. По сравнению с органическими красителями, они обладают в 10–50 раз более высоким по значению коэффициентом экстинкции, в 10–20 раз большей яркостью, в 100–200 раз более высокой фотостабильностью [144]. В работах [145, 146] были получены FRET-пары между комплексами  $\text{Tb}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , конъюгированных со стрептавидином, и квантовыми точками CdSe/ZnS, конъюгированных с биотином. Большой интеграл перекрытия, высокий коэффициент экстинкции CdSe/ZnS и высокие квантовые выходы комплексов лантанидов (для  $\text{Tb}^{3+}$  с L-супрамолекулярным комплексом – 0.49, для комплексов  $\text{Eu}^{3+}$ -L и  $\text{Eu}^{3+}$ -TBP – 0.20 и 0.24, соответственно) привели к увеличению радиуса Ферстера: 104 Å для  $\text{Tb}^{3+}$ -L, 96 Å для  $\text{Eu}^{3+}$ -L и 91 Å для  $\text{Eu}^{3+}$ -TBP. Полученные FRET-пары с использованием системы стрептавидин–биотин в дальнейшем могут использоваться в различных биоаналитических реакциях.

#### *Комплексы переходных металлов*

Комплексы переходных металлов также нашли свое применение при конструировании донорно-акцепторных пар. Идея была связана с тем,

что комплексы металлов ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) обладают полосой поглощения в области флуоресценции  $\text{Tb}^{3+}$ . На этом основании было разработано несколько FRET-пар с использованием лантанидов и комплексов металлов. Перенос энергии от  $\text{Tb}^{3+}$  к  $\text{Co}^{2+}$  был показан в работе Хорокса с соавторами [147], где определяли внутримолекулярные расстояния между сайтами связывания металлов в белке термоллизине (металлопептидаза). Фермент содержит один сайт связывания иона  $\text{Zn}^{2+}$  и четыре сайта связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которые замещались на  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Tb}^{3+}$ , соответственно. Позднее на основе тербий-связывающего пептида и 6-гистидинового олигопептида были созданы генетически кодируемые FRET-пары между тербием и металлами  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , которые использовались в определении о внутримолекулярных расстояний между сегментами калиевого канала в ооцитах лягушки [148].

#### *Флуоресцентные белки*

Флуоресцентные белки относительно недавно стали использоваться как акцепторы при переносе энергии от лантанидов. В качестве маркеров они получили широкое распространение для изучения экспрессии генов, локализации и динамики клеточных белков, мечения органелл и отдельных клеток. Флуоресцентные белки обладают широкой палитрой флуоресценции в синей, зеленой, желтой, оранжевой и красной областях спектра [149]. На их основе созданы FRET-биосенсоры внутриклеточных метаболитов (сAMP, сGMP, глутамат, триптофан,  $\text{Ca}^{2+}$ ), ферментативных активностей (Cdc42, Ras, Bid, каспазы, киназы,  $\beta$ -секретазы, CrkII), pH- и  $\text{Cl}^-$ -индикаторы, а также сенсоры белок-белковых взаимодействий [150–153]. В отличие от остальных флуорофоров, сенсоры на основе флуоресцентных белков не требуют введения в клетку дополнительных кофакторов для фолдинга, характеризуются аутокаталитическим формированием хромофора [153, 154] и в основном не влияют на функционирование слитых с ними белков [155]. Так как эти сенсоры являются генетически кодируемыми, то они могут вводиться в клетки путем трансфекции кодирующей последовательности, которая в дальнейшем будет воспроизводиться в клетках. Прикрепление сигнальной последовательности к флуоресцентным белкам позволяет маркировать органеллы и мембраны. Регуляция яркости сигнала белков может обеспечиваться не только их спектральными свойствами, но и типом промотора. Например, для более яркого сигнала используют сильные промоторы (CMV – цитомегаловирусный), для снижения или увеличения экспрессии используют индуцибельные промоторы (Tet-on или Tet-off промоторы) [151].



Однако FRET-сенсоры на основе флуоресцентных белков также имеют некоторые недостатки при использовании. Во-первых, они обладают достаточно широкими спектрами возбуждения и флуоресценции, что приводит к значительному перекрытию спектров донора и акцептора, и как следствие, к неправильной интерпретации данных по эффективности переноса энергии (например, пара CFP–YFP) [156]. Во-вторых, флуоресцентные белки обладают относительно большими размерами (2.4 нм в диаметре и 4.2 нм по высоте  $\beta$ -бочонка) [157, 158], что приводит к увеличению расстояния между донором и акцептором и, следовательно, к снижению эффективности переноса энергии.

Если в качестве донора во FRET-паре использовать лантаниды, то благодаря их большому Стоксову сдвигу и узкополосным спектрам флуоресценции, снижается вероятность спектрального перекрытия эмиссии акцептора. Регистрация флуоресценции такой FRET-пары с временной задержкой исключает регистрацию прямого возбуждения акцептора [26].

Многие GFP-подобные белки являются потенциальными акцепторами для лантанидов. Это связано с тем, что лантаниды обладают несколькими максимумами флуоресценции. Наиболее эффективно перенос энергии будет происходить при спектральном перекрытии акцепторов с основными пиками флуоресценции: 545 нм для тербия и 617 нм для европия. Среди флуоресцентных белков в основном оранжевые и красные белки обладают спектральным перекрытием с пиком флуоресценции Tb<sup>3+</sup> при 545 нм. В области флуоресценции Eu<sup>3+</sup> на длине 617 нм поглощает только один белок RFP660. Этот белок поглощает в области главного максимума флуоресценции европия (поглощение 618 нм), однако обладает низкой яркостью (квантовый выход – 0.09, коэффициент экстинкции – 27000 M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) [149].

Тенденция флуоресцентных белков к олигомеризации и агрегации является фактором, ограничивающим их использование: агрегаты оказывают токсический эффект на клетки, а тетрамерная организация белков часто препятствует их использованию в качестве белков слияния [159]. Поэтому определенные усилия направлены на получение мономерных флуоресцентных белков путем введения аминокислотных замен в области контактов между субъединицами [149] или на создание тандемных димеров, при котором получают два мономера, слитых «голова к хвосту». Таким способом был получен белок tdTomato (Clontech, США). Среди полученных на сегодняшний день флуоресцентных белков к мономерам относятся mBanana, все оранжевые белки, DsRed-monomer, TagRFP и mRuby. Белки mKO и

mOrange, и их производные, обладают яркой флуоресценцией, большим спектральным перекрытием, но имеют небольшой Стоксов сдвиг, что будет осложнять регистрацию флуоресценции [26]. Кроме того, белок mBanana обладает низкой яркостью, а mOrange – очень низкой фотостабильностью [7].

Среди красных мономерных белков, DsRed-мономер обладает невысокой яркостью и фотостабильностью. Другой белок TagRFP, мутант красного флуоресцентного белка eqFP578, полученного из актинии *Entacmaea quadricolor*, наоборот, обладает высокой яркостью и умеренной фотостабильностью. Белок mRuby, мутант на основе белка eqFP611, полученный относительно недавно, отличается большим Стоксовым сдвигом [7].

Выбор флуоресцентных белков в качестве акцепторов в TR-FRET-паре с лантанидами определяется целью работы. Общими критериями являются степень спектрального перекрытия, яркость флуоресценции белка, величина Стоксова сдвига [7].

Первая TR-FRET-пара на основе аминокислотного хелата Tb<sup>3+</sup> и белка EmGFP была использована для определения активности с-Jun-N-терминальной киназы [160]. При этом максимум возбуждения EmGFP (487 нм) перекрывался с максимумом флуоресценции Tb<sup>3+</sup> на длине волны 490 нм. При взаимодействии меченных хелатом Tb<sup>3+</sup> антител с фосфорилированным субстратом, слитым с белком GFP, наблюдался перенос энергии, что позволяло судить об активности терминальной киназы. Впоследствии TR-FRET-сенсор был запатентован под брендом LanthaScreen (Invitrogen) и стал использоваться для определения активности различных киназ [161–163].

TR-FRET-пара на основе Tb<sup>3+</sup>-YFP была использована для определения активности деубиквитинилирующих ферментов. Ингибирование этих ферментов является одной из стратегий в лечении опухолевых заболеваний. TR-FRET-пара состояла из убиквитина, который кодировался в одной рамке считывания с белком YFP, а с другой стороны был помечен хелатом тербия. Регистрация спектров микросекундной флуоресценции и кинетики затухания донора и акцептора с временной задержкой 100 мкс показала, что в результате переноса энергии наблюдается сенсibilизированное увеличение времени жизни флуоресценции белка YFP. Высокая эффективность переноса энергии, характерная для интактного субстрата, снижалась при его разрезании деубиквитинилирующим ферментом [164].

В работе [165] были получены две TR-FRET-пары Tb<sup>3+</sup>-EGFP и Eu<sup>3+</sup>-EYFP, с помощью которых изучали ферментативную активность Rab21 ГТФазы. Флуоресцентные белки были слиты с ферментом,

хелаты лантанидов (производные изотиоцианата) конъюгированы с ГТФ. Так как белок EYFP поглощает в области 514 нм, то между ним и хелатом  $\text{Eu}^{3+}$  отсутствует спектральное перекрытие. Несмотря на это, при регистрации флуоресценции и времени жизни акцептора с временной задержкой 100 мкс наблюдался перенос энергии. Такое явление ранее уже было описано для  $\text{Eu}^{3+}$  [166]. Оно было названо nonoverlapping FRET (nFRET), так как при таком переносе энергии отсутствует спектральное перекрытие, и флуоресценция акцептора регистрируется в более коротковолновой области, чем флуоресценция донора. Процесс не может объясняться теорией Ферстера. Вероятнее всего, перенос энергии в таких парах происходит не с обычного электронного уровня  $\text{Eu}^{3+}$  ( ${}^5\text{D}_0$ ). Исследователи, исходя из данных по корреляции между флуоресценцией акцептора и схемой электронных уровней, сделали вывод, что перенос энергии происходил с более высоких электронных уровней ( ${}^5\text{D}_2$  и  ${}^5\text{D}_1$ ), на которые он обычно принимает энергию возбуждения. Авторами также была построена схема распределения электронных уровней доноров и акцепторов.

Электронный уровень белка EYFP находится ниже уровня  ${}^5\text{D}_2$  и примерно совпадает по положению с  ${}^5\text{D}_1$ . Учитывая, что сенсibilizированное время жизни белка EYFP затухало по двухэкспоненциальному закону ( $8 \pm 0.1$  мкс и  $1.08 \pm 0.02$  мс), было сделано предположение, что перенос энергии на белок происходит с уровней  ${}^5\text{D}_2$  и  ${}^5\text{D}_1$ . Уровень  ${}^5\text{D}_3$  не рассматривался, так как он находится выше электронного уровня сенсibilизатора  $\text{Eu}^{3+}$ . В паре же  $\text{Tb}^{3+}$ -EGFP перенос энергии от  $\text{Tb}^{3+}$  на GFP происходит с излучательного уровня  ${}^5\text{D}_4$ , что приводило только к одноэкспоненциальному затуханию флуоресценции EGFP ( $60 \pm 2$  мкс).

Предложенные TR-FRET-сенсоры с использованием лантанидов в качестве доноров представлены в табл. 1.

#### ЛАНТАНИДСВЯЗЫВАЮЩИЕ ПЕПТИДЫ КАК ДОНОРЫ В TR-FRET-БИОСЕНСОРАХ

Способность некоторых белков связывать различные металлы давно используется в металлоаффинной хроматографии [176]. Ионы кальция и тербия обладают сходными ионными радиусами; для обоих атомов наблюдается следующее предпочтение в атомах, образующих связь:  $\text{O} > \text{N} > \text{S}$ . Поэтому EF-мотивы кальцийсвязывающих белков использовали как основу для получения тербийсвязывающих пептидов, которые бы специфически связывали  $\text{Tb}^{3+}$  и сенсibilизировали флуоресценцию [187–189].

В первой работе по получению тербийсвязывающих пептидов было показано, что при вариации ароматических аминокислот и их

позиции в 14-аминокислотных пептидах кальмодулинового семейства, присутствие триптофана в позиции 7 является наиболее оптимальным для сенсбилизации флуоресценции Tb<sup>3+</sup> при возбуждении на 280 нм. В результате ими была получена следующая последовательность: GDYNADGWIEFEEL с  $K_d = 9.3$  мкМ [190].

Другая группа исследователей [203] занялась поиском альтернативной последовательности, используя при этом существующую библиотеку пептидов. Они оптимизировали положение остатков цистеина и в результате получили последовательность ACADYNKDGWYEELECAA. Новый пептид обладал в 40 раз более высокой аффинностью по отношению к Tb<sup>3+</sup> ( $K_d = 220$  нМ) и демонстрировал более яркую флуоресценцию по сравнению с существующим.

Дальнейшая разработка тербийсвязывающих пептидов также велась в направлении увеличения аффинности Tb<sup>3+</sup>. В работах [191, 192] была использована стратегия «смещения–разделения» для проведения комбинаторного синтеза лантанидсвязывающих пептидов на твердой подложке. Затем последовательно был проведен отбор пептидов, не содержащих остатков цистеина и связывающих Tb<sup>3+</sup> с высокой аффинностью. В результате чего было получено два пептида YIDTNNDGWYEGDELLA ( $K_d = 57$  нМ) [191] и FIDTNNDGWIEGDELLLEEG ( $K_d = 19$  нМ) [192], обладающих более высокой аффинностью по отношению к Tb<sup>3+</sup>. Природа сенсбилизации флуоресценции Tb<sup>3+</sup> в тербийсвязывающем пептиде YIDTNNDGWYEGDELLA и его сродство к Tb<sup>3+</sup> была изучена на основе данных рентгеноструктурного анализа и измерений флуоресценции с временной задержкой [193].

Применение тербийсвязывающих пептидов было показано в изучении структуры белков и в изучении межмолекулярных взаимодействий. В упомянутой ранее работе для определения внутримолекулярных расстояний между доменами ионного канала ооцитов лягушки методом TR-FRET [148] использовалась последовательность YIDTNNDGWYEGDELLA. Акцептором во FRET-паре служил комплекс никеля или меди с 6-His тэгом. При наличии переноса энергии между тэгами доменов наблюдали уменьшение времени жизни тербия в несколько раз. Таким способом было определено расстояние между доменами S1–S5 ионного канала.

Было изучено взаимодействие SH2-доменов Src и Crk киназ, слитых с тербий-связывающим пептидом (FIDTNNDGWIEGDELLLEEG), с фосфорилированными и нефосфорилированными пептидами, конъюгированными с флуорофорами BODIPY-FL и BODIPY-TMR. Все пептиды были получены методом твердофазного пептидного синтеза с последующим мечением органическим флуорофором. [194].

В 2008 г. были описаны полусинтетические лантанидсвязывающие тэги (LBT), где вместо триптофана в 7-й позиции присутствовали синтетические флуорофоры – карбостирил 124 (cs 124) и акридин [195]. Выбор данных флуорофоров основывался на том, что их возбуждение происходит в более длинноволновых областях – 337 нм (для cs 124) и 390 (для акридона), что могло сделать их более безопасными для применения *in vivo*. При сравнении сенсбилизации ионов Tb<sup>3+</sup> и Eu<sup>3+</sup> в трех пептидах: в исходном пептиде с триптофаном (LBT-Trp), в пептиде с карбостирилом 124 (LBT-cs124) и в пептиде с акридоном (LBT-Acd) было показано, что в LBT-Trp сенсбилизуется только Tb<sup>3+</sup>, в LBT-cs124 сенсбилизуются Tb<sup>3+</sup> и Eu<sup>3+</sup>, в LBT-Acd сенсбилизуется только Eu<sup>3+</sup>, причем более эффективно, чем LBT-cs124 [195].

Дальнейшая разработка генетически кодируемых хелатов привела к созданию двойных лантанидсвязывающих пептидов, которые должны были способствовать увеличению интенсивности флуоресценции Tb<sup>3+</sup>. Полученная конструкция двух слитых LBT (GPGYIDTNNDGWIEGDELYIDTNNDGWIEGDELLA) связывала два иона Tb<sup>3+</sup>. Регистрация сигнала показала в три раза более яркую флуоресценцию по сравнению с флуоресценцией одиночных лантанидсвязывающих пептидов [196].

Лантанидсвязывающие пептиды были использованы для определения меж- и внутримолекулярных расстояний в центральной цитоплазматической петле пермеазы, обеспечивающей транспорт лактозы в клетку *E. coli* [197]. TR-FRET-пара состояла из LBT, генно-инженерным путем включенного в центральный участок петли, и акцепторов-цистеинов Cys<sub>169</sub> и Cys<sub>179</sub>, меченых органическими флуорофорами. С помощью данного сенсора было определено расстояние между центром петли пермеазы и цистеинами.

Лантанидсвязывающие пептиды состоят не более чем из 20 аминокислот и составляют примерно 10% от размера белка GFP [198], поэтому их применение должно способствовать более эффективному переносу энергии.

Нами были получены FRET-пары на основе тербийсвязывающего пептида YIDTNNDGWYEGDELLA [199]. В качестве акцептора был использован красный флуоресцентный белок DsRed2 и TagRFP. Значения эффективности FRET составили 35% для пары Tb<sup>3+</sup>-СП-TagRFP, в которой акцептор является мономером, и 28% для пары Tb<sup>3+</sup>-СП-DsRed2 [199, 200].

Уникальным свойством описанных сенсоров является микросекундная флуоресценция акцептора вследствие переноса энергии с лантанидов, что имеет важное преимущество перед другими сенсорами, проявляющееся в увеличении соотношения сигнал/фон за

счет минимизации наносекундного фонового сигнала. Это делает их высокоинформативными инструментами для детекции молекулярных событий *in vitro* и *in vivo*.

## VI. БИОИМДЖИНГ НА ОСНОВЕ ЛАНТАНИДОВ

Первоначально комплексы лантанидов разрабатывались непосредственно для биоаналитических приложений. Дальнейшая разработка техники микроскопии с опцией временной задержки и флуоресцирующих комплексов лантанидов, способных проникать в живые клетки или экспрессироваться в них, инициировали развитие имиджинга *in vivo* с применением лантанидов [12, 201–203].

В 1992 г. группа финских исследователей под руководством Соини применили микроскопию с временным разрешением (TRLM) для имиджинга лантанидных комплексов [201]. Они оснастили эпифлуоресцентный микроскоп импульсным источником света и оптическим модулятором в плоскости диафрагмы. Таким образом, были получены изображения фиксированных тканей и клеток с использованием синтетических лантанидных хелатов [204, 205]. Были получены имиджинги с использованием уже имеющихся меток: стрептавидина, меченного BCPDA [206].

Для мечения клеток стали использовать синтетические или полусинтетические лантанидные хелаты. Класс неорганических хелатов низкомолекулярных метаболитов для целей биоимиджинга описан в главе IV.

В получении TR-FRET-сенсоров для клеточного имиджинга можно выделить две стратегии. Для определения внутриклеточной ферментативной активности использовали синтетические или полусинтетические лантанидные хелаты в качестве доноров и слитые с флуоресцентными белками субстраты в качестве акцепторов [160, 164, 165]. В изучении белок-белковых взаимодействий использовали LBT и синтетические акцепторы [186, 195]. Получение полностью генетически кодируемых FRET-пар на основе флуоресцентных цветных белков и LBT – еще одна стратегия в получении сенсоров для клеточного биоимиджинга [199, 200].

Высокая информативность методов биоимиджинга обеспечивается с одной стороны высокоспецифичными сенсорами, с другой стороны – высокочувствительными методами. Наиболее высокоинформативным инструментом для прижизненной визуализации молекулярных событий можно считать сочетание методов FRET и техники FLIM. Измерение стационарного сигнала флуоресценции требует подбора

соответствующих фильтров, требует учета вклада донора в спектр эмиссии акцептора, учета прямого возбуждения акцептора, необходима нормализация сигнала на концентрацию донора и акцептора. Все эти ограничения снимаются при использовании метода FRET-FLIM, в основе которого лежит получение изображений усредненных времен жизни донора, которое изменяется при нарушении условий FRET [156, 207]. При сопоставлении различных методов микроскопии FRET-FLIM демонстрирует наиболее высокую чувствительность в изучении белок-белковых взаимодействий в клетке [186, 20].

Изучение белок-белковых взаимодействий в клетке методом FRET-FLIM продемонстрировано в работе [186]. TR-FRET-пара состояла из люминесцентного комплекса тербия (TbP-Lumi4) в качестве донора и GFP в качестве акцептора. С помощью данной TR-FRET-пары детектировали взаимодействие С-терминального YV-домена трансмембранного белка клаудина и PDZ-домена каркасного белка ZO-1. Сближение белков приводило к 6-кратному изменению сигнала FRET.

Очевидно, что препятствием для использования лантанидов в анализе живых объектов является коротковолновая высокоэнергетическая область возбуждения их флуоресценции, в особенности, если речь идет об использовании лантанидсвязывающих пептидов, где сенсбилизатором иона лантанида является триптофан. Для решения этой проблемы используется многофотонное возбуждение лантанидов.

#### МНОГОФОТОННОЕ ВОЗБУЖДЕНИЕ ЛАНТАНИДОВ

Использование коротковолнового высокоэнергетического УФ-облучения для возбуждения флуоресценции приводит к фотодеструкции клеток и обладает малой глубиной проникновения света [209]. Было показано, что облучение клеток линии CHO 50 Вт ртутной лампой высокого давления при 365 нм в течение нескольких секунд приводит к изменениям в редокс-статусе, к разрывам ДНК и прекращению деления клеток [210]. Чтобы избежать губительного для живых клеток облучения ультрафиолетом, используют технику многофотонного возбуждения.

Впервые двухфотонное поглощение было показано Кайзером и Гаретом в 1961 г. при возбуждении флуоресценции кристалла  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{3+}$  [211]. В 1964 г. Шин и Брэдли наблюдали флуоресценцию кристаллов нафталина, вызванную трехфотонным возбуждением [212]. Впоследствии, многофотонное возбуждение стали использовать в молекулярной спектроскопии различных материалов [213, 214].

Возможность применения многофотонного возбуждения в биологии в сочетании с флуоресцентной микроскопией была показана Денком в 1990 г. [215].

Многофотонное возбуждение происходит в результате одновременного поглощения флуорофором в элементарном акте нескольких фотонов, энергия которых суммируется. Вероятность многофотонных процессов пренебрежимо мала при интенсивности света обычных источников, но при использовании лазерного излучения становится сравнимой с вероятностью обычного (однофотонного) поглощения. Однофотонные процессы линейно зависят от интенсивности излучения; в случае многофотонных процессов зависимость нелинейная (например, квадратичная при двухфотонном процессе) [216].

Для реализации двух- или многофотонного возбуждения необходимы следующие условия: конфокальный микроскоп, высокочастотный фемто- или пикосекундный пульсирующий лазер с высокой пиковой и умеренной средней мощностью с длиной волны в инфракрасной или ближнеинфракрасной области, объектив с высокой апертурой, сканирующая система, спектральный модуль для дискриминации флуоресцентного сигнала и высокочувствительная детектирующая система [216, 217].

Для многофотонного возбуждения обычно используют титан-сапфировые лазеры с широкой полосой генерации (700–1000 нм). Лазеры используются для импульсного облучения, с продолжительностью не более 100–150 фемтосекунд, частотой генерации сигнала – 80–100 МГц [218], мощностью не более 25 мВ. Установленные значения параметров способствуют минимизации фотодеструкции клеток и тканей в результате облучения [219, 220].

В качестве детекторов для регистрации флуоресцентного сигнала в многофотонной микроскопии чаще всего используются фотоумножители. Лавинные фотодиоды также обладают превосходной чувствительностью, однако малый размер фоточувствительной зоны может приводить к погрешностям детекции и в этом случае требуется применение особой оптики [216].

Использование многофотонного возбуждения имеет свои преимущества по сравнению с однофотонным: исключается вредное воздействие ультрафиолета на живые клетки [221] и увеличивается глубина проникновения света до 800 микрон [222]. Последнее обеспечивается за счет того, что облучение дальнекрасным и ближнеинфракрасным светом попадает в терапевтическое окно прозрачности, область спектра, где свет менее всего поглощается и рассеивается [217, 223, 224]. Метод не подходит для изучения сильно пигментированных клеток и тканей, поглощающих в ближнеинфракрасной области [225].



Интерес к многофотонному возбуждению лантанидов начал проявляться в начале XXI века. Лакович вместе с сотрудниками показали в своих работах, что:

(1) флуоресценция лантанидов, обусловленная переходами с  $^5D_4$  на F-уровни, может индуцироваться многофотонным возбуждением; было показано двухфотонное возбуждение (при 796 нм) флуоресценции соли  $EuCl_3$  и трехфотонное возбуждение (при 805 нм) соли  $TbCl_3$  [226];

(2) флуоресценция лантанидов, вызванная многофотонным поглощением, значительно усиливается при сенсibilизации флуоресценции лантанидов органическими хелатами [227].

В работе было показано, что количество поглощаемых фотонов зависит не только от длины волны возбуждения и мощности лазерного облучения, но и от природы хелата. При использовании метилантрацилина происходят трехфотонные процессы возбуждения  $Tb^{3+}$  и  $Eu^{3+}$ , при использовании карбостирила 124 – как двух-, так и трехфотонные процессы, при использовании производного кумарина – только двухфотонные процессы. Для комплекса  $Eu^{3+}$  и кумарина наблюдался переход от двух- к трёхфотонному возбуждению при варьировании длины волны возбуждения от 780 до 880 нм. Возможность многофотонного возбуждения была продемонстрирована также для комплексов  $Nd^{3+}$  и  $Yb^{3+}$ , что доказывает потенциальную возможность использования и этих лантанидов для имиджинга тканей [228].

В дальнейшем в других работах были показаны двух-, трех- и даже четырехфотонные процессы возбуждения флуоресценции  $Tb^{3+}$  в комплексе с белком [229] и в кристаллах комплексов  $Tb^{3+}$  [230, 231],  $Nd^{3+}$  и  $Eu^{3+}$  [232] с органическими лигандами. Спектры флуоресценции и время жизни в возбужденном состоянии были одинаковы как в случае однофотонного, так и для многофотонного возбуждения [233]. Это доказывает, что при обоих способах возбуждения происходит одинаковый путь сенсibilизации и последующей флуоресценции лантанида.

В работе [234] Палсон с сотрудниками для проведения многофотонного возбуждения флуоресценции  $Eu^{3+}$  совместили облучение титан-сапфировым лазером и технику спектроскопии с временным разрешением. Используя временную задержку (от нескольких сотен нс до мкс) между двухфотонным возбуждением и детекцией сигнала, удалось значительно увеличить соотношение сигнала флуоресценции от комплекса  $Eu^{3+}$  с лигандом к фоновому сигналу автофлуоресценции от лиганда.

Конъюгат хелатов Eu с антителами к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) был использован для его визуализации на поверхности клеток линии A431 с помощью двухфотонного возбуж-

дения лантанида. Предел обнаружения европиевой метки составил менее 100 цептамолей [235].

Впервые имиджинг биологического объекта посредством двухфотонного возбуждения флуоресценции Tb<sup>3+</sup> на длине волны 532 нм удалось провести для комплекса Tb<sup>3+</sup>-трис(дипиколинат), конъюгированного с кристаллом лизоцима [236]. Позднее другими авторами [237] с помощью двухфотонного возбуждения (760 нм) были получены изображения раковых клеток линии Т24, зафиксированных в этаноле, к которым был добавлен хелат Eu<sup>3+</sup> (производное дипиколиновой кислоты). Флуоресцирующий комплекс обладал хорошей стабильностью в воде и достаточно высоким квантовым выходом (0.157). На флуоресцентных изображениях клеток, обладавших высоким соотношением сигнал/фон, были ясно различимы ядро, ядрышко и эндоплазматический ретикулум.

В работе коллектива под руководством Паркера [238] было проведено двухфотонное возбуждение комплексов Tb<sup>3+</sup>, где хромофором служил азаксантрон. Цель этих исследований заключалась в определении внутриклеточного профиля локализации хелатов лантанидов в зависимости от конъюгированного заместителя (эфира, кислоты, амида, алкильного фрагмента C<sub>12</sub>, Arg<sub>7</sub>, Lys–Arg<sub>7</sub>, тетрагуанидина или сывороточного альбумина человека) в клетках линии NIH–3Т3 и HeLa. В зависимости от типа лиганда существенно менялась токсичность комплексов Tb для клеток. Так, было показано, что некоторые соединения вызывают апоптоз, в то время как другие вызывают гибель клеток посредством некроза. При этом в зависимости от типа клеточной линии токсичность комплексов тербия была различной.

Коллектив во главе с Вонг [239] получил флуоресцентные изображения клеток линий A549, HeLa и HONE1, к которым был добавлен лантанидный комплекс TbL'(NO<sub>3</sub>), где L' – это производное 3-метоксибензамида. Облучение тербиевого комплекса на длине волны 800 нм привело к трехфотонному поглощению. Лантанидный хелат не оказывал цитотоксического действия на клеточные линии, что сделало возможным получить изображения флуоресценции именно живых клеток. Выживаемость клеток, проинкубированных с комплексом тербия, была такой же, как и в контроле.

Исследование триазиновых комплексов Eu<sup>3+</sup> показало, что даже небольшая модификация лиганда может приводить к значительным изменениям фотофизических свойств этих соединений, в частности сечения двухфотонного поглощения. Эксперименты по зависимости

сигнала от мощности лазерного излучения подтвердили двухфотонную природу возникновения сигнала флуоресценции Eu в клетках HeLa [240].

Другой эксперимент по многофотонному возбуждению комплексных соединений Tb<sup>3+</sup> и Eu<sup>3+</sup>, хелатированных бинуклеарными хелатами, ([Ln<sub>2</sub>(L<sup>CX</sup>)<sub>3</sub>], где Ln – Tb<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, X – 2.5, L – бинуклеарные хелаты), проводили на клетках HeLa. Разработанные комплексные соединения оказались термодинамически стабильными, химически инертными, нетоксичными для клеток вплоть до концентрации 500 мкМ и способными проникать в любой тип клеточной линии. Облучение проводили на длине волны 800 нм с использованием титан-сапфирового лазера с продолжительностью импульса 50 фемтосекунд, частотой генерации сигнала 50 кГц. Характерная для Tb<sup>3+</sup> и Eu<sup>3+</sup> флуоресценция наблюдалась после трехфотонного возбуждения комплексов [Ln<sub>2</sub>(L<sup>C2</sup>)<sub>3</sub>] и после двухфотонного возбуждения комплекса [Eu<sub>2</sub>(L<sup>C5</sup>)<sub>3</sub>]. Получение флуоресцентных изображений клеток HeLa, проинкубированных с комплексом [Eu<sub>2</sub>(L<sup>C5</sup>)<sub>3</sub>] после двухфотонного возбуждения выявило локализацию лантанида вокруг клеточного ядра [241].

Таким образом, проведенный исследования демонстрируют, что использование многофотонного возбуждения дает возможность изучать флуоресценцию лантанидов в живых клетках, избегая при этом нежелательного действия УФ. Дальнейшая перспектива заключается в разработке методики многофотонного возбуждения генетически кодируемых лантанидных FRET-сенсоров для изучения внутриклеточных процессов.

#### ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ЛАНТАНИДНЫМ КОМПЛЕКСАМ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ БИОИМИДЖИНГА

Для исследований на живых клетках к комплексным соединениям лантанидов выдвигаются следующие требования: они должны проникать в клетки, обладать низкой токсичностью, высокой термодинамической и кинетической стабильностью, растворяться в биологических жидкостях с сохранением активной формы, обладать селективным и обратимым мечением целевых субстратов [12]. Для исследований на уровне целого организма на первое место выходит безопасность данных комплексов для его жизнедеятельности.

В последних публикациях проанализированы данные по адсорбции, распределению, метаболизму и экскреции нехелатированных форм лантанидов [243, 244]. Показано, что ионные формы лантанидов проявляют основную токсичность в дозе 20–40 мг/кг веса. Дальней-

шее увеличение дозы ведет к снижению токсического эффекта. Эту необычную дозу-зависимость объясняют образованием коллоидных форм лантанидов, которые утрачивают способность связывать белки и мембраны [243].

Соединения гадолиния давно применяются как контрастирующие соединения в магнитно-резонансной томографии [244]. Эксперименты по острой токсичности у грызунов показали, что при введении хелатированного гадолиния токсические эффекты не проявляются даже при 50-кратном превышении  $LD_{50}$  свободного  $Gd^{3+}$ . Высвобождение же  $Gd^{3+}$  из комплексов может приводить к замещению им  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ . В субхроническом эксперименте при этом обнаруживаются все признаки дефицита цинка.

Таким образом, основным критерием безопасности лантанидов для их применения *in vivo* является высокая стабильность их комплексных соединений [245].

На клеточном и молекулярном уровне показано, что свободные ионы лантанидов могут связываться с участками связывания кальция, магния различных белков, АТФазой саркоплазматического ретикулума, цистатином, фосфатидилсеринном [243, 244]. Поэтому для клеточного биоимиджинга к лантанидным комплексам выдвигаются те же требования, что и для макромолекулярного имиджинга – высокая стабильность комплексов.

Для клеточного имиджинга получен ряд синтетических хелатов, которые доставляют в клетки лантаниды в связанном состоянии [242, 246, 247]. Высокой термодинамической стабильностью обладают полиаминокарбоксилаты, в частности 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N N' N'' N'''-тетрауксусная кислота (ДОТА) и диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА). При этом необходимо учитывать, что дополнительная химическая модификация, например введение аминогрупп, может приводить к снижению стабильности новых комплексов [245].

Другое важное требование, которое предъявляется к лантанидным комплексам, используемым в клеточном биоимиджинге, – они должны проникать в клетку. Путь, по которому комплексы лантанидов попадают в клетки, определяется в первую очередь их молекулярным весом. Низкомолекулярные соединения попадают в основном в клетки по механизму эндоцитоза (клатрин-зависимый эндоцитоз или кавеоларный путь), более крупные – по механизму макропиноцитоза или по клатрин/кавеола-независимому пути. Для комплексов тербия и европия основным путем, является макропиноцитоз [248].

**Таблица 2. Особенности внутриклеточной локализации комплексов лантанидов [249]**

Тип локализации	Особенности накопления/выведения	Токсичность, IC <sub>50</sub>
Эндосомально-лизосомальная (80% всех комплексов)	Быстрое накопление и выведение	В основном нетоксичные бинуклеарные хеликаты
Митохондриально-эндосомально-лизосомальная	Быстрое накопление и медленное выведение, челочное курсирование комплексов в системе митохондрии-лизосомы	IC <sub>50нетоксичных</sub> ≥175 мкМ, IC <sub>50токсичных</sub> 20–70 мкМ. Токсичные соединения нарушают мембранный потенциал митохондрий, при нахождении в митохондриях больше 6–10 ч вызывают апоптоз
Рибосомально-нуклеольный	Медленное накопление и выведение	Токсичность показана для соединений с N-координированным азатиаксантиновым остатком, IC <sub>50</sub> 40–90 мкМ

На основании изучения внутриклеточной локализации лантанидных комплексов было выделено три их основных класса: эндосомально-лизосомальный, митохондриально-эндосомально-лизосомальный и рибосомально-нуклеольный [249] (табл. 2).

Анализ большого числа исследований показал, что динамика накопления, распределения и выведения, а также следующие отсюда возможные токсические эффекты определяются химической природой комплексов, в том числе химической природой заместителей.

Было изучено одиннадцать вариантов производных на основе базового комплекса тербия, координированного N-азоксантроновыми группами [249]. Комплекс также содержал 3 липофильных заместителя, предотвращающих тушение люминесценции уратами и аскорбатами. Было установлено, что ковалентный конъюгат комплекса с человеческим сывороточным альбумином вообще не накапливался ни в одной из изученных клеточных линий. Введение же амидной группы в положение C<sub>12</sub> макроцикла вызывало дестабилизацию клеточных мембран и приводило к некрозу клетки. Олигогуанидиновый конъюгат преимущественно локализовался на митохондриях и приводил к апоптозу. Пептидные конъюгаты и метиловый эфир в качестве заместителя не вызывали токсических эффектов, быстро в течение нескольких минут накапливались по лизосомально-эндосомальному типу с преимущественной локализацией в макропиносомах. Введение гидрофильных карбоксильных и карбоксамидных заместителей также приводило к токсическим эффектам с локализацией в митохондриях и эндосомах по истечению нескольких часов и тоже приводило к дестабилизации мембран [249].

В случае если сенсор является полностью генетически кодируемым, встает вопрос о доставке лантанидов в клетки [164, 197]. В этом случае можно использовать метод осмотического лизиса пиноцитозных пузырьков или стрептолизин О. Доставка тербия в клетки этим способом была осуществлена с 55% эффективностью. Выживаемость клеток составила 95% [186]. Использование пептидов для внутриклеточной доставки также может помочь решению данной задачи [250].

## VII. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ СКРИНИНГ

Востребованным применением методов и технологий лантанидного анализа является высокоэффективный скрининг лекарственных соединений.

Под высокоэффективным скринингом (HTS) подразумеваются поставленные на поток лабораторные исследования, когда тестируется большое количество материала на компактных носителях и в малых объемах с использованием автоматизированных систем управления (не менее  $10^5$  аналитических определений в день, при этом рабочий объем составляет не более 10 мкл, а микропланшеты содержат не менее 1536 лунок). В HTS используются различные флуоресцентные техники и технологии анализа [251, 252]. В своем развитии HTS миновал несколько этапов, начиная с многопараметрических радиоиммунных методов [253, 254], иммуноферментных и иммунофлуоресцентных микроаналитических методов на различных носителях (шариках, палочках, дисках) [92, 256, 257,], заканчивая биочипами [255]. И технология биочипов, и технология высокоэффективного скрининга базируются на принципах мультианалитного и микроформатного исследований [256, 257].

Первая работа по ДНК-микрочипам и одна из первых по белковым микрочипам были опубликованы российскими учеными [258, 259]. Лантанидный анализ в технологии биочипов был применен для определения онкомаркеров [260], пестицидов [261] и в ряде других исследований.

Из лантанидных технологий в HTS применяется в основном время-разрешенный FRET [262]. Также показано применение люминесцентных частиц [263] и технологии DELFIA, в частности, для определения циклического АМФ [264] и ингибиторов тирозинкиназы [265].

Лантанидный времяразрешенный FRET был использован для решения следующих задач HTS:

– идентификация потенциальных ингибиторов теломеразы [266];

- скрининг лигандов на связывание с рецептором фактора некроза опухоли [267];
- скрининг коактиваторов гормонов на связывание с ядерными гормональными рецепторами [268];
- оценка связывания опухолевого супрессора p53 с негативным регулятором HDM2 [115];
- оценка связывания протеазы ВИЧ антителами к фосфотирозину [269];
- оценка связывания ингибиторов обратной транскриптазы с обратной транскриптазой вируса иммунодефицита человека [270].

В последнее время высокоэффективный скрининг включает в свой арсенал не только скрининг *in vitro*, но и скрининг *in vivo* на живых клетках и на живых организмах [271, 272]. Использование генетически кодируемых пептидов в лантанидном HTS предоставят возможность получать высоко стандартизованные биохимические реагенты со строго определенными точками присоединения доноров и акцепторов к белкам и антигенам; для скрининга *in vivo* лантанидный анализ может обеспечить требуемую высокую чувствительность за счет устранения сигнала биологической автофлуоресценции.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразное применение лантанидных соединений и пристальный интерес к ним обусловлен в первую очередь уникальным свойством – микросекундной флуоресценцией, что позволяет обойти проблему фоновой флуоресценции.

Большое количество комплексных соединений и способов управления их флуоресценцией определило разнообразие высокочувствительных меток и сенсоров на основе лантанидов. Развитие биоимиджинга с использованием лантанидных комплексов заставило обратить особое внимание на развитие техники регистрации сигнала, на разработку щадящего облучения клеток (техника многофотонного возбуждения) и на адаптацию комплексных соединений лантанидов к условиям *in vivo*. Разработка лантанидсвязывающих пептидов позволила перейти к получению полусинтетических и полностью генетически кодируемых лантанидных FRET-сенсоров, что является следующим этапом в развитии биоимиджинга на основе лантанидов.

Получение сенсоров различной функциональной активности, а также разработка новых способов доставки лантанидов в клетки при условии безопасности данных комплексов для жизнедеятельности организма, совершенствование высокоразрешающих методов микро-

скопии и спектроскопии с временным разрешением – вот основной список задач, которые предстоит решить в ближайшем будущем для того, чтобы генетически кодируемые сенсоры на основе лантанидов отвечали всем требованиям высокочувствительных инструментов молекулярного биоимиджинга.

Авторы приносят благодарность Л.Р.Арсланбаевой и А.Л.Русанову за помощь в подготовке материала для обзора.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Billinton, N., Knight, A.W. (2001) *Anal. Biochem.*, **291**, 175–197.
2. Monici, M. (2005) *Biotechnol. Annu. Rev.*, **11**, 227–256.
3. Pawley, J.B. (2006) *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3–d ed. New York: Springer Science Business Media, p.985.
4. Yuan, J., Wang, G. (2005) *J. Fluoresc.*, **15**, 559–568.
5. Corrodi, H., Jonsson, G. (1967) *J. Histochem. Cytochem.*, **15**, 65–78.
6. Levenson, R.M., Mansfield, J.R. (2006) *Cytometry A.*, **69**, 748–758.
7. Shaner, N., Steinbach, P., Tsien, R.Y. (2005) *Nature Methods*, **2**, 905–909.
8. Roda, A., Guardigli, M., Michelini, E., Mirasoli, M. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 109–123.
9. Van de Lest, C.H., Versteeg, E.M., Veerkamp, J.H., Van Kuppevelt, T.H. (1995) *J. Histochem. Cytochem.*, **43**, 727–730.
10. Terpetschnig, E., Szmecinski, H., Malak, H., Lakowicz, J.R. (1995) *Biophys. J.*, **68**, 342–350.
11. Piszczek, G. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.*, **453**, 54–62.
12. Thibon, A., Pierre, V.C. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 107–120.
13. Rajapakse, H.E., Reddy, D.R., Mohandessi, S., Butlin, N.G., Miller, L.W. (2009) *Angew. Chem. Int.*, **48**, 4990–4992.
14. Lissimore, J.L., Jankowski, J.T., Thomas, C.B., Mascotti, D.P., deHaseth, P.L. (2000) *Biotechniques*, **28**, 82–84.
15. Galland, P., Senger, H. (1988) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1**, 277–294.
16. Viegas, M.S., Martins, T.C., Seco, F., do Carmo, A. (2007) *Eur. J. Histochem.*, **51**, 59–66.
17. Cowe, T., Haven, A.J., Burnstock, G. (1985) *Histochem.*, **82**, 205–208.
18. Neumann, M., Gabel, D. (2002) *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 437–439.
19. Sakamak, K., Takagi, C., Yoshino, J., Yokota, H., Nakamura, S., Kominam, K., Hyod, A., Takamune, K., Yuge, M., Ueno, N. (2005) *Dev. Dyn.*, **233**, 562–569.
20. Kong, H.G., Choi, K.H., Heo, K.R., Lee, K.Y., Lee, H.J., Moon, B.J., Lee, S.-W. (2009) *Plant Pathol. J.*, **25**, 136–141.
21. Shcherbo, D., Murphy, C.S., Ermakova, G.V., Solovieva, E.A., Chepurnykh, T.V., Shcheglov, A.S., Verkhusha, V.V., Pletnev, V.Z., Hazelwood, K.L., Roche, P.M., Lukyanov, S.A., Zaraisky, A.G., Davidson, M.W., Chudakov, D.M. (2009) *Biochem. J.*, **418**, 567–574.
22. Müller-Taubenberger, A., Anderson, K.I. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 1–12.
23. Shcherbo, D., Shemiakina, I.I., Ryabova, A.V., Luker, K.E., Schmidt, B.T., Souslova, E.A., Gorodnicheva, T.V., Strukova, L., Shidlovskiy, K.M., Bri-



- tanova, O.V., Zraisky, A.G., Lukyanov, K.A., Loschenov, V.B., Luker, G.D., Chudakov, D.M. (2010) *Nat. Methods*, **7**, 827–829.
24. Binnemans, K. (2009) *Chem. Rev.*, **109**, 4283–4374.
25. Reifel, R. (2002) *Materials Science*, **20**, 5–18.
26. Selvin, P.R. (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomembr.*, **31**, 275–302.
27. Bünzli, J.C. (2004) *Met. Ions Biol. Syst.*, **42**, 39–75.
28. Hemmälä, I., Laitalä, V. (2005) *J. Fluoresc.*, **15**, 529–542.
29. Berlman, I.B. (1973) N.Y.: Academic Press, 70–80.
30. Mathis, G. (1993) *Clin. Chem.*, **39**, 1953–1959.
31. Selvin, P.R. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 730–734.
32. Weissman, S.I. (1942) *J. Chem. Phys.*, **10**, 214–217.
33. Whan, R.E., Crosby, G.A. (1962) *J. Mol. Spectrosc.*, **8**, 315–327.
34. Balzani, V. (1990) *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **51**, 55–62.
35. Crosby, G.A., Whan, R.E., Alire, R.M. (1961) *J. Chem. Phys.*, **34**, 743–748.
36. Crosby, G.A., Whan, R.E., Freeman, J.J. (1962) *J. Phys. Chem.*, **66**, 2493–2499.
37. Misra, V., Mishra, H.J. (2008) *Chem. Phys.*, **128**, 244701.
38. Yang, C., Fu, L.-M., Wang, Y., Zhang, J.-P., Wong, W.-T., Ai, X.-C., Qiao, Y.-F., Zou, B.-S., Gui, L.-L. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5010–5013.
39. Beeby, A., Faulkner, S., Parker, D., Williams, J.A.G. (2001) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 1268–1273.
40. Breen, P.J., Hild, E.K., Horrocks, W.D.Jr. (1985) *Biochem. J.*, **24**, 4991–4997.
41. Supkowski, R.M., Bolender, J.P., Smith, W.D., Renyolds, L.E.L., Horrocks, W.D.Jr. (1999) *Coord. Chem. Rev.*, **185**, 307–319.
42. Lazarides, T., Sykes, D., Faulkner, S., Barbieri, A., Ward, M.D. (2008) *Chem. Eur. J.*, **14**, 9389–9399.
43. Richardson, F.S. (1982) *Chem. Rev.*, **82**, 541–552.
44. Soini, E., Lovgren, T. (1987) *Anal. Chem.*, **18**, 105–154.
45. Soini, E., Hemmälä, I. (1979) *Clin. Biochem.*, **25**, 353–361.
46. Hemillä, I., Dakubu, S. (1986) US patent 4,565,790.
47. Пономарева И.В., Савицкий А.П., Шахнина К.Л., Шеголев А.А. (1989) *Иммунология*, **4**, 76–78.
48. Костромина Н.А. (1980) *Комплексоны РЗЭ*. М.: Наука, 220 с.
49. Soini, E., Kojola, H. (1983) *Clin. Chem.*, **29**, 65–68.
50. Lovgren, T., Hemmälä, I., Petterson, H., Eskola, I.U., Bertoft, E. (1984) *Talanta*, **31**, 909–916.
51. Toivonen, E., Hemmälä, I., Marnieni, I., Lorgenson, P.N., Zeuthen, I., Lövgren, T. (1986) *Clin. Chem.*, **32**, 637–640.
52. Suonpää, M., Markela, E., Stahlberg, T., Hemmälä, I. (1992) *J. Immunol. Methods*, **149**, 247–53.
53. Boerman, O.C., Thomas, C.M.G., Segern, M.F.C., Konemans, P., Lövgren, T., Surawaki, V.R., Haisma, H.J., Foels, L.G. (1987) *Clin. Chem.*, **33**, 2191–2194.
54. Fernandes, L.C., Kim, S.B., Matos, D. (2005) *World J. Gastroenterol.*, **11**, 645–648.
55. Vihko, P., Kurkela, R., Ramberg, I., Pelkonen, I., Vihko, R. (1990) *Clin. Chem.*, **36**, 92–96.
56. Becker, C., Piironen, T., Kiviniemi, J., Lilja, H., Pettersson, K. (2000) *Clin. Chem.*, **46**, 198–206.
57. Suonpää, M., Lavi, J., Hemillä, I., Lövgren, T. (1985) *Clin. Chim. Acta*, **145**, 341–348.
58. Maple, P. A. C., Jones, C. S., Andrews, N. J. (2001) *Clin. Pathol.*, **54**, 812–815.

59. Meurmann, O., Hemillä, I., Lövgren, T., Halonen, P. (1982) *J. Clin. Microbiol.*, **16**, 920–925.
60. Siitari, H., Hemillä, I., Soini, E., Lovgren, T. (1983) *Nature*, **301**, 258–260.
61. Smith, D.R., Rossi, C.A., Kijek, T.M., Henschel, E.A., Ludwig, G.V. (2001) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 1070–1075.
62. Sander, J., Niehaus, C. (1986) *Clin. Chem.*, **32**, 1231.
63. Saedi, S., Dean, H., Dent, W., Stock, E., Cronin, C. (1996) *Pediatrics*, **97**, 100–102.
64. Hayashi, G., Faure, C., Brondi, M.F., Vallejos, C., Soares, D., Oliveira, E., Brito, V., Mendonca, B.B., Bachega, T.A. (2011) *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, **55**, 632–637.
65. Grosskopf, C., Farriaux, J.P., Vidailhet, M., Briard, M.L., Navarro, J., Roussel, P. (2003) *Arch. Pediatr.*, **10**, 364s–369s.
66. Vieira, N., Carvalho, E., Fonseca, A. (2005) *Clin. Chim. Acta.*, **360**, 151–159.
67. Cowans, N.J., Stamatopoulou, A., Tørring, N., Spencer, K. (2011) *Ultrasound Obstet Gynecol.* **37**, 515–519.
68. Fagge, T., Barclay, G.R., Macgregor, I., Head, M., Ironside, J., Turner, M. (2005) *Transfusion*, **45**, 504–513.
69. Diamandis, E.P. (1989) *Clin. Chem.*, **35**, 491–495.
70. Kimura, H., Mukaida, M., Wang, G., Yuan, J., Matsumoto, K. (2000) *Forensic Sci. Int.*, **113**, 345–517.
71. Heinonen, P., Iitia, A., Torresani, T., Lovgren, T. (1997) *Clin. Chem.*, **43**, 1142–1150.
72. Samiotaki, M., Kwiatkowski, M., Ylitalo, N., Landegren, U. (1997) *Anal. Biochem. Nov.*, **253**, 156–161.
73. Hukkanen, V., Rehn, T., Kajander, R., Sjöroos, M., Waris, M. (2000) *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3214–3218.
74. Pietraszkiewicz, M., Karpuik, J., Pietraszkiewicz, O. (1998) *Spectrochimica Acta. Part A*, **54**, 2229–2236.
75. Mathis, G. (1995) *Clin. Chem.*, **41**, 1391–1397.
76. Chen, J., Selvin, P.R. (1999) *Bioconjugate Chem.*, **10**, 311–315.
77. Ci, Y-X., Yang, X-D.; Chang, W-B. (1995) *J. Immunol. Methods*, **179**, 233–241.
78. Yuan, J., Wang, G., Kimura, H., Matsumoto, K. (1999) *Anal. Sciences*, **15**, 125–128.
79. Savitsky, A.P., Chyudinov, A.V., Krilova, S. M. (1995) *Proc. SPIE*, **2388**, 429.
80. Diamandis, P., Morton, R.C. (1988) *J. Immunol. Methods*, **112**, 43–52.
81. Wu, F.B., Han, S.Q., Zhang, C., He, Y.F. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 5882–5889.
82. Hemmilä, I., Mikkala V.M., Iatva M., Kiilholma P. (1993) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **26**, 283–290.
83. Mikkala, V.M., Helenius, M., Hemmilä, I., Kankare, J., Takalo, H. (1993) *Helv. Chim. Acta*, **76**, 1361–1378.
84. Papanastasiou–Diamandi, A., Christopoulos, T.K. and Diamandis, E.P. (1992) *Clin. Chem.*, **38**, 545–548.
85. Saha, A.K., Kross, K., Kloszewski, E.D., Upson, D.A., Toner, J.L., Snow, R.A., Black, C.D.V., Desai, V.C. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11032–11033.
86. Evangelista, R.A., Pollak, A., Allore, B., Templeton, E.F., Morton, R.C., Diamandis, E.P. (1988) *Clin. Biochem.*, **2**, 173–178.
87. Diamandis, E.P. (1988) *Clin. Biochem.*, **21**, 139–150.
88. Diamandis, P., Morton, R.C., Reichstein, E., Khosran, M.I. (1989) *Anal. Chem.*, **61**, 48–57.
89. Chan, U.A., Bellen, A.C., Diamandis, E.P. (1987) *Clin. Chem.*, **33**, 2000–2003.
90. Khosravi, M.I., Diamandis, E.P. (1987) *Clin. Chem.*, **33**, 1994–1999.
91. Diamandis, E.P., Bhayana, V., Conway, V., Reichstein, E., Papanastasiou–Diamandis, A. (1988) *Clin. Chem.*, **34**, 1157–1159.

92. Kakabakos, S. E., Christopoulos, T. K., Diamandis, E.P. (1992) Clin. Chem., **38**, 338–342.
93. Scorilas, A., Bjartell, A., Lilja, H., Moller, C., Diamandis, E.P. (2000) Clin. Chem., **46**, 1450–1455.
94. Sundberg, M.W., Meares, C.F., Goodwin, D.A., Diamandis, C.I. (1974) J. Med. Chem., **17**, 1304–1307.
95. Wilmott, N.I., Miller, I.N., Tyson, I.F. (1985) Analyst, **109**, 343–345.
96. Жердева В.В., Чудинов А.В., Носыркова Н.В., Володаева Л.А., Савицкий А.П. (2006) Физиология и патология иммунной системы, **4**, 9–19.
97. Chiu, N.H.L., Christopoulos, T. K., Peltier, J. (1998) Analyst, **123**, 1315–1319.
98. He, Q., Chen, H., Nie, L., Tang, J., Xiao, P.J. (2006) Nanosci. Nanotechnol., **6**, 66–71.
99. Diamandis, E. P. (1993) Electrophoresis, **14**, 866–875.
100. Evangelist, R.A., Pollak, A., Templeton, E.F. (1991) Anal. Biochem., **197**, 213–224.
101. Bathrellos, L. M., Lianidou, E. S., Ioanno, P. C. (1998) Clin. Chem., **44**, 1351–1353.
102. Christopoulos, T. K., Diamandis, E. P. (1992) Anal. Chem., **64**, 342–346.
103. Templeton, E.F., Wong, H.E., Evangelista, R.A., Granger, T., Pollak, A. (1991) Clin. Chem., **37**, 1506–1512.
104. Härmä, H., Soukka, T., Lövgren, T. (2001) Clin. Chem., **47**, 561–568.
105. Soukka, T., Paukkunen, J., Härmä, H., Lönnberg, S., Lindroos, H., Lövgren, T. (2001) Clin. Chem., **47**, 1269–1278.
106. Jerdeva, V.V., Volodaeva, L. A., Savitsky A. P. (2006) Biotechnology in Biology and Medicine/ Egorov, Ed. N.Y.: Nova Science Publishers, 5–12.
107. Rodriguz-Ubis, J.-C., Alpha, B., Plancherel, D., Lehn, J.-M. (1984) Helv.Chim.Acta, **67**, 2264–2269.
108. Bruno, J.A., Herr, B.R., Horrocks, W.D. (1993) Inorg. Chem., **32**, 756–762.
109. Lehn, J. M., Sauvage, J. P. (1975) J. Am.Chem.Soc., **97**, 6700–6707.
110. Sata, N. Shinkai, S. (1993) J. Chem. Soc., Perkin Trans, **2**, 621.
111. Heyduk, E., Heyduk, T. (1997) Anal. Biochem., **248**, 216–227.
112. Lundin, K., Blomberg, K., Nordstrom, T., Lindqvist, C. (2001) Anal. Biochem., **299**, 92–97.
113. Stenroos, K., Hurskainen, P., Eriksson, S., Hemmila, I., Blomberg K., Lindqvist C. (1998) Cytokine, **10**, 495–499.
114. Blomberg K., Hurskainen P., Hemmilä I. (1999) Clin. Chem., **45**, 855–861.
115. Kane, S.A., Fleener, C.A., Zhang, Y.S., Davis, L.J., Musselman, A.L., Huang, P.S. (2000) Anal. Biochem., **278**, 29–38.
116. Lopez-Crapez, E., Bazin, H., Andre, E., Noletti, J., Greinier, J., Mathis, G. (2001) Nucleic Acids Res., **29**, 1–10.
117. Yoshikawa, K., Yuan, J., Matsumoto, K., Kimura, H. (1999) Anal. Sciences, **15**, 121–124.
118. Lee, K., Dzubeck, V., Latshaw, L., Schneider, J.P. (2004) J. Am. Chem. Soc., **126**, 13616–13617.
119. Thibon, A., Pierre, V.C. (2009) J. Am. Chem. Soc., **131**, 434–435.
120. Viguier, R.F.H., Hulme, A.N. (2006) J. Am. Chem. Soc. **128**, 11370–11371.
121. Dickins, R.S., Aime, S., Batsanov, A.S., Beeby, A., Botta, M., Bruce, J., Howard, J.A.K., Love, C.S., Parker, D., Peacock, R.D., Puschmann, H. (2002) J. Am. Chem. Soc., **124**, 12697–12705.
122. Bruce, J.I., Dickins, R.S., Govenlock, L.J., Gunlaugsson, T., Lopinski, S., Lowe, M.P., Parker, D., Peacock, R.D., Perry, J.J.B., Aime, S., Botta, M. (2000) J. Am. Chem. Soc., **122**, 9674–9684.

123. *Dickins, R.S., Gunnlaugsson, T., Parker, D., Peacock, R.D.* (1998) *Chem. Commun.*, 1643–1644.
124. *Bretonniere, Y., Cann, M.J., Parker, D., Slater, R.* (2002) *Chem. Commun.*, 1930–1931.
125. *Bretonniere, Y., Cann, M.J., Parker, D., Slater, R.* (2004) *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 1624–1632.
126. *Gunnlaugsson, T., Harte, A.J., Leonard, J.P., Nieuwenhuyzen, M.* (2002) *Chem. Commun.*, **18**, 2134–2135.
127. *Cable M.L., Kirby J.P., Sorasaene K., Gray H.B., Ponce A.* (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1474–1475.
128. *Reany, O., Gunnlaugsson, T., Parker, D.* (2000) *Chem. Commun.*, 473–474.
129. *Terai, T., Kikuchi, K., Iwasawa, S.Y., Kawabe, T., Hirata, Y., Urano, Y., Nagano, T.* (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6938–6946.
130. *Lim, C.S., Miller, J.N., Bridges, J.W.* (1980) *Anal. Biochem.*, **108**, 176–184.
131. *Morrison, L.E.* (1988) *Anal. Biochem.*, **174**, 101–120.
132. *Vázquez-Ibar, J.L., Weinglas, A.B., Kaback, H.R.* (2002) *PNAS USA*, **99**, 3487–3492.
133. *Савицкий А.П., Папковский Д.Б., Пономарев Т.В., Березин И.В.* (1989) *Докл. АН СССР*, **304**, 1005–1008.
134. *Савицкий А.П., Папковский Д.Б.* (1987) *Докл. АН СССР*, **293**, 744–745.
135. *Kronick, M.N.* (1986) *J. Immunol. Methods*, **92**, 1–13.
136. *Miller, J.N.* (2005) *Analyst*, **130**, 265–270.
137. *Yeh, S.W., Ong, L.J., Glazer, A.N., Clark, J.H.* (1987) *Cytometry*, **8**, 91–95.
138. *Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G.P., Xie, B.* (2009) *Curr. Chem. Genomics*, **3**, 22–32.
139. *Kupcho, K.R., Stafslie, D.K., DeRosier, T., Hallis, T.M., Ozers, M.S., Vogel, K.W.* (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13372–13373.
140. *Kim, S.H., Gunther, J.R., Katzenellenbogen, J.A.* (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 4685–4692.
141. *Kokko, T., Kokko, L., Soukka, T.* (2009) *J. Fluoresc.*, **19**, 159–164.
142. *Härmä, H., Rozwandowicz-Jansen, A., Martikkala, E., Frang, H., Hemmilä, I., Sahlberg, N., Fey, V., Perälä, M., Hänninen, P.* (2009) *J. Biomol. Screen.*, **14**, 936–943.
143. *Karvinen, J., Elomaa, A., Määkinen, M.-L., Hakala, H., Mukkala, V.-M., Peuralahti, J., Hurskainen, P., Hovinen, J., Hemmilä, I.* (2004) *Analyt. Biochem.*, **325**, 317–325.
144. *Zhong, W.* (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 47–59.
145. *Hildebrandt, N., Charbonnière, L.J., Löhmansröben, H.-G.* (2007) *J. Biomed. Biotechnol.*, **7**, 79169.
146. *Hildebrandt, N., Löhmansröben, H.-G.* (2007) *Curr. Chem. Biol.*, **1**, 167–186.
147. *Dew, W., Horrocks, J.R., Holmquist, B., Vallee, B. L.* (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4764–4768.
148. *Sandtner, W., Bezanilla, F., Correa, A.M.* (2007) *Biophys. J.*, **93**, 45–47.
149. *Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A.* (2010) *Physiol. Rev.*, **90**, 1103–63.
150. *Зубова Н., Савицкий А.П.* (2005) *Успехи биологической химии*, **45**, 391–454.
151. *VanEngelenburg, B., Palmer, A.E.* (2008) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 1–6.
152. *Tainaka, K., Sakaguchi, R., Hayashi, H., Nakano, S., Liew, F.F., Morii, T.* (2010) *Sensors*, **10**, 1355–1376.
153. *Morris, M.C.* (2010) *Cell Biochem. Biophys.*, **56**, 19–37.
154. *Remington, S.J.* (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 714–721.
155. *Zimmer, M.* (2002) *Chem. Rev.*, **102**, 759–781.
156. *Piston, D.W., Kremers, G.-J.* (2007) *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 407–414.

157. Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996) *Science*, **273**, 1392–1395.
158. Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N.Jr. (1996) *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1246–1251.
159. Miyawaki, A. *Cell Struct Funct.* (2002) **5**, 343–347.
160. Riddle, S.M., Vedvik, K.L., Hanson, G.T., Vogel, K.W. (2006) *Anal. Biochem.*, **356**, 108–116.
161. Robers, M.B., Machleidt, T., Carlson, C.B., Bi, K. (2008) *Assay Drug Dev. Technol.*, **6**, 519–529.
162. Carlson, C.B., Robers, M.B., Vogel, K.W., Machleidt, T. (2009) *J. Biomol. Screen.*, **14**, 121–132.
163. Carlson, C.B., Mashock, M.J., Bi, K. (2010) *J. Biomol. Screen.*, **15**, 327–334.
164. Horton, R.A., Strachan, E.A., Vogel, K.W., Riddle, S.M. (2007) *Anal. Biochem.*, **360**, 138–143.
165. Vuojola, J., Lamminmäki, U., Soukka, T. (2009) *Anal. Chem.*, **81**, 5033–5038.
166. Laitalä, V., Hemmillä, I. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 1483–1487.
167. Leifert, W.R., Bailey, K., Cooper, T.H., Aloia, A.L., Glatz, R.V., McMurchie, E.J. (2006) *Anal. Biochem.*, **355**, 201–212.
168. Kokko, L., Sanberg, K., Lövgren, T., Soukka, T. (2004) *Anal. Chim. Acta*, **503**, 155–162.
169. Appelblom, H., Nurmi, J., Soukka, T., Pasternack, M., Penttilä, K.E., Lövgren, T., Niemelä, P. (2007) *J. Biomol. Screen.*, **12**, 842–848.
170. Wang, G., Yuan, J., Hai, X., Matsumoto, K. (2006) *Talanta*, **70**, 133–138.
171. Heyduk, T., Heyduk, E. (2001) *Anal. Biochem.*, **289**, 60–67.
172. Chen, Y., Lehrer, S.S. (2004) *Biochemistry*, **43**, 11491–11499.
173. Bergendahl, V., Heyduk, T., Burgess, R.R. (2003) *Environ. Microbiol.*, **69**, 1492–1498.
174. Sueda, S., Yuan, J., Matsumoto, K. (2002) *Bioconjugate Chem.*, **13**, 200–205.
175. Nurmi, J., Wikman, T., Karp, M., Lövgren, T. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 3525–3532.
176. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) *Nature*, **258**, 598–599.
177. Laitalä, V., Ylikoski, A., Raussi, H.M., Ollikka, P., Hemmillä, I. (2007) *Anal. Biochem.*, **361**, 126–131.
178. Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., Javitch, J.A. (2008) *EMBO J.*, **27**, 2293–2304.
179. Wang, J., Norcross, M. (2008) *Drug Discov. Today*, **13**, 625–632.
180. Ramsay, D., Carr, I.C., Pediani, J., Lopez-Gimenez, J. F., Thurlow, R., Fidock, M., Milligan, G. (2004) *Mol. Pharmacol.*, **66**, 228–239.
181. Dodeller, F., Gottar, M., Huesken, D., Iourgenko, V., Cenni, B. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 21487–21494.
182. Lewis, H., Beher, D., Cookson, N., Oakley, A., Piggott, M., Morris, C.M., Jaros, E., Perry, R., Ince, P., Kenny, R.A., Ballard, C.G., Shearman, M.S., Kalaria, R.N. (2006) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **32**, 103–118.
183. Goedken, E.R., Gagnon, A.I., Overmeyer, G.T., Liu, J., Petrillo, R.A., Burchat, A.F., Tomlinson, M.J. (2008) *J. Biomol. Screen.*, **13**, 619–625.
184. Prieto, B., Llorente, E., González-Pinto, I., Alvarez, F.V. (2008) *Clin. Chem. Lab. Med.*, **46**, 660–666.
185. Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G.P., Xie, B. (2009) *Curr. Chem. Genomics*, **3**, 22–32.
186. Rajapakse, H.E., Gahlauta, N., Mohandessia, S., Yub, D., Turner, J.R., Millera, L.W. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 13582–13587.
187. Marsden, B.J., Shaw, G.S., Sykes, B.D. (1990) *Can. J. Chem.*, **68**, 587–601.

188. Hutnik, C.M., MacManus, J.P., Banville, D., Szabo, A.G. (1990) *J. Biol. Chem.*, **26**, 11456–11464.
189. Bunzli, J.-C.G. (2006) *Acc. Chem. Res.*, **39**, 53–61.
190. MacManus, J.P., Hogue, C.W., Marsden, B.J., Sikorska, M., Szabo, A.G. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 10358–10366.
191. Nitz, M., Franz, K.J., Maglathlin, R.L., Imperiali, B. (2003) *Chem. Bio. Chem.*, **4**, 272–276.
192. Martin, L.J., Sculimbrenne, B.R., Nitz, M., Imperiali, B. (2005) *QSAR Comb. Sci.*, **10**, 1149–1157.
193. Nitz, M., Sherawat, M.; Franz, K.J.; Peisach, E.; Allen, K.N.; Imperiali, B. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 3682–3685.
194. Sculimbrenne, B.R., Imperiali, B. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7346–7352.
195. Reynolds, A.M., Sculimbrenne, B.R., Imperiali, B. (2008) *Bioconjugate Chem.*, **19**, 588–591.
196. Martin, L.J., Hähnke, M.J., Nitz, M., Wöhnert, J., Silvaggi, N.R., Allen, K.N., Schwalbe, H., Imperiali, B. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7106–7113.
197. Vázquez-Ibar, J.L., Weinglass, A.B., Kaback, H.R. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **99**, 3487–3492.
198. Martin, L.J. (2008) *Development of LBTs as Powerfull and Versatile Peptides for use in Studies of Protein and Protein Interactions: doctoral thesis. Massachusetts*, 185 p.
199. Арсланбаева Л.Р., Жердева В.В., Ивашина Т.В., Винокуров Л.М., Русанов А.Л., Савицкий А.П. (2010) *Прикладная биохимия и микробиология*, **46**, 166–171.
200. Арсланбаева Л.Р., Жердева В.В., Ивашина Т.В., Винокуров Л.М., Морозов В.Б., Оленин Н., Савицкий А. П. (2011) *Биофизика*, **56**, 389–395.
201. Marriott, G., Clegg, R. Nt, Jovin, D. J., Jovin, T. M. (1991) *Biophys J.*, **61**, 1374–1387.
202. Seveus, L., Väisälä, M., Syrjänen, S., Sandberg, M., Kuusisto, A., Harju, R., Salo, J., Hemmilä, I., Kojola, H., Soini, E. (1992) *Cytometry*, **13**, 329–338.
203. Franz, K.J., Nitz, M., Imperiali, B. (2003) *Chem. Bio.Chem.*, **4**, 265–271.
204. Sevéus, L., Väisälä, M., Hemmilä, I., Kojola, H., Roomans, G.M., Soini, E. (1994) *Microsc. Res. Tech.*, **28**, 49–54.
205. Beverloo, H.B., van Schadewijk, A., Bonnet, J., van der Geest, R., Runia, R., Verwoerd, N.P., Vrolijk, J., Ploem, J.S., Tanke, H.J. (1992) *Cytometry*, **13**, 561–570.
206. Marriott, G., Hekiecker, M., Diamandis, E. P., Yan–Marritt, Y. (1994) *Bophys. J.*, **67**, 957–996.
207. Jares–Erijman, E.A., Jovin, T.M. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1387–1395.
208. Chen, Y., Mills, J.D., Periasamy, A. (2003) *Differentiation*, **71**, 528–541.
209. Tyrell, R.M., Keyse, S.M. (1990) *J. Photochem. Photobiol.*, **4**, 349–361.
210. Koenig, K., Krasieva, T.B., Bauer, E., Fiedler, U., Berns, M.W, Tromberg, B.J., Greulich, K.–O. J. (1996) *Biomed. Opt.*, **1**, 217–222.
211. Kaiser, W., Garret, C.G.B. (1961) *Phys. Rev. Lett.*, **7**, 229–231.
212. Singh, S., Bradley, L.T. (1964) *Phys. Rev. Lett.*, **12**, 612–614.
213. Shreve, A.P., Trautman, J.K., Owens, T.G., Albrecht, A.C. (1990) *Chem. Phys. Lett.*, **170**, 51–56.
214. Shreve, A.P., Albrecht, A.C. (1991) *J. Chem. Phys.*, **94**, 5772–5773.
215. Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. (1990) *Science*, **248**, 73–76.
216. Diaspro, A., Bianchini, P., Vicidomini, G., Faretta, M., Ramoino, P., Usai, C. (2006) *Biomed. Eng. Online*, **5**, 36.

217. Koenig, K. (2000) *J. Microsc.*, **200**, 83–104.
218. Guild, J.B., Xu, C., Webb, W.W. (1997) *Appl. Opt.*, **36**, 397–401.
219. Konig, K., So, P.T.C., Mantulin, W.W., Gratton, E. (1997) *Opt. Lett.*, **22**, 135–136.
220. Konig, K., So, P.T.C., Mantulin, W.W., Tromberg, B.J., Gratton, E. (1996) *J. Microsc.*, **183**, 197–204.
221. Tauer, U. (2002) *Exp Physiol.*, **87**, 709–714.
222. Oheim, M., Beaurepaire, E., Chaigneau, E., Mertz, J., Charpak, S. (2001) *J. Neurosci. Methods*, **111**, 29–37.
223. Zipfel, W.R., Williams, R.M., Webb, W.W. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1369–1377.
224. Kim, H. M., Cho, B. R. (2009) *Acc. Chem. Res.*, **42**, 863–872.
225. Masters, B.R., So, P.T.C. (2004) *Microsc. Res. Techniq.*, **63**, 3–11.
226. Lakowicz, J.R., Piszczek, G., Maliwal, B.P., Gryczynski, I. (2001) *Chem. Phys.*, **2**, 247–252.
227. Piszczek, G., Maliwal, B.P., Gryczynski, I., Dattelbaum, J., Lakowicz, J.R. (2001) *J. Fluoresc.*, **11**, 101–107.
228. Piszczek, G., Gryczynski, I., Maliwal, B.P., Lakowicz, J.R. (2002) *J. Fluoresc.*, **12**, 15–17.
229. White, G.F., Litvinenko, K.L., Meech, S.R., Andrew, D.L., Thompson, A.J. (2004) *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 47–55.
230. Luo, L., Lai, W.P.-W., Wong, K.L., Wong, W.-T., Li, K.-F., Cheah, K.-W. (2004) *Chem. Phys. Lett.*, **398**, 372–376.
231. Wong, K.L., Law, G.L., Kwok, W.M., Wong, W.T., Phillips, D.L. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 3436–3439.
232. Law, G.L., Wong, K.L., Yang, Y.Y., Yang, H.L., Wong, W.T., Lam, M.H., Tam, H.L., Cheah, K.-W. (2008) *J. Fluoresc.*, **18**, 749–752.
233. Law, G.L., Kwok, W.M., Wong, W.T., Wong, K.L., Tanner, P.A. (2007) *J. Phys. Chem. B.*, **111**, 10858–10861.
234. Palsson, L.O., Pal, R., Murray, B.S., Parker, D., Beeby, A. (2007) *Dalton Trans.*, **48**, 5726–5734.
235. Xiao, X., Haushalter, J. P., Kotz, K.T., Faris, G.W. (2011) *Biomed. Opt. Exp.*, **2**, 2255–2264.
236. D'Aléo, A., Pompidor, G., Elena, B., Vicat, J., Baldeck, P.L., Toupet, L., Kahn, R., Andraud, C., Maury, O. (2007) *Chem. phys. chem.*, **8**, 2125–2132.
237. Picot, A., D'Aléo A., Baldeck, P.L., Grichine, A., Duperray, A., Andraud, C., Maury, O. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1532–1533.
238. Kielar, F., Congreve, A., Law, G., New, E.J., Parker, D., Wong, K.-L., Castreno, P., de Mendoza, J. (2008) *Chem. Commun.*, **21**, 2435–2437.
239. Law, G.L., Wong, K.L., Man, C.W.Y., Wong, W.T., Tsao, S.W., Lam, M.H.W., Lam, P.K.S. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3714–3715.
240. Lo, W.-S., Kwok, W.-M., Law, G.-L., Yeung, C.-T., Chan, C. T.-L., Yeung, H.-L., Kong, H.-K., Chen, C.-H., Murphy, M. B., Wong, K.-L., Wong, W.-T. (2011) *Inorg. Chem.*, **50**, 5309–5311.
241. Eliseeva, S.V., Aubock, G., van Mourik, F., Cannizzo, A., Song, B., Deiters, E., Chauvin, A.-S., Chergui, M., Bunzli, J.-C.G. (2010) *J. Phys. Chem. B.*, **114**, 2932–2937.
242. Hirano, S., Suzuki, K. T. (1996) *Environ. Health Persp.*, **104**, 85–95.
243. Palasz, A., Czekaj, P. (2000) *Acta Biochem. Polonica*, **47**, 1107–1114.
244. Hanaoka, K. (2010) *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1283–1294.
245. Cacheris, W.P., Quay, S.C., Rocklage, S.M. (1990) *Magn. Reson. Imaging*, **8**, 467–481
246. Feng, J., Meloni, M.M., Allan, S.M., Faulkner, S., Narvainen, J., Vidyasagar, I., Kauppinen, R. (2010)

- Contrast Media Mol. Imaging, **5**, 223–230.
247. *Pandya, Sh., Yu, J., Parker, D.* (2006) Dalton Trans., 2757–2766.
248. *New, E.J., Parker, D.* (2008) Org. Biomol. Chem., **7**, 851–855.
249. *Montgomery, C.P., Murray, B.S., New, E.J., Pal, R., Parker, D.* (2009) Acc. Chem. Res., **42**, 925–37.
250. *Mishra, R., Su, W., Pohmann, R., Pfeuffer, J., Sauer, M.G., Ugurbil, K., Engelmann, J.* (2009) Bioconjugate Chem., **20**, 1860–1868.
251. *Wölcke, J., Ulmann, D.* (2001) Drug Discovery Today, **6**, 637–646.
252. *Boisclair, M.D., McClure, C., Josiah, S., Glass, S., Bottomley, S., Kamerkar, S., Hemillä, I.* (2000) J. Biomol. Screen., **5**, 319–328.
253. *Wians, F.H., Dev, J., Powell, M.M, Heald, J.I.* (1986) Clin. Chem., **32**, 887–890.
254. *Gow, S.M, Caldwell, G., Toft, A.D., Beckett, G.J.* (1986) Clin. Chem., **32**, 2191–2194.
255. *Мирзабеков А.Д.* (2003) Вестник Российской Академии Наук, **73**, 412–425.
256. *Ekins, R.P., Chu, F.W.* (1991) Clin. Chem., **37**, 1955–1967.
257. *Ekins, R.P., Chu, F.* (1994) Trends Biotechnol., **12**, 89–94.
258. *Khrapko, K.R., Lysov, Yu, P., Khorlyn, A.A., Shick, V.V., Florentiev, V.L., Mirzabekov, A.D.* (1989) FEBS Letters, **256**, 118–122.
259. *Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A. Voloshchuk, S., Chupeeva, V., Mirzabekov, A.* (2000) Anal. Biochem., **278**, 123–131.
260. *Lou, L-Y, Diamandis, E.P.* (2000) Luminisence, **15**, 409–413.
261. *Nichkova, M., Dosev, D., Gee, S.J., Hammock, B.D., Kennedy, I.M.* (2005) Proceedings of SPIE, **6008**, 151–159.
262. *Turconi, S., Bingham, R., Haupts, U., Pope, A.* (2001) Drug Discovery Today, **6**, S27–39.
263. *Martens, C., Bakker, A., Rodriguez, A., Mortensen, R.B., Barrett, R.W.* (1999) Anal. Biochem., **273**, 20–31.
264. *Gabriel, D., Vernier, M., Pfeifer, M.J., Dasen, B., Tenailon, L., Bouhela, I R.* (2003) Assay Drug Dev. Technol., **1**, 291–303.
265. *Beasley, J.R., McCoy, P.M., Walker, T.L., Dunn, D.A.* (2004) Assay Drug Dev. Technol., **2**, 141–151.
266. *Bare, L.A., Trinh, L., Wu, S., Devlin, J.J.* (1998) Drug Dev. Res., **43**, 109–116.
267. *Pope, A.J., Haupts, U.M., Moore, K.J.* (1999) J. Biomol. Screening, **4**, 205–214.
268. *Zhou, D., Quach, K.M., Yang, C., Lee, S.Y., Pohajdak, B., Chen, S.* (2000) Mol. Endocrinol., **14**, 986–998.
269. *Cummings, R., McGovern, H, Zheng, S., Park, Y., Hermes, J.* (1999) Anal. Biochem., **269**, 79–93.
270. *Zhang, J.-H., Chen, T., Nguyen, S.H., Oldenburg, K.R.* (2000) Anal. Biochem., **281**, 182–186.
271. *Walker, S.L., Ariga, J., Mathias, J.R., Coothankandaswamy, V., Xie, X., Distel, M., Köster R. W., Parsons, M.J., Bhalla, K. N., Saxena, M.T., Mumm, J.S.* (2012) PLoS One, **7**, e29916.
272. *Andriani, G., Chessler, A.D., Courtemanche, G., Burleigh, B.A., Rodriguez, A.* (2011) PLoS Negl. Trop. Dis., **5**, e1298.