

ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГРАММЫ И СЕРВИСЫ**МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОАНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ****В.В. Шумянцева^{1,2}, Т.В. Булко¹, Е.В. Супрун¹, А.В. Кузиков^{1,2}, Л.В. Сиголаева^{1,3}, Р.А. Мисамрех^{1,2}, А.И. Арчаков^{1,2}**¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10 стр. 8; *эл. почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва³Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Рассмотрены методы электроанализа биологических молекул, таких как ферменты, белки, пептиды, ДНК, лекарственные препараты. Описаны методы получения ферментных электродов, методы расчёта кинетических параметров реакций на основе анализа электрохимических данных. Результаты представлены в виде алгоритма, позволяющего осуществить выбор типа электрода для проведения соответствующей электрохимической реакции.

Ключевые слова: электроанализ; гемопротейны; ДНК; лекарственные препараты; электроокисление; электрокатализ**DOI:** 10.18097/BMCRM00032**ВВЕДЕНИЕ**

Электрохимические методы в биомедицинских исследованиях основаны на регистрации процессов, происходящих при получении или отдаче электронов биологическими молекулами. Особенностью электрохимических систем является то, что электрохимические методы являются количественными, и это позволяет рассчитать количество электроактивного биокомпонента в пробе. Электроанализ может быть применен не только для конструирования биосенсорных систем, но и для исследования механизма каталитических реакций, а также для разработки биореакторов на основе функционирования высокоспецифичных и стереоспецифичных белков-ферментов. Информационные параметры электроанализа позволяют рассчитать не только кинетические константы ферментативных процессов, но и охарактеризовать биоэлектрохимическую систему, определить особенности электродных процессов, электродную кинетику переноса электронов в системе электрод/фермент, определить эффективные формальные потенциалы редокс-активных компонентов, исследовать стехиометрию компонентов электродных реакций, рассчитать количество электроактивного вещества, участвующего в процессе, исследовать условия обратимости/необратимости реакций, в определенных условиях рассчитать изменение термодинамических параметров (ΔG , ΔS , ΔH), а также получить информацию о типе процесса (диффузионный или поверхностный) для исследуемого биокомпонента. Электроанализ каталитической активности цитохромов P450 применим для расчётов кинетических параметров ферментативной реакции. Методы мониторинга химической модификации, контролируемой биохимическими событиями, такими как посттрансляционные модификации, а также структурной перестройки при комплексообразовании функционально значимых белков и пептидов с ионами металлов, перспективны для изучения конформационных перестроек биомолекул при

проведении скрининга потенциальных лекарственных препаратов. Электроанализ ДНК и олигонуклеотидов позволяет определить количество ДНК в пробе, что является эффективным методом количественной оценки нуклеотидного материала в биологических образцах (плазме или сыворотке крови). Приведены примеры анализа лекарственных препаратов на основе электрохимических реакций в биологических пробах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*Электрохимические измерения*

Электрохимические измерения проводятся с использованием потенциостатов PGSTAT 12 Autolab, μ Autolab Type III ("Metrohm Autolab", Нидерланды) с программным обеспечением GPES, (версия 4.9.7) и PGSTAT 312N Autolab с программным обеспечением NOVA (версия 2.0). В работе используются трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати ("КолорЭлектроникс", Москва, <http://www.colorel.ru/>) с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 0.2 см (площадь 0.0314 см²). Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl).

В работе применяется метод иммобилизации гемопротейнов на печатных графитовых электродах (ПГЭ), модифицированных дидодецилдиметиламмония бромидом (ДДАБ). На поверхность рабочего графитового электрода наносят 1 мкл 0.1 М раствора ДДАБ в хлороформе. После испарения хлороформа (10 мин) наносят 1 мкл анализируемого белка соответствующей концентрации. Электроды оставляют при температуре +4°C на 12 ч. во влажной камере, предотвращающей высыхание белков.

Перед началом всех электрохимических измерений электроды инкубируют в электролитном (0.1 М KН₂PO₄ + 0.05 М NaCl) буфере, pH 7.4, 20 мин при комнатной температуре (22±3°C).



Электрохимические измерения в анаэробных условиях проводят в герметично закрытой ячейке с помещённым в неё ферментным электродом. Ячейка заполняется 1 мл электролитного буфера, герметично закрывается, в течение 30 мин. пропускается аргон. Параметры регистрации циклических вольтамперограмм: диапазон потенциалов от +0.5 до -0.8 В, скорости развертки потенциала от 10 до 100 мВ/с. Циклическая вольтамперометрия ферментного электрода в аэробных условиях регистрируется в 1 мл электролитного буфера (0.1 М калий фосфатный буфер, pH 7.4, содержащем 0.05 М NaCl).

Для измерения сигнала электроокисления аминокислот в составе белков электроды модифицируют многостеночными углеродными нанотрубками (МУНТ), диспергированными в хлороформе (1 мг/мл, ультразвуковая дезинтергация 1 мин). На рабочий электрод наносят 1 мкл суспензии, после испарения хлороформа наносят исследуемый белок, аминокислоту или пептид (60 мкл). Измерения проводят в горизонтальном режиме.

Для электроанализа ДНК и лекарственных препаратов рабочий электрод модифицируют дисперсией МУНТ или графена в хлороформе (1 мг/мл). Электроанализ ДНК и лекарственных препаратов проводят в горизонтальном режиме измерений при нанесении 60 мкл анализируемой пробы в 0.1 М калий фосфатном буфере (pH 7.4), содержащем 0.05 М NaCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрохимическим сигналом называется временная зависимость тока или напряжения, используемая для передачи информации. Носителем информации является один или несколько параметров сигнала: амплитуда сигнала, положение сигнала (потенциал). Численное значение информационного параметра называется аналитическим сигналом. Электрохимическая ячейка должна иметь систему электродов и электролит. Для точных измерений используют три электрода: индикаторный или рабочий электрод, электрод сравнения и вспомогательный электрод (противоэлектрод). Функционирование индикаторного электрода связано с его чувствительностью к частицам, присоединяющим или отдающим электроны. Электрод сравнения имеет стабильный и воспроизводимый потенциал, не зависящий от среды, в которой проводятся измерения. Он служит эталоном, относительно которого измеряют потенциал индикаторного (рабочего) электрода. В качестве электрода сравнения часто используют хлорсеребряный электрод сравнения Ag/AgCl, имеющий потенциал +0.207 мВ относительно стандартного водородного электрода. Если раствор имеет большое омическое сопротивление, и ток, протекающий через ячейку, достаточно велик, необходимо использование вспомогательного электрода. Вспомогательный электрод обеспечивает протекание тока через ячейку. Его потенциал и ток не измеряют [1].

Электрохимические методы, применяемые для анализа биологических объектов

Циклическая вольтамперометрия – метод регистрации зависимости $I=f(E)$, то есть тока от потенциала (потенциала относительно электрода сравнения) одновременно катодного и анодного процесса (рис. 1). Циклическая вольтамперометрия позволяет определить потенциал и амплитуду анодного процесса (E_{pa}) и катодного процесса (E_{pc}). Сигнал, как $E=f(t)$ в циклической вольтамперометрии представляет собой быстрый треугольный импульс. Циклическая вольтамперограмма характеризуется пиком восстановления и окисления ионов или молекул при определённом потенциале (относительно хлорсеребряного электрода сравнения, отн. Ag/AgCl) [1-3].

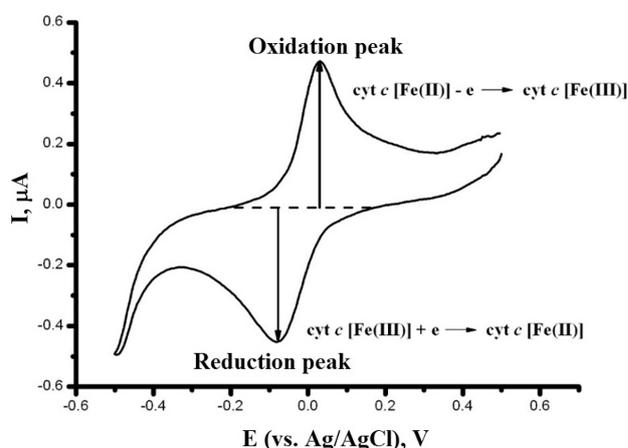


Рисунок 1. Типичная циклическая вольтамперограмма.

Зависимость потенциала электродной реакции от активностей (концентраций) окисленной и восстановленной форм вещества выражается уравнением Нернста:

$$E = E^{0'} + RT \ln \frac{a[Ox]}{a[Red]} \quad (1),$$

где E – потенциал электродной реакции (В), $E^{0'}$ – формальный потенциал электродной реакции (В), R – универсальная газовая постоянная (Дж/моль К), T – абсолютная температура (К), $a[Ox]$ и $a[Red]$ – активность окисленной и восстановленной форм вещества, соответственно (моль/л).

Формальный потенциал определяется уравнением:

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2),$$

где E_{pa} – потенциал пика окисления (анодного пика) и E_{pc} – потенциал пика окисления восстановления (катодного пика) (В). Уравнение (2) справедливо только для обратимых систем, поэтому используется термин средний потенциал или полупотенциал пиков.

В общем случае выражение для тока процесса $Ox + n e \rightleftharpoons Red$ описывается уравнением **Батлера-Фольмера**:

$$I = -nFAk_s \left\{ [Ox]_{x=0} e^{-\alpha \frac{nF}{RT} \eta} - [Red]_{x=0} e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT} \eta} \right\} \quad (3),$$

где I – ток (А), n – число переносимых электронов на одну молекулу окисленного вещества Ox , F – постоянная Фарадея (Кл/моль), A – площадь электрода (m^2), k_s – стандартная константа скорости переноса электрона (м/с), $[Ox]_{x=0}$ и $[Red]_{x=0}$ – поверхностные концентрации окисленной (Ox) и восстановленной (Red) форм вещества, α – коэффициент переноса (моль/ m^2) или доля перенапряжения, увеличивающая скорость катодного процесса и $1-\alpha$ анодного процесса, η – перенапряжение, то есть разность потенциалов электрода, через который протекает ток, и потенциала того же электрода при токе равно нулю ($E - E^0$) (В). Гетерогенная константа скорости переноса электронов (k_s) для процесса, контролируемого диффузией, в общем случае может быть выражена уравнением:

$$k_s = k_s^0 e^{[nF(E-E^0)]/RT} \quad (4),$$

где k_s^0 – стандартная гетерогенная константа скорости переноса электронов. При $E = E^0$, $k_s = k_s^0$.

Для процессов, контролируемых диффузией, ток пика пропорционален корню квадратному из скорости развёртки потенциала согласно общей форме уравнения Рэндлса-Шевчика [4]:

$$I_p = \psi_{\text{пик}}(p) nFA[X] \sqrt{\frac{nFvD}{RT}} \quad (5),$$

где I_p – ток пика окисления или восстановления вещества X (А), $\psi_{\text{пик}}(p)$ – безразмерная величина, зависящая от геометрии электрода и характера диффузии, $[X]$ – концентрация вещества X (моль/л), v – скорость развёртки потенциала (В/с), D – коэффициент диффузии (m^2/c).

Для обратимых электрохимических систем в отсутствие диффузии, то есть в которых электроактивные молекулы адсорбированы на электроде или окислительно-восстановительный процесс протекает вблизи поверхности электрода, ток пиков линейно зависит от скорости развёртки потенциала и выражается следующим уравнением:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_0 \quad (6),$$

где Γ_0 – поверхностная концентрация электроактивного вещества на электроде (моль/ m^2).

Для процессов, неконтролируемых диффузией, происходящих в тонком слое (слое, меньше диффузионного), электрохимическая кинетика описывается уравнением Лавирона [5].

$$E_p = E^0 + \frac{(2.303RT)}{(an'F)} \log \frac{(RTk^0)}{(an'F)} + \frac{(2.303RT)}{(an'F)} \log v \quad (7),$$

где v – скорость сканирования, n' – число электронов, переносимых в лимитирующей электрохимической реакции, α – коэффициент переноса, формальный окислительно-восстановительный потенциал, k^0 – стандартная гетерогенная константа скорости переноса заряда [см/сек], E_p – потенциал электрода, R – универсальная газовая постоянная [Дж/(моль К)], T – температура [К], F – постоянная Фарадея [Кл/моль].

С помощью данного метода можно получить экспериментальную картину о кинетике и термодинамике многих электрохимических систем, в том числе и электрокаталитических.

Квадратно-волновая вольтамперометрия (КВВА) – способ снижения границы определяемых концентраций при вольтамперометрическом измерении, при котором на постоянную составляющую напряжения накладывают переменную составляющую небольшой амплитуды прямоугольной формы с частотой 20-225 Гц.

Хроноамперометрия (амперометрия) – метод электрохимического анализа, в котором приложенное к ячейке напряжение поддерживается постоянным, а протекающий через ячейку ток является функцией концентрации, времени и ряда других факторов. Метод, основанный на измерении тока как функции концентрации при постоянном напряжении рабочего электрода, называется амперометрическим титрованием.

Дифференциально-импульсная вольтамперометрия (ДИВА) – метод регистрации зависимости тока от потенциала, при котором развёртка потенциала производится в виде прямоугольных импульсов. Один импульс состоит из изменения потенциала на промежуточное значение и задержки на 5-100 мс, после которой потенциал меняется на конечное значение, которое больше начального, но меньше промежуточного. Наложение импульса потенциала на электрод в эксперименте приводит к увеличению отношения между фарадеевским током и током заряжения, поскольку первый уменьшается пропорционально $1/t^{1/2}$. Вследствие этого можно получить снижение предела определяемых концентраций. Помимо этого, ДИВА характеризуется низким значением отношения ёмкостного тока к фоновому. Это обусловлено двойной выборкой тока в начале и конце импульса. Потенциостат/гальваностат регистрирует разность двух токов. Для обратимой системы высота пика $\Delta i_{\text{имп}}$ на дифференциально-импульсной вольтамограмме равна

$$\Delta i_{\text{имп}} = \frac{nFAD_{Ox}^{1/2} C_{Ox}}{\pi^{1/2} t_{\text{имп}}^{1/2}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad (8),$$

где $\Delta i_{\text{имп}}$ – высота пика [А], n – число электронов, участвующих в реакции, F – постоянная Фарадея [Кл/моль], A – площадь поверхности электрода [cm^2], D_{Ox} – коэффициент диффузии для окисленной формы вещества [cm^2/c], C_{Ox} – объёмная концентрация окисленной формы вещества [моль/ cm^3], $t_{\text{имп}}$ – время одного импульса, $\sigma = \exp(nF\Delta E_{\text{имп}}/2RT)$, R – универсальная газовая постоянная [Дж/(моль·К)], T – температура [К].

Инверсионная вольтамперометрия (ИВА) – способ снижения границы определяемых концентраций вольтамперометрического измерения, при котором до начала измерения производится предварительное концентрирование определяемого компонента из объёма раствора на поверхности электрода. Концентрирование может осуществляться за счёт процессов адсорбции или электроосаждения.

В наших исследованиях ИВА была применена для анализа кардиомаркера тропонина I. Электроанализ наночастиц золота и серебра на поверхности рабочего электрода методами ИВА позволил разработать количественный метод регистрации этого кардиомаркера в плазме крови [6].

Электроактивное покрытие электрода, то есть поверхностная концентрация электроактивного компонента Γ на электроде может быть рассчитано путём подсчёта площади под вольтамперной кривой при интегрировании тока прямой развёртки. Количество электроактивного вещества Γ на поверхности рабочего электрода рассчитывается по закону Фарадея из циклической вольтамперограммы:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (9),$$

где Γ – количество электроактивного вещества [моль/см²]; Q – количество электричества [Кулон] (площадь пика); n – число электронов; F – постоянная Фарадея (96485) [Кл/моль]; A – площадь рабочего электрода [см²].

В современных потенциостатах/гальваностатах для получения и обработки результатов измерений используется соответствующее программное обеспечение.

В работах по электроанализу используются различные типы электродов: как стационарные, так и трёхконтактные печатные электроды – одноразовые, промышленно выпускаемые графитовые электроды, получаемые последовательным нанесением на пластиковую основу проводящих слоев и изоляции методом трафаретной печати (ПГЭ). Размеры такого электрода 1×3 см. Выбор типа электрода определяется исследуемым биообъектом.

Электроанализ каталитической активности цитохромов P450

Ферменты в качестве распознающих элементов в электрохимическом биосенсорном анализе имеют широкое распространение вследствие высокой субстратной специфичности, чувствительности, а также разработанности применения кинетических закономерностей для расчёта параметров ферментативных реакций, протекающих на электроде. Цитохромы P450 относятся к классу гемопротеинов [7]. Основная задача электроанализа этого класса ферментов – зарегистрировать процесс обратимой реакции окисления – восстановления иона железа гема в соответствии со схемой:



Взаимодействие с субстратами – кислородом и органическим соединением – выражается в увеличении восстановительного каталитического тока (рис. 2).

Регистрируя каталитический ток методами вольтамперометрии или амперометрии, можно рассчитать такие важные кинетические параметры ферментативного процесса, как константу Михаэлиса (K_m) и электрохимическую каталитическую константу (k_{cat}). С помощью электрохимической

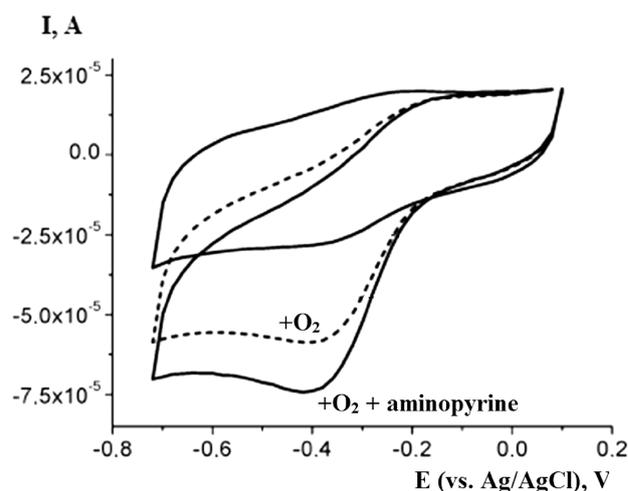


Рисунок 2. Циклические вольтамперограммы цитохрома P450 2B4, иммобилизованного на поверхности стеклоуглеродного электрода, модифицированного монтмориллонитом $(Na, Ca)_{0.33}(Al, Mg)_2(Si_4O_{10})$ и наночастицами платины в анаэробных условиях, в аэробных условиях, 0.1 М калий-фосфатный буфер, 0.05 М KCl, pH 7.4, в присутствии субстрата (8 мМ аминопирин), скорость сканирования 10 В/с [8, 9].

формы уравнения Михаэлиса-Ментен могут быть рассчитаны кинетические параметры ферментативных реакций (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m). Константа Михаэлиса определяется по электрохимической форме уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$I_{cat} = (I_{cat\ max} [S]) / (K_m + [S]) \quad (10),$$

где I_{cat} – каталитический ток при определённой концентрации субстрата, [Ампер]; $I_{cat\ max}$ – максимальный каталитический ток при полном насыщении фермента, [Ампер]; $[S]$ – концентрация субстрата, [М]; K_m – кажущаяся константа Михаэлиса, [М].

Максимальное значение каталитического тока может быть определено экспериментально по данным амперометрии при контролируемом напряжении и при насыщающей концентрации субстрата в системе. Уравнение максимального каталитического тока может быть представлено как:

$$I_{cat\ max} = nFA\Gamma_0 k_{cat} \quad (11),$$

где n – число электронов; F – постоянная Фарадея; A – площадь рабочего электрода, [см²]; Γ_0 – поверхностная концентрация электроактивного фермента, [моль/см²]; k_{cat} – электрохимическая каталитическая константа, [с⁻¹].

Информационные параметры электроанализа позволяют рассчитать не только кинетические константы ферментативных процессов, но и охарактеризовать биоэлектрохимическую систему, определить особенности электродных процессов, электродную кинетику переноса электронов в системе электрод/фермент, определить эффективные формальные потенциалы редокс-активных компонентов, исследовать стехиометрию компонентов электродных реакций, рассчитать количество электроактивного вещества, участвующего в процессе, исследовать условия обратимости/необратимости реакций,

в определённых условиях рассчитать изменение термодинамических параметров (ΔG , ΔS , ΔH), а также получить информацию о типе процесса (диффузионный или поверхностный) для исследуемого биоконпонента [1-3, 10].

Электрохимические методы применяются при исследовании термодинамики ферментативного катализа изоферментов цитохрома P450. Окислительно-восстановительный потенциал является функцией от температуры, изменения энтальпии и энтропии и может быть выражен уравнением:

$$E^{0'} = \frac{-\Delta H^{0'}}{nF} + \frac{T\Delta S^{0'}}{nF} \quad (12),$$

где $\Delta H^{0'}$ – стандартное изменение энтальпии [Дж/моль К], $\Delta S^{0'}$ – стандартное изменение энтропии [Дж/моль К].

Окислительно-восстановительный потенциал гемопротенинов зависит от взаимодействия гема как с лигандами, так и с апобелком. Таким образом, определение $E^{0'}$ как функции от температуры позволяет исследовать термодинамику при взаимодействии изоферментов цитохрома P450 с лигандами (в том числе с субстратами или ингибиторами). Изменение энтальпийного фактора отражает взаимодействие между ионом железа гема и лигандами, а изменение энтропийного фактора свидетельствует о конформационной реорганизации фермента, связанной с окислительно-восстановительными процессами [9, 11].

Электроанализ белков на основе окисления аминокислотных остатков

Электрохимический анализ белков и пептидов, не содержащих простетических групп, может быть осуществлён с помощью реакции окисления аминокислотных остатков для решения биомедицинских задач, в частности связанных с регистрацией различных типов посттрансляционных модификаций белков [12]. В 1980 г. две независимые группы под руководством V. Grabes и J.A. Reunaud впервые показали окисление белков на твёрдых электродах [13, 14]. Из аминокислот, входящих

в состав белков, помимо Cys и Cys-Cys, удалось зарегистрировать окисление Met, His, Tyr и Trp. Необходимо отметить, что в отличие от Tyr, Trp и Cys, электроокисление остатков His, Cys-Cys и Met происходит при достаточно высоких положительных потенциалах. В реакции окисления участвуют электроактивные группы аминокислот, находящиеся на поверхности молекулы и ориентированные к поверхности электрода [15].

Модификация рабочей поверхности электрода многостеночными углеродными нанотрубками (МУНТ) существенно усиливает сигнал электроокисления аминокислот [16] (рис. 3).

Важной областью применения реакции окисления аминокислотных остатков является процесс агрегации белков, играющий одну из ключевых ролей при нейродегенеративных заболеваниях. Ингибирование неправильного сворачивания белков в нейротоксичные олигомерные агрегаты – одна из стратегий поиска лекарственных средств для лечения данных заболеваний. Так, при болезни Альцгеймера в мозге происходит образование олигомеров и нерастворимых фибриллярных агрегатов амилоида-бета (A β). A β представляет собой растворимый нейропептид (4.5 кДа), состоящий из 38-42 аминокислотных остатков. Из электроактивных остатков, A β содержит три His6, His13 и His14, один Met35 и один Tyr10. Однако, окисление остатков His и Met требует высоких положительных потенциалов, превышающих 1 В (отн. Ag/AgCl), к тому же до сих пор не показано их окисление для A β . С другой стороны, единственный остаток Tyr A β (1-40) и A β (1-42), представляющих две изоформы A β различной длины, легко окисляется в нейтральных pH при потенциалах 0.6-0.7 В (отн. Ag/AgCl) подобно другим нейропептидам, содержащим один остаток Tyr. Прямой электрохимический подход может быть использован для мониторинга агрегации A β в различных условиях: в присутствии ионов Fe(II), Cu(II) и Zn(II) (A β (1-42), A β (1-16), A β (1-40) в присутствии сим-триазиновых производных в качестве модуляторов агрегации (A β (1-42)) или в присутствии

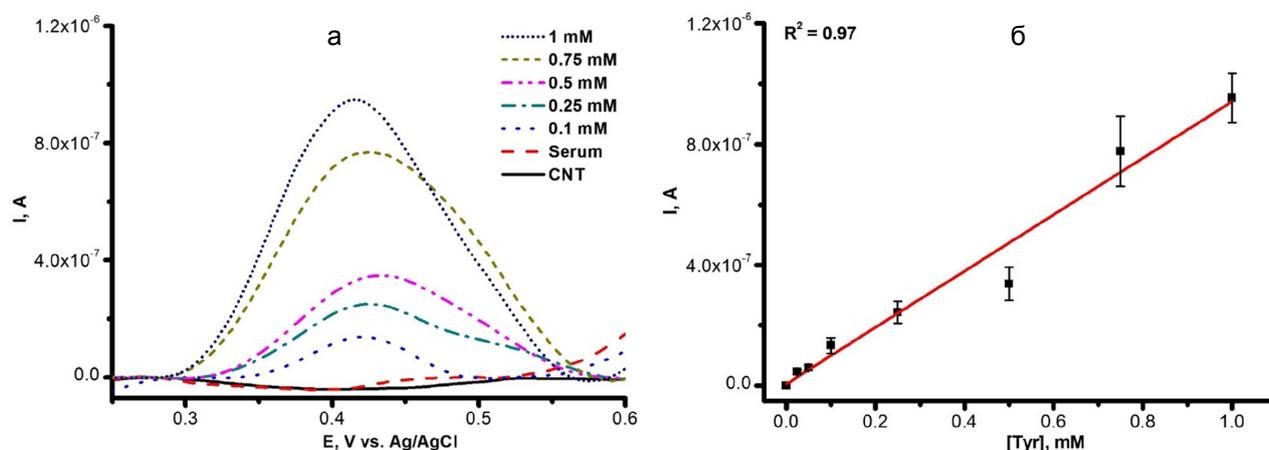


Рисунок 3. а) ДИВА (окислительная кривая) электроокисления L-тирозина (0.1 мМ ÷ 1 мМ) в сыворотке крови человека на печатных графитовых электродах, модифицированных МУНТ, суспендированными в хлороформе [16]. б) Зависимость окислительного тока ДИВА от концентрации тирозина в сыворотке крови.

пентапептида, разрушающего β -пластины, как ингибитора агрегации (A β (1-42)). Ионы металлов (в частности Zn(II) и Cu(II)) выполняют важную функцию в патологическом процессе агрегации, а A β взаимодействует с ионами металлов через металл-связывающий домен, состоящий из N-концевых аминокислотных остатков 1-16. Основываясь на измерении сигнала окисления единственного остатка Tyr10 A β , был разработан электрохимический экспресс-анализ комплексообразования между A β и ионами металлов. С этой целью был выбран водорастворимый синтетический пептид A β (1-16), представляющий металл-связывающий домен A β . Образование комплексов A β (1-16) с ионами двухвалентных металлов (Zn(II), Cu(II), Mg(II) и Ca(II)) было исследовано при концентрации A β (1-16) 5×10^{-5} М и при концентрации ионов металлов в области 1×10^{-5} – 5×10^{-2} М в Трис-буфере с pH от 5 до 9. Прибавление Zn(II) либо Cu(II) ионов значительно снижало пик окисления A β (1-16) и вызывало сдвиг потенциала пика в область более положительных значений, в то время как ионы Mg(II) и Ca(II) не оказывали какого-либо эффекта в пределах экспериментальной ошибки (рис. 4) [17].

Альбумин сыворотки человека и миоглобин мышц лошади показали схожее поведение относительно тестируемых ионов металлов. Электрохимический анализ белков в области положительных потенциалов окисления аминокислот может быть применён для изучения комплексообразования других функционально значимых белков и пептидов с ионами металлов.

Электрохимические методы определения ДНК

В основе электрохимических методов определения концентрации нуклеиновых кислот лежит способность гетероциклических азотистых оснований, входящих в состав нуклеотидов, электрохимически окисляться на поверхности электрода.

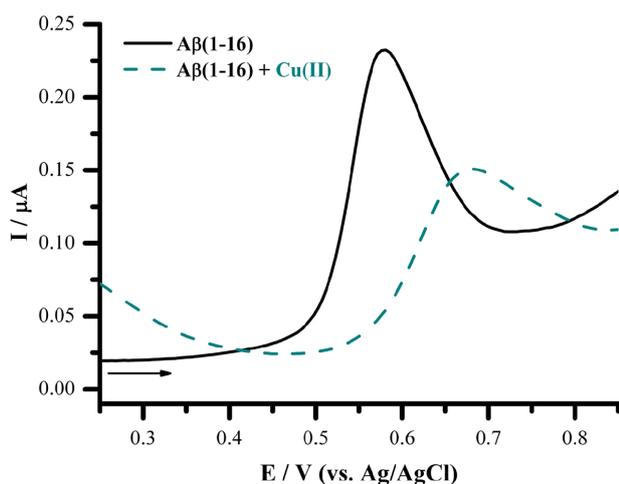


Рисунок 4. КВВА окислительного сигнала амилоида-бета (A β)(1-16) в присутствии ионов Cu(II). Концентрация A β (1-16) 5×10^{-5} М; концентрация Cu(II) 1×10^{-3} М, Трис-буфер, pH 7.2. В экспериментах с A β были использованы немодифицированные электроды, полученные методом графитной печати.

Регистрируя зависимость тока, протекающего через рабочий электрод, находящийся в контакте с электроактивным веществом, от разности потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения, можно получить данные о концентрации электроактивного вещества, кинетике и термодинамике электрохимической реакции. Электрохимические методы для изучения реакции переноса электронов между основаниями ДНК и ртутным электродом были впервые использованы более 50 лет назад. Тем не менее, до сих пор электрохимические методы исследования ДНК остаются актуальными и перспективными, поскольку применение современных твёрдых материалов для получения электродов и способов модификации электродов позволяет увеличить чувствительность методов, упростить протоколы проведения исследований, снизить их стоимость.

Все гетероциклические основания, входящие в состав ДНК, пурины (аденин (А) и гуанин (G)); и пиримидины (тимин (Т) и цитозин (С)) способны электрохимически окисляться на поверхности электрода по pH-зависимому механизму [10, 18] (рис. 5).

Пурины окисляются в области значительно меньших положительных потенциалов, чем пиримидины, окисление которых происходит только в сильно положительной области, что вызывает трудности при их регистрации, связанные с “окном потенциалов” используемых типов электродов. Также во многих работах было показано, что для одинаковых концентраций пуринов и пиримидинов наблюдаемые пики окисления пуринов были значительно более интенсивны. По этим причинам электрохимические методы исследования ДНК, как правило, базируются на регистрации окисления пуринов (рис. 6). В электрохимических методах при определении концентрации двухцепочечной ДНК для расчёта количества пиримидинов пользуются правилом Чаргаффа, в соответствии с которым количество тимина равно количеству аденина, а количество гуанина равно количеству цитозина (A=T, G=C).

Активно разрабатываются новые углеродные наноматериалы для модификации электродов с целью снижения потенциала электроокисления гетероциклических оснований [18]. Было показано,

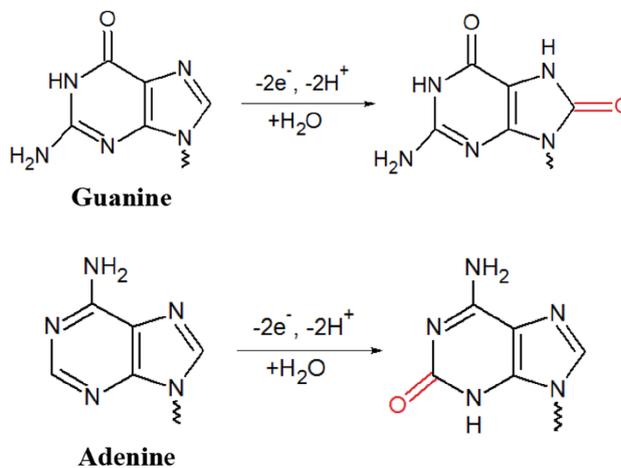


Рисунок 5. Схема электроокисления пуринов.

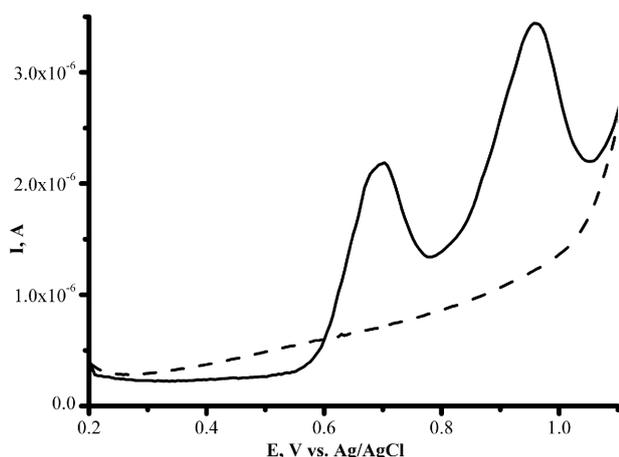


Рисунок 6. ДИВА ПГЭ/МУНТ (---) и ДНК на ПГЭ/МУНТ (—). На рабочую поверхность электрода наносили 2 мкл раствора ДНК (3 мг/мл), выделенного из молок осетровых рыб, измерения проводились при комнатной температуре, в диапазоне потенциалов 0.4÷1.5 В, шаг потенциалов 0.05 В, амплитуда модуляции 0.05 В, потенциал аккумуляирования 0.4 В, время аккумуляирования 5 мин.

что использование стеклоглеродных рабочих электродов, модифицированных мезопористыми углеродными волокнами, смещает потенциал окисления по сравнению с немодифицированным электродом, что даёт возможность зарегистрировать электроокисление не только пуриновых оснований А и Г, но и пиримидиновых оснований Т и С [19].

Анализ лекарственных препаратов с помощью электрохимических методов

Аналитические методы анализа лекарственных средств необходимы на различных стадиях дизайна новых лекарственных средств, исследовании их стабильности и контроля качества, изготовления рецептурных форм, исследовании фармакокинетики и фармакодинамики, метаболических биотрансформаций ксенобиотиков, проведении доклинических и клинических испытаний. Высокочувствительные методы анализа необходимы в постмаркетинговом контроле качества, а также при злоупотреблении наркотическими средствами. Электроанализ и использование наноматериалов является одним из наиболее чувствительных, экономичных и информативных методов в современной аналитической химии, биохимии, фармакологии. Электроанализ лекарственных препаратов основан на реакции электроокисления/электровосстановления и регистрации амплитуды сигнала при потенциале окисления/восстановления препарата [20] (рис. 7). Алгоритм анализа лекарственных препаратов

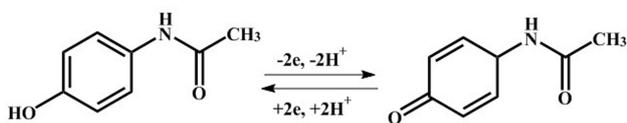


Рисунок 7. Механизм электрохимического окисления/восстановления ацетаминофена.

с использованием электродов, получаемых методом трафаретной печати, заключается в проведении эксперимента в горизонтальном режиме измерений, что позволяет использовать минимальное количество пробы (60 мкл анализируемого раствора).

Парацетамол (ацетаминофен, N-ацетил-*n*-аминофенол) широко используется как жаропонижающее и обезболивающее средство [20, 21].

При электроокислении ацетаминофена на немодифицированном графитовом электроде наблюдается пик при потенциале $E_{ок} = +0.51 \pm 0.02$ В (рис. 8).

Предел определяемых концентраций для ацетаминофена составил 1.10×10^{-9} М. Анализ ацетаминофена в сыворотке крови даёт чёткий пик окисления препарата, что позволяет использовать метод в аналитических целях (рис. 9).

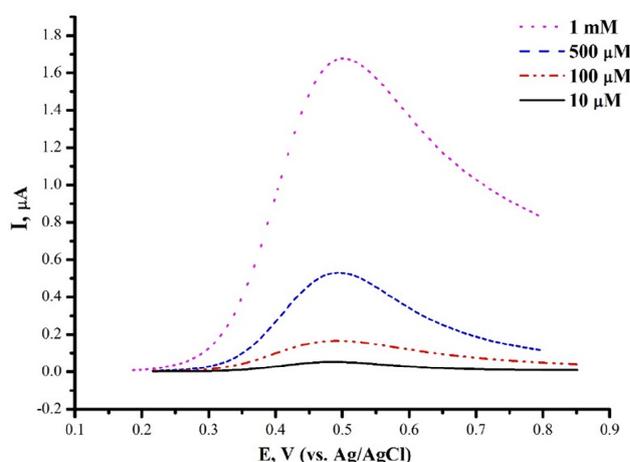


Рисунок 8. ДИВА ацетаминофена при разных концентрациях на немодифицированном графитовом электроде. Измерения проводили в 0.1 М калий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.05 М NaCl) в диапазоне потенциалов 0÷1.2 В, при комнатной температуре.

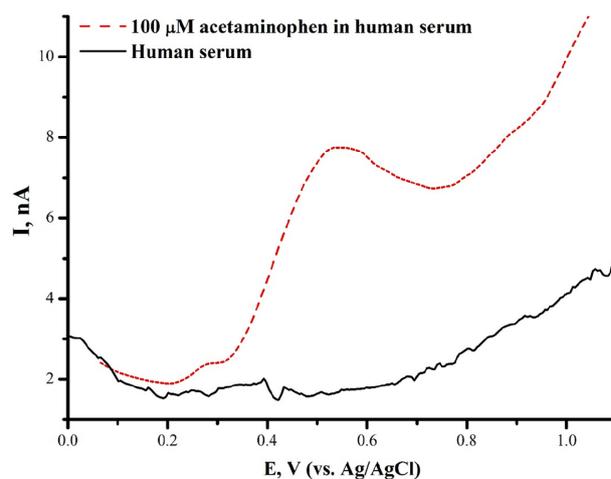


Рисунок 9. Дифференциально-импульсная вольтамперограмма (ДИВА) ацетаминофена в сыворотке крови на немодифицированном ПГЭ. Измерения проводили в диапазоне потенциалов 0÷1.6 В, частота 25 Гц, в аэробных условиях, при комнатной температуре.

Таблица. Сравнительные характеристики электрохимических систем.

Биообъект	Тип электрода, модификация	Режим измерений, электрохимический метод, тип процесса	Линейный диапазон определяемых концентраций
Цитохромы P450	ПГЭ, Мембраноподобные соединения (ДДАБ), наночастицы золота/ДДАБ монтмориллонит (Na,Ca) _{0,33} (Al,Mg) ₂ (Si ₄ O ₁₀) и наночастицы платины	Вертикальный, ЦВА, амперометрия, КВВА, ДИВА Перенос электронов в слое у поверхности электрода (protein film voltammetry)	$\Gamma=10^{-15}$ моль гемопротейна/электрод*
Белки и пептиды, не содержащие простетические группы	ПГЭ, МУНТ/хлороформ	Горизонтальный КВВА, ДИВА, Диффузионно-контролируемый	1 нМ ÷ 0,1 мМ
ДНК	ПГЭ, МУНТ/хлороформ	Горизонтальный КВВА, ДИВА	5÷500 мкг/мл (пик гуанина, E=+0.7±0.05 В 0.5÷50 мкг/мл (пик аденина, E=+0.96±0.05 В.
Ацетаминофен	ПГЭ, МУНТ/хлороформ	Горизонтальный КВВА, ДИВА	100 нМ ÷ 5мМ

Примечание: * - расчёт электроактивного цитохрома P450 был проведён с помощью данных ДИВА.

Модификация рабочей поверхности электрода дисперсиями графена, повышает чувствительность анализа в 20 раз (предел определяемых концентраций составил 5×10^{-11} М).

Разработаны методы электроанализа диклофенака (вольтарен) ($E_{ок} = 0.56 \pm 0.02$ В); ибупрофена ($E_{ок} = +1.20 \pm 0.05$ В) с использованием ПГЭ, модифицированных дисперсиями углеродных наноматериалов (МУНТ, графен). Исследуемые лекарственные препараты являются субстратами цитохромов P450, поэтому такой подход является комплементарным для регистрации каталитической активности цитохромов P450.

Рассмотрены принципы, методы и возможности электроанализа различных классов биологически активных соединений, а также пути от электрохимических данных к кинетике электрокатализа (таблица).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00374 и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг.

ЛИТЕРАТУРА

- Bard, A.E. (2001) *Electrochemical methods. Fundamental and Applications*, A.E. Bard, L.R. Faulkner. NY: Eds John Wiley & Sons, Second edition
- Scholz, F. (2002) *Electroanalytical methods. Guide to Experiments and Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Wang, J. (2006) *Analytical Electrochemistry*, Third edition, p. 32, Wiley-VCH
- Compton, R., & Banks, C. (2011) *Understanding voltammetry* (2nd edition), by Imperial College Press
- Laviron, E. (1979) General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical

systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 101, 19-28. DOI: 10.1016/S0022-0728(79)80075-3

6. Shumkov, A.A., Suprun, E.V., Shatinina, S.Z., Lisitsa, A.V., Shumyantseva, V.V., & Archakov, A.I. (2013) Gold and Silver Nanoparticles for Electrochemical Detection of Cardiac Troponin I based on Stripping Voltammetry. *BioNanoScience*, 3, 216-222. DOI: 10.1007/s12668-013-0090-9

7. Hrycaj, E.G., & Bandiera, S.M. (2015) Monooxygenase, peroxxygenase and peroxidase properties and reaction mechanism of cytochrome P450 enzymes. pp. 1-61. In E.G. Hrycaj and S.M. Bandiera (eds.), *Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 851. Springer International Publishing Switzerland DOI: 10.1007/978-3-319-16009-2_9

8. Shumyantseva, V.V., Ivanov, Yu.D., Bistolas, N., Scheller, F.W., Archakov, A.I., & Wollenberger, U. (2004) Direct Electron Transfer of Cytochrome P450 2B4 at Electrodes Modified with Nonionic Detergent and Colloidal Clay Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 76, 6046-6052. DOI: 10.1021/ac049927y

9. Shumyantseva, V.V., Bulko, T., Shich, E., Makhova, A., Kuzikov, A., & Archakov, A.A. (2015) Cytochrome P450 Enzymes and Electrochemistry: Crosstalk with Electrodes as Redox Partners and Electron Sources. pp. 229-246. In E.G. Hrycaj and S.M. Bandiera (eds.), *Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 851. Springer International Publishing Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-16009-2_9

10. Bartlett, P.N. (Ed.) (2008) *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, Ch. 2, John Wiley & Sons, Ltd., p. 268

11. Hagen, K.D., Gillan, J.M., Im, S.-C., Landefeld, S., Mead, G., Hiley, M., et al. (2013) Electrochemistry of mammalian cytochrome P450 2B4 indicates tunable thermodynamic parameters in surfactant films. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 129, 30-34. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2013.07.039

12. Shumyantseva, V.V., Suprun, E.V., Bulko, T.V., & Archakov, A.I. (2014) Electrochemical methods for detection of post-translational modifications of proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 131-139. DOI: org/10.1016/j.bios.2014.05.001

13. Brabec, V., & Mornstein, V. (1980) *Biochimica et Biophysica*

- Acta, 625, 43-50. DOI: 10.1016/0005-2795(80)90106-3
14. Reynaud, J.A., Malfoy, B., & Bere, A. (1980) The electrochemical oxidation of three proteins: RNAase A, bovine serum albumin and concanavalin A at solid electrodes. *Journal of Electroanalytical and Chemical Interfacial Electrochemistry*, 116, 595-606. DOI: 10.1016/S0022-0728(80)80281-6
15. Suprun, E.V., Zharkova, M.S., Morozevich, G.E., Veselovsky, A.V., Shumyantseva, V.V. & Archakov, A.I. (2013) Analysis of Redox Activity of Proteins on the Carbon Screen Printed Electrodes. *Electroanalysis*, 25(9), 2109-2116. DOI: 10.1002/elan.201300248
16. Shumyantseva, V., Bulko, T., Kuzikov, A., Masamrekh, R., & Archakov, A. (2018) Analysis of L-tyrosine based on electrocatalytic oxidative reactions via screen-printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes and nanosized titanium oxide (TiO₂). *Amino Acids*, 50, 823-829. DOI: 10.1007/s00726-018-2557-z
17. Radko, S.P., Khmeleva, S.A., Suprun, E.V., Kozin, S.A., Bodoev, N.V., Makarov A.A. et al. (2015) Physico-chemical methods for studying amyloid- β aggregation. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 9(3), 258-274. DOI: 10.18097/PBMC20156102203
18. Abo-Hamad, A., AlSaadi, M.A., Hayyan, M., Juneidi, I., & Hashim, M.A. (2016) Ionic Liquid-Carbon Nanomaterial Hybrids for Electrochemical Sensor Applications: a Review. *Electrochimica Acta* 193 (2016) 321-343. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.02.044
19. Ren, S., Wang, H., Zhang, H., Yu, L., Li, M., & Li, M. (2015) Direct electrocatalytic and simultaneous determination of purine and pyrimidine DNA bases using novel mesoporous carbon fibers as electrocatalyst. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 750, 65-73. DOI: 10.1016/j.jelechem.2015.05.020
20. Rahi, A., Karimian, K., & Heli, H. (2016) Nanostructured materials in electroanalysis of pharmaceuticals. *Analytical Biochemistry*, 497, 39-47. DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.018
21. Cernat, A., Tertis, M., & Sandulescu, R. (2015) Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. *Analytica Chimica Acta*, 886, 16-28. DOI: 10.1016/j.aca.2015.05.044
- Поступила: 22. 05. 2018.
Принята к публикации: 06. 06. 2018.

ELECTROCHEMICAL METHODS FOR STUDIES OF BIOLOGICAL MOLECULES

V.V. Shumyantseva^{1,2}, T.V. Bulko², E.V. Suprun¹, A.V. Kuzikov^{1,2}, L.V. Sigolaeva^{1,3}, R.A. Masamrekh^{1,2}, A.I. Archakov^{1,2}

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., bldg. 8, Moscow, 119121 Russia; e-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Biochemistry Department of Medico-Biological faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Chemical Department, Moscow, Russia

This paper focuses on experimental data of electroanalysis of enzymes, proteins, peptides, DNA, and medicinal preparations, obtained by authors. Methods for enzyme electrodes preparation, methods for kinetic parameters calculations based on analysis of electrochemical data. Results are described as algorithm for efficient electrochemical reaction of biomolecules.

Key words: electroanalysis; bioelectrochemistry; hemeproteins; DNA; drugs; medicinal preparations; electrooxidation; electrocatalysis

ACKNOWLEDGEMENTS

This study supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-04-00374) and within the framework of the Fundamental Research Program of State Academies of Sciences for 2013-2020.