

УДК 616-073.584

© Ф. В. Верещагин, В. М. Гусев, О. Н. Компанец, М. А. Павлов,
Д. П. Чулков, Ю. М. Евдокимов, С. Г. Скуридин

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ОПТИЧЕСКОГО СИГНАЛА КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Обсуждается возможность создания многофункциональной аналитической системы (биосенсора) на основе наноконструкций (НаК) ДНК (биодатчик) и портативного дихрометра с использованием светоизлучающих диодов. Такая система может работать в режимах измерения оптических свойств НаК ДНК и калибровки характеристик сигнала кругового дихроизма взаимодействующего с биодатчиком биологически активного вещества (БАВ), а также в режиме измерения скорости диффузии БАВ в биологически активный материал биодатчика.

Кл. сл.: биосенсор, наноконструкции ДНК, круговой дихроизм, биологически активное вещество

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время линейка аналитических систем на основе портативного дихрометра с использованием ДНК-биодатчиков разного типа — "жидких" частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК, наноконструкций (НаК) ДНК, в которых молекулы ДНК упорядочены и сшиты между собой различными наномостиками, иммобилизованных в геле НаК ДНК и т. п. [1, 2] — достаточна обширна. Для биодатчиков на основе НаК ДНК характерна не только аномальная оптическая активность, проявляемая в виде интенсивной полосы в спектре кругового дихроизма (КД) в области поглощения азотистых оснований ДНК на длине волны ~260–270 нм, но и дополнительная аномальная оптическая активность в области поглощения элементов наномостиков, "сшивающих" НаК ДНК, в частности хромофоров антибиотиков в области длин волн 450–650 нм, например дауномицина в области 505–525 нм. Величина аномальной оптической активности таких биодатчиков в полосе поглощения антибиотика остается неизменной в течение длительного времени и может уменьшаться (вплоть до полного исчезновения) под действием биологически активных веществ (БАВ), "мишенью" для которых служат структурные элементы наномостиков, являющиеся по сути наносенсорами. Встраивание (интеркаляция) в структуру "жидких" частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК биологически активных соединений (например, противоопухолевых анти-

биотиков) также приводит к появлению в спектре кругового дихроизма дополнительной аномальной полосы в видимой области спектра, амплитуда которой зависит от концентрации указанных соединений и используется для установления в анализируемой жидкой среде их наличия и концентрации.

Задача исследования оптических свойств и контроля качества биодатчика на основе НаК ДНК, а также изменения этих свойств при взаимодействии с БАВ обычно решается с использованием дихрометров, имеющих в своем составе ламповый источник излучения и монохроматор и работающих в широком диапазоне длин волн со слабыми световыми потоками, что, конечно, ограничивает чувствительность регистрации сигнала КД и точность определения концентрации определяемых БАВ в анализируемых пробах.

Опыт использования в составе оптической биосенсорной аналитической системы компактного дихрометра для определения дауномицина в жидкости, работающего на двух дискретных рабочих длинах волн [3, 4], позволил говорить о возможности реализации многофункциональной аналитической системы, которая содержала бы размещенный на вращающемся диске турели достаточно большой набор высокоярких интенсивных светодиодных источников излучения, снабженных коллимирующими линзами и узкополосными интерференционными фильтрами, вместе формирующих достаточное количество узкополосных излучающих комплексов и обеспечивающих

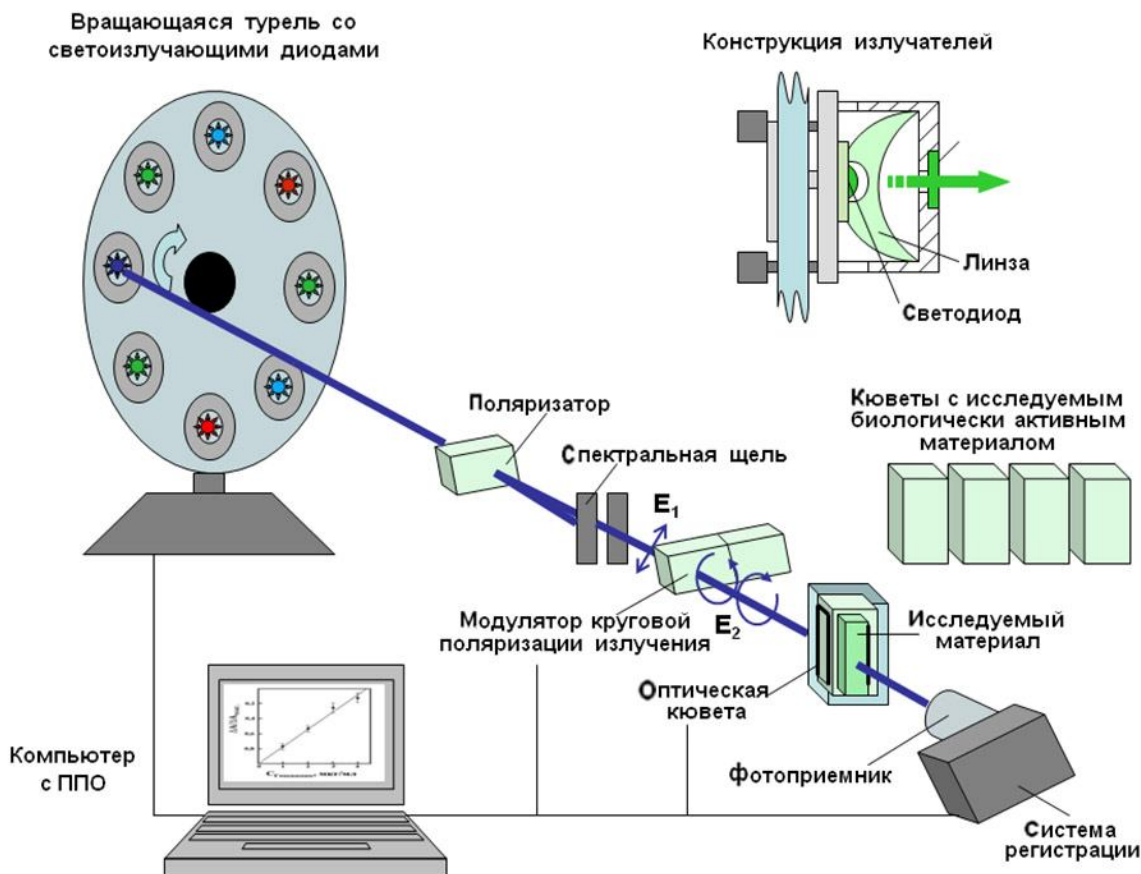


Рис. 1. Принцип работы многофункциональной аналитической системы для определения характеристик оптического сигнала кругового дихроизма биологически активного материала (для наглядности диск турели показан вращающимся в вертикальной плоскости)

функционирование системы в нескольких режимах [5] (рис. 1). Компоновка системы может быть еще более компактной и устойчивой, если диск турели вращается в горизонтальной плоскости и используется уголкового отражателя для изменения направления световых лучей. Съемная кювета с жидкими пробами размещается вертикально в приемном устройстве; для размещения исследуемого гелевого или пленочного образца используется перемещаемая микроплата с лунками (с оптически проницаемым для излучения дном). Выбор режима работы системы (каждого ее элемента и системы в целом) и подачу управляющих команд осуществляет встроенный микрокомпьютер.

При сравнении с существующими аналитическими системами, работающими на принципах измерения КД, такая "многолучевая" система по-

тенциально обладает более высокой чувствительностью регистрации сигнала КД и точностью определения концентрации БАВ в анализируемых пробах, в том числе ультранизкой концентрации (до $\sim 10^{-9}$ моль/мл).

ОПИСАНИЕ РЕЖИМОВ РАБОТЫ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Режим тестирования системы в УФ и видимом диапазонах осуществляется при размещении в приемном устройстве оптически проницаемой съемной кюветы с размещенной в ней тестовой пробой, содержащей эталон оптической активности. В качестве такого эталона может быть использован в том числе и сам биологически

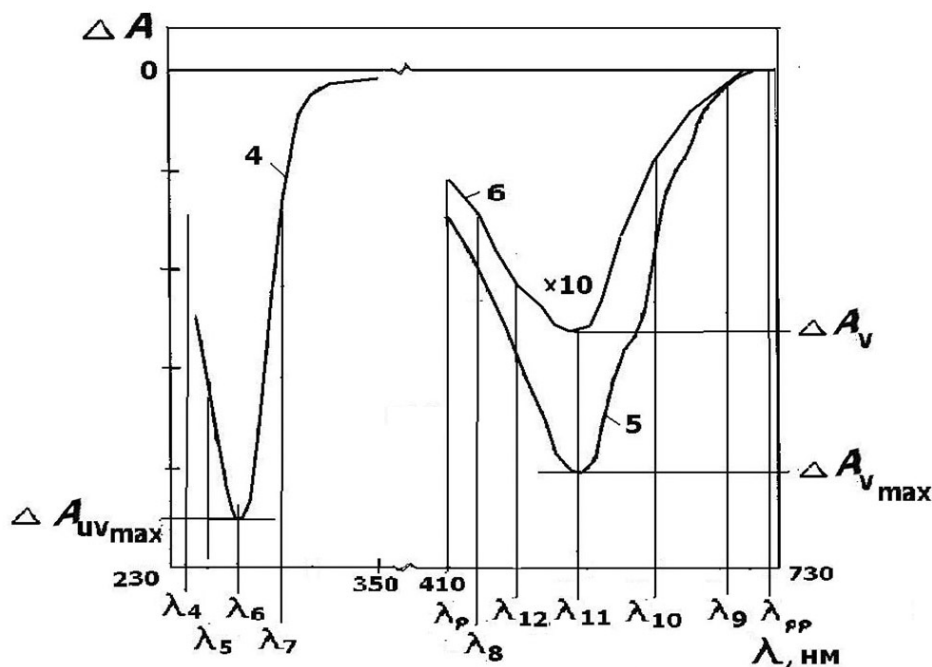


Рис. 2. Пример определения характеристик КД биологически активного материала, выполненного в виде интегрального биодатчика, содержащего "сшитые" мостиками наноконструкции ДНК в водно-солевом растворе полиэтиленгликоля при облучении в ультрафиолетовом и видимом диапазонах с изменением величины максимума сигналов КД в видимой области спектра в сторону ее уменьшения при взаимодействии с биологически активным веществом (кривая 6)

активный материал в виде жидкокристаллического ДНК-биодатчика, откалиброванный по первичному эталону. По результату регистрации спектра КД делается вывод о работоспособности системы выявлять и регистрировать сигналы КД исследуемых проб, вычислять их характеристики и визуализировать их с достаточной степенью достоверности.

Процесс измерений осуществляется путем подачи системой управления команды включения последовательно источников излучения и команд поворота диска турели, достаточного для последовательного формирования излучающих комплексов. Например, измерение величины аномального оптического сигнала КД биологически активного материала (БАМ) биодатчика на основе "сшитых" мостиками НК ДНК в исходном состоянии производится при облучении биодатчика в видимой области спектра с максимумом ΔA_{Vmax} на длине волны $\lambda_{11} = 505$ нм и при облучении в УФ-области с максимумом ΔA_{UVmax} на длине волны $\lambda_6 = 260$ нм (рис. 2). Данные измерений служат паспортом биодатчика в исходном состоянии. Последующее добавление в исследуемую пробу известного БАВ может привести к частичному или полному разрушению БАМ или показать инертность БАМ к БАВ. Исчезновение сигнала КД БАМ в ультрафиолетовой области спектра позволяет определить количество БАВ, приводящее к полному разрушению структуры БАМ.

Режим определения скорости диффузии БАВ в БАМ и/или исследования динамики трансформации наноконструкций ДНК при взаимодействии с БАВ реализуется после тестирования БАМ в контакте с известной концентрацией БАВ и определения длин волн, на которых оптическая активность КД биодатчика в исходном состоянии максимальна. В этом режиме обеспечиваются работа излучающих комплексов на характерных длинах волн КД биодатчика в течение заданного времени экспозиции, измерение величины максимальной амплитуды ΔA сигнала КД биодатчика до контакта с БАВ и после полного проникновения БАВ в молекулярные структуры биодатчика, при этом фиксируется время прекращения взаимодействия биодатчика с БАВ по моменту прекращения изменения амплитуды сигнала КД пробы.

Заметим, что система позволяет время определения скорости диффузии БАВ в биодатчик существенно сократить за счет проведения измерений величины КД БАМ, обработанных раствором БАВ, через небольшие одинаковые интервалы времени ΔT , достаточные для проявления характерной зависимости изменения аномального сигнала КД биодатчика во времени при взаимодействии БАВ с чувствительными элементами биодатчика, т. е. не дожидаясь осуществления полной диффузии БАВ в биоматериал. На рис. 3 в виде кривых 15, 16 и 17 представлена динамика изменения амплитуды сигнала КД через равные

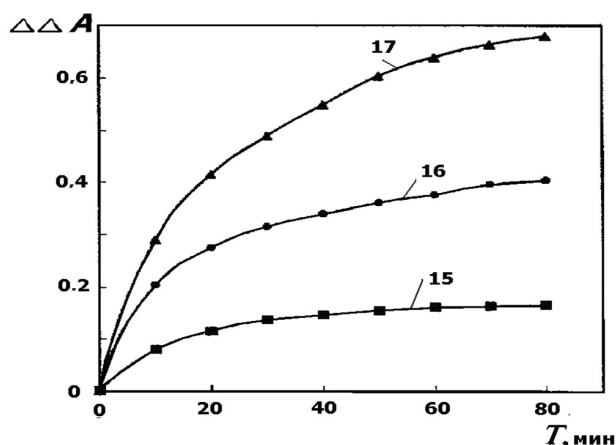


Рис. 3. Динамика изменения амплитуды сигнала КД через равные интервалы времени в течение 80 мин взаимодействия биодатчика с водным раствором белка сывороточного альбумина (БСА) в различных концентрациях.

Концентрация БСА: 1.1 мкг/мл — кривая 15, 3.4 мкг/мл — кривая 16 и 5.7 мкг/мл — кривая 17

интервалы времени в течение 80 мин взаимодействия биодатчика с водным раствором белка сывороточного альбумина (БСА) в различных концентрациях.

Режим калибровки оптических свойств биологически активного материала — это стандартная процедура регистрации величины сигналов КД биодатчика на характерных для него длинах волн в течение заданного времени экспозиции в нескольких пробах, соответствующих разным концентрациям взаимодействующего с биодатчиком БАВ, в том числе до контакта с БАВ.

Облучение проб производится как минимум на трех длинах волн — соответствующей максимуму сигнала КД биодатчика в исходном состоянии и на длинах волн (большей и меньшей первой), соответствующих минимальным значениям сигнала КД биодатчика в исходном состоянии (для учета фонового уровня сигнала КД). Например, для случая биодатчика с мостиковыми "сшивками" ДНК величина максимума сигнала в спектре КД в области поглощения ДАУ (элемент мостика) на длине волны $\lambda = 505$ нм изменяется в связи с разрушением мостиков "сшивки" при взаимодействии биодатчика в калибровочных пробах с водным раствором БСА на уровне концентрации в несколько мкг/мл.

Величины изменения максимума амплитуды сигналов ΔA_{\max} на указанной выше длине волны для заданных одинаковых промежутков времени и для каждой из исследуемых проб с разной концентрацией БАВ, рассчитанные с учетом фоновых сигналов, сохраняются в памяти компьютера, где

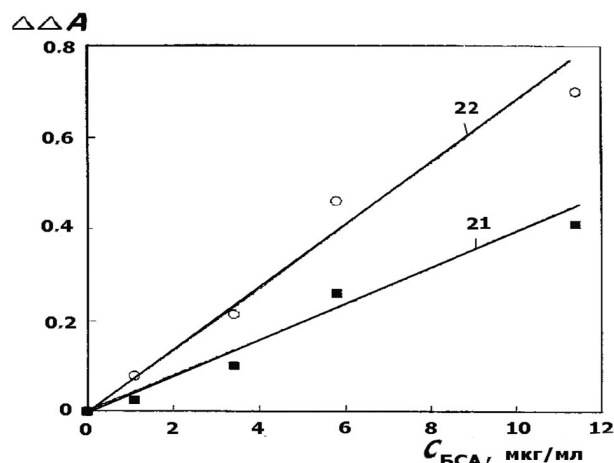


Рис. 4. Калибровочные зависимости относительного изменения максимума амплитуды сигнала КД БАВ, выполненного в виде биодатчика, содержащего молекулы ДНК в упорядоченном состоянии, сшитые "мостиками" комплексов "ДАУ-Cu", после обработки водным раствором белка (БСА) в известной концентрации в течение 10 мин (кривая 21) и после обработки водным раствором белка в известной концентрации в течение 60 мин (кривая 22)

затем соотносятся с величинами результирующих сигналов КД всех исходных проб биодатчика, в результате чего формируются зависимости величины $\Delta\Delta A = \Delta A / \Delta A_{\max}$ относительного изменения амплитуды сигнала КД, соответствующие времени обработки биодатчика биологически активным веществом.

Полученная зависимость между относительным изменением относительной амплитуды $\Delta\Delta A$ полосы в спектре КД биодатчика и концентрацией БАВ в растворе в интервале изменений его концентрации может быть использована в качестве калибровочной прямой при определении концентрации БАВ в растворах с помощью биодатчика. Таким образом были получены, например, калибровочные зависимости для определения наличия и содержания белка сывороточного альбумина (рис. 4) и гипорамина в исследуемых пробах, предположительно содержащих указанные БАВ в неизвестной концентрации. Полученная аналитическая калибровочная зависимость для митоксантрона в широкой области концентраций, в том числе в области концентраций до 10^{-9} моль/мл, позволяет осуществить его определение с более высокой (в 2–3 раза) точностью и воспроизводимостью по сравнению с аналитической калибровочной кривой, полученной с помощью дихрометра-прототипа. Калибровочные данные сохраняются в памяти компьютера для последующего использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя, можно сказать, что представляемая многофункциональная аналитическая система при сравнении ее с существующими аналитическими системами обладает более высокой чувствительностью при исследовании оптических свойств и контроле качества биодатчиков на основе ДНК, при измерении оптической активности, определении наличия и концентрации практически важных классов БАВ в жидкости, а также обладает дополнительными функциональными возможностями, в частности при использовании в качестве оптического диффузометра при анализе механизмов транспорта БАВ, разрушающих биодатчик, и определении их коэффициентов диффузии в БАМ. В силу этих возможностей такая система может с успехом использоваться, например, в лабораториях медицинских учреждений для оперативного мониторинга низких содержаний противоопухолевых антибиотиков в биологической жидкости и принятия своевременного решения в лечебно-диагностическом процессе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евдокимов Ю.М., Саянов В.И., Семенов С.В., Скуридин С.Г. Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК / Под ред. Ю.М. Евдокимова. М.: Радиотехника, 2008. 296 с.
2. Евдокимов Ю.М., Саянов В.И., Скуридин С.Г. Наноструктуры и наноконструкции на основе ДНК / Под ред. Ю.М. Евдокимова. М.: ССАЙНС-ПРЕСС, 2010. 256 с.
3. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Верещагин Ф.В., Гусев В.М., Компанец О.Н., Чулков Д.П. Наноконструкции на основе двухцепочечных молекул ДНК и их оптические свойства // XXV съезд по спектроскопии, Троицк—Москва, 3–7 октября 2016 г. Сборник тезисов.

сов. Москва: МПГУ, 2016 (ISBN 978-5-4263-0368-3). С. 219–220.

4. Верещагин Ф.В., Гусев В.М., Компанец О.Н., Чулков Д.П., Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г. Компактный двухволновый дихрометр для оптической биосенсорной аналитической системы медицинского назначения // XXV съезд по спектроскопии, Троицк—Москва, 3–7 октября 2016 г. Сборник тезисов. Москва: МПГУ, 2016 (ISBN 978-5-4263-0368-3). С. 284–285.
5. Гусев В.М., Компанец О.Н., Павлов М.А., Чулков Д.П., Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г. Многофункциональная аналитическая система для определения характеристик оптического сигнала кругового дихроизма биологически активного материала. Патент РФ (изобретение) № 2 569 752 // Б.И. № 36 (27.12.2014).

Институт спектроскопии РАН, Москва, Троицк
(Верещагин Ф.В., Гусев В.М., Компанец О.Н., Павлов М.А.)

РМП "Медтехника" УДП РФ, Москва (Чулков Д.П.)

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
(Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г.)

Контакты: *Компанец Олег Николаевич*,
onkomp@isan.troitsk.ru

Материал поступил в редакцию 28.06.2018

MULTIFUNCTIONAL ANALYTICAL SYSTEM FOR DETERMINING THE CHARACTERISTICS OF THE OPTICAL SIGNAL OF CIRCULAR DICHROISM OF A BIOLOGICALLY ACTIVE MATERIAL

F. V. Vereshchagin¹, V. M. Gusev¹, O. N. Kompanets¹, M. A. Pavlov¹,
D. P. Chulkov², Yu. M. Yevdokimov³, S. G. Skuridin³

¹*Institute of Spectroscopy of the RAS, Moscow, Russia*

²*RMP "Medtehnika" UDP RF, Moscow, Russia*

³*Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia*

The possibility of creating a multifunctional analytical system (biosensor) based on nanoconstructions (NaC) of DNA (biosensing unit) and a portable dichrometer using light-emitting diodes is discussed. Such a system can work in modes of measuring the optical properties of DNA NaC and calibrating the characteristics of the circular dichroism signal of biologically active substance (BAS) interacting with the biosensing unit, as well as in the mode of measuring the diffusion rate of BAS into the biologically active material of the biosensing unit.

Keywords: biosensor, nanoconstructions DNA, circular dichroism, biologically active substance, diffusion rate

REFERENCES

1. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Semenov S.V., Skuridin S.G. *Zhidkokristallicheskie dispersii i nanokonstruk-zii DNK. Pod red. Yu.M. Yevdokimova* [Liquid crystal dispersions and nanodesigns of DNA. Yu.M. Yevdokimov (eds.)]. Moscow, Radiotekhnika Publ., 2008. 296 p. (In Russ.).
2. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Skuridin S.G. *Nanostruktury i nanokonstrukcii na osnove DNK* [Nanostructures and nanodesigns on the basis of DNA]. Yu.M. Yevdokimov (eds.). Moscow, SSAINS-PRESS Publ., 2010. 256 p. (In Russ.).
3. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Vereshchagin F.V., Gusev V.M., Kompanets O.N., Chulkov D.P. [Nanodesigns on the basis of two-chained molecules DNA and their optical properties]. *Sbornik tezisov XXV s'ezd po spektroskopii, Troitsk—Moskva, 3–7 oktyabrya 2016 g.* [The XXV congress on spectroscopy, Troitsk — Moscow, on October 3–7, 2016. Collection of theses]. Moscow, MGPU Publ., 2016 (ISBN 978-5-4263-0368-3). pp. 219–220. (In Russ.).
4. Vereshchagin F.V., Gusev V.M., Kompanets O.N., Chulkov D.P., Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G. [Compact dvukhvolnovy dichrometr for the optical biotouch analytical system of medical appointment]. *Sbornik tezisov XXV s'ezd po spektroskopii, Troitsk—Moskva, 3–7 oktyabrya 2016 g.* [The XXV congress on spectroscopy, Troitsk — Moscow, on October 3–7, 2016. Collection of theses]. Moscow, MGPU Publ., 2016 (ISBN 978-5-4263-0368-3). pp. 284–285. (In Russ.).
5. Gusev V.M., Kompanets O.N., Pavlov M.A., Chulkov D.P., Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G. *Mnogofunkcional'naya analiticheskaya sistema dlya opredeleniya harakteristik opticheskogo signala krugovogo dihiroizma biologicheskii aktivnogo materiala* [Multipurpose analytical system for definition of characteristics of an optical signal of circular dichroism of biologically active material]. Patent RF (for the device) no. 2 569 752. B.I. No. 36 (Prioritet 27.12.2014). (In Russ.).

Contacts: *Kompanets Oleg Nikolaevich*,
onkomp@isan.troitsk.ru

Article received in edition 28.06.2018