

УДК 681.7.08

© А. В. Хромов, А. В. Никулин, О. Н. Компанец, Д. П. Чулков, 2019

НАНОСЕНС И КАЛИБРОВКА ПОРТАТИВНЫХ БИОСЕНСОРНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ УСТРОЙСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-БИОДАТЧИКОВ

Обсуждается возможность использования высокостабильного лекарственного противоракового препарата Наносенс в качестве дополнительного стандарта оптической активности для калибровки портативных биосенсорных аналитических устройств на основе ДНК-биодатчиков и дихрометра.

Кл. сл.: оптическая активность, круговой дихроизм, калибровка дихрометра, биосенсор на основе ДНК, биологически активные соединения

ВВЕДЕНИЕ

Спектрометры оптического кругового дихроизма (КД) — дихрометры — используются во многих лабораториях для изучения физико-химических свойств природных соединений и химических веществ, в том числе их оптической активности. В последнее время дихрометры стали широко применяться в портативных биосенсорных аналитических системах с использованием в качестве биодатчиков "жидких" частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии (ХЖКД) или наноконструкций (НаК) двухцепочечной ДНК, в которых молекулы ДНК пространственно упорядочены и "сшиты" между собой различными наномостиками [1, 2]. Для биодатчиков на основе НаК ДНК характерна не только аномальная оптическая активность, проявляемая в виде интенсивной полосы в спектре КД на длине волны ~ 260–270 нм, но и дополнительная аномальная оптическая активность в области поглощения элементов наномостиков (450–650 нм), "сшивающих" НаК ДНК, в частности хромофоров антибиотиков. 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 соединений (БАС), "мишенью" для которых служат структурные элементы наномостиков. Встраивание в структуру "жидких" частиц ХЖКД ДНК биологически активных соединений (например, противоопухолевых антибиотиков) также приводит к появлению в спектре кругового дихроизма дополнительной аномальной полосы в видимой области спектра, амплитуда которой исполь-

зуется для установления в анализируемой жидкой среде их наличия и концентрации.

Задачу исследования оптических свойств и контроля качества биодатчиков на основе ДНК, а также изменения этих свойств при взаимодействии с БАС можно решать с использованием портативных дихрометров, работающих как в широком диапазоне длин волн от 200 до 750 нм (излучатель — ксеноновая лампа), так и на дискретных длинах волн (источники — миниатюрные светоизлучающие диоды), одна из которых — 270 нм, а другие в полном соответствии с особенностями спектра КД ДНК-биодатчиков, — на длинах волн дополнительной аномальной полосы КД в видимой области спектра. Важным требованием при этом остается точность измерений дихрометром величины оптической активности исследуемого биодатчика в исходном состоянии и при его взаимодействии с БАС. Важно также, чтобы соединения, используемые в качестве эталонов оптической активности, были стабильными и могли воспроизводить эту характеристику в течение длительного периода. Для повышения точности калибровки желательно, чтобы характерные рабочие линии в спектре КД эталонных соединений находились в области длин волн, в которой используется дихрометр биосенсорной системы.

В качестве эталонных соединений для измерения регистрируемой дихрометром характеристики оптической активности чаще всего используют d-10-пропиламмниевую соль камфорсульфоновой кислоты (КСК), водный раствор которой обладает КД положительного знака при $\lambda = 290.5$ нм и отрицательного знака при $\lambda = 192.2$ нм, и d-10-камфорсульфонат с практически теми же характеристиками, а также

Наносенс

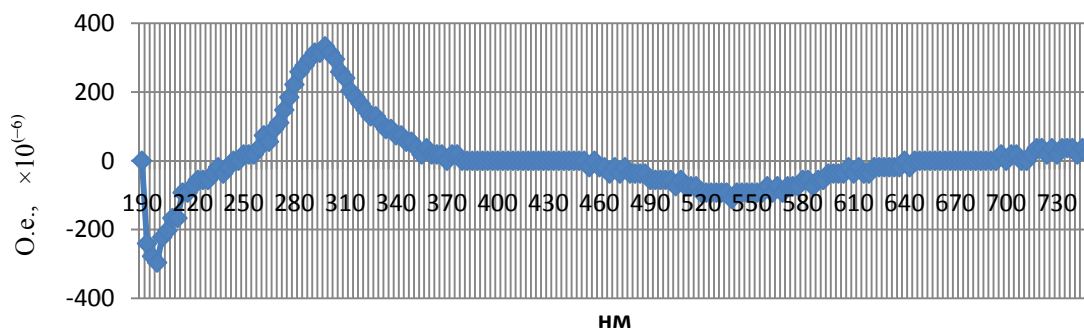


Рис. 1. Спектр кругового дихроизма (КД) Наносенса в УФ и видимой областях спектра

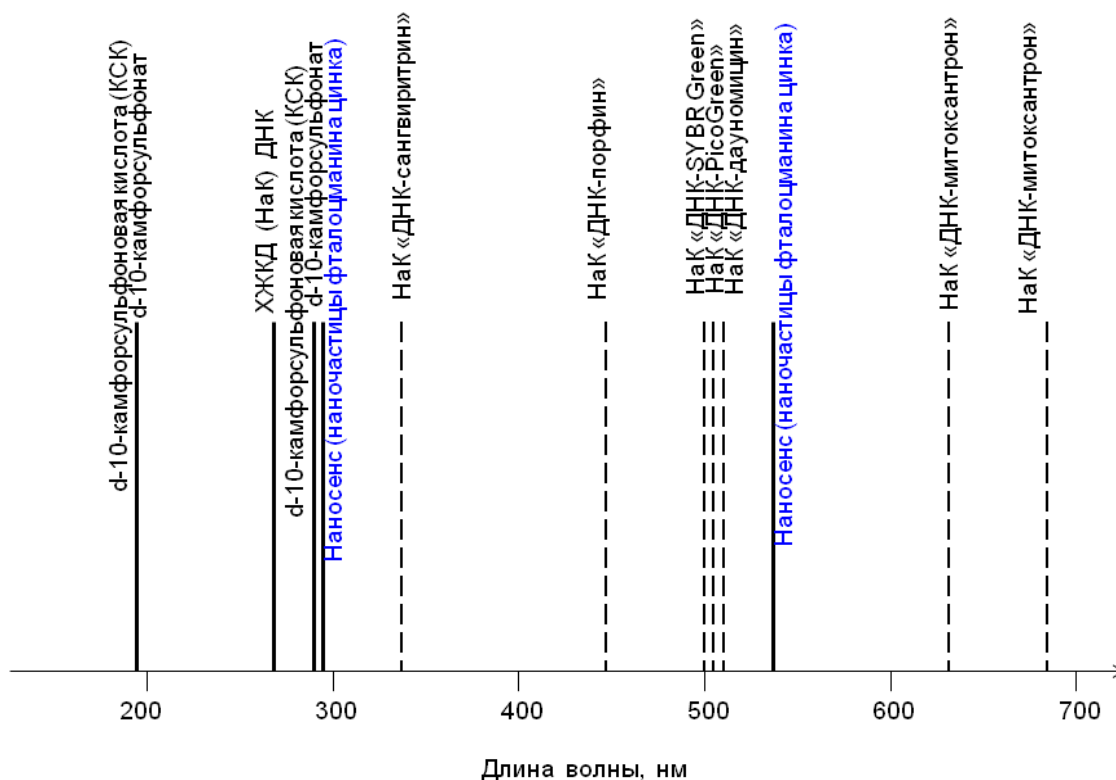


Рис. 2. Положение аномальной полосы КД ХЖКД ДНК отрицательного знака, полос КД КСК и Наносенса (положительного знака) в области 300 нм и аномальных полос КД отрицательного знака (пунктирные линии) молекулярных и нано-конструкций (НаК) ДНК с разными интеркаляторами, встраиваемыми в их структуру, в области 500 нм. Видно, что спектр КД Наносенса хорошо "накладывается" на положение полос КД в обеих областях спектра

иодид трис(этилендиамин)кобальта(III) моногидрата, водный раствор которого генерирует полосу КД с максимумом при 490 нм [3].

Для тестирования и калибровки оптической ак-

тивности биодатчиков на основе ДНК предлагалось использовать также полимерные материалы на основе вышеупомянутых наноконструкций ДНК, включенных в состав полимерного гидроге-

ля [4]. Существенным недостатком, препятствующим использованию таких материалов для калибровки дихрометров, остается сложность их изготовления: по этой причине они могут быть доступны пока только узким специалистам, профессионально работающим с НК ДНК и полимерными гелями.

В настоящей работе предлагается рассмотреть в качестве вторичного стандарта оптической активности в области длин волн, на которых работают дихрометры биосенсорных устройств, разработанный в НИОПИК препарат Наносенс, имеющий характерные рабочие линии в спектре КД одновременно как в ультрафиолетовой, так и в видимой областях спектра (рис. 1), которые стабильны и могут воспроизводить характеристику оптической активности в течение длительного периода (более трех лет).

НАНОСЕНС И ЕГО ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Наносенс представляет собой стабильную нанодисперсию фталоцианина цинка (средний размер частиц 100–150 нм) — органического красителя (пигмента), практически нерастворимого в воде и органических растворителях, в виде жидкости ярко-синего цвета с содержанием фталоцианина цинка 0.1–0.2 %, поверхностно-активной добавки (Проксанол 268) 0.1–10.0 %, хлорида натрия 0.1–1.5 % и воды (остальное). Химическое название препарата — тетрабензо-5,10,15,20-тетраазапорфирина цинка. Хранится он в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С или в замороженном виде при температуре не выше –8 °С. Основное назначение препарата — лечение злокачественных новообразований методом импульсной лазерной абляции наночастиц [5]. После лазерного облучения некоторая часть фталоцианина цинка, находящегося в опухоли в виде наночастиц и подвергаясь воздействию лазерного импульса, прямо на месте воздействия излучения испаряется и переходит в молекулярную форму, превращаясь в один из самых эффективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. При дополнительном облучении опухоли непрерывным лазером фотосенсибилизатор генерирует синглетный кислород и перекись водорода, которые поражают клетки опухоли повторно — тем самым реализуется двойное избирательное воздействие на опухоль при однократном введении препарата.

Спектр кругового дихроизма Наносенса (с исходной концентрацией 2 мг/мл) в области 190–750 нм приведен на рис. 1. Он имеет два выраженных пика: положительный на длине волны 295 нм и отрицательный на длине волны 550 нм. Для сравнения на рис. 2 показаны положения аномаль-

ных полос КД комплексов ДНК с интеркаляторами (раздельно) дауномицином, порфином, митоксантроном, сангвиритрином, PicoGreen, SYBR Green, оптическую активность которых и связанную с нею концентрацию требуется контролировать.

НАНОСЕНС КАК ВТОРИЧНЫЙ СТАНДАРТ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Предпосылки

Решение поставленной задачи состоит в определении и контроле характеристик оптической активности Наносенса при помощи первичного эталона (водный раствор КСК) и проверки характеристик КД дихрометров биосенсорных устройств на основе ДНК при их работе в УФ и видимом диапазонах длин волн по аттестованным характеристикам оптической активности Наносенса. В данной работе все измерения выполнялись на спектрометре кругового дихроизма (дихрометре) СКД-2МУФ, входящем в состав биосенсорной аналитической системы, в которой в качестве биодатчика используются "жидкие" частицы ХЖКД комплексов ДНК с интеркаляторами.

Решению задачи, как следует из сказанного выше, способствуют:

- наличие аномальной положительной полосы в спектре КД Наносенса на длине волны 295 нм;
- стабильность амплитуды и положения этой полосы при установленной концентрации раствора препарата;
- близость указанной полосы Наносенса в УФ-области к полосе КД положительного знака на 290.5 нм первичного эталона — водного раствора КСК;
- наличие дополнительной оптической активности Наносенса, проявляемой в виде отрицательной полосы в спектре его КД на длине волны 550 нм, располагаемой в области аномальных полос КД "жидких" частиц ХЖКД комплексов ДНК с интеркаляторами;
- наличие для Наносенса при соблюдении фиксированных условий его разбавления определенного соотношения между амплитудой интенсивной положительной полосы в спектре КД в УФ-области (295 нм) и амплитудой отрицательной полосы в видимом диапазоне (550 нм);
- долговременная стабильность оптических характеристик Наносенса.

Калибровка дихрометров по величине оптической активности Наносенса реализуется в три этапа.

Этап 1 калибровки

На этапе 1 определяется величина оптической активности на длине волны 295 нм ($\Delta A_{\text{НС}, 295}$) стандартного раствора Наносенса (2 мг/мл), содержащего распределенные по объему наночастицы фталоцианина. Для ее определения используются близость полос КД и наблюдаемое при измерениях соотношение k_1 между величинами (амплитудами) регистрируемых дихрометром положительного сигнала КД раствора эталона (КСК) на длине волны 290.5 нм (${}^{\text{КД}}\Delta A_{290}$), соответствующего [3] известной величине эталонной оптической активности раствора КСК ($\Delta A_{\text{эталон}}$), и положительного сигнала КД раствора Наносенса с максимумом ${}^{\text{КД}}\Delta A_{295}$ на длине волны 295 нм.

Спектрометр КД измеряет отношение переменной составляющей сигнала на частоте модуляции круговой поляризации излучения (с длиной волны λ), пропорциональной величине кругового дихроизма ΔA_λ ($\Delta A_\lambda = (A_R - A_L)_\lambda$ — разность поглощения A_λ в веществе света с правой и левой круговыми поляризациями), к постоянной составляющей регистрируемого сигнала, пропорциональной средней величине светового потока I_λ . При этом переменная составляющая величины измеряемого на выходе фотоприемника сигнала КД $\Delta U_\lambda = \Delta I_\lambda \times S_\lambda \times T_\lambda$, а постоянная (не модулированная) составляющая $U_0 = I_\lambda \times S_\lambda$ (S_λ — чувствительность фотоприемника, T_λ — величина усиления электронного тракта спектрометра КД), из чего следует $\Delta U_\lambda = (\Delta I_\lambda / I_\lambda) \times U_0 \times T$. В этих условиях регистрируемые при измерениях сигналы КД растворов КСК и Наносенса можно записать в виде:

$${}^{\text{КД}}\Delta A_{290} = \Delta A_{\text{КСК}, 290} \times U_0 (I_{290} \times S_{290}) \times T_{290}$$

и

$${}^{\text{КД}}\Delta A_{295} = \Delta A_{\text{НС}, 295} \times U_0 (I_{295} \times S_{295}) \times T_{295}.$$

С учетом одинакового значения усиления электронного тракта T для двух близких длин волн (290.5 и 295 нм) находим из приведенных выше выражений искомое значение $\Delta A_{\text{НС}, 295}$ КД раствора Наносенса (толщиной L) на основе наночастиц фталоцианина цинка на длине волны 295 нм:

$$\Delta A_{\text{НС}, 295} = k_1 (A_L - A_R)_{\text{КСК}, 290} = k_1 \Delta \epsilon_{\text{КСК}, 290} C_{\text{КСК}, \text{М}} L.$$

Здесь круговой дихроизм водного раствора КСК $\Delta \epsilon_{\text{КСК}, 290} = 2.37 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и является эталонной величиной для КСК на длине волны 290.5 нм, концентрация $C_{\text{КСК}, \text{М}}$ выражена в М/л и длина оптического пути L — в см [3].

Для калибровки используются водные растворы КСК, имеющие концентрацию 3, 15, 150 мкг/мл, с оптической плотностью соответственно 31×10^{-6} , 154×10^{-6} и 1544×10^{-6} оптических единиц (о.е.) и растворы Наносенса с такой же концентрацией. Исходя из измеренной величи-

ны сигнала КД раствора Наносенса на длине волны 295 нм, находим, что оптической плотности раствора Наносенса $\Delta A_{\text{НС}, 295} = 150 \times 10^{-6}$ о.е. соответствует концентрация КСК в растворе $C_{\text{КСК}} = 6.5 \times 10^{-5}$ М/л (при длине оптического пути в кювете $L = 1$ см). Это означает, что при помощи спектрометра КД, откалиброванного согласно описанной выше процедуре измерений и ставшего в результате этого рабочим средством измерения КД, можно проводить тестирование и определение величины сигнала КД любого другого оптически активного соединения или материала при облучении его циркулярно-поляризованным светом вблизи 295 нм, исходя из соотношения регистрируемых спектрометром КД сигналов КД этого соединения (материала) и дополнительного стандарта — раствора Наносенса (${}^{\text{КД}}\Delta A_{295}$).

Этап 2 калибровки

На этапе 2 определяется величина $\Delta A_{\text{НС}, 537}$ кругового дихроизма раствора Наносенса в видимой области. При определении этой величины используем, во-первых, определенную на этапе 1 величину оптической активности на длине волны 295 нм ($\Delta A_{\text{НС}, 295}$) раствора Наносенса и, во-вторых, измеренное соотношение k_2 максимума сигнала КД Наносенса на длине волны 295 нм (${}^{\text{КД}}\Delta A_{295}$) и наблюдаемого минимума его сигнала КД в видимой области на длине волны 550 нм:

$$\Delta A_{\text{НС}, 550} = k_2 \times \Delta A_{\text{НС}, 295} \times T_{295} / T_{550}$$

(здесь T_{295} и T_{550} — измеряемые характеристики усиления T_λ электронного тракта дихрометра в фиксированной полосе частот на указанных выше длинах волн).

Этап 3 калибровки

На этапе 3 полученные на дихрометре характеристики КД дополнительного стандарта на основе раствора Наносенса на длине волны 550 нм используются непосредственно для калибровки в видимой области оптической активности образцов, имеющих в своем составе "жидкие" частицы ХЖКД комплексов "ДНК + интеркалятор" (рис. 2). Задача определения величины (${}^{\text{КД}}\Delta A_{\text{ДНК+БАС, вид}}$) решается аналогично решенной на этапе 1, т. е. путем непосредственного измерения соотношения k_i сигналов КД $\Delta A_{\text{НС}, 550}$ и сигналов КД в видимой области спектра образцов, содержащих тот или иной (i -й) комплекс "ДНК + интеркалятор", например, "ДНК-SYBR Green", при этом используется близость их полос КД ($T_{550} \sim T_{500}$). Аналогичным образом могут быть получены результаты измерения КД других образцов, содержащих комплексы "ДНК-PicoGreen", "ДНК-сангвиритрин", "ДНК-дауномицин", "ДНК-митоксантрон".

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение описанных выше измерительных процедур означает, что при помощи дихрометра, откалиброванного таким образом и ставшего рабочим средством измерения КД на длине волны 295 и 550 нм, можно проводить определение оптической активности любого другого обладающего этим свойством соединения при облучении его циркулярно поляризованным светом, исходя из соотношения регистрируемых дихрометром сигналов КД от этого соединения (материала) и от вторичного стандарта на основе раствора Наносенса.

Рассмотренный способ калибровки спектрометров кругового дихроизма (поверки измерительной системы спектрометра КД), входящих в состав биосенсорных систем на основе ДНК-биодатчиков, с применением в качестве дополнительного стандарта оптической активности (кругового дихроизма) растворов препарата Наносенс, содержащих наночастицы фталоцианина цинка, может найти применение в спектральном приборостроении и аналитической биохимии, в том числе клинической биохимии.

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. 294 с.
2. Евдокимов Ю.М., Саянов В.И., Скуридин С.Г. Наноструктуры и наноконструкции на основе ДНК / Под ред. Ю.М. Евдокимова. М.: САЙНС-ПРЕСС, 2010. 254 с.
3. Schippers P.H., Dekkers H.P.J.M. Direct determination of absolute CD data and calibration of commercial instruments // *Analytical Chemistry*. 1981. Vol. 53, no. 6. P. 778–782. DOI: 10.1021/ac00229a008
4. Гусев В.М., Компанец О.Н., Павлов М.А., Чулков Д.П., Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г. Наноконструкции ДНК для тестирования и калибровки спектрометров кругового дихроизма // *Научные технологии*. 2013. № 4. С. 68–76.
5. Хромов А.В., Коган Б.Я., Фейзулова Р.К.-Г., Панкратов А.А., Якубовская Р.И. Доклинические исследования лекарственного препарата Наносенс // *Biomedical Photonics*. 2015. № S1. С. 12–13.

Центр фармсинтеза и биотехнологии ЦКП (НОЦ), РУДН, Москва (Хромов А.В.)

ЦКП (НОЦ), РУДН, Москва (Никулин А.В.)

Институт спектроскопии РАН, Москва (Компанец О.Н.)

ФГУП "Ремонтно-монтажное производство медицинской техники "Медтехника" УДП РФ, Москва (Чулков Д.П.)

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

Материал поступил в редакцию 28.06.2018

NANOSENS AND CALIBRATION OF PORTABLE BIOSENSOR ANALYTICAL DEVICES WITH USING DNA BIOSENSING UNITS

A. V. Nikulin¹, A. V. Khromov¹, O. N. Kompanets², D. P. Chulkov³

¹RUDN University, Moscow, Russia

²Institute of Spectroscopy of the Russian Academy of Sciences, Troitsk, Moscow, Russia

³Medtekhnika of the RF President' Administration Moscow, Russia

The possibility of using the highly stable anti-cancer drug Nanosens as an additional standard of optical activity for calibration of portable biosensor analytical devices based on DNA biosensing units and a dichrometer is discussed.

Keywords: optical activity, circular dichroism, dichrometer calibration, DNA based biosensor, biologically active substances

REFERENCES

1. Evdokimov Yu.M. (ed.), Salyanov V.I., Semenov S.V., Skuridin S.G. *Zhidkokristallicheskie dispersii i nanokonstrukcii DNK* [Liquid crystal dispersions and nanodesigns of DNA]. Moscow, Radiotekhnika Publ., 2008. 294 p. (In Russ.).
2. Evdokimov Yu.M. (ed.), Salyanov V.I., Skuridin S.G. *Nanostrukturny i nanokonstrukcii na osnove DNK* [Nanostructures and nanodesigns on the basis of DNA]. Moscow, SAYNS-PRESS, 2010. 254 p. (In Russ.).
3. Schippers P.H., Dekkers H.P.J.M. Direct determination of absolute CD data and calibration of commercial instruments. *Analytical Chemistry*, 1981, vol. 53, no. 6, pp. 778–782. DOI: 10.1021/ac00229a008
4. Gusev V.M., Kompanets O.N., Pavlov M.A., Chulkov D.P., Evdokimov Yu.M., Skuridin S.G. [DNA nanoconstructions for testing and calibration of CD spectrometers]. *Naukoemkie tekhnologii* [Science Intensive Technologies], 2013, no. 4, pp. 68–76. (In Russ.).
5. Hromov A.V., Kogan B.Ya., Fejzulova R.K.-G., Pankratov A.A., Yakubovskaya R.I. [Preclinical researches of the medicinal medicine Nanopsychic]. *Biomedical Photonics*, 2015, no. S1, pp. 12–13. (In Russ.).

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

Article received in edition 28.06.2018