

УДК 612.015.1; 577.15; 543.94

©Коллектив авторов

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

**В.В. Шумянцева^{1,2*}, Т.В. Булко^{1,2}, Е.В. Супрун¹, А.В. Кузиков¹,
Л.Е. Агафонова¹, А.И. Арчаков¹**

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: +7(499)246-5820; факс: +7(495)245-0857;
эл. почта: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²ООО “ИБМХ – ЭкоБиоФарм”, Москва

Обобщены экспериментальные исследования авторов по разработке методов высокочувствительного электрохимического анализа для биомедицинских исследований в постгеномную эру, а также электрохимических сенсорных систем для анализа различных биообъектов. Электроанализ каталитической активности цитохромов P450 позволил разработать систему скрининга потенциальных субстратов и/или ингибиторов этого класса гемопротеинов, а также биологически активных соединений, модулирующих каталитические функции белка. На основании изучения кинетики биоаффинных взаимодействий в системе тропонин I/антитела к тропонину I (TnI) в плазме крови человека разработан высокочувствительный пьезокварцевый иммуносенсор, позволяющий осуществлять прямую регистрацию биохимических взаимодействий (без дополнительного введения меток и без химических модификаций) на основе различия кинетических параметров специфических и неспецифических биоаффинных взаимодействий. Разработанные методы прямой регистрации электрохимической активности бактериальных клеток *E. coli* JM109 позволяют проводить оценку антибактериальных свойств лекарственных препаратов в режиме реального времени, используя минимальные объёмы клеточного материала с концентрацией 10⁶ КОЕ/электрод. Приведены экспериментальные данные авторов по получению полимеров с молекулярными отпечатками (молекулярно импринтированных полимеров, МИП) в качестве аналогов антител и биораспознающих элементов, осуществляющих селективное комплементарное связывание определяемых веществ по принципу “ключ-замок”.

Ключевые слова: электрохимические биосенсоры, молекулярно импринтированные полимеры, цитохром P450, миоглобин, кардиомаркеры, бактериальные клетки.

DOI: 10.18097/PBMC20156102188

ВВЕДЕНИЕ

В 1979 г. А.И. Арчаков с соавторами опубликовал пионерскую работу, посвященную использованию электродов в качестве доноров электронов для катализа цитохрома P450 2B4 [1, 2]. Эти работы послужили фундаментальной основой в электрохимии гемопротеинов. Развитие нанотехнологий в электрохимии, методов наноструктурирования электродов, использование микро- и нанoeлектродов дало мощный импульс для дальнейшего исследования электрокатализа и электронного транспорта в биологических системах. Биоэлектрохимия стала мощной областью анализа “*in electrode*” в биомедицинских исследованиях наряду с традиционными классическими исследованиями “*in vivo*”, “*in vitro*” и использованием биоинформатики,

математической биологии и информационных технологий в формате “*in silico*” (схема 1). В лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ разработаны методы высокочувствительного электрохимического анализа для биомедицинских исследований, а также электрохимических сенсорных систем для анализа биообъектов:

· Анализ электрокаталитической активности цитохромов P450 2B4, 1A2, 3A4, 51b1 (стерол-14a-деметилазы *Mycobacterium tuberculosis* CYP51b1), 11A1 (P450_{scc}), 17A1, BM3, бактериальных цитохромов CYP109D1, CYP109C1, CYP109C2, CYP260A1. Проведено исследование влияния субстратов, ингибиторов, витаминов группы В (B1, B2, B6) и витаминов-антиоксидантов (витамин С, А и Е) на электрокаталитические свойства цитохромов P450.

* - адресат для переписки

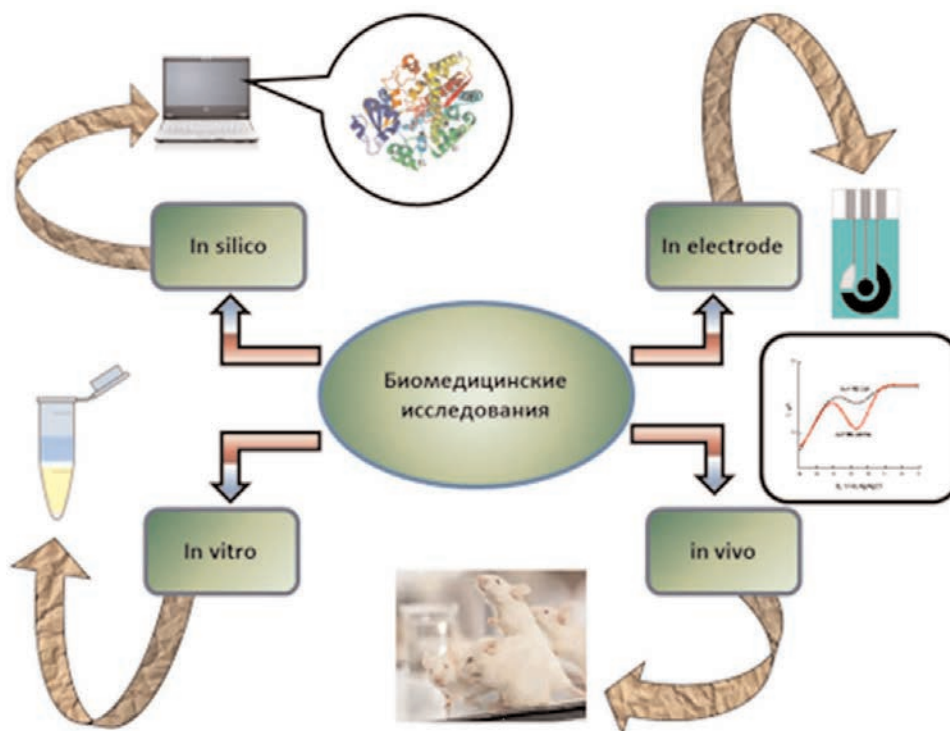


Схема 1. Электроанализ и его место в биомедицинских исследованиях.

- Электрохимический иммуноанализ плазмы крови для диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ). Предел обнаружения миоглобина составляет 10^{-8} г/мл ($5,6 \cdot 10^{-10}$ М). Разработан метод анализа тропонина I на основе анализа сигналов наночастиц золота или серебра с помощью инверсионной вольтамперометрии с пределом обнаружения 10^{-10} г/мл ($4,25 \cdot 10^{-12}$ М). Проведена статистическая обработка электрохимических параметров профилирования плазмы крови здоровых доноров и пациентов с ОИМ на электродах без антител с использованием хеометрических подходов.

- Разработаны методы прямой регистрации электрохимической активности бактериальных клеток *E. coli* JM109, а также электроанализ антибактериальных свойств лекарственных препаратов.

- С помощью кварцевых кристаллических микровесов (QCM) исследована кинетика биоаффинных взаимодействий кардиомаркеров с антителами в плазме крови человека.

- Разработаны биосенсорные технологии на основе анализа электроокисляемых аминокислот (тирозин, триптофан, цистеин) в составе белков для анализа конформационных изменений структуры белков.

- Разрабатываются электрохимические сенсоры на основе полимеров с молекулярными отпечатками (МИП), осуществляющих селективное комплементарное связывание определяемых веществ по принципу “ключ-замок”.

1. ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

Ключевая роль I фазы биотрансформации ксенобиотиков, в том числе и лекарственных препаратов, принадлежит гем-содержащим ферментам суперсемейства цитохрома P450 (CYP), входящим в состав монооксигеназной системы [3, 4]. Цитохромы P450 участвуют также в метаболизме эндогенных соединений, таких как стероидные гормоны [5-9], витамин D и E [10], насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, эйкозаноиды [11], ретиноиды, желчные кислоты, простагландины, уропорфириногены, арахидоновая кислота [12, 13]. Компонентами монооксигеназного каталитического цикла, кроме цитохрома P450, являются также редокс-партнёрные белки: NADPH-зависимая редуктаза (флавопротеин, содержащий в качестве простетической группы FAD и FMN), выполняющая роль переносчика электронов от NADPH к цитохрому P450, и цитохром b_5 .

Поиск более эффективных, экономичных методов моделирования метаболизма лекарственных препаратов является одной из быстроразвивающихся областей аналитической химии [14]. Моделирование метаболических путей превращения физиологически активных соединений и лекарственных препаратов проводится как с помощью компьютерных методов “*in silico*” [15-17], так и экспериментальным путём “*in vivo*” и “*in vitro*” с помощью ферментных систем [18, 19]. Для осуществления лекарственного мониторинга используют весь арсенал современной биохимии [20].

Особое внимание уделяется разработке электрохимических биосенсорных систем

на основе изоферментов цитохрома P450, которые используются для исследования биохимических и фармакологических аспектов функционирования монооксигеназной системы.

Пионерскими работами в создании электрохимических систем на основе цитохромов P450 стали работы Арчакова и соавт. [1, 2], F. Scheller и соавт. [21], R. Estabrook и соавт. [22], H. Hill и соавт. [23].

Каталитический механизм цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы сложен, требует участия редокс-партнеров и коферментов NADPH как источника электронов для восстановления цитохрома P450. Поскольку цитохромы P450 являются мембранными белками, то при исследовании их каталитической активности требуется сложное реконструирование монооксигеназной системы с использованием редокс-партнеров и фосфолипидов. Кроме того, различные изоферменты цитохрома P450 очень неустойчивы и быстро инактивируются. Уникальностью электрохимических биосенсорных систем на основе иммобилизованного на электроде цитохрома P450 является то, что электрокаталитическая реакция инициируется электронами с электрода, что исключает необходимость использования редокс-партнерных белков цитохрома P450 и восстановительных эквивалентов NADPH [24-27].

В работах по электроанализу были использованы 3-х контактные печатные электроды – одноразовые, промышленно выпускаемые графитовые электроды, получаемые последовательным нанесением на пластиковую основу проводящих слоев и изоляции методом трафаретной печати. Размеры такого электрода 1×3 см (рис. 1).

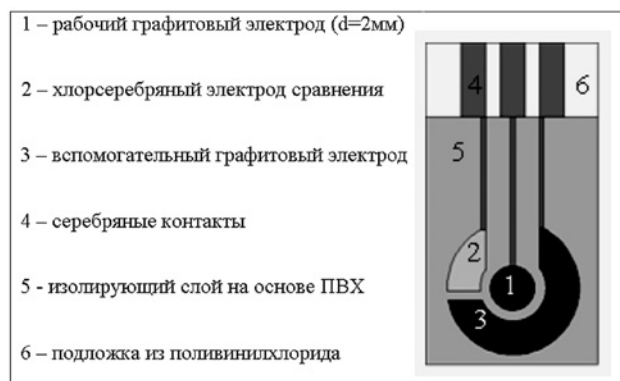


Рисунок 1. Внешний вид электрода, полученного методом трафаретной печати.

Электрокаталитический цикл цитохрома P450 можно представить следующим образом [28] (схема 2):

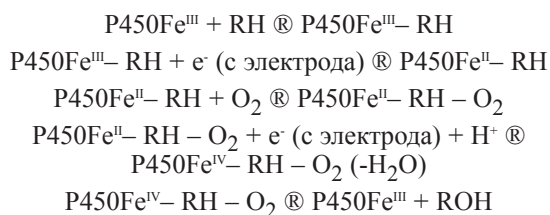


Схема 2. Электрокаталитический цикл цитохрома P450.

Важной особенностью электрохимических биосенсоров на основе цитохрома P450 является то, что определение каталитической активности иммобилизованного фермента может осуществляться с помощью регистрации каталитического тока, возникающего при внесении в электрохимическую систему субстрата (рис. 2).

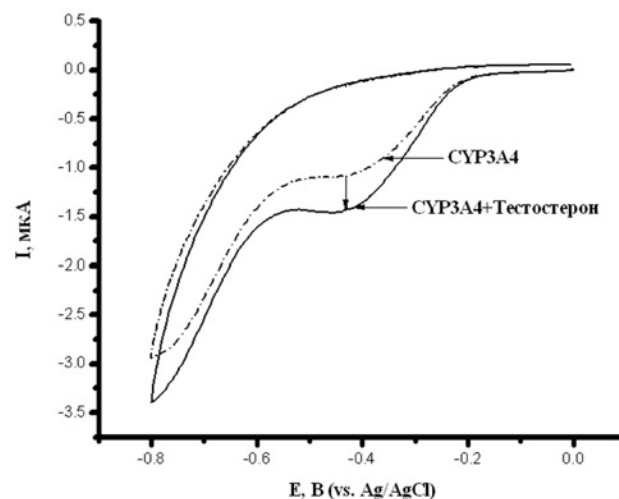


Рисунок 2. Циклические вольтамперограммы цитохрома P450 3A4 (CYP3A4), иммобилизованного на поверхности графитового электрода, полученного методом трафаретной печати, модифицированного мембраноподобным веществом – диододецилдиметиламмонием бромидом (ДДАБ); (—) – без субстрата, (---) – в присутствии субстрата CYP3A4 – тестостерона.

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}) (рис. 3). Константа Михаэлиса определяется по электрохимической форме уравнения Михаэлиса-Ментен [29]:

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

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 [30]:

$$I_{cat \max} = nFA\Gamma_0 k_{cat}$$

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.

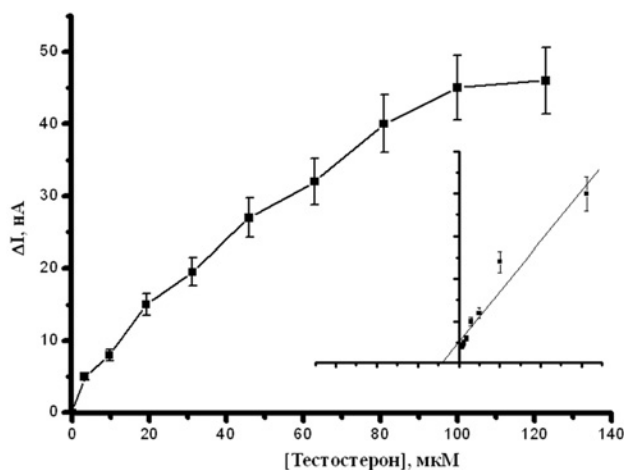


Рисунок 3. Зависимость изменения каталитического тока при амперометрическом титровании цитохрома P450 3A4 (CYP3A4) тестостероном при контролируемом напряжении $E = -0,5$ В (vs. Ag/AgCl). Вставка: расчёт электрохимической константы Михаэлиса с помощью метода двойных обратных координат $1/\Delta I$, $1/[\text{тестостерон}]$.

Большое внимание при разработке электрохимических сенсорных систем на основе цитохромов P450 уделяется стадии иммобилизации фермента на поверхности электрода. Биологические компоненты в иммобилизованном состоянии должны сохранять определённую степень свободы. Это касается как конформационной подвижности биополимеров, так и доступа к ним низкомолекулярных компонентов (субстратов, ингибиторов, активаторов), необходимых для осуществления биохимических реакций [31]. Существуют различные методологические подходы к иммобилизации ферментов на поверхности электрода, в частности цитохрома P450 [27]. Использование наноструктурированных электродов повышает чувствительность биосенсорного анализа [32, 33]. Внедрение новых материалов, таких как наночастицы золота, наночастицы оксида титана, углеродные нанотрубки, использование микро- и нанoeлектродов позволяет создавать высокочувствительные и портативные биосенсоры на основе цитохрома P450 [27, 34, 35].

Используемые нами композитные материалы на основе наночастиц золота и мембраноподобного жидкокристаллического вещества дидодециламмония бромид (ДДАБ), показали высокую эффективность при создании электрохимических биосенсоров на основе цитохрома P450. Был сконструирован электрохимический биосенсор на основе P450scs (CYP11A1) для определения холестерина [36, 37]. Чувствительность биосенсора, модифицированного наночастицами золота, составила $0,13 \text{ мкА} \cdot \text{мкМ}^{-1}$ в определяемом диапазоне от 10 до 70 мкМ холестерина.

Электрохимические биосенсоры на основе наночастиц золота были использованы нами для исследования электрокаталитической C-деметилазной активности цитохрома P450 51b1 (CYP51b1, стерол-14a-деметилаза) *M. tuberculosis* по отношению к ланостерину [38, 39]. Трудность исследования

P450 51b1 заключается в необходимости реконструирования природной системы, однако, даже при реконструировании и использовании различных электронпереносящих редокс-партнеров, таких как ферредоксин/ферредоксин-редуктаза или NADPH-зависимая редуктаза, выделенных из рекомбинантной формы *M. tuberculosis*, эффективного восстановления P450 51b1 не происходит. Поэтому нами было исследовано электрохимическое восстановление P450 51b1, где электрод является донором электронов. Методами масс-спектрометрии и спектрофотометрического анализа определены продукты и кинетические параметры электрокаталитической P450 51b1-зависимой реакции C-деметилирования ланостерина. Полученные результаты оказались сходными с данными, описывающими ход реакции в природной P450 51b1-зависимой системе, протекающей при участии редокс-партнеров и NADPH. Электрохимическая константа Михаэлиса P450 51b1 по отношению к ланостерину, рассчитанная по данным амперометрии, составила $30 \pm 2 \text{ мкМ}$. Также с помощью электрокаталитической системы P450 51b1 исследованы свойства азольного ингибитора – кетоконазола [25, 26, 33, 40].

Монокомпонентные системы на основе цитохрома P450 представляют интерес с точки зрения создания метаболических карт различных лекарственных соединений с целью обнаружения наиболее токсичных реакционноспособных метаболитов. Для повышения их эффективности были созданы электрохимические системы на основе полусинтетических флавоцитохромов P450 2B4 и 1A2 [41, 42]. Такие полусинтетические флавоцитохромы, обладающие как редуктазной, так и оксигеназной активностью, имеют высокую эффективность и значительно стабильнее, по сравнению с реконструированной системой, состоящей из цитохрома P450 и его редокс-партнеров.

Одним из перспективных направлений электрохимического применения цитохромов P450 является создание биосенсоров на основе цитохрома P450 3A4. Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450; он участвует в метаболизме 225 субстратов, из которых 191 вещество является лекарством, а из 97 ингибиторов этой формы 87 соединений являются лекарствами [43, 44]. С помощью высокочувствительных электрохимических методов анализа нами исследовано взаимодействие этого цитохрома P450 3A4 с субстратами, ингибиторами и биологически активными соединениями (витаминами, антиоксидантами). Витамины группы В ингибируют гидроксилазную активность цитохрома P450 3A4, участвующего в метаболизме нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака [45]. Приём диклофенака в комплексе с витаминами группы В, приводит к снижению дозы нестероидного противовоспалительного препарата [45, 46]. Витамины-антиоксиданты С, А, Е стимулировали электрохимическое восстановление P450 3A4 и P450 2C9

[47]. Модулирующая роль антиоксидантных препаратов таурина и 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния гидроксibuтаноидоата (этоксидол) на каталитическую N-деметилазную активность цитохрома P450 3A4, была исследована электроаналитическими методами [48]. Таурин в диапазоне концентраций 10–70 мкМ стимулирует электрохимическое восстановление цитохрома P450 3A4, причём при концентрации 50 мкМ электровосстановление максимально ($115 \pm 3\%$). Таурин оказывает выраженный эффект ослабления ингибирования итраконазолом изофермента цитохрома P450 3A4.

Цитохромы P450 (CYP) являются белками-мишенями при разработке новых противораковых препаратов в случае гормон-зависимых онкологических заболеваний [49]. Ингибиторы ключевого фермента синтеза андрогенов – P450 17A1 (CYP17A1), катализирующего 17 α -гидроксиллазную-17,20-лиазную реакцию, используются при лечении андроген-зависимого рака простаты [4, 50]. Потенциальные ингибиторы P450 17A1 (ароматазы) используются при лечении эстроген-зависимого рака молочной железы.

Электрохимический биосенсор на основе P450 17A1 показал приемлемые аналитические возможности для скрининга потенциальных ингибиторов этого изофермента цитохрома P450, которые могут представлять интерес в качестве новых противоопухолевых препаратов [51, 52].

Электрохимические методы позволяют оценить такой важный параметр как константу ингибирования фермента K_i при исследовании новых потенциальных ингибиторов. В присутствии ингибитора происходит снижение величины каталитического тока, иммобилизованного на поверхности электрода фермента, в ответ на внесение в систему субстрата. На рисунке 4 представлен амперометрический отклик CYP17A1 на субстрат прегненолон в присутствии и в отсутствии ингибитора абиратерона. В присутствии абиратерона, проявляющего ингибиторные свойства, происходит снижение амплитуды каталитического тока [52].

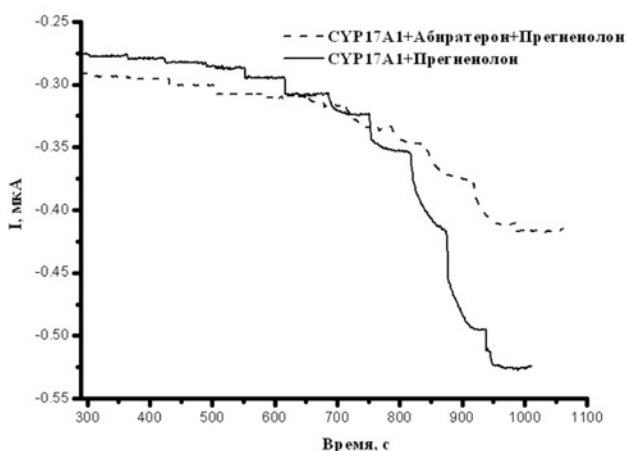


Рисунок 4. Амперометрические отклики CYP17A1 на субстрат прегненолон без ингибитора абиратерона (—) и в присутствии ингибитора абиратерона (---), $E = -0,5$ В (vs. Ag/AgCl).

Электрохимические методы зарекомендовали себя как надёжный инструмент для исследования таких биохимических аспектов функционирования цитохром P450-зависимых систем, как межмолекулярный перенос электронов между редокс-партнерными белками, а также внутримолекулярный перенос у флавогемопroteина цитохрома P450 BM3 *Bacillus megaterium* (CYP102A1), метаболизирующего лауриновую кислоту у бактерий [53], стехиометрия и термодинамика электрокаталитического цикла цитохрома P450 [54], аллостерическая регуляция цитохрома P450 при взаимодействии с редокс-партнерными белками (цитохромом b_5) [55, 56].

2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ КАРДИОМАРКЕРОВ

2.1. Электроанализ миоглобина как раннего маркера острого инфаркта миокарда

Согласно статистике, сердечно-сосудистые заболевания, занимают первое место среди причин смерти населения в России (www.gks.ru) и вызывают почти половину от общего числа смертей в Европе (www.ahnheart.org). Ранняя диагностика инфаркта миокарда позволяет повысить эффективность лечения и снизить смертность. Важное значение в контексте ранней диагностики инфаркта миокарда имеют кардиомаркеры. Кардиомаркер – это биологическое вещество, повышение уровня которого в крови наблюдается в течение сердечно-сосудистого заболевания или сразу после повреждения сердечной мышцы [57]. На сегодняшний день известно 177 соединений-маркеров сердечно-сосудистых заболеваний и исследования в данной области продолжаются [58]. Миоглобин является одним из наиболее ранних кардиомаркеров острого инфаркта миокарда. При остром инфаркте миокарда (ОИМ) концентрация миоглобина резко повышается от нормы (женщины 12–76 нг/мл, мужчины 19–92 нг/мл) до 1500 нг/мл (86 нМ). По уровню миоглобина можно судить об обширности ОИМ, то есть при инфаркте миокарда выраженность гипермиоглобинемии находится в прямой зависимости от размеров очага некроза [57]. Для селективного определения кардиоизоформы миоглобина, высвобождающегося в кровь при повреждении сердечной мышцы, использовали антитела к кардиомиоглобину. Аналитическим сигналом служила величина регистрируемого тока переноса электрона с железа гема на поверхность графитового электрода, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными ДДАБ. Нанесённые на поверхность электрода коллоидные частицы золота работают как ансамбль из микроэлектродов и позволяют не только увеличить площадь активной поверхности сенсора, но и улучшить соотношение сигнал/шум (рис. 5). Переход от плоского электрода к системе микроэлектродов с радиусами, соизмеримыми с толщиной диффузионного слоя, приводит к возникновению “краевого эффекта”, когда величина предельного тока прямо пропорциональна радиусу микроэлектрода [59].

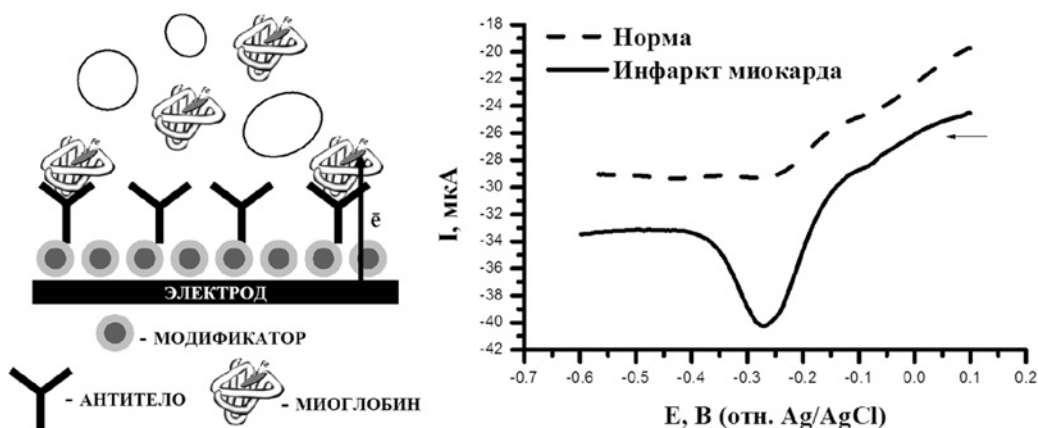


Рисунок 5. Принципиальная схема электрохимического биосенсора для анализа кардиомиоглобина.

Разработанный биосенсор обладал высокой стабильностью, специфичностью и низким пределом обнаружения миоглобина – 0,25 нМ (4,4 нг/мл), а также широким рабочим диапазоном определяемых концентраций, достигающим 0,1 мкМ (1750 нг/мл) и покрывающим клинический диапазон концентраций [26, 60-68]. Электроанализ не требует использования вторичных меченых антител. Метод основан на усилении сигнала гемопротейна при использовании электродов, модифицированных наночастицами золота и на возникновении каталитического тока при взаимодействии миоглобина с кислородом в соответствии со схемой 3:

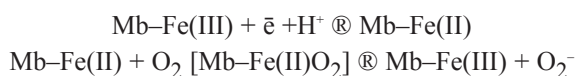


Схема 3. Электровосстановление миоглобина в присутствии кислорода как акцептора восстановленной формы гемопротейна.

2.2. Определение тропонина I и тропонина T по сигналу наночастиц металлов методом инверсионной и квадратно-волновой вольтамперометрии

Метод электрохимического определения белков-маркёров ОИМ в плазме крови здоровых доноров и больных ОИМ основан на регистрации сигнала наночастиц металлов методом инверсионной и квадратно-волновой вольтамперометрии [69, 70]. Аналитическим сигналом служила высота катодного (восстановительного) пика оксида золота (рис. 6А), или анодного (окислительного) пика наночастиц серебра, которую рассчитывали по полученной вольтамперометрической кривой ($DI = I_{\text{сигнал}} - I_{\text{фон}}$) с использованием программного пакета GPES (рис. 6Б).

Аналитические и диагностические возможности разработанных иммуносенсоров были продемонстрированы на образцах плазмы крови и на стандартных растворах тропонина I и Т. Электроды были модифицированы наночастицами золота и серебра, полученными химическим синтезом и электросинтезом, моноклональными антителами к тропонину I или Т. Иммунизацию моноклональных антител на поверхность модифицированных

электродов осуществляли с использованием ДДАБ. Электрохимические параметры, регистрируемые с помощью наночастиц металлов, изменяются в зависимости от количества абсорбированных биологических молекул на рабочей поверхности иммуносенсора (рис. 7). На вставке рисунка 7, кривая А соответствует образцу плазмы крови здорового донора, кривая Б соответствует образцу плазмы крови больного ОИМ.

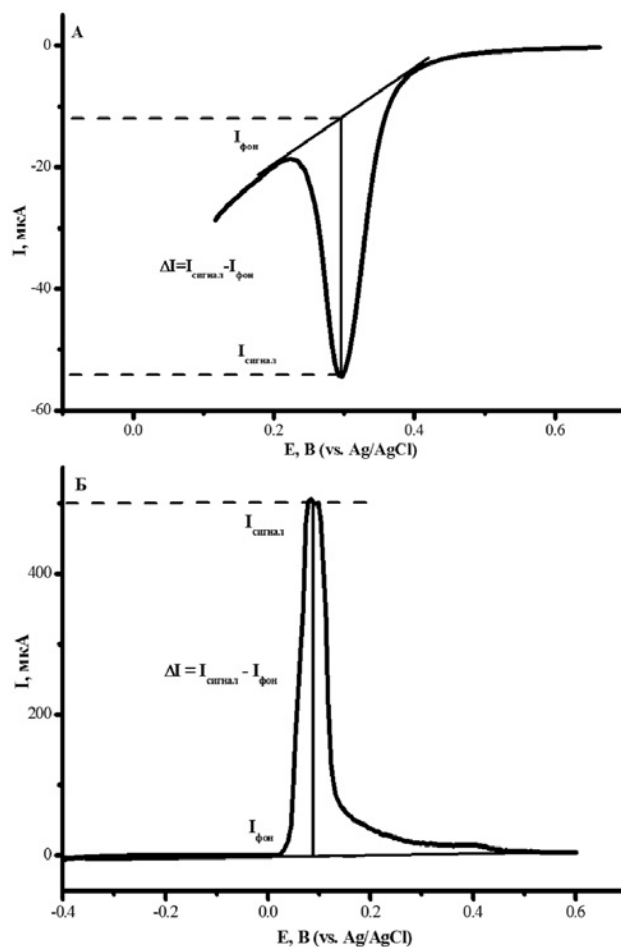


Рисунок 6. А. Расчёт высоты катодного (восстановительного) пика оксида золота. Б. Расчёт высоты анодного (окислительного) пика окисления наночастиц серебра.

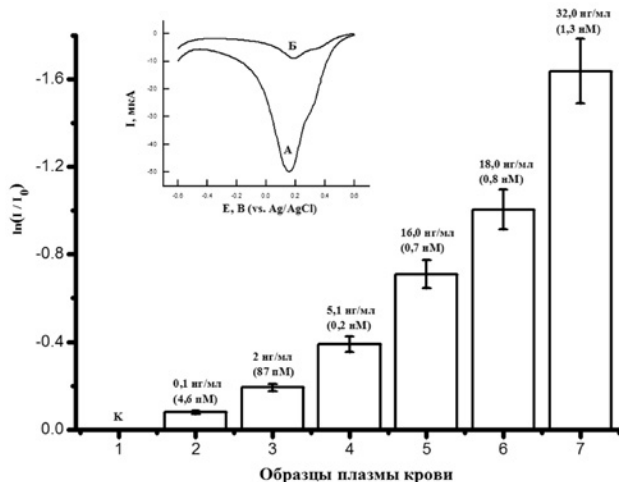


Рисунок 7. Зависимость $\ln(I/I_0)$ от концентрации тропонина I в образцах плазмы крови для ПГЭ/ Au_3 /ДДАБ/ At^+ . В качестве базового тока (I_0) взят усреднённый сигнал высоты катодного (восстановительного) пика оксида золота для пяти образцов плазм крови здоровых доноров. На вставке кривая А соответствует образцу плазмы крови здорового донора, кривая Б соответствует образцу плазмы крови больного ОИМ.

На основе электродов, модифицированных наночастицами золота и серебра с иммобилизованными на их поверхности антителами к тропонину I или T, были получены четыре вида иммуносенсоров на тропонин I (ПГЭ/ Au_x /ДДАБ/ At^+ , ПГЭ/ Au_3 /ДДАБ/ At^+ , ПГЭ/ Ag_3 /ДДАБ/ At^+ и ПГЭ/ Ag_x /ДДАБ/ At^+) и тропонин T (ПГЭ/ Au_x /ДДАБ/ At^+ , ПГЭ/ Au_3 /ДДАБ/ At^+ , ПГЭ/ Ag_3 /ДДАБ/ At^+ и ПГЭ/ Ag_x /ДДАБ/ At^+). С помощью данных модификаций были получены калибровочные кривые на соответствующие белки-маркёры инфаркта миокарда для образцов плазмы крови и стандартных растворов. На образцах плазмы крови здоровых доноров и больных ОИМ была показана диагностическая чувствительность разработанных иммуносенсоров на тропонин T. По электрохимическим параметрам образцы плазмы крови были разделены на две группы: здоровые доноры и больные ОИМ (рис. 8). В работе использовалось 22 образца плазмы крови: из них 7 образцов плазмы крови здоровых доноров, и 15 образцов плазмы крови больных ОИМ.

По полученным данным была проведена оценка результатов лабораторных исследований, включавшая следующие параметры разработанных тест-систем: ложноположительные (тест даёт положительный ответ, хотя заболевания у пациента не имеется) и ложноотрицательные результаты (тест

даёт отрицательный ответ, хотя у пациента имеется заболевание), диагностическая чувствительность теста, которая определяет вероятность положительного результата и показывает, с какой степенью уверенности можно ожидать положительный результат теста у больных.

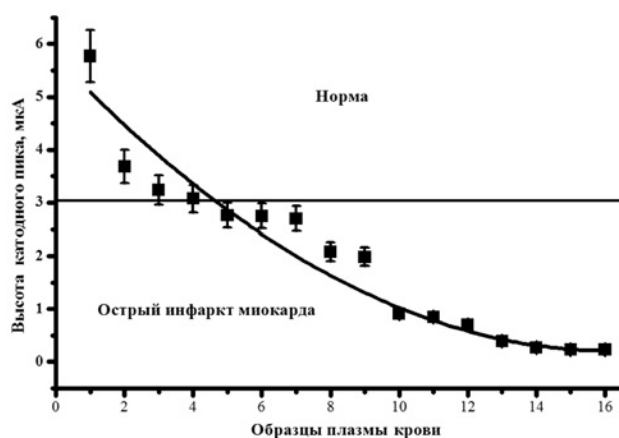


Рисунок 8. Зависимость высоты катодного (восстановительного) пика оксида золота от образцов плазмы крови, содержащих разные концентрации тропонина T (ПГЭ/ Au_3 /ДДАБ/ At^+).

В таблице 1 представлены аналитические характеристики разработанных иммуносенсоров на основе электродов, модифицированных наночастицами золота и серебра, полученными электросинтезом и химическим синтезом, на тропонин T.

Для разработанных иммуносенсоров на тропонин I диапазон определяемых концентраций в плазме крови составляет 0,1–32,00 нг/мл (0,0043–1,34 нМ) и 0,54–5,08 нг/мл (0,02–0,04 нМ) для стандартных растворов тропонина I, диагностическая чувствительность составляет 87%. Относительное стандартное отклонение среднего результата аналитического сигнала по трём измерениям образцов плазм крови или стандартных растворов, было сопоставимо с ранее рассчитанным стандартным отклонением среднего результат аналитического сигнала для каждой модификации электрода и составило 9–12% ($n=3$). Время пробоподготовки занимает от 20 до 75 мин, а электрохимический анализ – 2 мин. Объём исследуемого образца плазмы крови 1 мкл.

Концентрация тропонина T в норме составляет 0,1–0,5 нг/мл (2,7–13,5 пМ). Диапазон определяемых концентраций иммуносенсоров ПГЭ/ Au_3 /ДДАБ и ПГЭ/ Ag_3 /ДДАБ 0,1–1 нг/мл (2,7–27,0 пМ).

Таблица 1. Аналитические характеристики электрохимических иммуносенсоров для анализа тропонина T.

Аналитическая характеристика	Au_3 /ДДАБ	Au_x /ДДАБ	Ag_3 /ДДАБ	Ag_x /ДДАБ
Линейный диапазон определяемых концентраций стандартных растворов	0,1 – 1,0 нг/мл (2,7 – 27,0 пМ)	1,0 – 3,0 нг/мл (27 – 80,0 пМ)	1,0 – 6,0 нг/мл (27,0 – 160,0 пМ)	0,1 – 1,0 нг/мл (2,7 – 27,0 пМ)
Диагностическая чувствительность	87%	67%	73%	80%
Ложноположительные	3	3	3	2
Ложноотрицательные	3	3	5	4

Диагностическая чувствительность для электродов, модифицированных наночастицами золота (Au_3), составила 87%. Среди всех предложенных модификаций лучшие аналитические и диагностические характеристики показали ПГЭ/ Au_3 /ДДАБ [70].

2.3. Пьезокварцевый иммуносенсор для анализа тропонина I в плазме крови

Кинетика биоаффинных взаимодействий в системе тропонин I/антитела к тропонину I (TnI) в плазме крови человека была исследована с помощью метода кварцевых кристаллических микровесов (QCM). На основании полученных данных был разработан высокочувствительный пьезокварцевый иммуносенсор, позволяющий осуществлять прямую регистрацию биохимических взаимодействий без дополнительного введения меток и без химических модификаций на основе различия кинетических параметров специфических и неспецифических биоаффинных взаимодействий. Так как химические модификации могут приводить к денатурации или агрегации антител, в работе была использована нековалентная иммобилизация антител на золотом резонаторе без использования дополнительных сшивающих реагентов.

Взаимодействие антиген-антитело является высокоаффинной реакцией с константой ассоциации порядка $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, именно поэтому её изучение с помощью традиционных кинетических методов сильно затруднено. В нашем исследовании на золотой электрод пьезокварцевого резонатора наносили антитела к тропонину I, затем добавляли 1 мкл образца плазмы и регистрировали кинетику изменения частоты колебаний резонатора в режиме реального времени. При исследовании образцов плазмы здоровых доноров наблюдался ниспадающий характер кривой зависимости изменения частоты от времени. Анализ полученных данных с образцами плазм пациентов, больных ОИМ, показал наличие на кривой участка с практически постоянным значением частоты (наличие горизонтального плато), который свидетельствовал об образовании комплекса антиген-антитело. Плато продолжительностью 10-30 с регистрировали через 30-90 с после ввода образца плазмы (рис. 9). Значения констант скоростей образования, k_o , и диссоциации, k_d , комплекса и константы аффинности K_{af} тропонина I с антителами устанавливали по методике Скэтчарда

Таблица 2. Изменение частоты колебаний резонатора, Df , константы скоростей образования, k_o , и диссоциации, k_d , иммунного комплекса и константа аффинности, K_{af} , тропонина I с антителами образцов плазм пациентов, больных инфарктом миокарда.

Образец плазмы	Tn I, нг/мл	Δf , Гц	k_o , $\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$	K_d , s^{-1}	K_{af} , M^{-1}
AMI-0018	0,40±0,04	-(144±22)	$1,5 \times 10^{10}$	0,57	$2,6 \times 10^{10}$
AMI-0003	0,62±0,06	-(192±35)	$2,6 \times 10^9$	0,116	$2,2 \times 10^{10}$
AMI-0022	0,88±0,09	-(221±16)	$1,4 \times 10^9$	0,092	$1,5 \times 10^{10}$
AMI-0039	0,95±0,10	-(241±16)	$2,2 \times 10^9$	0,191	$1,2 \times 10^{10}$
AMI-0041	1,20±0,12	-(283±39)	$5,0 \times 10^8$	0,056	$8,9 \times 10^9$
AMI-0036	1,40±0,14	-(330±38)	$1,4 \times 10^9$	0,172	$8,3 \times 10^9$

из графика зависимости $d(Df)/dt$ от Df , учитывая линейный характер кинетической зависимости изменения частоты колебаний сенсора в начальный момент времени [71]. Результаты анализа представлены в таблице 2 [72-74].

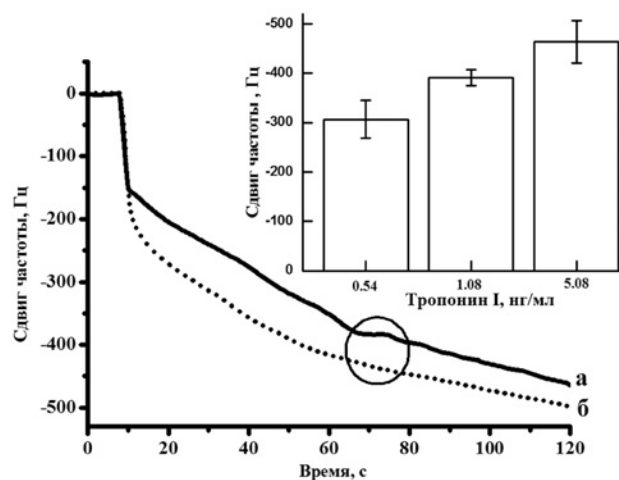


Рисунок 9. QCM-сенсограмма после прибавления (а) 1 мкл сыворотки, содержащей тропонин I (1,08 нг/мл) и (б) сыворотки без TnI (USBiological, calibrator kit, T8665-15R). Вставка: зависимость изменения частоты от концентрации тропонина I в пробе. На QCM-резонатор были нанесены антитела (118 нг/мл) к тропонину I.

Как видно из таблицы 2, с увеличением концентрации тропонина I в пробе сдвиг частоты колебаний резонатора линейно увеличивается; вместе с тем, значение константы аффинности уменьшается. Уравнение прямой имеет следующий вид:

$$Df/\text{Гц} = (71,42894 \pm 9,19389) + (177,07721 \pm 10,35299) \cdot C(\text{TnI}) / \text{нг/мл}, R^2=0,98,$$

где $C(\text{TnI})$ – концентрация тропонина I, нг/мл.

Незначительное уменьшение константы аффинности, вероятно, связано с влиянием диффузии из-за отсутствия условий идеального перемешивания.

Кинетика биоаффинных взаимодействий была изучена на образцах плазм пациентов, больных ОИМ. Погрешность определения тропонина I с использованием предложенного сенсора не превышала 19%. Разработанный иммуносенсор может быть применён для быстрого и чувствительного анализа кардиомаркеров в крови пациентов [74] (рис. 10).

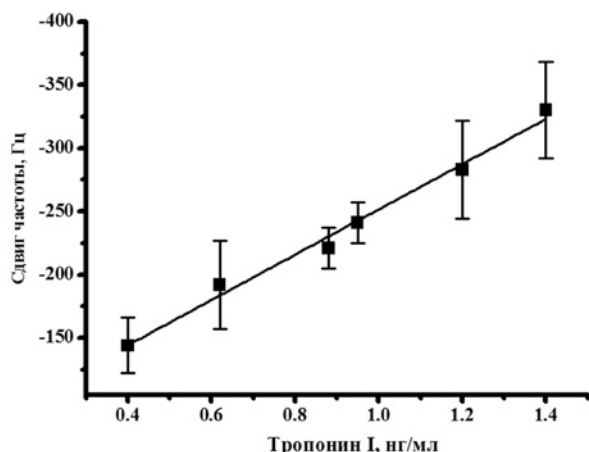


Рисунок 10. Зависимость изменения частоты резонатора от концентрации тропонина I в образцах плазмы крови.

3. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА КЛЕТОК *E. Coli* JM109

Электромикробиология – современное направление, исследующее взаимодействие между микроорганизмами и электронными устройствами, а также изучающее электрохимические свойства микроорганизмов в различных условиях [75].

Инфекционные заболевания являются серьёзной проблемой здравоохранения. Своевременное выявление возбудителя и его чувствительности к лекарственным препаратам позволяют снизить количество осложнений, уменьшить риск летальных исходов, подобрать адекватную и эффективную терапию. Основная цель наших исследований в области электромикробиологии состояла в прямой регистрации переноса электронов в клетках *E. coli* JM109. При встраивании в матрицу ДДАБ клеток *E. coli* JM109 регистрируется характерный катодный пик в области от -0,4 В. На рисунке 11 представлены циклические вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ), и электрода, содержащего ДДАБ и иммобилизованные клетки *E. coli* JM109 (ПГЭ/ДДАБ/*E. coli* JM109).

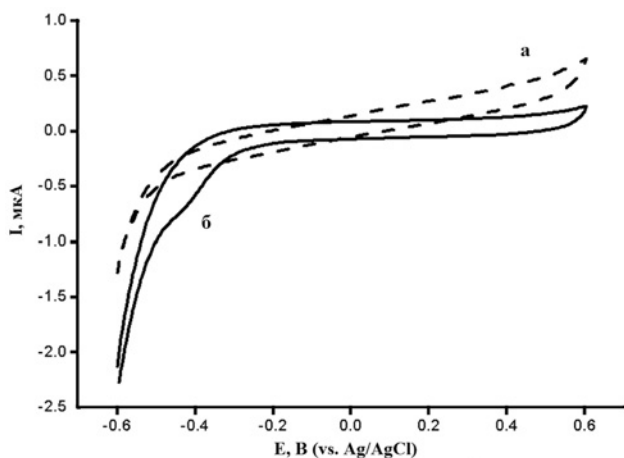


Рисунок 11. Циклические вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ (пунктирная линия) и электрода ДДАБ/*E. coli* JM109 (сплошная линия) в аэробных условиях, скорость сканирования, 0,1 В/с. Концентрация клеток $1,6 \cdot 10^7$ КОЕ/электрод.

На рисунке 12 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы для ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/ДДАБ/*E. coli* JM109.

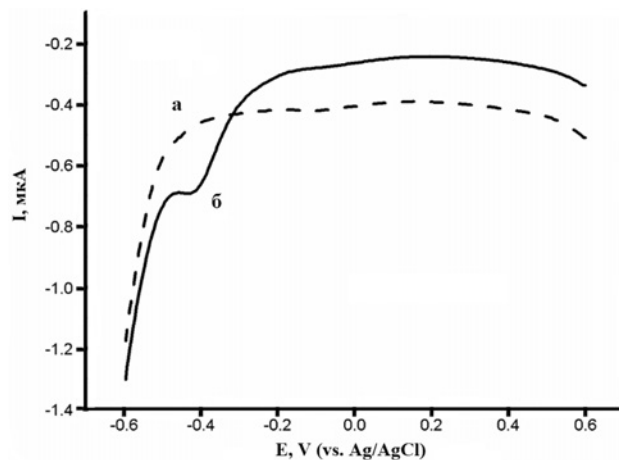


Рисунок 12. Квадратно-волновые вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ (пунктирная линия) и электрода ДДАБ/*E. coli* JM109 (сплошная линия) в аэробных условиях. Частота 10 Гц. Концентрация клеток $1,6 \cdot 10^7$ КОЕ/электрод.

Появление катодного пика в области -0,4 В, регистрируемое как с помощью циклической, так и с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии, свидетельствует о наличии электронного переноса между *E. coli* JM109 и электродом. Регистрируемые электрохимические реакции происходят с участием цитохрома *c*, локализованного на внешней мембране клетки, и мембранных декагемовых белков OmcA и MtrC [75, 76].

Регистрируемая электрохимическая реакция, по-видимому, заключается в прямом переносе электронов с электрода на железо гема белков: гемопротеины (Fe^{III}) + e^- (с электрода) ® гемопротеины (Fe^{II}).

Были проведены эксперименты по определению чувствительности *E. coli* JM109 к различным антибиотикам. На рисунке 13 представлена диаграмма, отражающая зависимость величины снижения сигнала от времени инкубации ПГЭ/ДДАБ/*E. coli* JM109 с антибиотиками. За 100% принималась величина катодного пика, измеренная перед добавлением в систему антибиотика.

С помощью электрохимических методов была исследована чувствительность *E. coli* JM109 к ряду антибиотиков (амикацин, цефепим, ампициллин, эритромицин). Цефепим, ампициллин и амикацин активны в отношении грамотрицательных бактерий, однако, механизм действия этих антибиотиков различен. Амикацин ингибирует синтез белка при связывании с консервативным А-участком 16S субъединицы рибосомной РНК в составе 30S РНК, эритромицин связывается с 23S субъединицей рибосомной РНК, ампициллин ингибирует рост клеточной стенки [77, 78].

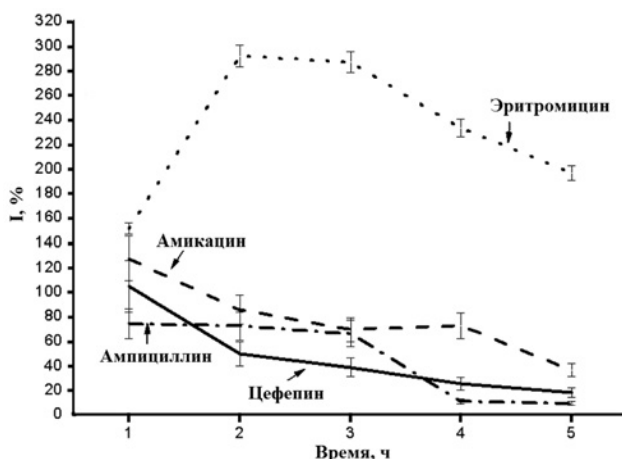


Рисунок 13. Зависимость максимальной высоты катодного пика ПГЭ/ДДАБ/*E. coli* JM109 электродов к антибиотикам: ампициллин (1,432 мМ), цефепим (1,04 мМ), амикацин (0,852 мМ), эритромицин (13,6 мкМ). Приведены средние данные 5 экспериментов. Концентрация клеток $1,6 \cdot 10^7$ КОЕ/электрод.

Для цефепима (1,04 мМ), и амикацина (0,852 мМ), максимальное снижение величины катодного тока соответственно на 92% и 81% происходит через 5 ч инкубации системы с антибиотиком. Для ампициллина (1,432 мМ), максимальное снижение величины катодного тока происходит через 4 ч и составляет 95%. Эритромицин (13,6 мкМ) не дает снижения величины катодного тока, а наоборот происходит его увеличение. Через 5 ч высота катодного пика составляет 225%, так как данный антибиотик не действует на *E. coli* JM109 в концентрации 13,6 мкМ (10 мкг/мл) [77, 78].

4. ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ОКИСЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

В последние годы возрос интерес к электрохимическому анализу белков и пептидов с помощью окисления аминокислотных остатков для решения биомедицинских задач, в частности, связанных с различными пост-трансляционными модификациями белков и агрегацией белков при нейродегенеративных заболеваниях [79-81]. В 1980 г. две независимые группы под руководством Brabec [82] и Reupaud [83] впервые показали окисление белков на твердых электродах. Из аминокислот, входящих в состав белков, помимо Цис и Цис-Цис, удалось зарегистрировать окисление аминокислотных остатков Мет, Гис, Тир и Три [84-86]. Необходимо отметить, что в отличие от Тир, Три и Цис, электроокисление остатков Гис, Цис-Цис и Мет происходит при достаточно высоких положительных потенциалах [84]. В настоящее время электрохимическое окисление различных белков за счёт аминокислотных остатков показано на электродах из углеродных материалов и золота [87, 88]. Используя структуры белков (www.pdb.org), было показано, что в реакции окисления

участвуют электроактивные группы аминокислотных остатков, находящиеся на поверхности молекулы и ориентированные к поверхности электрода. При этом величина тока окисления белка пропорциональна количеству электроактивных аминокислот, приходящихся на единицу площади поверхности молекулы, то есть “плотности” электроактивных остатков [89].

Таким образом, при одинаковом числе электроактивных аминокислотных остатков в молекуле ток окисления тем выше, чем ниже молекулярная масса белка [89] (рис. 14, 15). Основные преимущества данного электрохимического подхода к анализу белков это: (1) прямая детекция в достаточно низких концентрациях; (2) чувствительность к изменению конформации белка (разворачивание глобулы приводит к значительному увеличению электрохимического сигнала окисления) [82]; изменение сигнала при модификации аминокислотных остатков по электроактивным группам. Например, фосфорилирование остатка тирозина блокирует реакцию электроокисления, что приводит к уменьшению сигнала [89, 90].

Важной областью применения реакции окисления аминокислотных остатков является процесс агрегации белков, играющий одну из ключевых ролей при нейродегенеративных заболеваниях [81]. 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

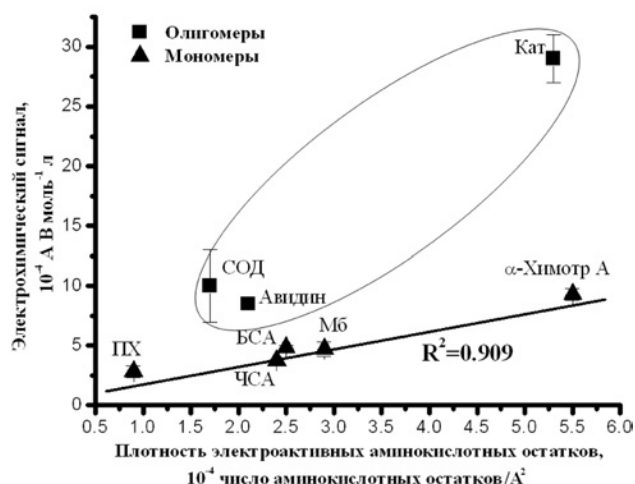


Рисунок 14. Зависимость между высотой пика окисления КВВА (ток пика/молярная концентрация белка) и поверхностной “плотностью” электроактивных аминокислотных остатков (количество электроактивных аминокислот/площадь молекулы белка). Белки: пероксидаза хрена (ПХ), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), бычий сывороточный альбумин (БСА), миоглобин скелетных мышц лошади (Мб), авидин яичного белка (Авидин), супероксиддисмутаза эритроцитов быка (СОД), а-химотрипсинаген А поджелудочной железы быка (а-химотр А), каталаза печени быка (Кат).

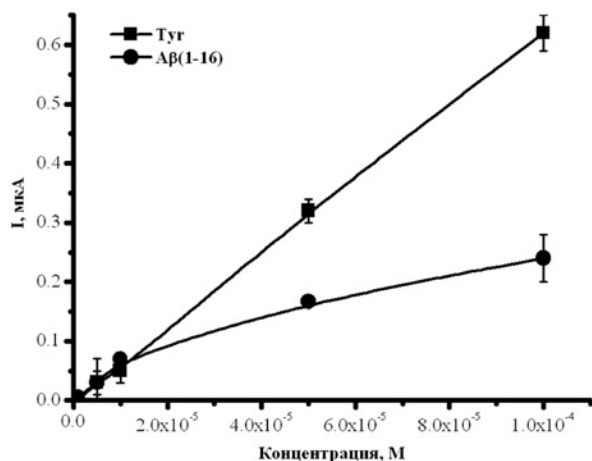


Рисунок 15. Зависимость высоты пика окисления КВВА от концентрации тирозина (Tyr) и амилоида-бета (Ab(1-16)); трис-буфер, pH 7,2.

олигомеров и нерастворимых фибриллярных агрегатов амилоида-бета (Ab). Ab представляет собой растворимый нейропептид (4,5 кДа), состоящий из 38-42 аминокислотных остатков. Из электроактивных остатков, Ab содержит три Гис (6, 13 и 14), один Мет (35) и один Тир (10). Однако, окисление остатков Гис и Мет требует высоких положительных потенциалов, превышающих 1 В (отн. Ag/AgCl) [87, 88]; к тому же, до сих пор не показано их окисление для Ab. С другой стороны, единственный остаток Тир Ab легко окисляется в нейтральных pH при потенциалах 0,6-0,7 В (vs. Ag/AgCl) [91], подобно другим нейропептидам, содержащим один остаток Тир [92]. В 2005 г. группа японских ученых впервые предложила использовать электрохимическое окисление Ab для изучения кинетики его агрегации [91]. В последующих исследованиях было показано, что прямой электрохимический подход с успехом может быть использован для мониторинга агрегации Ab в различных условиях: в присутствии ионов Fe(II), Cu(II) и Zn(II) ((Ab(1-42), Ab(1-40)) [93, 94]; в присутствии сим-триазиновых производных в качестве модуляторов агрегации (Ab(1-42)) [95] или пентапептида, разрушающего β -пластины, как ингибитора агрегации (Ab(1-42)) [96]. Ионы металлов (в частности, Zn(II) и Cu(II)) выполняют важную функцию в патологическом процессе агрегации, а Ab взаимодействует с ионами металлов через металл-связывающий домен, состоящий из N-концевых аминокислотных остатков 1-16. Основываясь на измерении сигнала окисления единственного остатка Тир-10 Ab, был разработан электрохимический экспресс-анализ комплексообразования между Ab и ионами металлов [97]. С этой целью был выбран водорастворимый синтетический пептид Ab(1-16), представляющий металл-связывающий домен Ab. Образование комплексов Ab(1-16) с ионами двухвалентных металлов, Zn(II), Cu(II), Mg(II) и Ca(II) было исследовано при концентрации Ab(1-16) $5 \cdot 10^{-5}$ М и при концентрации ионов металлов в области $1 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-2}$ М в трис-буфере с pH от 5 до 9.

Добавление Zn(II) либо Cu(II) ионов значительно снижало пик окисления Ab(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. 16).

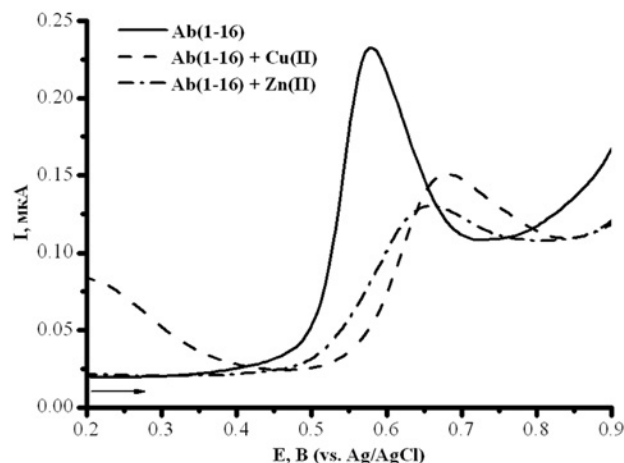


Рисунок 16. Типичные КВВА сигналы окисления Ab(1-16) в отсутствие и в присутствии ионов Cu(II) и Zn(II). Концентрация Ab(1-16) $5 \cdot 10^{-5}$ М; концентрация ионов металлов $1 \cdot 10^{-3}$ М; трис-буфер, pH 7,2.

Кроме Ab(1-16), альбумин сыворотки человека и миоглобин мышц лошади показали схожее поведение относительно тестируемых ионов металлов; это позволяет предположить, что электрохимический анализ белков в области положительных потенциалов окисления аминокислот может быть с успехом применен для изучения комплексов белков и пептидов с ионами металлов.

5. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ АНАЛОГОВ АНТИТЕЛ (ПОЛИМЕРОВ С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ОТПЕЧАТКАМИ, МИП) ДЛЯ ЭЛЕКТРОАНАЛИЗА МИОГЛОБИНА

Вследствие высокой аффинности и специфичности, антитела являются необходимым компонентом биосенсорного анализа. Тем не менее, использование антител имеет существенные ограничения. Они дороги, неустойчивы при изменении температуры, при химических модификациях, подвержены действию протеаз. Решение проблемы получения специфических связывающих структур, состоит в конструировании альтернативных устойчивых искусственных полимерных молекул для связывания соответствующих лигандов.

В связи с этим в настоящее время развивается новое направление – создание сенсоров на основе синтетических биомимических (или “биоподражательных”) материалов, осуществляющих, как и биореагенты, селективное комплементарное связывание определяемых веществ по принципу “ключ-замок”. Такими

биомимическими материалами являются полимеры с молекулярными отпечатками, или молекулярно-импринтированные полимеры (МИП, от англ. molecularly imprinted polymers).

В наших исследованиях были получены полимеры с молекулярными отпечатками для миоглобина. В качестве мономера был использован *о*-фенилендиамин (ФДА). Сенсорным элементом был графитовый электрод, полученный методом трафаретной печати. Электрополимеризацию ФДА проводили в водных буферных растворах на поверхности рабочего графитового электрода, что удобно для получения МИП с целью анализа белковых молекул. Для получения полимера на основе ФДА на поверхности рабочего графитового электрода проводили сканирование (20 сканов) в диапазоне от 0 В до +1,1 В со скоростью 50 мВ/с в 0,5 М ацетатном буфере, рН 5,2. При электрополимеризации в присутствии миоглобина (шаблона) были получены МИП для регистрации связывания миоглобина. Полимер без шаблона (НИП) был получен аналогично. Анализ связывания миоглобина с МИП и оценка распознавательной способности полимера по отношению к миоглобину проводили методом КВВА при прямой электрохимической регистрации миоглобина по пику восстановления Fe^{+3} гемопротейна (рис. 17). Полимер с молекулярными отпечатками более эффективно связывает миоглобин по сравнению с полимером, полученным без молекулы-шаблона: фактор импринтинга, рассчитанный как отношение максимального тока ($I_{\text{max}}(\text{МИП})/I_{\text{max}}(\text{НИП})$) составляет 2-4 [98].

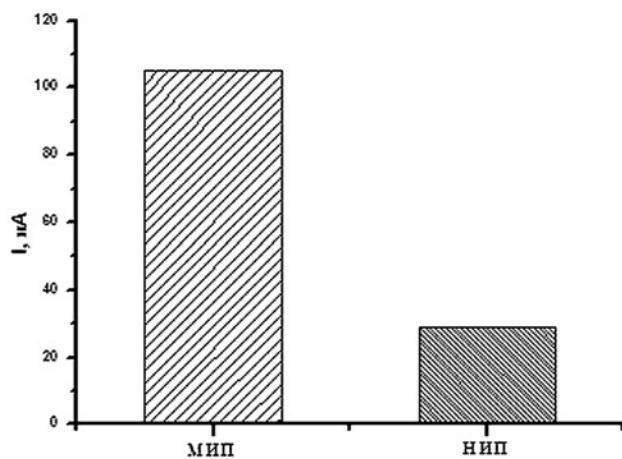


Рисунок 17. КВВА (восстановительный пик) электродов, модифицированных МИП (¾) и НИП (---) после инкубации с миоглобином ($1 \cdot 10^{-7}$ М, $2 \cdot 10^{-13}$ моль/электрод) и стадии удаления неспецифической сорбции. Диапазон развёртки потенциала от -0,7 до +0,1 В (относительно Ag/AgCl), $n = 0,05$ В/с, частота 10 Гц, амплитуда 20 мВ и шаг 5 мВ.

Количественный анализ связывания миоглобина с МИП проводили после инкубации МИП-электродов в растворе миоглобина в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-5}$ М или при иммобилизации 2 мкл $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-5}$ М миоглобина на поверхности сенсоров.

Для удаления неспецифической сорбции миоглобина на поверхности полимера сенсоры промывали деионизованной водой и проводили анализ методом КВВА. Для расчёта электрохимической константы диссоциации K_d была проанализирована зависимость максимальной амплитуды тока КВВА от концентрации миоглобина в качестве молекулы-шаблона. Так как кривая насыщения соответствует изотерме Лэнгмюра [99], константа диссоциации была рассчитана как концентрация миоглобина, при которой ток $I_{1/2}$ КВВА соответствует половине максимального значения I_{max} . Равновесное значение $K_{d,\text{МИП}}$ соответствует $(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$ М, оценочное значение $K_{d,\text{НИП}}$ лежит в области 10^{-6} М.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель проведенных авторами экспериментальных работ – показать применимость электрохимических технологий не только для разработки и создания биосенсоров, но и для исследования механизмов биохимических процессов и ферментативных систем в биомедицинских исследованиях. В течение последних десятилетий использование электродов в качестве доноров электронов, описанное А.И. Арчаковым для катализа цитохрома P450, стало активно развивающейся областью биоэлектрохимии. В обзоре проанализированы результаты авторов по электроанализу каталитической активности цитохромов P450 и возможным путям модулирования катализа и аллостерической регуляции. Электроанализ цитохромов P450 позволяет сделать шаг в сторону молекулярной медицины и оценить критерии эффективности терапевтических препаратов, а также их интерференцию. Электроанализ применим для исследования такой важной проблемы, как антибиотикорезистентность бактериальных клеток. Разработаны электрохимические методы мониторинга химической модификации, контролируемой биохимическими событиями, а также структурной перестройки при комплексообразовании функционально значимых белков и пептидов с ионами металлов, что перспективно для изучения конформационных перестроек биомолекул при проведении скрининга потенциальных лекарственных препаратов. В наших исследованиях были получены полимеры с молекулярными отпечатками для миоглобина в качестве аналогов антител для проведения электроанализа этого функционально значимого белка. Таким образом, биоэлектрохимия стала равноправным аналитическим и информативным методом в биомедицинских исследованиях наряду с традиционными классическими исследованиями “*in vivo*”, “*in vitro*” и “*in silico*”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы, и Министерства образования и науки Российской Федерации: Соглашение № 14.576.21.0045, уникальный идентификатор RFMEFI57614X0045.

ЛИТЕРАТУРА

- Кузнецов Б.А., Местечкина Н.М., Изотов М.В., Карузина И.И., Карякин А.В., Арчаков А.И. (1979) Биохимия, **44**, 1569-1574.
- Арчаков А.И., Кузнецов Б.А., Изотов М.В., Карузина И.И. (1981) Биофизика, **26**, 352-354.
- Archakov A., Bachmanova G. (1990) Cytochrome P450 and Reactive Oxygen. Taylor and Francis, London.
- Ortiz de Montellano P.R. (ed.) (2005) Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, third ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Pikuleva I. (2006) Pharmacol. Ther., **112**, 761-773.
- Estabrook R. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 290-298.
- Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T. (2005) Cancer Letters, **227**, 115-124.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2007) Biochim. Biophys. Acta - General Subjects, **1770**, 330-344.
- Wu J.H., Croft K.D. (2007) Mol. Asp. Med., **28**, 437-440.
- Sacerdori D., Gatta A., McGriff J. (2003) Prostaglandins Lipid Mediators, **72**, 51-71.
- Kalsorta A., Strobel H.W. (2006) Pharmacol. Ther., **112**, 589-611.
- Gross G.J., Falck J.R., Isbell M., Moore J., Nithipatikom K. (2005) Card. Res., **68**, 18-25.
- Graville D.J., Gottlieb R. (2005) Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, **2**, 123-127.
- Nowak P., Wozniakiewicz M., Koscielniak P. (2014) Trends Anal. Chem., **59**, 42-49.
- Балакин К.В., Иваненков Я.А. (2005) Биомед. химия, **51**, 384-412.
- Cirspi C.L. (1999) Curr. Opin. Drug Discov. Dev., **2**, 15-19.
- Criovori P., Pogessi I. (2006) Eur. J. Medicinal Chem., **41**, 795-808.
- Kumar R.A., Clark D.S. (2006) Current Opin. Chem. Biol., **10**, 162-168.
- Sakai-Kato K., Kato M., Homma H., Toyo'oka T., Utsunomiya-Tate N. (2005) Anal. Chem., **77**, 7080-7083.
- Арчаков А.И., Лисица А.В., Петушкова Н.А., Карузина И.И. (2008) Клин. мед., **86**(2), 4-8.
- Scheller F., Renneberg R., Mohr P., Janing G-R., Ruckpaul K. (1976) FEBS Lett., **71**, 309-312.
- Estabrook R.W., Faulkner K.M., Seth M.S., Fisher C.W. (1996) Methods Enzymol., **272**, 44-51.
- Kazlauskaitė J., Westlake A.C.G., Wong L., Hill H.A.O. (1996) Chemical Commun., **18**, 2189-2190.
- Шумянцева В.В., Булко Т.В., Арчаков А.И. (1999) Успехи химии, **68**, 967-973.
- Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Chalenko Ya.M., Vagin M.Yu., Rudakov Yu.O., Shatskaya M.A., Archakov A.I. (2011) Biochem. Biophys. Acta. Proteins and Proteomics, **1814**, 94-101.
- Shumyantseva V.V., Suprun E.V., Bulko T.V., Chalenko Ya.M., Archakov A.I. (2012) Nanomedicine in Diagnostics (Rozlosnik N., ed.), (1st edn). CRC Press, Taylor and Francis Group, pp. 68-95.
- Schneider E., Clark D. (2013) Biosens. Bioelectron., **39**, 1-13.
- Iwuoha E.I., Joseph S., Zhang Z., Smyth M.R., Fuhr U., Ortiz de Montellano P.R. (1998) J. Pharmac. Biomed. Analysis, **17**, 1101-1110.
- Sucheta A., Cabback R., Weiner J., Armstrong F.A. (1993) Biochemistry, **32**, 5455-5465.
- Iwuoha E.I., Williams-Dottin A.R., Hall L.A., Morrin A., Mathebe G.N., Smyth M.R., Killard A. (2004) Pure Appl. Chem., **76**, 789-799.
- Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н. (2009) Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине, БИНОМ. Лаборатория знаний.
- Шумянцева В.В., Булко Т.В., Рудаков Ю.О., Кузнецова Г.П., Саменкова Н.Ф., Лисица А.В., Карузина И.И., Арчаков А.И. (2006) Биомед. химия, **52**, 458-468.
- Шумянцева В.В., Супрун Е.В., Булко Т.В., Добрынина О.В., Арчаков А.И. (2010) Биомед. химия, **56**, 55-71.
- Carrara S., Shumyantseva V.V., Archakov A.I., Samori B. (2008) Biosens. Bioelectron., **24**, 148-150.
- Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Khan R., Archakov A.I. (2014) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **8**, 237-242.
- Shumyantseva V.V., Carrara S., Bavastrello V., Riley D.J., Bulko T.V., Skryabin K.G., Archakov A.I., Nicolini C. (2005) Biosens. Bioelectron., **21**, 217-222.
- Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузнецова Г.П., Саменкова Н.Ф., Арчаков А.И. (2009) Биохимия, **74**, 542-549.
- Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузнецова Г.П., Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Карузина И.И., Арчаков А.И. (2007) Биохимия, **72**, 658-663.
- Шумянцева В.В., Булко Т.В., Арчаков А.И. (2004) Биомед. химия, **50**, 243-259.
- Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Usanov S.A., Schmid R.D., Nicolini C., Archakov A.I. (2001) J. Inorg. Biochem., **87**, 185-190.
- Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Alexandrova S.A., Sokolov N.N., Schmid R.D., Bachmann A.I., Archakov A.I. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **263**, 678-680.
- Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Bachmann T.T., Bilitewski U., Schmid R.D., Archakov A.I. (2000) Arch. Biochem. Biophys., **377**(1), 43-48.
- Zanger U., Schwab M. (2013) Pharmacol. Ther., **138**, 103-141.
- Nebert D.W., Russel D.W. (2002) Lancet, **360**, 1155-1162.
- Шумянцева В.В., Ших Е.В., Махова А.А., Булко Т.В., Кукес А.Г., Сизова О.С., Раменская Г.В., Усанов С.А., Арчаков А.И. (2011) Биомед. химия, **57**, 343-354.
- Makhova A.A., Shumyantseva V.V., Shich E.V., Bulko T.V., Kukes V.G., Sizova O.S., Ramenskaya G.V., Usanov S.A., Archakov A.I. (2011) BioNanoSci., **1**, 46-52.
- Махова А.А., Шумянцева В.В., Ших Е.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Кузиков А.В., Кукес В.Г., Арчаков А.И. (2013) Молекулярная медицина, **5**, 49-53.
- Шумянцева В.В., Махова А.А., Булко Т.В., Бернхардт Р., Кузиков А.В., Ших Е.В., Кукес В.Г., Арчаков А.И. (2015) Биохимия, **80**, 439-448.
- Bruno D.R., Njar V.C.O. (2007) Bioorg. Med. Chem., **15**, 5047-5060.
- Scriture C., Sparreboom A., Figg W. (2005) Lancet Oncol., **6**, 780-789.
- Шумянцева В.В., Булко Т.В., Мишарин А.Ю., Арчаков А.И. (2011) Биомед. химия, **57**, 402-409.
- Kuzikov A.V., Dugin N.O., Stulov S.V., Shcherbinin D.S., Zharkova M.S., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Misharin A.Y. (2014) Steroids, **88**, 66-71.
- Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Lisitsyna V.B., Urlacher V.B., Kuzikov A.V., Suprun E.V., Archakov A.I. (2013) Biophysics, **58**, 349-354.
- Rudakov Yu.O., Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I. (2008) J. Inorg. Biochem., **102**, 2020-2025.

55. Gnedenko O.V., Yablokov E.O., Usanov S.A., Mukha D.V., Sergeev G.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Moskaleva N.E., Shumyantseva V.V., Ivanov A.S., Archakov A.I. (2014) *Chem. Phys. Lett.*, **593**, 40-44.
56. Гнеденко О.В., Иванов А.С., Яблоков Е.О., Усанов С.А., Муха Д.В., Сергеев Г.В., Кузиков А.В., Москалева Н.Е., Булко Т.В., Шумянцева В.В., Арчаков А.И. (2014) *Биомед. химия*, **60**, 17-27.
57. McDonnell B., Hearty S., Leonard P., O'Kennedy R. (2009) *Clin. Biochem.*, **42**(7-8), 549-561.
58. Anderson L. (2005) *J. Physiol.*, **563**(1), 23-60.
59. Шольц Ф. (2006) Электроаналитические методы. Теория и практика, М. БИНОМ. Лаборатория знаний.
60. Shumyantseva V., Suprun E., Bulko T., Archakov A. (2009) *Electroanalysis*, **21**(3-5), 530-535.
61. Арчаков А.И., Шумянцева В.В., Булко Т.В., Курнышова А.В., Вагин М.Ю. (2009) Патент №367958, Бюлл. изобр., №26, 20.09.2009.
62. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Вагин М.Ю., Супрун Е.В., Арчаков А.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 758-768.
63. Suprun E., Bulko T., Lisitsa A., Gnedenko O., Ivanov A., Shumyantseva V., Archakov A. (2010) *Biosens. Bioelectron.*, **25**(7), 1694-1698.
64. Шумянцева В.В., Супрун Е.В., Булко Т.В., Арчаков А.И. (2010) в кн. *Химический анализ в медицинской диагностике*, М., Наука, стр. 181-211.
65. Шумков А.А., Супрун Е.В., Шумянцева В.В., Арчаков А.И. (2010) *Биомедицина*, №5, 146-148.
66. Suprun E.V., Shilovskaya A.L., Lisitsa A.V., Bulko T.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. (2011) *Electroanalysis*, **23**, 1051-1057.
67. Арчаков А.И., Шумянцева В.В., Супрун Е.В., Булко Т.В. (2011) Патент 2425382, Бюлл. изобр., №21, 26.07.2011.
68. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Арчаков А.И. (2013) *Биомед. химия*, **59**, 209-218.
69. Шумков А.А., Супрун Е.В., Шумянцева В.В., Арчаков А.И. (2011) *Биомедицина*, № 3, 46-49.
70. Shumkov A.A., Suprun E.V., Shatinina S.Z., Lisitsa A.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. (2013) *BioNanoScience*, **3**, 216-222.
71. Si S., Si L., Ren F., Zhu D., Fung Y. (2002) *J. Colloid Interface Science*, **253**, 47-52.
72. Агафонова Л.Е., Шумков А.А., Шумянцева В.В., Арчаков А.И. (2013) *Вестник РГМУ*, **2**, 75-79.
73. Agafonova L.E., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. (2014) *BioNanoSci.*, **4**, 46-51.
74. Agafonova L.E., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. (2014) *Chem. Phys. Lett.*, **604**, 5-9.
75. Lovley D.R. (2012) *Annu. Rev. Microbiol.*, **66**, 391-409.
76. Peng L., You S., Wang J. (2010) *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 1248-1251.
77. Чаленко Я.М., Шумянцева В.В., Ермолаева С.А., Арчаков А.И. (2012) *Биомедицина*, №1, 43-48.
78. Chalenko Y., Shumyantseva V., Ermolaeva S., Archakov A. (2012) *Biosens. Bioelectron.*, **32**(1), 219-223.
79. Suprun E.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. (2014) *Electrochim. Acta*, **140**, 72-82.
80. Shumyantseva V.V., Suprun E.V., Bulko T.V., Archakov A.I. (2014) *Biosens. Bioelectron.*, **61**, 131-139.
81. Veloso A., Kerman K. (2013) *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 5725-5741.
82. Brabec V., Mornstein V. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **625**, 43-50.
83. Reynaud J.A., Malfoy B., Bere A. (1980) *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **116**, 595-606.
84. Brabec V., Mornstein V. (1980) *Biophys. Chem.*, **12**, 159-165.
85. Reynaud J.A., Malfoy B., Canesson P. (1980) *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **114**, 195-211.
86. Malfoy B., Reynaud J.A. (1980) *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **114**, 213-223.
87. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. (2013) *Bioelectrochemistry*, **89**, 11-18.
88. Topal B.D., Özkan S.A., Uslu B. (2014) *J. Electroanal. Chem.*, **719**, 14-18.
89. Suprun E.V., Zharkova M.S., Morozovich G.E., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. (2013) *Electroanalysis*, **25**, 2109-2116.
90. Kerman K., Vestergaard M., Chikae M., Yamamura S., Tamiya E. (2007) *Electrochem. Commun.*, **9**, 976-980.
91. Vestergaard M., Kerman K., Saito M., Nagatani N., Takamura Y., Tamiya E. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11892-11893.
92. Reynolds N.C., Kissel B.M., Fleming L.H. (1995) *Electroanalysis*, **7**, 1177-1181.
93. Hung V.W.-S., Masoom H., Kerman K. (2012) *J. Electroanal. Chem.*, **681**, 89-95.
94. Geng J., Yu H., Ren J., Qu X. (2008) *Electrochem. Commun.*, **10**, 1797-1800.
95. Veloso A.J., Hung V. W.-S., Cheng X. R., Kerman K. (2012) *Electroanalysis*, **24**, 1847-1851.
96. Veloso A.J., Kerman K. (2012) *Bioelectrochemistry*, **84**, 49-52.
97. Suprun E.V., Zaryanov N.V., Radko S.P., Kulikova A.A., Kozin S.A., Makarov A.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2015) *Electrochimica Acta*, в печати. DOI: 10.1016/j.electacta.2015.01.066.
98. Moreira F., Sharma S., Dutra R., Noronha J., Cass A., Sales M. (2013) *Biosens. Bioelectron.*, **45**, 237-244.
99. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Байчоров И.Х., Агафонова Л.Е., Арчаков А.И. (2015) *Биомед. химия*, **61**, в печати.

Поступила: 16. 02. 2015.

ELECTROCHEMICAL METHODS FOR BIOMEDICAL INVESTIGATIONS

V.V. Shumyantseva^{1,2}, T.V. Bulko^{1,2}, E.V. Suprun¹, A.V. Kuzikov¹, L.E. Agafonova¹, A.I. Archakov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7(499)246-5820; fax: +7(495)245-0857;
e-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru
²IBMC-EcoBioPharm Company, Moscow, Russia

In the review, authors discussed recently published experimental data concerning highly sensitive electrochemical methods and technologies for biomedical investigations in the postgenomic era. Developments in electrochemical biosensors systems for the analysis of various bio objects are also considered: cytochrome P450s, cardiac markers, bacterial cells, the analysis of proteins based on electro oxidized amino acids as a tool for analysis of conformational events. The electroanalysis of catalytic activity of cytochromes P450 allowed developing system for screening of potential substrates, inhibitors or modulators of catalytic functions of this class of hemoproteins. The highly sensitive quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor has been developed for analysis of bio affinity interactions of antibodies with troponin I in plasma. The QCM technique allowed real-time monitoring of the kinetic differences in specific interactions and nonspecific sorption, without multiple labeling procedures and separation steps. The affinity binding process was characterized by the association (k_a) and the dissociation (k_d) kinetic constants and the equilibrium association (K) constant, calculated using experimental data. Based on the electroactivity of bacterial cells, the electrochemical system for determination of sensitivity of the microbial cells to antibiotics cefepime, ampicillin, amikacin, and erythromycin was proposed. It was shown that the minimally detectable cell number corresponds to 10^6 CFU per electrode. The electrochemical method allows estimating the degree of *E. coli* JM109 cells resistance to antibiotics within 2-5 h. Electrosynthesis of polymeric analogs of antibodies for myoglobin (molecularly imprinted polymer, MIP) on the surface of graphite screen-printed electrodes as sensor elements with *o*-phenylenediamine as the functional monomer was developed. Molecularly imprinted polymers demonstrate selective complementary binding of a template protein molecule (myoglobin) by the “key-lock” principle.

Key words: electrochemical biosensors, molecularly imprinted polymers (MIP), cytochrome P450, myoglobin, cardiac markers, bacterial cells.