

УДК 543.9 + 544.6

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ДНК-СЕНСОР НА ДОКСОРУБИЦИН НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТОВ ОКСИДА ГРАФЕНА, ЭЛЕКТРОПОЛИМЕРИЗОВАННОГО АЗУРА А И МЕТИЛЕНОВОГО ЗЕЛЕННОГО

© 2024 г. А. В. Порфирьева^{а, *}, З. Ф. Хуснутдинова^а, Г. А. Евтюгин^а

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

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

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 06.09.2023 г.

Принята к публикации 10.09.2023 г.

Разработан вольтамперометрический ДНК-сенсор для определения доксорубина, сигналом которого служит изменение тока редокс-медиатора Метиленового зеленого, регистрируемое с помощью циклической вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде, модифицированном электрохимически восстановленным оксидом графена, электрополимеризованным Азуром А и ДНК, насыщенной Метиленовым зеленым. Установлено влияние природы полимерного слоя и используемого редокс-медиатора на чувствительность определения доксорубина. При оптимальном составе поверхностного слоя ДНК-сенсор позволяет определять до 0.01 пМ доксорубина. Сенсор апробирован на ряде модельных (искусственная урина, раствор Рингера–Локка, раствор бычьего сывороточного альбумина) и биологических образцов (слюна, урина), содержащих доксорубин.

Ключевые слова: ДНК-сенсор, биосенсор, электрохимически восстановленный оксид графена, электрополимеризация, Азур А, интеркалирование ДНК, определение доксорубина.

DOI: 10.31857/S0044450224060119, EDN: ttlogg

Одним из перспективных направлений развития современной аналитической химии является разработка электрохимических сенсоров и биосенсоров для контроля лекарств, биомаркеров заболеваний и различных токсикантов [1–3]. Традиционно для анализа антрациклиновых лекарственных препаратов цитостатического действия используют высокоэффективную жидкостную хроматографию и спектроскопические методы анализа [4]. Использование спектроскопии позволяет определять антрациклины на субмикромольном уровне. Хроматографические методы более чувствительны и селективны, но требуют значительных экономических затрат, включая более дорогостоящее оборудование, необходимость высокочистых растворителей, трудоемкой пробоподготовки и высокой квалификации персонала. В связи с этим в последнее время большое внимание уделяется развитию методов электрохимического анализа. Они характеризуются относительной простотой, обладают хорошо развитой теоретической базой, их результаты легко интер-

претировать. По точности и чувствительности электрохимические сенсоры могут конкурировать с хроматографическими методами, но при этом требуют минимальной пробоподготовки и легко адаптируются для использования вне лаборатории, в том числе по месту требования — в кабинете врача или у постели больного [5].

Современные электрохимические сенсоры используют химическую модификацию поверхности электрода — преобразователя сигнала для повышения регистрируемого тока, снижения рабочего потенциала и улучшения селективности определения различных аналитов. Электрохимически восстановленный оксид графена относится к числу перспективных модификаторов, в последнее десятилетие нашедших широкое применение в составе разнообразных электрохимических сенсоров и биосенсоров [6, 7]. Его получают путем катодной поляризации оксида графена, наносимого из суспензии на поверхность рабочего электрода. По сравнению с использованием сильных восстановителей такой подход экологически безопасен,

не приводит к образованию побочных продуктов, загрязняющих поверхностный слой электрода, характеризуется высокой эффективностью и позволяет получать модифицирующий материал с хорошо воспроизводимыми электрохимическими характеристиками [8].

Электрополимеризованные материалы с проводящими (полианилин, полипиррол) [9] и электроактивными свойствами (полифеназиновые, политрифенилметановые красители) [10] также успешно используют в составе электрохимических биосенсоров в качестве медиаторов электронного переноса, матрицы для иммобилизации биологических компонентов сенсоров и сигналообразующих компонентов. Их получение путем электролиза приводит к формированию устойчивой катионной пленки, способной электростатически удерживать противоположно заряженные компоненты слоя, формируя полиэлектролитные комплексы, обладающие собственной редокс-активностью. К числу компонентов таких поверхностных слоев относятся углеродные наноматериалы, заряженные отрицательно за счет ионизации поверхностных карбоксильных групп, и молекулы ДНК. Азур А относится к классу фенотиазинов, используемых в биохимии и аналитической химии в качестве индикаторов и прокрашивающих реагентов. Он способен образовывать электрополимеризованные покрытия на различных подложках [11–13]. В то же время описано [14–16] лишь несколько примеров использования электрополимеризованного Азура А (ПАА) в составе электрохимических сенсоров для определения глюкозы и НАДН, а также в составе ДНК-сенсоров для определения соединений, повреждающих ДНК [13], и для определения интеркалятора ДНК доксорубина [17].

Сигнал полимерных редокс-активных медиаторов в составе ДНК-сенсоров на соединения, способные к специфическому связыванию с ДНК, связан с влиянием подобных взаимодействий на распределение заряда в ДНК-содержащем слое. Интеркалирование меняет форму и распределение заряда фосфатных групп остова ДНК, что приводит к смещению равновесия окисления-восстановления полифенотиазинового красителя в слое. Для увеличения чувствительности определения таких взаимодействий в состав слоя вводят также дополнительные диффузионно свободные медиаторы электронного переноса [17, 18].

В данной работе впервые описано использование сочетания углеродного наноматериала (электрохимически восстановленного оксида графена, ЭХВОГ) с электрополимеризованным Азуром А для формирования ДНК-сенсора и определения доксорубина как модельного интеркалятора нативной ДНК. Изучены медиаторы электронного переноса, усиливающие сигнал интеркалирования, и установлено синергетическое действие

компонентов слоя при регистрации взаимодействий ДНК–доксорубин в присутствии Метиленового зеленого (МЗ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали Азур А хлорид (содержание красителя $\approx 80\%$), оксид графена (ОГ), ДНК из молок рыбы, Метиленовый синий (МС), Нейтральный красный (НК), гидрохинон (ГХ), Нильский синий (НС), Метиленовый зеленый, доксорубина гидрохлорид, бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, Германия), ДНК из эритроцитов цыпленка (Реанал, Венгрия). Все реагенты были категории ч. д. а. и analytical grade. Рабочие растворы реагентов и растворы для проведения электрохимических измерений готовили на деионизованной воде Millipore®.

Оборудование. Вольтамперометрические измерения проводили с помощью портативного биопотенциостата-гальваностата $\mu\text{Stat 400}$ Metrohm DropSens (DropSens, S.L., Испания). Для изготовления ДНК-сенсора использовали электроды, изготовленные из стеклоуглерода СУ 2000 (диаметр 1.6 мм, НИИГрафит, Москва) в оболочке из политетрафторэтилена с токоъемником из нержавеющей стали. Рабочая площадь поверхности составила 0.0283 см^2 . Потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения Ag/AgCl/3.0 M раствор KCl . Противоелектродом служила никелевая фольга. Измерения проводили в нетермостатированной трехэлектродной ячейке объемом 5 мл. Для измерения pH применяли цифровой иономер Экотест-001 (ЗАО “Эконикс-Эксперт”, Москва).

Получение покрытия электрохимически восстановленного оксида графена. Стеклоуглеродный электрод (СУЭ) полировали механически с помощью полировального набора CN Instruments (Кат. № CN1120, США), после чего ополаскивали водой, промывали ацетоном, серной кислотой, этанолом и дважды водой. Далее электрод очищали электрохимически путем циклирования потенциала между -1.0 и 1.0 В при скорости сканирования потенциала 0.1 В/с . Затем на рабочую поверхность СУЭ наносили 2 мкл водной суспензии оксида графена ($0.125\text{--}1.0\text{ мг/мл}$) и сушили на воздухе. После этого электрод, покрытый оксидом графена, помещали в ячейку, содержащую 5 мл 0.1 M фосфатного буферного раствора с pH 7.0, содержащего 0.1 M NaNO_3 , и проводили десятикратное циклирование потенциала в диапазоне от 0 до -1.3 В при скорости сканирования потенциала 0.05 В/с . В ходе сканирования наблюдали характерные катодные пики при $-0.95\text{...}-1.2\text{ В}$ (в зависимости от поверхностной концентрации оксида графена), изменение которых свидетельствовало о протекании электрохимического восстановления оксида графена.

Электрополимеризация Азура А. Стеклоуглеродный электрод, модифицированный ЭХВОГ, переносили в 0.1 М фосфатный буферный раствор с pH 7.0, содержащий 0.1 М NaNO₃ и 0.2 мМ Азура А, и поляризовали при 1.2 В в течение 300 с. Далее многократно сканировали его потенциал в интервале от -0.7 до 1.2 В при скорости сканирования потенциала 0.1 В/с (20 циклов). Электрополимеризацию контролировали по характерным изменениям пиков красителя на вольтамперограмме. Аналогичным образом получали покрытия при использовании только потенциостатического (1.2 В, 300 с) или только потенциодинамического режима электрополимеризации Азура А (область сканирования -0.7 ... 1.2 В, 0.1 В/с, 20 циклов). Далее электрод переносили в рабочий буферный раствор, не содержащий мономера, и проводили 10 циклов сканирования потенциала для удаления из полимерной пленки несвязавшихся частиц красителя.

Включение ДНК из различных источников в состав поверхностного слоя сенсора. На электрод, модифицированный ЭХВОГ/ПАА, наносили 2 мкл раствора ДНК из молок рыбы или эритроцитов цыпленка с концентрацией 1 мг/мл, высушивали на воздухе либо инкубировали в течение 10, 20 или 30 мин, затем промывали дистиллированной водой для удаления несвязавшихся реагентов.

Включение ДНК из молок рыбы и редокс-медиаторов в состав поверхностного слоя сенсора. На электрод, модифицированный ЭХВОГ/ПАА, капельно наносили 2 мкл раствора, полученного смешением равных объемов раствора ДНК из молок рыбы с концентрацией 1 мг/мл и 0.01 М раствора редокс-медиатора (МС, МЗ, НК, НС или ГХ, схема 1). Каплю высушивали, электрод промывали водой, после чего проводили десятикратное сканирование потенциала, как описано

выше, в диапазоне потенциалов -0.6 ... 0.8 В в случае МС, МЗ и ГХ и -1.2... 0.8 В для НК и НС, скорость сканирования потенциала 0.1 В/с. Ниже модифицирующий слой обозначен как ЭХВОГ/ПАА/ДНК + медиатор.

Определение доксорубина. ДНК-сенсор состава ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ помещали в ячейку с 0.1 М фосфатным буферным раствором с pH 7.0, содержащим 0.1 М NaNO₃, вольтамперометрический сигнал МЗ стабилизировали, как описано выше, после чего ДНК-сенсор инкубировали в 0.01 пМ–0.1 мкМ растворе доксорубина в течение 20 мин. Регистрировали циклическую вольтамперограмму в тех же условиях. Сигналом служило изменение катодного тока пика МЗ после контакта ДНК-сенсора с доксорубином. Предел обнаружения определяли из соотношения S/N = 3. Градуировочную зависимость строили в полулогарифмических координатах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение электрохимически восстановленного оксида графена. Электрохимическое восстановление ОГ имеет определенные преимущества по сравнению с химическим восстановлением. Подобные покрытия не содержат примесей, вносимых за счет введения в систему химических восстановителей. Кроме того, электрохимическое восстановление позволяет путем регулирования налагаемого потенциала контролировать количество восстанавливаемого ОГ и косвенно – присутствие на его поверхности кислородсодержащих функциональных групп [19, 20]. Для выбора условий модификации электрода на его поверхность наносили 2 мкл водной суспензии с концентрацией ОГ 1, 0.5, 0.25 или 0.125 мг/мл. С увеличением количества ОГ на электроде росли катодные токи

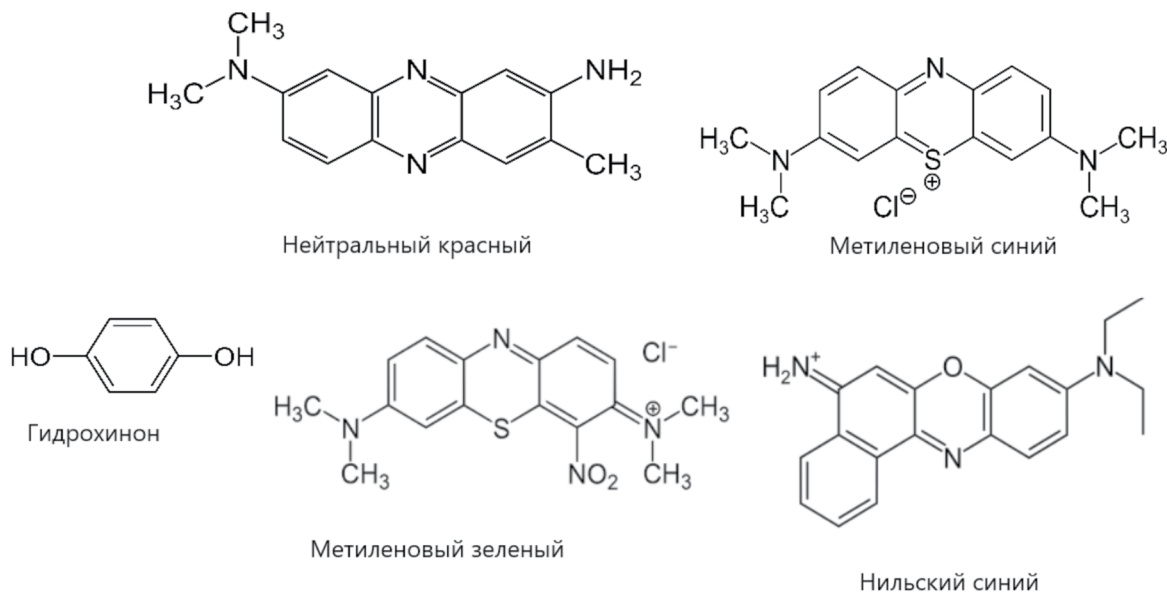


Схема 1. Структурные формулы использованных редокс-медиаторов.

электровосстановления, а пик восстановления смещался в сторону более отрицательных потенциалов.

Полученные ЭХВОГ-покрытия характеризовали методом циклической вольтамперометрии в присутствии 0.01 М феррицианида калия. Для этого сравнивали токи пиков окисления-восстановления феррицианид-иона и разность потенциалов пиков. В качестве оптимальной выбрали концентрацию суспензии ОГ 0.5 мг/мл, для которой наблюдали минимальную разность потенциалов редокс-пиков феррицианид-иона, максимальную близость соотношения токов пиков к единице и максимальные абсолютные значения токов пика окисления и восстановления (рис. 1). Рассчитанный по уравнению Рэндлса-Шевчика коэффициент шероховатости покрытия ЭХВОГ, полученного из ОГ с концентрацией 0.5 мг/мл, составил 1.13.

Нанесение электрополимеризованного Азура А и электрохимические характеристики покрытия ЭХВОГ/ПАА. Использование углеродных наноматериалов позволяет повысить эффективную площадь поверхности электрода, а наличие функциональных групп обеспечивает дополнительные взаимодействия между модифицирующими слоями. Для получения ПАА применяли потен-

циостатический и потенциодинамический режимы электрополимеризации, а также их сочетание (рис. 2а). При сравнении вольтамперограмм СУЭ с электрополимеризованными покрытиями, полученными в буферном растворе, не содержащем мономера Азура А, наблюдали две пары пиков, отнесенных к мономерной и полимерной формам фенотиразинового красителя [21]. Наибольшие токи пиков демонстрировали покрытия ЭХВОГ/ПАА, полученные при сочетании потенциостатического и потенциодинамического режимов электрополимеризации (рис. 2б). Сочетание потенциодинамического и потенциостатического режимов позволяет накопить на поверхности сенсора большее количество продукта электрополимеризации, что обеспечивает повышение чувствительности разработанного сенсора к включению в состав слоя молекул аналита за счет смещения окислительно-восстановительного равновесия в полимерном слое. Восстановленный оксид графена сохраняет после восстановления определенное количество кислородсодержащих карбоксилатных групп. Их отрицательные заряды дополнительно способствуют накоплению продукта электрополимеризации, заряженного положительно, по сравнению с чистым стеклоуглеродом.

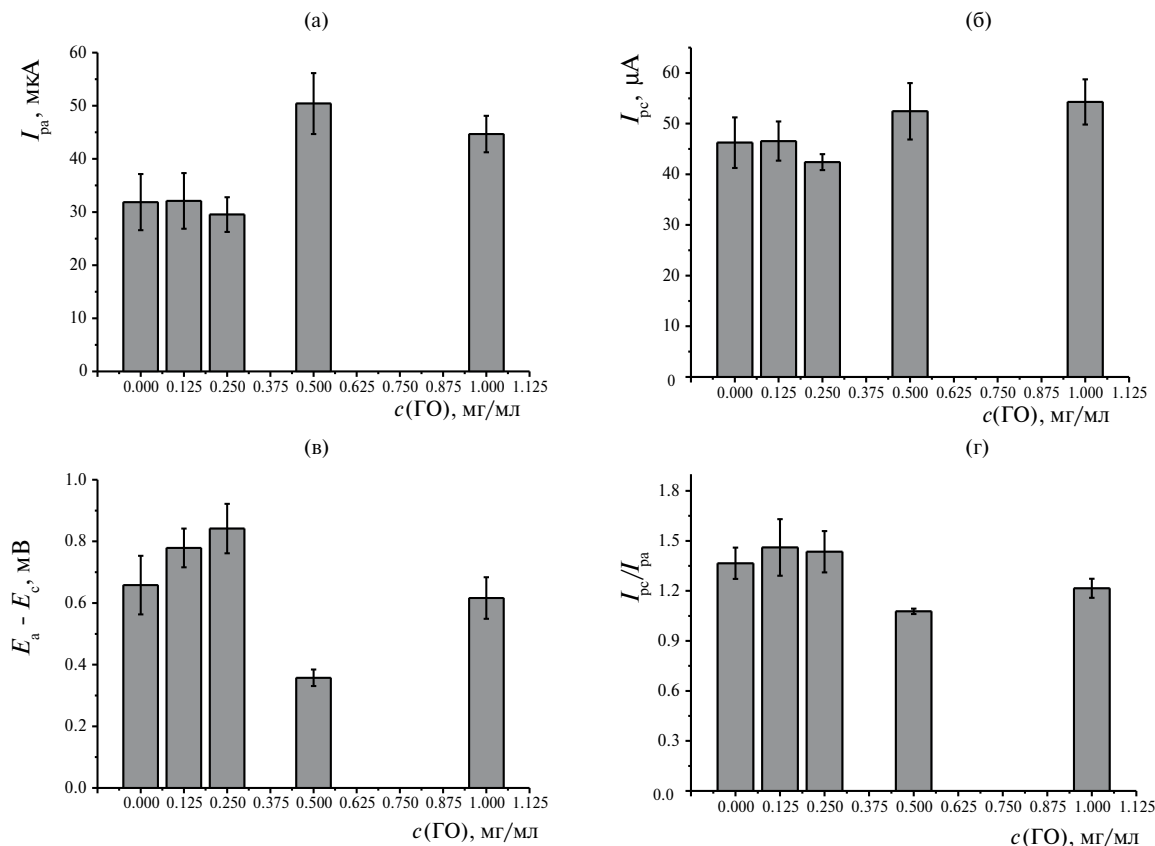


Рис. 1. (а) Токи пика окисления, (б) токи пика восстановления, (в) разность потенциалов пиков окисления и восстановления, (г) соотношение токов пиков окисления-восстановления 0.01 М феррицианида в зависимости от концентрации оксида графена, нанесенного на рабочую поверхность стеклоуглеродного электрода, на этапе его катодного восстановления.

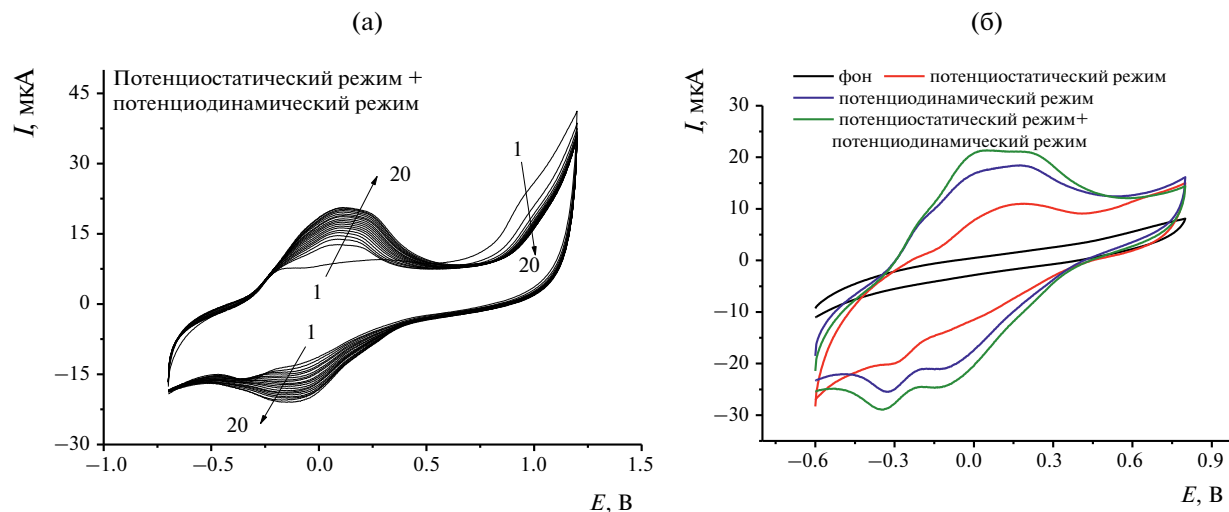


Рис. 2. (а) Циклические вольтамперограммы Азура А на СВЭ/ЭХВОГ в 0.1 М фосфатном буферном растворе с pH 7.0, содержащем 0.1 М NaNO_3 , для потенциостатического режима в сочетании с потенциодинамическим режимом; -1.2 В, 300 с, далее в интервале $-0.7 \dots 1.2$ В, 20 циклов, 0.1 В/с. (б) Циклические вольтамперограммы электрополимеризованного Азура А на СВЭ/ЭХВОГ для разных режимов электрополимеризации в 0.1 М фосфатном буферном растворе с pH 7.0, содержащем 0.1 М NaNO_3 , $-0.6 \div 0.8$ В, 0.1 В/с.

Вольтамперограммы демонстрировали достаточную стабильность полимерных покрытий при многократном циклировании потенциала, в том числе с промежуточным перемешиванием раствора в ячейке. Покрытия, синтезированные путем сочетания потенциостатического и потенциодинамического режимов электрополимеризации, отличались более высокими значениями токов покрытия. Их сигнал стабилизировался быстрее по сравнению с покрытиями, полученными с использованием только потенциостатического или только потенциодинамического режима электрополимеризации. В процессе электрополимеризации образующийся ПАА находился в окисленной форме и нес на себе положительный заряд, обеспечивающий электростатическое взаимодействие с ДНК.

Важным преимуществом указанного полимера является сохранение редокс-активности в широком диапазоне pH, включая область физиологических значений. Вид вольтамперограмм покрытия ЭХВОГ/ПАА в зависимости от pH фосфатного буферного раствора представлен на рис. 3. Ток пика окисления мономерной формы достаточно стабилен в кислой и слабокислой областях pH, при этом заметно снижается в нейтральной и слабощелочной областях. Ток пика окисления полимерной формы красителя незначительно меняется в диапазоне pH 2.0–7.0 с небольшим локальным максимумом при pH 4.0. В щелочной области токи пика окисления полимерной формы ПАА растут. Сигнал восстановления мономерной формы Азура А имеет максимум в области pH 7, тогда как ток восстановления полимерной формы красителя остается практически постоянным во всем изученном диапазоне pH, незначительно снижаясь при pH 7.0–8.0 (рис. 4).

Полусумму потенциалов пиков мономерной и полимерной форм использовали в качестве равновесного редокс-потенциала E_m . Для покрытия ЭХВОГ/ПАА наклон зависимости E_m –pH для мономера составил -72 мВ/pH (pH 2.0–7.0), что незначительно превышает нернстовский наклон для равного числа переносимых ионов водорода и электронов в потенциалопределяющей стадии. В диапазоне pH 7.0–9.0 наклон зависимости составил 31 мВ/pH. Это может быть связано с тем, что депротонирование, приводящее к отрыву иона водорода от фенотиазинового фрагмента в щелочной среде, происходит быстро и не влияет на общую скорость электродной реакции. Соответственно в щелочной среде в потенциалопределяющей стадии участвуют один ион водорода и два электрона. Для полимерной формы наблюдали наклон -62 мВ/pH (pH 2.0–6.0), что отвечает равному числу переносимых ионов водорода и электронов. В щелочной среде потенциал полимерной формы ПАА меняется нерегулярно.

Для установления природы лимитирующей стадии электродной реакции получили билогарифмическую зависимость тока пика от скорости сканирования потенциала. Для покрытия ЭХВОГ/ПАА сигналы окисления-восстановления мономерной формы демонстрируют тангенс угла наклона, близкий к 0.5 (0.54 и 0.57 соответственно), что свидетельствует о диффузионном характере процесса, для окисления полимерной формы наклон зависимости близок к единице (0.94), что свидетельствует об адсорбционном характере процесса. Для восстановления полимера наклон зависимости составил 0.85 (смешанный диффузионно-адсорбционный характер электродного процесса).

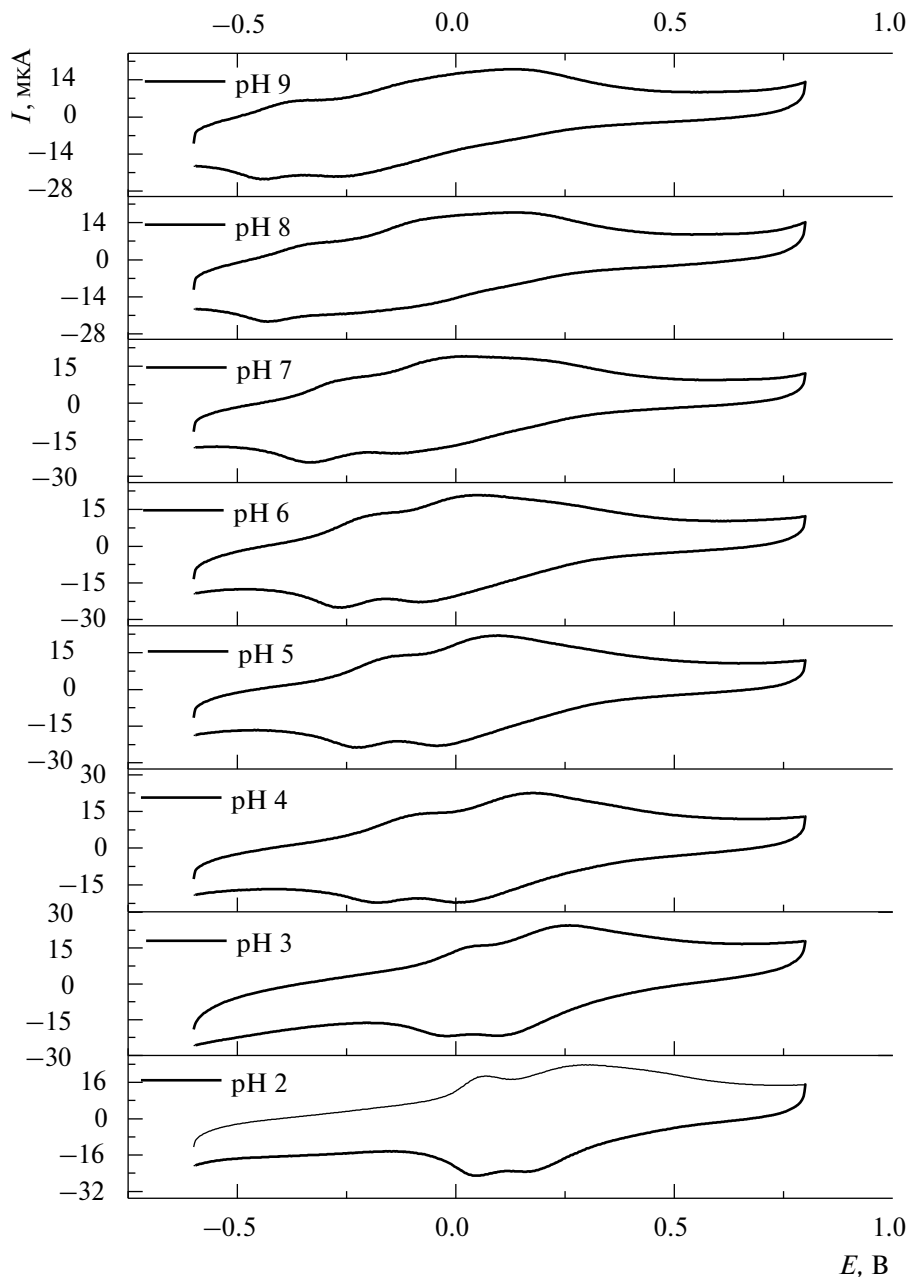


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы, полученные на СУЭ/ЭХВОГ/ПАА в 0.1 М фосфатном буферном растворе с pH 7.0, содержащем 0.1 М NaNO_3 , при pH 2.0–9.0.

Коэффициенты переноса электрона α , рассчитанные по уравнениям Лавирона (1) и (2) для восстановления мономера и окисления-восстановления полимера, демонстрируют смещение относительно симметричного переходного состояния электронного переноса ($\alpha = 0.5$) в сторону более стабильного окисленного состояния:

$$E_{\text{pc}} = E^{0'} + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{RTk_{\text{et}}}{\alpha nF} - \frac{RT}{\alpha nF} \ln \nu, \quad (1)$$

$$E_{\text{pa}} = E^{0'} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{(1-\alpha)nF}{RTk_{\text{et}}} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \nu. \quad (2)$$

Значения коэффициента переноса для окисления мономера красителя не рассчитывали, поскольку наклон соответствующей зависимости был отрицательным. Все изученные электрохимические параметры покрытия ЭХВОГ/ПАА представлены в табл. 1.

Включение ДНК в состав поверхностного слоя.

Иммобилизация ДНК – важный этап создания биосенсора, поскольку биополимер должен не только надежно закрепиться в поверхностном слое, но и сохранить при этом доступность для молекул аналита. Физическую адсорбцию ДНК можно проводить путем капельного нанесения аликвоты ее раствора поверх слоя модификато-

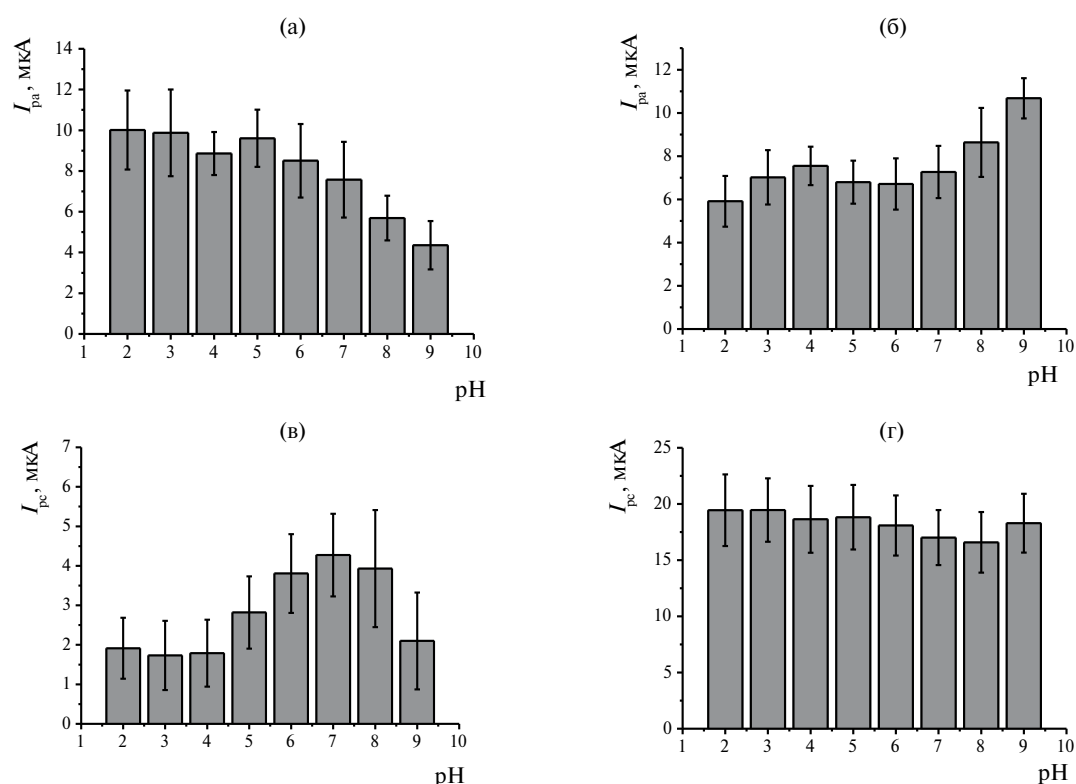


Рис. 4. Зависимость тока пика от pH на вольтамперограммах для СУЭ/ЭХВОГ/ПАА, диапазон сканирования $-0.6 \dots 0.8$ В, 0.1 В/с, (а) ток пика окисления мономерной формы, (б) ток пика окисления полимерной формы, (в) ток пика восстановления мономерной формы, (г) ток пика восстановления полимерной формы красителя.

ра с последующим высушиванием либо путем инкубирования модифицированного электрода в растворе ДНК в течение определенного времени с отмывкой несвязавшихся молекул ДНК. Для выбора оптимального варианта проводили высушивание на поверхности СУЭ/ЭХВОГ/ПАА 2 мкл раствора ДНК из молока рыбы или эритроцитов цыпленка с концентрацией 1 мг/мл, а также инкубирование электрода в растворе ДНК из молока рыбы в течение $10\text{--}30$ мин. Во всех случаях после контакта с ДНК электрод промывали водой и далее регистрировали циклическую вольтамперограмму в 0.1 М фосфатном буферном растворе

с pH 7.0 , содержащем 0.1 М NaNO_3 , в диапазоне потенциала от -0.6 до 0.8 В, скорость развертки 0.1 В/с. Контролировали изменение четырех пиков, которые относили к окислению-восстановлению мономерной и полимерной форм Азура А, дополнительных сигналов, относимых к реакциям нуклеотидов ДНК, при этом на вольтамперограмме не обнаруживали (рис. 5).

При инкубировании электрода в растворе ДНК наблюдали больший разброс результатов измерения по сравнению с высушиванием аликвоты раствора ДНК, поэтому в дальнейшем для иммобилизации ДНК выбрали ее капельное на-

Таблица 1. Электрохимические параметры покрытия ЭХВОГ/ПАА

Ток пика	Наклон зависимости $\lg(I) - \lg v$	Коэффициент переноса электрона	Наклон зависимости $E_p - \lg v$
Окисление мономера	0.544 ± 0.014	—	-0.030 ± 0.002
Восстановление мономера	0.566 ± 0.016	$\alpha = 0.70$	-0.085 ± 0.014
Окисление полимера	0.943 ± 0.028	$1 - \alpha = 0.94$	0.063 ± 0.003
Восстановление полимера	0.833 ± 0.022	$\alpha = 0.78$	-0.075 ± 0.005

несение с последующим высушиванием и отмывкой. Наибольшие изменения вольтамперограмм после контакта СУЭ/ПАА с ДНК наблюдали для сигналов окисления красителя. Нанесение ДНК из эритроцитов цыпленка с большей молекулярной массой не приводит к значимой разнице сигнала ЭХВОГ/ПАА после высушивания. В связи с этим для создания ДНК-сенсора использовали ДНК из молок рыбы.

Влияние природы дополнительных медиаторов электронного переноса. Инкубирование ДНК-сенсора состава СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК в растворе модельного интеркалятора доксорубина приводит к снижению токов пиков полимерного покрытия, однако указанные изменения невелики и не позволяют достоверно оценить вклад доксорубина в сигнал ДНК-сенсора. Для увеличения чувствительности определения доксорубина предложен подход, при котором ДНК предварительно насыщали растворимыми медиаторами электронного переноса – МС, НК, НС, МЗ или ГХ. Используемые компоненты (кроме ГХ) в растворе находились в катионной (окисленной) форме.

При этом МЗ, в отличие от МС, не проявляет интеркалирующей способности из-за присутствия в молекуле объемной нитрогруппы вблизи плоского фенотиазинового ядра. Вследствие этого МЗ взаимодействует с ДНК электростатически, локализуясь по малым бороздкам спирали ДНК. Гидрохинон выбрали, поскольку он часто используется в качестве редокс-индикатора, но его взаимодействие с модифицирующим покрытием не связано с электростатическими взаимодействиями.

Первоначально для оценки области редокс-активности медиаторов немодифицированный СУЭ помещали в ячейку, содержащую 1 мМ раствор индикатора в рабочем буферном растворе, и регистрировали вольтамперограмму в диапазоне потенциалов от -1.0 В до 0.6 В (0.1 В/с) (рис. 6). Во всех случаях на вольтамперограммах наблюдали хорошо выраженные редокс-пики в области -0.535 и -0.575 В для НК, -0.15 и -0.185 В для МС, 0.21 и -0.005 В для ГХ (пики окисления и восстановления соответственно). В случае МЗ наблюдали две пары редокс-пигов

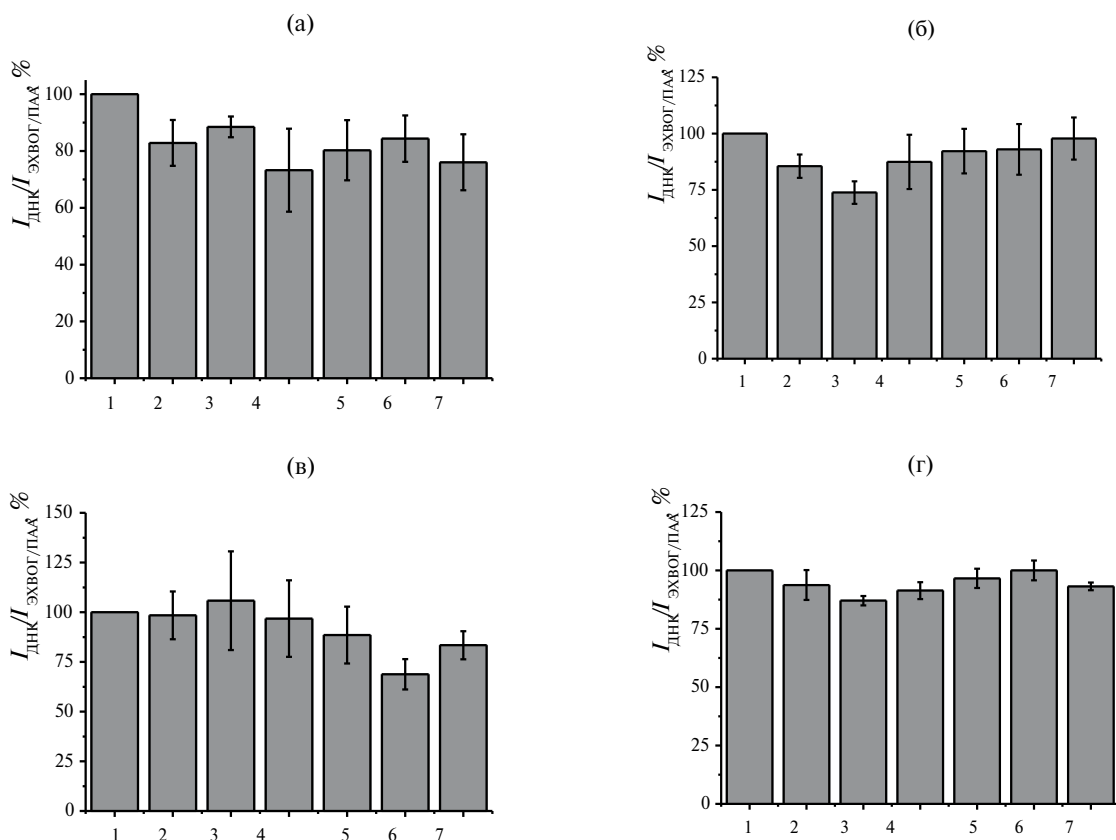


Рис. 5. Влияние способа включения ДНК из молок рыбы и эритроцитов цыпленка в состав поверхностного слоя на сигнал СУЭ/ЭХВОГ/ПАА. Циклическая вольтамперометрия, от -0.6 В до 0.8 В, 0.1 М фосфатный буферный раствор с pH 7.0, содержащий 0.1 М NaNO_3 , (а) окисление мономерной формы, (б) окисление полимерной формы, (в) восстановление мономерной формы, (г) восстановление полимерной формы. 1 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА, 2 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из молок рыбы (высушивание), 3 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из молок рыбы (высушивание)/доксорубин, 4–6 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из молок рыбы (инкубирование 10, 20, 30 мин соответственно), 7 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из эритроцитов цыпленка (высушивание).

при -0.16 и -0.235 В и при -0.03 и -0.065 В. Для НС на вольтамперограммах наблюдали две волны при -0.46 и -0.365 В, причем катодный сигнал был более выражен, чем анодный. Как видно, выбранные медиаторы проявляют собственную электрохимическую активность в разных областях потенциалов, что позволило в процессе скрининга охватить весь интересующий диапазон, включая область собственной редокс-активности ПАА.

Медиаторы в составе поверхностного слоя ДНК-сенсора. После включения медиатора в состав поверхностного слоя сенсора и стабилизации

токов на вольтамперограммах ДНК-сенсор инкубировали в течение 20 мин в 100 нМ растворе доксорубина, промывали водой и снова регистрировали вольтамперограмму.

На вольтамперограмме, полученной на СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МС, наблюдали хорошо выраженную пару пиков при -0.35 и -0.2 В. Сигнал МС достаточно стабилен при многократном циклировании потенциала (рис. 7а), но взаимодействие ДНК с доксорубином не влияет на его величину (рис. 7б). Соотношение величин анодных токов пика МС до и после введения 100 нМ раствора доксорубина составило $103 \pm 2\%$.

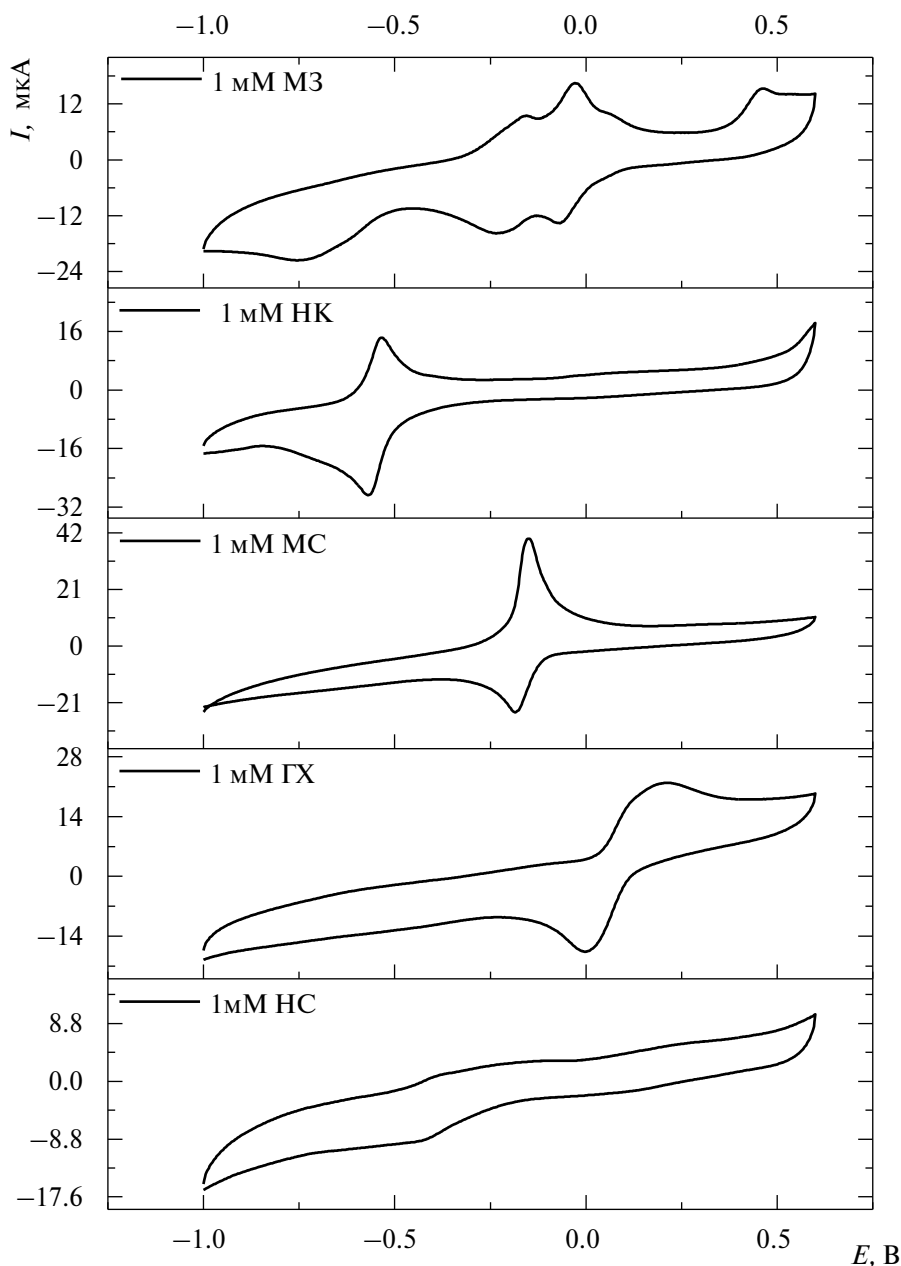


Рис. 6. Циклические вольтамперограммы 1 мМ Метиленового зеленого, Нейтрального красного, Метиленового синего, гидрохинона, Нильского синего на стеклоуглеродном электроде. Диапазон сканирования потенциала $-1.0 \dots 0.6$ В, 0.1 В/с, 0.1 М фосфатный буферный раствор с pH 7.0, содержащий 0.1 М NaNO_3

В случае НК сигналы на СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + НК выражены слабее. На вольтамперограмме наблюдали пару волн при -0.53 и -0.815 В (рис. 7в). Введение доксорубина оказывает несколько большее влияние на пики медиатора по сравнению с МС, но все-таки недостаточное для количественной характеристики взаимодействия ДНК–доксорубина (рис. 7г). Соотношение величин анодных токов НК до и после введения 100 нМ раствора доксорубина составило $114 \pm 2\%$.

При использовании НС сигнал медиатора на вольтамперограмме отсутствует (рис. 7д, е). Возможно, его концентрация в смеси с ДНК недостаточна для проявления заметной электрохимической активности в рассмотренной области потенциалов.

В случае ГХ на первых циклах сканирования потенциала наблюдали хорошо выраженную пару пиков, пропадающую при продолжении сканирования (рис. 7ж). По-видимому, ГХ не удерживается в слое ДНК на электроде, поскольку его незаряженная форма не вступает в электростатические взаимодействия с биополимером ДНК (рис. 7з).

В отличие от других медиаторов, в случае МЗ на вольтамперограммах удалось зафиксировать не только четкий сигнал медиаторной системы (рис. 7и), но и его значимые изменения при контакте с 100 нМ доксорубином (рис. 7к). Соотношение величин анодных токов пика МЗ до и после введения 100 нМ раствора доксорубина составило $58 \pm 6\%$.

Вероятно, при инкубировании ДНК-сенсора в растворе доксорубина антрациклиновый препарат вытесняет из слоя МЗ, электростатически удерживаемый на поверхности молекулы ДНК. Доксорубин встраивается в спираль ДНК за счет интеркалирования, увеличивает объем спирали ДНК, при этом в результате протонирования аминогруппы рибозного фрагмента молекулы доксорубина сохраняется возможность электростатического взаимодействия препарата с ДНК, приводящего к экранированию ее отрицательного заряда [22]. В результате вытеснения МЗ с поверхности ДНК его пик окисления снижается пропорционально концентрации доксорубина. Таким образом, МЗ выбрали в качестве оптимального медиатора для построения концентрационной зависимости для определения доксорубина.

Таким образом, МЗ показал наилучшие характеристики при регистрации влияния доксорубина по сравнению с другими медиаторами электронного переноса. Ранее аналогичные изменения сигнала в системе ДНК–антрациклин были обнаружены для МС [18]. Таким образом, выбор МЗ не связан непосредственно с проявлением интеркалирования, его отклик на включение доксорубина может быть отнесен к совокупно-

му влиянию всех компонентов слоя на электрохимическую доступность молекул МЗ для электронного переноса в пределах слоя.

Определение доксорубина на СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ. ДНК-сенсор состава СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ инкубировали в растворе доксорубина в течение 20 мин, после чего регистрировали циклическую вольтамперограмму в диапазоне потенциалов от -0.6 до 0.8 В со скоростью сканирования 0.1 В/с. Увеличение концентрации антрациклинового препарата приводит к закономерному снижению анодного тока пика медиатора. В диапазоне концентраций доксорубина от 0.01 пМ до 100 нМ наблюдали линейную зависимость $y = (12.3 \pm 0.7) - (4.04 \pm 0.06) \lg c_{\text{доксорубин}} (\text{М})$ с коэффициентом корреляции 0.998 , где y , %, – относительное снижение тока пика МЗ при контакте ДНК-сенсора с доксорубином. Предел обнаружения доксорубина составил 0.01 пМ.

В табл. 2 представлены аналитические характеристики определения доксорубина с помощью электрохимических сенсоров и биосенсоров, описанных в литературе. В целом электрохимические сенсоры, в которых сигналом служит ток окисления самого доксорубина, демонстрируют худшие характеристики по сравнению с ДНК- и аптасенсорами, обеспечивающими более эффективное распознавание и накопление аналита в приэлектродном слое. Разработанный ДНК-сенсор на доксорубин демонстрирует наиболее широкий диапазон определяемых концентраций и наиболее низкий предел обнаружения по сравнению с приведенными в табл. 2 сенсорами.

Анализ реальных образцов. Для апробации разработанного ДНК-сенсора и оценки возможности его использования для определения доксорубина в биологических средах строили градуировочные зависимости для определения доксорубина в ряде модельных растворов и реальных биологических образцах. В качестве модельных растворов использовали раствор искусственной урины, содержащий 20 мМ КСl, 49 мМ NaCl, 15 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ CaCl_2 , 18 мМ NH_4Cl и 18 мМ мочевины [33], раствор Рингера–Локка [18] для имитации электролитов плазмы крови – 154 мМ NaCl, 5.6 мМ KCl, 2.2 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 мМ NaHCO_3 , 2.5 мМ MgSO_4 , 3.2 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.3 мМ D-глюкозы и раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 41.4 мг/мл, которая соответствует нормальному уровню сывороточного альбумина у взрослых. В качестве биологических образцов использовали образцы урины и слюны от условно здорового донора. Образцы искусственной и человеческой урины подвергали корректировке pH до 7.0 с последующей фильтрацией через фильтровальную бумагу в случае визуального наблюдения выделения осадка.

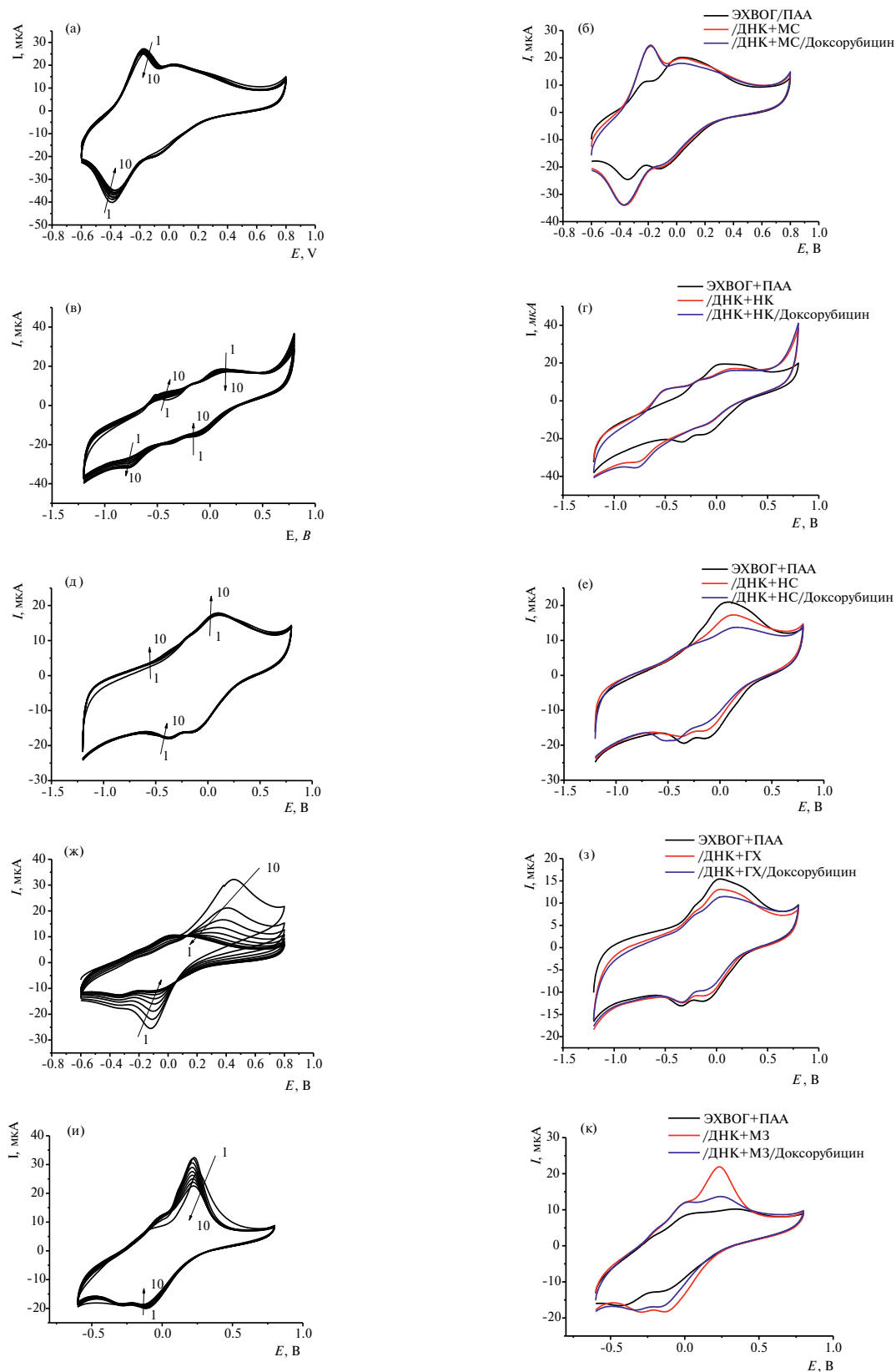


Рис. 7. Стабилизация вольтамперометрического сигнала (10 циклов, стрелки показывают изменения с увеличением числа циклов): (а) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МС, (в) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + НК, (д) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + НС, (ж) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + ГХ, (и) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ. Диапазон сканирования потенциала: (а, ж, и) $-0.6 \dots 0.8$ В, (в, д) $-1.2 \dots 0.8$ В, 0.1 В/с. Циклические вольтамперограммы для СУЭ/ЭХВОГ/ПАА, СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + медиатор, СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + медиатор/доксорубин при использовании в качестве медиатора (б) МС, (г) НК, (е) НС, (з) ГХ, (к) МЗ; в 0.1 М фосфатном буферном растворе с $\text{pH } 7.0$, содержащем 0.1 М NaNO_3 . Диапазон сканирования потенциала: (б, з, к) $-0.6 \dots 0.8$ В, (г, е) $-1.2 \dots 0.8$ В, 0.1 В/с.

Таблица 2. Аналитические характеристики определения доксорубина с помощью электрохимических сенсоров, ДНК- и аптасенсоров

Электрод/модификатор	Метод определения	Линейный диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Литература
Электрохимические сенсоры				
СУЭ/полипиррол/нчAu/ЭХВОГ	ЦВА	0.02 мкМ–5.2 мМ, 5.2–25 мМ	0.02 мкМ	[23]
СУЭ/допированное S УНВ/FeV	Хроноамперометрия	20 нМ–542.5 мкМ	5.2 нМ	[24]
СУЭ/ПНСОК	ДИВА	1 нМ–1 мкМ, 2–12 мкМ	0.15 нМ	[25]
УПЭ/ЭХВОГ/ВУКМП	ДИВА	1–15 мкМ	1 нМ	[26]
СУЭ/ацетиленовая сажа	ЦВА	0.01–2.5 мкМ	3.006 нМ	[27]
УПЭ/MgO/УТ	ЦВА	0.1–10 мкМ	0.09 мкМ	[28]
Электрохимические ДНК- и аптасенсоры				
СУЭ/УЧ/АЖ/ДНК	СЭИ	0.1 пМ–1 нМ	0.07 пМ	[29]
Au/ЭХВОГ/нчAu/аптамер	КВВА	0.3 мкМ–6 мкМ	0.1 мкМ	[30]
СУЭ/ОУНТ/ДНК	ДИВА	1 нМ–20 мкМ	0.6 нМ	[31]
СУЭ/УЧ/П[5]А/ПМС/ПНК/ТКА +ДНК	ЦВА	0.5 пМ–1 нМ	0.13 пМ	[32]
СУЭ/ПАА+УЧ/ДНК+МС	ЦВА	0.1 пМ–100 нМ	0.03 пМ	[17]
СУЭ/ПАА+фМУНТ/ДНК+МС		Анодные токи: 0.3 пМ–0.1 нМ; катодные токи: 0.3 пМ–0.03 нМ	Анодные токи: 0.3 пМ Катодные токи: 0.3 пМ	
СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК+МЗ	ЦВА	0.01 пМ–100 нМ	0.01 пМ	Данная работа

Обозначения: АЖ – акридиновый желтый, ВУКМП – вертикально упорядоченные кремниевые мезопористые пленки, ДИВА – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, КВВА – квадратно-волновая вольтамперометрия, нчAu – наночастицы золота, П[5]А – пиллар[5]арен, ПАА – поли(Азур А), ПМС – поли(Метиленовый синий), ПНК – поли(Нейтральный красный), ПНСОК – полые наносферы оксида кобальта, СЭИ – спектроскопия электрохимического импеданса, ТКА – тиакаликс[4]арен, УНВ – углеродное нановолокно, УПЭ – углеродсодержащий печатный электрод, УТ – углеродные точки, УЧ – углеродная чернь, фМУНТ – функционализированные многостенные углеродные нанотрубки, ЦВА – циклическая вольтамперометрия, ЭХВОГ – электрохимически восстановленный оксид графена.

Для всех использованных образцов подбирали оптимальные условия разбавления, нивелирующие мешающее влияние матричных компонентов. Так, искусственную урину разбавляли рабочим буферным раствором в объемном соотношении 1 : 1, раствор Рингера– Локка – в пропорции 1 : 2, человеческую слюну – 1 : 5, образец урины не требовал разбавления. Наибольшее влияние оказывал бычий сывороточный альбумин, для минимизации его влияния исследуемый раствор разбавляли в соотношении 1 : 20. Некоторое занижение сигнала наблюдали для образцов слюны, что могло быть связано с частичной неспецифической сорбцией доксорубина на белках и иных олигомерных компонентах, входящих в ее состав.

Правильность определения доксорубина контролировали методом введено–найдено. Степень открытия в реальных образцах представлена в табл. 3.

ДНК-сенсор состава СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ показал удовлетворительные результаты определения доксорубина в модельных системах и биологических образцах. Следует отметить, что отбор подобных биологических образцов не предусматривает инвазивных процедур, поэтому определение антрациклиновых препаратов можно проводить, не травмируя физически и психологически пациентов, получающих терапию данным препаратом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложен-

ными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Биологические образцы слюны и мочи были добровольно предоставлены авторами данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Congur G. Electrochemical biosensors for monitoring of drug-DNA interactions // *Curr. Top. Med. Chem.* 2023. V. 23, № 4. P. 316.
2. Negahdary M., Sharma A., Anthopoulos T.D., Angnes L. Recent advances in electrochemical nanobiosensors for cardiac biomarkers // *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2023. V. 164. Article 117104.
3. Kadam U.S., Hong J.C. Advances in aptameric biosensors designed to detect toxic contaminants from food, water, human fluids, and the environment // *Trends Environ. Anal. Chem.* 2022. V. 36. Article e00184.
4. Pashaei Y., Mehrabi M., Shekarchi M. A review on various analytical methods for determination of anthracyclines and their metabolites as anti-cancer chemotherapy drugs in different matrices over the last four decades // *TrAC, Trends in Anal. Chem.* 2020. V. 130. Article 115991.
5. Campuzano S., Pedrero M., Yáñez-Sedeño P., M. Pingarrón J. New challenges in point of care electrochemical detection of clinical biomarkers // *Sens. Actuators, B.* 2021. V. 345. Article 130349.
6. Huang X., Shi W., Bao N., Yu C. Electrochemically reduced graphene oxide and gold nanoparticles on an indium tin oxide electrode for voltammetric sensing of dopamine // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. № 5. Article 310.
7. Lin X., Lian X., Luo B., Huang X.-C. A highly sensitive and stable electrochemical HBV DNA biosensor based on ErGO-supported Cu-MOF // *Inorg. Chem. Commun.* 2020. V. 119. Article 108095.
8. Zhou A., Bai J., Hong W., Bai H. Electrochemically reduced graphene oxide: Preparation, composites, and applications // *Carbon.* 2022. V. 191. P. 301.
9. Tran L.T., Tran H.V., Cao H.H., Tran T.H., Huynh C.D. Electrochemically effective surface area of a polyaniline nanowire-based platinum microelectrode and development of an electrochemical DNA sensor // *J. Nanotechnol.* 2022. V. 2022. Article 8947080.
10. Dalkiran B., Brett C.M. A. Polyphenazine and polytriphenylmethane redox polymer/nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors: A review // *Microchim. Acta.* 2021. V. 188. Article 178.
11. Agrisuelas J., Gimenez-Romero D., Garcia-Jareno J.J., Vicente F. Vis/NIR spectroelectrochemical analysis of poly-(Azure A) on ITO electrode // *Electrochem. Commun.* 2006. V. 8. № 4. P. 549.
12. Chen C., Mu S. Electrochemical polymerization of azure A and properties of poly(azure A) // *J. Appl. Polym. Sci.* 2003. V. 88. № 5. P. 1218.
13. Evtugyn G., Porfireva A., Plastinina K., Evtugyn V., Kuzin Y. Electrochemical DNA sensor based on poly(Azure A) obtained from the buffer saturated with chloroform // *Sensors.* 2021. V. 21. № 9. Article 2949.
14. Gao Q., Wang W., Ma Y., Yang X. Electrooxidative polymerization of phenothiazine derivatives on screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system // *Talanta.* 2004. V. 62. № 3. P. 477.
15. Liu T., Luo Y., Zhu J., Kong L., Wang W., Tan L. Non-enzymatic detection of glucose using poly(azureA)-nickel modified glassy carbon electrode // *Talanta.* 2016. V. 156-157. P. 134.
16. Gao Q., Sun M., Peng P., Qi H., Zhang C. Electro-oxidative polymerization of phenothiazine dyes into a multilayer-containing carbon nanotube on a glassy carbon electrode for the sensitive and low-potential detection of NADH // *Microchim. Acta.* 2010. V. 168. P. 299.
17. Porfireva A., Begisheva E., Rogov A., Evtugyn G. One-step electropolymerization of Azure A and carbon nanomaterials for DNA-sensor assembling and doxorubicin biosensing // *C—Journal of Carbon Research.* 2022. V. 8. Article 75.
18. Goida A., Kuzin Y., Evtugyn V., Porfireva A., Evtugyn G., Hianik T. Electrochemical sensing of idarubicin—DNA interaction using electropolymerized azure B and methylene blue mediation // *Chemosensors.* 2022. V. 10. Article 33.
19. Evtugyn G.A., Porfireva A.V., Belyakova S.V. Electrochemical DNA sensors for drug determination // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022. V. 221. Article 115058.

Таблица 3. Определение 10 пМ доксорубина в образцах по току окисления Метиленового зеленого методом циклической вольтамперометрии (сигнал стандартного образца — $56.4 \pm 7.6\%$)

Модельный/реальный образец	Сигнал доксорубина в образце, %	Степень открытия (по логарифму концентрации), %
Искусственная урина (1 : 1)	55 ± 3	97 ± 6
Раствор Рингера—Локка (1 : 2)	55 ± 4	97 ± 7
Раствор бычьего сывороточного альбумина (1 : 20)	56 ± 9	98 ± 15
Человеческая слюна (1 : 5)	51 ± 6	90 ± 11
Человеческая урина	55 ± 3	98 ± 5

20. Zhou M., Wang Y., Zhai Y., Zhai J., Ren W., Wang F., Dong S. Controlled synthesis of large-area and patterned electrochemically reduced graphene oxide films // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. № 25. P. 6116.
21. Sha Y., Gao Q., Qi B., Yang X. Electropolymerization of Azure B on a screen-printed carbon electrode and its application to the determination of NADH in a flow injection analysis system // *Microchim. Acta.* 2004. V. 148. P. 335.
22. Pérez-Arnaiz C., Busto N., Leal J.M., García B. New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin Interaction // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 5. P. 1288.
23. Behravan M., Aghaie H., Giahi M., Maleknia L. Determination of doxorubicin by reduced graphene oxide/gold/polypyrrole modified glassy carbon electrode: A new preparation strategy // *Diamond Relat. Mater.* 2021. V. 117. Article 108478.
24. Rajaji U., Yogesh K.K., Chen S.-M., Raghu M.S., Parashuram L., Alzahrani F.M., et al. Deep eutectic solvent synthesis of iron vanadate-decorated sulfur-doped carbon nanofiber nanocomposite: electrochemical sensing tool for doxorubicin // *Microchim. Acta.* 2021. V. 188. Article 303.
25. Ouyang Y., Liang M., Wang F., Mei S., Mo G. Direct electrochemistry of doxorubicin and its ultrasensitive detection using a novel porous thorny carbon dodecahedron // *New J. Chem.* 2022. V. 46. P. 23039.
26. Lv N., Qiu X., Han Q., Xi F., Wang Y., Chen J. Anti-biofouling electrochemical sensor based on the binary nanocomposite of silica nanochannel array and graphene for doxorubicin detection in human serum and urine samples // *Molecules.* 2022. V. 27. № 24. Article 8640.
27. Sun S., Xu X., Niu A., Sun Z., Zhai Y., Li S., Xuan C., Zhou Y., Yang X., Zhou T., Tian Q. Novel electrochemical sensor based on acetylene black for the determination of doxorubicin in serum samples // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2022. V. 17. № 11. Article 221187.
28. Singh Th. A., Sharma V., Thakur N., Tejwan N., Sharma A., Das J. Selective and sensitive electrochemical detection of doxorubicin via a novel magnesium oxide/carbon dot nanocomposite based sensor // *Inorg. Chem. Commun.* 2023. V. 150. Article 110527.
29. Kulikova T., Porfireva A., Rogov A., Evtugyn G. Electrochemical DNA sensor based on acridine yellow adsorbed on glassy carbon electrode // *Sensors.* 2021. V. 21. № 22. Article 7763.
30. Kong F., Luo J., Jing L., Wang Y., Shen H., Yu R., Sun S., Xing Y., Ming T., Liu M., Jin H., Cai X. Reduced graphene oxide and gold nanoparticles-modified electrochemical aptasensor for highly sensitive detection of doxorubicin // *Nanomaterials.* 2023. V. 13. № 7. Article 1223.
31. Moghadam F.H., Taher M.A., Karimi-Maleh H. Doxorubicin anticancer drug monitoring by ds-DNA-based electrochemical biosensor in clinical samples // *Micromachines.* 2021. V. 12. № 7. Article 808.
32. Kappo D., Shurpik D., Padnya P., Stoikov I., Rogov A., Evtugyn G. Electrochemical DNA sensor based on carbon black—poly(methylene blue)—poly(neutral red) composite // *Biosensors.* 2022. V. 12. № 5. Article 329.
33. Laube N., Mohr B., Hesse A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines // *J. Cryst. Growth.* 2001. V. 233. № 1-2. P. 367.

ORIGINAL ARTICLES

ELECTROCHEMICAL DNC-SENSOR FOR DOXORUBICIN BASED ON COMPOSITES OF GRAPHENE OXIDE, ELECTROPOLYMERIZED AZUR A AND METHYLENE GREEN

A. V. Porfirieva^{a, *}, Z. F. Khusnutdinova^a, G. A. Evtugyn^a

^aKazan Federal University, A.M. Butlerov Chemical Institute, 420008 Kazan, Russia

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

Received July 11, 2023. Revised September 6, 2023. Accepted September 10, 2023

Abstract. A voltammetric DNA sensor for the determination of doxorubicin was developed, the signal of which is the change in the current of the redox mediator Methylene green, recorded by cyclic voltammetry on a glass-carbon electrode modified with electrochemically reduced graphene oxide, electropolymerized Azur A and DNA saturated with Methylene green. The influence of the nature of the polymer layer and the redox mediator used on the sensitivity of doxorubicin determination was determined. At optimal composition of the surface layer the DNA-sensor allows to determine up to 0.01 pM of doxorubicin. The sensor was tested on a number of model (artificial urine, Ringer-Locke's solution, bovine serum albumin solution) and biological samples (saliva, urine) containing doxorubicin.

Keywords: DNA sensor, biosensor, electrochemically reduced graphene oxide, electropolymerization, Azur A, DNA intercalation, doxorubicin detection.