

УДК 543.9+544.6

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ДНК-СЕНСОР НА ДОКСОРУБИЦИН НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА И АМИНИРОВАННОГО ТИАКАЛИКС[4]АРЕНА

© 2019 г. А. В. Порфирьева^{1, *}, К. С. Шibaева¹, В. Г. Евтюгин², Л. С. Якимова¹, И. И. Стойков¹, Г. А. Евтюгин¹

¹Казанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
420008 Россия, Казань, ул. Кремлевская, 18

²Казанский федеральный университет, Междисциплинарный центр аналитической микроскопии
420008 Россия, Казань, ул. Кремлевская, 18

*E-mail: porfireva-a@inbox.ru

Поступила в редакцию 27.04.2018 г.

После доработки 05.06.2018 г.

Принята к публикации 10.01.2019 г.

Разработан импедиметрический ДНК-сенсор для высокочувствительного определения доксорубицина, сигналом которого служит сопротивление переноса заряда, регистрируемое с помощью спектроскопии электрохимического импеданса на стеклоуглеродном электроде, модифицированном электрополимеризованным нейтральным красным или полианилином и полиэлектролитными комплексами с включением ДНК. Установлено влияние природы полимерного слоя и состава полиэлектролитного комплекса на чувствительность определения доксорубицина. Показана роль макроцикла, способного к экранированию отрицательного заряда ДНК и взаимодействию с катионными центрами подложки. При оптимальном составе полиэлектролитов ДНК-сенсор позволяет определять до 0.1 нМ доксорубицина.

Ключевые слова: ДНК-сенсор, биосенсор, электрополимеризация, нейтральный красный, полианилин, интеркалирование ДНК, определение доксорубицина.

DOI: 10.1134/S0044450219070090

Развитие современной электроаналитической химии создает новые возможности для высокочувствительного и селективного определения соединений, востребованных в медицинской диагностике и фармацевтике. К ним относятся метаболиты, остаточные количества загрязняющих веществ, биомаркеры заболеваний, лекарственные препараты и продукты их превращения [1]. В настоящее время большинство указанных соединений определяют, используя различные варианты хроматографии и оптической спектроскопии [2, 3]. Будучи чувствительными и селективными, универсальные методы инструментального анализа требуют для своей реализации стационарных условий химической лаборатории, трудоемкую и длительную пробоподготовку, а также высокую квалификацию обслуживающего персонала. Развитие средств персонализированной медицины, в частности, диагностического оборудования для использования вне медицинского учреждения (point-of-care – у постели больного [4]) предполагает переход от такого универсального оборудования к индивидуальным сенсорам. К таким

устройствам относят также биосенсоры, используемые для определения аналита его реакции с участием биохимических элементов распознавания (ферментов, антител, нуклеиновых кислот). Биосенсоры медицинского назначения в настоящее время чаще всего базируются на электрохимических преобразователях сигнала. К их достоинствам относят компактный дизайн, простоту управления, совместимость с большинством вариантов биохимического анализа, хорошо разработанную теорию применения и интуитивно понятную интерпретацию сигнала [5].

Развитие биосенсоров и перспективы их внедрения в медицинскую диагностику в значительной степени зависят от возможностей совершенствования принципов измерения сигнала, связанного с взаимодействием аналита и биохимического рецептора. Поиск более чувствительных преобразователей сигнала и новых стратегий регистрации биохимических взаимодействий может расширить область применения биосенсоров и улучшить их аналитические и операционные характеристики. Это в полной мере относится и к ДНК-

сенсорам. В настоящее время их используют в основном для определения комплементарных последовательностей олигонуклеотидов по реакции их гибридизации на поверхности преобразователя сигнала [6]. Сигналом о гибридизации служит изменение тока диффузионно свободного индикатора (редокс-зонда), добавляемого в раствор, или сопротивление переноса такого же зонда, рассчитываемое по результатам измерения электрохимического импеданса. Изменение сигнала редокс-зонда связано с внедрением в поверхностный слой объемных олигонуклеотидов, что снижает скорость переноса молекул зонда к электроду. В случае низкомолекулярных аналитов чувствительность такого способа регистрации может оказаться недостаточной в связи с тем, что связывание аналита в поверхностном слое не меняет его объем и проницаемость [7]. Такие проблемы могут возникнуть, например, при определении противораковых препаратов цитостатического действия, которые взаимодействуют с нативной ДНК, встраиваясь между парами нуклеиновых оснований [8]. Ранее показано, что альтернативным способом регистрации взаимодействия ДНК с такими аналитами может быть регистрация электрохимического отклика гибридных материалов, состоящих из ДНК и продуктов электрополимеризации, проявляющих редокс-активность [9–14]. Связывание аналита молекулами ДНК меняет распределение заряда в гибридном материале, что смещает редокс-равновесие полимерного компонента. Подобные ДНК-сенсоры могут включать фенотиазиновые красители (метиленовый синий и метиленовый зеленый), нейтральный красный (НК) и полианилин (ПАНИ), а их сигналом служит изменение параметров импеданса [15].

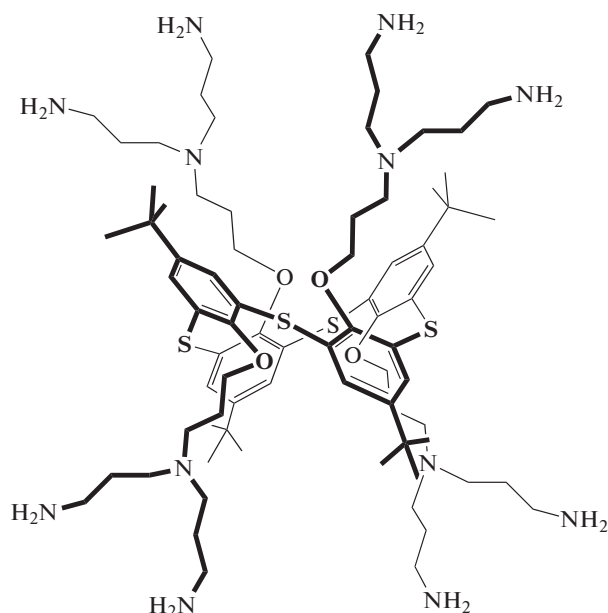
Несмотря на перспективность подобного подхода, в литературе имеются только единичные примеры его реализации применительно к цитостатикам. Так, описано определение антрациклиновых препаратов с помощью ДНК, электростатически иммобилизованной поверх монослоя НК на стеклоуглероде [14]. Измерение тока пика восстановления красителя и сопротивления переноса заряда позволяет определять до 0.05 нМ доксорубицина и даунорубицина и 0.5 нМ идарубицина [11]. Близкие значения пределов обнаружения достигнуты с помощью сенсора, включающего ПАНИ с ДНК, захваченной в растущую пленку полимера на стадии электрополимеризации [16]. Взаимодействие с антрациклином меняет электрохимическую активность ПАНИ, количественно определяемую по току пика окисления полимера. Недостатком указанного ДНК-сенсора является необходимость проведения измерения в кислой среде, обеспечивающей электрохимическую активность ПАНИ.

Полимерная форма НК (**поли-НК**) – продукт окислительной полимеризации феназинового красителя нейтрального красного. Полимеризация протекает при циклировании потенциала в широком интервале рН и приводит к образованию полимера типа “голова к хвосту”, сохраняющего способность к обратимому переносу электрона [17]. В отличие от ПАНИ и полифенотиазиновых красителей, полимеризация НК не меняет его электрохимических характеристик, совпадающих у мономерной и полимерной форм [18]. Это облегчает измерение сигнала ДНК-сенсора на основе поли-НК. Ранее его успешно применяли для создания аптасенсоров на микотоксины и белки [14, 15, 19]. Вместе с тем, поли-НК еще не использовали для получения полиэлектролитных комплексов с включением нативной ДНК.

В этой связи представляет интерес сравнить поведение ДНК-сенсоров на основе полиэлектролитных комплексов, формируемых на основе ПАНИ и поли-НК, при определении антрациклиновых препаратов цитостатического действия. В данной работе представлены результаты определения доксорубицина, интеркалятора ДНК, с помощью сенсоров, получаемых путем электростатической самосборки синтетических полиэлектролитов и нативной ДНК из молок лосося на стеклоуглеродном электроде, модифицированном указанными полимерами. Для повышения чувствительности регистрации интеркалирующего действия доксорубицина предложено использовать полиаминированный тиакаликс[4]арен, образующий молекулярные комплексы с ДНК и частично экранирующий отрицательный заряд фосфатных групп остова ДНК. Ранее аналогичные взаимодействия с участием полифункциональных разветвленных азотсодержащих производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена использовали как эффективные реагенты для компактизации ДНК [20].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали НК ($N^8, N^8, 3$ -триметилфеназин-2,8-диамин хлорид), поли(стиролсульфонат натрия) (ПСС, средняя молекулярная масса 1000000 Да), поли(аллиламин гидрохлорид) (ПАА, средняя молекулярная масса 65000 Да), ДНК из молок лосося (Sigma-Aldrich). Октаминотиакаликс[4]арен (ТК) в конфигурации *1,3-альтернат* (схема) синтезирован на кафедре органической химии Казанского федерального университета по методике [21]. Его структура подтверждена методами ИК-, 1H ЯМР-спектроскопии и данными элементного анализа.



Структура октааминотиакаликс[4]арена в конфигурации *1,3-альтернат*.

Все остальные реагенты были категории “ч. д. а.” и “analytical grade”. Рабочие растворы готовили на деионизированной воде Millipore®. Для получения ПАНИ использовали свежеперегнанный анилин. Другие реактивы дополнительно не очищали. Растворы для проведения электрохимических измерений готовили на деионизированной воде Millipore®.

Для вольтамперометрических измерений использовали потенциостат-гальваностат AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm Autolab b.v., Голландия). Потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения Ag/AgCl (3.0 М KCl). Противоеlectродом служила платиновая проволока. Для измерения pH применяли цифровой иономер “Экотест-001” (ЗАО “Эконикс-Эксперт”, Москва). Импедиметрические измерения проводили в ацетатном буферном растворе с pH 4.5 с помощью модуля FRA потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N в присутствии эквимольной смеси 0.1 М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 0.1 М $K_4[Fe(CN)_6]$. Рабочий интервал частот от 100 кГц до 0.04 Гц, амплитуда напряжения 5 мВ, потенциал 0.2 В. Для расчета параметров импеданса строили диаграмму Найквиста и аппроксимировали зависимость мнимой и действительной частей импеданса в соответствии с эквивалентной ячейкой Рэндлса. Проводили не менее пяти параллельных измерений с последующим усреднением значений сопротивления переноса заряда R_{ct} и емкости (постоянно-фазового элемента) C .

Изображения получали методом атомно-силовой микроскопии на микроскопе Bruker FastScan Dimension Bio в полустатическом режиме на воз-

духе в окне 90×90 мкм со стандартными кремниевыми кантилеверами.

Электрополимеризация нейтрального красного. Стеклоуглеродный электрод диаметром 1.7 мм очищали механически на замше и полировали до зеркальной поверхности с помощью диоксида кремния (полировальный набор CH Instruments, № каталога CH120), после чего ополаскивали деионизированной водой, промывали ацетоном, серной кислотой, этанолом и дважды деионизированной водой. Далее электрод очищали электрохимически путем циклирования потенциала между -1.0 и 1.0 В при скорости сканирования потенциала 100 мВ/с. Электрод переносили в 0.025 М фосфатный буферный раствор с pH 7.0, содержащий 0.1 М $NaNO_3$ и 0.4 мМ НК, и многократно сканировали потенциал в интервале от -0.8 до 0.8 В при скорости сканирования потенциала 50 мВ/с. Процесс сканирования заканчивали при потенциале 0.8 В (всего 19.5 циклов сканирования). Процесс полимеризации контролировали по характерным изменениям пиков на вольтамперограмме. Далее электрод переносили в рабочий буферный раствор, не содержащий мономера, и регистрировали 10 циклов сканирования потенциала для удаления из полимерной пленки не связавшихся частиц красителя.

Электрополимеризация анилина. Стеклоуглеродный электрод очищали, как описано выше, и переносили в 0.5 М раствор щавелевой кислоты, содержащий 0.07 М анилин. Полимеризацию проводили в режиме многократного циклирования потенциала в интервале от -0.3 до 1.0 В (20 циклов) при скорости сканирования потенциала 50 мВ/с.

Получение полиэлектролитных комплексов с участием ДНК и октааминотиакаликс[4]арена. Электрод с нанесенным слоем поли-НК или ПАНИ ополаскивали водой и подсушивали на воздухе, после чего закрепляли в штативе рабочей частью вверх. На него наносили аликвоты растворов полиэлектролитов (2 мкл 0.09%-ного раствора ПСС или ПАА, 3 мкл 5.0 мМ раствора ТК и 2 мкл раствора ДНК с концентрацией 1 мг/мл). После нанесения каждого раствора электрод инкубировали, закрывая его поверхность пластиковой пробиркой для защиты от преждевременного высыхания, затем электрод промывали деионизированной водой, подсушивали и повторяли процедуру нанесения электролита противоположного заряда.

Определение содержания доксорубина. ДНК-сенсор инкубировали в 0.1 мМ–0.01 нМ растворе доксорубина в ацетатном буферном растворе с pH 4.5, и измеряли электрохимический импеданс. Сигналом служило сопротивление переноса заряда, измеряемое в присутствии феррицианид-ионов. Предел обнаружения определяли, исходя

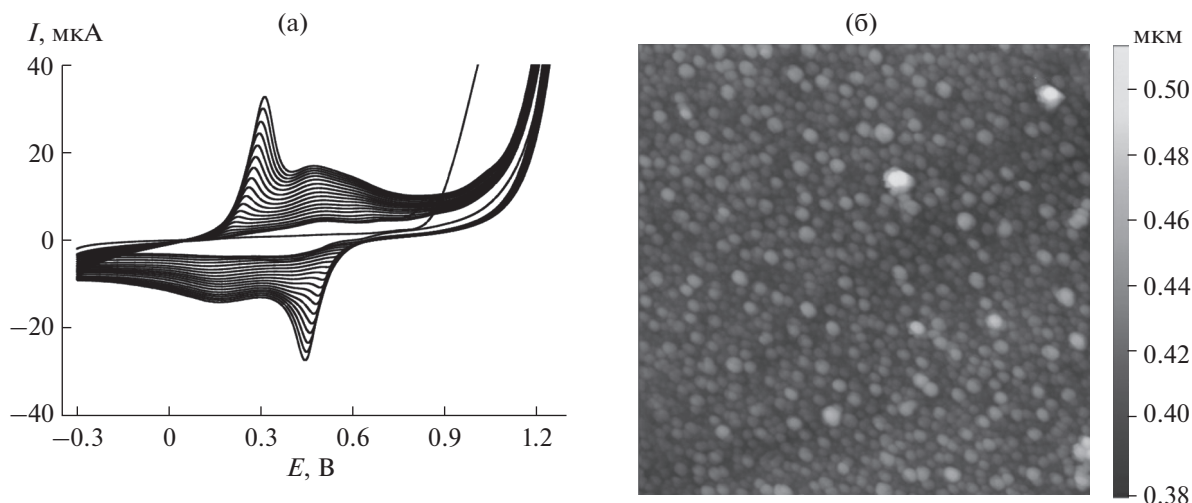


Рис. 1. (а) – Циклические вольтамперограммы, полученные на стеклоуглеродном электроде в 0.07 М растворе анилина в 0.5 М щавелевой кислоте, скорость сканирования 50 мВ/с. (б) – Морфология поверхности полианилина в указанных условиях при 10 циклах сканирования потенциала (по данным атомно-силовой микроскопии).

из соотношения $S/N = 3$. Градуировочную зависимость строили в полулогарифмических координатах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нанесение электрополимеризованных слоев.

Попытки сформировать полиэлектролитные комплексы непосредственно на поверхности стеклоуглеродного электрода показали их неустойчивость и быстрое разрушение при последующих измерениях вольтамперометрического или импедиметрического сигнала. Возможно, это связано с недостаточностью электростатических взаимодействий на поверхности стеклоуглерода, содержащей небольшое число ионизированных и полярных групп. В связи с этим было принято решение сначала формировать на поверхности полимерную пленку, сочетающую электрохимическую активность для переноса электрона и собственный положительный заряд для удерживания полиэлектролитов противоположного знака. В качестве такой подложки апробировали два материала – ПАНИ и поли-НК. Их выбор обусловлен тем, что они проявляют собственную электрохимическую активность и могут быть синтезированы при различных рН, что позволяет оценить влияние экспериментальных условий на функционирование полиэлектролитных комплексов.

На рис. 1 представлены циклические вольтамперограммы (ЦВА), полученные в растворе анилина в щавелевой кислоте, и морфология поверхности образующейся пленки по данным атомно-силовой микроскопии. Полимеризации анилина отвечают регулярно увеличивающиеся пики на ЦВА в области потенциалов 0.10–0.70 В, отвеча-

ющие взаимным переходам различных редокс-форм полимера (лейко-эмералдин, эмералдин, анилиновый черный). При высоких потенциалах на первом цикле образуется необратимый пик образования катион-радикала анилина, инициирующий полимеризацию. Его высота на последующих циклах быстро снижается из-за покрытия поверхности электрода олигомерами анилина. В отличие от аналогичных покрытий, полученных из серной кислоты, ПАНИ с оксалат-ионами в качестве противоионов демонстрирует высокую шероховатость поверхности, способствующую сборке полиэлектролитных комплексов. Полимер образует равномерно распределенные по поверхности гранулы размером около 80 нм. Контроль сопротивления переноса заряда и токов окисления-восстановления пары лейко-эмералдин/эмералдин (солевая форма) показал, что при использовании в качестве среды щавелевой кислоты полимер сохраняет электрохимическую активность вплоть до рН 5.0. Этим он выгодно отличается от ПАНИ, традиционно получаемого из серной кислоты, где наибольшее значение рН, отвечающее существованию полуокисленной (активной) формы эмералдин сульфата, обычно не превышает 3. Такое поведение расширяет возможности применения полианилинового покрытия для контроля биохимически значимых процессов, обычно протекающих при рН 5–7.

Поли-НК получали аналогичным образом (рис. 2). Как следует из ЦВА (рис. 2а), увеличение числа циклов сканирования потенциала приводит к уширению и увеличению высоты пиков в области потенциалов $-0.7...-0.2$ В, однако накопление электрохимически активных продуктов протекает медленнее, чем в случае ПАНИ. Ини-

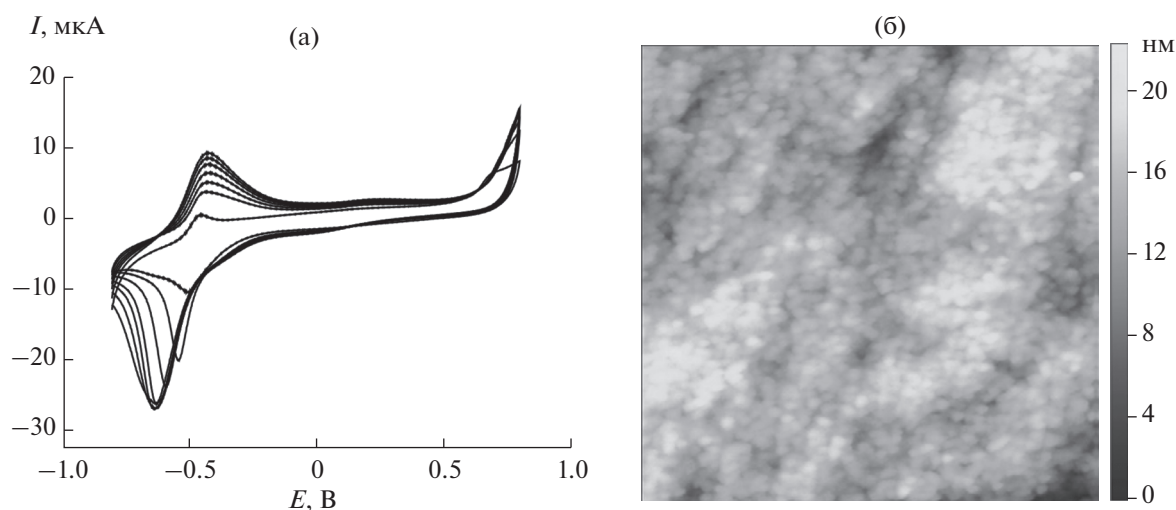


Рис. 2. (а) — Циклические вольтамперограммы, полученные на стеклоуглеродном электроде в 0.04 мМ растворе нейтрального красного в 0.025 М фосфатном буферном растворе с рН 7.0; скорость сканирования 50 мВ/с; двадцать циклов сканирования, показаны четные циклы. (б) — Морфология поверхности полимерной формы нейтрального красного в указанных условиях при 10 циклах сканирования потенциала (по данным атомно-силовой микроскопии).

цирование полимеризации происходит за счет образования катион-радикала при потенциале более 0.7 В. По мере заполнения поверхности необратимый пик окисления при данном потенциале закономерно уменьшается. По мере увеличения числа циклов сканирования потенциала первоначальная симметрия основной пары пиков окисления—восстановления НК меняется, и начинает преобладать катодный пик при -0.65 В. Это связано с сорбционной активностью катионной (окисленной) формы поли-НК, которая превалирует в условиях эксперимента. Изображение поверхности (рис. 2б), полученное методом атомно-силовой микроскопии, характеризуется зернистостью с размерами округлых образований 7–15 нм. Меньшая шероховатость поверхности и размер зерна полимера согласуются с более низкой эффективностью накопления полимера по сравнению с ПАНИ (сравн. рис. 1б и 2б). Электрод с нанесенным слоем поли-НК сразу после электролиза демонстрирует нестабильность характеристик, что связывают с присутствием в слое захваченных молекул мономера НК, которые постепенно вытесняются в раствор. Для ускорения процесса и стабилизации состава полимерной пленки НК электрод переносили в рабочий буферный раствор и далее циклировали потенциал до стабилизации формы ЦВА. Обычно для этого было достаточно 10 циклов. Далее электрод промывали и использовали для сборки полиэлектролитных комплексов. В случае ПАНИ специальной процедуры стабилизации не требовалось. Для получения устойчивых характеристик модифицированного электрода было доста-

точно его промывания в рабочем буферном растворе.

Сборка полиэлектролитных комплексов с участием ДНК. Формирование слоев полиэлектролитов осуществляли путем их последовательного нанесения на полимерные пленки с отмывкой несвязавшихся молекул в деионизированной воде или растворе хлорида калия. Указанные условия способствуют образованию монослоев полиионов, к числу которых относится и нативная ДНК благодаря наличию на поверхности ее спирали фосфатных остатков, несущих отрицательный заряд. Атомно-силовая микроскопия не позволила надежно зафиксировать послойное осаждение полиэлектролитов, поэтому процесс сборки характеризовали с помощью спектроскопии электрохимического импеданса, используя в качестве редокс-зонда эквимольярную смесь ферри- и ферроцианидов калия $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Предварительно установлено отсутствие мешающего влияния на ЦВА феррицианид-ионов присущей пленкам электрохимической активности. Хотя для ПАНИ области электрохимической активности полимера и феррицианида частично перекрывались, пики редокс-зонда были существенно выше и не наблюдались искажение их формы по сравнению с аналогичными ЦВА, зарегистрированными на чистом стеклоуглеродном электроде.

В табл. 1 приведены значения параметров электрохимического импеданса, полученные для полиэлектролитных комплексов различного состава с использованием эквивалентной схемы Рэндлса. До нанесения полиэлектролитов сопротивление переноса заряда на поли-НК оказалось даже ниже, чем для ПАНИ, что можно объяснить

Таблица 1. Импедиметрические характеристики стеклоуглеродного электрода с электрополимеризованными покрытиями и полиэлектролитными комплексами различного состава ($n = 5$)

Состав поверхностного слоя	ПАНИ		Поли-НК	
	R_{et} , кОм	C , мкФ	R_{et} , кОм	C , мкФ
—	14 ± 1	7 ± 2	7.3 ± 0.4	7 ± 1
ПСС	29 ± 3	9 ± 2	12 ± 2	5 ± 2
ПСС + ТК	1.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1	7.0 ± 0.6	7 ± 2
ПСС + ДНК	16 ± 2	3.4 ± 0.7	11 ± 2	5 ± 1
ПСС + ТК + ДНК	1.8 ± 0.3	2.1 ± 0.4	18 ± 2	4 ± 2
ПСС + ДНК + ТК	4.7 ± 0.5	2.5 ± 0.6	14 ± 2	7 ± 2

большой толщиной пленки последнего. Введение ПСС резко увеличивает сопротивление переноса заряда из-за электростатического отталкивания одноименно заряженных феррицианид-ионов и полиэлектролита. Последующее нанесение ТК, взаимодействующего за счет наличия в молекуле аминогрупп с анионными центрами слоя, резко снижает сопротивление переноса заряда, тогда как нанесение ДНК купирует влияние макроцикла. Последнее можно связать с тем, что взаимодействие аминированного тиакаликсарена и нативной ДНК приводит к экранированию поверхностных фосфатных групп, так что параметры импеданса меняются в связи с увеличением диффузионного сопротивления переноса, тогда как электростатические взаимодействия оказывают меньший эффект. В случае поли-НК изменения сопротивления переноса заряда выражены намного слабее, что можно отнести как к меньшей плотности положительно заряженных центров на поверхности полимера, так и к меньшей шероховатости пленки. Однако в целом они согласуются с изменениями аналогичного параметра для покрытий поверх слоя ПАНИ. Расчеты коэффициента шероховатости, определяющего физический смысл постоянно-фазового элемента в эквивалентной схеме, во всех случаях были не менее 0.8, что позволяет считать отклонения от схемы несущественными и принять постоянно-фазовый элемент как емкость границы раздела электрод–раствор. Соответствующие значения меньше, чем величины R_{et} и определяются с большей погрешностью, достигающей 30 отн. %. Для ПАНИ можно отметить параллельное снижение сопротивления переноса заряда и емкости при осаждении на электрод ТК. Это обусловлено, как отмечалось выше, экранированием фосфатных групп, причем без внесения дополнительного заряда в слой. Таким образом, уменьшалось общее разделение заряда в слое и электростатическое отталкивание феррицианид-иона. Аналогичный вывод можно сделать для комбинации ПСС–

ДНК. Два указанных компонента слоя заряжены одноименно, поэтому можно предположить, что даже при относительно большой нагрузке полиэлектролитов они не образуют плотного сплошного покрытия, оставляя место для доступа феррицианид-иона к положительно заряженным редокс-центрам ПАНИ. Что касается поли-НК, то для данного полимера изменения емкости для всех вариантов состава покрытия, рассмотренного в работе, можно считать одинаковыми в пределах погрешности определения данного параметра. Это также можно связать с меньшей плотностью заряда поверхности исходного полимерного слоя. Таким образом, импедиметрические измерения показали, что ПАНИ заметно более чувствителен к электростатическим факторам, определяющим самосборку электролитов, чем поли-НК, а вклад ТК сводится к экранированию отрицательного заряда сульфатной группы ПСС и ДНК и ускорению переноса феррицианид-иона к электроду.

Влияние доксорубина на параметры электрохимического импеданса. Для установления возможности определения антрациклиновых препаратов по характеристикам полученных полиэлектролитных комплексов ДНК-сенсоры инкубировали в растворе доксорубина в течение 10 мин, после чего повторяли процедуру измерения импеданса. Для того чтобы заведомо исключить электростатическое отталкивание редокс-зонда, в ряде случаев внешний слой полиэлектролитного комплекса имел положительный заряд, создаваемый молекулами ПАА. Диаграмма Найквиста для полиэлектролитного комплекса на основе поли-НК и примеры концентрационных зависимостей сопротивления переноса заряда и емкости слоя от концентрации доксорубина приведены на рис. 3. Диаграммы Найквиста имеют традиционный вид: сплюснутый полукруг в области высоких частот переменной составляющей потенциала отвечает лимитированию процесса скоростью переноса электрона на границе электрод–раствор. Из положения полукруга на диаграмме рассчитаны значения параметров импеданса. Аналитические характеристики определения доксорубина с помощью ДНК-сенсоров на основе полиэлектролитных комплексов ДНК приведены в табл. 2.

Во всех изученных вариантах формирования полиэлектролитных комплексов контакт с интеркалятором приводил к существенному увеличению сопротивления переноса заряда. Это можно объяснить следующими обстоятельствами: внедрение молекул доксорубина в спираль ДНК увеличивает объем молекулы и разделение заряда, обусловленного фосфатными группами. Чем дальше от электрода располагается ДНК, тем меньше влияние доксорубина на параметры электрохимического импеданса. Порядок добавления ДНК и ТК тоже имеет значение, но мень-

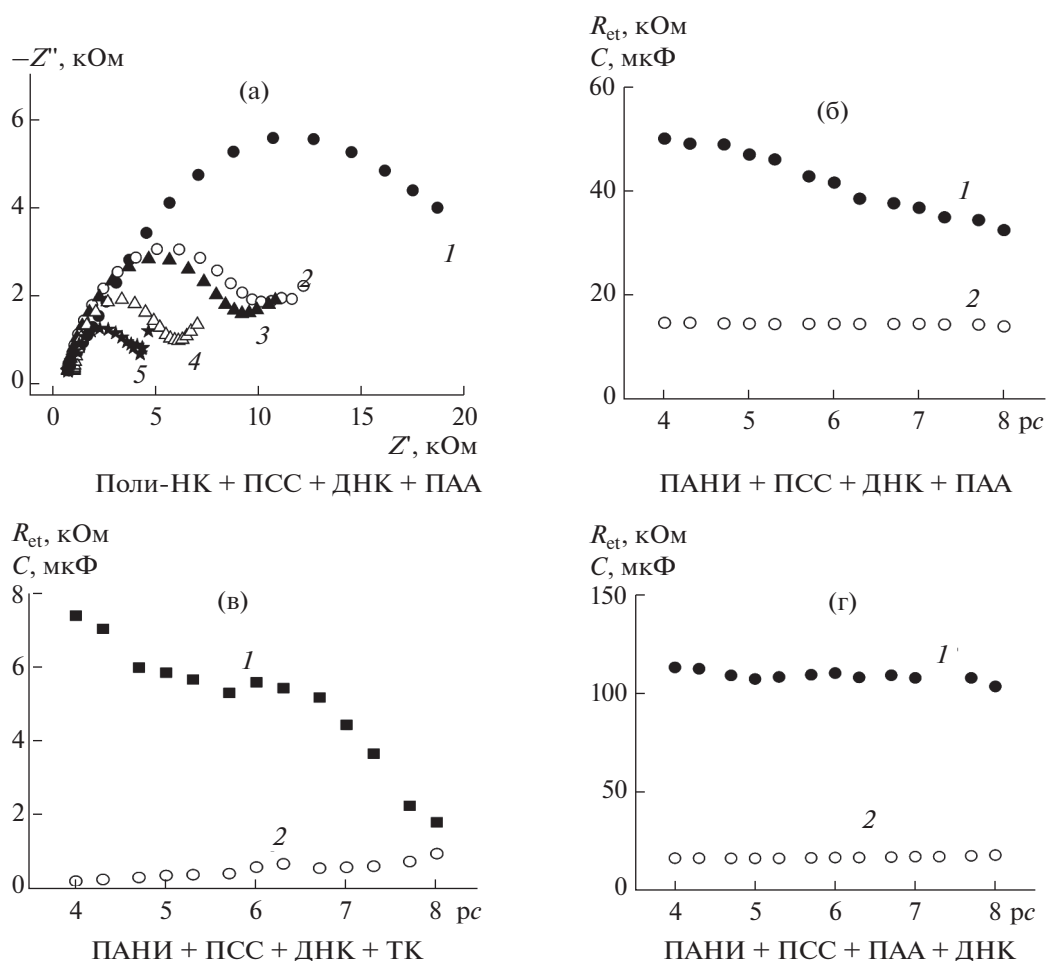


Рис. 3. (а) – Диаграмма Найквиста, полученная для ДНК-сенсора на основе полимерной формы нейтрального красного в присутствии 1×10^{-4} (1), 1×10^{-5} (2), 1×10^{-6} (3), 1×10^{-7} (4) и 1×10^{-8} (5) М доксорубина. (б)–(г) – Влияние концентрации доксорубина на сопротивление переноса заряда R_{et} (1) и емкость слоя C (2) в зависимости от состава полиэлектролитных комплексов на основе полианилина.

шее по сравнению с другими полиэлектролитами в составе комплекса.

В случае ПАНИ аналогичным образом влияет ТК, который может специфически связываться как по протонированным иминогруппам полимера, так и по анионным центрам ДНК. Как следствие, введение макроциклического амина снижает значение сопротивления переноса заряда и влияние на него интеркалятора. В случае с поли-НК влияние ТК меняется. По-видимому, в силу стерических причин макроцикл не может взаимодействовать с катионными центрами поли-НК, которые нагружены заместителями. В результате превалирует взаимодействие с ДНК. В этом случае интеркалирование биомолекулы может сопровождаться вытеснением с ее поверхности макроцикла, что усиливает сигнал. Как результат, чувствительность определения доксорубина для полиэлектролитных комплексов на основе того же сочетания полиэлектролитов вы-

ше, когда они собираются поверх поли-НК, нежели когда подложкой выступает ПАНИ.

ДНК-сенсор на основе поли-НК демонстрирует пределы обнаружения (c_{\min}), сопоставимые или ниже тех, которые приведены выше для аналогичных ДНК-сенсоров на основе ПАНИ [16], адсорбированного слоя мономера НК [14] или полифенотиразинов [9]. В дополнение к изменению сопротивления переноса заряда определенные выводы о характере воздействия может дать и емкость слоя, которая отражает изменение в разделении заряда в поверхностном слое. Однако достаточно большая погрешность ее определения и незначительное изменение с концентрацией доксорубина не позволяют использовать ее для количественного определения.

Исходя из предложенного механизма генерации сигнала, не следует ожидать селективности при определении различных цитостатиков близкого строения. Вместе с тем, полиаминирован-

Таблица 2. Аналитические характеристики определения доксорубина с помощью ДНК-сенсоров на основе полиэлектролитных комплексов ДНК

Модификатор	$R_{et} \text{ (кОм)} = a + bpc \text{ (М)}$					
	a	b	R^2	n	ДОС ($\mu\text{с}$, М)	c_{\min} , нМ
ПАНИ						
ПСС + ДНК + ПАА	70 ± 1	-4.7 ± 0.2	0.9792	14	4.0–8.0	0.5
ПСС + ПАА + ДНК	116 ± 2	-1.4 ± 0.4	0.9511	14	4.0–8.0	5.0
ПСС + ДНК + ТК	11.5 ± 0.7	-1.1 ± 0.1	0.8744	14	4.0–8.0	1.0
ПСС + ТК + ДНК	18.8 ± 0.6	-1.9 ± 0.1	0.9677	14	4.0–8.0	0.5
Поли-НК						
ПСС + ДНК + ПАА	33 ± 1	-3.8 ± 0.2	0.9787	14	4.0–8.0	0.2
ПСС + ПАА + ДНК	31.7 ± 0.8	-4.7 ± 0.2	0.9935	8	4.0–7.0	1.0
ПСС + ДНК + ТК	92 ± 7	-9 ± 1	0.9215	12	4.7–9.0	0.1
ПСС + ТК + ДНК	7.8 ± 0.3	-0.7 ± 0.1	0.9262	12	4.0–8.0	1.0

Обозначения: ДОС – диапазон определяемых содержаний, c_{\min} – предел обнаружения.

ный тиакаликс[4]арен ТК в перспективе может быть использован для повышения чувствительности определения окислительного повреждения ДНК или разделения вклада различных активных форм кислорода. Оказываемое им экранирующее действие может дополняться защитой молекул ДНК при незначительных интенсивностях воздействия. Это повысит информативность сигнала ДНК-сенсора и в перспективе расширит область его применения как средства выявления потенциальных канцерогенов при эколого-аналитическом контроле.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 17-73-20024).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lubert K.H., Kalcher K. History of electroanalytical methods // *Electroanalysis*. 2010. V. 22. № 17–18. P. 1937.
- Rao G., Goyal A. An overview on analytical method development and validation by using HPLC // *Pharm. Chem. J.* 2016. V. 3. № 2. P. 280.
- Maragos C.M., Busman M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: A review // *Food Addit. Contam. A*. 2010. V. 27. № 5. P. 688.
- Da Silva E.T.S.G., Souto E.P., Barragan J.T.C., Giarola F., Ana C.M., Kubota L.T. Electrochemical biosensors in point-of-care devices: Recent advances and future trends // *ChemElectroChem*. 2017. V. 4. № 4. P. 778.
- Kimmel D.W., Le Blanc G., Meschievitz M.E., Cliffel D. Electrochemical sensors and biosensors // *Anal. Chem.* 2012. V.84. № 2. P. 685.
- Rashid J.I.A., Yusuf N.A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review // *Sens. Bio-Sens. Res.* 2017. V. 16. № 1. P. 19.
- Yu H.L.L., Maslova A., Hsing I-M. Rational design of electrochemical DNA biosensors for point-of-care applications // *ChemElectroChem*. 2017. V. 4. № 4. P. 795.
- Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1845. № 1. P. 84.
- Evtugyn G.A., Stepanova V.B., Porfireva A.V., Zamaleeva A.I., Fakhrullin R.R. Electrochemical DNA sensors based on nanostructured organic dyes/DNA/polyelectrolyte complexes // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. V. 14. № 9. P. 6738.
- Hao X., Xu Z., Li N., Li N. B., Luo H. Q. A cation exchange based electrochemical sensor for cetyltrimethylammonium bromide detection using an acridine orange/polystyrene sulfonate system // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. № 9. P. 3849.
- Sun Y., Wang J., Jin L., Chang Y., Duan J., Lu Y. A new conjugated poly(pyridinium salt) derived from phenanthridine diamine: its synthesis, optical properties and interaction with calf thymus DNA // *Polymer J.* 2015. V. 47. P. 753.
- Jeong J.-E., Woo H.Y. Control of electrostatic interaction between a molecular beacon aptamer and conjugated polyelectrolyte for detection range-tunable ATP assay // *Polymer Chem.* 2017. V. 8. P. 6329.
- Ensafi A.A., Amini M., Rezaei B. Detection of DNA damage induced by chromium/glutathione/H₂O₂ system at MWCNTs–poly(diallyldimethylammonium chloride) modified pencil graphite electrode using methylene blue as an electroactive probe // *Sens. Actuators B*. 2013. V. 177. P. 862.
- Evtugyn G., Porfireva A., Stepanova V., Budnikov H. Electrochemical biosensors based on native DNA and nanosized mediator for the detection of anthracycline preparations // *Electroanalysis*. 2015. V. 27. № 3. P. 629.
- Evtugyn G., Hianik T. Electrochemical DNA sensors and aptasensors based on electropolymerized materials

- and polyelectrolyte complexes // Trends Anal. Chem. 2016. V. 79. № 1. P. 168.
16. *Shamagsumova R., Porfireva A., Stepanova V., Osin Yu., Evtugyn G., Hianik T.* Polyaniline–DNA based sensor for the detection of anthracycline drugs // Sens. Actuators B. 2015. V. 220. P. 573.
 17. *Pauliukaite R., Ghica M.E., Barsan M., Brett C.M.A.* Characterisation of poly(neutral red) modified carbon film electrodes; application as a redox mediator for biosensors // J. Solid State Electrochem. 2007. V. 11. № 7. P. 899.
 18. *Schlereth D.D., Karyakin A.A.* Electropolymerization of phenothiazine, phenoxazine and phenazine derivatives: Characterization of the polymers by UV-visible difference spectroelectrochemistry and Fourier transform IR spectroscopy // J. Electroanal. Chem. 1995. V. 395. № 1-2. P. 221.
 19. *Zhang K., Zhang Y.* Label-free electrochemical DNA sensor based on gold nanoparticles/poly(neutral red) modified electrode // Electroanalysis. 2010. V. 22. № 6. P. 673.
 20. *Якимова Л.С., Пуплампу Д.Б., Евтюгин Г.А., Стойков И.И.* Полифункциональные разветвленные азотсодержащие производные *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена как эффективные агенты для компактизации ДНК из тимуса теленка // Изв. Акад. наук. Сер. хим. 2017. № 8. С. 1515.
 21. *Stoikov I.I., Galukhin A.V., Zaikov E.N., Antipin I.S.* Synthesis and complexation properties of 1,3-alternate stereoisomers of *p*-tert-butylthiacalix[4]arenes tetra-substituted at the lower rim by the phthalimide group // Mendeleev Commun. 2009. V. 19. № 4. P. 193.