

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

*На правах рукописи*



**КУЛИКОВА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА**

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК- И АПТАСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ  
ПОЛИАНИЛИНА**

02.00.02 – Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук,  
профессор Евтюгин Геннадий Артурович

**КАЗАНЬ - 2020**

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: *Евтюгин Геннадий Артурович*  
Доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: *Майстренко Валерий Николаевич*,  
доктор химических наук, профессор, заведующий  
кафедрой аналитической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»

*Стожко Наталья Юрьевна*,  
доктор химических наук, профессор, заведующий  
кафедрой химии и физики ФГБОУ ВО «Уральский  
государственный экономический университет»

Ведущая организация: **Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН**

Защита состоится 15 октября 2020 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета КФУ. 02.01 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова КФУ, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета. Электронные версии автореферата и диссертации доступны на официальном сайте К(П)ФУ <http://kpfu.ru>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан « 7 » июля 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета КФУ. 02.01

кандидат химических наук

Якимова Людмила Сергеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Современный этап развития аналитической химии характеризуется особым вниманием к созданию новых методов и средств анализа органических соединений, применяемых в диагностике заболеваний, их лечении, либо оказывающих влияние на здоровье человека. К ним относятся так называемые биомаркеры заболеваний, остаточные количества лекарственных препаратов и токсинов, а также метаболиты, уровень которых связан со здоровьем человека. Электрохимические сенсоры, в которых аналитическим сигналом служит ток превращения аналита на электроде - трансдьюсере либо изменение условий электродной реакции стандартного редокс-маркера, позволяют решать задачи быстрой и надежной диагностики заболевания и оценки состояния больного, включая оказание помощи вне лечебного учреждения, по месту оказания медицинской помощи (концепция point-of-care diagnostics). Создание подобных устройств является важным шагом в реализации приоритета научно-технологического развития Российской Федерации, установленного Указом Президента РФ № 642 от 01.12. 2016 г. (переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)). Все вышесказанное относится к созданию биосенсоров – специализированных аналитических устройств, в составе которых присутствуют биохимические компоненты, реагирующие с определяемыми веществами. Биосенсоры можно рассматривать как простые модели поведения определяемых соединений в живом организме и средства оценки не только содержания вещества, но и его потенциальной биохимической активности.

Применение биосенсоров в медицине особо актуально в свете усилий, прилагаемых к борьбе с онкологическими заболеваниями. Их распространенность среди экономически активного населения, высокая смертность и сложность лечения даже при своевременной диагностике ставят задачи постоянного совершенствования применяемых лекарственных препаратов, а также эффективной оценки их фармакокинетики и индивидуальной дозы в химиотерапии. Разработка новых биосенсоров для определения противораковых препаратов стимулируется также значительными побочными эф-

фактами существующих препаратов и близостью их действующей и токсической дозы, определяемой, помимо прочих факторов, индивидуальной изменчивостью организма пациента.

Поскольку биологической мишенью многих противораковых препаратов является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), соответствующие биосенсоры включают саму кислоту или ее фрагменты в качестве биохимического элемента распознавания. Однако взаимодействие ДНК – лекарство приводит к весьма незначительным изменениям характеристик продукта по сравнению с нативной ДНК, что затрудняет количественное определение акта взаимодействия, а следовательно, и определения малых концентраций противоопухолевых препаратов. Одним из подходов к решению указанной проблемы является включение ДНК в электрохимически активную матрицу, которая реагирует на внедрение электрохимически не активного препарата смещением равновесия переноса электрона. Это приводит к генерации тока, регистрируемого с помощью стандартной вольтамперометрии, либо смещению потенциала, устанавливаемого потенциометрически. Однако на сегодняшний день возможности подобного подхода остаются не раскрытыми, поскольку отсутствуют представления о том, каким образом взаимодействие ДНК с аналитом способно влиять на микроокружение биополимера и как можно оптимизировать условия такого взаимодействия с точки зрения повышения чувствительности и селективности определения лекарственного препарата.

В этой связи актуальны исследования, связанные с разработкой новых подходов по включению ДНК в состав подобных электроактивных матриц и поиску рабочих условий измерения сигнала, связанного с взаимодействием ДНК и низкомолекулярного аналита в поверхностном слое биосенсора.

**Степень разработанности проблемы.** Хотя ДНК-сенсоры достаточно распространены среди биосенсоров медицинского направления, большинство из них предназначено для определения высокомолекулярных соединений – олигонуклеотидов при регистрации комплементарных последовательностей ДНК либо белков, специфически связывающихся с определенным участком гена. Поведение таких ДНК-сенсоров радикально отличается от ожидаемого при определении небольших молекул аналитов – лекарственных препаратов. В частности, взаимодействие олигонуклеотидов и белков значительно меняет характеристики поверхностного слоя, которые достаточно легко

определить по параметрам электрохимического сигнала специальной метки или редокс-индикатора, специально вносимого в состав биосенсора. Использование электрохимически активных матриц, как правило, не связано с задачами определения малых молекул субстрата. Такие матрицы служат для иммобилизации ДНК на поверхности сенсора и облегчении переноса электрона на отдельные нуклеотиды (гуанин и аденин). Сочетание ДНК и электроактивных матриц известно в литературе, однако связано с решением задач включения ДНК в состав биосенсоров или повышения эффективности электросинтеза полимера за счет так называемого темплатного эффекта (ускорения полимеризации за счет стабилизации промежуточных катионных продуктов).

**Цель работы** состояла в создании электрохимических биосенсоров для определения доксорубина, афлатоксина М1 и антиоксидантов на основе ДНК и аптамера, включаемых в состав электрополимеризованного полианилина (ПАНИ) и ряда других электрохимически активных полимеров.

Для достижения указанной цели потребовалось решить следующие **задачи**:

1. Установить условия получения гибридных покрытий с включением ДНК и аптамеров в полимерную матрицу путем электрополимеризации и электростатической самосборки компонентов.
2. Определить факторы, влияющие на электрохимические характеристики новых гибридных материалов с включением ДНК, и выделить из них наиболее значимые с точки зрения регистрации взаимодействия ДНК (аптамера) с низкомолекулярными аналитами.
3. Сравнить различные способы включения ДНК в электроактивную матрицу при создании электрохимических биосенсоров для определения антрациклинового противоракового препарата (доксорубин).
4. Разработать новые способы определения афлатоксина М1, доксорубина и групповой оценки антиоксидантов с помощью разработанных биосенсоров, в том числе, в лекарственных формах, биологических жидкостях и продуктах питания.

**Научная новизна работы** состоит в следующем:

1. Установлена возможность регистрации интеркалирования ДНК и взаимодействия аптамер – микотоксин с помощью биосенсора, включающего биологический компонент в пленку электрополимеризованного ПАНИ, по изменению электрохимиче-

ских характеристик поверхностного слоя и его проницаемости для низкомолекулярных соединений – редокс-индикаторов.

2. Определено влияние способа включения ДНК в слой ПАНИ на аналитические характеристики определения доксорубицина и сделаны предположения о механизме подобного влияния.

3. Предложены новые подходы к направленному изменению аналитических и операционных характеристик ДНК-сенсоров путем дополнительного включения в слой Метиленового синего и замены ДНК в слое после контакта с аналитом при послойном нанесении ПАНИ, физически адсорбированной ДНК и дополнительного слоя полимера.

4. Разработан новый аптасенсор на афлатоксин М1 на основе гибридных покрытий ПАНИ – аптамер с импедиметрической и вольтамперометрической регистрацией сигнала.

5. Проведена оценка антиоксидантных свойств объекта анализа с помощью гибридных электрополимеризованных покрытий ПАНИ-ДНК-полифенотиазиновый краситель.

**Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы** состоят в том, что:

1. Разработаны новые способы формирования гибридных покрытий из электрополимеризованного ПАНИ и ДНК (аптамера), свойства которых зависят от специфичных взаимодействий ДНК (аптамера) и определяют аналитические характеристики определения низкомолекулярных аналитов – доксорубицина, микотоксина и антиоксидантов.

2. Установлена роль ДНК в полимеризации анилина и генерации сигнала биосенсора, состоящая в реализации темплатного эффекта и во влиянии биополимера на редокс-равновесие ПАНИ и перенос противоионов в чувствительном слое биосенсора.

3. Предложен способ повышения чувствительности биосенсоров на основе ПАНИ и ДНК путем предварительного насыщения ДНК МС и его высвобождения в конкурентном связывании аналита.

4. Разработаны импедиметрические и вольтамперометрические аптасенсоры на афлатоксин М1 с улучшенными характеристиками определения и подавленным

влиянием матричных элементов пробы при анализе молока и молокопродуктов.

5. Предложен новый подход к оценке суммарного содержания антиоксидантов и дифференциации образцов путем использования биосенсоров на основе ПАНИ и ДНК с различными поверхностными покрытиями полифенотиразиновых покрытий.

**Методология и методы исследования.** В исследовании использованы современные методы исследования электродных реакций (постоянноточковая вольтамперометрия, спектроскопия электрохимического импеданса (СЭИ). Морфологию поверхности электросинтезированных покрытий изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для решения задач классификации образцов чая по производителю на основе сигналов ДНК-сенсоров использовали метод главных компонент (МГК) и линейный дискриминантный анализ (ЛДА). Метрологическую оценку результатов эксперимента проводили с помощью специализированного пакета OriginLab 8.1 (OringLab Corporation).

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Новые способы получения гибридных покрытий ПАНИ-ДНК и их электрохимические характеристики в зависимости от состава, способа получения и механизма взаимодействия ДНК (аптамера) с аналитом.
2. Условия определения препаратов, интеркалирующих ДНК и специфически связывающихся с аптамером, по электрохимическим характеристикам слоя и диффузионно свободного индикатора ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , Метиленовый синий (МС)).
3. Результаты определения доксорубицина с помощью разработанных ДНК-сенсоров, различающихся способом включения ДНК в состав поверхностного слоя.
4. Способ классификации коммерческих образцов чая по результатам оценки суммарного содержания в них антиоксидантов с помощью биосенсоров на основе ПАНИ, ДНК и полимерных форм фенотиразиновых красителей.
5. Результаты определения доксорубицина в лекарственных формах и искусственных образцах сыворотки крови и афлатоксина М1 в лекарственных формах и молочных продуктах.

**Личный вклад автора.** состоит в формулировании цели и задач исследования, литературном обзоре данных по тематике исследования, выполнении основных экспериментов по получению и характеристике электрополимеризованных материалов и

гибридных покрытий с включением ДНК (аптамера), их критическом рассмотрении и обобщении.

**Степень достоверности полученных результатов** подтверждается использованием комплекса современных методов исследования и сочетанием различных подходов к изучению полученных материалов (СЭИ и СЭМ). Предлагаемые механизмы взаимодействия ДНК с электрополимеризованными материалами и влияние биохимических взаимодействий на свойства ПАНИ согласуются с существующими представлениями об электродных реакциях электрополимеризации и механизме интеркалирования ДНК противораковыми препаратами.

**Апробация работы.** Результаты, полученные в ходе работы над диссертацией, были представлены на всероссийских и международных конференциях: IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием ЭМА-2016 (Екатеринбург – Ленёвка, 2016), III Съезде аналитиков России (Москва, 2017), Международном симпозиуме по электрохимическим и акустическим методам биоанализа (Братислава, Словакия, 2017), Международной конференции по электрохимическим сенсорам Матрафюред (Будапешт – Вышеград, Венгрия, 2019), 12 Зимнем симпозиуме по хемометрике (Саратов, 2020), а также на Итоговой научной конференции сотрудников Химического института им. А.М. Бутлерова, посвященной 190-летию со дня рождения А.М. Бутлерова (Казань, 2019).

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Диссертация выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности № 0671-2020-0063, в рамках основного научного направления Химического института им. А.М. Бутлерова «Синтез, строение, реакционная способность и практически полезные свойства органических, элементоорганических и координационных соединений», а также грантов РФФИ № 14-03-00409-а и РНФ (№ 17-73-20024 и № 19-73-10134).

**Публикации.** По теме диссертационного исследования опубликовано 9 печатных работ, из них 4 статьи в реферируемых журналах, входящих в библиографические базы данных Web of Science и Scopus, и 5 тезисов доклада на всероссийских и международных конференциях. Соавторами в публикациях являлись: д.х.н. Евтюгин Г. А., научный руководитель, к.х.н. Порфирьева А. В. и к.х.н. Степанова В. Б. (изучение

электрополимеризованных материалов), проф., д.б.н. Савельев А.А. (модели отклика биосенсоров для классификации сортов чая), проф., д.х.н. Зиятдинова Г.К. (кулонометрическое определение антиоксидантной емкости чая), проф., д.ф.-м.н. Гианик Т. (обсуждение механизмов регистрации взаимодействий аптамер – микотоксин) и Воробьев В.В. (регистрация снимков СЭМ поверхности биосенсоров).

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 124 страницах текста компьютерной верстки, включает 44 рисунка и 12 таблиц. Диссертация состоит из Введения, 3 глав, Заключения и Списка использованных библиографических источников, содержащего 160 ссылок на работы российских и зарубежных авторов.

Во **Введении** охарактеризована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи для ее достижения, представлены положения, составляющие научную новизну, теоретическую и практическую значимость диссертационной работы, методологию исследования, положения, выносимые на защиту. Указаны личный вклад автора и сведения об апробации диссертации. Дана общая структура диссертации и число публикаций, в которых изложены полученные результаты.

**Глава 1** (Обзор литературы) посвящена особенностям электрополимеризации и электрохимическим свойствам ПАНИ, а также его применению в составе электрохимических сенсоров, иммуно- и ДНК-сенсоров. Приведены определяемые концентрации и пределы обнаружения аналитов, а также состав биочувствительного слоя и вклад ПАНИ в сигнал сенсоров.

**Глава 2** (Экспериментальная часть) содержит описание использованных в работе реактивов и оборудования, методик приготовления электрополимеризованных слоев и биосенсоров на их основе, а также методики определения аналитов с помощью биосенсоров с различным составом поверхностного слоя.

**Глава 3** (Результаты и обсуждение) посвящена экспериментальным результатам, полученным в рамках диссертации. **Раздел 3.1** посвящен теоретической оценке влияния ДНК на электрохимические свойства ПАНИ. В **Разделе 3.2** дана характеристика ДНК-сенсоров с ДНК, физически адсорбированной поверх полимера. **Раздел 3.3** описывает послойное нанесение компонентов биочувствительного слоя и применение ДНК-сенсоров для определения доксорубина. **Раздел 3.4** содержит результаты исследований покрытий ПАНИ – ДНК – полимерные красители и их использование для оценки антиоксидантных свойств чая. **Раздел 3.5** описывает вольтамперометрический

и импедиметрический аптасенсор для определения афлатоксина М1 в водных стандартных растворах и в молоке.

Диссертация выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», работы в области создания аптасенсора на АФМ1 проводили в лаборатории биофизики Университета Коменюса в Братиславе, Словакия, под руководством проф. Т. Гианика.

\* \* \*

Автор выражает благодарность научному руководителю заведующему кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова проф., д.х.н. Евтюгину Г.А. за чуткое руководство и неоценимую помощь в выборе темы диссертационной работы, постановке задач и интерпретации полученных результатов, а также за терпение и педагогичность; проф. Зиятдиновой Г.К. за проведение кулонометрических исследований антиоксидантных свойств чая; профессору А.А. Савельеву за математическую обработку данных для классификации сортов чая; профессору университета Коменского в Братиславе (Словакия) Т. Гианику за возможность прохождения научной стажировки и ценные советы по изучению свойств аптамеров на афлатоксин М1; сотрудникам кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ за помощь и поддержку при проведении исследований.

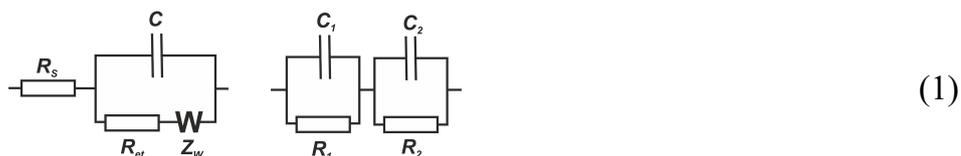
## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Экспериментальная часть**

Для получения электрогенерированных полимерных покрытий в работе использовали редокс-активные представители феназинового и фенотиазинового ряда НК, МС и МЗ, а также анилин. В качестве биоконпонента в составе разработанных ДНК-сенсоров использовали двухцепочечную низкомолекулярную ДНК, выделенную из молок лосося, а в случае экспериментов по оценке влияния ДНК на электрохимические свойства покрытия высокомолекулярную ДНК из эритроцитов крови цыпленка. При разработке аптасенсора на афлатоксин М1 роль биоконпонента играл специфичный аптамер, связывающий микотоксин в молекулярный комплекс.

Вольтамперометрические измерения проводили с помощью электрохимическо-

го анализатора CHI Electrochemical Workstation 440B (CH Instruments, США) и потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm AUTOLAB, Нидерланды). Импедиметрические измерения проводили с помощью потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm Autolab, Нидерланды) при формальном потенциале феррицианид-иона, определенном как полусумма потенциалов пика его окисления и восстановления. Амплитуда изменения потенциала составляла 5 мВ, частоту меняли от 100 кГц до 0.04 Гц. Измерения проводили в ячейке, содержащей 5 мл рабочего буфера в присутствии 0.01 М смеси  $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ . Параметры электрохимического импеданса (сопротивление переноса заряда  $R_{et}$  и емкость  $C$ ) определяли с помощью программного обеспечения производителя (NOVA 1.7, Metrohm AUTOLAB, Нидерланды) с использованием эквивалентной ячейки Рэндлса и двойной ячейки Рэндлса (1).



В работе использовали стеклоуглеродные электроды (СУЭ), изготовленные из стержня СУ2000 (НИИГрафит, г.Москва), помещенного в тефлоновый корпус, снабженный металлическим токосъемником. Противозэлектродом служила платиновая проволока, электродом сравнения - хлоридсеребряный электрод ( $Ag / AgCl / 3 \text{ M KCl}$  («Metrohm AG», Herisau, Швейцария, и CHI128, CH Instruments, Austin, США)). Все электрохимические измерения проводили в трехэлектродной нетермостатируемой ячейке объемом 5 мл. Обработку данных проводили с помощью программы NOVA (Metrohm AUTOLAB) и CHI (CH Instruments).

Изображения с помощью атомно-силовой микроскопии получали на микроскопе Bruker FastScan Dimension Bio в полуконтактном режиме измерения со сканером  $90 \times 90$  мкм и кремниевыми кантилеверами. Данные сканирующей электронной микроскопии получали с помощью универсального аналитического комплекса сканирующей автоэмиссионной электронной микроскопии Merlin (Carl Zeiss Group, Германия). Перед снятием изображений для повышения их контрастности образцы покрывали слоем Au/Pd с помощью вакуумного напыления на установке T150ES (Quorum Technologies, Великобритания).

## Вольтамперометрический сенсор для математического моделирования влияния ДНК на редокс-свойства ПАНИ

Для характеристики влияния ДНК на электрохимические характеристики покрытия была использована математическая модель, предложенная Посадосом для описания энергии взаимодействия окисленных и восстановленных фрагментов ПАНИ [J. Electroanal. Chem. 2011. V.655. P. 17-22]. Исходными данными служили вольтамперограммы, полученные на электроде, покрытом пленкой ПАНИ с включением ДНК. Значения токов окисления-восстановления позволяют рассчитать относительное изменение энергии взаимодействия в зависимости от объемной концентрации ДНК. Результаты в безразмерных координатах приведены на рисунке 1.

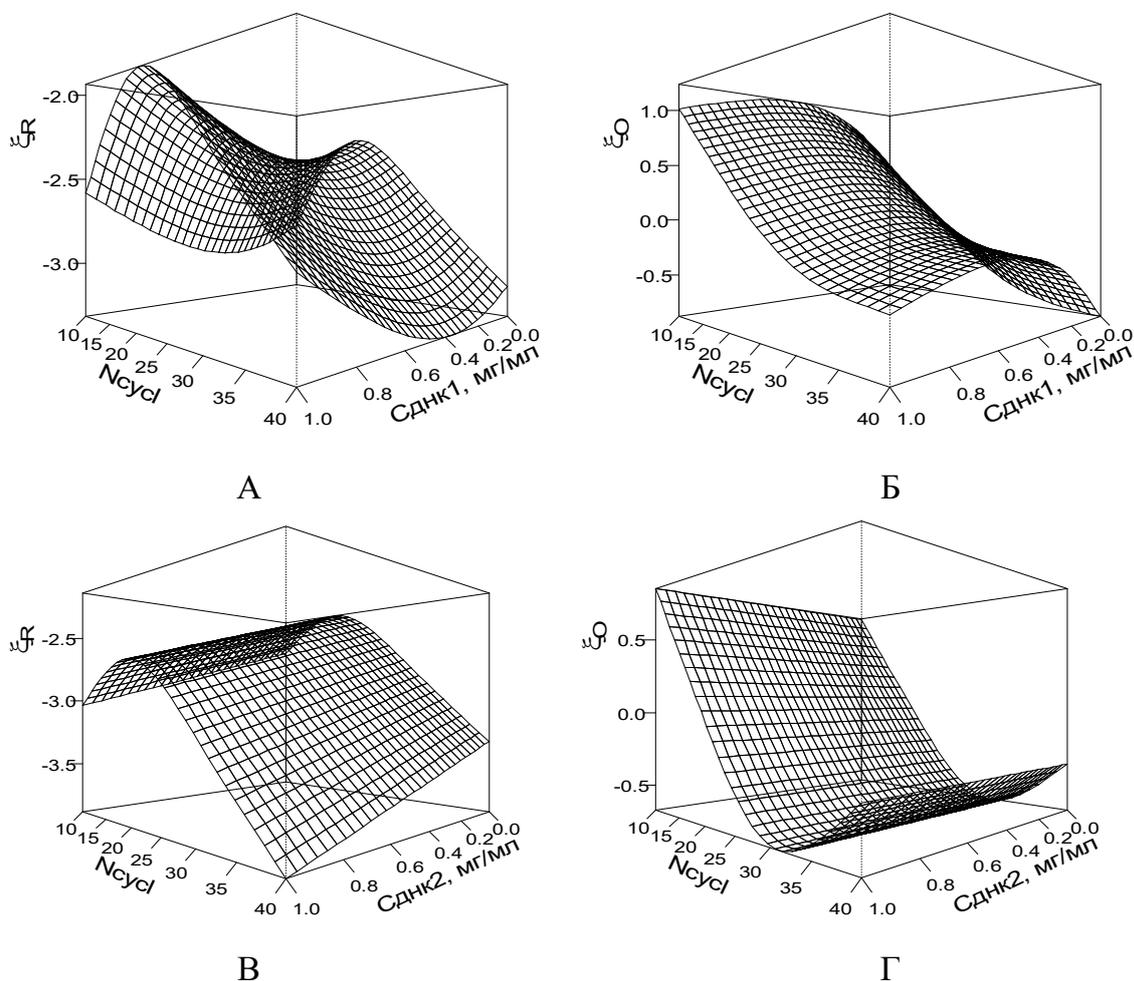


Рисунок 1 - Модели зависимостей  $\xi_R$ ,  $\xi_O$ ,  $(\xi_R - \xi_O)$  и  $(\xi_R + \xi_O)$  от числа циклов сканирования потенциала на стадии полимеризации ПАНИ и концентрации низкомолекулярной ДНК1 из молок лосося (А и Б) и высокомолекулярной ДНК2 из эритроцитов крови цыпленка (В и Г)

Здесь  $\xi_R$  и  $\xi_O$  - безразмерные параметры взаимодействий восстановленного и окисленного фрагмента ПАНИ,  $N_{Cycl}$  - число циклов сканирования потенциала при полимеризации, ДНК1 и ДНК2 - ДНК из молок лосося и эритроцитов крови цыпленка, соответственно. Влияние ДНК закономерно увеличивается с ростом молекулярной массы и концентрации ДНК в растворе. Это влияние на  $(\xi_R + \xi_O)$  носит линейный характер, но низкомолекулярная ДНК1 увеличивает данный параметр, стабилизируя биполярную структуру ПАНИ, а ДНК2 уменьшает его, способствуя распределенной решетки поляронов. По-видимому, помимо электростатических факторов введение биополимера приводит к структурным нарушениям строения ПАНИ. Моделирование объясняет, почему низкомолекулярная ДНК показала более высокую чувствительность к малым молекулам, как антрациклины, по сравнению с высокомолекулярной ДНК.

#### **Вольтамперометрический сенсор с возможностью замены ДНК в слое ПАНИ-ДНК для определения доксорубина**

Для регистрации взаимодействий ДНК по характеристикам ПАНИ предложено разделить нанесение указанных модификаторов, сначала осаждая ПАНИ из кислой среды и затем физически адсорбируя ДНК из нейтральной. Далее регистрировали вольтамперограмму в буферном растворе, не содержащем свободного анилина. В кислой области на вольтамперограммах присутствуют пики эмералдина. Их высота закономерно снижается при введении в раствор интеркалятора ДНК доксорубина (рисунок 2).

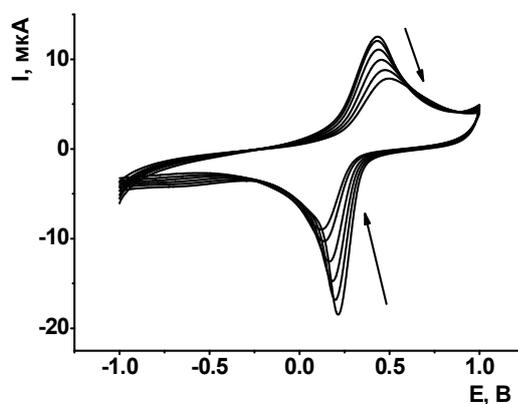


Рисунок 2 - Циклические вольтамперграммы на СУЭ, покрытом ПАНИ-ДНК (9 циклов) после 15 мин. инкубирования в растворе доксорубина 1, 3, 10, 30, 100 и 300 мкМ

Изменение токов пика возрастает при предварительном насыщении ДНК МС. Его присутствие улучшает обратимость переноса электрона в слое ПАНИ. Доксорубин вытесняет МС из цепи переноса заряда, что снижает регистрируемые токи. Чувствительность определения доксорубина увеличивалась с толщиной пленки с максимумом при 25 циклах сканирования потенциала на стадии полимеризации анилина. Предел обнаружения ( $c_{lim}$ ) доксорубина составил 0.1 мкМ в отсутствие красителя и 10 пМ в присутствии красителя.

Для регенерации биосенсора после его контакта с доксорубином предложено удалять ДНК соляной кислотой с последующим инкубированием биосенсора в свежем растворе ДНК для восстанавливают состава слоя. Удаление ДНК в результате кислотного гидролиза и регенерация слоя получили подтверждение с помощью СЭИ. Удаление ДНК увеличивало сопротивление переноса заряда, устанавливаемое по диаметру полукруга на диаграмме Найквиста. Обработка ДНК возвращала вид зависимости, зафиксированный до удаления ДНК из слоя (рисунок 3).

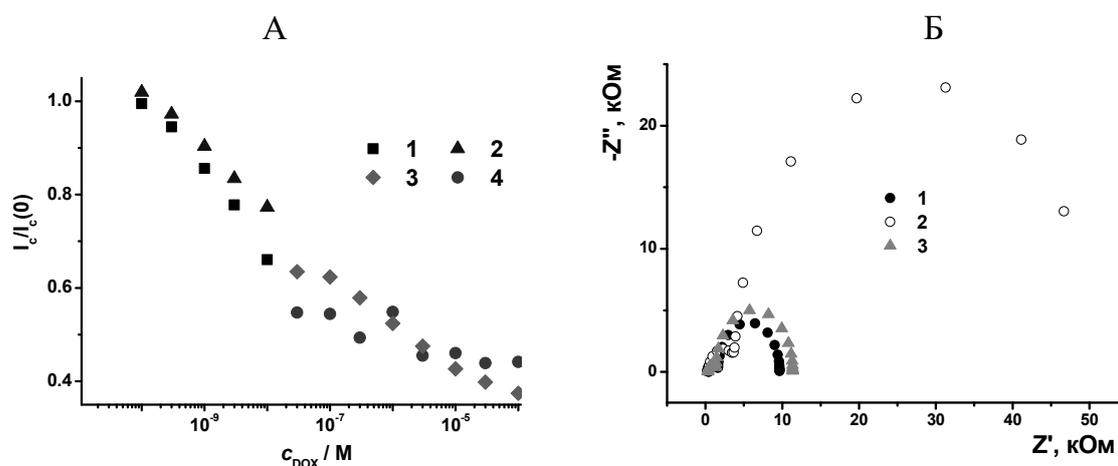


Рисунок 3 – (А) Относительный сдвиг катодного тока пика  $I_c/I_c(0)$  на СУЭ, покрытом ПАНИ-ДНК(МС) в зависимости от концентрации доксорубина  $c_{dox}$ . Полимеризация ПАНИ за 25 (1, 2) и 9 циклов (3, 4), измерения до (1, 3) и после (2, 4) кислотной обработки пленки и регенерации ДНК в слое; (Б) Диаграммы Найквиста, полученные на СУЭ, покрытом слоем ПАНИ-ДНК до (1) и после (2) кислотной обработки, а также при регенерации ДНК в слое (3)

Аналогичные зависимости на вольтамперограммах, отвечающие разной толщине пленки, сливаются в одну прямую с общим наклоном, что говорит о том, что

чувствительность биосенсора к интеркалирующему препарату прямо связана с содержанием красителя в слое.

### Электрохимические ДНК сенсоры с послойным покрытием ПАНИ-ДНК-ПАНИ для определения специфических взаимодействий ДНК

При высокой кислотности среды могут наблюдаться нежелательные изменения конформации ДНК при ее иммобилизации. Поэтому было предложено сначала проводить физическую адсорбцию биополимера с последующим ее закрытием дополнительной сверхтонкой пленкой ПАНИ. Добавление второго слоя сохраняет МС в пленке, поэтому в присутствии красителя симметрия пиков на вольтамперограммах увеличивается за счет увеличения катодного пика. Введение доксорубина в тот же раствор после его контакта с МС увеличивает прежде всего анодный пик. Это связано с вытеснением метиленового синего из комплекса с ДНК и сохранением его роли как медиатора электронного переноса. Проведена оптимизация условий определения доксорубина по количеству добавляемой ДНК и числу циклов сканирования потенциала на стадии полимеризации анилина. Селективность отклика на доксорубин подтвердили отсутствием значимых изменения токов пика при экспозиции биосенсора в растворе сульфаметоксазола.

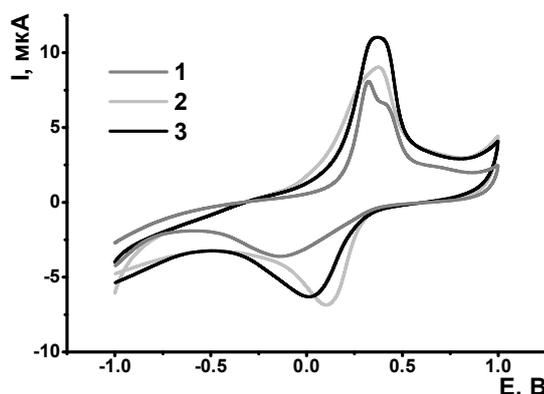


Рисунок 4 - Циклические вольтамперограммы, полученные на СУЭ, покрытом ПАНИ-ДНК-ПАНИ до (1) и после последовательного 15 мин. инкубирования в 0.5 мМ метиленовом синем (2) и 10 нМ доксорубине (3)

Использование СЭИ позволило охарактеризовать процессы, протекающие на границах полимерного слоя, и связать их с действием интеркаляторов ДНК. Как следует из сопоставления диаграмм Найквиста для внутренней и внешней границы раздела (рисунок 5), присутствие доксорубина более проявляется на условиях электронного обмена на границе электрод - полимер.

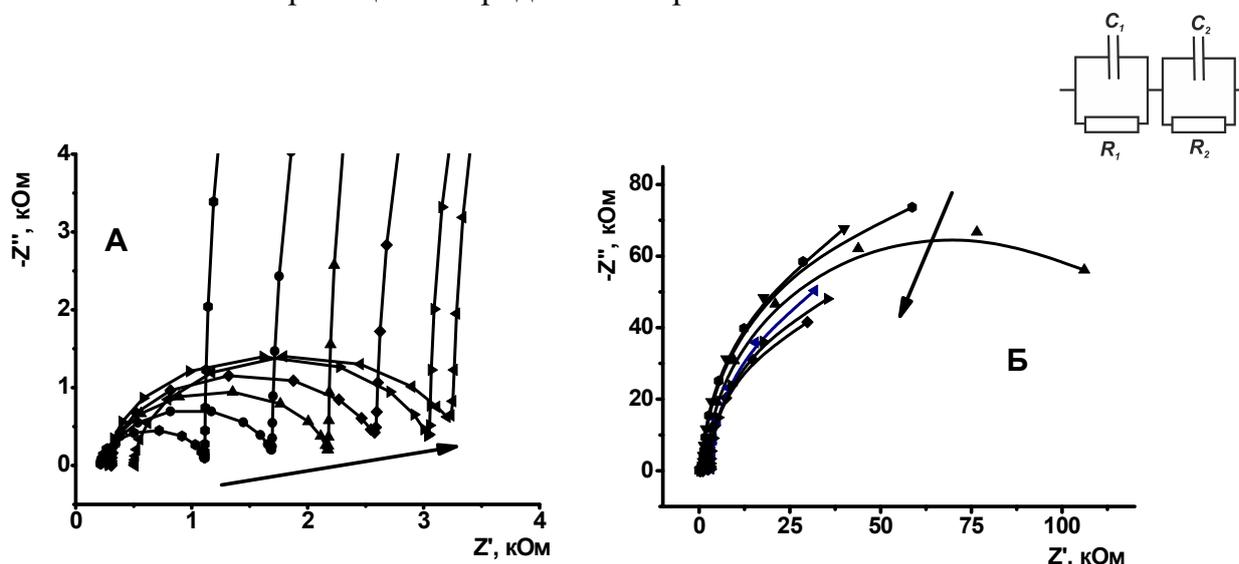


Рисунок 5 - Диаграммы Найквиста, соответствующие внутренней (А) и внешней (Б) границе СУЭ-ПАНИ-ДНК (20 мкл, 2 мг/мл)-ПАНИ при инкубировании в 0.1 мМ МС и  $0, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-8}$  и  $1 \times 10^{-9}$  М доксорубине. Измерения в присутствии 0.01 М  $K_3[Fe(CN)_6]$  и 0.01 М  $K_4[Fe(CN)_6]$  при 0.26 В отн. Ag/AgCl

Разработанные биосенсоры также были протестированы на искусственных образцах урины и сыворотки крови, содержащих известные количества доксорубина. Чувствительность разработанного импедиметрического сенсора была выше, чем у большинства других ранее описанных электрохимических и ДНК-сенсоров для определения доксорубина. Снижение  $c_{lim}$  было достигнуто благодаря более тесному контакту ДНК с ПАНИ в поверхностном слое и более сильному ее влиянию на внутреннюю электрохимическую активность полимерной матрицы. Кроме того, послойная иммобилизация сделала возможным подбор условий введения ДНК и предотвратила контакт биополимера с сильными кислотами, которые необходимы для полимеризации анилина и проявления его электрохимической активности.

**СУЭ, модифицированный слоем ПАНИ-ДНК-полифеназиновый краситель,  
для оценки антиоксидантных свойств чая**

Поскольку ПАНИ обладает свойствами медиатора электронного переноса, а его композиты с ДНК демонстрируют расширение рабочей области потенциала и рН-чувствительности активности, соответствующие сенсоры могут найти применение для определения окисляющихся органических соединений и их совокупного содержания в пробе (антиоксидантной активности продукта питания или напитка). Для проверки этого были полученные смешанные покрытия ПАНИ-ДНК-полифеназиновый краситель, где в качестве внешнего слоя были выбраны продукты электрополимеризации МС, Метиленового зеленого и Нейтрального красного, ранее демонстрировавшие высокую чувствительность в определении органических субстратов. Подстилающий слой ПАНИ выполнял функцию селективного сорбента, удерживая на поверхности физически адсорбированную ДНК, поверх которой проводили полимеризацию красителей (рисунок 6).

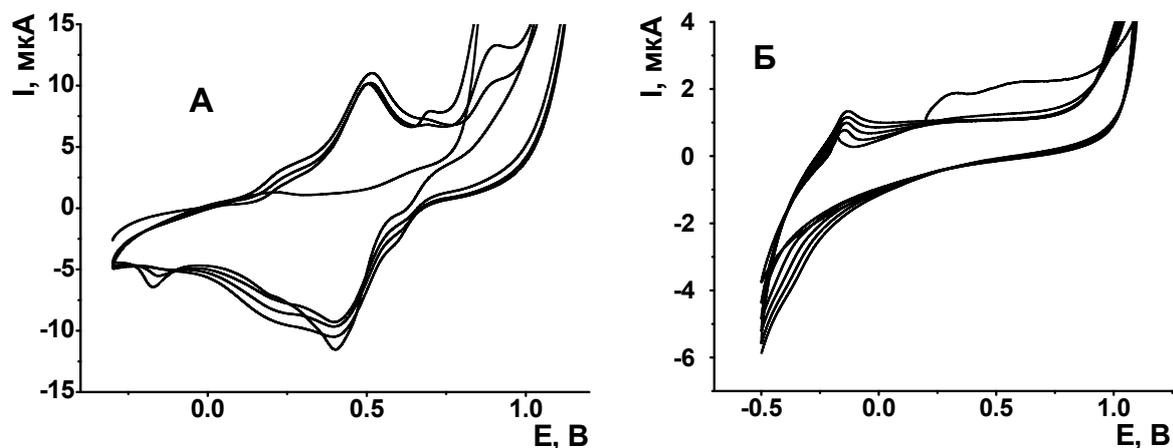


Рисунок 6 - Электрохимическое накопление ПАНИ из 0.5 М щавелевой кислоты, содержащей (А) 0.7 мМ анилина и (Б) МС на ДНК, адсорбированной на слое ПАНИ

Модифицированные указанным способом электроды были протестированы на модельных растворах антиоксидантов - стандартных растворах аскорбиновой кислоты, гидрохинона и кверцетина. В большинстве случаев добавление антиоксидантов не влияло на форму пиков редокс-превращений красителей на вольтамперограммах, но увеличивало величину токов пика благодаря конкурентным редокс-реакциям красителей с добавками. Сигналы на вольтамперограммах зависели от природы красителя,

pH и условий модификации электрода. С уменьшением pH абсолютные значения токов и их изменение с концентрацией антиоксиданта увеличивались, что связано с изменением электропроводности подстилающего слоя ПАНИ.

Возможность контролировать присутствие антиоксидантов была подтверждена измерением сигнала в присутствии чая, полученного из коммерческих продуктов, доступных на рынке и заваренных по рекомендациям производителя. Его добавление приводило к характерным изменениям пиков на вольтамперограммах, меняющихся с торговой маркой продукта, кратности разбавления настоя и временем его хранения. В холостом эксперименте при отсутствии ДНК в слое или замене чая на воду изменений на вольтамперограммах не наблюдалось. Возможность дискриминации образцов чая по значениям токов пика была продемонстрирована с помощью МГК (рисунок 7).

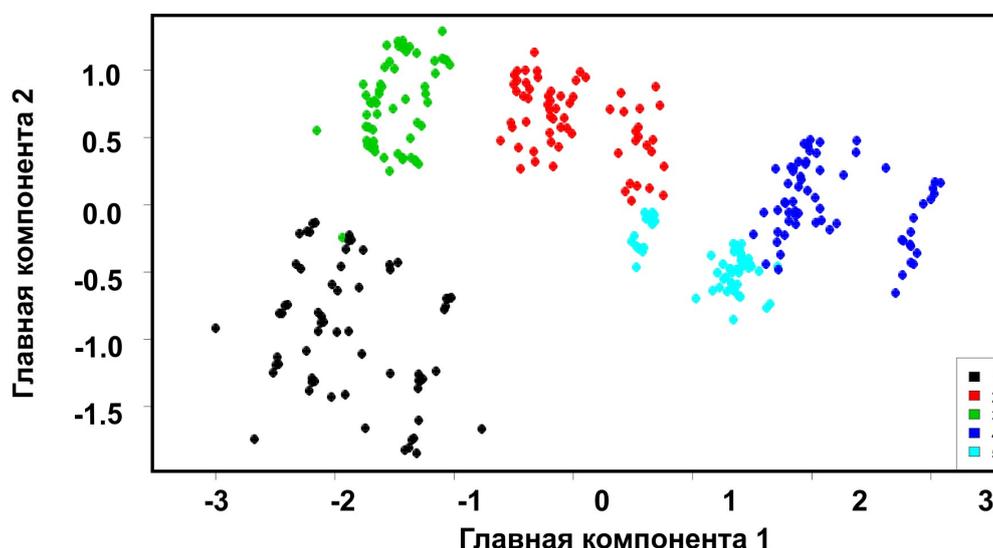


Рисунок 7 - График счетов первых двух главных компонент по результатам дискриминации торговых марок чая по анодным и катодным токам пика полимерных красителей. Данные для трех индивидуальных сенсоров три индивидуальных сенсора

Классификацию по значениям тока катодного и анодного пика на вольтамперограммах, полученных после инкубирования сенсоров в кратно разбавленном чае. Области графика, отвечающие отдельным маркам чая, хорошо разделены, что свидетельствует о значимом различии торговых марок и возможности их дискриминации по результатам измерения сигнала сенсоров. Объясненная дисперсия составила 91.1%

Для предсказания марки чая по сигналам разработанных электрохимических сенсоров с покрытием ПАНИ-ДНК-полимерные красители использовали ЛДА. Веро-

ятность успешного прогноза составила 94-100%. Анализ распределения дисперсии установил, что наибольший вклад в правильный прогноз вносит сенсор на основе поли(нейтрального красного). Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения сенсоров для контроля качества пищевой продукции.

### Электрохимический аптасенсор на афлатоксин М1 на основе электрода, модифицированного ПАНИ

Предложенный способ формирования биочувствительного слоя путем последовательного сочетания электрополимеризации и электростатической адсорбции био-рецептора был использован для создания аптасенсора на афлатоксин М1. Это соединение образуется при метаболизме афлатоксина Б1, экскрецируется с молоком и отличается высокой устойчивостью, сохраняясь в молоке и молочных продуктах при их кулинарной обработке.

Для получения селективного отклика использовали аптамер, специфически связывающий афлатоксин М1: 5'-NH<sub>2</sub> АСТ GCT AGA GAT TTT CCA CAT-3'. Его помещали вместо ДНК между двумя сверхтонкими пленками ПАНИ и далее инкубировали в растворе аналита 20 мин. Диаграммы Найквиста на рисунке 8 соответствуют различным стадиям сборки слоя и его контакту с увеличивающимися концентрациями афлатоксина М1 в интервале 2 - 30 нг/л ( $c_{lim}$  8 нг/л).

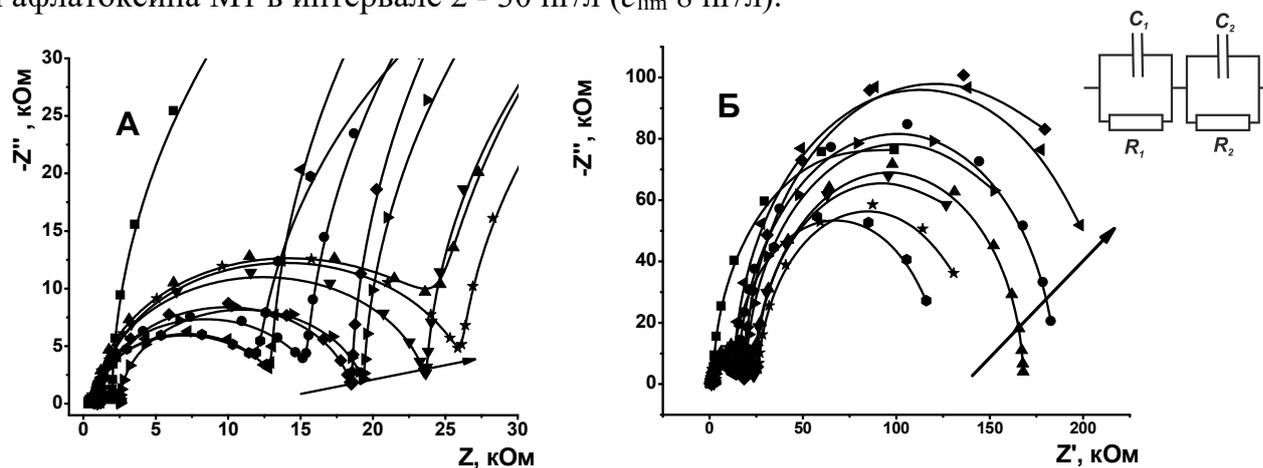


Рисунок 8 Диаграммы Найквиста на внешней (А) и внутренней (Б) границе раздела. СУЭ покрыт слоем ПАНИ-аптамер-ПАНИ, инкубирование в 5-120 нг/л АФМ1. Измерения в присутствии 0.01 М  $K_3[Fe(CN)_6]$  и 0.01 М  $K_4[Fe(CN)_6]$  при 0.097 В отн. Ag/AgCl. Диапазон частот 0.04 Гц-100 кГц, амплитуда 5 мВ. Стрелки указывают направление изменения концентрации АФМ1 в ряду 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 и 120 нг/л

При анализе молокопродуктов сывороточные белки осаждали метанолом и далее разбавляли элюат для подавления влияния растворителя на сигнал. Аптасенсор позволяет проводить определение до афлатоксина М1 с пределом обнаружения 20 нг/л (с учетом разбавления, область линейности до 300 нг/л), что достаточно для его детектирования на уровне установленных норм. Отклик аптасенсора сохраняет селективность в присутствии в пробе охратоксина А и афлатоксина В1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали исследования по формированию биочувствительного слоя ДНК-сенсоров на основе электрополимеризованных материалов, включение ДНК в состав сенсора оказывает значительное воздействие на электрохимические свойства матрицы, связанное со структурными факторами и электростатическими взаимодействиями в слое. Это открывает широкие возможности по направленному изменению аналитических характеристик биосенсоров, связанных с регистрацией специфических взаимодействий ДНК. На примере доксорубина как представителя антрациклиновых препаратов - цитостатиков, рассмотрены особенности сигналов биосенсоров в зависимости от строения и способа формирования поверхностного слоя. Найденные закономерности могут найти применение при создании биосенсоров для оценки фармакокинетики лекарственных препаратов, взаимодействующих с ДНК, установлении индивидуальной дозы по результатам исследований фармакокинетики, в оценке качества пищевой продукции и выявлении фальсификатов по уровню содержания в них антиоксидантов.

На основании проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

1. Математическое моделирование взаимодействий окисленных и восстановленных фрагментов цепи по вольтамперным данным о собственной электрохимической активности полианилина показало зависимости изменений в энергии взаимодействия от концентрации и природы (средней молекулярной массы) ДНК, связанное со структурными факторами формирования однородной пленки ДНК - полимер.

2. При адсорбции ДНК поверх тонких пленок полианилина собственная электрохимическая активность полимера закономерно меняется в силу влияния ДНК на разделение зарядов и варьирование соотношения окисленной и восстановленной форм полианилина, определяющих потенциал слоя. Интеркаляторы (на примере док-

сорубицина) влияют на разделение зарядов в слое и его проницаемость, что позволяет проводить их определение с вольтамперометрической и импедиметрической регистрацией сигнала.

3. Предложен новый способ повышения чувствительности определения доксорубицина, состоящий в предварительном насыщении ДНК Метиленовым синим, способным к замещению доксорубицином и включению в цепь переноса заряда в приэлектродном слое.

4. Разработаны ДНК-сенсоры с трехслойным нанесением поверхностного слоя полианилин - ДНК - полианилин (полимерные формы красителей). Дополнительный внешний слой стабилизирует структуру ДНК и уменьшает потери метиленового синего при его включении в слой в качестве медиатора электронного переноса. Разработанные сенсоры позволяют проводить определение до 2 нМ доксорубицина по данным вольтамперометрии и 0.6 пМ - с импедиметрической регистрацией сигнала.

5. Электрохимическая полимеризация Метиленового синего, Метиленового зеленого и Нейтрального красного приводит к образованию пленки поверх слоя полианилин - ДНК, которая играет роль медиатора электронного переноса при окислении органических соединений. Токи пика окисления и восстановления зависят от природы и концентрации антиоксидантов позволяют использовать сенсоры для решения задач классификации пищевых продуктов по уровню антиоксидантной активности. На примере экстрактов чая с помощью анализа главных компонент установлена возможность определения коммерческой марки продукта, достоверность ее прогнозирования с помощью линейного дискриминантного анализа составляет 94.6-100%

6. Разработан электрохимический аптасенсор на афлатоксин М1, в котором специфический аптамер иммобилизован путем включения между двумя пленками полианилина. Сигналом на афлатоксин служит изменение тока пика редокс-индикатора (феррицианид-ион) или сопротивления переноса заряда. Предел обнаружения афлатоксина составляет 5 и 1 нг/л для вольтамперометрического и импедиметрического сигнала. Диапазон определяемых концентраций в искусственно приготовленных образцах загрязненного молока составил 20 - 300 нг/л (с учетом 10-кратного разбавления на стадии пробоподготовки).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи в научных журналах:*

1. **Kulikova, T.N.** Voltammetric sensor with replaceable polyaniline-DNA layer for doxorubicin determination / T. N. Kulikova, A. V. Porfireva, R. V. Shamagsumova, G. A. Evtugyn // *Electroanalysis*. - 2018. - V.30 (10). - P.2284-2292 (вклад автора - 0.13 пл)
2. **Kulikova, T.N.** Electrochemical DNA Sensors with Layered Polyaniline-DNA Coating for Detection of Specific DNA Interactions / T. N. Kulikova, A. V. Porfireva, G. A. Evtugyn, T. Hianik // *Sensors*. - 2019. - V.19 (3). - reg.469 (вклад автора - 0.25 пл)
3. **Kulikova, T. N.** Discrimination of tea by the electrochemical determination of its antioxidant properties by a polyaniline-DNA-polyphenazine dye modified glassy carbon electrode / T. N. Kulikova, A. V. Porfireva, V. V. Vorobev, A. A. Saveliev, G. K. Ziyatdinova, G. A. Evtugyn // *Anal. Letters*. - 2019. - V.52 (16). – P.2562-2582 (вклад автора - 0.21 пл)
4. **Kulikova, T. N.** Electrochemical aptasensor with layer - by - layer deposited polyaniline for Aflatoxin M1 voltammetric determination / T. N. Kulikova, A. V. Porfireva, T. Hianik, G. A. Evtugyn // *Electroanalysis*. - 2019. - V.31 (10). – P.1913-1924 (вклад автора - 0.17 пл)

*Тезисы конференций:*

5. Степанова В.Б. Электрохимические характеристики новых гибридных материалов полианилина и ДНК / В.Б. Степанова, **Т.Н. Куликова**, Е.Е. Стойкова, Г.А. Евтюгин // ЭМА-2016. Тезисы докладов IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием (Екатеринбург – Ленёвка, 29 мая-3 июня 2016). – Екатеринбург: УМЦ УПИ, 2016. – С. 149
6. **Kulikova, T.** Sensors based on layer-by-layer application of polymeric dyes and DNA: structure, electrochemical properties and application in electroanalysis / T. Kulikova, A. Porfireva, Y. Kuzin, G. Evtugyn // *Electrochemical and Acoustic Methods in Bioanalysis. Program, Abstracts and Practical Courses of International Workshop (Bratislava, Slovakia, September 24-28, 2017)*. – Bratislava, 2017. – P.34
7. **Куликова Т.Н.** Сенсоры на основе послойного нанесения полимерных красителей и ДНК: структура, электрохимические свойства и применение в электроанализе / Т.Н. Куликова, А.В. Порфирьева, Ю.И. Кузин, Е.Е. Стойкова, Г.А. Евтюгин // Третий

съезд аналитиков России. Тезисы докладов (8-13 октября, 2017, Москва). М: ГЕОХИ РАН, 2017. – С.154.

8. Porfireva, A.V. Electrochemical DNA sensor based on layered electropolymerized layers for detection of DNA damage and antitumor drugs / A.V. Porfireva, **T.N. Kulikova**, G.A. Evtugyn // Matrafüred – International conference on chemical sensors. Oral and poster abstracts (Visegrad, Hungary, June 16-21, 2019). – Visegrad, 2019. – P.74

9. **Kulikova, T.** Discrimination of tea by the electrochemical determination of its antioxidant properties by a polyaniline – DNA – polyphenazine dye modified glassy carbon electrode / T. N. Kulikova, A. V. Porfireva, V. V. Vorobev, A. A. Saveliev, G. K. Ziyatdinova, G. A. Evtugyn // The 12th Winter Symposium on Chemometrics. Modern methods of data analysis. Abstracts (Saratov, Russia, February 24-28, 2020) – Saratov: «Саратовский источник», 2019. – P.69.