

УДК 543.64

Электрохимические ДНК-сенсоры для определения биологически активных низкомолекулярных соединений

Г. А. Евтюгин, Г. К. Будников, А. В. Порфирьева

ГЕННАДИЙ АРТУРОВИЧ ЕВТЮГИН — доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского государственного университета. Область научных интересов: биоэлектрохимические методы анализа. E-mail Gennady.Evtugyn@ksu.ru

ГЕРМАН КОНСТАНТИНОВИЧ БУДНИКОВ — доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета. Область научных интересов: электрохимические методы анализа, химические и биохимические сенсоры. E-mail Herman.Budnikov@ksu.ru

АННА ВЕНИАМИНОВНА ПОРФИРЬЕВА — аспирант кафедры аналитической химии Казанского государственного университета. Область научных интересов: электрохимические и пьезометрические ДНК-сенсоры. E-mail porfireva-a@inbox.ru

420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина, тел. 843-231-54-91.

Введение

Развитие методов биоанализа, использующих в качестве элементов молекулярного распознавания нуклеиновые кислоты, синтетические и природные олигонуклеотиды, — одно из актуальных направлений современной аналитической химии [1]. В рамках создания новых методов биоанализа большое внимание уделяется процессам взаимодействия ДНК с высоко- и низкомолекулярными соединениями природного и антропогенного происхождения, что объясняется несколькими причинами. Прежде всего это необходимо для решения широкого круга биомедицинских проблем, связанных с онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, а также для решения задач генетической диагностики [2]. Биосенсорные технологии позволяют устанавливать последовательность нуклеотидов специфических участков ДНК, что актуально для идентификации патогенных микроорганизмов и вирусов, установления отцовства, при изучении полиморфизма генов, для раннего обнаружения врожденных генетических аномалий [3]. Развитие биосенсорных технологий сыграло решающую роль в научно-методическом и технологическом обеспечении расшифровки генома человека [4].

Высокая потребность в ДНК-сенсорах, значительные финансовые вливания позволили ускорить их коммерциализацию, в том числе с созданием специализированных венчурных компаний [5—7]. В так называемых ДНК-чипах детектируется взаимодействие короткоцепочечного олигонуклеотида (ДНК-зонда), закрепленного на поверхности преобразователя сигнала, с компле-

ментарными участками олигонуклеотидов пробы. Происходит связывание нуклеотидов в устойчивые пары аденин-тимин и гуанин-цитозин с образованием спиральной двунитевой ДНК — так называемый процесс гибридизации. Такие взаимодействия отличаются высокой специфичностью. Они позволяют регистрировать не только комплементарное связывание, но и влияние на него различных факторов [8]. В массивах ДНК-чипов в качестве сигнала часто регистрируется индуцируемая лазерным лучом флуоресценция, что позволяет добиться высокой производительности и чувствительности измерения (обнаружение до десятков тысяч нуклеотидных последовательностей на каждый сенсор) [4]. Существуют также упрощенные электрохимические ДНК-сенсоры с меньшим числом ДНК-зондов, в том числе комплектуемые специализированными измерительными блоками [7].

Несмотря на успехи, достигнутые в решении проблемы обнаружения комплементарных последовательностей олигонуклеотидов и расшифровки таких последовательностей с помощью специфических зондов, остается область задач, где преимущества ДНК-сенсоров пока не реализованы в полной мере. Речь идет об определении низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами. Эта аналитическая функция ДНК-сенсоров имеет важное практическое значение. Специфические взаимодействия низкомолекулярных соединений с ДНК определяют действие лекарственных противораковых препаратов, последствия окислительного и термического шока, про-

цессы повреждения и эффективность репарации нуклеиновых кислот [13-15]. ДНК-сенсоры могут служить удобными моделями для изучения процессов *in vitro* в таких областях, как фармакология, экотоксикология и экологическое нормирование содержания токсикантов в окружающей среде. Несмотря на то, что условия взаимодействия нуклеиновых кислот с низкомолекулярными регуляторами и эффекторами различной природы отличаются от таковых в живой клетке, с помощью ДНК-сенсоров можно оценивать специфичность связывания, механизм регуляторного или повреждающего действия и трансформации биологически активных веществ в биохимических реакциях с участием ДНК. Важной задачей является определение эффективных лекарственных доз противораковых препаратов, отличающихся высокой токсичностью, а также их концентраций в биологических жидкостях и товарных формах. ДНК-сенсоры перспективны для скрининга и исследования фармакокинетики новых лекарств и биологически активных пищевых добавок [16].

Возможности генерации аналитического сигнала, обусловленного взаимодействием ДНК с низкомолекулярными соединениями, весьма разнообразны. С одной стороны, это может обеспечить специфичность определения, а с другой — создает некоторые трудности для исследователя, который вынужден адаптировать конструкцию биосенсора и протокол измерения для каждого нового объекта анализа. Вероятно, по этой причине сверхпроизводительные флуоресцентные методы измерения с использованием ДНК-чипов для определения низкомолекулярных соединений не применяются. Их производительность и универсальность заведомо избыточны для анализа ограниченного числа проб, а высокая стоимость их изготовления резко увеличивает себестоимость разового измерения сигнала. Для практики определения низкомолекулярных соединений рационально применение небольших и относительно недорогих устройств на основе единичных ДНК-сенсоров или небольших их массивов (десятков сенсоров, изготавливаемых методами фотолитографии на единой подложке), ориентированных на анализ десятков и сотен проб в течение рабочего дня. В таком формате анализа определенные преимущества перед флуоресцентными и масс-селективными сенсорами имеют электрохимические принципы регистрации сигнала. Электрохимические ДНК-сенсоры более простые в аппаратном оформлении, они менее чувствительны к компонентному составу матрицы, имеют более удобный интерфейс управления основными операционными параметрами. А относительно мягкие требования по интервалу определяемых концентраций и пределам обнаружения низкомолекулярных соединений нивелируют различия в чувствительности электрохимических и упомянутых выше принципов измерения сигнала.

В последнее время появились обзорные работы, обобщающие опыт по использованию электрохимических ДНК-сенсоров для определения низкомолекулярных соединений — лекарственных препаратов [17, 18] и

ионов металлов [19]. Однако их недостаточно для понимания того, как механизмы взаимодействия ДНК с соответствующими компонентами реализуются в тех или иных электрохимических приложениях, как реализовать преимущества электроанализа в качестве удобного инструментария, обеспечивающего не только понимание природы интермедиатов, но и в определенной степени механизма их образования. В данном обзоре рассмотрены электроаналитические аспекты генерирования сигнала ДНК-сенсоров и определения с их помощью низкомолекулярных соединений.

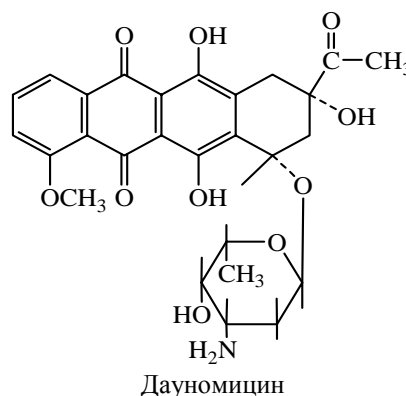
Определение лекарственных препаратов

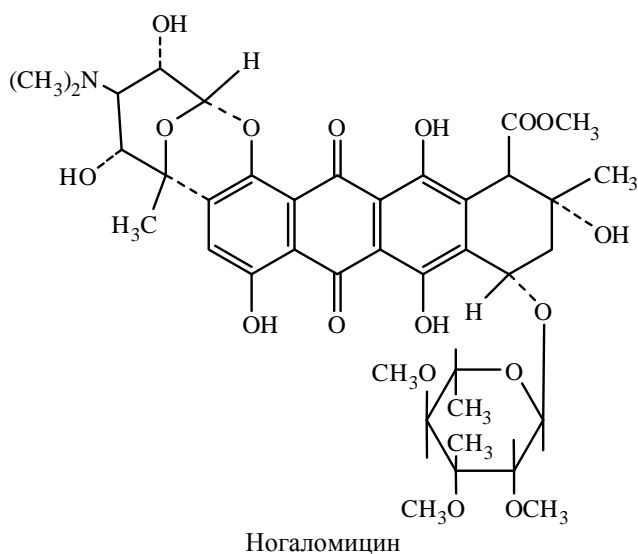
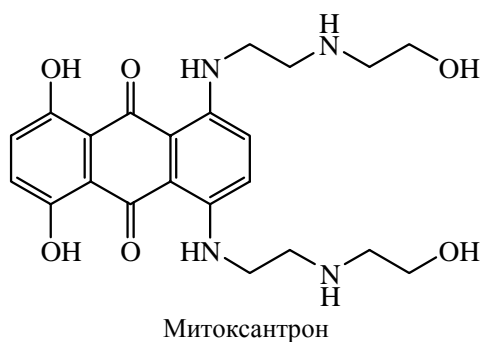
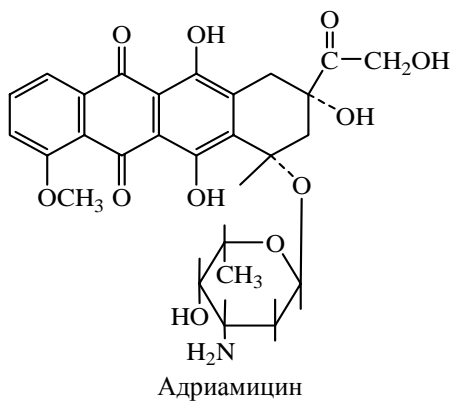
Как отмечалось выше, ДНК являются основной биологической мишенью для широкой группы лекарственных препаратов, прежде всего противоопухолевого действия. По химической природе препараты, применяемые в современной клинической практике, можно разделить на следующие группы: комплексные соединения металлов — платины, рения, осмия, кобальта, никеля и ряда других; антрациклиновые препараты; растительные алкалоиды.

Их действие на ДНК обусловлено контролем процессов транскрипции и активности полимераз (в этом случае лекарственный препарат реагирует с белками, связывающимися с ДНК); влиянием на реакции ДНК с РНК, в том числе на образование гибридных спиралей ДНК-РНК и триплексов двунитевой ДНК и РНК; прямым взаимодействием — интеркалированием — со спиралью ДНК. В последнем случае плоская ароматическая молекула или ее фрагмент встраивается между парами комплементарных нуклеиновых оснований спирали ДНК. Поскольку интеркалирование возможно только с двунитевой ДНК, интеркаляторы являются также маркерами процесса гибридизации с участием ДНК-зонда: сигнал, обусловленный их электрохимическим окислением, меняется в зависимости от того, произошла ли гибридизация или интеркалирование или электрод покрыт только одонитевым ДНК-зондом.

Антрациклиновые препараты

Ниже приведены структуры некоторых антрациклиновых соединений, используемых в ДНК-сенсорах для регистрации гибридизации, а также определяемых по взаимодействию с ДНК.





Наиболее изучено электрохимическое поведение адриамицина (другие коммерческие названия — доксорубин, адриабластин), который наряду с бисфенантролиновым комплексом меди(II) и метиленовым синим является типичным маркером гибридационных процессов с участием ДНК, сорбированной на электроде.

Все антрациклины интеркалируют частично, по системе конденсированных колец, с образованием комплексов включения с двунитевой ДНК. Прочность связывания в реакциях с ДНК в растворе закономерно уменьшается в ряду ногамицин > 4'-оксаадриамицин > адриамицин > дауномицин (измерение со стационарным ртутным электродом). Значения констант связывания, рассчитанные по току окисления антрациклинового препарата, варьируют в интервале $(2-4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$

[20, 21]. В случае дауномицина и адриамицина взаимодействие происходит в основном по парам нуклеотидов ДНК гуанин-цитозин. В среднем одна молекула интеркалятора приходится на 3—6 комплементарных пар оснований в зависимости от нуклеотидного состава ДНК-зонда. Митоксантрон дает еще более плотную упаковку комплекса — одна молекула интеркалятора на 3 пары нуклеотидов [22].

На циклических вольтамперограммах дауномицина, окисляемого на стеклоуглеродном электроде, имеются две сопряженные пары пиков при потенциалах 535...260 и -650...-710 мВ (нас.к.э.) [23]. Адриамицину в аналогичных условиях соответствуют пары обратимых пиков в области потенциалов -600...-800 и 300...800 мВ [24, 25]. Как показало сравнение вольтамперограмм деаэрированного и насыщенного кислородом растворов этих соединений, пики в катодной области потенциалов относятся к каталитическому восстановлению молекулярного кислорода. Анодные процессы связаны предположительно с окислением гидроксильных групп в конденсированных ароматических кольцах. рН-зависимость потенциалов пика свидетельствует об эквивалентном переносе двух электронов и двух ионов водорода. Близкое поведение демонстрируют митоксантрон: три пика окисления в области потенциалов 0,3...0,8 В в режиме квадратно-волновой вольтамперометрии [26], а также ногамицин: анодно-катодный пик кислорода при -0,520 В и пики окисления самого ногамицина при менее отрицательных потенциалах (стационарный ртутный электрод, рН = 7,0 [20]).

При добавлении в анализируемый раствор ДНК пики антрациклиновых препаратов уменьшаются, что свидетельствует об интеркалировании антрациклинов и образовании электрохимически малоактивного аддукта с ДНК. На угольно-пастовом электроде дауномицин окисляется при 0,50 В, тогда как в комплексе с нативной ДНК — при 0,56 В. При введении ДНК в раствор дауномицина оба пика наблюдаются совместно, при этом пик гуанина, не связанного в комплекс с препаратом, прогрессирующе снижается, а высота пика аддукта — увеличивается. При иммобилизации ДНК на электроде обнаруживается только пик окисления аддукта [27]. Изменения электрохимического поведения антрациклинов наблюдаются при введении в раствор или нанесении на поверхность электрода двунитевой нативной ДНК. Если использовать одонитевую ДНК, получаемую путем термической денатурации, соответствующие пики меняются незначительно.

Следует отметить, что сорбция антрациклинов на электроде, как и их удерживание в аддукте с ДНК, адсорбированной на угольно-пастовом или ртутном электроде, настолько сильна, что позволяет проводить электрохимические измерения в два этапа. Сначала производится накопление препарата в условиях поляризации электрода, затем сенсор переносится в другой раствор и регистрируется окисление накопленного аддукта. Такой прием позволяет повысить эффективность сорбции за счет электростатического накопления и оптимизировать

по pH измерение сигнала. Как правило, пики антрациклинов лучше выражены при измерении в слабокислых растворах. Накопление проводят в условиях катодной поляризации при $-0,4...-0,7$ В. В этой области потенциалов генерируются активные формы кислорода, преимущественно анион-радикалы. Они окисляют гуанин с образованием 8-оксогуанина, регистрируемого по пику окисления при потенциалах менее положительных, чем потенциал окисления гуанина [24]. То же соединение (оксогуанин) является маркером окислительного повреждения ДНК в живых организмах. Появление сопряженных пиков окисления гуанина (8-оксогуанина) наряду с пиками окисления дауномицина или адриамицина свидетельствует о взаимодействии двунитевой ДНК с антрациклином, причем восстановленная форма антрациклинового препарата прочнее связывается с двунитевой ДНК, чем окисленная. Соотношение констант устойчивости соответствующих комплексов можно получить, исходя из разности стандартных окислительно-восстановительных потенциалов соответствующих форм антрациклина в присутствии ДНК [20].

Электрохимическое окисление антрациклиновых препаратов происходит при высоких перенапряжениях. Это связано со стерическими ограничениями переноса электрона, обусловленными присутствием остатков сахаридов вблизи окисляющегося фрагмента молекулы. Кроме того, значительны сопутствующие емкостные и сорбционные токи, особенно при измерении на электродах, покрытых ДНК. Поэтому для регистрации аналитического сигнала используют наиболее чувствительные варианты вольтамперометрии — дифференциальный импульсный и квадратноволновой методы, а также инверсионную гальваностатическую хронопотенциометрию. В последнем случае электрод поляризуют под действием постоянного тока в микроамперном интервале значений и регистрируют изменение электродного потенциала E во времени t . Электродным реакциям соответствуют симметричные пики на хронопотенциограммах $E - (dt/dE)$. Площадь, занимаемая этими пиками, пропорциональна концентрации деполяризатора [28].

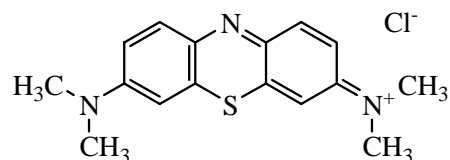
Исключение составляет электрохимическое поведение митоксантрона, сигнал которого синергически усиливается совместно с сигналом однонитевой (денатурированной) ДНК. Предложен протокол измерения, включающий нанесение на электрод комплекса ДНК-митоксантрон, его высушивание и последующее измерение сигнала при помещении электрода в рабочий буферный раствор. При этом помимо пика тока окисления митоксантрона на дифференциальных вольтамперограммах появляются пики, отнесенные к гуаниновым либо адениновым фрагментам ДНК. С двунитевой ДНК митоксантрон не взаимодействует. Если измерения проводить в растворе, содержащем препарат и однонитевую ДНК, без промежуточного высушивания электрода, на вольтамперограммах появляются оба пика окисления гуанина и аденина, возможно, за счет образования триплексов ДНК (что реализуется аналогично взаимодействию ДНК и РНК). В случае малых концентраций

митоксантрона, до 0,2 мМ, высота пиков нуклеотидов ДНК снижается, а затем увеличивается вплоть до концентрации препарата 0,4 мМ [26]. Сигналы окисления нуклеотидов появляются и исчезают в течение достаточно длительного периода времени — от 17 ч до 3 сут, что, возможно, связано с медленно протекающими реакциями окислительной дегградации ДНК.

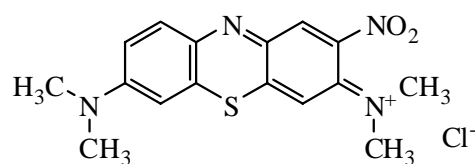
Сложность регистрации сигнала антрациклинов и его изменчивость во времени затрудняют использование ДНК для количественного определения этих препаратов. Литературные источники дают лишь оценки интервала определяемых концентраций, а именно $n \cdot (10^{-5} - 10^{-6})$ М. Также трудно сказать что-либо о селективности процесса. Дополнительную информацию о составе объектов контроля мог бы дать совместный анализ высот пиков окисления антрациклинов, гуанина, аденина и продуктов их окисления. Вместе с тем следует иметь в виду, что проявление окислительного действия компонентов раствора (например, кислорода), как и сигнал ДНК, существенно зависит от условий измерения сигнала: pH, времени контакта, условий вольтамперометрического или хронопотенциометрического эксперимента.

Фенотиазины

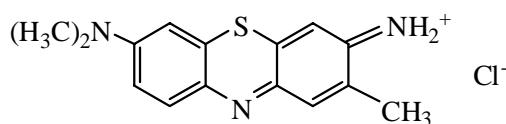
К данной группе лекарственных препаратов относятся вещества, обладающие бактерицидным и фотосенсибилизирующим действием (тиазиновые красители метиленовый синий, метиленовый зеленый, толуидиновый синий), нейролептики промазин и его аналоги, применяемые для снятия агрессивных состояний у человека и животных, а также для лечения шизофрении и других психических расстройств.



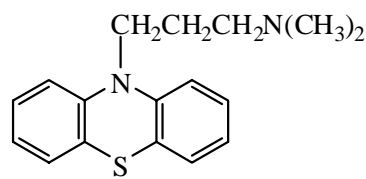
Метиленовый синий



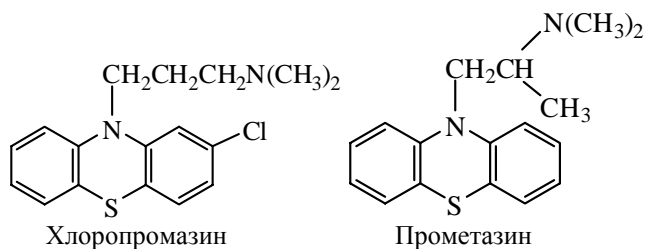
Метиленовый зеленый



Толуидиновый синий



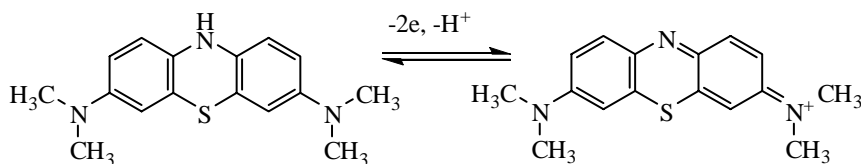
Промазин



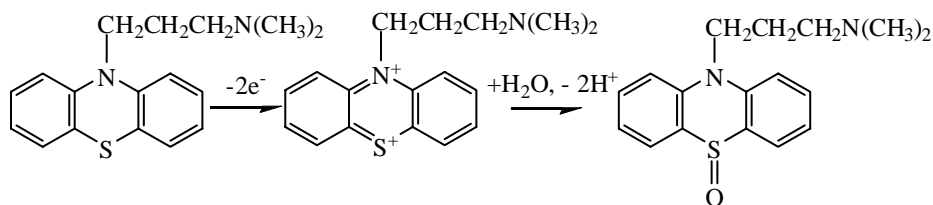
Все фенотиазины участвуют в обратимых электрохимических реакциях, сопряженных с процессами переноса иона водорода и с другими необратимыми стадиями более глубокого окисления. Тиазиновые красители более устойчивы в окисленной форме, промазины — в восстановленной форме. Часть фенотиазиновых препаратов поставляется в виде двойных солей с ионами двухвалентных металлов.

При взаимодействии с нативной ДНК фенотиазинный фрагмент молекулы включается в состав нуклеиновой кислоты, но может реагировать и с однонитевой ДНК по аминогруппам нуклеиновых оснований [29—33]. В отличие от дауномицина и его аналогов, взаимодействие фенотиазинов с ДНК не полностью экранирует электрохимически активный центр молекулы этих соединений, который сохраняет способность к переносу электрона. Кроме того, фенотиазины, в отличие от дауномицина, благодаря большей гидрофобности могут встраиваться в самоорганизованные слои ДНК, формируемые на золотых электродах посредством связей Au—S [34].

Фенотиазиновые красители в водной среде окисляются на электроде с переносом двух электронов и одного протона и образованием хиноидной структуры:



Для производных промазина предполагается, что в электродной реакции участвует мостиковый атом серы с конечным образованием сульфоксида [31]:



Наиболее изучено электрохимическое поведение метиленового синего, маркера гибридизационных процессов [34—37]. Его сопряженные пики окисления-восстановления на стеклоуглеродном электроде в кислой среде симметричны. В случае протекания электродной реакции в нейтральной или слабощелочной среде катодный пик меньше по величине и более устой-

чив по потенциалу, чем анодный пик, который носит ярко выраженный сорбционный характер. Взаимодействие метиленового синего с ДНК в растворе приводит к некоторому снижению сигнала его окисления-восстановления и смещению потенциала пика окисления на 10—15 мВ в область более положительных значений [51]. Если краситель реагирует с ДНК, иммобилизованной на поверхности электрода, то сигнал снижается в силу интеркалирования метиленового синего в спираль нуклеиновой кислоты.

Количественная оценка ассоциации метиленового синего с одно- и двунитевой ДНК, проведенная по результатам кулонометрических и вольтамперметрических измерений, показывает, что прочность связывания маркера с однонитевой ДНК примерно в два раза ниже, чем с двунитевой. Одна молекула метиленового синего приходится в среднем на шесть пар нуклеиновых оснований [30, 34]. Небольшое различие в аффинности метиленового синего по отношению к одно- и двунитевой ДНК объясняется тем, что помимо интеркалирования по парам гуанин-цитозин метиленовый синий способен электростатически взаимодействовать с участками ДНК, богатыми адениновыми фрагментами, располагаясь на поверхности спирали ДНК [39]. В этом случае образуется достаточно лабильный комплекс, сохраняющий электрохимическую активность.

С аналитической точки зрения имеет значение модификация электрода однонитевой ДНК, приводящая к увеличению регистрируемых токов окисления/восстановления маркера на 30—60% (стеклоуглеродный и печатный графитовый электроды) по сравнению с процессами на немодифицированном электроде.

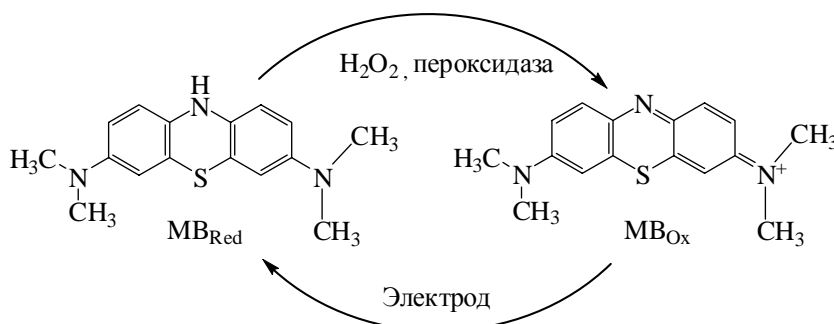
Сродство к ДНК метиленового синего сохраняет его полимерная форма, образующаяся в результате электрополимеризации, осуществляемой при многократном циклировании потенциала электрода в слабощелочном растворе мономера [40]. Чувствительность к ДНК выражается в изменении стационарного потенциала электрода, покрытого поли-

метиленовым синим, при введении в раствор нативной ДНК. Для более точной регистрации сигнала предложен титриметрический способ, в котором определяют скачок потенциала при титровании полиметиленового синего гидрохиноном. Величина скачка пропорциональна концентрации ДНК в интервале 0,075—2,5 мкг/мл. Добавление к нативной ДНК антрациклиновых препаратов, конкурентно связывающихся с биополимером, уменьшает сдвиг потенциала при титровании. Метод позволяет определять 5,0—30 мкг/л доксорубина при продолжительности контакта антрациклина и ДНК 10 мин. Увеличение продолжительности инкубирования до

30 мин существенно снижает нижнюю границу определяемого содержания доксорубина [41].

Метиленовый зеленый в комбинации с ДНК-сенсорами изучен меньше. Он не способен к интеркаливанию, однако в окисленной форме электрохимически взаимодействует с одно- и двунитевой ДНК. Чувствительность определения метиленового зеленого зависит от плотности отрицательного заряда биополимера. При измерении на планарном золотом электроде показано, что соответствующие токи и наклоны концентрационных зависимостей для этого красителя закономерно возрастают при переходе от нативной к однонитевой ДНК [42]. Включение ДНК в состав поверхностного слоя сенсора увеличивает максимальный ток окисления метиленового зеленого в 10 раз, а наклон концентрационной зависимости сигнала — в 14 раз по сравнению с результатом измерения на чистом золотом электроде.

Интересный подход к определению фенотиазинов предложен в [43]. На поверхности электрода иммобилизуют нативную ДНК и пероксидазу путем их электростатической сорбции и последующей кросс-сшивки глутаровым альдегидом [44]. ДНК играет роль специфического сорбента, увеличивая поверхностную концентрацию фенотиазина, а пероксидаза катализирует его окисление пероксидом водорода:



Скорость пероксидазной реакции определяют по току восстановления окисленной формы маркера MB_{Ox}. При этом на электроде регенерируется восстановленная форма MB_{Red}, которая, обладая высоким сродством к ДНК, вновь вовлекается в каталитический цикл. В результате достигается высокая чувствительность ДНК-пероксидазного сенсора к фенотиазиновым красителям — субстратам пероксидазы. ДНК-пероксидазный сенсор позволяет определять 0,02—23 мкМ метиленового синего ($C_{\text{мин}}=0,01$ мкМ) и 3—120 мкМ метиленового зеленого ($C_{\text{мин}}=0,01$ мкМ). Для сравнения: в тех же условиях пероксидазный сенсор, не содержащий в своем составе ДНК, определяет 0,08—10 мкМ метиленового синего, предел обнаружения 0,04 мкМ.

Промазин и его аналоги сохраняют способность к окислению после интеркалирования и включения в комплекс с двунитевой ДНК. В режиме инверсионной гальваностатической хронопотенциометрии на угольно-пастовых и толстополеночных планарных графитовых электродах они дают пики окисления в области 600—

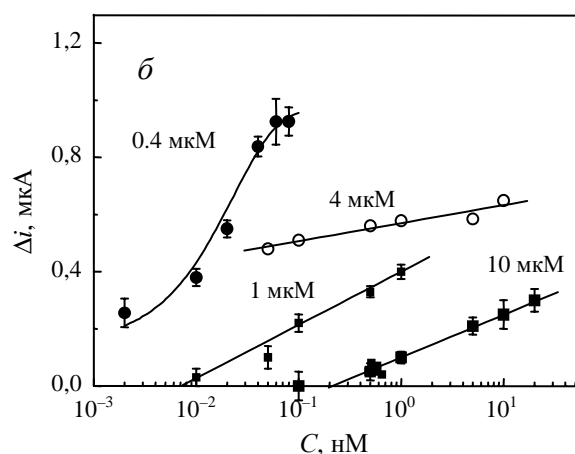
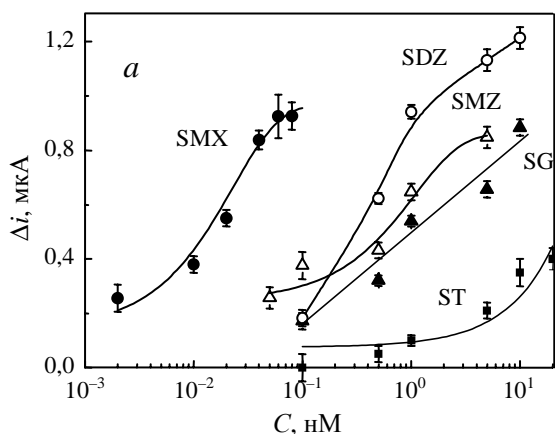
900 мВ (отн. Ag/AgCl). Для сравнения: пик гуанина, постепенно увеличивающийся при контакте электрода с фенотиазинами, регистрируется при 1100 мВ. В присутствии нативной ДНК токи фенотиазинов возрастают. Пределы обнаружения: 5 нМ прометазина, 7 нМ хлоропромазина, 12 нМ незамещенного фенотиазина [45]. Несколько ниже чувствительность определения прометазина и хлоропромазина на золотых электродах, содержащих ДНК, которая ковалентно связана с наночастицами золота, удерживаемыми на электроде цистаминовыми мостиками. Нанесение наночастиц золота позволяет увеличить рабочую поверхность электрода по сравнению с чистым золотым электродом той же геометрической поверхности, но не интервал определяемых концентраций фенотиазинов, сигнал которых увеличивается в присутствии ДНК. Ток пика окисления пропорционален концентрации хлоропромазина в интервале $1,0 \cdot 10^{-5}$ — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М, прометазина — в интервале $2 \cdot 10^{-5}$ — $1,6 \cdot 10^{-4}$ М [46].

Попытки применения пероксидазы для повышения чувствительности определения промазина в комплексе с ДНК оказались неудачными, поскольку промазин как субстрат пероксидазы малоактивен [47]. Поэтому для его определения с помощью ДНК-пероксидазного сенсора предложено вводить в раствор метиленовый синий

в качестве дополнительного медиатора электронного переноса. Сигналом служит ток восстановления окисленной формы медиатора, пропорциональный концентрации промазина в интервале $5 \cdot 10^{-5}$ — $3 \cdot 10^{-4}$ М, если на поверхности электрода находится двунитевая ДНК, и $2 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ М в присутствии денатурированной ДНК.

Сульфаниламиды

В отличие от антрациклинов и фенотиазинов данная группа лекарств специфически с ДНК не связывается. Тем не менее по данным энталийметрических измерений сульфаниламиды взаимодействуют с нативной ДНК предположительно по малым бороздкам спирали, влияя тем самым на температуру плавления и тепловой эффект термической денатурации ДНК. Это позволило предложить косвенные способы определения сульфаниламидов, основанные на конкурентных взаимодействиях электрохимически активных маркеров и сульфаниламидов с компонентами поверхностного слоя ДНК-пероксидазного сенсора. Если сульфаниламиды вытесняют фенотиазиновые маркеры с поверхности ДНК, скорость их ферментативного окисления снижается. Если вытеснение происходит из спирали ДНК (переход маркера из интеркалированного в свободное состояние), скорость реакции увеличивается. Соответственно этому меняется ток, характеризующий скорость пероксидазной реакции. Поэтому сигнал такого сенсора меняется разнонаправленно, в зависимости от природы маркера и условий измерения.



Концентрационная зависимость выходного сигнала ДНК-пероксидазного сенсора при определении сульфаниамидов с использованием маркера:

a — влияние природы сульфаниамида на сигнал маркера (0,4 мкМ метиленовый синий); *b* — влияние концентрации маркера (0,4—10 мкМ) на сигнал при определении сульфаметоксазола. SMX — сульфаметоксазол, SDZ — сульфадиазин, SMZ — сульфаметазин, SG — сульфатуанидин, ST — сульфатиазол

Если в качестве маркера использовать метиленовый синий в области его малых концентраций (0,4 мкМ), присутствие сульфаниамидов приводит к прогрессирующему снижению сигнала [43, 48]. Ток маркера, регистрируемый методом квадратно-волновой вольтамперометрии, зависит от концентрации сульфаниамидов в достаточно широком интервале их концентраций (см. рисунок). Увеличение концентрации маркера снижает чувствительность определения сульфаниамидов, что характерно для конкурентных методов кинетического анализа.

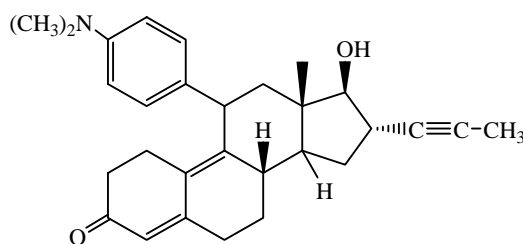
Увеличение продолжительности контакта ДНК-пероксидазного сенсора с сульфаниамидами с 10 до 30 мин вызывает инверсию влияния сульфаниамидов: вместо ингибирования ферментативной реакции наблюдается рост сигнала сенсора за счет медленного вытеснения из ДНК интеркалированной формы маркера. Предложенный способ позволяет определять 0,01—0,1 нМ сульфаметоксазола, 0,4—20 нМ сульфатиазола, 0,1—10 нМ сульфадиазина, 0,15—15 нМ сульфаметазина и 0,1—10 нМ сульфатуанидина. Селективность определения в силу неспецифического связывания сульфаниамидов с ДНК невелика. Можно говорить лишь о суммарном определении препаратов при их совместном присутствии.

Метиленовый зеленый связывается с ДНК значительно слабее метиленового синего. Соответственно, его использование в качестве маркера ДНК-пероксидазного сенсора позволяет определять значительно большие концентрации препаратов: 0,5—5,0 мкМ сульфаметоксазола, 0,5—6,0 мкМ сульфатиазола, 4—20 мкМ сульфадиазина, 1,1—20 мкМ сульфатуанидина.

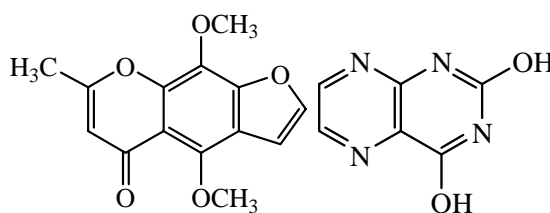
Другие фармацевтические препараты

ДНК-сенсоры использовали для определения лекарственных препаратов, в молекулах которых присутст-

вуют конденсированные ароматические, а также другие планарные фрагменты, облегчающие интеркалирование их в молекулу ДНК.

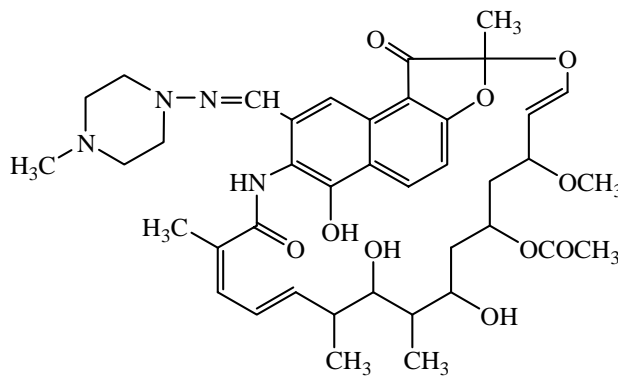


Мифепристон

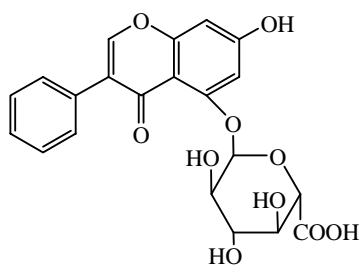


Келлин

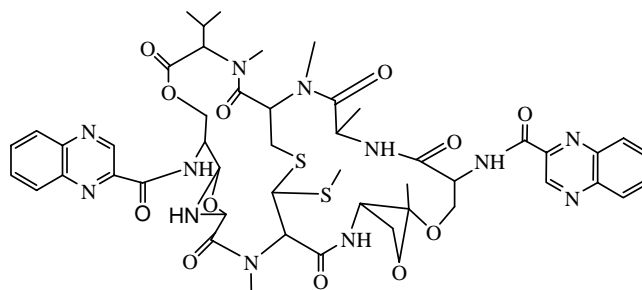
Люмазин



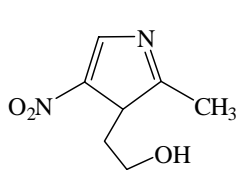
Рифампицин



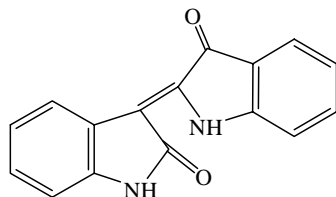
Байкалин



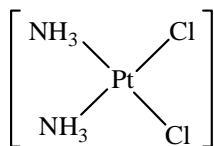
Митомицин С



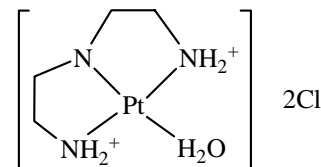
Метронидазол



Индирубин



Цисплатин



Хлордиэтилтриаминоплатина(II)

Влияние ДНК на электрохимические характеристики указанных препаратов в целом подобно наблюдаемому при изучении антрациклиновых препаратов. На электроде ДНК-сенсора происходит сорбционное накопление определяемого соединения, что приводит к изменению характеристических сигналов нуклеотидов ДНК. Обычно практикуется сорбционное накопление препаратов в бестоковом режиме или при постоянной поляризации электрода с иммобилизованной ДНК. Затем биосенсор переносят в другую среду, более благоприятную для измерения сигнала. Относительное изменение сигнала зависит как от прочности связывания ДНК с определяемым соединением, так и от вторичных реакций ДНК с интеркалированными препаратами. В зависимости от задачи исследования количественные оценки проводят по пикам окисления ДНК и по собственным пикам окисления лекарственных веществ.

Флавоноид байкалин, выделенный из *Scutellaria Baicalensis Georgi* и проявляющий широкий спектр биологической активности (торможение репликации ВИЧ, противораковое, антимикробное, иммуномодулирующее действие), реагирует с одно- и двухнитевой ДНК, при этом пик его окисления при 0,30 В (нас.к.э.) уменьшается [49]. Аналогично ведет себя растительный алкалоид индирубин [50], а также люмазин [51]. В присутствии ДНК происходит закономерное смещение потенциала и пика окисления препаратов, регистрируемое методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Сигнал может быть использован как для определения микромолярных количеств препаратов, так и для оценки содержания нативной ДНК в растворе или на поверхности электрода.

Угольно-пастовый электрод, модифицированный нативной ДНК, использовали для сорбционного концентрирования келлина, применяемого при лечении ряда кожных заболеваний. Пик анодного окисления келлина, регистрируемый методом дифференциальной импульс-

ной вольтамперометрии, пропорционален концентрации препарата в интервале 0,05—0,1 мкМ [52]. Такой же прием накопления на стационарном ртутном электроде, модифицированном нативной ДНК, с последующим окислением электрохимически активного препарата использовали для определения антибиотика эхиномицина [53]. Митомицин С в тех же условиях ингибирует электрохимическое окисление самой ДНК. Пик гуанина, регистрируемый методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии или инверсионной гальваностатической хронопотенциометрии, закономерно снижается в интервале концентраций препарата 0,1—5,0 мг/л [54].

С помощью ДНК-сенсора можно определять также противораковые препараты на основе комплексов платины — цисплатина и хлордиэтилтриаминоплатины(II) [55]. Образующиеся аддукты с ДНК окисляются на электроде в 80 раз медленнее, чем свободная ДНК, что выражается в уменьшении высоты пиков окисления гуанина, регистрируемых с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Метод позволяет определять субмикромолярные концентрации фармацевтических препаратов.

Мифепристон, синтетический рецептор прогестерона, взаимодействует только с двуниевой ДНК, адсорбированной на угольно-пастовом электроде. Это выражается в значительном увеличении высоты пика окисления препарата при 0,62 В (нас.к.э.) (вторая гармоника переменноточковой вольтамперограммы). Высота пика пропорциональна концентрации препарата в интервале 0,2—2,0 мкМ ($C_{\text{мин}} = 0,1$ мкМ) [56]. Таким же образом ведет себя противомаларийный препарат хлороквин, сигнал окисления которого при 0,7 В после накопления на электроде с ДНК возрастает в 10 раз. Аккумуляцию препарата проводили при pH = 4,0 (ацетатный буферный раствор), измерение сигнала — при pH = 8,0 (фосфатный буферный раствор). Интервал определяемых концентраций 0,1—10 мкМ [57].

Еще более высокая чувствительность определения достигается по отношению к рифампицину, противотуберкулезному препарату, при измерении на электродах, покрытых одно- и дунитевой ДНК. Накопление препарата приводит к снижению пиков окисления гуаниновых и адениновых оснований при 0,86 и 1,016 В, соответственно. Предел обнаружения рифампицина, рассчитанный по данному параметру, составил 10^{-18} М. Сам препарат окисляется при потенциале 0,75 В (рН = 7,4), ток пика линейно зависит от концентрации рифампицина в интервале 20—300 нМ [58]. Соотношение пиков окисления аденина, гуанина и рифампицина, как и характер их взаимного влияния, зависят от рН и различаются для нативной и денатурированной ДНК, что открывает возможности разделения влияния сходных препаратов (что, впрочем, еще не реализовано).

Метронидазол, антимикробный препарат, связывается с нативной ДНК в растворе и на поверхности стеклоуглеродного электрода. Это приводит к уменьшению соответствующих пиков его окисления/восстановления в растворе и 6—8-кратному их увеличению, если ДНК находится на поверхности электрода. Предполагаемый механизм электрохимических процессов включает последовательное ступенчатое восстановление нитрогруппы в молекуле метронидазола. Наблюдаются также пики окисления гуанинового остатка в ДНК. Ток пика, измеренный в режиме дифференциальной импульсной вольтамперометрии, пропорционален концентрации метронидазола в интервале 0,05—60 мкМ [59]. Сходное поведение обнаруживают и другие нитроароматические соединения [60, 61].

Следует отметить, что практически во всех упомянутых публикациях исследовали модельные растворы фармацевтических препаратов, а основное внимание уделялось не выбору условий их анализа, а количественным и качественным оценкам их взаимодействия с ДНК, включая электронный перенос и влияние комплексообразования на редокс-потенциалы деполяризаторов. Вероятно, вряд ли можно ожидать высокой селективности определения, поскольку многие препараты окисляются в близких областях потенциалов, а сопутствующее изменение электрохимических характеристик ДНК воспроизводится хуже и зачастую допускает лишь качественное описание. Тем не менее известны примеры успешного применения методик измерения с помощью ДНК-сенсоров для контроля лекарственных форм препаратов [58].

Определение ДНК-повреждающих факторов и антиоксидантов

Данные группы соединений, несмотря на противоположный характер их действия, целесообразно рассмотреть совместно, поскольку определение антиоксидантов основано на их способности препятствовать разрушению ДНК в присутствии сильных окислителей. При электрохимическом анализе в этих условиях наблюдается уменьшение сигналов, проявляющихся в присутствии ДНК-повреждающих факторов.

Неблагоприятное действие на ДНК химических и физических факторов может сводиться к повреждению пространственной структуры ДНК в результате нарушения комплементарности связывания пар оснований (термическая денатурация, действие сильных кислот и щелочей), к изменению структуры самих оснований ДНК (окисление, метилирование, депуринизация ДНК), а также к разрыву фосфоэфирных связей и уменьшению средней молекулярной массы ДНК [62, 63]. Поскольку речь идет о процессах *in vitro*, репарация ДНК не может влиять на результаты эксперимента, что облегчает трактовку наблюдаемых изменений сигнала биосенсоров по сравнению с аналогичными исследованиями с участием живых клеток. По той же причине малая «реальность» результатов исследования модельных систем и их распространение на живые системы требуют сопоставления результатов измерения с принятыми тестами генотоксичности. В ряде случаев такая работа уже проводится, что позволяет надеяться на внедрение в будущем в практику анализа соответствующих ДНК-сенсоров.

Существует несколько подходов к оценке повреждения действия ДНК в составе электрохимических сенсоров. Наиболее изучен метод, по которому регистрируют сигналы окисления отдельных оснований в составе ДНК (гуанина, реже аденина), а также 8-оксо-гуанина (8-оксо-7,8-дигидрогуанин) — индикатора окислительного повреждения ДНК. Исследования, проводимые с использованием антрациклинов, показали, что образование 8-оксогуанина связано не только с катодным генерированием анион-радикала кислорода, но и с согласованными взаимодействиями в аддукте ДНК-антрациклин [24]. Изменение сигнала нуклеиновых оснований, как отмечалось выше, не обязательно связано с повышением их доступности для электрохимического превращения при денатурации ДНК. Могут происходить взаимодействия с образованием комплексов, меняющие реакционную способность оснований без нарушения комплементарного связывания. Кроме того, интеркалирование в спираль ДНК увеличивает ее внутренний объем, что также вызывает изменение электрохимической активности отдельных нуклеиновых оснований. Все это приводит к тому, что сигнал ДНК-сенсора меняется разнонаправленно в зависимости от природы токсиканта, его активности, времени воздействия, способа включения ДНК в состав биосенсора.

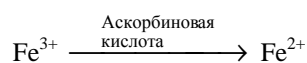
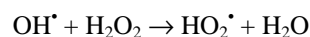
Например, при изучении токсического действия отдельных соединений в концентрациях 0,05—50 мг/л (заведомо превышающих ПДК) наблюдали изменение пика окисления гуанина одно- и дунитевой ДНК, электростатически сорбированной на печатном графитовом электроде [64, 65]. Наибольшее снижение сигнала зафиксировано при действии таких эффективных интеркаляторов, как 1,2-диаминоантрахинон, 2-нафтиламин, акридиновый оранжевый, 2-аминоантрацен. Несколько неожиданным оказалось значительное понижение сигнала гуанина в присутствии карбарила и хлорфенола, токсическое действие которых с ДНК не связано. Дауномицин, цисплатин, РСВ 105 (2,3,3',4,4'-пентахлор-

дифенил) в цитируемых работах вызывали увеличение сигнала гуанина на 30—40%, что частично противоречит другим данным, полученным при изучении действия этих веществ в значительно более низких концентрациях. Многие токсиканты, такие как афлатоксин, бисфенол А, нонилфенол и гидразин, на сигнал ДНК-сенсора влияют незначительно. Переход от двунитовой к однонитовой ДНК снижает влияние токсиканта, высота пика гуанина уменьшается в 2—3 раза.

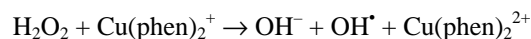
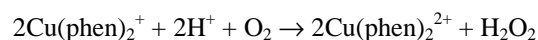
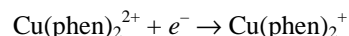
Сопоставление результатов тестирования модельных и реальных объектов (природные и сточные воды) с помощью ДНК-сенсора и тестов генотоксичности показали наличие корреляции с тестами, представляющими собой вариации теста Эймса с ревертантными штаммами бактерий, содержащих ген *lux* люциферазы (ToxAlert™ и др.). Эти бактерии способны к биолюминесценции в случае обратных мутаций, активирующих синтез необходимого фермента. Генотоксичные вещества увеличивают частоту обратных мутаций, а следовательно, и интенсивность свечения культуры клеток. В варианте этого теста используются штаммы бактерий, в которых ген *lux* закрыт белком-супрессором, освобождающим соответствующий участок ДНК при воздействии токсиканта (тест *umi*) [66]. Сопоставление данных тестирования образцов сточных вод из промышленных регионов Италии и Испании с помощью ToxAlert и ДНК-сенсора на основе печатного графитового электрода и нативной ДНК показало, что сигнал бактериального теста в целом в 1,5—2 раза выше, чем ДНК-сенсора, и снижается при обработке сточных вод (их очистке). Сигнал ДНК-сенсора при тестировании сточных вод, прошедших очистные сооружения, меняется менее регулярно, чем в случае неочищенных, грязных стоков. Сделан важный вывод о возможности использования ДНК-сенсора для контроля качества сточных вод в ходе их очистки («чище—грязнее»), поскольку относительные изменения показателей биотестов и ДНК-сенсора коррелируют [77].

Сходный подход был использован при тестировании с помощью электрохимических ДНК-сенсоров органических загрязнителей почв [67]. Модельными токсикантами служили аминокислоты антрацена, нафталина, хлорированные анилины и ряд ароматических сульфокислот. При их действии наблюдалось линейное уменьшение тока пика окисления гуанина нативной ДНК, иммобилизованной путем электростатической адсорбции на печатном графитовом электроде. По результатам эксперимента рассчитывали значение параметра EC_{50} , отвечающее концентрации токсиканта, при которой сигнал составляет 50% от его максимального значения. Для большинства проанализированных соединений величина EC_{50} находится в микро- и субмикромольном интервале концентраций. Полученные значения соответствуют в целом классу опасности токсиканта. Кроме того, исследования экстрактов почв и модельных систем выявили соответствие между показателями ДНК-сенсора и результатами флуоресцентного метода определения 2-антрамина [67].

Вторым по распространенности подходом к оценке повреждения ДНК является электрохимический контроль генерирования активных реагентов, расходуемых в реакции с ДНК. Классическим примером является реакция Фентона, в которой под действием пероксида водорода и ионов Fe^{2+} образуются гидроксильные и супероксидные радикалы. Поскольку реакция протекает в щелочной среде, ионы металла (железа) включают в комплекс с ЭДТА для повышения их гидролитической устойчивости, а для регенерации Fe^{2+} используют либо катодную реакцию [68], либо химические восстановители, например, аскорбиновую кислоту [69—71]:



Аналогично можно генерировать активные формы кислорода с участием ряда комплексов ионов переходных металлов, обладающих интеркалирующей способностью. Например, в присутствии бисфенантролинового комплекса меди(II) происходит электроокислительное расщепление ДНК, протекающее при $-0,5$ В с участием растворенного кислорода [72]:



Описано выделение продуктов расщепления ДНК методом жидкостной хроматографии [73].

Генерирование гидроксильных радикалов и других активных форм кислорода может быть осуществлено с помощью других комплексов меди(II) — бипиридилного комплекса [74], с тетразамакроциклическим лигандом [75], а также с помощью соединений марганца(II) [76], бипиридилных комплексов рутения(II) [77—80], фенантролиновых комплексов кобальта(III) [79, 81].

Интенсивность генерирования реакционноспособных форм кислорода контролируют по сигналам комплексов переходных металлов. Так, в случае комплексов меди(II) с фенантролиновыми и бипиридилными лигандами обычно наблюдается снижение регистрируемых токов, что связано с интеркалированием лигандов в спираль ДНК и влиянием этого процесса на доступность катиона металла для окисления на электроде. Напротив, в случае комплексов рутения(II) и кобальта(III) происходит закономерный рост сигнала окисления восстановленной формы комплекса, поскольку соответствующие катионы сохраняют электрохимическую активность и в интеркалированной форме. Такое поведение, несомненно, более благоприятно для измерения сигнала, связанного с повреждением ДНК, и для его интерпретации.

В рамках изучения биохимических процессов в организме человека разработаны различные схемы гене-

рации активных форм кислорода, направленные на достижение большего подобия модельных процессов реальным реакциям, протекающим в живой клетке. Так, предлагается сочетать действие кислородных окислителей с различными схемами активации генотоксического компонента подобно тому, как это происходит в организме человека. С использованием цитохрома P 450 или миоглобина моделируют реакции окислительной активации онкогенов, протекающие в печени и мышечной ткани. Например, при изучении метаболизма стирола установлено, что такая активация приводит к образованию более токсичного эпоксидного производного [79, 82]. Систему Fe(II)—H₂O₂ и Cu(II)—H₂O₂ использовали для иницирования процессов повреждения ДНК в присутствии органических производных мышьяковых кислот [83]. Малотоксичные или нетоксичные в обычных условиях эти производные промотировали разрушение ДНК гидроксильными радикалами, образование и расходование которых контролировали с помощью электрохимически активных маркеров — фенантролиновых комплексов кобальта(III) и рутения(II).

Несмотря на то, что реакции образования значительных количеств окислителей, способных повреждать ДНК, в природе могут протекать только в условиях экстремального загрязнения окружающей среды, их нельзя сбрасывать со счетов, поскольку в живых организмах эндогенный пероксид водорода является обычным компонентом, образующимся во многих метаболических процессах окисления органического вещества под действием оксидоредуктаз. Кроме того, с меньшей интенсивностью процессы генерирования радикальных частиц идут и с участием молекулярного кислорода.

Важным представляется то, что повреждения ДНК могут происходить в восстановительной среде — при катодном восстановлении молекулярного кислорода, в присутствии аскорбиновой кислоты и других восстановителей. Это относится и к некоторым антиоксидантам, которые поначалу рассматривались исключительно как противораковые профилактические средства [84]. Позднее участие производных галловой кислоты и кверцетина, обладающих антиоксидантным действием, в мутагенезе получило экспериментальное подтверждение [72, 73, 85, 86]. Взаимодействие кверцетина и ДНК изучали также электрохимическим методом по пику окисления на стеклоуглеродном электроде компонентов, находящихся в растворе. Показано, что медленное взаимодействие ДНК и кверцетина резко ускоряется в присутствии комплексов меди(II). По-видимому, происходит интеркалирование комплекса в спираль ДНК с последующим окислительным расщеплением биополимера на фрагменты [87—89]. С помощью спектроскопических исследований было показано, что в ходе реакции образуется супероксидный анион, разрушающий спираль ДНК. Это приводит к большей доступности для окисления остатков гуанина и аденина в ДНК, пики которых на вольтамперограммах возрастают во времени. Также происходит образование 8-оксогуанина, индикатора окислительного стресса, и рост пика гуанина. Если

вольтамперометрические эксперименты проводятся в бескислородной среде, нарушения ДНК не проявляются.

Помимо активных форм кислорода окислительное повреждение ДНК вызывают и другие промежуточные продукты электрохимических реакций, например, нитрозосоединения, гидроксиламины и продукты их азосочетания, образующиеся при частичном восстановлении нитроимидазолов [90, 91] и нитрофенолов [61]. Тиофен-S-оксид при катодном восстановлении в присутствии нативной ДНК в растворе образует аддукт, в котором сохраняет электрохимическую активность и в то же время провоцирует разрывы нитей ДНК [92].

Электрохимические сенсоры использовали для определения ряда других соединений, способных повреждать ДНК по другим механизмам (помимо окислительного). Так, 4,4'-дигидроксиалкон, алкилирующий реагент, при контакте с нативной ДНК вызывает значительное снижение пиков окисления гуанина и аденина. Напротив, в реакции с денатурированной ДНК в присутствии микромолярных количеств дигидроксиалкона пики окисления этих оснований увеличиваются [93]. Для определения процессов дезаминирования ДНК предложено использовать сочетание метиленового синего и ферроцианид-иона. Последний выступает медиатором электронного переноса между интеркалированным в ДНК метиленовым синим и электродом. Ток восстановления регистрируют методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Если нуклеотидная последовательность содержит вместо цитозина продукт его дезаминирования — урацил, электрокаталитический отклик снижается [94].

Электрохимические ДНК-сенсоры позволяют также регистрировать повреждения ДНК, обусловленные физическими факторами. Так, термическая денатурация ДНК под действием электрического тока меняет эффективность окислителей, генерируемых в системе Cu(II)—аскорбиновая кислота—растворенный кислород. В качестве маркера может служить фенантролиновый комплекс меди(II), сигнал которого закономерно возрастает по мере увеличения продолжительности термического воздействия на электрод [95].

Сигнал повреждения ДНК достаточно показателен для того, чтобы определять также вещества, снижающие действие токсикантов. К таким веществам относятся прежде всего антиоксиданты — флавоноиды, полифенолы, некоторые витамины, которые эффективно подавляют действие пероксида водорода, супероксидного и гидроксильного радикалов, переводя их в малоактивные и неопасные формы — воду или молекулярный кислород. Как правило, количественное определение антиоксидантов протекает в две стадии — это генерирование активных форм кислорода и оценка защитного действия определяемого соединения по относительному изменению тока маркера или нуклеиновых оснований.

Так, реактив Фентона использовали для оценки антиоксидантной активности растительных экстрактов из *Peumus boldus*, *Baccharis genstelloides*, *Cymbopogon citrates*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita* и *Camellia*

sinensis с помощью печатного графитового электрода с нативной ДНК, электростатически адсорбированной на поверхности. Сигналом служит пик окисления гуанина, регистрируемый методом квадратно-волновой вольтамперометрии [96]. В этих исследованиях использовался также стандартный метод, основанный на измерении скорости захвата стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила, измеряемой фотометрически. Реактив Фентона вызывает снижение пика окисления гуанидина, присутствие которого в растворе экстракта частично нивелирует действие окислителя. По результатам тестирования с помощью ДНК-сенсора антиоксидантное действие экстрактов снижается в ряду: *Baccharis genstelloides* > *Peumus boldus* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citratus* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita*. По данным стандартного метода эти антиоксиданты составляют ряд: *Peumus boldus* > *Baccharis genstelloides* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citratus*.

Аналогичный электрод с фенантролиновым комплексом кобальта(III) в качестве маркера использовали для оценки антиоксидантной активности полисахаридов дрожжей. Окислителем служила смесь фенантролинового комплекса меди(II) или комплекса ЭДТА-Fe(II), аскорбиновой кислоты и молекулярного кислорода. Окисление ДНК приводит к снижению сигнала маркера, присутствие антиоксидантов уменьшает наклон зависимости относительного изменения тока маркера от концентрации переходного металла в окислительной смеси [97]. Метод позволяет количественно определять индивидуальные полисахариды в интервале 0,5—4,0 мг/мл при концентрации маркера 0,5 мкМ и продолжительности инкубирования 10 мин.

Природные флавоноиды определяли по их влиянию на расщепление термически денатурированной ДНК активными формами кислорода, генерированными в системе Cu(II)—H₂O₂—аскорбиновая кислота [98, 99]. Сигналом сенсора служит ток маркера — фенантролинового комплекса меди(II), закономерно снижающийся в присутствии антиоксидантов по мере увеличения продолжительности контакта с ними. В соответствии с характером влияния антиоксидантная активность препаратов снижается в ряду: рутин > кверцетин > эпигаллокатехин галлат >> катехин. Прооксидантное действие изученных препаратов, т.е. их участие в генерировании активных форм кислорода, о котором говорилось выше [87—89], в условиях эксперимента не наблюдалось. Выбор термически денатурированной ДНК связан с тем, что эта форма ДНК более чувствительна, чем нативная, к действию окислителей [95].

Для оценки антиоксидантного действия помимо переходных металлов могут использоваться электрохимически активные интеркаляторы, эффективность связывания которых с ДНК меняется при действии активных форм кислорода. Примером реализации такого подхода может служить определение глутатиона и галловой кислоты по току восстановления маркера — метиленового синего [100]. Чувствительным элементом

ДНК-сенсора является электрод ИТО (оксиды индия и олова, обладающие проводимостью в тонком слое; применяются для изготовления оптически прозрачных тонкослойных электродов на стеклянной подложке, предназначенных для спектроэлектрохимических исследований), покрытый фотосенсибилизирующим слоем оксида титана, который при УФ-облучении инициирует фотохимические реакции образования пероксидных радикалов из воды и растворенного кислорода, и нативной ДНК. Метиленовый синий в составе поверхностного слоя проявляет низкую электрохимическую активность в силу интеркалирования в спираль ДНК, но его сигнал увеличивался после УФ-облучения сенсора, причем ток восстановления маркера зависит от продолжительности облучения. Экспериментальное значение константы скорости зависит от концентрации антиоксиданта в растворе и продолжительности облучения. При фиксированной продолжительности облучения концентрацию антиоксиданта можно рассчитать по следующему кинетическому уравнению:

$$\left(\frac{1}{I_{30}} - \frac{1}{I_0}\right)^{-1} = a + b[\text{AO}]$$

где I_{30} и I_0 — токи восстановления метиленового синего для продолжительности облучения 30 и 0 мин, соответственно; a и b — эмпирические коэффициенты; [AO] — концентрация антиоксиданта.

Метод позволяет определять миллимолярные концентрации антиоксидантов. Показано, что эффективность защитного действия галловой кислоты оказалась в 16 раз выше, чем глутатиона.

В качестве маркера ДНК-сенсора при определении антиоксидантов могут применяться также гетерогенные медиаторы электронного переноса, например, ферроцен, ковалентно связанный с терминальным концом ДНК-зонда [101]. Повреждение олигонуклеотида, комплементарного зонду, активными формами кислорода, генерированными с помощью реактива Фентона, приводит к нарушениям комплементарного связывания и как следствие к снижению сигнала ферроцена, регистрируемого с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Повреждение ДНК снижают тиомочевина, изопропанол и бензоат, правда, в достаточно больших количествах (10 мМ).

Перспективы развития ДНК-сенсоров

Одна из основных проблем дальнейшего развития ДНК-сенсоров состоит в повышении информативности сигнала и его биохимической достоверности. Эта проблема может быть решена путем сочетания ДНК с другими биохимическими компонентами, участвующими в метаболических превращениях органических соединений. Речь идет о ферментах, способных в значительной степени влиять на сродство определяемых соединений к ДНК, на их ДНК-повреждающее действие, а также на устойчивость и фармакокинетику противораковых препаратов. Учитывая, что до 60% онкогенов претерпевают

изменения в живом организме, данное направление представляется весьма актуальным. Проведенные работы с использованием миоглобина и цитохрома Р 450 — свидетельство того, что процессы метаболической активации могут быть воспроизведены *in vitro* и эти процессы влияют на сигнал ДНК-сенсора.

Необходима разработка новых способов регистрации аффинных взаимодействий с участием ДНК. Заметим, что многие исследования, связанные с применением наиболее популярных маркеров, были инициированы задачами поиска способа регистрации гибридных взаимодействий. Их не адаптировали к условиям обнаружения низкомолекулярных лигандов, реакции которых с ДНК менее специфичны и более разнообразны. Между тем подбором новых маркеров, окисляющихся при меньших потенциалах, чем антрациклины или комплексы металлов, можно будет добиться улучшения операционных характеристик сигнала ДНК-сенсора и, возможно, его специфичности по отношению к отдельным соединениям. К числу потенциально перспективных способов регистрации сигнала ДНК-сенсора можно отнести применение углеродных нано-трубок, эффективно катализирующих перенос электрона с одной и двунитевой ДНК, в том числе с участием низкомолекулярных медиаторов, сорбированных на поверхностном слое или введенных в анализируемый раствор. Можно ожидать дальнейшего развития систем переноса электрона по двунитевой ДНК с участием интеркалированных медиаторов. Подобные системы могут найти применение также в сочетании с импедиметрическими и микрокондуктометрическими системами [102, 103], в том числе для создания биокомпьютера.

Еще одно направление развития ДНК-сенсоров связано с расширением спектра биологических мишеней. В подавляющем большинстве цитированных работ используется нативная ДНК из тимуса теленка или спермы лосося. Имеются отдельные публикации, в которых показано преимущество работы с плазмидной сверхспирализованной ДНК и термически денатурированной ДНК. Вместе с тем отсутствуют данные о сравнительной активности различных видов ДНК по отношению к отдельным низкомолекулярным соединениям, как и рекомендации по целенаправленному подбору биологических мишеней для решения конкретных биоаналитических задач. Развитие данного направления частично связано с использованием синтетических олигонуклеотидов, аптамеров, создаваемых методами комбинаторной химии в отношении конкретных рецепторов — белков, антибиотиков [104]. Но число публикаций по применению аптасенсоров в составе электрохимических измерительных устройств пока невелико. Частично это связано с трудностями выбора принципа детектирования, поскольку аптамеры имеют относительно небольшие размеры и не способны включать классические интеркаляторы. Тем не менее применение аптамеров, а также олигонуклеотидов с каталитическими функциями, в частности рибозимов [105, 106], могло бы разнообра-

зить процессы биохимического распознавания с реализацией в сенсорных технологиях.

Исследования авторов выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 06-03-32217).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee H.K., Lee M., Roh H.W., Lee N., Cho Y.H., Jeong J.B., Jung H.N., Yang W.S., Ryu G.H. *Curr. Appl. Phys.*, 2005, № 5, p. 433.
2. Domany E. *Comp. Phys. Commun.*, 2005, v. 169, p. 183—187.
3. Khanna V.Kh. *Biotechnol. Adv.*, 2007, v. 25, p. 111—121.
4. Mockler T.C., Chan S., Sundaresan A., Chen H., Jacobsen S.E., Ecker J.R. *Genomics*, 2005, v. 85, p. 1—15.
5. Lee T. M.-H., Hsing I.-M. *Anal. chim. acta*, 2006, v. 556, p. 26.
6. Kerman K., Kobayashi M., Tamiya E. *Measurement Sci. Technol.*, 2004, v. 15, p. R1—R11.
7. Vernon S.D., Farkas D.H., Unger E.R., Chan V., Miller D.L., Chen Y.P. *e. a. BMC Infect. Diseases*, 2003, v. 19, p. 1—12 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/12>).
8. Ihara T., Takata J., Takagi M. *Anal. chim. acta*, 1998, v. 365, p. 49.
9. Koehler J.M., Csaki A., Reichert J., Moller R., Straube W., Fritzsche W. *Sensors and Actuators B*, 2001, v. 76, p. 166.
10. Patolsky F., Katz E., Bardea E., Willner I. *Langmuir*, 1999, v. 15, p. 3703—3706.
11. Yao G., Tan W. *Anal. Biochem.*, 2004, v. 331, p. 216—223.
12. Vercoetere W., Akeson M. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, v. 6, p. 816—822.
13. Hartwig A., Mullenders L., Asmuß M., Dally H., Hartmann M., Fresenius J. *Anal. Chem.*, 1998, v. 361, p. 377—380.
14. Vo-Dinh T., Cullum B. *Ibid.*, v. 366, p. 540—551.
15. Coté G.L., Lec R.M., Pishko M.V. *IEEE Sensors J.*, 2003, v. 3, p. 251—266.
16. Zimmermann B., Hahnefeld C., Herberg F.W. *Targets*, 2002, v. 1, p. 67—73.
17. Erdem A., Ozsoz M. *Electroanalysis*, 2002, v. 14, p. 965—974.
18. Bagni G., Ozella D., Sturchino R., Mascini M. *Anal. chim. acta*, 2006, v. 568, p. 345—353.
19. Бабкина С.С., Будников Г.К. *Ж. аналит. химии*, 2006, т. 61, с. 790.
20. Ibrahim M.S. *Anal. chim. acta*, 2001, v. 443, p. 63—72.
21. Korbut O., Buckova M., Tarapcek P., Labuda J., Grundler P. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, v. 506, p. 143—148.
22. Wang S., Peng T., Yang C. *Biophys. Chem.*, 2003, v. 104, p. 239.
23. Chu X., Shen G., Jiang J., Kang T., Xiong B., Yu R. *Anal. chim. acta*, 1998, v. 373, p. 29—38.
24. Oliveira-Brett A.M., Vivan M., Fernandez I.M., Piedade J.A.P. *Talanta*, 2002, v. 56, p. 959—970.
25. Piedade J.A.P., Fernandez I.R., Oliveira-Brett A.M. *Bioelectrochemistry*, 2002, v. 56, p. 81—83.
26. Wang J., Ozsoz M., Cai X., Rivas G., Shiraishi H., Grant D.H., Chicharro M., Fernandes J., Palecek E. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1998, v. 45, p. 33—40.
27. Mascini M., Palchetti I., Marrazza G. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, v. 369, p. 15—22.
28. Yabuki S., Mizutani F. *Bioelectrochemistry*, 2004, v. 63, p. 253.
29. Wang J., Rivas G., Cai X., Shiraishi H., Farias P.A.M., Dontha N., Luo D. *Anal. chim. acta*, 1996, v. 332, p. 139—144.
30. Vanickova M., Buckova M., Labuda J. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2000, v. 45, p. 125—134.
31. Zhong J., Qi Z., Dai H., Fan C., Li G., Matsuda N. *Anal. Sci.*, 2003, v. 19, p. 653—657.
32. Yau H.C.M., Chan H.L., Yang M. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, v. 18, p. 873—879.

33. *Boon E.M., Barton J.K.* Current Opinion in Structural Biology, 2002, v. 12, p. 320—329.
34. *Kara P., Kerman K., Ozkan D., MERIC B., Erdem A., Ozkan Z., Ozsoz M.* Electrochem. Commun., 2002, v. 4, p. 705—709.
35. *Gu J., Lu X., Ju H.* Electroanalysis, 2002, v. 14, p. 949—954.
36. *Erdem A., Kerman K., MERIC B., Akarka U.S., Ozsoz M.* Anal. chim. acta, 2000, v. 422, p. 139—149.
37. *Erdem A., Kerman K., MERIC B., Ozsoz M.* Electroanalysis, 2001, v. 13, p. 219—223.
38. *Tani A., Thomson A.J., Butt J.N.* Analyst, 2001, v. 126, p. 1756.
39. *Rohs R., Sklenar H. J.* Biomolecular Structure Dynamics, 2004, v. 21, p. 699—711.
40. *Schlereth D.D., Karyakin A.A. J.* Electroanal. Chem., 1995, v. 395, p. 221—232.
41. *Evtugyn G.A., Stoikova E.E., Sadchikova E.N., Budnikov H.C.* Proc. 9th Int. Symp. Kinetics in Anal. Chem., Marrakech, Morocco, 2006, p. 36.
42. *Порфирьева А.В., Стойкова Е.Е., Евтюгин Г.А., Будников Г.К.* Уч. зап. Казан. ун-та. Естественные науки. 2006, т. 148, с. 9.
43. *Evtugyn G.A., Goldfarb O.E., Budnikov H.C., Ivanov A.N., Vinter V.G.* Sensors, 2005, v. 5, p. 364—376.
44. *Абдуллин Т.И., Винтер В.Г., Коландинская М.В., Евтюгин Г.А., Будников Г.К.* Уч. зап. Казан. ун-та. Естественные науки, 2005, т. 147, с. 90—106.
45. *Wang J., Rivas G., Cai X., Shiraishi H., Farias P.A.M., Dontha N., Luo D.* Anal. chim. acta, 1996, v. 332, p. 139—144.
46. *Zhong J., Qi Z., Dai H., Fan C., Li G., Matsuda N.* Anal. Sci., 2003, v. 19, p. 653—657.
47. *Kulys J., Krikstopaitis K., Ziemys A.* JBIC, 2000, v. 5, p. 333.
48. *Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Гольдфарб О.Э.* Научные технологии, 2004, т. 5, с. 30—37.
49. *Sun Z., Ma Z., Zhang W., Wang X., Fan C., Li G.* Anal. Bioanal. Chem., 2004, v. 379, p. 283—286.
50. *Ye B., Yuan L., Chen C., Tao J.* Electroanalysis, 2005, v. 17, p. 1523—1528.
51. *Ibrahim M.S., Shehatta I.S., Nayeli A.A. J.* Pharm. Biomed. Analysis, 2002, v. 28, p. 217—225.
52. *Radi A.* Anal. chim. acta, 1999, v. 386, p. 63—68.
53. *Jelen F., Erdem A., Palecek E.* Bioelectrochem., 2002, v. 55, p. 65.
54. *Ozkan D., Karadeniz H., Erdem A., Mascini M., Ozsoz M.* J. Pharm. Biomed. Anal., 2004, v. 35, p. 905—912.
55. *Brabec V.* Electrochimica acta, 2000, v. 45, p. 2929—2932.
56. *Gu K., Zhu J., Zhu Y., Xu J., Chen H.* Fresenius J. Anal. Chem., 2000, v. 368, p. 832—835.
57. *Radi A.* Talanta, 2005, v. 65, p. 271—275.
58. *Girousi S.T., Gherghi I.C., Karava M.K. J.* Pharm. Biomed. Anal., 2004, v. 36, p. 851—858.
59. *Jiang X., Lin X.* Bioelectrochem., 2006, v. 68, p. 206—212.
60. *Labuda J., Bucková M., Jantová S., Štěpánek I., Surugiu I. e.a.* Fresenius J. Anal. Chem., 2000, v. 367, p. 364—368.
61. *Abreu F.C., Goulart M.O.F., Oliveira Brett A.M.* Biosens. Bioelectron., 2002, v. 17, p. 913—919.
62. *Bjelland S., Seeberg E.* Mutation Research, 2003, v. 531, p. 37.
63. *Barzilai A., Yamamoto K.* DNA Repair, 2004, v. 3, p. 1109—1115.
64. *Mascini M., Palchetti I., Marrazza G.* Fresenius J. Anal. Chem., 2001, v. 369, p. 15—22.
65. *Lucarelli F., Palchetti I., Marazza G., Macini M.* Talanta, 2002, v. 56, p. 949—957.
66. *Blaise C., Ferard J.-F.* Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations, 2005, v. 2, p. 1—68.
67. *Bagni G., Hernandez S., Mascini M., Sturchio E., Boccia P., Marconi S.* Sensors, 2005, v. 5, p. 394—410.
68. *Fojta M., Kubickarova T., Palecek E.* Biosens. Bioelectron., 2000, v. 15, p. 107—115.
69. *Henle E.S., Linn S. J.* Biol. Chem., 1997, v. J272, p. 19095.
70. *Fojta M.* Electroanalysis, 2002, v. 14, p. 1449—1463.
71. *Drouin R., Rodriguez H., Gao S.W., Gebreyes Z., O'Connor T.R. e.a.* Free Radical Biol. Med., 1996, v. 21, p. 261—273.
72. *Fojta M., Havran L., Kubickarova T., Palecek E.* Bioelectrochem., 2002, v. 56, p. 25—27.
73. *Yang Z., Yu J., Chen H.* Electroanalysis, 2002, v. 14, p. 747—752.
74. *Yang Z.-S., Wang Y.-L., Zhang Y.-Z.* Electrochem. Commun., 2004, v. 6, p. 158—163.
75. *Durackova Z., Novotny L., Liptakova A., Dovinova I., Labuda J. J.* Inorg. Biochem., 1997, v. 80, p. 350.
76. *Rodriguez M., Kodadek T., Torres M., Bard A.J.* Bioconjugate Chem., 1990, v. 1, p. 123—131.
77. *Wang B., Rusling J.F.* Anal. Chem., 2003, v. 75, p. 4229—4235.
78. *Zhou L., Rusling J.F.* Ibid., 2001, v. 73, p. 4780—4786.
79. *Mugweru A., Rusling J.F.* Ibid., 2002, v. 74, p. 4044—4049.
80. *Rusling J.F.* Biosens. Bioelectron., 2004, v. 20, p. 1022—1028.
81. *Yang J., Zhang Z., Rusling J.F.* Electroanalysis, 2002, v. 14, p. 1494—1500.
82. *Zhou L., Yang J., Estavillo C., Stuart J.D., Schenkman J.B., Rusling J.F. J.* Am. Chem. Soc., 2003, v. 125, p. 1431—1436.
83. *Labuda J., Bubnicova K., Kovalova L., Vanickova M., Mattusch J., Wennrich R.* Sensors, 2005, v. 5, p. 411—423.
84. *Diculescu V.C., Paquim A.-M.C., Oliveira-Brett A.M.* Ibid., 2005, v. 5, p. 377—393.
85. *Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilbert I.* Free Rad. Biol. Med., 1998, v. 25, p. 1057—1065.
86. *Johnson M.K., Loo G.* Mut. Res. DNA Repair, 2000, v. 459, p. 211.
87. *Oliveira Brett A.M., Diculescu V.C.* Bioelectrochem., 2004, v. 64, p. 133—141.
88. *Oliveira Brett A.M., Diculescu V.C.* Ibid., 2004, v. 64, p. 143.
89. *Liu Y., Deng K., Li J., Liu S., Yao S.* Biophys. Chem., 2004, v. 112, p. 69—76.
90. *Oliveira Brett A. M., Serrano S.H.P., Gutz I., La-Scalea M.A.* Bioelectrochem. Bioenerg., 1997, v. 42, p. 175—178.
91. *La Scalea M.A., Serrano S.H.P., Ferreira E.I., Oliveira Brett A. M. J.* Pharm. Biomed. Anal., 2002, v. 29, p. 561—568.
92. *Oliveira Brett A.M., da Silva L.A., Fujii H., Mataka S., Thiemann T. J.* Electroanal. Chem., 2003, v. 549, p. 91—99.
93. *MERIC B., Kerman K., Ozkan D., Kara P., Erdem A., Kucukoglu O. e.a. J.* Pharm. Biomed. Anal., 2002, v. 30, p. 1339—1346.
94. *Ostatná V., Dolinnaya N., Andreev S., Oretskaya T., Wang J., Hianik T.* Bioelectrochem., 2005, v. 67, p. 205—210.
95. *Korbut O., Buckova M., Tarapcek P., Labuda J., Grundler P. J.* Electroanal. Chem., 2001, v. 506, p. 143—148.
96. *Mello L.D., Hernandez S., Marrazza G., Mascini M., Kubota L.T.* Biosens. Bioelectron., 2006, v. 21, p. 1374—1382.
97. *Buckova M., Labuda J., Sandula J., Krizkova L., Stepanek I., Durackova Z.* Talanta, 2002, v. 56, p. 939—947.
98. *Korbut O., Bučková M., Labuda J., Grindler P.* Sensors, 2003, v. 3, p. 1—10.
99. *Labuda J., Buckova M., Heilerova L., Silhar S., Stepanek I.* Anal. Bioanal. Chem., 2003, v. 376, p. 168—173.
100. *Liu J., Roussel C., Lagger G., Tacchini P., Girault H.H.* Anal. Chem., 2005, v. 77, p. 7687—7694.
101. *Xu C., Cai H., He P., Fang Y.* Fresenius J. Anal. Chem., 2000, v. 367, p. 593—595.
102. *Drummond T.G., Hill M.G., Burton J.K.* Nature Biotechnology, 2003, v. 21, p. 1192—1199.
103. *Khanna V.K.* Biotechnol. Adv., 2007, v. 25, p. 85—98.
104. *O'Sullivan C.K.* Anal. Bioanal. Chem., 2002, v. 372, p. 44—48.
105. *Kissinger P.T.* Biosens. Bioelectron., 2005, v. 20, p. 2512—2516.
106. *Vo-Dinh T., Cullum B.* Fresenius J. Anal. Chem., 2000, v. 366, p. 540—551.