

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ БИМОЛЕКУЛ: ОБОСНОВАННЫЙ ВЫБОР СЕНСОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

©2021 г. В. В. ШУМЯНЦЕВА^{1,2*},
Л. Е. АГАФОНОВА¹, Т. В. БУЛКО¹, А. В. КУЗИКОВ^{1,2},
Р. А. МАСАМРЕХ^{1,2}, Д. ЯН³, Д. В. ПЕРГУШОВ⁴,
Л. В. СИГОЛАЕВА^{1,4}

¹ *Лаборатория биоэлектрохимии, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва*

² *Кафедра биохимии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва*

³ *Department of Materials and Environmental Chemistry, Stockholm University, Stockholm, Sweden*

⁴ *Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Электроанализ миоглобина с использованием полимерных наноконпозиций для модификации электродов. III. Модификация электродов дисперсиями MWCNT в растворах полиионных жидкостей и различных катионных диблок-сополимеров для анализа ДНК. IV. Модификация электродов MWCNT в водных растворах анионных диблок-сополимеров для анализа цитохрома с. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Успехи современной биологической химии, в первую очередь, отражают выяснение тонких механизмов метаболических путей патологических процессов, специфических маркеров и их количественной сравнительной идентификации для состояний норма/патология. Разработаны различные методы и подходы анализа биомолекул

Принятые сокращения: Mb – миоглобин; MWCNT – многостенные углеродные нанотрубки; SPE – печатный графитовый электрод; дцДНК – двухцепочечная ДНК; PIL – полиионные жидкости; ДИВА – метод дифференциально-импульсной вольтамперометрии; LOD – предел обнаружения; Tyr – тирозин; Trp – триптофан.

* *Адрес для корреспонденции:* viktorija.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук. Модификаторы электродных поверхностей на основе полимерных наноконпозиций получены в рамках проекта РНФ № 18-44-04011.

для диагностики заболеваний, взаимодействий с молекулярными мишенями. Методы визуализации (имиджинга), атомная силовая спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия, спектральные методы, методы с использованием флуорогенных компонентов, масс-спектрометрия как макромолекул (например, исследование протеома), так и низкомолекулярных соединений (метаболом) активно входят в арсенал современной трансляционной диагностической медицины как представители нанотехнологий, так и омиксных подходов [1–4]. Электрохимические методы в биохимических и биомедицинских исследованиях активно развиваются благодаря продуктивному взаимному влиянию нанотехнологий, наноматериалов, методов получения и обработки результатов электроанализа [5]. Преимуществом электрохимических методов является количественное определение электроактивного биокомпонента на основе применения фундаментальных законов электрохимии, при этом измерительные устройства могут быть как стационарными для проведения фундаментальных исследований, так и портативными для проведения анализов в клинических лабораториях. Регистрируя зависимость силы тока, протекающего через индикаторный электрод, находящийся в контакте с электроактивным веществом, от разности потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения, можно получить данные о концентрации электроактивного вещества, кинетике и термодинамике электрохимической реакции [6]. Для эффективного электрохимического процесса, связанного с транспортом электронов, и/или реализации электрокатализа важную роль играет тип электрода и модификация электрода для иммобилизации биомолекулы. Немодифицированные электроды не всегда достаточно эффективны. В качестве модификаторов могут быть использованы различные материалы: полимеры, гели, природные биомолекулы, металлы и их оксиды. В последние годы широкое распространение получили наноразмерные структуры, в том числе коллоидные растворы золота, серебра (наночастицы металлов), оксидов железа, одностенные и многостенные углеродные нанотрубки, графен, оксид графена, графен, допированный бором, азотом, серой, липиды, синтетические мембраноподобные вещества, полимерные композиции [6–13]. Наночастицы могут служить катализаторами реакций, протекающих на поверхности электрода. Модификация поверхности (наноструктурирование) электродов позволяет подобрать оптимальные условия, подстроить сенсор под выбранную электрохимическую реакцию, определяемое вещество, а также обеспечить необходимые аналитические характеристики метода, такие как

биосовместимость, предел обнаружения, селективность, диапазон определяемых концентраций аналита и т.д.

Выбор типа модификации рабочей поверхности электрода часто проводят эмпирически на основании перебора комбинаций и концентраций компонентов. В данном обзоре мы описали подход к тому или иному типу модификации, основанный на свойствах, в первую очередь, биомолекул, а также модификатора как непосредственного участника и/или посредника между редокс-центром биомолекулы и электродом. В обзоре рассмотрены методы электроанализа функционально значимых гемопротеинов: переносчика кислорода в мышцах миоглобина и переносчика электронов цитохрома *c*, а также олигонуклеотидов и двухцепочечной ДНК (дцДНК).

Гемопротеины играют важную роль в биохимических процессах, таких как перенос и хранение молекулярного кислорода гемоглобином и миоглобином, перенос электронов с респираторных субстратов цитохромами и терминальное окисление O_2 цитохром *c* оксидазой, разложение пероксида водорода каталазой, окисление органических веществ пероксидазой, метаболическое превращение лекарств и ксенобиотиков ферментами фазы I цитохромами P450, синтез оксида азота из L-Arg с помощью NO-синтазы, использование активных форм кислорода каталазой. Эти различные функции в первую очередь основаны на окислительно-восстановительных свойствах иона железа гема по схеме $Fe(III) + e^- \leftrightarrow Fe(II)$ [14, 15]. Эффект прямого переноса электрона с электрода на ион железа гема широко используется при создании электрохимических сенсоров на пероксид водорода и нитрит-ион. Кардиомиоглобин и цитохром *c* служат маркерами острого инфаркта миокарда [15–17]. Цитохром *c* является важным гемсодержащим металлопротеином, который расположен в цитозоле между внутренней и внешней мембранами митохондрий. Цитохром *c* относится к классу первого семейства цитохромов *c*-типа, выполняет различные функции в зависимости от его клеточной локализации и условий, в которых он функционирует. Он опосредует перенос электронов между комплексами III и IV дыхательной цепи [18, 19]. Помимо того, высвобождение цитохрома *c* из митохондрий является сигналом для начала апоптотического процесса. Обнаружение цитохрома *c* во внеклеточном пространстве может быть использовано в клинической диагностике таких патологий как острый инфаркт миокарда, красная волчанка, ревматоидный артрит, онкологические заболевания. Цитохром *c* используется в качестве биомаркера для идентификации повреждения митохондрий, приводящего к гибели клеток. Проапоптотические свойства цитохрома *c* могут применяться

для развития методов диагностики, при поиске новых лекарственных препаратов, обладающих способностью вызывать гибель патологических клеток, а также для оценки эффективности применяемых лекарственных препаратов. Разработка современных, экспрессных, доступных методов для определения количественных характеристик цитохрома *c* с помощью электрохимических биосенсоров, является актуальной задачей биоаналитической химии [20].

Нуклеотиды, олигонуклеотиды, ДНК и РНК рассматриваются как маркеры многих патологических состояний. Наличие мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК, а также в РНК или микроРНК и их количество могут служить диагностическими биомаркерами различных онкологических заболеваний, прогностическими маркерами для анализа реакции на лечение и/или как маркеры прогрессирования заболевания [21–29]. Изменение длины ДНК (фрагментация ДНК) является одним из признанных маркеров запрограммированной гибели клеток (апоптоза) [24]. Анализ модифицированных гетероциклических оснований (например, профилей метилирования) важен для эпигенетических исследований [24, 30–33], а также для обнаружения точечных мутаций [30].

Таким образом, разработка высокочувствительных электрохимических сенсоров для определения ДНК и функционально значимых гемопротеинов является актуальной задачей. В настоящей работе описаны модификации электродов, получаемых методом трафаретной печати (SPE) с рабочим графитовым электродом, полимерными наноконструкциями на основе многостенных углеродных нанотрубок (MWCNT) для усиления регистрации электрохимического сигнала биохимических процессов на поверхности электродов и повышения порога чувствительности в электроанализе различных биообъектов – олигонуклеотидов, дцДНК, миоглобина и цитохрома *c*.

Полимерные материалы обладают свойством диспергировать углеродные материалы и образовывать стабильные на коллоидном уровне дисперсии (MWCNT) в водных растворах. Кроме того, полимеры могут иметь в составе заряженные и гидрофобные сегменты различной длины. Такое свойство полимеров делает их привлекательными в роли модификаторов электродов для электрохимической регистрации биообъектов, также имеющими как гидрофобные домены, так и полярные участки, обогащенные положительными или отрицательными зарядами. Кроме того, широко используемые в электроанализе графитовые электроды имеют как гидрофобную составляющую, так и отрицательно заряженные карбоксильные группы, возникающие за счет окисления атома

углерода. Такие свойства полимеров, биообъектов и поверхности индикаторных электродов делает эту триаду как взаимозависимой, так и демонстрирует возможность управления эффективностью всей системы.

II. ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ МИОГЛОБИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОКОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ЭЛЕКТРОДОВ

Миоглобин (Mb) – гемопроtein (M = 16900 Да), основная функция которого – перенос кислорода в мышцах. Миоглобин является маркером патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, ранним маркером инфаркта миокарда [16]. Большинство исследователей считают концентрацию миоглобина в норме равной 100 нг/мл. Изoeлектрическая точка миоглобина $pI = 7$, при физиологических значениях pH этот белок не заряжен. Миоглобин является электроактивным белком, разработка методов детекции миоглобина основана на прямой регистрации сигнала восстановления железа гема ($Mb-Fe(III) + e^- \leftrightarrow Mb-Fe(II)$). Восстановленная форма миоглобина Mb-Fe(II) активно связывает кислород с соответствием со схемой $Mb-Fe(II) + O_2 \rightarrow [Mb-Fe(II)O_2]$, поэтому в аэробных условиях электроанализа регистрируется только восстановительный пик этого гемопроteина, который является отражением электрокаталитического процесса восстановления и усиливает сигнал регистрации этого белка. Вследствие функциональной значимости миоглобина разработаны различные модификаторы поверхности электрода: поверхностно-активные вещества (ПАВы), полимерные гидрогели, мембраноподобные комплексы полиэлектролитов с ПАВ, алюмосиликаты, фиброин шелка, липиды, углеродные нанотрубки, ионные жидкости, оксиды металлов [34]. Поверхностно-активные вещества и полимеры (додецилсульфат натрия, хитозан) также используются для улучшения диспергируемости MWCNT и повышения коллоидной стабильности дисперсий углеродных наноматериалов [35]. Эффективность прямого переноса электронов между электродом и ионом железа гема зависит от использованного электродного материала, модификации поверхности электрода и правильной ориентации активного белкового центра на электроде. Композитные наноматериалы улучшают перенос электронов, способствуют закреплению биологического материала на поверхности электрода, а также придают биосовместимость для сохранения природных, аффинных и каталитических свойств биомолекул. Модификация электродов MWCNT придает сенсорам ряд

полезных свойств, например, увеличенную площадь поверхности, улучшенную проводимость и широкой диапазон рабочих потенциалов [32, 36].

Ранее нами был отмечен синергический эффект MWCNT в сочетании с ионогенным амфифильным диблок-сополимером 1,2-полибутадиен-*блок*-полидиметиламиноэтилметакрилат (polycationic poly(1,2-butadiene)-*block*-poly(*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate) (PB₂₉₀-*b*-PDMAEMA₂₄₀)) для электрохимического детектирования миоглобина [35]. Было показано, что полимер PB₂₉₀-*b*-PDMAEMA₂₄₀ является эффективным биосовместимым материалом для встраивания Mb, что облегчает прямой перенос электронов с электрода на гемопротейн. Специфику связывания обеспечивают иммобилизованные на электроде антитела к кардиомиоглобину (рис. 1А). В водных растворах полимер образует мицеллы, которые при pH = 7 в фосфатном буфере проявляют хорошую адгезию к углеродным материалам и образуют однородные тонкие пленки на гидрофобной графитовой подложке. Такой тип поликатионного полимера может образовывать ионные связи с отрицательно заряженными группами молекулы миоглобина и взаимодействовать с карбоксильными группами рабочей поверхности графитового электрода, которые образуются за счет частичного окисления атомов углерода. Почти 3-х-кратное увеличение тока восстановления Mb достигается в матрице MWCNT (2 мг/мл)/PB₂₉₀-*b*-PDMAEMA₂₄₀ по сравнению с электродом, модифицированным только MWCNT, диспергированными в хлороформе (рис. 1Б).

В данной работе было использовано послойное нанесение модификаторов на поверхность рабочего электрода: 1 слой – дисперсия MWCNT в хлороформе, 2 слой – поликатионный полимер PB₂₉₀-*b*-PDMAEMA₂₄₀. Кроме того, необходимо отметить роль MWCNT: при возрастании концентрации с 0,5 мг/мл до 2 мг/мл амплитуда катодного тока ДИВА (DPV) возрастает в 1,4 раза. Чувствительность данной биосенсорной системы достаточна, чтобы охватить весь диапазон концентраций Mb, начиная с нормальной физиологической концентрации сердечного миоглобина человека (10–100 нг/мл; 0,56–5,6 нМ) до уровня Mb у пациентов с инфарктом миокарда (100–1780 нг/мл; 5,6–100 нМ) [37].

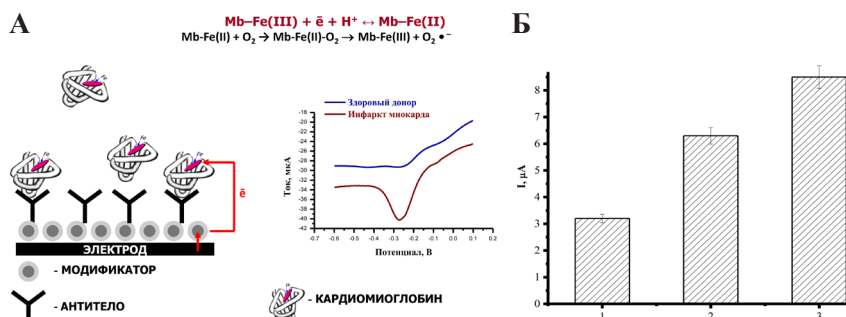


Рис. 1. (А) Схема электроанализа кардиомиоглобина с использованием модифицированных электродов с иммобилизованными антителами. (Б) Зависимость максимальной амплитуды тока дифференциально-импульсной вольтамперограммы (ДИВА) SPE/MWCNT/ Mb (1), SPE / MWCNT /PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀ (0,5 мг/мл)/Mb (2), SPE/MWCNT/PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀ (2,0 мг/мл) / Mb (3) в аэробном 100 мМ калий-фосфатном буфере, 50 мМ NaCl, pH 7,4. Условия ДИВА: скорость сканирования 50 мВ/с, амплитуда 20 мВ, шаг 5 мВ; частота 10 Гц.

III. МОДИФИКАЦИЯ ЭЛЕКТРОДОВ ДИСПЕРСИЯМИ MWCNT В РАСТВОРАХ ПОЛИИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ И РАЗЛИЧНЫХ КАТИОННЫХ ДИБЛОК-СОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ДНК

Нуклеотиды, олигонуклеотиды, ДНК, микроРНК, РНК известны как маркеры многих патологических состояний. ДНК трансплантата, циркулирующая у реципиентов трансплантата, была предложена в качестве потенциального биомаркера отторжения органа или повреждения клеточного трансплантата [28]. Уровень аденина и гуанина в плазме, сыворотке и моче, а также изменение концентрации аденина в ДНК можно рассматривать как индикатор карциномы или заболеваний печени [29]. Анализ циркулирующей опухолевой ДНК в плазме крови рассматривается как диагностический и прогностический метод в онкологии, получивший название «жидкая биопсия» [25, 38].

Для количественной регистрации ДНК, РНК, нуклеотидов, олигонуклеотидов разрабатываются методы электроанализа, основанные на электрохимической реакции электроокисления гетероциклических оснований [39–41].

Пиримидиновые гетероциклические основания тимин и цитозин электроокисляются при относительно высоких потенциалах (более 1,2–1,4 В), что затрудняет их регистрацию с помощью графитовых электродов, получаемых методом трафаретной печати. Пуриновые

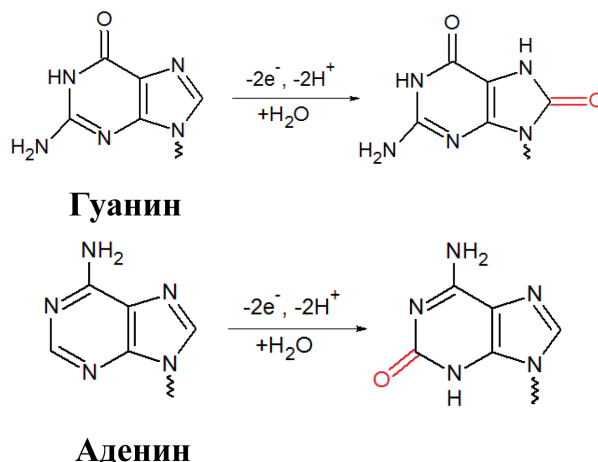


Рис. 2. Схема электрохимического окисления гуанина и аденина [31, 46].

гетероциклические основания аденин и гуанин электроокисляются при более низких значениях потенциалов (0,6–0,9 В). Разработаны различные подходы для регистрации пуриновых гетероциклических оснований ДНК, РНК, нуклеотидов, олигонуклеотидов [24, 33, 42–52].

Механизм электроокисления гуанина является необратимым процессом с участием двух протонов и двух электронов с образованием 8-оксогуанина. Это соединение является биомаркером разрыва и фрагментации ДНК за счет окислительного стресса [31, 46]. Механизм электроокисления аденина также представляет собой необратимый процесс и протекает в три стадии с участием двух электронов на первой стадии и образованием 2-оксоаденина, а также последующих двух стадий с участием дополнительных четырех электронов и образованием 2,8-диоксоаденина и его окисленной формы [31, 46] (рис. 2).

В наших исследованиях мы использовали свойства композиций на основе поликатионных полимеров, обладающих свойствами диспергировать углеродные наноматериалы в водных средах и взаимодействовать с полианионными молекулами ДНК [53, 54].

Для равномерного покрытия рабочего электрода требуется высокоомогенная дисперсия MWCNT с хорошей проводимостью и без (или, по крайней мере, с минимальным) структурным повреждением наноматериала. Однако получить такую дисперсию MWCNT довольно сложно из-за плохой диспергируемости таких углеродных наноматериалов в большинстве органических растворителей. Сильно деструктивная функционализация MWCNT путем жесткого окисления в

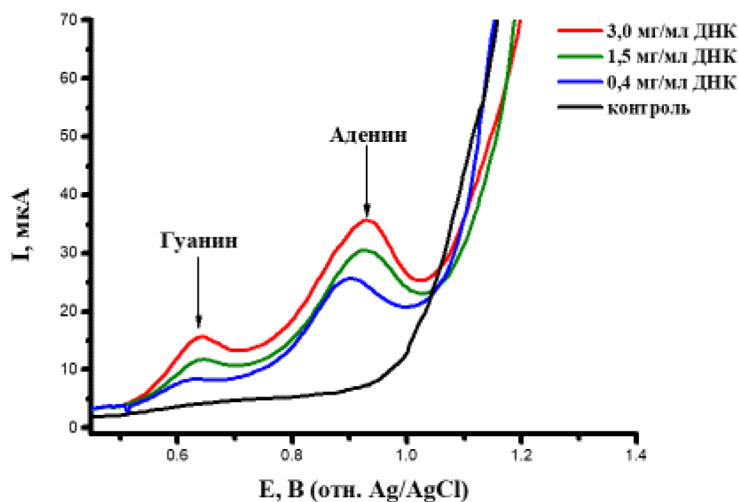


Рис. 3. Дифференциально-импульсная вольтамперограмма электродов, модифицированных MWCNT/PIL-Et, концентрация ДНК 0,4–3,0 мг/мл.

концентрированной смеси азотной и серной кислот в настоящее время заменяется более безопасной и мягкой ультразвуковой обработкой либо в воде, либо в водно-органических смесях или в органических растворителях (диметилформамид, ацетон, изопропанол, этанол, толуол, N-метил-2-пирролидон, циклодекстрины).

Полимерные материалы, несущие различные функциональные группы, могут быть использованы для иммобилизации биообъектов, отличающихся зарядом молекулы и значениями изоэлектрических точек. Для иммобилизации полианионных молекул дцДНК использовали поликатионные полимерные модификаторы, такие как полиионные жидкости на основе производных имидазола [53]. Для прямого электроанализа дцДНК на основе электроокисления гуанина и аденина были синтезированы полиионные жидкости (PIL) на основе производных имидазола, поли-1-этил-3-винилимидазолий бромид (PIL-Et) и поли-1-бутил-3-винилимидазолий бромид (PIL-But), и применены для модификации поверхности SPE высокостабильными дисперсиями MWCNT в их водных растворах [53]. На рис. 3 представлены сигналы ДИВА электродов, модифицированных MWCNT/PIL-Et, концентрация ДНК варьировалась в диапазоне 0,4–3,00 мг/мл [53].

Такая модификация SPE значительно увеличивает электроактив-

Таблица. Аналитические характеристики химически модифицированных электродов для анализа биообъектов

Биообъект	Тип электрода, модификация	Рабочие концентрации
дцДНК	SPE/PIL/MWCNT	5–500 мкг/мл (пик гуанина (G), E = +0,60 ± 0,01 В 0,5–50 мкг/мл (пик аденина (A), E = +0,85 ± 0,01 В
дцДНК	SPE/PnBMA ₄₀ -b-PDMAEMA ₁₂₀ / MWCNT	5–1500 мкг/мл (пик гуанина (G), LOD = 5 мкг/мл и 1–200 мкг/мл (пик аденина (A), LOD = 1 мкг/мл
Цитохром c	SPE/PnBA ₁₀₀ -b-PAA ₁₄₀ /MWCNT	1–100 мкМ, LOD = 1,16 мкМ при E = +0,578 ± 0,011 В (Tyr + Trp)
Мб	SPE/PB ₂₉₀ -b-PDMAEMA ₂₄₀ /MWCNT	Физиологические концентрации 10–1780 нг/мл (0,56 нМ–100 нМ)

ную площадь поверхности и ускоряет скорость переноса электронов за счет синергетического сочетания таких специфических свойств MWCNT, как сильная адсорбционная способность, высокие электрон-транспортные свойства и высокая удельная поверхность, с такими преимуществами PIL, как ионная проводимость и способность диспергировать углеродные наноматериалы. Кроме того, положительно заряженный атом азота имидазольного кольца полимерных конструкций на основе PIL может образовывать ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами олигонуклеотидов или ДНК, стабилизируя систему для регистрации и измерения электрохимических сигналов.

Синтез полиионных жидкостей для получения стабильных дисперсий MWCNT описан в [53]. В таблице приведены аналитические характеристики сенсоров на основе регистрации электроокисления гуанина (при потенциале E = +0,60 ± 0,01 В) и аденина (при потенциале E = +0,85 ± 0,01 В). Линейные диапазоны определения дцДНК соответствуют 5–500 мкг/мл для окислительного пика гуанина и 0,5–50 мкг/мл для окислительного пика аденина (табл.).

Поскольку максимальная амплитуда пиков окисления пуриновых нуклеотидов пропорциональна содержанию соответствующих остатков аденина (A) или гуанина (G) в нуклеотидной цепи, прямое электроокисление можно использовать для обнаружения точечных мутаций или так называемого однонуклеотидного полиморфизма в коротких фрагментах ДНК (олигонуклеотидах). Чтобы продемонстрировать это, была использована пара олигонуклеотидов, которая отличается только одним нуклеотидным остатком.

Разработанные системы SPE/PIL-But/MWCNT способны распоз-

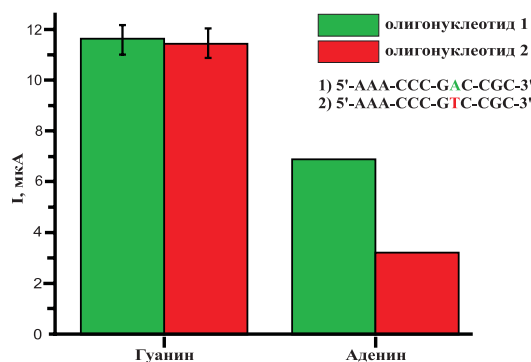


Рис. 4. Электроанализ олигонуклеотидов (1) 5' AAA-CCC-GAC-CGG 3', и (2): 5' AAA-CCC-GTC-CGG 3' с помощью наноструктурированных электродов SPE/PIL-But/MWCNT.

навать точечную мутацию в 12-членных одноцепочечных олигонуклеотидах (рис. 4) 5'-AAA-CCC-GAC-CGG-3', и 5'-AAA-CCC-GTC-CGG-3' [53, 54]. Олигонуклеотидная последовательность и положение мутации были выбраны как аналоги фрагмента рецептора фактора роста (EGFR) 21. На рис. 4 четко показано различие значений тока электроокисления аденина I_A для этих олигонуклеотидов: окислительный ток для А-остатков составил около 6,7 мкА и 3 мкА для олигонуклеотида 1 и 2, соответственно, из-за различного содержания А-остатков, в то время как окислительный ток для гуанина был одинаковым для обоих олигонуклеотидов, что указывает на отсутствие различия в содержании G-остатков. Таким образом, с помощью этого эксперимента продемонстрирована потенциальная способность разработанной сенсорной конструкции SPE/PIL-But/MWCNT для обнаружения точечных мутаций в коротких фрагментах ДНК.

Немелкоклеточная карцинома легкого связана с экзон 21 L858R EGFR и, как известно, это заболевание имеет довольно плохой прогноз [30]. Обнаружение экзона 21 L858R имеет большое клиническое значение для выбора адекватного лечения. Такое обнаружение мутаций имеет большое клиническое значение и может внести свой вклад в персонализированный подход к лечению.

Был разработан метод получения гомогенных устойчивых на коллоидном уровне дисперсий MWCNT в водном растворе ионогенного амфифильного диблок-сополимера 1,2-полибутадиен-блок-полидиметиламиноэтилметакрилат (polycationic poly(1,2-butadiene)-block-poly(*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate)), PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀) [55] и диблок-сополимеров PnBMA_x-b-PDMAEMA_y поли-*n*-бутилметакрилат-блок-полидиметиламиноэтилметакрилат

(poly(*n*-butyl methacrylate)-*block*-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)), где значения x и y варьировались как ($x=40$, $y=40$); ($x=40$, $y=120$) и ($x=70$, $y=120$) [56]. Водные растворы диблок-сополимеров $PnBMA_x$ -*b*-PDMAEMA $_y$ готовят при концентрации 5 мг/мл путем их прямого растворения, все мономерные DMAEMA звенья диблок-сополимеров протонированы при pH 3.

Авторами в работе [56] для электроанализа дцДНК применялись ионогенные амфифильные диблок-сополимеры поли-*n*-бутилметакрилат-блок-полидиметиламиноэтилметакрилат ($PnBMA_{40}$ -*b*-PDMAEMA $_{40}$, $PnBMA_{40}$ -*b*-PDMAEMA $_{120}$, $PnBMA_{70}$ -*b*-PDMAEMA $_{120}$), содержащие как гидрофобные, так и ионогенные блоки в одной макромолекуле. Помимо того, что эти диблок-сополимеры являются полимерными связующими, которые обеспечивают достаточную целостность осажденного слоя MWCNT при модификации электрода, $PnBMA_x$ -*b*-PDMAEMA $_y$ сами по себе могут также действовать как матрица-хозяин. Их протонированные PDMAEMA блоки эффективно удерживают противоположно заряженные целевые аналиты (отрицательно заряженную дцДНК в данном случае), тем самым обеспечивая потенциальные преимущества для электрохимических измерений. Наибольший комбинированный эффект был обнаружен для системы SPE/ $PnBMA_{40}$ -*b*-PDMAEMA $_{120}$ /MWCNT, которая была изготовлена с использованием дисперсий MWCNT с концентрацией 2 мг/мл.

При соотношении длин гидрофобных и гидрофильных фрагментов диблок-сополимера $PnBMA_{40}$ -*b*-PDMAEMA $_{120}$ и концентрации MWCNT 2 мг/мл наблюдается значительное увеличение электроактивной площади поверхности как за счет особой структуры сополимера (оптимальный гидрофобно-гидрофильный баланс и оптимальная общая длина макромолекулы), так и за счет оптимального содержания углеродных нанотрубок в $PnBMA_x$ -*b*-PDMAEMA $_y$ /MWCNT системе. Линейные диапазоны определения дцДНК с помощью такой системы соответствуют 5–1500 мкг/мл для окислительного пика гуанина и 1–200 мкг/мл для окислительного пика аденина (табл., рис. 5). Разработанные сенсоры позволяют регистрировать ДНК в сыворотке крови человека.

Пределы обнаружения соответствуют 5 мкг/мл для гуанина и 1 мкг/мл для аденина. Принимая во внимание среднюю молярную массу дцДНК молок осетровых рыб как 20 кДа, молярные значения пределов обнаружения равны 0,25 мкМ для гуанина и 0,05 мкМ для аденина. Показано [56], что разработанная система SPE/ $PnBMA_{40}$ -*b*-PDMAEMA $_{120}$ /MWCNT (2 мг/мл) применима для анализа дцДНК в диапазоне концентраций 2–100 мкг/мл, выделенной из лейкоцитов крови человека (рис. 6).

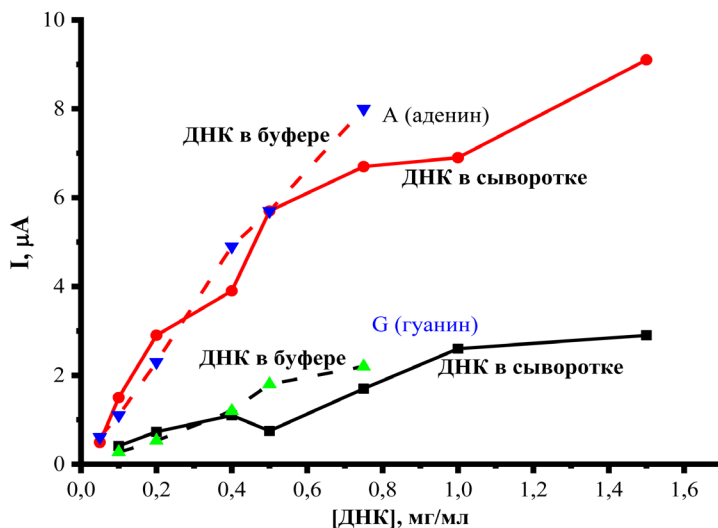


Рис. 5. Сравнительный анализ дцДНК в буфере и в сыворотке с помощью анализа электрохимического окисления гуанина и аденина с использованием сенсорной конструкции SPE/P η BMA $_{40}$ -b-PDMAEMA $_{120}$ /MWCNT (2 мг/мл MWCNT).

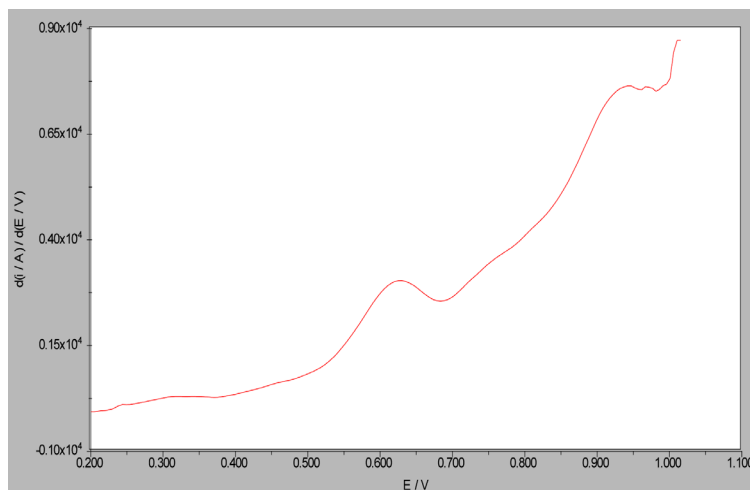


Рис. 6. Интенсивность пиков дифференциально-импульсной вольтамперограммы электрохимического окисления гуанина и аденина для лейкоцитарной ДНК с концентрацией 9,35 мкг/мл, проанализированных с помощью системы SPE/P η BMA $_{40}$ -b-PDMAEMA $_{120}$ /MWCNT (2 мг/мл MWCNT). Экспериментальные данные получены при обработке сигналов с помощью анализа первой производной при дифференцировании дифференциально-импульсных вольтамперограмм.

Использование поликатионных полимеров для анализа полианионных молекул ДНК позволяет эффективно регистрировать ДНК с помощью анализа сигналов электроокисления пуриновых оснований гуанина и аденина в широком и физиологически значимом диапазоне концентраций.

IV. МОДИФИКАЦИЯ ЭЛЕКТРОДОВ ДИСПЕРСИЯМИ MWCNT В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ АНИОННЫХ ДИБЛОК-СОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ЦИТОХРОМА C

Цитохром *c* ($M = 13370$ Да) имеет большую функциональную значимость как маркер инфаркта миокарда, маркер апоптоза, электронтранспортный гемопротейн. Разработаны различные методы количественного определения цитохрома *c*: иммунохимические, спектральные методы, методы, основанные на регистрации испускаемого излучения продуктом реакции анализируемого вещества с активатором хемилюминесценции, а также электрохимические методы [19, 57].

При процессе переноса электронов ион железа гема обратимо переходит из окисленной формы (Fe^{3+}) в восстановленную (Fe^{2+}), что приводит к изменению конформации гема. Окислительно-восстановительный потенциал этого процесса определяет эффективность переноса электрона. Даже самые незначительные изменения в структуре полипептидной цепи и микроокружения гема могут оказать влияние на эффективность переноса электрона, а значит на работу всей дыхательной цепи и процессов апоптоза. Изоэлектрическая точка цитохрома *c* $pI = 10,1$; это свидетельствует о том, что в молекуле преобладают боковые радикалы, содержащие положительно заряженные (катионные) группы, при нейтральных значениях pH цитохром *c* имеет суммарный положительный заряд. В митохондриальной мембране около 15% цитохрома *c* прочно связано с кардиолипином, одним из фосфолипидов, составляющих митохондриальную мембрану. Комплекс цитохрома *c* с кардиолипином проявляет пероксидазную активность, инициируя апоптоз клеток. В составе кардиолипина, преобладают боковые радикалы, содержащие анионные группы. Кардиолипин составляет около 15–20% от всех липидов внутренней митохондриальной мембраны и имеет уникальную структуру, состоящую из четырех жирных кислот, из которых линолевая кислота присутствует в большем количестве. Имея избыточный положительный заряд в нейтральной среде, цитохром *c* связывается за счет электростатических взаимодействий с поверхностью мембранного липидного слоя, заряженного отрицательно [19, 58].

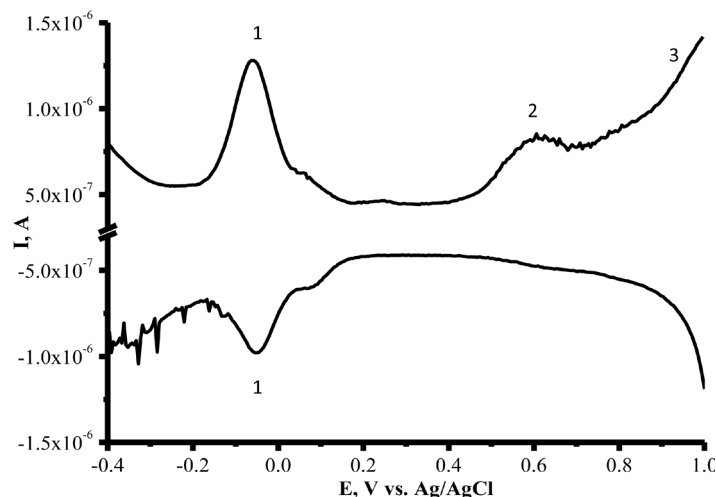


Рис. 7. Панорамная ДИВА цитохрома *c* на SPE/PnBA₁₀₀-*b*-PAA₁₄₀/MWCNT как электрохимическая сигнатура: (1) гемовая область, (2) окисление аминокислот тирозина и триптофана Tyr + Trp, (3) электроокислительная деструкция гема. Нижняя кривая: окислительный фрагмент ДИВА цитохрома *c* на SPE/PnBA₁₀₀-*b*-PAA₁₄₀/MWCNT.

В связи с этим свойством цитохрома *c* были разработаны композитные материалы для модификации электродов, несущие отрицательные заряды для стабилизации и связывания с цитохромом *c*.

Для иммобилизации цитохрома *c* на поверхности электрода использовали дисперсии MWCNT на основе водного раствора полианионного диблок-сополимера поли-*n*-бутилакрилат-*б*лок-полиакриловая кислота (MWCNT/PnBA₁₀₀-*b*-PAA₁₄₀) [59].

Такой тип модификации электродов позволяет получить панорамную вольтамперограмму в широком диапазоне потенциалов и регистрировать не только окислительно-восстановительные процессы иона железа гема (в соответствии с реакцией $\text{Fe(III)} + e^- \leftrightarrow \text{Fe(II)}$) при потенциале около 0 В, но и исследовать процессы электрохимического окисления аминокислот полипептидной цепи цитохрома *c* (тирозина и триптофана при +0,6 В), а также необратимое электрохимическое окисление гема при +0,8 В (рис. 7).

Это многоточечное обнаружение цитохрома *c* можно рассматривать как электрохимический «отпечаток пальца» (fingerprint) и метод распознавания и количественного определения цитохрома *c* в сложных (био)химических анализах. Предел обнаружения цитохрома *c* при

$E = +0,578 \pm 0,011$ В, относящегося к окислению Tyr + Trp, составил 1,16 мкМ, что примерно в два раза ниже, чем для восстановления гема вблизи потенциала 0 В. Исследование процессов электроокисления аминокислот полипептидной цепи цитохрома *c* (тирозина и триптофана) важно и с точки зрения регистрации функционально значимых посттрансляционных модификаций этого гемопротейна [60]. Тирозин подвергается таким посттрансляционным модификациям, как фосфорилирование, нитрование. Цитохром *c* человека содержит пять остатков тирозина. Tyr46 and Tyr48 локализованы в Ω петле, расположенной близко к гему. Нитрование этих остатков приводит к изменению вторичной структуры за счет перераспределения сети водородных связей, окружающих гем. В результате гем переходит в высокоспиновое состояние, что приводит к усилению пероксидазной активности нитроцитохрома *c* и индуцирует специфическую деградацию белка. Нитрование Tyr46 and Tyr48 цитохрома *c* приводит к сборке нефункциональной апоптосомы. Однако нитрование Tyr67 не влияет на вторичную структуру этого гемопротейна, но нитрование Tyr74 приводит к усилению пероксидазной активности, нарушению взаимодействия с каспазой 9, ингибированию апоптоза. Нитрование Tyr46, Tyr48, Tyr67, Tyr74 и Tyr97 приводит к изменению окислительно-восстановительного потенциала, снижает взаимодействие с каспазами, что, в свою очередь, приводит к нефункциональной дефектной апоптосоме. При нитровании Tyr74 происходит семикратное усиление пероксидазной активности цитохрома *c*, а также потеря электрон-транспортных функций вследствие смещения окислительно-восстановительного потенциала на 400 мВ.

Tyr97 является ключевой аминокислотой при формировании апоптосомы [61, 62]. Фосфорилирование Tyr97 приводит к образованию солевого мостика между фосфотирозином и Lys7, что затрудняет образование апоптосомы [63, 64].

Таким образом, разработана стратегия получения электрохимической сигнатуры гемового белка цитохрома *c*, основанной на электроанализе протетической группы белка и, одновременно, на электроокислительных свойствах аминокислот, таких как Tyr и Trp. Предел обнаружения (LOD) составлял 1,91 мкМ в случае регистрации гема и 1,16 мкМ в случае регистрации электроокисления. Специфическая и чувствительная сигнатура цитохрома *c* может быть в дальнейшем использована для регистрации апоптотических событий во время химиотерапии, поиска новых противоопухолевых препаратов, иссле-

дования механизма апоптоза, регистрации посттрансляционных модификаций отдельных функционально значимых аминокислот полипептидной цепи белка или самого гема.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При разработке эффективного электрохимического процесса, связанного с переносом электронов, и реализации электрокатализа важную роль играет выбор соответствующей модификации электрода для иммобилизации отличающихся по своим свойствам биообъектов и регистрации электронного транспорта. Использование многостенных углеродных нанотрубок придает модифицированным электродам увеличенную площадь поверхности, улучшенную проводимость и расширенное окно потенциалов. Вместе с тем, сочетание MWCNT с ионогенными полимерами позволяет получить не только высокоомогенные водные дисперсии углеродных наноматериалов и усилить синергический эффект, а также эффективно исследовать биообъекты, отличающиеся зарядом молекулы и значениями изоэлектрических точек.

Модификации печатных графитовых электродов сенсорными конструкциями на основе дисперсий многостенных углеродных нанотрубок в водных растворах полимеров являются многообещающими в качестве высокочувствительных систем распознавания для количественного анализа биообъектов, имеющих различные параметры молекулы (заряд, гидрофобность, размер, функции). Углеродные наноматериалы для модификации электродов повышают аналитическую чувствительность системы и количество электроактивного компонента на электроде, а использование ионогенных полимеров позволяет получить не только высокоомогенную дисперсию MWCNT с хорошей проводимостью, но также надежно закрепить анализируемые биообъекты на рабочей поверхности электрода (табл.).

Обоснованный выбор и исследование механизмов специфических взаимодействий (ионных, гидрофобных) биомолекулы и модификатора электрода активно исследуются как с практических, так и с теоретических позиций. Авторы [65] применили подходы и методы молекулярной динамики для понимания механизма адсорбции аланина, глицина и валина на поверхности графена и функционализированного графена, который активно применяется для модификации электродов с целью улучшения аналитических характеристик

сенсоров. Эта работа является важным шагом в понимании и предсказании для выбора тандема биомолекула/модификатор.

Функционализация электродной поверхности играет важную роль при разработке сенсорных систем для биохимии, клинической медицины, фармакологии. В зависимости от поставленной цели эксперимента (анализ маркера патологического процесса, поиск потенциальных субстратов/ингибиторов функционально значимых ферментов метаболизма, исследование межлекарственных взаимодействий, анализ конформационных изменений белков, поиск однонуклеотидных замен), в совокупности с выбранным электрохимическим методом анализа позволяет повысить чувствительность электрохимической биосенсорной системы и снизить предел определяемых концентраций, что является основополагающим для конструирования «умных» биосенсоров (smart biosensors) для электроанализа различных биообъектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов А.А. мл., Соловьев И.Д., Савицкий А.П. (2019) Сенсоры для визуализации протеолитической активности и их применение в моделях болезни человека, *Успехи биологической химии*, **59**, 3–38.
2. Лохов П.Г., Балашова Е.Е., Трифонова О.П., Маслов Д.Л., Арчаков А.И. (2020) Десять лет Российской Метаболомике: история развития и основные результаты, *Биомедицинская химия*, **66**, 279–293.
3. Трифонова О.П., Балашова Е.Е., Маслов Д.Л., Григорьев А.И., Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Арчаков А.И. (2020) Метаболомный анализ крови для создания цифрового образа здорового человека, *Биомедицинская химия*, **66**, 216–223.
4. McShane, L.M., Cavenagh, M.M., Lively, T.G., Eberhard, D.A., Bigbee, W.L., Williams, P.M., Mesirov, J.P., Polley, M.Y., Kim, K.Y., Tricoli, J.V., Taylor, J.M., Shuman, D.J., Simon, R.M., Doroshow, J.H., Conley, B.A. (2013) Criteria for the use of omics-based predictors in clinical trials, *Nature*, **502**, 317–320.
5. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Sigolaeva, L.V., Kuzikov, A.V., Pogodin, P.V., Archakov, A.I. (2018) Molecular imprinting coupled with electrochemical analysis for plasma samples classification in acute myocardial infarction diagnostic, *Biosensors and Bioelectronics*, **99**, 216–222.
6. Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Bulko, T.V., Archakov, A.I. (2018) From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450, *Biosensors and Bioelectronics*, **121**, 192–204.
7. Mi, L., He, F., Jiang, L., Shangguan, L., Zhang, X., Ding, T., Liu, A., Zhang, Y., Liu, S. (2017) Electrochemically-driven benzo [a] pyrene metabolism via human cytochrome P450 1A1 with reductase coated nitrogen-doped graphene nano- composites, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **804**, 23–28.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

8. Sharma, S., Singh, N., Tomar, V., Chandra, R. (2018) A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, **107**, 76–93.
9. Anzar, N., Hasan, R., Tyagi, M., Yadav, N., Narang, J. (2020) Carbon nanotube – A review on Synthesis, Properties and plethora of applications in the field of biomedical science, *Sensors International*, **1**, 100003.
10. Carrara, S., Baj-Rossi, C., Boero, C., De Micheli, G. (2014) Do carbon nanotubes contribute to electrochemical biosensing? *Electrochimica Acta*, **128**, 102–112.
11. Hu, C., Hu, S. (2009) Carbon nanotube-based electrochemical sensors: principles and applications in biomedical systems, *Journal of Sensors*, **2009**, 1–40.
12. Baig, N., Sajid, M., Saleh, T.A. (2019) Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for electroanalytical applications, *Trends in Analytical Chemistry*, **111**, 47–61.
13. Rivera-Gavidia, L.M., Luis-Sunga, M., Bousa, M., Vales, V., Kalbac, M., Arévalo, M.C., Pastor, E., García, G. (2020) S- and N-doped graphene-based catalysts for the oxygen evolution reaction, *Electrochimica Acta*, **340**, 135975.
14. Shumyantseva V., Makhova A., Bulko T., Kuzikov A., Shich E., Kukes V., Archakov A. (2015) Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: the protective and stimulating roles of antioxidants. *RSC Advances*, **87**, 71306–71313.
15. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Chalenko, Y.M., Vagin, M.Y., Rudakov, Y.O., Shatskaya, M.A., and Archakov, A.I. (2011) Electrochemical investigations of cytochrome P450, *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins Proteomics*, **1814**, 94–101.
16. McDonnell, B., Hearty, S., Leonard, P., and O’Kennedy, R. (2009) Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing, *Clinical Biochemistry*, **42**, 549–561.
17. Marenzi, G., Giorgio, M., Trinei, M., Moltrasio, M., Ravagnani, P., Cardinale, D., Ciceri, F., Cavallero, A., Veglia, F., Fiorentini, C., Cipolla, C.M., Bartorelli, A.L., and Pelicci, P. (2010) Circulating cytochrome c as potential biomarker of impaired reperfusion in ST-segment elevation acute myocardial infarction, *The American Journal of Cardiology*, **106**, 1443–1449.
18. Schweitzer-Stenner, R. (2018) Relating the multi-functionality of cytochrome c to membrane binding and structural conversion, *Biophysical Reviews*, **10**, 1151–1185.
19. Manickam, P., Kaushik, A., Karunakaran, C., Bhansali, S. (2017) Recent advances in cytochrome c biosensing technologies, *Biosensors and Bioelectronics*, **87**, 654–668.
20. Yin, J., Miao, P. (2016) Apoptosis evaluation by electrochemical techniques, *Chemistry-an Asian Journal*, **11**, 632–641.
21. Hasanzadeh, M., Shadjou, N., de la Guardia, M. (2017) Early stage diagnosis of programmed cell death (apoptosis) using electroanalysis: nanomaterial and methods overview, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **93**, 199–211.
22. Nikolaev, S., Lemmens, L., Koessler, T., Blouin, J.-L., Nospikel, T. (2018) Circulating tumoral DNA: preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory, *Analytical Biochemistry*, **542**, 34–39.
23. Huffnagle, I.M., Joyner, A., Rumble, B., Hysa, S., Rudel, D., Hvastkovs, E.G. (2014) Dual electrochemical and physiological apoptosis assay detection of in vivo generated nickel chloride induced DNA damage in *Caenorhabditis elegans*, *Analytical Chemistry*, **86**, 8418–8424.

24. Sanjuán, I., Martín-Gómez, A.N., Graham, J., Hernández-Ibáñez, N., Banks, C., Thiemann, T., Iniesta, J. (2018) The electrochemistry of 5-halocytosines at carbon based electrodes towards epigenetic sensing, *Electrochimica Acta*, **282**, 459–468.
25. Campos-Carrillo, A., Weitzel, J.N., Sahoo, P., Rockne, R., Mokhnatkin, J.V., Murtaza, M., Gray, S.W., Goetz, L., Goel, A., Schork, N., Slavin, T.P. (2020) Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool, *Pharmacology & Therapeutics*, **207**, 107458.
26. Kogikoski, S. Jr., Paschoalino, W.J., Cantelli, L., Silva, W., Kubota, L.T. (2019) Electrochemical sensing based on DNA nanotechnology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **118**, 597–605.
27. Zhang, Y., Zhang, W.B., Liu, C., Zhang, P., Balaeff, A., Beratan, D.N. (2016) DNA charge transport: moving beyond 1D, *Surface Science*, **652**, 33–38.
28. Machera, H.C., García-Fernández, N., Adsuar-Gómez, A., Porrás-López, M., González-Calleb, A., Noval-Padilloa, J., Guerrero, J.M., Molinerod, P., Borrego-Domínguezb, J.M., Herruzo-Avilésc, Á., Rubio, A. (2019) Donor-specific circulating cell free DNA as a noninvasive biomarker of graft injury in heart transplantation, *Clinica Chimica Acta*, **495**, 590–597.
29. Udomsinprasert, W., Poovorawan, Y., Chongsrisawat, V., Vejchapipat, P., Jittikoon, J., Honsawek, S. (2019) Leukocyte mitochondrial DNA copy number as a potential biomarker indicating poor outcome in biliary atresia and its association with oxidative DNA damage and telomere length, *Mitochondrion*, **47**, 1–9.
30. Shoja, Y., Kermanpur, A., Karimzadeh, F. (2018) Diagnosis of EGFR exon21 L858R point mutation as lung cancer biomarker by electrochemical DNA biosensor based on reduced graphene oxide/functionalized ordered mesoporous carbon/Ni-oxyl-tracycline metallopolymer nanoparticles modified pencil graphite electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, **113**, 108–115.
31. Brotons, A., Vidal-Iglesias, F., Solla, J., Iniesta, J. (2016) Carbon materials for the electrooxidation of nucleobases, nucleosides and nucleotides toward cytosine methylation detection: a review, *Analytical Methods*, **8**, 702–715.
32. Herl, T., Taraba, L., Bohm, D., Marysik, F.-M. (2019) Electrooxidation of cytosine on bare screen-printed carbon electrodes studied by on-line electrochemistry-capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Electrochemistry Communications*, **99**, 41–45.
33. Li, C.-c., Wang, Z.-y., Wang, L.-j., Zhang, C.-y. (2019) Biosensors for epigenetic biomarkers detection: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, **144**, 111695.
34. Wang, G., Liu, Y., Hu, N. (2007) Comparative electrochemical study of myoglobin loaded in different types of layer-by-layer assembly films, *Electrochimica Acta*, **53**, 2071–2079.
35. Shumyantseva, V.V., Sigolaeva, L.V., Agafonova, L.E., Bulko, T.V., Pergushov, D.V., Schacher, F.H., Archakov, A.I. (2015) Facilitated biosensing via direct electron transfer of myoglobin integrated into diblock copolymer/multi-walled carbon nanotube nanocomposites, *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 5467–5477.
36. Alim, S., Vejayan, J., Yusoff, M., Kafi, A.K.M. (2018) Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing, *Biosensors and Bioelectronics*, **121**, 125–136.
37. Matveeva, E.G., Gryczynski, Z., Lakowicz, J.R. (2005) Myoglobin immunoassay based on metal particle-enhanced fluorescence, *Journal of Immunological Methods*, **302**, 26–35.

38. Tang, Z., Huang, J., He, H., Ma, C., Wang, K. (2020) Contributing to liquid biopsy: Optical and electrochemical methods in cancer biomarker analysis, *Coordination Chemistry Reviews*, **415**, 213317.
39. Li, Q., Batchelor-McAuley, C., Compton, R.G. (2010) Electrochemical oxidation of guanine: electrode reaction mechanism and tailoring carbon electrode surface to switch between adsorptive and diffusional responses, *The Journal of Physical Chemistry B*, **114**, 7423–7428.
40. Gonçalves, L.M., Batchelor-McAuley, C., Barros, A., Compton, R.G. (2010) Electrochemical oxidation of adenine: a mixed adsorption and diffusion response on an edge-plane pyrolytic graphite electrode, *The Journal of Physical Chemistry*, **114**, 14213–14219.
41. Trotter, M., Borst, N., Thewes R., von Stetten, F. (2020) Review: Electrochemical DNA sensing – Principles, commercial systems, and applications, *Biosensors and Bioelectronics*, **154**, 112069.
42. Blair, E., Damion, K., Corrigan, D.R. (2019) A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection, *Biosensors and Bioelectronics*, **134**, 57–67.
43. Arvand, M., Niazi, A., Mazhabi, R.M., Biparva, P. (2012) Direct electrochemistry of adenine on multi-walled carbon nanotube-ionic liquid composite film modified carbon paste electrode and its determination in DNA, *Journal of Molecular Liquids*, **173**, 1–7.
44. Sun, W., Li, Y., Duan, Y., Jiao, K. (2008) Direct electrocatalytic oxidation of adenine and guanine on carbon ionic liquid electrode and the simultaneous determination, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 988–993.
45. Hasoň, S., Fojta, M., Ostatná, V. (2019) Label-free electrochemical analysis of purine nucleotides and nucleobases at disposable carbon electrodes in microliter volumes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **847**, 113252.
46. Palecek, E., Bartosik, M. (2012) Electrochemistry of nucleic acids, *Chemical Reviews*, **112**, 3427–3481.
47. Reipa, V., Atha, D.H., Coskun, S.H., Sims, C.M., Nelson, B.C. (2018) Controlled potential electro-oxidation of genomic DNA, *Public Library of Science one*, **13**, e0190907.
48. Kowalczyk, A. (2020) Trends and perspectives in DNA biosensors as diagnostic devices, *Current Opinion in Electrochemistry*, **23**, 36–41.
49. Ji, L., Yu, S., Zhou, X., Bao, Y., Yang, F., Weidong, Kang, W., Xin, Zhang X. (2019) Modification of electron structure on the semiconducting single-walled carbon nanotubes for effectively electro-sensing guanine and adenine, *Analytica Chimica Acta*, **1079**, 86–93.
50. Zhang, S., Zhuang, X., Chen, D., Feng Luan, F., He, T., Tian, C., Lingxin Chen, L. (2019) Simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine using MnO₂ nanosheets and ionic liquid-functionalized graphene combined with a permeation-selective polydopamine membrane, *Microrchimica Acta*, **186**, 450.
51. Ren, S., Wang, H., Zhang, H., Yu, L., Li, M. (2015) Direct electrocatalytic and simultaneous determination of purine and pyrimidine DNA bases using novel mesoporous carbon fibers as electrocatalyst, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **750**, 65–73.
52. Wang, H., Ma, R., Sun, F., Jia, L., Zhang, W., Shang, L., Xue, Q., Jia, W., Wang, H. (2018) A versatile label-free electrochemical biosensor for circulating tumor DNA based on dual enzyme assisted multiple amplification strategy, *Biosensors and Bioelectronics*, **122**, 224–230.
53. Sigolaeva, L.V., Bulko, T.V., Kozin, M.S., Zhang, W., Köhler, M., Romanenko, I., Yuan, J., Schacher, F.H., Pergushov, D.V., Shumyantseva, V.V.

- (2019) Long-term stable poly(ionic liquid)/MWCNTs inks enable enhanced surface modification for electrooxidative detection and quantification of dsDNA, *Polymer*, **168**, 95–103.
54. Шумянцева В.В., Агафонова Л.Е., Булко Т.В., Кузиков А.В., Масамрех Р.А. (2020) Подготовка электрохимических биосенсорных систем для анализа биообъектов: обоснованный выбор модификаций рабочей поверхности для проведения исследований в режиме «смарт-электродов», *Bio-medical Chemistry: Research and Methods*, **3**, e00119, 1–9.
55. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Konyakhina, A.Yu., Romanenko, I., Max, J.B., Köhler, M., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Pergushov, D.V., Schacher, F.H., Sigolaeva, L.V. (2020) All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study their electrocatalytic conversion by cytochromes P450, *Electrochimica Acta*, **336**, 135579.
56. Sigolaeva, L.V., Bulko, T.V., Konyakhina, A. Yu., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Max, J.B., Köhler, M., Schacher, F.H., Pergushov, D.V., and Shumyantseva, V.V. (2020) Rational Design of Amphiphilic Diblock Copolymer/MWCNT Surface Modifiers and Their Application for Direct Electrochemical Sensing of DNA, *Polymers*, **12**, 1514.
57. Aghamiri, Z.S., Mohsennia, M., Rafiee-Pour, H.-A. (2018) Immobilization of cytochrome c and its application as electrochemical biosensors, *Talanta*, **176**, 195–207.
58. Santucci, R., Sinibaldi, F., Cozza, P., Polticelli, F., Fiorucci, L. (2019) Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate, *International Journal of Biological Macromolecules*, **136**, 1237–1246.
59. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Pergushov, D.V., Schacher, F.H., Sigolaeva, L.V. (2020) Electrochemical fingerprint of cytochrome c on a MWCNT/polymer nanocomposite electrode, *Mendeleev Communications*, **30**, 299–301.
60. Lin, Y.-W. (2018) Structure and function of heme proteins regulated by diverse post-translational modifications, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **641**, 1–30.
61. Rodriguez-Roldan, V., Garcia-Heredia, J., Navarro, J., De la Rosa, M., Hervas, M. (2008) Effect of Nitration on the Physicochemical and Kinetic Features of Wild-Type and Monotyrosine Mutants of Human Respiratory Cytochrome c, *Biochemistry*, **47**, 12371–12379.
62. Ly, H.K., Utesch, T., Diaz-Moreno, I., Garcia-Heredia, J.M., De La Rosa, M.A., Hildebrandt, P. (2012) Perturbation of the Redox Site Structure of Cytochrome c Variants upon Tyrosine Nitration, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 5694–5702.
63. Lee, I., Salomon, A., Yu, K., Doan, J.W., Grossman, L., Huttemann, M. (2006) New Prospects for an Old Enzyme: Mammalian Cytochrome c Is Tyrosine-Phosphorylated in Vivo, *Biochemistry*, **45**, 9121–9128.
64. Yu, H., Lee, I., Salomon, K., Huttemann, Yu, M., (2008) Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated *in vivo*, inhibiting mitochondrial respiration, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**, 1066–1071.
65. Kamel, M., Raissi, H., Hashemzadeh, H., Mohammadifard, K. (2020) Theoretical elucidation of the amino acid interaction with graphene and functionalized graphene nanosheets: insights from DFT calculation and MD simulation, *Amino Acids*, **52**, 1465–1478.