

На правах рукописи

МОИСЕЕВА ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
СТАЦИОНАРНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ФАРМПРЕПАРАТОВ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2007

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Определение и изучение взаимодействия эффекторов ДНК различной природы является актуальной проблемой современной аналитической химии. К таким эффекторам относятся, в частности, тяжелые металлы и противоопухолевые препараты. Эти эффекторы имеют высокое сродство к молекулам ДНК организма, поэтому их определение с помощью ДНК как аналитического реагента и ДНК-содержащих аналитических систем очень перспективно и актуально.

Известно, что тяжелые металлы, попадая в организм из среды промышленных предприятий и природных вод, вызывают повреждения в цепи ДНК, что говорит о потенциальной мутагенности и генотоксичности даже таких металлов, которые до недавнего времени считались относительно безопасными, например меди и кобальта. С одной стороны, эти металлы являются необходимыми (эссенциальными) для организма, так как они, наряду с железом, принимают участие в образовании гема и их недостаток приводит к развитию злокачественных анемий. С другой стороны, содержание данных тяжелых металлов в биосфере должно строго контролироваться, согласно решению Целевой группы по выбросам Европейской экономической комиссии ООН и данные металлы признаны генотоксичными Международным агентством по исследованию раковых заболеваний, поскольку возможна интоксикация организма данными тяжелыми металлами при массовых выбросах на производстве, а также при нарушениях в биохимических процессах организма, приводящих к денатурации ДНК клеток. В этом плане особенно актуальна проблема исследования малоизученной системы эффектор-денатурированная односпиральная ДНК (д-ДНК), которая максимально адекватно моделирует процессы, происходящие в организме под действием денатурирующих агентов. Результаты таких исследований могли бы помочь в предсказании механизма такого воздействия и в выборе детоксикантов.

Эффекторами ДНК являются также цитостатики - противоопухолевые препараты, которые прочно связываются с ее цепями и подавляют синтез ДНК раковых клеток. Однако с целью снижения возможных побочных эффектов и подбора правильной индивидуальной дозировки препаратов, выяснения их фармакокинетики является актуальным определение фармпрепаратов в многокомпонентных биологических жидкостях, в том числе в сыворотке крови человека.

В эколого-аналитическом мониторинге тяжелых металлов и в анализе противоопухолевых препаратов применяется ряд стандартных методов для определения данных эффекторов в объектах окружающей среды и в биологических жидкостях (кровь, сыворотка, моча) – это методы масс-спектрометрии, атомно-абсорбционной спектрометрии, спектрофотометрии и др. Однако применение их на практике имеет ряд недостатков, например дорогостоящее оборудование, длительность проведения анализа и пробоподготовки и др.

В случае мониторинга противоопухолевых препаратов в условиях отечественных клинических лабораторий регулярного контроля за содержанием данных фармпрепаратов в сыворотке крови пациентов не проводится.

Электрохимические биосенсоры на основе ДНК позволяют изучать взаимодействие эффекторов с ДНК и определять их достаточно быстро, без дорогостоящего оборудования, без длительной пробоподготовки, достаточно специфично и селективно, на уровне малых концентраций.

Таким образом, актуальна разработка биоаффинных методов определения различных эффекторов ДНК на основе амперометрических ДНК-сенсоров.

Цель исследования. Разработка и оптимизация биоаффинных способов определения эффекторов ДНК различной природы – тяжелых металлов на примере ионов кобальта (II), в том числе при совместном присутствии на примере ионов кобальта (II) и меди (II), а также противоопухолевых препаратов – антибиотика адрибластина и алкалоида онковина амперометрическими ДНК-сенсорами на основе стационарных электродов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить количественные характеристики процесса комплексообразования эффекторов с различными формами иммобилизованной ДНК с целью оптимизации биоаффинных методов их определения;
- выяснить роль специфической адсорбции тяжелых металлов в процессе их мембранного концентрирования на БС и определение аффинной константы связывания ионов кобальта (II) с иммобилизованной на мембране д-ДНК (д-ИДНК);
- на основании полученных данных разработать биоаффинный способ определения кобальта(II) в присутствии матричных компонентов в модельных растворах и реальных образцах природной воды и сыворотки крови с помощью д-ИДНК-содержащего БС;
- разработать биоаффинный способ определения антибиотика антрациклиновой группы на примере адрибластина с помощью р-ИДНК-содержащего БС на основе СРПЭ в модельных растворах и в образцах сыворотки крови;
- разработать биоаффинный способ определения алкалоида индолового ряда на примере онковина с помощью р-ИДНК-содержащего БС на основе СРПЭ в модельных растворах и в образцах сыворотки крови.

Научная новизна полученных в диссертации результатов заключается в том, что

- получены количественные характеристики комплексообразования денатурированной иммобилизованной ДНК с ионами тяжелых металлов и эффективные константы устойчивости и доли комплексных форм для ионов кобальта (II) и константы аффинного связывания ионов кобальта (II) для целенаправленной разработки способа определения тяжелых металлов с помощью амперометрического ДНК-сенсора на основе стационарного ртутно-пленочного электрода (СРПЭ);

- рассчитана максимальная сорбционная емкость биочувствительной части ДНК-сенсора и установлена возможность определения кобальта (II) и меди (II) при совместном присутствии на основании изотерм биоаффинной сорбции ионов металлов на ДНК-модифицированной мембране;
- получены количественные характеристики комплексообразования молекул цитостатиков - интеркаляторов, с иммобилизованной ренатурированной ДНК, подтверждающие целесообразность использования выбранной формы ДНК при иммобилизации в составе ДНК-сенсора на основе СРПЭ;
- предложен биоаффинный способ селективного определения тяжелых металлов на примере ионов кобальта (II) и меди (II) с помощью д-ИДНК-содержащего БС на основе СРПЭ;
- разработан биоаффинный способ определения противоопухолевого антибиотика антрациклиновой группы адрибластина с помощью р-ИДНК-содержащего БС на основе СРПЭ;
- разработан биоаффинный способ определения природного алкалоида онковина, обладающего противоопухолевой активностью, с помощью р-ИДНК-содержащего БС;
- установлены оптимальные условия использования разработанных способов определения тяжелых металлов и фармпрепаратов в сыворотке крови при диагностике заболеваний, а также тяжелых металлов в природных объектах при экологическом мониторинге.

Практическая значимость. На основе полученных ДНК-сенсоров разработаны биоаффинные способы определения тяжелых металлов и фармпрепаратов. Использование этих способов позволяет определять токсиканты на уровне ПДК и меньших концентраций и судить об их потенциальной мутагенной и канцерогенной активности. Анализ образцов на содержание фармпрепаратов необходим при контроле их качества в процессе фармпроизводства и в сыворотке крови пациентов в процессе терапевтического мониторинга.

Разработанные методики анализа просты, относительно дешевы, требуют очень малый объем образцов. Правильность разработанных методик установлена сравнением со стандартными независимыми методами. Методики определения апробированы при анализе реальных образцов. Представляет интерес использовать данные ДНК-сенсоры в анализе образцов природной воды и биологических жидкостей в условиях медицинских лабораторий и лабораторий эколого-аналитического контроля.

На защиту автор выносит:

- обоснование выбора формы молекул ДНК для иммобилизации в составе биосенсора на основании исследования комплексообразования кобальта (II) и противоопухолевых препаратов с различными формами ДНК;

- результаты изучения специфической адсорбции ионов Co(II) на ДНК-содержащей мембране в составе биосенсора, а также при совместной адсорбции ионов Co(II) и Cu(II);
- способ определения кобальта (II) и меди (II) с помощью амперометрического биосенсора на основе выбранной формы иммобилизованной денатурированной ДНК и СРПЭ;
- биоаффинные способы определения противоопухолевых препаратов – интеркаляторов различной природы (антибиотиков и алкалоидов) с помощью амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной денатурированной ДНК и СРПЭ;
- выбор оптимальных параметров работы ДНК-сенсоров: времени концентрирования, времени реактивации, pH, условий реактивации;
- аналитические и метрологические характеристики методик анализа различных объектов на содержание тяжелых металлов и фармпрепаратов.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и изложены в материалах: Международной конференции «Ломоносов-2000» (Москва, 2000), Поволжской конференции по аналитической химии (Казань, 2001), Итоговой научной студенческой конференции КГУ (Казань, 2000), Всероссийской конференции «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2001), Международной научной конференции «Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий» (Томск, 2006), Всероссийской конференции «Экоаналитика-2006» (Самара, 2006), Международного конгресса по аналитической химии ICAS-2006 (Москва, 2006).

Публикации. По тематике диссертационной работы опубликовано 12 работ. Из них 3 статьи в научных журналах и 9 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Настоящая работа является частью исследований проводимых на кафедре неорганической химии Казанского государственного университета в рамках темы Министерства образования и науки РФ «Координационные соединения 3d-переходных, платиновых и редкоземельных металлов, термодинамика и кинетика образования в различных средах, синтез строение, свойства, направления практического использования» (рег. № 01.960002010).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 143 страницах, содержит 18 таблиц, 27 рисунков и библиографию, включающую 166 ссылок. Диссертационная работа состоит из введения и шести глав: обзора литературы, экспериментальной части, четырех глав результатов и их обсуждения, а также выводов и списка используемой литературы.

В первой главе представлен обзор литературных данных по функционированию ДНК и ее эффекторов в организме и электрохимическим методам их определения. Основное внимание уделено использованию электрохимических ДНК-сенсоров.

Во второй главе описаны объекты и методы исследования, аппаратура. Приведены методики иммобилизации различных форм ДНК, а также методики построения изотерм биоаф-

финной сорбции тяжелых металлов и получения констант устойчивости и аффинного связывания тяжелых металлов и фармпрепаратов с различными формами иммобилизованной ДНК.

В третьей главе изложены результаты изучения взаимодействия тяжелых металлов с ДНК и их определения с помощью амперометрического ДНК-сенсора на основе д-ИДНК.

В четвертой главе отражено изучение взаимодействия с ДНК противоопухолевого антибиотика антрациклиновой группы на примере адрибластина, оказывающего цитостатическое действие за счет интеркаляции; приведены результаты его определения с помощью р-ИДНК-сенсора.

Глава 5 посвящена разработке биоаффинного метода определения с помощью р-ИДНК-сенсора природного алкалоида индолового ряда на примере онковина, также являющегося интеркалятором; представлены результаты изучения процесса его комплексообразования с р-ИДНК.

Глава 6 посвящена аналитическому применению разработанных амперометрических ДНК-сенсоров на основе стационарных электродов в анализе объектов окружающей среды и сыворотки крови человека.

Автор выражает благодарность заведующему кафедрой неорганической химии Казанского университета Н.А. Улаховичу за постоянную поддержку, полезные советы и замечания, высказанные в процессе обсуждения работы, профессору кафедры неорганической химии Казанского университета Ю.И. Сальникову за проведение расчетов методом математического моделирования и помощь в обсуждении полученных результатов.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью решения поставленных задач использовались следующие методы исследования: вольтамперометрия с использованием вольтамперометрической системы SVA-1BM-01 «Аналитик» (Болгария); спектрофотометрия с использованием спектрофотометра U-2000 «Hitachi» (Япония); атомно-абсорбционная спектрофотометрия с использованием атомно-абсорбционного спектрофотометра Z – 6100 «Hitachi» (Япония).

В работе изучены следующие объекты: денатурированная ДНК (д-ДНК), ее комплексы с ионами металлов (на примере ионов Co(II) и ионов Co(II) и Cu(II) при совместном присутствии), ренатурированная ДНК (р-ДНК) и ее комплексы с противоопухолевыми препаратами – антибиотиком адрибластином и алкалоидом онковином.

Приготовление биочувствительной части амперометрических ДНК-сенсоров.

Для получения биочувствительной части ДНК-сенсоров навеску НЦ массой 0,1 г со средним содержанием азота 11,5-12 % растворяли в смеси ацетона и толуола, добавляли раствор д-ДНК, либо р-ДНК, раствор глутарового альдегида и гексан в качестве коагулянта. Из этой смеси на стеклянной поверхности получали пленку. Полученную пленку закрепляли на поверхности стационарного ртутно-пленочного электрода (СРПЭ).

Обработка данных комплексообразования ионов Co(II) и фармпрепаратов с ИДНК. При обработке результатов исследований комплексообразования Co(II)-д-ИДНК и фармпрепарат-р-ИДНК для установления состава и определения эффективных констант устойчивости данных комплексов определяли равновесную концентрацию ионов металла, либо фармпрепарата в процессе их комплексообразования при постоянной концентрации лиганда - ДНК (L) спектрофотометрически по поглощению комплексоната Co(II) при 215 нм, адрибластина при 232 нм, вольтамперометрически по величине I_p при - 1,3 В для комплексоната Co(II) и при - 0,46 В и - 0,9 В для адрибластина и онковина, соответственно и по градуировочным графикам. Обработка результатов проводилась методом математического моделирования с использованием программы CPESP (Shevelkova A.N., Salnikov Yu.I. et.al. FEBS Letters. 1996.V.383. P. 259-263).

Построение изотерм адсорбции тяжелых металлов с помощью ДНК-сенсора. Построение изотерм адсорбции ионов Co(II), либо ионов Co(II) и Cu(II) при их совместном присутствии проводили на основании зависимостей оптических плотностей растворов комплексонатов соответствующих металлов (для ионов Co(II) см. выше, для ионов Cu(II) при 276 нм), либо по величине I_p этих растворов (для ионов Co(II) см. выше, для ионов Cu(II) при - 0,4 В), от исходной концентрации ионов тяжелых металлов в заданном диапазоне концентраций. По градуировочным графикам зависимости определяли остаточные концентрации ионов Co(II) или Cu(II) в растворе.

Определение констант аффинного связывания комплексов Co(II) – д-ИДНК и фармпрепарат - р-ИДНК. Константы аффинного связывания ($K_{связ}$) комплексов определяли вольтамперометрически по токам восстановления комплексоната Co(II) при потенциале - 1,3 В, для фармпрепаратов при - 0,46 В или - 0,9 В для адрибластина и онковина, соответственно. По градуировочным зависимостям определяли концентрации комплексов Co(II)-д-ИДНК и фармпрепарат-р-ИДНК и равновесные концентрации Co(II), либо адрибластина и онковина, которые использовали для построения графика Скетчарда.

2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ С ДНК: КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМОЙ ДНК И БИОАФФИННАЯ СОРБЦИЯ НА ДНК-СОДЕРЖАЩЕЙ МЕМБРАНЕ БИОСЕНСОРА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ С ПОМОЩЬЮ ДНК-СЕНСОРА НА ОСНОВЕ СРПЭ

Изучение взаимодействия тяжелых металлов с ДНК проводилось на примере ионов Co(II) и Cu(II), так как с одной стороны эти металлы являются жизненно необходимыми, с другой стороны установлена их потенциальная генотоксичность, что делает определение данных ионов в сыворотке крови и в экологических объектах актуальным. Для выбора формы ДНК, позволяющей наиболее эффективно решить поставленную аналитическую задачу, ранее изучено взаимодействие ионов Cu(II) (выбраны в качестве модели, так как имеют наи-

большее сродство к ДНК) с денатурированной неиммобилизованной (д-ДНК) и денатурированной иммобилизованной ДНК (д-ИДНК) (Babkina S.S., N.A. Ulakhovich, Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 5678-5685). Полученные результаты (для д-ДНК: соотношение нуклеотид-М(II) 1:1 и 1:2, $\lg\beta_{\text{эфф}} = 10,1 \pm 0,4, 14,3 \pm 0,1$, соответственно, максимальная доля комплекса 0,8; для д-ИДНК соотношение нуклеотид-М(II) 1:2,5, $\lg\beta_{\text{эфф}} = 61,03 \pm 0,02$, максимальная доля комплекса 0,98) свидетельствуют о том, что форма д-ИДНК является биолигандом с высокой комплексообразующей способностью и оптимальна для использования в составе БС. С учетом описанных выше результатов, комплексообразование ионов Co(II) изучалось только с выбранной формой д-ИДНК при выбранном $\text{pH}=2,5$. Для оценки параметров комплексообразования ионов Co(II) с д-ИДНК были определены равновесные концентрации ионов Co(II) после проведения реакции комплексообразования с д-ИДНК спектрофотометрическим методом (СФ) и методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ААС). Результаты представлены на рис. 1 и в табл. 1. Обработка полученных данных выполнена методом математического моделирования (см. раздел 1).

а

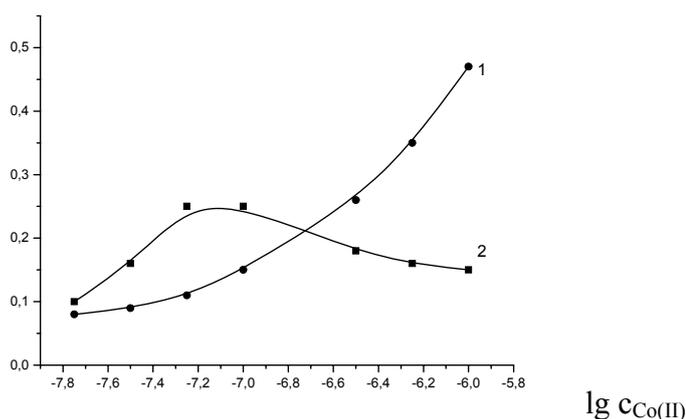


Рис. 1. Доли накопления комплексов Co(II) -д-ИДНК при $\text{pH}=2,5$ по данным метода спектрофотометрии:

- 1 - соотношение нуклеотид: Co(II) = 1:2;
- 2 - соотношение нуклеотид: Co(II) = 2:1;
- $c_{\text{ДНК}}=0,01$ мг/мл.

Таким образом, на основании экспериментальных данных получены количественные характеристики процесса комплексообразования ионов Co(II) с д-ИДНК, которые указывают на то, что ионы данного металла образуют достаточно прочные комплексы с д-ИДНК, что свидетельствует об их взаимодействии именно с азотистыми основаниями иммобилизованных молекул. Однако, по сравнению с ионами Cu(II) взаимодействие ионов Co(II) протекает менее эффективно, что свидетельствует о меньшем сродстве ионов Co(II) не только к нативной ДНК (согласно литературным данным), но и к выбранной форме д-ИДНК вследствие меньшего числа вариантов взаимодействия их с биомолекулой даже в условиях доступности центров связывания.

Результаты изучения комплексообразования ионов Co(II) с д-ИДНК

Состав комплекса	Соотношение нуклеотид : Co(II)	$\lg\beta_{эфф}$	Доля комплекса при $c_{Co(II)} = 1,75 \times 10^{-7}$ моль/л	Доля комплекса при $c_{Co(II)} = 1,00 \times 10^{-6}$ моль/л
$[CoL_2]^*$	2 : 1	$13,69 \pm 0,07$	0,25	0,15
$[Co_2L]$	1 : 2	$15,71 \pm 0,07$	0,17	0,47

* L – один нуклеотид

Биоаффинная сорбция тяжелых металлов на д-ИДНК-содержащей мембране.

Была уточнена сорбционная емкость модифицированной НЦ мембраны с д-ИДНК по отношению к ионам Cu(II) и оценена ее сорбционная емкость по отношению к ионам Co(II) для получения значения максимального количества молей тяжелых металлов, способных адсорбироваться на данной поверхности. В исследуемой системе происходит хемосорбция выбранных ионов на биочувствительной части сенсора за счет комплексообразования с азотистыми основаниями д-ИДНК, что позволяет получить более точные и воспроизводимые характеристики процесса. Для контроля специфичности адсорбции проводили холостой опыт с НЦ матрицей, не содержащей д-ИДНК.

При построении изотерм адсорбции Ленгмюра (см. раздел 1) концентрацию исходного раствора ионов металла увеличивали до выхода изотерм на предел (a_∞), обусловленный сорбционной емкостью мембраны (рис. 2). Это свидетельствует о предельном заполнении возможных мест связывания с д-ИДНК на модифицированной мембране сорбируемыми ионами. Полученные значения a_∞ (рис. 2, кривые 1, 3) для ионов Co(II) $(3,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ моль/м², для ионов Cu(II) $(8,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ моль/м² (Babkina S.S., N.A. Ulakhovich, Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 5678-5685), что еще раз свидетельствует о меньшем сродстве ионов Co(II) к д-ИДНК, чем Cu(II). Были также построены изотермы адсорбции ионов Co(II) и Cu(II) из раствора, в котором эти ионы присутствовали совместно в соотношении 1:1 за счет достаточной разницы потенциалов этих пиков (ΔE более, чем 250 мВ)(рис.2, кривые 2, 4).

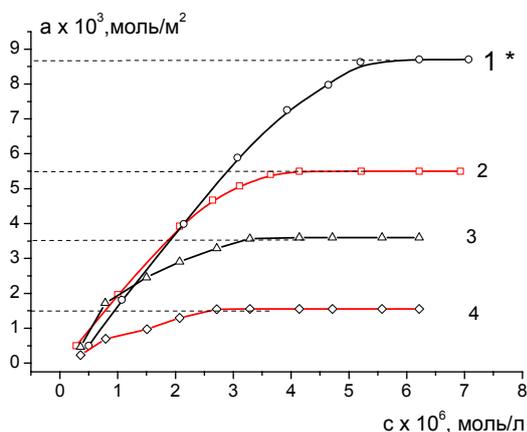


Рис. 2. Изотермы адсорбции ионов тяжелых металлов на д-ИДНК содержащей НЦ мембране амперометрического БС:

(1) и (3) – при адсорбции из индивидуальных растворов Cu(II) и Co(II);

(2) и (4) – при совместной адсорбции Cu(II) и Co(II) из их смеси в соотношении 1:1.

* - Babkina S.S., N.A. Ulakhovich, Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 5678-5685.

Как видно из рис. 2 в данных условиях на мембрану с д-ИДНК сорбируется практически одновременно оба вида ионов. Следовательно, с помощью ДНК-сенсора возможно определение этих ионов в совместном присутствии. Из рис. 2 также следует, что и при условии конкурентной адсорбции, сорбционная способность ионов Cu(II) больше, чем ионов Co(II), что еще раз подтверждает большее их сродство к молекулам д-ИДНК.

Определение константы аффинного связывания ($K_{\text{связ}}$) комплекса Co(II) – д-ИДНК. Для оценки специфичности изучаемых процессов проводили определение величины константы аффинного связывания ($K_{\text{связ}}$) ионов Co(II) с д-ИДНК и, для сравнения специфичности связывания Co(II) и Cu(II) с д-ИДНК, воспроизвели эксперимент по определению $K_{\text{связ}}$ также для меди (Babkina S.S., N.A. Ulakhovich, Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 5678-5685). Определение проводили на основании спектрофотометрических данных для ионов Co(II) и вольтамперометрических данных для ионов Cu(II) методом Скетчарда, основанным на получении зависимости отношения концентрации образующегося комплекса [M(II)-д-ИДНК] к равновесной концентрации металла-комплексообразователя [M(II)] от равновесной концентрации образующегося комплекса [M(II)-д-ИДНК]. По тангенсу угла наклона полученных прямолинейных зависимостей найдено значение величины константы аффинного связывания $K_{\text{связ}}$ ионов Co(II) с д-ИДНК $(3,9 \pm 0,2) \times 10^4$ л/моль (спектрофотометрические данные), $K_{\text{связ}}$ для Cu(II)-д-ИДНК составила $(19,1 \pm 0,2) \times 10^5$ л/моль (вольтамперометрические данные). Эти данные еще раз подтверждают достаточно высокое сродство ионов тяжелых металлов к выбранной форме молекул ДНК и факт образования прочной связи данных ионов с д-ИДНК за счет координационного взаимодействия с азотистыми гетероциклическими основаниями ДНК и наличия дополнительных вариантов комплексообразования: образования внутринитевого хелата между атомами N(7) и O(6) гуанина д-ИДНК, образование внутринитевых шивков с атомами N(7) гуанина д-ИДНК.

Следует отметить, что результаты изучения сорбции ионов меди из индивидуальных растворов и специфичности их связывания с д-ИДНК, полученные в данной работе, хорошо согласуются с результатами, полученными ранее (Babkina S.S., N.A. Ulakhovich, Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 5678-5685). Это свидетельствует о хорошей воспроизводимости биочувствительной части сенсора и ее однородности.

Полученные количественные характеристики взаимодействия ионов Co(II) и Cu(II) с д-ИДНК подтверждают данные об их генотоксичности и свидетельствуют о целесообразности определения данных металлов в различных объектах с помощью предложенного д-ИДНК-содержащего БС на основе СРПЭ.

Разработка способа определения ионов Co(II) и ионов Co(II) и Cu(II) при совместном присутствии с помощью амперометрического биосенсора на основе д-ИДНК. С учетом проведенного исследования амперометрический д-ИДНК-содержащий БС на основе СРПЭ был использован для определения тяжелых металлов на примере ионов Co(II) и Cu(II).

В качестве материала для изготовления матрицы для иммобилизованных биомолекул в данной работе был выбран нитрат целлюлозы (НЦ), как обладающий гидрофильностью и минимальной неспецифической сорбцией. Ковалентный способ иммобилизации д-ДНК предполагает включение молекул ДНК в полимерную матрицу из НЦ с одновременной кросс-сшивкой при обработке глутаровым альдегидом в качестве бифункционального реагента (см. раздел 1). Подобранные смеси растворителей максимально сохраняют структуру и свойства биомолекул, и способ иммобилизации позволяет получить воспроизводимые, устойчивые матрицы, модифицированные биомолекулами, благодаря сочетанию механической фиксации ДНК в полимере с химическим связыванием.

Аналитические возможности разработанного БС на основе д-ИДНК были оценены на примере определения ионов тяжелых металлов Co(II) и Cu(II). Предлагаемый биоаффинный способ определения ионов Co(II), или Cu(II) в объектах аналитического контроля с помощью амперометрического ДНК-сенсора основан, с одной стороны, на установленном нами высоком сродстве ионов Co(II) и Cu(II) к молекулам д-ИДНК, что позволяет провести эффективное биоаффинное концентрирование данных ионов из анализируемого раствора с малой концентрацией на мембране с д-ИДНК в составе БС. С другой стороны, в методике используется реактивация БС путем удаления ионов Co(II), либо Cu(II) с поверхности ДНК-сенсора обработкой его раствором комплексона III и определение ионов тяжелых металлов в виде комплексонатов. При этом возможно определение более низких концентраций тяжелых металлов, а БС реактивируется и может быть многократно использован. Появление на вольтамперограмме катодных пиков при $-1,3$ В, либо при $-0,4$ В после концентрирования ионов Co(II) или ионов Cu(II) на биосенсоре и его реактивации еще раз подтверждает факт разрушения комплекса ионов Co(II), либо ионов Cu(II) с д-ИДНК под действием комплексона III. Величина этих сигналов зависит от концентрации ионов Co(II), либо ионов Cu(II), а при их постоянной концентрации - от способности молекул ДНК к комплексообразованию. Молекулы д-ДНК после иммобилизации сохраняют свою активность не менее 30 дней. Равенство аналитических сигналов, полученных при использовании различных участков мембраны с иммобилизованной д-ДНК равной площади, свидетельствует об однородности биочувствительной части сенсора по составу. С помощью данного ДНК-сенсора возможно провести около 10 циклов измерений. Следует сказать, что при необходимости можно легко заменить модифицированную мембрану после проведения анализа на новую.

Выбрано оптимальное время концентрирования (10 мин) и время реактивации (20 мин) для определения изучаемых ионов металлов. Проведено определение ионов Co(II) и Cu(II) в модельных растворах по градуировочным графикам зависимости $\lg I_p$ (мкА) от $\lg c$ (моль/л), которые имеют следующий вид: $\lg I_p = (0,262 \pm 0,002) \lg c + (1,95 \pm 0,02)$, $r = 0,9978$, для ионов Co(II) (пример определения - в табл. 2); $\lg I_p = (0,273 \pm 0,002) \lg c + (2,62 \pm 0,01)$, $r = 0,9986$, для ионов Cu(II). Линейная область определяемых концентраций ионов Co(II) и Cu(II) с помощью амперометрического ДНК-сенсора составляет $1,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-8}$ моль/л для ионов

Co(II), $1,0 \times 10^{-5}$ – $4,0 \times 10^{-11}$ моль/л для ионов Cu(II). Нижняя граница определяемых содержаний (c_n) составляет $2,0 \times 10^{-8}$ моль/л и $4,0 \times 10^{-11}$ моль/л ($s_r=0,33$) для ионов Co(II) и Cu(II), соответственно. В таблице 3 представлены результаты определения данных ионов тяжелых металлов в модельных растворах при их совместном присутствии. В случае определения более низких концентраций ионов тяжелого металла объем раствора при накоплении можно увеличить.

Таблица 2.
Результаты определения ионов Co(II) в модельных растворах биоаффинным методом на основе амперометрического ДНК-сенсора (n=5, P=0,95)

Введено, $c \times 10^5$, моль/л	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^5$, моль/л	s_r
0,002	$0,0021 \pm 0,0003$	0,15
0,01	$0,012 \pm 0,002$	0,13
0,05	$0,049 \pm 0,002$	0,03
0,1	$0,10 \pm 0,04$	0,03
0,50	$0,50 \pm 0,01$	0,02

Таблица 3.
Результаты определения Cu(II) и Co(II) при совместном присутствии в модельных растворах с помощью амперометрического ДНК-сенсора (n=5, P=0,95)

Введено, $c \times 10^5$, моль/л		Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^5$, моль/л		s_r	
Co(II)	Cu(II)	Co(II)	Cu(II)	Co(II)	Cu(II)
0,01	0,01	$0,013 \pm 0,001$	$0,015 \pm 0,002$	0,06	0,10
0,1	0,1	$0,11 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,03$	0,09	0,10
1,00	1,00	$1,12 \pm 0,3$	$0,97 \pm 0,10$	0,13	0,08

Таким образом, предложен биоаффинный способ определения тяжелых металлов на примере ионов Co(II) и Cu(II) с помощью амперометрического ДНК-сенсора, который может применяться на практике для анализа различных объектов наряду со стандартными методиками определения, так как нижние границы определяемых содержаний тяжелых металлов с помощью ДНК-сенсора позволяют определять данные эффекторы даже при очень малом их содержании в исследуемых растворах. С помощью д-ИДНК-содержащего БС возможно определять и другие тяжелые металлы и оценить их потенциальную генотоксичность и мутагенность для ДНК организма.

3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА АДРИБЛАСТИНА С ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ДНК В СОСТАВЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ДНК-СЕНСОРА НА ОСНОВЕ СРПЭ И ЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЕ

При поиске новых, более эффективных и менее токсичных онкопрепаратов, а также при их получении, выяснении фармакокинетики, метаболизма и при контроле их содержания актуально изучение взаимодействия препаратов с ДНК и их определение. В данном исследовании было оценено взаимодействие противоопухолевого антибиотика антрациклинового ряда на примере адрибластина с ДНК и проведено определение с помощью ДНК-сенсора. Препарат адрибластин (действующее вещество - доксорубин) широко применяется в клинической практике для лечения различных видов злокачественных опухолей (острые лейкозы, рак молочной железы, рак легкого и др.). Решена задача оптимизации состава биочувствительной части сенсора, при этом был учтен механизм действия данного препарата на двунитовую ДНК, как интеркалятора, а также его способность связываться в организме с денатурированной одонитевой ДНК за счет электростатического взаимодействия. Поэтому при приготовлении биочувствительной части БС на основе ИДНК после термической денатурации ДНК проводили медленное охлаждение. В результате, при сохранении одинарных цепей, образуются и фрагменты вторичной структуры, т.е. двойных цепей ДНК за счет восстановления водородных связей либо между двумя цепями, либо внутри одной спирали, т.е. происходит процесс частичной ренатурации. В данном случае образуется ренатурированная ДНК, или р-ДНК. Затем проводили ковалентную иммобилизацию данной формы биомолекулы в НЦ-матрице и получали образцы р-ИДНК (см. раздел 1). Нами было изучено комплексообразование адрибластина с молекулами р-ИДНК в составе НЦ матрицы для количественной оценки сродства эффектора именно к данной форме ДНК, а также для оптимизации разрабатываемого аналитического метода.

На основе полученных данных (для достоверности получаемой информации использовали два независимых метода - СФ, ВА) методом математического моделирования с использованием программы SPESSP рассчитаны составы комплексов, доли их накопления (α) и эффективные константы устойчивости комплекса адрибластин-р-ИДНК и построены графики накопления всех значимых форм изучаемых комплексов. На рис. 3 приведен график по распределению долей комплексов адрибластина с р-ИДНК. Полученные данные по комплексообразованию адрибластина с р-ИДНК систематизированы в табл. 4.

α

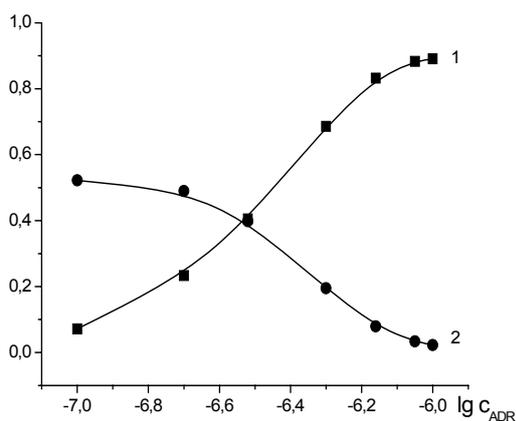


Рис. 3. Доли комплексов

адрибластин–р-ИДНК:

1 – доля комплекса [АДР₂L];

2 - доля комплекса [АДPL₂];

c_{ДНК}=0,01 мг/мл, АБР, рН=5,2

Из полученных данных (табл. 4) видно, что проведенное исследование позволило оптимизировать состав разработанного р-ИДНК-содержащего биосенсора, установить факт эффективного связывания адрибластина с р-ИДНК и в дальнейшем дает возможность создать условия высокоэффективного концентрирования препарата на БС.

эффективного связывания адрибластина с р-ИДНК и в дальнейшем дает возможность создать условия высокоэффективного концентрирования препарата на БС.

Таблица 4.

Результаты изучения комплексообразования адрибластина с р-ИДНК

Форма ДНК	р-ИДНК, рН 5,2	
Состав комплекса	[АДР ₂ L*]	[АДPL ₂]
Соотношение нуклеотид : препарат	1 : 2	2 : 1
lg β _{эфф}	13,8±0,5	14,4±0,2
Доля комплекса при c _{ADR} = 1,05×10 ⁻⁷ моль/л	0,02	0,52
Доля комплекса при c _{ADR} = 1,0×10 ⁻⁶ моль/л	0,89	0,11

*L - пара нуклеотидов

Определение константы аффинного связывания комплекса адрибластин – р-ИДНК проводили для количественной характеристики специфичности комплексообразования методом Скетчарда. K_{связ} оценена на основании вольтамперометрических данных полученных по описанной выше методике (см. раздел 1). Строили график в координатах: [C_{ДНК-ADR}]/[C_{ADR}] – [C_{ДНК-ADR}], где [C_{ДНК-ADR}] – равновесная концентрация комплекса р-ИДНК-онкопрепарат, [C_{ADR}] – равновесная, т.е. оставшаяся несвязанной после образования комплекса, концентрация адрибластина. Значение K_{связ} составило для адрибластина - (2,5±0,2)×10⁶ л/моль.; высокие значения K_{связ} свидетельствуют о перспективности проведения биоаффинного концентрирования препаратов данного класса на ДНК-сенсоре, возможности повышения чувствительности анализа и актуальности определения противоопухолевых препаратов этого класса с помощью биоаффинного метода на основе амперометрического

p-ИДНК-содержащего сенсора.

Разработка способа определения адрибластина с помощью амперометрического биосенсора на основе p-ИДНК. Предлагаемый метод определения онкопрепаратов данного класса с помощью амперометрического ДНК-сенсора на основе СРПЭ основан на количественно установленном нами высоком сродстве адрибластина к молекулам p-ИДНК, что позволяет провести эффективное концентрирование данного препарата из анализируемого раствора с малой концентрацией, в том числе из многокомпонентных биологических жидкостей. Удаление фармпрепарата с поверхности БС обработкой его раствором с большой ионной силой (нами был выбран 1 М NaCl) позволяет использовать БС многократно, что делает метод более экономичным и экспрессным. Аналитическим сигналом при определении адрибластина был I_p восстановления на БС при потенциале $-0,46$ В. Оптимальное время концентрирования препарата на мембране с p-ИДНК составило 15 мин. Оптимальное время реактивации составило 20 мин. Таким образом, выбраны рабочие условия определения с помощью ДНК-сенсора для сокращения времени проведения анализа без возможного ухудшения его чувствительности. Уравнения градуировочного графика зависимости $\lg I_p$ (мкА) от $\lg c$ (моль/л) имеет следующий вид: $\lg I_p = (0,117 \pm 0,002) \lg c + (1,54 \pm 0,02)$, $r = 0,9990$. Линейная область определяемых концентраций адрибластина с помощью БС на основе p-ИДНК составляет $1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-10}$ моль/л. Нижняя граница определяемых содержаний (c_n) составляет $1,0 \times 10^{-10}$ моль/л ($s_r = 33\%$). Ошибка определения не превышает 10%. В случае определения более низких содержаний фармпрепарата можно увеличить объем раствора при накоплении. В табл. 5 представлены результаты определения адрибластина (фирма «Pharmacia & Upjohn», (Италия)) в модельных растворах с помощью ДНК-сенсора.

Таблица 5.
Результаты определения адрибластина с помощью амперометрического p-ИДНК-содержащего биосенсора ($n=5$, $P=0,95$)

Введено, $c \times 10^6$, моль/л	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^6$, моль/л	s_r
0,0001	$0,00011 \pm 0,00002$	0,14
0,005	$0,0051 \pm 0,0004$	0,03
0,01	$0,012 \pm 0,001$	0,04
0,50	$0,49 \pm 0,03$	0,03
1,00	$1,05 \pm 0,04$	0,02

Таким образом, проведенное исследование позволило решить актуальную задачу изучения комплексообразования и дальнейшего усовершенствования биоаффинного метода определения онкопрепаратов - антибиотиков. Разработанный метод определения препаратов данного класса позволяет провести аналитический контроль биообъектов, содержащих адрибластин, в процессе терапевтического мониторинга.

4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНОГО АЛКАЛОИДА ОНКОВИНА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ, С ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ДНК В СОСТАВЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ДНК-СЕНСОРА НА ОСНОВЕ СРПЭ И ЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Как было сказано выше, успешное применение противоопухолевых препаратов возможно при строгом аналитическом контроле их содержания в биологических жидкостях и лекарственных формах. Актуально осуществление мониторинга фармпрепаратов, для выбора адекватной индивидуальной дозировки онкопрепаратов и схемы их применения для повышения эффективности и безопасности лечения. Это особенно актуально в связи с тем, что в условиях клинических и биохимических лабораторий не проводится постоянного контроля за содержанием противоопухолевых веществ в биологических жидкостях. Препарат онковин (действующее вещество винкристин) является представителем другого класса онкопрепаратов - природным алкалоидом индолового ряда, выделенным из *Catharanthus roseus* (барвинок); применяется для лечения различных видов опухолей, в частности острой лейкемии и лимфогранулематоза.

Поскольку, как отмечено выше, механизм цитостатического действия алкалоидов, в частности онковина, аналогичен механизму действия противоопухолевых антибиотиков, то при разработке ДНК-сенсора, применимого в анализе алкалоидов, использовалась выбранная выше форма ренатурированной ДНК для иммобилизации в составе БС. Для количественного доказательства возможности использования формы р-ИДНК проведено изучение комплексообразования онковина с р-ИДНК.

α

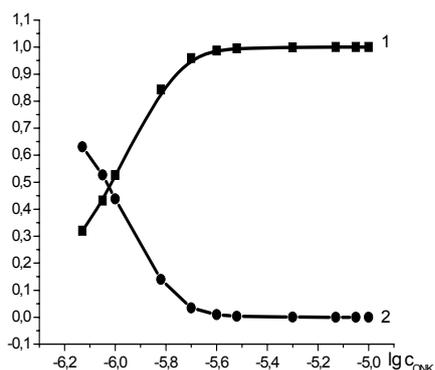


Рис. 4. Доли комплексов онковин-р-ИДНК:

1 – доля комплекса [ОНК₃L];

2 – доля комплекса [ОНКЛ₂];

$c_{\text{ДНК}}=0,01$ мг/мл, АБР рН=5,2

На основе вольтамперометрических данных методом математического моделирования с использованием программы SPSSP рассчитаны доли накопления (α) и эффективные константы устойчивости ($\beta_{\text{эфф}}$) комплексов противоопухолевого препарата онковина с р-ИДНК и построены графики накопления всех значимых форм изучаемых комплексов. Результаты изучения комплексообразования онковина с р-ИДНК представлены на рис. 4 и в таблице 6.

Таблица 6.

Результаты изучения комплексообразования онковина с р-ИДНК

Форма ДНК	р-ИДНК, pH 5,2	
Состав комплекса	[ОНКL ₂ *]	[ОНК ₃ L]
Соотношение нуклеотид : препарат	2 : 1	1 : 3
$\lg \beta_{\text{эфф}}$	15,2±0,8	19,5±0,4
Доля комплекса при $c_{\text{ОНК}} = 7,5 \times 10^{-7}$ моль/л	0,63	0,32
Доля комплекса при $c_{\text{ОНК}} = 2,5 \times 10^{-6}$ моль/л	0,01	0,99

L* - пара нуклеотидов

Определение константы аффинного связывания комплекса онковин – р-ИДНК.

Для количественной характеристики специфичности комплексообразования онковина с р-ИДНК провели также определение методом Скетчарда константы аффинного связывания. $K_{\text{связ}}$ оценивали по полученным вольтамперометрическим данным по описанной выше методике (см. раздел 1). Строили графики в координатах: $[C_{\text{ДНК-ОНК}}]/[C_{\text{ОНК}}] - [C_{\text{ДНК-ОНК}}]$, где $[C_{\text{ДНК-ОНК}}]$ – равновесная концентрация комплекса р-ИДНК-онковин, $[C_{\text{ОНК}}]$ – равновесная, т.е. оставшаяся несвязанной после образования комплекса, концентрация препарата. Значение $K_{\text{связ}}$ составило для онковина - $(5,0 \pm 0,4) \times 10^5$ л/моль. Данное значение меньше, чем для комплекса адрибластин-р-ИДНК, что, по-видимому, объясняется различием структур и молекулярных весов данных препаратов.

Разработка способа определения онковина с помощью амперометрического биосенсора на основе р-ИДНК. Предлагаемая методика определения противоопухолевого алкалоида индолового ряда онковина с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС основана на количественно установленном нами высоком сродстве онковина к молекулам р-ИДНК, что также позволяет провести эффективное концентрирование препарата данного класса из анализируемого раствора с малой концентрацией, в том числе из многокомпонентных биологических жидкостей. Удаление онковина с поверхности БС обработкой его раствором 1 М NaCl позволяет повторно использовать БС при дальнейших анализах. Аналитическим сигналом при определении онковина был I_p восстановления на БС при потенциале $-0,9$ В. Оптимальное время концентрирования, также как и оптимальное время реактивации мембраны составило 20 минут. Для онковина уравнение градуировочного графика зависимости $\lg I_p$ (мкА) от $\lg c$ (моль/л) имеет вид: $\lg I_p = (0,327 \pm 0,01) \lg c + (2,31 \pm 0,21)$, $r = 0,9992$. Данный график использовали для определения неизвестной концентрации онкопрепарата. Результаты определения онковина в составе препарата «Онковин» (фирма «Lilly France S.A.» (Франция)) с помощью амперометрического р-ИДНК-содержащего БС представлены в таб-

лице 7. Линейная область определяемых концентраций онковина с помощью амперометрического БС на основе р-ИДНК составляет $1,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-9}$ моль/л. Нижняя граница определяемых содержаний (c_n) составляет $2,0 \times 10^{-9}$ моль/л ($s_r = 33\%$). В случае определения низких концентраций онковина объем раствора можно увеличить на этапе концентрирования его на мембране БС.

Таблица 7.

Результаты определения онковина с помощью амперометрического р-ИДНК-содержащего БС (n=5, P=0,95)

Введено, $c \times 10^5$, моль/л	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^5$, моль/л	s_r
0,0005	$0,00053 \pm 0,00008$	0,12
0,005	$0,0052 \pm 0,0003$	0,05
0,01	$0,013 \pm 0,001$	0,06
0,50	$0,51 \pm 0,03$	0,05
1,00	$1,06 \pm 0,05$	0,04

Таким образом, результаты изучения процесса комплексообразования фармпрепарата выбранного класса с р-ИДНК, найденные оптимальные условия проведения анализа, широкий диапазон определяемых содержаний, возможность селективного определения онковина в присутствии электрохимически неактивных компонентов матрицы, либо восстанавливающихся в иной области потенциалов, позволяют использовать разработанный амперометрический ДНК-сенсор как новое средство биохимического контроля за содержанием данных онкопрепаратов в многокомпонентных биологических системах, в том числе в сыворотке крови человека и в лекарственных формах данного препарата, что актуально на стадии контроля производства и сроков годности готового продукта.

5. ПРИМЕНЕНИЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ ДНК-СЕНСОРОВ В АНАЛИЗЕ РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

Для оценки аналитических возможностей амперометрических ДНК-сенсоров на основе СРПЭ, содержащих денатурированную, либо ренатурированную ДНК, они были применены в анализе реальных объектов.

При определении тяжелых металлов в природной и питьевой воде и сыворотке крови человека была адаптирована методика на основе д-ИДНК-сенсора. Оценено влияние матричных компонентов сыворотки крови на определения (табл. 8).

Некоторые результаты определения тяжелых металлов представлены в табл. 9. Достаточная разница потенциалов восстановления комплексонов Co(II) и Cu(II) , а также установленный факт независимой сорбции этих ионов при совместном присутствии позволяют определять эти металлы в многокомпонентных системах, в частности, в сыворотке крови при их совместном присутствии, что является важным при диагностике анемии.

Способ определения данных ионов металлов с помощью д-ИДНК-содержащего БС отличается селективностью, хорошей воспроизводимостью, простотой пробоподготовки, достаточной экспрессностью и требует минимальный объем пробы. Данная методика может быть использована как дополнительная к известным методам контроля за содержанием кобальта и меди в различных объектах анализа; при необходимости возможна дополнительная пробоподготовка.

Таблица 8.
Влияние матричных компонентов на результаты определения $7,5 \times 10^{-8}$ моль/л ионов Co(II) с помощью амперометрического ДНК-сенсора

Соотношение $\text{Co(II)} : \text{M}$	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^8$, моль/л	s_r
1 : 1 M = Mg(II) , Fe(III) , Zn(II) , Al(III) , Cu(II)	$7,4 \pm 0,2$	0,02
1 : 5 M = Mg(II) , Fe(III) , Zn(II)	$7,5 \pm 0,3$	0,03
1 : 10 M = Mg(II) , Zn(II)	$7,6 \pm 0,1$	0,01
1 : 100 M = Mg(II)	$7,3 \pm 0,3$	0,03

Для оценки возможности использования разработанного амперометрического р-ИДНК-сенсора как нового инструмента биохимического анализа при определении фарм-препаратов была разработана методика определения адрибластина и онковина в реальных объектах – в сыворотке крови человека (некоторые результаты представлены в табл. 10).

Разработанный метод был использован также для определения целевых компонентов – адрибластина и онковина – в инъекционной форме препарата в присутствии компонентов лекарственных форм с целью контроля состава готовой продукции (табл. 11). Была проведена оценка мешающего влияния на результаты определения присутствующих в данной лекарственной форме других компонентов (лактоза, метилгидроксibenзоат). Установлено, что сопутствующие компоненты электрохимически неактивны и не мешают определению целевых компонентов (адрибластина и онковина), так как эти вещества не являются эффекторами ДНК. В случае возможного мешающего действия компонентов матрицы возможно проведение дополнительной пробоподготовки.

Как видно из таблицы 11 случайная погрешность незначима и не превышает 10%.

Таблица 9.

Результаты определения Co(II) и Cu(II) в реальных объектах с помощью амперометрического ДНК-сенсора (n=5, P=0,95, $t_{\text{табл}}=2,78$; $F_{\text{табл}}=6,39$)

Анализируемый объект, металл	Вольтамперометрия с ДНК-сенсором		Контрольный метод		$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta)$	s_r	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta)$	s_r		
Речная вода Co(II)	$(0,6 \pm 0,02) \times 10^{-4}$ мг/мл	0,02	$(0,8 \pm 0,03) \times 10^{-4}$ мг/мл*	0,03	2,62	1,50
Питьевая вода Co(II)	$(5,1 \pm 0,3) \times 10^{-7}$ моль/л	0,05	$(5,6 \pm 0,4) \times 10^{-7}$ моль/л*	0,04	1,51	2,33
Озерная вода Cu(II)	$(0,21 \pm 0,01) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,04	$(0,22 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ мг/мл*	0,10	1,15	1,33
Сыворотка 1 Co(II)	$(5,1 \pm 0,3) \times 10^{-7}$ моль/л	0,05	$(5,4 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ моль/л•	0,01	1,49	3,00
Сыворотка 2 Co(II)	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^{-8}$ моль/л	0,02	$(3,4 \pm 0,2) \times 10^{-8}$ моль/л•	0,05	1,73	2,38
Сыворотка 2 Cu(II)	$(3,4 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ моль/л	0,11	$(3,1 \pm 0,5) \times 10^{-5}$ моль/л•	0,13	1,13	2,50

* - атомно-абсорбционная спектроскопия; • - спектрофотометрия

Таблица 10.

Результаты определения адрибластина и онковина в сыворотке крови с помощью амперометрического ДНК-сенсора (n=5, P=0,95)

Анализируемый объект	Вольтамперометрия с ДНК-сенсором			
	Найдено, АДР, $\bar{c} \pm \delta$	s_r	Найдено, ОНК, $\bar{c} \pm \delta$	s_r
Сыворотка 1	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-8}$ моль/л	0,07	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^{-8}$ моль/л	0,10
Сыворотка 2	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^{-9}$ моль/л	0,07	$(0,23 \pm 0,02) \times 10^{-8}$ моль/л	0,07
Сыворотка 3	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^{-8}$ моль/л	0,06	$(2,1 \pm 0,4) \times 10^{-8}$ моль/л	0,15
Сыворотка 4	$(5,3 \pm 0,4) \times 10^{-9}$ моль/л	0,06	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^{-9}$ моль/л	0,05
Сыворотка 5	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-8}$ моль/л	0,04	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-8}$ моль/л	0,12

Таблица 11.

Результаты определения адрибластина и онковина в лекарственных формах с помощью амперометрического р-ИДНК-содержащего БС (n=5, P=0,95)

Фарм-препарат	Лекарственная форма	Аттестованное количество (по НД)	Найдено, $\bar{c} \pm \delta$	s_r
Адрибластин	Иньекции	2 мг/мл	$2,2 \pm 0,2$ мг/мл	0,07
Онковин	Иньекции	0,2 мг/мл	$0,25 \pm 0,01$ мг/мл	0,03

Таким образом, в настоящей работе продемонстрированы примеры изучения взаимодействия и определения эффекторов ДНК различной природы с помощью предложенных биоаффинных способов с использованием амперометрических ДНК-сенсоров на основе стационарных электродов. Разработанные способы селективны, экспрессны и высокочувствительны, что позволило использовать их в анализе модельных систем и реальных образцов на содержание выбранных эффекторов (тяжелых металлов и противоопухолевых препаратов – интеркаляторов различных классов).

ВЫВОДЫ:

1. Установлены составы и доли комплексов и получены количественные характеристики процессов взаимодействия тяжелых металлов на примере ионов Co(II) с денатурированной иммобилизованной ДНК (д-ИДНК) в составе НЦ мембраны и взаимодействия противоопухолевых препаратов - интеркаляторов на примере адрибластина и онковина с ренатурированной иммобилизованной ДНК (р-ИДНК). Определены константы аффинного связывания комплексов эффектор-ИДНК. Показана целесообразность использования формы д-ИДНК в качестве аналитического реагента в составе БС на основе СРПЭ при определении тяжелых металлов и формы р-ИДНК при определении цитостатиков.
2. Выявлено меньшее сродство ионов Co(II) к д-ИДНК по сравнению с ионами Cu(II) как в условиях адсорбции из индивидуальных растворов, так и при адсорбции при соотношении концентраций ионов этих металлов в растворе 1:1; доказана возможность их селективного определения при совместном присутствии.
3. Предложены биоаффинные селективные способы определения кобальта (II) и кобальта (II) и меди (II) при совместном присутствии с помощью амперометрического д-ИДНК-сенсора на основе СРПЭ с использованием биоспецифического мембранного концентрирования на биосенсоре и реактивации биосенсора для его многократного использования. Широкий линейный диапазон определяемых содержаний позволяет использовать ДНК-сенсор как новое средство биохимического и экоаналитического контроля для определения тяжелых металлов с $c_n=2,0 \times 10^{-8}$ моль/л для ионов Co(II) и с $c_n=4,0 \times 10^{-11}$ моль/л для ионов Cu(II) .
4. Предложены биоаффинные способы определения противоопухолевых препаратов различных классов: антибиотиков на примере адрибластина и природных алкалоидов на примере онковина с помощью разработанного амперометрического р-ИДНК-сенсора на основе СРПЭ с использованием биоспецифического мембранного концентрирования на БС; выявлены условия функционирования и реактивации БС для многократного применения, позволяющие использовать ДНК-сенсоры как новое средство

биохимического контроля для определения выбранных противоопухолевых препаратов с $c_n = 1,0 \times 10^{-10}$ моль/л для адрибластина, $c_n = 2,0 \times 10^{-9}$ моль/л для онковина.

5. На основе амперометрических ДНК-сенсоров разработаны высокочувствительные методики анализа воды (природной и питьевой) и сыворотки крови человека на содержание Co(II) и Cu(II) , в том числе при их совместном присутствии, а также адрибластина и онковина. Определению не мешают сопутствующие матричные компоненты, в частности ионы металлов до соотношения 1:100 при определении Co(II) и Cu(II) и компоненты сыворотки крови и лекарственной формы при определении онкопрепаратов. При сравнении полученных результатов с контрольными методами установлено, что систематическая погрешность незначима.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Бабкина С.С. Определение противоопухолевого антибиотика доксорубицина с помощью амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной ДНК / С.С. Бабкина, Е.Н. Моисеева, Н.А. Улахович // Фармация. – 2006. – №. 5. – С. 9-11.
2. Бабкина С.С. Взаимодействие иммобилизованной ДНК с адрибластином и ионами кобальта (II) и их определение биоаффинными методами, основанными на использовании амперометрического ДНК-сенсора / С.С. Бабкина, Е.Н. Моисеева, Н.А. Улахович // Вестник Казанского технологического университета. – 2006. - №2. – С. 211-218.
3. Бабкина С.С. Изучение взаимодействия с ДНК и определение противоопухолевого препарата онковина с помощью амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной ДНК / С.С. Бабкина, Е.Н. Моисеева, Н.А. Улахович, Ю.И. Сальников // Вестник Казанского технологического университета. – 2007. - №2. – С. 46-51.
4. Бабкина С.С. Амперометрический сенсор на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для определения ДНК / С.С. Бабкина, Н.А. Улахович, Ю.И. Зявкина, Е.Н. Моисеева // Междунар.конференция «Сенсор-2000». Сенсоры и микросистемы. Тез. докл. – С. Петербург, 2000. - С. 123-124.
5. Моисеева Е.Н. Амперометрический биосенсор на основе иммобилизованной ДНК и его использование для определения тяжелых металлов / Е.Н. Моисеева // Тез. докладов Международной конференции «Ломоносов-2000». – Москва, 2000. - С. 184.
6. Моисеева Е.Н. Амперометрический биосенсор на основе иммобилизованной ДНК и его использование для определения тяжелых металлов / Е.Н. Моисеева// Тез. докладов Итоговой студенческой научной конференции КГУ. - Казань, 2000. – С. 48.
7. Бабкина С.С. Контроль содержания тяжелых металлов в воде и продуктах питания путем их концентрирования на биосенсоре, содержащем дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) / С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Е.Н.Моисеева, Е.Е.Филюшина // Материалы и тез.докладов региональной научной конференции «Методы аналитического контроля материалов и объектов окружающей среды». - Пермь, Изд-во Пермского университета, 2001. - С.120.

8. Бабкина С.С. Определение ионов тяжелых металлов и комплексов платины в сыворотке крови человека с помощью иммобилизованной дезоксирибонуклеиновой кислоты в составе биосенсора / С.С. Бабкина, Н.А. Улахович, Е.Н. Моисеева, Ю.И. Зявкина, Е.Е. Филюшина / Тез. докл. Междисциплинарной конференции с международным участием «Новые биокибернетические и телемедицинские технологии 21-го века для диагностики и лечения заболеваний человека» НБИТТ-21. – Петрозаводск, 2002. – С. 64.
9. Бабкина С.С. Определение ионов железа(III) в сыворотке крови с помощью иммобилизованной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в составе биосенсора / С.С. Бабкина, Н.А. Улахович, Е.Н. Моисеева, Е.Е. Филюшина // 2-я Российская научная конференция Всероссийской конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной аналитической химии». – Пермь, 2002. – С. 86-87.
10. Бабкина С.С. Биоаффинные методы, основанные на использовании амперометрического ДНК-биосенсора, для изучения взаимодействия и противоопухолевых препаратов и токсичных металлов с ДНК и для их определения / С.С. Бабкина, Е.Н. Моисеева, Н.А. Улахович // Материалы Междунар. научной конфер. «Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий». - Томск, 2006. – Т.2, С. 332-334.
11. Бабкина С.С. Амперометрический анализ экологических объектов с помощью ДНК-сенсора на содержание тяжелых металлов как генотоксичных эффекторов ДНК / Бабкина С.С., Моисеева Е.Н., Улахович Н.А. // Тез. докл. Всероссийской конференции «Экоаналитика-2006».- Самара, 2006. – С. 68.
12. Babkina S.S. Amperometric DNA biosensor for investigation of Co(II)-DNA interaction and cobalt assay / S.S. Babkina, E.N. Moiseeva, N.A. Ulakhovich // Abs. International congress on analytical sciences ICAS-2006. – Moscow, 2006. – С. 834.