

УДК 53.082.5

С. Г. Скуридин^{1*}, Ф. В. Верещагин², В. М. Гусев², В. И. Саянов¹, И. В. Решетов³, Ю. М. Евдокимов¹

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧАСТИЦ ХОЛЕСТЕРЧЕСКОЙ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ
ДИСПЕРСИИ ДНК В КАЧЕСТВЕ БИОДАТЧИКА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ ДОКСОРУБИЦИНА
В РАСТВОРАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ**

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук,
ул. Вавилова, д. 32, 119311 Москва, Россия. *E-mail: lancet-bio@bk.ru

²Институт спектроскопии Российской академии наук,
ул. Физическая, д. 5, 108840 Москва, Троицк, Россия.

³Клиника онкологии, реконструктивно-пластической хирургии
и радиологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова,
Большая Пироговская ул., д. 6, стр. 1, 119435 Москва, Россия

В результате фазового исключения молекул двухцепочечной ДНК получены холестерические жидкокристаллические дисперсии (ХЖКД). Исследовано взаимодействие частиц ХЖКД ДНК с антрациклиновым антибиотиком – доксорубицином (ДОКС) в водно-солевых растворах и плазме крови. Показано, что образование интеркаляционного комплекса ДОКС с молекулами ДНК, упорядоченными в квазинематических слоях частиц ХЖКД, сопровождается появлением интенсивной (аномальной) полосы в спектре кругового дихроизма в области поглощения хромофоров ДОКС ($\lambda_{\text{макс.}} = 505$ нм). Амплитуда этой полосы зависит от концентрации ДОКС, т.е. частица дисперсии представляет собой биодатчик, меняющий свои свойства в «ответ» на присутствие антибиотика. Определены оптимальные условия формирования биодатчика и получена калибровочная зависимость, позволяющая определять наличие и концентрацию ДОКС в растворах и плазме крови.

Ключевые слова: холестерическая жидкокристаллическая дисперсия ДНК, круговой дихроизм, аномальная полоса в спектре КД, биодатчик, биосенсорная тест-система, доксорубицин.

DOI: 10.18083/LCAppl.2020.3.80

S. G. Skuridin^{1*}, F. V. Vereshchagin², V. M. Gusev², V. I. Salyanov¹, I. V. Reshetov³, Yu. M. Yevdokimov¹

APPLICATION OF CHOLESTERIC LIQUID-CRYSTALLINE DNA DISPERSION PARTICLES AS BIOSENSING UNITS FOR DETERMINATION OF PRESENCE AND CONCENTRATION OF DOXORUBICIN IN SOLUTIONS AND BLOOD PLASMA

¹Engelgardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences,
32 Vavilova St., Moscow, 119991, Russia. *E-mail: lancet-bio@bk.ru

²Institute of Spectroscopy of the Russian Academy of Sciences,
5 Fizicheskaya St., Moscow, Troitsk, 108840, Russia.

³Clinic of Oncology, Reconstructive Plastic Surgery and Radiology,
Sechenov First Moscow State Medical University,
6, Bld. 1 Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow, 119435, Russia

As a result of phase exclusion of double-stranded DNA molecules, the cholesteric liquid-crystalline dispersions (CLCD) were obtained. The interaction of DNA CLCD particles with an anthracycline antibiotic – doxorubicin (DOX) in water-salt solutions and blood plasma was studied. It was shown that the formation of the intercalation complex of DOX with DNA molecules ordered in the quasinematic layers of CLCD particles is accompanied by an appearance of an intense (abnormal) band in the circular dichroism spectrum in the absorption region of DOX chromophores ($\lambda_{\max} = 505$ nm). The amplitude of this band depends on the concentration of DOX, i.e. a dispersion particle is a biosensing unit that changes its properties in a “response” to the presence of antibiotic molecules. The optimal conditions for the formation of the biosensing unit were determined and a calibration curve was obtained that allows one to determine the presence and the concentration of DOX in solutions and blood plasma.

Key words: cholesteric liquid-crystalline dispersion of DNA, circular dichroism, abnormal band in the CD spectrum, biosensing unit, biosensor test-system, doxorubicin.

1. Введение

В работах [1–3] показано, что частицы холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД), образующиеся в результате фазового исключения линейных двухцепочечных молекул ДНК из водно-солевых растворах полиэтиленгликоля (ПЭГ), можно использовать в качестве полифункциональных биодатчиков, позволяющих определять различные химические вещества и биологически активные соединения (БАС), «мишенью» которых является генетический материал клеток. Определение химических веществ и БАС, образующих комплексы с двухцепочечными молекулами ДНК, основано на том, что различные соединения (молекулы «гостей») могут легко диффундировать в квазинематические слои частиц дисперсий ДНК и взаимодействовать с парами азотистых оснований нуклеиновой кислоты.

Результаты теоретического анализа [4] свидетельствуют о том, что при фиксированном осмотическом давлении раствора, задаваемом концен-

трацией ПЭГ, при невысокой степени связывания молекул «гостей» с парами азотистых оснований, пространственная спирально закрученная структура частиц ХЖКД ДНК не нарушается. В случае интеркаляции молекул БАС между парами азотистых оснований молекул ДНК, упорядоченных в квазинематическом слое частиц ХЖКД, эти молекулы оказываются пространственно ориентированными по отношению к длинной оси молекул ДНК. На эти молекулы будут распространяться все правила, установленные при теоретическом анализе спектров кругового дихроизма (КД) и развитие для пар азотистых оснований ДНК [5, 6]. Поэтому в спектре КД ХЖКД, образующихся при фазовом исключении молекул комплексов (ДНК-БАС), в области поглощения хромофоров БАС (так же, как и азотистых оснований) следует ожидать появления аномальной полосы, амплитуда которой будет возрастать при увеличении концентрации молекул БАС, связанных в комплекс с ДНК.

Предсказания теории были проверены экспериментально на примере противоопухолевого антибиотика антрациклиновой группы – дауномицина (ДАУ) [7], структурная формула которого приведена на рис. 1, *А*.

В соответствии с предсказанием теории интеркаляции молекул ДАУ приводит к появлению дополнительной интенсивной (аномальной) полосы в спектре КД ХЖКД комплекса (ДНК-ДАУ), расположенной в области поглощения ДАУ в видимой области спектра ($\lambda = 500$ нм). Поэтому частицу ХЖКД ДНК можно назвать «биодатчиком»,

генерирующим оптический «сигнал», величина которого зависит от концентрации молекул ДАУ, связанных с ДНК. Для регистрации аномальной полосы в спектре КД ХЖКД в Институте спектроскопии РАН был разработан и создан портативный двухволновой дихромат, способный работать с биодатчиком на основе частиц ХЖКД ДНК [8]. Таким образом, были заложены основы создания новой тест-системы для установления наличия и определения концентрации ДАУ в анализируемой жидкости при помощи измерения аномального оптического сигнала в спектре КД.

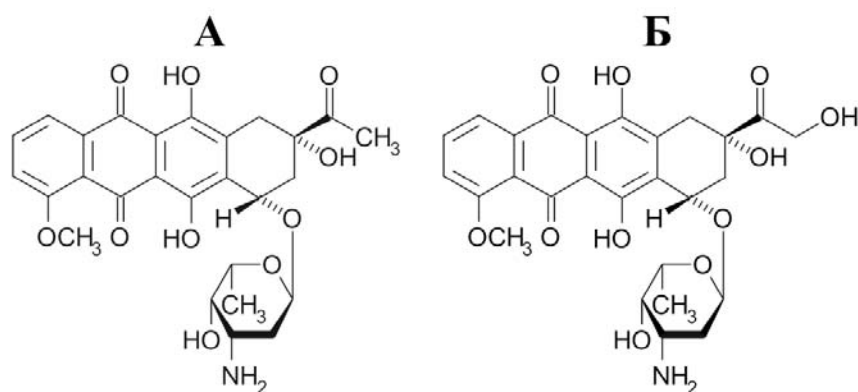


Рис. 1. Структурные формулы дауномицина (*А*) и доксорубина (*Б*)

Fig. 1. Structural formulas of daunomycin (*A*) and doxorubicin (*B*)

Кроме ДАУ в онкологической практике при терапии некоторых заболеваний используется другой антибиотик – доксорубин (ДОКС, рис. 1, *Б*). Хотя этот антибиотик также принадлежит к антрациклиновой группе и является аналогом ДАУ, его физико-химические и биологические свойства отличаются от свойств ДАУ. При этом клиническое использование этого антибиотика ограничено рядом побочных эффектов (в частности, дозозависимой кардиотоксичностью [9, 10]), требующих в некоторых случаях редукции доз или отмены назначенного препарата. В связи с этим основная проблема при терапии ДОКС сводится к скорости и точности определения его концентрации в биологических жидкостях (цельная кровь, плазма крови и т.д.) пациентов, что необходимо для принятия врачом решения о продолжении (или отмене) начатой терапии.

Быстрых методов определения ДОКС на сегодня не существует. Это означает, что приборы и методики экспрессного контроля его содержания в биологических жидкостях онкологических больных остро востребованы.

Цель настоящей работы: на основе сочетания частиц ХЖКД ДНК в качестве биодатчиков и портативного дихромата разработать метод определения наличия и концентрации ДОКС в лабораторных растворах и плазме крови.

2. Эксперимент

Использовали дополнительно очищенный от примесей и деполимеризованный препарат двухцепочечной ДНК из эритроцитов цыплят («Reanal», Венгрия) с молекулярной массой $\sim (0,6-0,8) \times 10^6$ Да.

Нативность ДНК после деполимеризации контролировали по величине гиперхромного эффекта (~ 30–35 %), сопровождающего кислотную денатурацию двухцепочечных нуклеиновых кислот.

Концентрацию ДНК в водно-солевых растворах определяли спектрофотометрически, пользуясь известным значением молярного коэффициента поглощения ($\epsilon_{258.4} = 6600 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Препараты полиэтиленгликоля (ПЭГ, («Sigma» (*BioUltra*), США; молекулярная масса ПЭГ 4000 Да) и антрациклинового антибиотика доксорубина («Sigma», США) использовали без дополнительной очистки.

Концентрацию ДОКС в исходном растворе определяли спектрофотометрически, пользуясь значением его молярного коэффициента поглощения ($\epsilon_{480} = 11500 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [11, 12].

Исходный водно-солевой раствор ПЭГ (0,3 М NaCl, $C_{\text{ПЭГ}} = 170 \text{ мг мл}^{-1}$) готовили, растворяя навески NaCl и ПЭГ в 0,002 М Na^+ -фосфатном буфере (рН ~ 7,0), а затем фильтровали для удаления возможных механических загрязнений через мембранные фильтры (*Millipore*, США) с диаметром пор 0,8 мкм.

ХЖКД ДНК формировали в соответствии с методикой, описанной в работе [13]. Согласно этой методике, равные объемы водно-солевых растворов, один из которых содержал ДНК, а другой – ПЭГ (концентрация ДНК и ПЭГ в растворах в два раза превышала требуемые конечные значения и составляла соответственно 20 мкг мл^{-1} и 340 мг мл^{-1}), смешивали; полученную смесь интенсивно перемешивали на вихревом встряхивателе «*IKA VORTEX Genius 3*» (Германия) в течение 1 мин, выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч для завершения формирования ХЖКД ДНК, а затем использовали в работе.

Для приготовления *in vitro* ДОКС-содержащих проб плазмы крови использовали лиофильно высушенный препарат плазмы крови здоровых доноров (Плазма Н (только для *in vitro* диагностики); производитель НПО «Ренам», Россия).

Пробоподготовку ДОКС-содержащих аналитических проб плазмы крови для оценки в них концентрации этого антибиотика при помощи биодатчика на основе частиц ХЖКД ДНК проводили в несколько этапов.

1. В центрифужной пробирке смешивают 1,5 мл ДОКС-содержащей плазмы крови человека

с 1,5 мл водно-солевого раствора ПЭГ ($C_{\text{ПЭГ}} = 340 \text{ мг мл}^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер). С учетом разведения, таким образом, создаются физико-химические условия, необходимые для образования ХЖКД ДНК. Полученную смесь тщательно перемешивают в течение 1 мин. Таким способом получают ДОКС-содержащую пробу плазмы крови в растворе ПЭГ.

2. Полученную смесь центрифугируют в течение 15 мин ($14000 \text{ об мин}^{-1}$, 15 °С; «*Eppendorf*», *Centrifuge 5418R* (Германия)) для осаждения компонентов плазмы крови, несовместимых с раствором ПЭГ.

3. 1,5 мл супернатанта, полученного после низкоскоростного центрифугирования ДОКС-содержащей пробы плазмы крови в растворе ПЭГ, смешивают с 1,5 мл смеси, в которой создана ХЖКД ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 20 \text{ мкг мл}^{-1}$, $C_{\text{ПЭГ}} = 170 \text{ мг мл}^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер), частицы которой обладают аномальной оптической активностью, проявляющейся в виде интенсивной отрицательной полосы в спектре КД ($\lambda = 270 \text{ нм}$). Таким образом, получают аналитическую пробу для определения концентрации антибиотика в автоматическом режиме при помощи двухволнового портативного дихрометра.

Спектры поглощения растворов регистрировали при помощи спектрофотометра *Cary 100 Scan* («*Varian*», США), а спектры КД – при помощи широкополосного дихрометра СКД-2 (разработка Института спектроскопии РАН, г. Москва, г. Троицк). Спектры КД представляли в виде зависимости разности интенсивности поглощения лево- и правополяризованного света (ΔA ; $\Delta A = (A_L - A_R)$) от длины волны (λ) [14].

Во всех случаях использовали прямоугольные кварцевые кюветы («*Helma*» 100 QS, Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Концентрацию ДОКС в аналитических пробах, приготовленных на основе тестовых лабораторных растворов ДОКС или ДОКС-содержащих проб плазмы крови, определяли при помощи экспериментального образца компактного двухволнового дихрометра, в котором в качестве источников света впервые использованы светодиоды высокой яркости оптического излучения, приспособленного для работы с биодатчиком на основе частиц ХЖКД ДНК (разработка Института спектроскопии РАН, г. Москва, г. Троицк) [8].

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Спектры поглощения ДОКС в водно-солевых растворах с разным значением pH

На рисунке 2, А сопоставлены спектры поглощения ДОКС в водно-солевых растворах, имеющих разную кислотность (pH от 6,8 до 1,5). В этих условиях форма спектра поглощения практически не меняется, что свидетельствует о сохране-

нии исходной структуры молекул ДОКС. На рисунке 2, Б приведены спектры поглощения ДОКС в водно-солевых растворах, имеющих разную щелочность (pH от 6,8 до 11,5). Видно, что, начиная с растворов, имеющих pH 8,4, форма спектров поглощения резко меняется, что указывает на изменение свойств ДОКС (ионизацию молекул антибиотика).

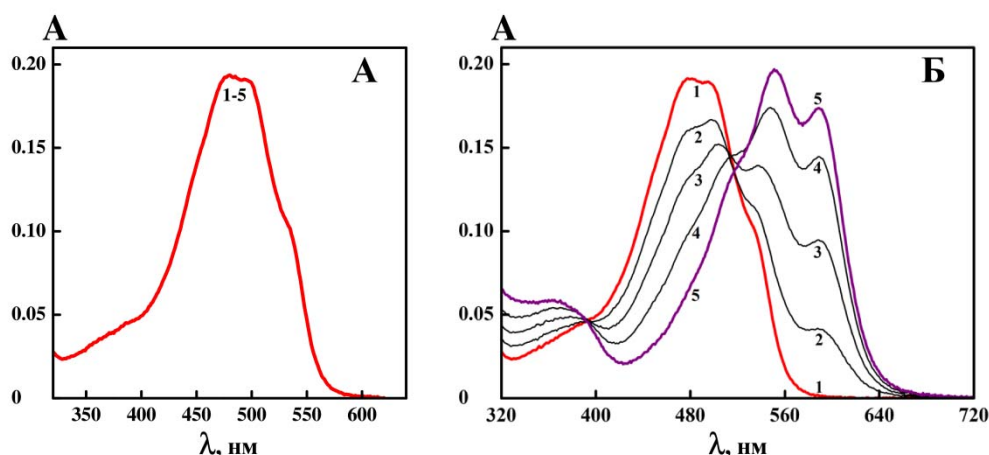


Рис. 2. Спектры поглощения ДОКС при разных значениях pH раствора (А: pH 6,8–1,5; Б: pH 6,8–11,5).

А: 1 – pH ~ 6,8; 2 – pH ~ 5,1; 3 – pH ~ 3,1; 4 – pH ~ 2,3; 5 – pH ~ 1,5.

Б: 1 – pH ~ 6,8; 2 – pH ~ 8,4; 3 – pH ~ 8,8; 4 – pH ~ 9,9; 5 – pH ~ 11,5.

$C_{\text{ДОКС}} = 1,65 \times 10^{-5}$ М, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер

Fig. 2. The absorption spectra of DOX at different pH values of the solution (А: pH 6,8–1,5; Б: pH 6,8–11,5).

А. 1 – pH ~ 6,8; 2 – pH ~ 5,1; 3 – pH ~ 3,1; 4 – pH ~ 2,3; 5 – pH ~ 1,5.

В. 1 – pH ~ 6,8; 2 – pH ~ 8,4; 3 – pH ~ 8,8; 4 – pH ~ 9,9; 5 – pH ~ 11,5.

$C_{\text{DOX}} = 1,65 \times 10^{-5}$ М, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -phosphate buffer

Таким образом, свойства молекул ДОКС остаются неизменными в кислых растворах или растворах, имеющих значения pH, близкие к нейтральным. В этих условиях была определена эффективность взаимодействия ДОКС с молекулами двухцепочечной ДНК.

3.2. Взаимодействие ДОКС с молекулами двухцепочечной ДНК в водно-солевых растворах с разным значением pH

На рисунке 3, А в качестве примера показано изменение спектра поглощения ДОКС при его титровании раствором ДНК (pH ~ 6,8). Добавление

ДНК приводит к нескольким оптическим эффектам. Во-первых, амплитуда основной полосы поглощения ДОКС (длина волны 495 нм; кривая 1) уменьшается (кривые 2–8). Во-вторых, на длине волны 544 нм появляется хорошо выраженная изобестическая точка. Согласно общепринятой точке зрения такие оптические эффекты указывают на встраивание (интеркаляцию) молекул ДОКС между парами оснований ДНК. При этом титрование ДОКС раствором ДНК при pH ~ 3,0 (рис. 3, Б) не оказывает заметного влияния на характер образования интеркаляционных комплексов (ДОКС-ДНК).

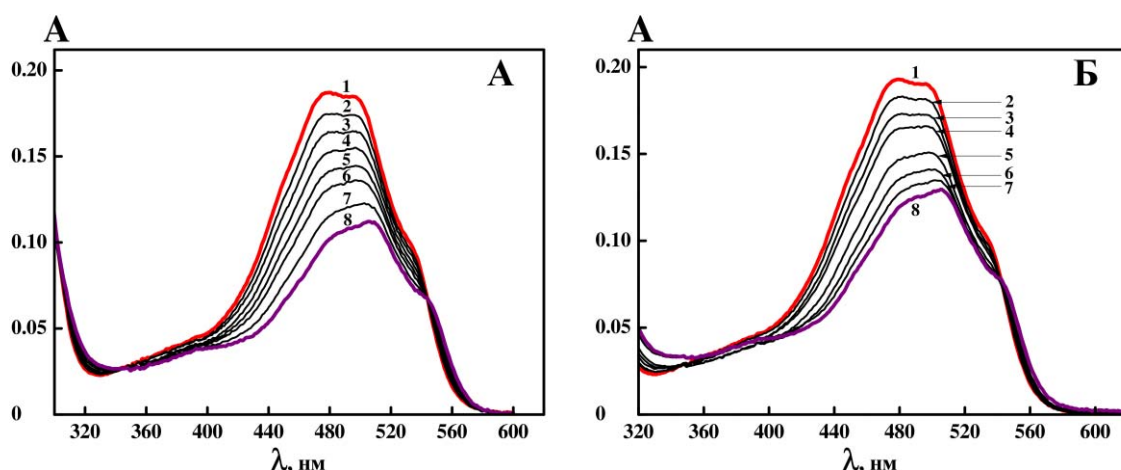


Рис. 3. Формирование комплекса (ДОКС–ДНК) в водно-солевых растворах с разным значением pH (А – pH ~ 6,8; Б – pH ~ 3,0):

А. 1 – $C_{\text{ДНК}} = 0$, 2 – $C_{\text{ДНК}} = 4,98 \text{ мкг мл}^{-1}$, 3 – $C_{\text{ДНК}} = 9,9 \text{ мкг мл}^{-1}$,
4 – $C_{\text{ДНК}} = 14,78 \text{ мкг мл}^{-1}$, 5 – $C_{\text{ДНК}} = 19,61 \text{ мкг мл}^{-1}$, 6 – $C_{\text{ДНК}} = 24,39 \text{ мкг мл}^{-1}$,
7 – $C_{\text{ДНК}} = 33,82 \text{ мкг мл}^{-1}$, 8 – $C_{\text{ДНК}} = 52,13 \text{ мкг мл}^{-1}$,
 $C_{\text{ДОКС}} = 1,61 \times 10^{-5} \text{ М}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер.
Б. 1 – $C_{\text{ДНК}} = 0$, 2 – $C_{\text{ДНК}} = 5,74 \text{ мкг мл}^{-1}$, 3 – $C_{\text{ДНК}} = 11,48 \text{ мкг мл}^{-1}$,
4 – $C_{\text{ДНК}} = 17,2 \text{ мкг мл}^{-1}$, 5 – $C_{\text{ДНК}} = 28,61 \text{ мкг мл}^{-1}$, 6 – $C_{\text{ДНК}} = 39,97 \text{ мкг мл}^{-1}$,
7 – $C_{\text{ДНК}} = 56,93 \text{ мкг мл}^{-1}$, 8 – $C_{\text{ДНК}} = 84,98 \text{ мкг мл}^{-1}$,
 $C_{\text{ДОКС}} = 1,64 \times 10^{-5} \text{ М}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер

Fig. 3. Complex formation (DOX–DNA) in water-salt solutions with different pH values (A – pH ~ 6,8; B – pH ~ 3,0):

A. 1 – $C_{\text{DNA}} = 0$, 2 – $C_{\text{DNA}} = 4,98 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$, 3 – $C_{\text{DNA}} = 9,9 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$,
4 – $C_{\text{DNA}} = 14,78 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$; 5 – $C_{\text{DNA}} = 19,61 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$; 6 – $C_{\text{DNA}} = 24,39 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$,
7 – $C_{\text{DNA}} = 33,82 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$, 8 – $C_{\text{DNA}} = 52,13 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$,
 $C_{\text{DOX}} = 1,61 \times 10^{-5} \text{ М}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -phosphate buffer.
B. 1 – $C_{\text{DNA}} = 0$, 2 – $C_{\text{DNA}} = 5,74 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$, 3 – $C_{\text{DNA}} = 11,48 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$,
4 – $C_{\text{DNA}} = 17,2 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$; 5 – $C_{\text{DNA}} = 28,61 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$; 6 – $C_{\text{DNA}} = 39,97 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$,
7 – $C_{\text{DNA}} = 56,93 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$, 8 – $C_{\text{DNA}} = 84,98 \text{ } \mu\text{г мл}^{-1}$,
 $C_{\text{DOX}} = 1,64 \times 10^{-5} \text{ М}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -phosphate buffer

3.3. Влияние ионной силы растворов на эффективность образования интеркаляционных комплексов (ДОКС–ДНК)

На рисунке 4 приведены зависимости изменения амплитуды полосы в спектре поглощения ДОКС на длине волны 495 нм от концентрации

ДНК в растворах с разной ионной силой. Сопоставление кривых, приведенных на рис. 4, показывает, что изменение ионной силы раствора (в пределах от 0,15 до 0,6) не оказывает значительного влияния на характер взаимодействия ДОКС с молекулами ДНК.

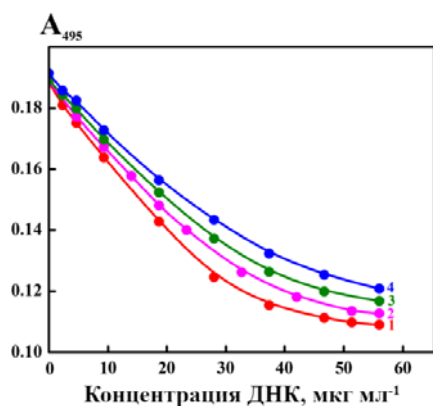


Рис. 4. Зависимость амплитуды полосы в спектре поглощения ДОКС на длине волны 495 нм от концентрации ДНК в растворах с разной концентрацией NaCl:

1 – 0,15 М NaCl, 2 – 0,3 М NaCl, 3 – 0,45 М NaCl, 4 – 0,6 М NaCl, $C_{\text{ДОКС}} \sim 1,65 \times 10^{-5}$ М

Fig. 4. The dependence of the band amplitude on the DNA concentration in the absorption spectrum of DOX at $\lambda = 495$ nm in solutions of different NaCl concentrations.

1 – 0,15 М NaCl, 2 – 0,3 М NaCl, 3 – 0,45 М NaCl, 4 – 0,6 М NaCl, $C_{\text{DOX}} \sim 1,65 \times 10^{-5}$ М

3.4. Влияние ПЭГ на эффективность образования комплексов (ДОКС-ДНК)

Поскольку формирование ХЖКД происходит в результате фазового исключения молекул ДНК из водно-солевых растворов ПЭГ, определено

влияние концентрации ПЭГ на эффективность образования комплексов (ДОКС-ДНК).

Амплитуда основной полосы поглощения растворов ДОКС ($\lambda = 495$ нм), содержащих переменную концентрацию ПЭГ (от 170 до 300 мг мл⁻¹), практически не меняется при их обработке ДНК (рис. 5, А).

Это означает, что увеличение осмотического давления раствора практически не оказывает заметного влияния на эффективность образования интеркаляционных комплексов (ДОКС-ДНК).

3.5. Образование интеркаляционных комплексов (ДОКС-ДНК) в водно-солевом растворе в присутствии плазмы крови человека

На рисунке 5, Б обобщены данные, характеризующие эффективность взаимодействия ДОКС с ДНК в растворах, содержащих разную концентрацию плазмы крови человека. Этот рисунок показывает, что наличие плазмы крови в водно-солевом растворе не оказывает существенного влияния на характер связывания ДОКС с молекулами ДНК.

Таким образом, данные, приведенные в п. 3.2.–3.5, позволили определить фундаментальные условия образования интеркаляционных комплексов (ДОКС-ДНК) в разных средах. С учетом полученных результатов были изучены особенности спектров КД ХЖКД ДНК, обработанной ДОКС.

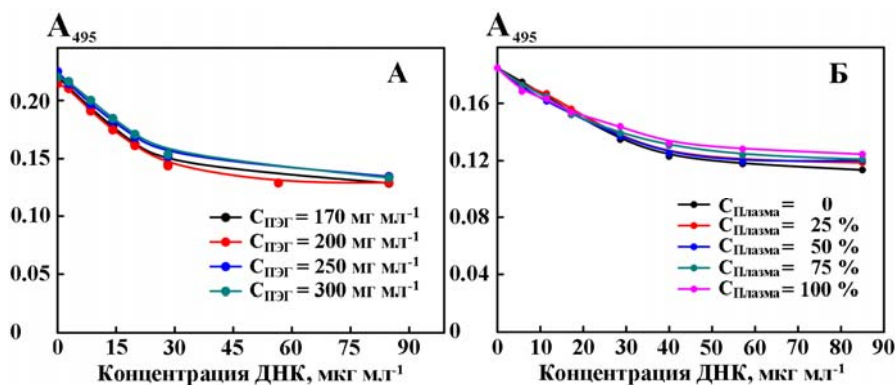


Рис. 5. Зависимость амплитуды полосы в спектре поглощения ДОКС на длине волны 495 нм от концентрации ДНК в растворах с разной концентрацией ПЭГ (А) (170, 200, 250 и 300 мг мл⁻¹), $C_{\text{ДОКС}} \sim 1,912 \times 10^{-5}$ М, 0,01 М Na⁺-фосфатный буфер; Б – с разной концентрацией плазмы крови (0, 25, 50, 75 и 100 %), $C_{\text{ДОКС}} \sim 1,6 \times 10^{-5}$ М, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na⁺-фосфатный буфер

Fig. 5. The dependence of the band amplitude on the DNA concentration in the absorption spectrum of DOX at $\lambda = 495$ nm in solutions with different PEG (А) concentrations (170, 200, 250 and 300 mg ml⁻¹),

$C_{\text{DOX}} \sim 1,912 \times 10^{-5}$ М, 0,01 М Na⁺-phosphate buffer; Б – with different concentrations of blood plasma (0, 25, 50, 75 and 100 %), $C_{\text{DOX}} \sim 1,6 \times 10^{-5}$ М, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na⁺-phosphate buffer

3.6. Спектры КД ХЖКД ДНК, обработанной ДОКС

Экспериментально измеренные спектры КД ХЖКД ДНК, обработанной ДОКС (рис. 6, кривые 2–5), содержат две аномальные полосы, имеющие отрицательные знаки.

Первая полоса расположена в УФ-области спектра КД в области поглощения азотистых оснований ДНК ($\lambda_{\max} \sim 270$ нм), а вторая – в видимой

области спектра КД в области поглощения хромофоров ДОКС ($\lambda_{\max} \sim 505$ нм). Совпадение знаков аномальных полос, расположенных в разных областях спектра КД, означает, что молекулы ДОКС встраиваются (интеркалируют) между парами оснований ДНК, причем угол наклона ДОКС по отношению к длинной оси молекулы ДНК составляет $\sim 90^\circ$ [15].

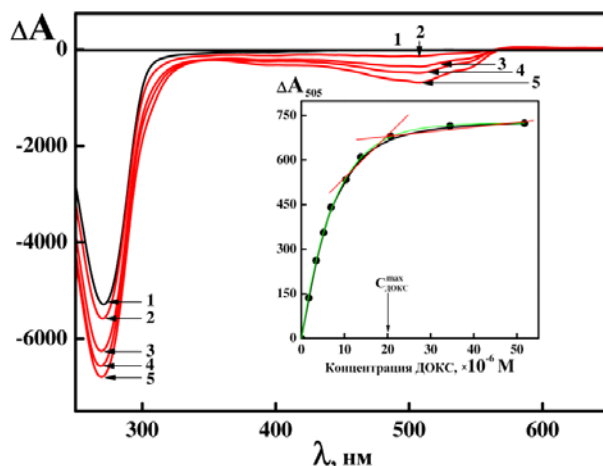


Рис. 6. Спектры КД исходной ХЖКД ДНК (кривая 1) и этой же дисперсии, обработанной разными концентрациями ДОКС (кривые 2–5):

1 – $C_{\text{ДОКС}} = 0$, 2 – $C_{\text{ДОКС}} = 1,73 \times 10^{-6}$ М, 3 – $C_{\text{ДОКС}} = 5,73 \times 10^{-6}$ М, 4 – $C_{\text{ДОКС}} = 10,35 \times 10^{-6}$ М, 5 – $C_{\text{ДОКС}} = 34,5 \times 10^{-6}$ М.
 $C_{\text{ДНК}} = 10$ мкг мл $^{-1}$, $C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг мл $^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -фосфатный буфер,
 $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1$ см, $T = 22$ °С.

Вставка: Экспериментальная зависимость (черная кривая) амплитуды полосы в спектрах КД ХЖКД ДНК на длине волны 505 нм (ΔA_{505}) от концентрации ДОКС и полученная на ее основе калибровочная кривая (обозначена зеленым цветом). Калибровочная кривая представляет собой экспоненциальную зависимость величины ΔA_{505} от $C_{\text{ДОКС}}$, которая описывается уравнением $\Delta A_{505} = A_1 \times \exp(-C_{\text{ДОКС}}/t_1) + y_0$, где: $A_1 = -730,04761$, $t_1 = 7,54896$, $y_0 = 724,98204$. Стрелкой обозначена максимальная концентрация ДОКС, определяемая при помощи проведенной калибровки

Fig. 6. The CD spectra of the initial DNA CLCD (curve 1) and the same dispersion treated with different DOX concentrations (curves 2–5):

1 – $C_{\text{DOX}} = 0$, 2 – $C_{\text{DOX}} = 1,73 \times 10^{-6}$ М, 3 – $C_{\text{DOX}} = 5,73 \times 10^{-6}$ М, 4 – $C_{\text{DOX}} = 10,35 \times 10^{-6}$ М, 5 – $C_{\text{DOX}} = 34,5 \times 10^{-6}$ М.
 $C_{\text{DNA}} = 10$ $\mu\text{g ml}^{-1}$, $C_{\text{PEG}} = 170$ mg ml $^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -phosphate buffer,
 $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ optical units, $L = 1$ cm, $T = 22$ °C.

Insert: Experimental dependence (black curve) of the band amplitude in the CD spectra of DNA CLCD at $\lambda = 505$ nm (ΔA_{505}) on the DOX concentration and the calibration curve obtained on its basis (green curve). The calibration curve represents the exponential dependence of ΔA_{505} vs C_{DOX} , which is described by the equation $\Delta A_{505} = A_1 \exp(-C_{\text{DOX}}/t_1) + y_0$, where: $A_1 = -730,04761$, $t_1 = 7,54896$, $y_0 = 724,98204$. The arrow indicates the maximum concentration of DOX, determined by the calibration.

Амплитуда аномальной полосы в области поглощения ДОКС растет по мере увеличения степени его связывания с ДНК, тогда как полоса в области поглощения ДНК остается практически неизменной, что указывает на малую степень возмущения вторичной структуры ДНК при связывании с ДОКС. Зависимость амплитуды отрицатель-

ной полосы в спектре КД ХЖКД ДНК на длине волны 505 нм от концентрации добавленного в раствор ДОКС (вставка на рис. 6, черная кривая) представляет собой по существу калибровочную кривую (вставка на рис. 6, зеленая кривая) для определения концентрации ДОКС в растворе.

Получено уравнение, описывающее калибровочную кривую, а также численные значения входящих в него параметров.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, согласно которому аномальная полоса в спектре КД, расположенная в области поглощения хромофоров ДНК ($\lambda \sim 270$ нм), выступает в качестве удобного, легко детектируемого критерия, позволяющего отслеживать эффективность формирования и «качество» частиц ХЖКД ДНК. При этом интеркаляция молекул ДОКС между парами оснований молекул ДНК, упорядоченных в структуре частиц ХЖКД ДНК, сопровождается появлением дополнительной аномальной полосы в спектре КД, расположенной в видимой области спектра (в которой влияние «осложняющих» факторов на ее форму и амплитуду является минимальным). Амплитуда этой полосы зависит от концентрации ДОКС, что открывает принципиальную возможность для использования частиц ХЖКД ДНК в качестве чувствительных элементов (биодатчика) аналитической тест-системы, ориентированной на установление наличия ДОКС и определение его концентрации в диапазоне от $0,5 \times 10^{-6}$ до 20×10^{-6} М (вставка на рис. 6).

3.7. Определение концентрации ДОКС в тестовых растворах и плазме крови

Для определения концентрации ДОКС в тестовых растворах и плазме крови использовали экспериментальный образец портативного дихрометра, который отличается от всех предыдущих версий дихрометров, работающих с использованием биодатчиков на основе жидкокристаллических структур ДНК, тем, что он регистрирует сигнал аномального кругового дихроизма только на двух дискретных длинах волн, специфических для биодатчика на основе частиц ХЖКД ДНК и соответствующих расположению основной аномальной полосы в спектре КД биодатчика (на длине волны 270 нм) и дополнительной аномальной полосы в области поглощения хромофоров ДОКС (на длине волны 505 нм).

На рисунке 7 в качестве примера показан вид бланка анализа, содержащего информацию о дате и месте его проведения, а также о производителе препарата ДОКС и его содержании в аналитической пробе и исходном растворе (или плазме крови).

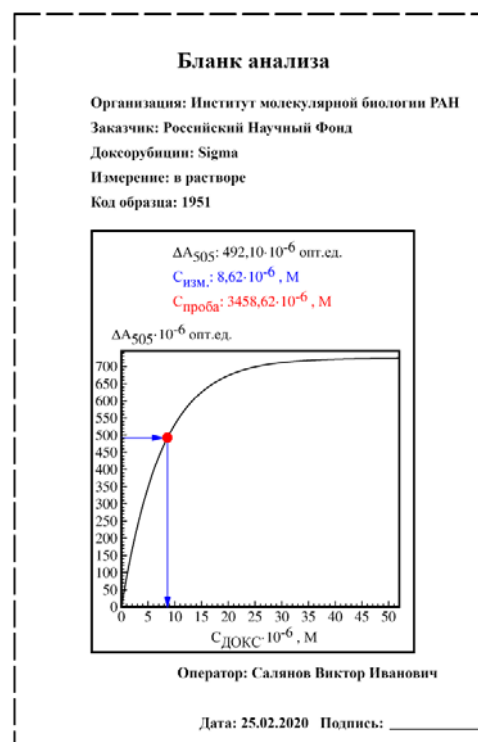


Рис. 7. Внешний вид бланка с результатами анализа. Стрелками на рисунке показан способ определения концентрации ДОКС в аналитической пробе

Fig. 7. Analysis template form. The arrows show a method for determination of DOX concentration in an analytical probe

Кроме того, на бланке присутствует калибровочная кривая, на которой «красной» точкой указано экспериментально полученное значение величины ΔA_{505} , использованное для определения концентрации ДОКС в аналитической пробе.

На рисунке 8 представлены результаты экспериментов, выполненных при помощи портативного двухволнового дихрометра по оценке точности и воспроизводимости измерений концентрации ДОКС в тестовых растворах с известной концентрацией антибиотика в трех сериях опытов (обозначены черными, синими и красными точками). Полученные данные свидетельствуют о том, что погрешность измерения концентрации ДОКС в аналитической пробе, представляющая собой отклонение экспериментально измеренных концентраций антибиотика от их номинальных (расчетных) значений, составляет $\pm 10\%$.

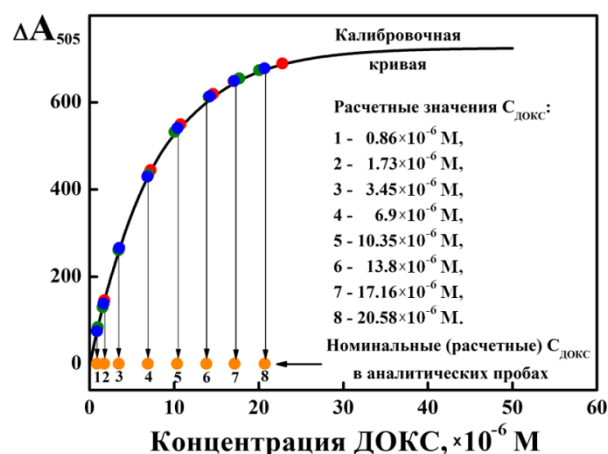


Рис. 8. Воспроизводимость определения концентрации ДОКС в аналитических пробах в автоматическом режиме: $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкг мл}^{-1}$, $C_{\text{ПЭГ}} = 170 \text{ мг мл}^{-1}$, $0,3 \text{ М NaCl} + 0,002 \text{ М Na}^+$ -фосфатный буфер, $\Delta A_{505} \times 10^{-6}$ оптич. ед., $L = 1 \text{ см}$, $T = 22^\circ \text{C}$

Fig. 8. The reproducibility of DOX concentration determination in analytical probes in automatic mode.

$C_{\text{DNA}} = 10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, $C_{\text{PEG}} = 170 \text{ mg ml}^{-1}$, $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+$ -phosphate buffer, $\Delta A_{505} \times 10^{-6}$ optical units, $L = 1 \text{ cm}$, $T = 22^\circ \text{C}$

При помощи этой же тест-системы была проведена также серия экспериментов по определению концентрации ДОКС в образцах плазмы крови человека, приготовленных *in vitro* и прошедших предварительную пробоподготовку в соответствии с методикой, описанной в разделе «Эксперимент».

В ходе пробоподготовки было установлено, что молекулы ДОКС практически не образуют комплексов с компонентами плазмы крови, несовместимыми с раствором ПЭГ, и, как следствие этого, не осаждаются при центрифугировании. На основании полученных данных был сделан важный вывод, согласно которому для определения концентрации ДОКС в аналитических пробах, приготовленных на основе ДОКС-содержащих образцов плазмы крови, можно использовать калибровочную кривую, полученную с использованием растворов ДОКС с известной концентрацией антибиотика (вставка на рис. 6). Проведенные испытания показали (в качестве примера, см. таблицу), что погрешность определения концентрации ДОКС в аналитических пробах плазмы крови также находится в пределах допустимых значений.

Таблица. Оптический сигнал, генерируемый биодатчиком на основе частиц ХЖКД ДНК на длине волны 505 нм ($\Delta A_{505}^{\text{изм.}}$) после взаимодействия с ДОКС (колонка 2), и соответствующая ему концентрация антибиотика (колонка 3), определенная в автоматическом режиме при помощи калибровочной кривой (см. вставку на рис. 6).

(Оптический сигнал, генерируемый биодатчиком на длине волны 270 нм, составляет $-4598,65 \times 10^{-6}$ оптич. ед.)

Table. The optical signal generated by the biosensing unit based on DNA CLCD particles at a wavelength of 505 nm after interacting with DOX (column 2) and the corresponding antibiotic concentration (column 3) determined automatically using calibration curve (see insert in fig. 6).

(The optical signal generated by the biosensor at a wavelength of 270 nm, is $-4598,65 \times 10^{-6}$ optical units)

№ аналитической пробы	Номинальное (расчетное) значение концентрации ДОКС в аналитических пробах равно $0,415 \times 10^{-6} \text{ М}$		
	$\Delta A_{505}^{\text{изм.}}$, оптич. ед.	$C_{\text{ДОКС}}^{\text{изм.}}$, М	Отклонение $C_{\text{ДОКС}}^{\text{изм.}}$ от $C_{\text{ДОКС}}^{\text{расчет.}}$, %
1	2	3	4
1	$32,98 \times 10^{-6}$	$0,404 \times 10^{-6}$	-2,65
2	$34,53 \times 10^{-6}$	$0,421 \times 10^{-6}$	1,45
3	$32,06 \times 10^{-6}$	$0,394 \times 10^{-6}$	-5,06
4	$32,79 \times 10^{-6}$	$0,402 \times 10^{-6}$	-3,13
5	$32,79 \times 10^{-6}$	$0,402 \times 10^{-6}$	-3,13
6	$36,09 \times 10^{-6}$	$0,438 \times 10^{-6}$	5,54
7	$32,24 \times 10^{-6}$	$0,396 \times 10^{-6}$	-4,58
8	$34,53 \times 10^{-6}$	$0,421 \times 10^{-6}$	1,45

Следовательно, тест-система, включающая биодатчик на основе частиц ХЖКД ДНК и портативный двухволновой дихрометр, позволяет не только измерять концентрацию ДОКС в лабораторных растворах с известной концентрацией антибиотика, но и успешно работает с аналитическими пробами, приготовленными на основе образцов ДОКС-содержащей плазмы крови. Это означает, что данная тест-система может быть использована для решения медицинских задач. Минимальная концентрация ДОКС, определяемая при помощи данного биоаналитического подхода, составляет $\sim 5 \times 10^{-7}$ М.

4. Выводы

На базе экспериментального образца портативного двухволнового дихрометра, приспособленного для работы с биодатчиком на основе частиц ХЖКД ДНК, создана биосенсорная тест-система. Данная тест-система предназначена для определения наличия и концентрации противоопухолевого антибиотика доксорубина в лабораторных растворах и плазме крови. Показано, что биосенсор позволяет измерять концентрацию антибиотика в аналитической пробе в интервале от $0,5 \times 10^{-6}$ до 20×10^{-6} М.

Данная тест-система может найти применение при решении задач практического здравоохранения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-00041-П; Евдокимов Ю. М., Скуридин Г. С., Саянов В. И.).

Список литературы / References

- Skuridin S.G., Yevdokimov Yu.M., Efimov V.S., Hall J.M., Turner A.P.F. A new approach for creating double-stranded DNA biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 1996, **11** (9), 903–911.
DOI: 10.1016/0956-5663(96)89439-5.
- Yevdokimov Yu.M. Double-stranded DNA liquid-crystalline dispersions as biosensing units. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, **28** (2), 77–81.
DOI: 10.1042/bst0280077.
- Евдокимов Ю. М., Саянов В. И., Скуридин С. Г. Наноструктуры и наноконструкции на основе ДНК М.: Сайнс-Пресс, 2010. 256 с. [Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Skuridin S.G. Nanostructures and nanoconstructions based on DNA. Moscow, Science-Press, 2010, 256 p. (in Russ.)].
- Евдокимов Ю. М., Скуридин С. Г., Саянов В. И., Семенов С. В., Сольев П. Н., Валуев-Эллистон В. Т., Верещагин Ф. В., Чулков Д. П., Компанец О. Н. Аномальная полоса в спектре кругового дихроизма холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК – аналитический критерий для обнаружения окрашенных биологически активных соединений // *Сенсорные системы*. 2016. Т. 30, № 3. С. 249–259. [Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I., Semenov S.V., Sol'yev P.N., Valuev-Elliston V.T., Vereshchagin F.V., Chulkov D.P., Kompanets O.N. Abnormal band in the circular dichroism spectrum of DNA cholesteric liquid-crystalline dispersions – an analytical criterion for detection of coloured biologically active compounds. *Sensory systems*, 2016, **30** (3), 249–259. (in Russ.)].
- Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Skuridin S.G., Semenov S.V., Kompanets O.N. The CD spectra of double-stranded DNA liquid crystalline dispersions. *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy* / Ed. by D.S. Rodgers. New York : Nova Science Publishers, 2012, chapter 1, 5–75.
- Семенов С. В., Евдокимов Ю. М. Круговой дихроизм частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК // *Биофизика*. 2015. Т. 60, № 2. С. 242–252. [Semenov S.V., Yevdokimov Yu.M. Circular dichroism of DNA liquid-crystalline dispersion particles. *Biophysics*, 2015, **60** (2), 242–252. (in Russ.).
DOI: 10.1134/S0006350915020177].
- Евдокимов Ю. М., Скуридин С. Г., Саянов В. И., Семенов С. В., Сольев П. Н., Валуев-Эллистон В. Т., Верещагин Ф. В., Чулков Д. П., Компанец О. Н. О возможности определения антрациклиновых антибиотиков в водных растворах при помощи оптической оптической аналитической системы (биосенсора) // *Оптика и спектроскопия*, 2017. Т. 122, № 2. С. 44–51. **DOI:** 10.7868/S003040341702009X. [Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I., Semenov S.V., Sol'yev P.N., Valuev-Elliston V.T., Vereshchagin F.V., Chulkov D. P., Kompanets O.N. On the possibility of determining anthracycline antibiotics in aqueous solutions using optical analytical system (biosensor). *Optics and Spectroscopy*, 2017, **122** (2), 194–201. <https://link.springer.com/article/10.1134/S0030400X17020096> - citeas.
DOI: 10.1134/S0030400X17020096].
- Chulkov D.P., Gusev V.M., Kompanets O.N., Vereschagin F.V., Skuridin S.G., Yevdokimov Yu.M. A compact two-wave dichrometer of an optical biosensor analytical system for medicine. *EPJ Web of Conferences*, 2017, **132**, article number 03050.
DOI: 10.1051/epjconf/201713203050.
- Shi W., Deng H., Zhang J. Zhang Y., Zhang X., Cui G. Mitochondria-targeting small molecules effectively prevent cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Molecules*, 2018, **23** (6), pii: E1486.
DOI: 10.3390/molecules23061486.

10. Marques-Aleixo I., Santos-Alves E., Oliveira P.J., Moreira P.I., Magalhães J., Ascensão A. The beneficial role of exercise in mitigating doxorubicin-induced mitochondrionopathy. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 2018, **1869** (2), 189–199. **DOI:** 10.1016/j.bbcan.2018.01.002.
11. Airolidi M., Barone G., Gennaro G., Giuliani A.-M., Giustini M. Interaction of doxorubicin with polynucleotides. A spectroscopic study. *Biochemistry*, 2014, **53** (13), 2197–2207. **DOI:** 10.1021/bi401687v.
12. Fiallo M.M., Tayeb H., Suarato A., Garnier-Suillerot A. Circular dichroism studies on anthracycline antitumor compounds. Relationship between the molecular structure and the spectroscopic data. *J. Pharm. Sci.*, 1998, **87** (8), 967–975. **DOI:** 10.1021/js970436l.
13. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Semenov S.V., Skuridin S.G. DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanoconstructions. Boca Raton, London, New York : CRC Press (Taylor & Francis Group), 2012, 258 p.
14. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Skuridin S.G., Semenov S.V., Kompanets O.N. The CD Spectra of Double-Stranded DNA Liquid Crystalline Dispersions. New York : Nova Science Publisher, 2011, 103 p.
15. Евдокимов Ю. М., Сальянов В. И., Семенов С. В., Скуридин С. Г. Жидкокристаллические фазы и дисперсии ДНК: образование и свойства / под ред. Ю. М. Евдокимова. М. : Радиотехника, 2020. 416 с. [Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Semenov S.V., Skuridin S.G. The liquid-crystalline DNA phases and dispersions: formation and properties / ed. by Yu.M. Yevdokimov. Moscow : Radiotekhnika, 2020, 416 p. (in Russ.). **DOI:** 10.18127/B9785931081991].

Поступила 18.07.2020 г.

Received 18.07.2020

Принята 26.08.2020 г.

Accepted 26.08.2020