

## **Hemiluminiscencija: teorijski princip, reakcije i primena u kliničkoj laboratorijskoj praksi i istraživanjima**

**Vesna Kuntić<sup>1</sup>, Aleksandra Topić<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institut za fizičku hemiju, <sup>2</sup>Institut za medicinsku biohemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

---

### **Kratak sadržaj**

U ovom radu, dato je teorijsko objašnjenje nastanka hemiluminiscencije i prikazane su najznačajnije hemiluminiscentne i bioluminiscentne reakcije. Na bazi hemiluminiscencije razvijena je moćna, visoko osetljiva analitička tehnika - **luminometrija**, sa detekcionim limitom do atomola ( $10^{-18}$ ) i čak zeptomola ( $10^{-21}$ ), koja je našla široku primenu u imunohemijskim određivanjima i DNK analizama. U tu svrhu, ispitivana jedinjenja se vezuju za hemiluminiscentne obeleživače (akridinijum estar, akridinijum sulfonamid), ili se obeležavaju enzimima (peroksidazom ili alkalnom fosfatazom), koji pojačavaju signal hemiluminiscentnih reakcija. U rutinskoj praksi, primenjuje se veliki broj hemiluminiscentnih imuno-testova za merenje biohemijskih, imunoloških, toksikoloških, virusoloških i endokrinoloških analita u cilju ispitivanja funkcije tiroideje, fertiliteta, oštećenja miokarda, anemije, praćenja koncentracije leka, dijagnoze i praćenja zloupotrebe lekova, otkrivanja i praćenja terapije kancera, kao i infektivnih bolesti (npr. hepatitis). U kliničkim istraživanjima, zahvaljujući osetljivosti, brzini i raznolikosti izvođenja, došlo je do široke primene hemiluminiscencije, posebno u metodama ispitivanja proteina i nukleinskih kiselina pomoću blotting metoda (Western, Northern i Southern blotting), microarray metoda, praćenja reaktivnih kiseoničnih radikala, kao i u reakcijama detekcije supstanci, koje su prethodno razdvojene tečnom hromatografijom i kapilarnom elektroforezom. Danas se tehnike hemiluminiscentne detekcije koriste i za merenje aktivnosti enzima za čiju sintezu su odgovorni određeni geni (reporters genes).

**Ključne reči:** hemiluminiscencija, hemiluminiscentne reakcije, primena hemiluminiscencije

## Uvod

Savremeni razvoj imunoloških, mikrobioloških, biohemijskih, kao i analitičkih tehnika nezamisliv je bez primene hemiluminiscentnih reakcija. Zahvaljujući hemiluminiscentnim reakcijama, značajno je snižen detekcioni limit metoda zasnovanih na hemiluminiscenciji i omogućena detekcija analita u atomolima (u literaturi postoje podaci da su detektovani čak zeptomoli,  $10^{-21}$ ), kao i vizualizacija kod *in situ* metoda.

U cilju pojašnjenja fenomena hemiluminiscencije, u ovom radu prikazan je teorijski princip nastanka hemiluminiscencije i objašnjene su najpoznatije hemiluminiscentne (i bioluminiscentne) reakcije. Takođe, prikazana je primena u imunologiji i biohemiji, u rutinskom radu i istraživačke svrhe.

## Teorijski princip nastajanja hemiluminiscencije

Apsorpcijom energije, molekuli prelaze u energetski viša, pobuđena stanja. Pobuđeni molekuli mogu izgubiti višak energije u sudarima sa molekulima okoline, pri čemu nastaju *neradijacioni prelazi*. Drugi način gubitka energije su *radijacioni prelazi*, kojim se apsorbovana energija emituje u obliku svetlosti različitih talasnih dužina. Ova pojava naziva se **luminiscencija** i deli se na fotoluminiscenciju, termoluminiscenciju, triboluminiscenciju, radioluminiscenciju i hemiluminiscenciju, prema tome da li se pobuđivanje vrši dovođenjem svetlosne, toplotne energije, mehaničkim putem, radioaktivnim zračenjem ili hemijskom reakcijom.

Hemiluminiscencija, često nazivana *cool light* (hladno svetlo) je emisija elektromagnetnog zračenja nastala kao rezultat hemijske reakcije. Hemijskom reakcijom određenih, visoko energetskih molekula nastaje proizvod koji emituje svetlost (može se reći da je svetlost jedan od proizvoda hemijske reakcije). Svetlost koja se emituje kod hemiluminiscencije, po mehanizmu nastajanja, ekvivalentna je fluorescenciji, odnosno fosforescenciji i predstavlja radijacione prelaze iz pobuđenog singletnog (elektroni zadržavaju sparenu orijentaciju

---

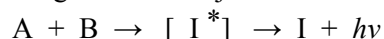
\* Luminiscencija se u literaturi često izjednačava sa hemiluminiscencijom

spina u pobuđenom stanju), odnosno tripletnog stanja (orijentacija spina je promijenjena u pobuđenom stanju) u osnovno stanje (1-2).

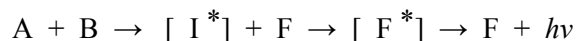
Dok najveći broj hemiluminiscentnih reakcija proizvodi vrlo malo svetlosti čiji se intenzitet praktično ne može meriti, neke hemiluminiscentne reakcije imaju veoma veliki kvantni prinos (*quantum yield*), koji predstavlja odnos između broja emitovanih i apsorbovanih kvantata i maksimalno može imati vrednost 1 (3). Samo reakcije sa visokim kvantnim prinosom mogu se koristiti u određenim luminiscentnim tehnikama.

## Hemiluminiscentne reakcije

U hemiluminiscentnim reakcijama nastaje proizvod u pobuđenom stanju  $[I^*]$ , koji pri povratku u osnovno stanje  $[I]$  emituje svetlost, odnosno elektromagnetno zračenje:



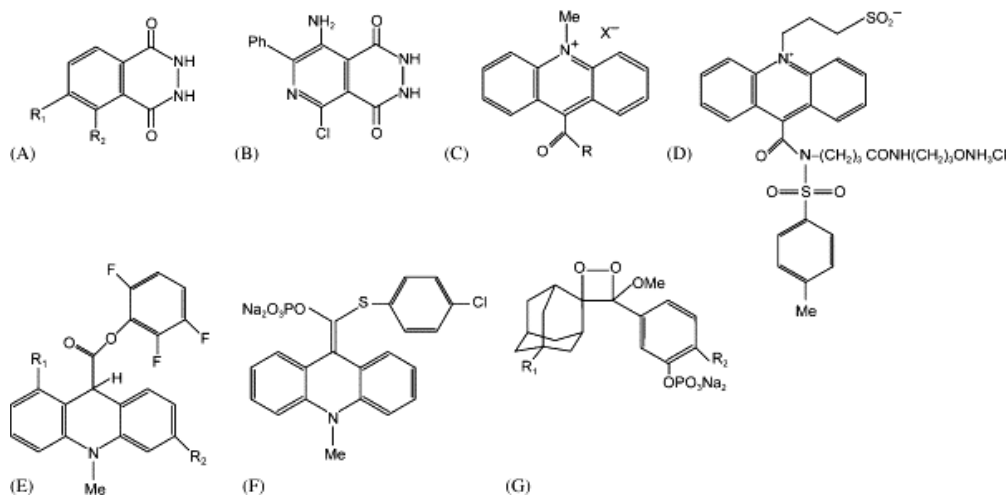
Ova reakcija primer je **direktne hemiluminiscencije**. U nekim slučajevima, kada molekul u pobuđenom stanju ne emituje dovoljno svetlosti, energija se može preneti na drugi molekul, F, koji se pobuđuje i pri povratku u osnovno stanje emituje svetlost. Prvobitno pobuđeni molekul naziva se **primarni emiter** ili **donor**. Drugi molekul se naziva **akceptor**. Ovakva reakcija naziva se **indirektna** ili **senzibilisana** hemiluminiscentna reakcija:



Emitovana svetlost u hemiluminiscentnim reakcijama može biti u ultravioletnoj (UV), vidljivoj (VIS) i infracrvenoj (IR) oblasti spektra, ali je najčešća emisija vidljive svetlosti, koja je vizuelno najatraktivnija i najviše se koristi u analitičke svrhe. Da bi se emitovala svetlost iz VIS spektra, u reakciji mora da se stvori, tj. oslobodi 40-70 Kcal/mol energije, što znači da samo visokoenergetski molekuli mogu zadovoljiti ovaj zahtev.

U hemiluminiscentnim reakcijama stupaju u reakciju tzv. **luminiscentni reagensi** (*light emitting materials*) (Slika 1) i jaka oksidaciona sredstva ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $F_2$ ). Hemiluminiscentne reakcije mogu se odigravati u čvrstoj, tečnoj i gasnoj fazi, ali za analitiku su najvažnije reakcije tečne faze. Po nekim autorima (4-7), hemiluminiscentne reakcije se mogu svrstati u tri grupe:

1. Hemiluminiscentne reakcije **u užem smislu** u kojima učestvuju sintetska jedinjenja i jaki oksidansi kao što su peroksidi.
2. Reakcije koje se odigravaju u živim organizmima, kao što su svici ili meduze, uz prisustvo enzima. Ove reakcije su **bioluminiscentne reakcije**, a sama pojava se naziva **bioluminiscencija**.
3. **Elektrohemioluminiscentne reakcije** u kojima se emituje svetlost, a koje nastaju upotrebom električne struje.

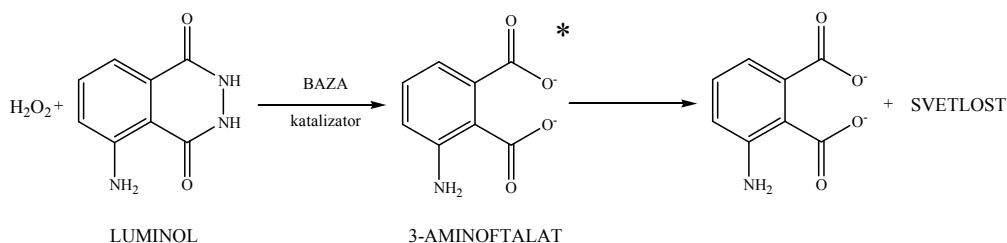


Slika 1. Hemiluminiscentni reagensi i obeleživači: (A) luminol ( $R_1=H$ ,  $R_2=NH_2$ ), izoluminol ( $R_1=NH_2$ ,  $R_2=H$ ); (B) 8-amino-5-hloro-7-fenilpirido[3,4-*d*]pridazin-1,4(2H,3H)-dion; (C) akridinium estar; (D) akridinium sulfonamid estar; (E) karboksamid-akridinski substrati za peroksidazu (PS-1,  $R_1=H$ ,  $R_2=OMe$ ; PS-2,  $R_1=OMe$ ,  $R_2=OMe$ ; PS-3,  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ); (F) akridinski substrati za alkalnu fosfatazu; (G) adamantil 1,2-diooksetan (AMPPD<sup>®</sup>,  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ; CSPD<sup>®</sup>,  $R_1=Cl$ ,  $R_2=H$ ; CDP-Star<sup>®</sup>,  $R_1=Cl$ ,  $R_2=Cl$ )

## Primeri hemiluminiscentnih reakcija

### Reakcija luminola

**Luminol** (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindion) je najpoznatiji i najviše korišćeni luminiscentni reagens. Mešanjem luminola sa jakim oksidacionim sredstvom, kao što je  $H_2O_2$ , u baznoj sredini i uz prisustvo jona metala kao katalizatora i enzima peroksidaze, razvija se svetlost plavičaste boje:



Prisustvo katalizatora je veoma bitno: mnogi joni metala, kao npr. Cu (II), Co(II), Fe(III) povećavaju emisiju i intenzitet svetlosti. Takođe, enzim luciferin pojačava intenzitet reakcije do 1000 puta. Joni nekih metala, pak, deluju suprotno i suzbijaju hemiluminiscenciju (8-10).

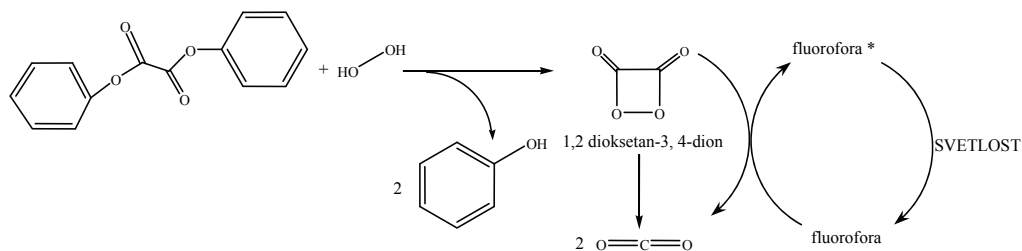
Reakcija luminola sa jakim oksidacionim sredstvima koristi se za određivanje koncentracije vodonik-peroksida, koncentracije katjona nekih metala i organskih jedinjenja koja kompleksiraju katjone metala. Aminokiseline, fruktoza, tagatoza, glicerol i albumin iz seruma, su neka od mnogih jedinjenja koja se određuju hemiluminiscentnom reakcijom sa luminolom. Pomoću reakcije luminola, određuje se koncentracije peroksidaza i prate imunološke reakcije u kojima peroksidaze služe za obeležavanje (objašnjeno u daljem tekstu).

### **Reakcija oksalatnog estra**

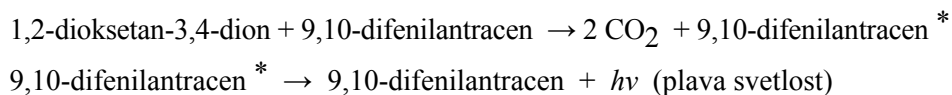
U hemiluminiscentnoj reakciji oksalatnog estra svetlost ne emituje proizvod reakcije (kao u reakciji luminola), već proizvod reakcije reaguje sa drugim jedinjenjem, koje je obično neki fluorescentni molekul (F). Prenosom energije, fluorescentni molekul se pobuđuje i pri vraćanju u osnovno stanje emituje svetlost.



Međuproizvod (I) koji nastaje je visokoenergetski molekul 1,2-dioksetan-3,4-dion, koji se vrlo lako raspada na dva molekula ugljendioksida, a oslobođena energija pobuđuje fluorescentni molekul tzv. fluoroforu:



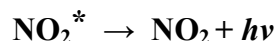
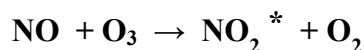
Ako je fluorofora 9,10-difenilantracen, u toku reakcije nastaje svetlost plavičaste boje, prema sledećoj reakciji:



### ***Hemiluminiscentne reakcije gasne faze***

Jedna od najstarijih i podrobno opisanih (naročito u delima Agate Kristi) hemiluminiscentnih reakcija u gasnoj fazi je oksidacija belog fosfora na vlažnom vazduhu, pri čemu nastaje zelena svetlost. Reakcija između para fosfora i kiseonika koristi se za dokazivanje tragova fosfora, posebno kod trovanja (*Mitscherlich-ova* metoda).

Druga karakteristična hemiluminiscentna reakcija u gasnoj fazi predstavlja reakciju ozona i azot(II)-oksida, pri čemu nastaje azot(IV)-oksid u pobuđenom stanju, koji pri povratku u osnovno stanje emituje svetlost različitih talasnih dužina, ali je emisija ipak koncentrisana oko 1200 nm:



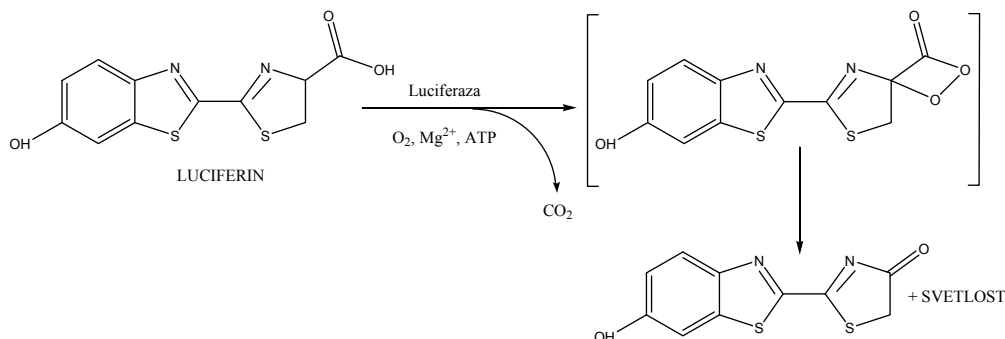
Ova reakcija je osnova analitičkih metoda kojima se određuje sadržaj azotmonoksida ili ozona i testira kvalitet vazduha.

### ***Bioluminiscentne reakcije***

Hemiluminiscentne reakcije koje se odvijaju u živim organizmima, uz prisustvo enzima, nazivaju se bioluminiscentne reakcije, a sama pojava bioluminiscencija. Značaj bioluminiscencije za organizme koji žive na mračnim mestima, a naročito za morske organizme, koji žive na velikim dubinama gde sunčeva svetlost ne dopire, veoma je veliki. Bioluminiscencija se javlja kod nekih bakterija, gljiva, protozoa, ljuskara, sunđera, meduza, lignji, insekata itd. Verovatno najpoznatiji primer bioluminiscentnih insekata su svici.

### **Luciferin-luciferaza reakcija**

Reakcija luciferin-luciferaza se odvija u telima svitaca i to u posebnim ćelijama abdomena koje sadrže supstancu **luciferin** i proizvode enzim **luciferazu**. U reakciji luciferina sa kiseonikom uz adenzin trifosfat (ATP) i luciferazu koja katalizuje reakciju, nastaje oksiluciferin i emituje se svetlost:



Sama reakcija se odvija u dva koraka:

**1. luciferin + ATP → luciferiladenilat + pirofosfat (PPi)**

Ova reakcija se odvija na površini enzima luciferaze, pri čemu luciferiladenilat ostaje vezan za enzim, a pirofosfat se oslobađa.

**2. luciferiladenilat + O<sub>2</sub> → oksiluciferin +AMP + hv**

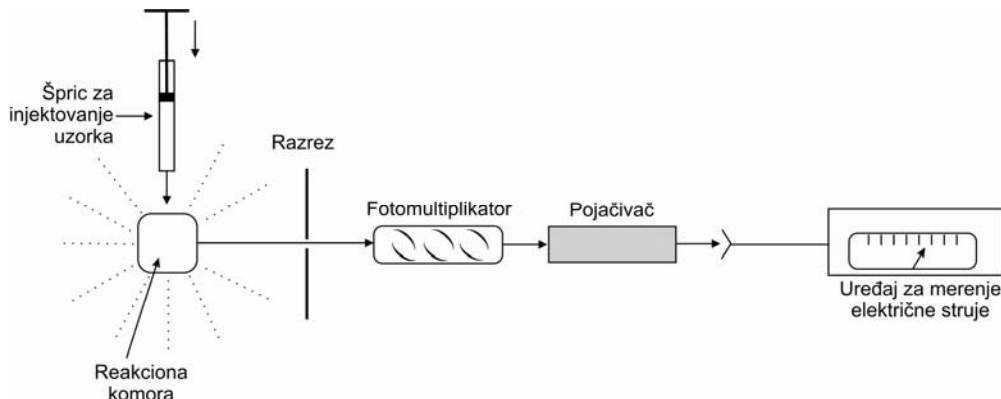
Oksiluciferin i AMP se oslobađaju sa površine enzima. Talasna dužina emitovane svetlosti je između 510 i 670 nm. Čelije koje proizvode svetlost sadrže kristale mokračne kiseline, koji pomažu reflektovanje svetlosti (8-10).

Može se reći da je čovek "ukrao" ovu reakciju od svitaca i prilagodio je za *in vitro* ispitivanja sadržaja ATP-a u ćelijama. Reakcijom luciferin-luciferaza može se detektovati ATP u femtomolskim količinama. Merenjem sadržaja ATP-a moguće je odrediti količinu prisutnih mikroorganizama u uzorku, što se koristi za mikrobiološku kontrolu lekova, kozmetičkih proizvoda, hrane i vode.

## Luminometrija

Korišćenjem hemiluminiscentnih reakcija, razvila se moćna analitička tehnika – **luminometrija**, koja se zasniva na merenju intenziteta svetlosti emitovane iz hemiluminiscentnih i bioluminiscentnih reakcija u cilju određivanja koncentracije analita.

Na Slici 2. prikazana je jednostavna šema luminometra (9). Špricom se u reakcionu komoru injicira luminiscentni reagens, koji reaguje sa komponentom iz analize. Kao rezultat hemijske reakcije nastaje svetlost, koja se emituje u svim pravcima (prikazano isprekidanim linijama na slici). Zrak svetlosti prolazi kroz razrez, pada na fotomultiplikator, koji svetlosnu energiju prevodi u električni signal, koji se zatim pojačava i meri.



Slika 2. Šema luminometra

### Primena hemiluminiscencije - luminiscentno obeležavanje

Kvantitativna analiza kod hemiluminiscentnih reakcija zasnovana je na Lambert-Beerovom zakonu, koji predstavlja linearnu zavisnost intenziteta emitovane svetlosti od koncentracije hemiluminiscentnog molekula. Međutim, mali broj molekula od značaja u biohemiji pokazuju hemiluminiscenciju, pa je ova pojava iskorišćena na posredan način: za ispitivanu supstancu vezuje se luminiscentni reagens jakim kovalentnom vezom, tako da je ispitivana supstanca "obeležena" luminiscentnim reagensom. Stoga se takvi luminiscentni reagensi nazivaju još i **(hemi)luminiscentni obeleživači**. Na taj način se preko intenziteta zračenja luminiscentnog reagensa (obeleživača) može pratiti ispitivana komponenta i odrediti njena koncentracija.

Tipičan primer luminiscentnih obeleživača su akridinijum estri, koji se mogu vezati za veliki broj molekula značajnih za biohemiju, imunohemiju, mikrobiologiju i virusologiju (hormone, proteine, antitela, virus humane imunodeficijencije (HIV), tumorske produkte, itd) i koji pri oksidaciji u alkalnoj sredini emituju svetlost. Ispitivani molekul može se obeležiti i enzimom, koji katalizuje određenu hemiluminiscentnu reakciju i pojačava intenzitet emisije svetlosti.

### Primena hemiluminiscencije u kliničkoj laboratorijskoj praksi i istraživanjima

U kliničkim istraživanjima metode na bazi hemiluminiscencije koriste se za merenje ekspresije gena odgovornih za sintezu određenih enzima, za ispitivanje ćelijske luminiscencije, za ispitivanje proteina metodom Western



blotting, kao i za ispitivanje nukleinskih kiselina metodama Northern i Southern blotting (11-12).

Uopšteno, hemiluminiscencija se koristi za kvantitativnu analizu klinički značajnih analita u biološkim tečnostima, kao što su: *N*-acetyl- $\beta$ -D-glukozaminidaza u urinu, holesterol, vitamin C, neuraminidaza (za procenu osetljivosti kliničkih izolata *influenza virusa* na inhibitore neuraminidaze), nazalni azot oksid (za screening primarne cilijarne diskinezije), fenol i 4-metilfenol u urinu i drugim analitima.

## **Rutinska primena hemiluminiscencije u kliničkim laboratorijama**

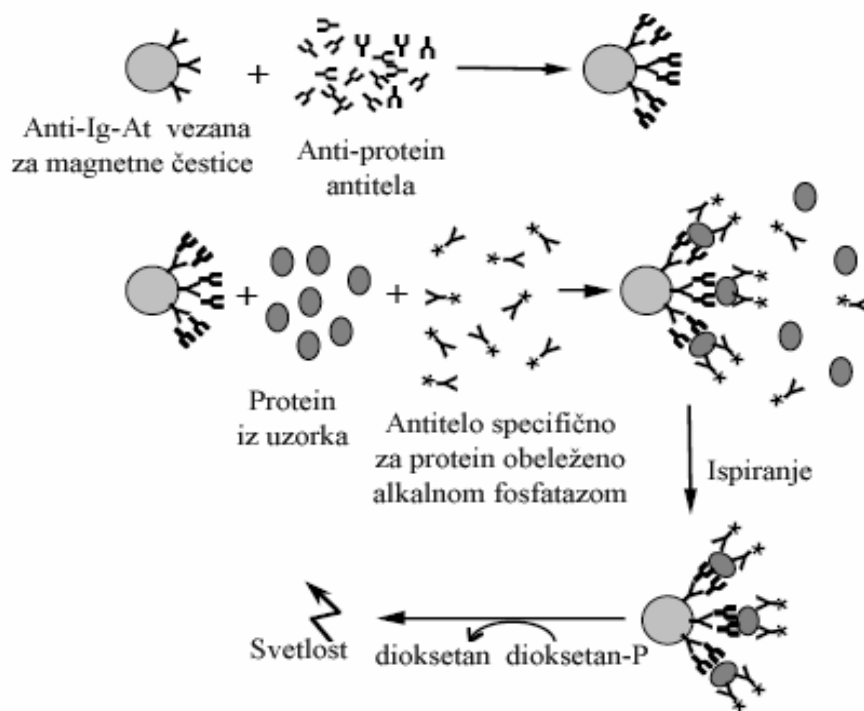
### ***Imunohemijske metode određivanja***

Danas je najznačajnija rutinska primena hemiluminiscencije u kliničkim laboratorijama u imunohemijskim metodama. Razvijen je veliki broj komercijalnih hemiluminiscentnih imuno-testova, kao i automatskih analizatora. Ovi testovi su namenjeni kvantitativnom merenju analita koji se rutinski određuju u laboratorijama: kliničko-hemijskoj, imunološkoj, toksikološkoj, virusološkoj kao i endokrinološkoj. Primena ovih testova u laboratorijskoj praksi je široka: procena funkcije tiroideje, ispitivanje fertiliteta, procena oštećenja miokarda, dijagnoza anemije, merenje nivoa lekova u krvi, dijagnoza i praćenje zloupotrebe lekova, dijagnoza i praćenje kancera i infektivnih bolesti (hepatitis, HIV) i dr. Tri glavne hemiluminiscentne tehnike u imuno-određivanjima su:

- a) imuno-određivanja pomoću obeleživača sa akridinijum estrom i sulfonamidom (13);
- b) tehnike hemiluminiscentne detekcije pomoću peroksidaze rena kao obeleživača (14) i
- c) tehnike hemiluminiscentne detekcije pomoću alkalne fosfataze kao obeleživača (15).

Korišćenjem magnetnih čestica u novijim hemiluminiscentnim testovima omogućena je jednostavna separacija čvrste od tečne faze (16). Na Slici 3, kao primer, prikazan je jedan od imunohemijskih testova. Na magnetne čestice su „prikačena” anti-Ig-antitela koja grade kompleks sa anti-protein antitelima (antitela specifična za protein koji se ispituje). Protein koji se ispituje iz uzorka vezuje se za odgovarajuća anti-protein antitela, koja su se prethodno vezala za anti-Ig-antitela. Na ovako nastali kompleks, vezuje se antitelo specifično za protein iz uzorka obeleženo alkalnom fosfatazom i nakon ispiranja, kao supstrat se dodaje dioksetan-fosfat koje se delovanjem enzima defosforiliše, pri čemu

nastaje proizvod koji emituje svetlost. Ove metode pokazuju veoma visoku osetljivost (do 1 zM tj.  $10^{-21}$  M).



**Slika 3. Princip hemiluminiscentnog imuno-određivanja proteina iz uzorka korišćenjem magnetnih čestica i alkalne fosfataze kao obeleživača**

Drugi tip hemiluminiscentnog imuno-određivanja je merenje svetlosti indukovane singletnim kiseonikom (LOCI: *Luminiscent oxygen channeling immunoassay*) (17). U ovoj metodi je iskorišćena *in situ* produkcija hemiluminiscentnog jedinjenja, kao i transfer singletnog kiseonika između dve vrste čestica obloženih antitelima, donora i akceptora. Čestice-donori su obložene bromoskvarinom I (boja koja produkuje singletni kiseonik), a čestice akceptori su obložene mešavinom tioksena (prekursor hemiluminiscentnog dioksetana) i europium helata (fluorescentni akceptor za pobuđenu hemiluminiscenciju). Vezivanjem antigena, dve vrste čestica se dovode u bliski kontakt i nakon ekscitacije laserskim zrakom na 680 nm, fotopobuđivač iz čestica-donora prevodi kiseonik iz vazduha u singletni kiseonik, koji difunduje

do najbližih čestica-akceptora i reaguje sa tioksenom. Kao rezultat ovih hemijskih reakcija, javlja se emisija svetlosti na talasnim dužinama od 520 do 620 nm. Ovi testovi su adaptirani za metode kompetitivnog određivanja (ciklični adenzin monofosfat (cAMP)), određivanje interakcija (ligand-receptor, protein-protein, protein-DNK), određivanje enzima (proteaze, kinaze, helikaze), kao i za imuno-određivanja (tirotropin, hepatitis B antigen, digoksin). Na ovaj način, moguće je npr. izmeriti hormon tirotropin (TSH) sa osetljivošću do 4 atomola.

### ***Određivanje nukleinskih kiselina***

Najvažnija klinička primena kvantitativnog merenja virusnih nukleinskih kiselina jeste u otkrivanju virusnih infekcija kao i praćenju terapije. Npr. kvantifikacija virusnog genoma je danas integralni deo praćenja pacijenata inficiranih različitim virusima, kao što su npr. virus humane imunodeficijencije (HIV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV). Isto tako, značajno je i određivanje nivoa citomegalovirusne DNK, kod pacijenata koji su kandidati za transplantaciju koštane srži. Takođe, značajna je primena genomske kvantifikacije i u ispitivanju rizika od infekcije, npr. transmisije HBV sa majke na dete ili infekcije HBV kod medicinskih radnika. Ispitivanje nukleinskih kiselina osetljivim tehnikama je imperativ u slučajevima kada se ne mogu primeniti konvencionalne metode zasejavanja, ili kada postoji veliki rizik prilikom izolacije nekog virusa. Iako su se metode kvantitativnog merenja nukleinskih kiselina upotrebljavale samo u istraživačke svrhe, danas su deo rutinske virusologije. Testovi molekularne biologije za ispitivanje nukleinskih kiselina se sastoje iz tri faze:

1. priprema uzorka koja najčešće podrazumeva ekstrakciju i prečišćavanje nukleinskih kiselina iz biološkog materijala,
2. hibridizacija ciljne nukleinske kiseline, kao i amplifikacija genoma i
3. detekcija i eventualna kvantifikacija ciljne nukleinske kiseline.

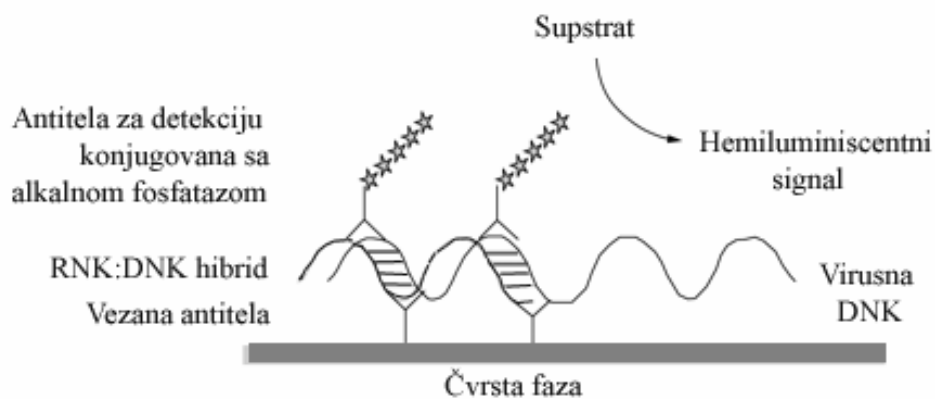
Najveći uspeh hemiluminiscencije u testovima nukleinskih kiselina je homogena ne-separaciona hemiluminescencija za detekciju specifičnih DNK i RNK sekvenci. Princip ove tehnike je zasnovan na hibridizaciji oligonukleotida, koji su obeleženi visoko hemiluminiscentnim akridinijum estrom (AK-obebežen oligonukleotid). Akridinijum estar se u blago alkalnoj sredini hidrolizuje i postaje trajno ne-hemiluminiscentan. Kada se AK-obebežen oligonukleotid hibridizuje sa komplementarnom sekvencom DNK ili RNK iz uzorka, akridinijum estar postaje zaštićen od hidrolize i emituje svetlost, koja se meri pomoću luminometra i proporcionalna je ispitivanoj nukleinskoj kiselini.

Ovaj princip hemiluminiscentnog testa je, danas, široko korišćen u dijagnostici infektivnih bolesti (npr. Chlamydia). Ovde će detaljnije biti opisane

dve tehnike ispitivanja nukleinskih kiselina sa amplifikacijom: tehnike hibridizacije i tehnike razgranate DNK.

### Tehnike hibridizacije

Tehnike hibridizacije se baziraju na detekciji segmenta jednog lanca nukleinske kiseline (koji je denaturisan) uz pomoć obeležene nukleinske kiseline (18). Ovaj lanac je komplementaran delu genoma koji se ispituje i prema tome se specifično vezuje za ciljnu nukleinsku kiselinu. Tako su na tržištu dostupni testovi za citomegalovirusnu DNK u leukocitima, kao i hepatitis B virusnu DNK u serumu. U ovim testovima se koristi RNK koja se vezuje za DNK u uzorku, formirajući RNK:DNK hibrid (Slika 4). Ovaj hibrid se vezuje za čvrstu fazu koja je obložena antiRNK:DNK antitelima. U sistem se unose antitela obeležena alkalnom fosfatazom koja se vezuju za RNK:DNK hibrid („sendvič” imuno-određivanje). Na kraju se kvantitativno određuje aktivnost alkalne fosfataze, dodatkom hemiluminiscentnog supstrata. Kako se nekoliko molekula alkalne fosfataze vezuje za anti-RNK-DNK hibrid-At, a pošto se više konjugovanih antitela vezuje za svaki hibridni molekul, dolazi do uvećanja signala, čak 3000 puta.

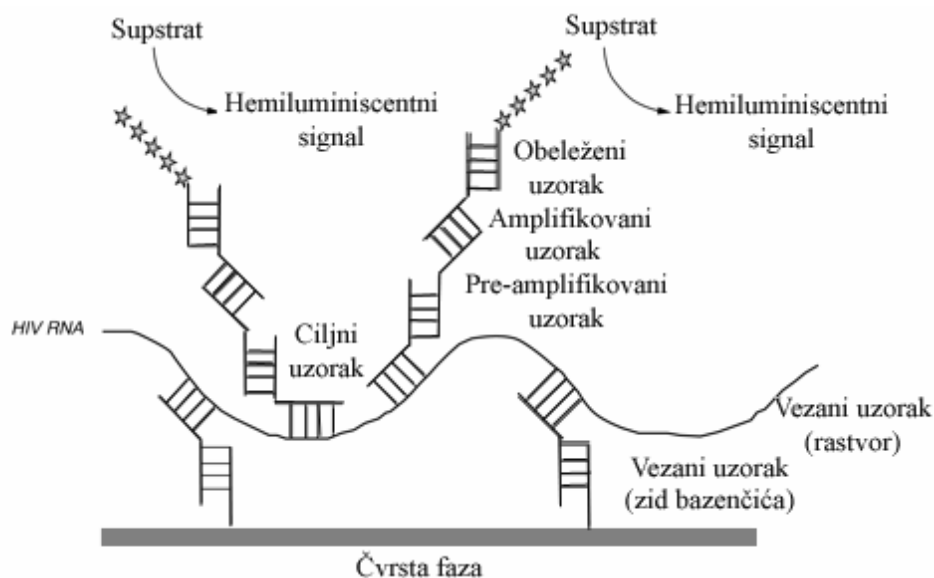


Slika 4. Princip tehnike vezanog hibrida za određivanje virusnih nukleinskih kiselina

### Tehnike razgranate DNK

Ove tehnike (*branch DNA* ili *bdNA*) koriste kombinaciju sintetičkih oligonukleotida za merenje količine virusnih DNK i RNK u ispitivanom uzorku (19). Ciljna, virusna nukleinska kiselina se pričvrsti za podlogu pomoću

oligonukleotida (Slika 5). Zatim se nekoliko drugih proba veže za ciljnu sekvencu, kao i međusobno, uključujući i razgranatu DNK, amplifikovanu probu. Na kraju, probe obeležene alkalnom fosfatazom se hibridizuju sa svakom amplifikovanom probom u imobilizovani kompleks. Dodatkom hemiluminiscentnog supstrata na koji deluje alkalna fosfataza, dolazi do emisije svetlosti, čiji intenzitet je proporcionalan količini sekvenci iz uzorka koji ispituujemo. Danas je ovaj metod primenjen u testovima za kvantifikaciju HIV-1 RNK, HCV RNK, i HBV DNK. Testovi se odlikuju veoma visokom osetljivošću: HIV-1 bDNK test ima osetljivost od 500 kopija/ml, a ultra-osetljivi testovi za HIV mogu detektovati čak 50 kopija/ml.



Slika 5. Princip tehnike razgranate DNK za određivanje virusnih nukleinskih kiselina

### ***Primena hemiluminiscencije u kliničkim istraživanjima***

Zahvaljujući visokoj osetljivosti, visokom stepenu dinamičnosti i velikoj raznolikosti, hemiluminiscencija je široko primenjena u kliničkim istraživanjima. Polja kliničkih istraživanja u kojima se koristi hemiluminiscencija su: imunološka određivanja, praćenje reaktivnih kiseoničnih

proizvoda, kao i detekcija supstanci koje su razdvojene metodama HPLC i kapilarne elektroforeze.

Imunološka određivanja u istraživanjima se koriste za veliki broj parametara kao što su: citokini (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) (20), interferon  $\gamma$  (21), vaskularni endotelni faktor rasta-C (22) i drugi.

U istraživanjima se testovi nukleinskih kiselina koriste za ispitivanje polimorfizma nukleotida (single-nucleotide polymorphism, SNP), zatim u kombinaciji sa PCR metodom (*polymerase chain reaction*) za ispitivanje infektivnih bolesti kao što su: herpes simplex (23), *Trichomonas vaginalis* (24) i drugi.

Luminometrijska merenja se koriste i u genetskim istraživanjima, kao što su proučavanja genske ekspresije i genske regulacije, otkrivanju genskih mutacija i dr. Za proučavanje genske ekspresije i regulacije koriste se tzv. „reporter” geni koji se „ubacuju” u ćelijsku DNK i služe da povežu specifični događaj na molekularnom nivou sa pojavom koja se može meriti (hemiluminiscencijom). Na tržištu postoji nekoliko luminiscentnih „reporter” gena (25). To su geni koji su odgovorni za sintezu luciferaze, placentalne alkalne fosfataze,  $\beta$ -galaktozidaze,  $\beta$ -glukuronidaze i hormona rasta. Gen koji je odgovoran za sintezu luciferaze koristi se u medicini prilikom određivanja osetljivosti mikroorganizama (npr. bacila tuberkuloze) na pojedine antibiotike. U DNK izolovanog bacila tuberkuloze ubacuje se gen koji kontroliše sintezu luciferaze i ovim genetski promenjenim bacilom se zaseju odgovarajuće podloge u kojima se nalaze različiti antibiotici. Posle perioda inkubacije, meri se intenzitet luminiscencije, a podloga sa koje se emituje najmanja količina svetlosti sadrži antibiotik sa najjačim dejstvom na izolovani bacil.

Ćelijska hemiluminiscencija je moćno sredstvo u istraživanjima na ćelijama. Oblast ovih istraživanja je veoma široka, kao npr. ispitivanja polimorfonuklearnih neutrofila kod oboljenja pluća, produkcije reaktivnih kiseoničnih produkata u humanim spermatozoidima (26), ispitivanja lipopolisaharida *Helicobacter pylori* (27), ispitivanja endotoksina (28), kao i mnoga druga ispitivanja.

Takođe, značajna je primena hemiluminiscencije u kliničkim istraživanjima proteina primenom metoda Western blotting kao i metodama Southern blotting za DNK i Northern blotting za RNK i to u reakcijama detekcije.

## Zaključak

Luminometrija na bazi hemiluminiscencije je danas prihvaćena metoda u rutinskoj kliničkoj praksi i istraživanjima. Zahvaljujući izuzetnim karakteristikama: veoma visokoj osetljivosti i specifičnosti, mogućnošću potpune automatske primene kod velikog broja raznorodnih parametara, luminometrija je nezamenjiva u medicini. Razvoj hemiluminiscentne tehnologije nije završen, već se nastavlja otkrivanjem novih i efikasnijih hemiluminiscentnih molekula.

## Literatura

1. Spasoje Đorđević i saradnici, Hemijsko tehnološki priručnik, Fizičko-hemijske metode, Rad, Beograd 1985.
2. Robert A. Albery, Robert J. Silbey, Physical chemistry, John Wiley & Sons, Inc, 1997.
3. Milorad Jeremić, Slobodan Macura, Jovan Vuković, Savremena biofizika. Metode u molekularnoj biofizici, Naučna knjiga, Beograd 1987.
4. <http://www.lumigen.com/documents/chemexplained.shtml>
5. [http://www.shsu.edu/~chm\\_tgc/chemilumdir/chemiluminescens2.html](http://www.shsu.edu/~chm_tgc/chemilumdir/chemiluminescens2.html)
6. <http://www.shsu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/molspec/lumin1.htm>
7. <http://www.biodevice.com/FluorescenceChemiluminescence.htm>
8. Lawrence A. Kaplan, Amadeo J. Pesce, and Steven C. Kazmierczak, Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, 4th ed. editors. St. Louis, MO: Mosby, 2003.
9. David Sheehan, Physical Biochemistry: Principles and Application, John Wiley and sons, LTD, 1997.
10. K.E. Van Holde, Physical biochemistry, Prentice-Hall, Inc 1985.
11. Stanley PE, Kricka LJ. Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and Current Applications. World Scientific, Singapore, 2003.
12. Kricka LJ. Clinical applications of chemiluminescence. Analytical Chimica Acta 2003; 500: 279-286.
13. Pringle MJ. Analytical applications of chemiluminescence. Adv Clin Chem 1993; 30: 89-183.
14. Thorpe GH, Kricka LJ. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. Methods Enzymol 1986; 133: 331-353.

15. Olesen CE, Mosier J, Voyta JC, Bronstein I. Chemiluminescent immunodetection protocols with 1,2-dioxetane substrates. *Methods Enzymol* 2000; 305: 417-427.
16. Creager RD, Knoll D, Shellum C, Werness P. Commercialization of a chemiluminescence-based analyser. *IVD Technology* 1996; 2: 32-38.
17. Ullman EF, Kirakossian S, Singh S, Wu ZP, Irvin BR, Pease JS, Switchenko A, Irvine JD, Dafforn A, Skold CN, Wagner DB. Luminescent oxygen channelling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5426-5430.
18. Arnold Jr LJ, Hammond PW, Weise WA, Nelson NC. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 1989; 35: 1588-1594.
19. Urdea M, Horn T, Fultz T, Anderson M, Running J, Hamren S, Ahle D, Chang CA. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 1991; 24: 197-200.
20. Satoh T, Tollerud DJ, Guevarra L, Rakue Y, Nakadate T, Kagawa J. Chemiluminescence assays for cytokines in serum: influence of age, smoking, and race in healthy subjects. *J. Arerugi* 1995; 44: 661-669.
21. Alkan S, Akdis C, Towbin H. Chemiluminescent and enzyme-linked immunoassays for sensitive detection of human IFN-I. *J. Immunoassay* 1994; 15: 217-238.
22. Duff SE, Li C, Renehan A, O'Dwyer ST, Kumar S. Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C. *Int J Oncol* 2003; 22: 339-343.
23. Vesanen M, Piiparinen H, Kallio A, Vaheri A. Detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid samples using the polymerase chain reaction and microplate hybridization. *J. Virol. Methods* 1996; 59: 1-11.
24. Campbell AK, Kricka LJ, Stanley PE. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects*, Wiley, Chichester, 1994.
25. Hasting JW, Kricka LJ, Stanley PE. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*, Wiley, Chichester, 1997.
26. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil. Steril* 2002; 78: 1215-1224.
27. Hansen PS, Petersen SB, Varning K, Nielsen H. Additive effects of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and proteins in monocyte inflammatory responses. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 765-771.
28. Moriwaki Y, Sugiyama M, Ozawa Y, Mochizuki Y, Kunisaki C, Kamiya N, Yamazaki Y, Suda T. Changes in the response of neutrophils to endotoxin priming following major abdominal surgery. *World J Surg* 2002; 26: 521-526.



# Chemiluminescence: theory, reactions and application in the routine clinical laboratory and research

Vesna Kuntić<sup>1</sup>, Aleksandra Topić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physical Chemistry, <sup>2</sup>Institute of Medical Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe, 450, 11221 Belgrade, Serbia

---

## Summary

This article reviews the fundamental and applied aspects of chemiluminescence and its applications in both routine clinical analysis and in the diverse applications in clinical research. Chemiluminescence reactions are basic of luminometric assays, induce ultra sensitive detection limits (attomole–zeptomole), rapid assays, and a broad range of analytical applications.

In the routine clinical laboratory, chemiluminescence is now commonly used for immunoassay and DNA probe assays, in the form of a chemiluminescent labels (acridinium ester, acridinium sulfonamide) and detection reactions for peroxidase and alkaline phosphatase enzyme labels (luminol and adamantyl 1,2-dioxetane-based reactions, respectively). Chemiluminescent immunoassay test kits and automated immunoassay analyzers have been developed. There are broad range of chemiluminescent immunoassay tests which are routinely used for the measurement of the biochemistry, immunology, toxicology, virology, and endocrinology analytes in the assessment of thyroid function, fertility, myocardial damage, anemia, therapeutic drug levels, and diagnosing and monitoring drug abuse, cancer and infectious diseases (e.g. hepatitis).

In clinical research, the sensitivity, dynamic range and diversity of chemiluminescent assays has led to a vast range of applications, notably in protein and nucleic acid blotting, microarray-based assays, monitoring reactive oxygen species, and as detection reactions for substances separated by HPLC and capillary electrophoresis. Nowadays, in clinical research, chemiluminescent detection techniques are used to measure enzymes expressed by reporter genes, cellular luminescence, blotted proteins (Western blotting) and nucleic acids (Northern and Southern blotting).

**Key words:** chemiluminescence, chemiluminescent reactions, application of chemiluminescence

---