

---

## ОБЗОРЫ

---

УДК 543.9

# ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ

© 2015 г. Г. А. Евтюгин<sup>1</sup>, Е. Е. Стойкова

Химический институт им. А. М. Бутлерова

Казанского (Приволжского) федерального университета

420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

<sup>1</sup>E-mail: gevtyugin@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2013 г., после доработки 10.03.2014 г.

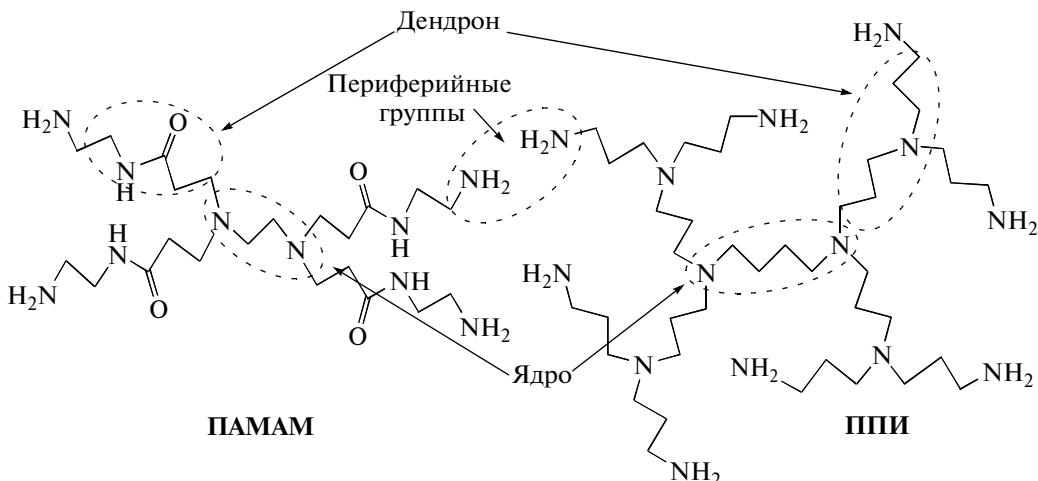
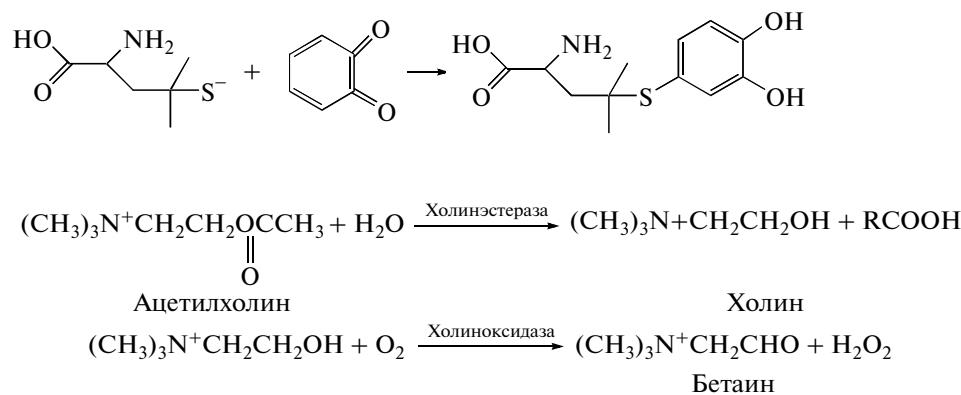
Рассмотрены основные закономерности функционирования электрохимических биосенсоров, включающих в состав биочувствительного слоя дендримеры различного состава. Определены роль и значение дендримеров как матрицы для иммобилизации биологических компонентов биосенсоров, увеличения плотности рецепторов и медиаторов электронного переноса. Приведены примеры реализации различных типов биосенсоров на основе ферментов, иммунохимических реагентов и нуклеиновых кислот.

**Ключевые слова:** дендримеры, химически модифицированные электроды, биосенсоры, ДНК-сенсоры, иммуносенсоры.

**DOI:** 10.7868/S0044450215050047

Разработка новых материалов — перспективное направление развития аналитической химии и других научно-технических отраслей [1]. Достижения нанотехнологий — наноразмерные иnanoструктурные материалы с уникальными характеристиками — находят все более широкое применение в решении задач разделения, концентрирования и распознавания различных соединений [2]. Сочетание особых свойств таких материалов с высокой избирательностью, характерной для биохимических методов анализа, позволяет создать принципиально новые аналитические устройства, востребованные для решения задач биомедицины (персонализированная медицина, клинический анализ, внелабораторные индивидуальные средства диагностики), фармацевтики (скрининг новых лекарственных препаратов, фармакокинетика) и экологического мониторинга (индивидуальное и групповое определение экотоксикантов). Это, в частности, нашло отражение в закреплении соответствующих направлений исследований в перечне критических технологий РФ (биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии, нано-, био-, информационные, когнитивные технологии). Вместе с тем, использование новых современных материалов не сводится к механическому совмещению отдельных биологических и вспомогательных компонентов. Размер наночастиц, наличие в них функциональных групп, необходимых для функционирования биосенсора, а также особенности

внедрения наноматериалов в макроскопические системы, такие как модифицирующие слои сенсоров и биосенсоров, предъявляют особые требования как к процессам “сборки” чувствительных слоев, так и к их составу и особенностям изучения на этапах оптимизации и тестирования соответствующих аналитических устройств. Применительно к электрохимическим преобразователям сигнала особое внимание уделяется вопросам обеспечения электрической коммуникации первичного преобразователя и биохимического компонента. Она опосредована каскадами промежуточных реакций, включающих электронообменные процессы, сорбционно-катализитические стадии и собственно биохимическое распознавание молекул анализаторов. Разнообразие поведения сложных гибридных структур обеспечивает высокую чувствительность определения анализаторов и открывает новые возможности дизайна (био)сенсоров, направленные на их миниатюризацию, совместимость с имеющимися средствами измерения и на использование в специальных условиях, например, при имплантации датчика или удаленной регистрации его сигнала по радиоканалу. Все это определяет актуальность обобщения имеющихся литературных данных, посвященных отдельным аспектам применения таких “умных” материалов в составе биосенсоров.



**Рис. 1.** Типичная структура дендримеров ПАМАМ и ППИ с тремя выделенными зонами: ядро, дендрон и периферийные группы.

Настоящий обзор посвящен применению в составе электрохимических биосенсоров дендримеров (от греч. “dendron” – дерево). Это гиперразветвленные полимеры, содержащие центральное ядро, на котором посредством ветвления наращивают функционализированные повторяющиеся единицы [3]. Являясь индивидуальными соединениями, дендримеры в силу большой молекулярной массы, объемной структуры и значительного числа функциональных групп на поверхности проявляют свойства, более типичные для наночастиц, состоящих из агрегатов низкомолекулярных органических соединений и их комплексов. Дендримеры применяют в качестве сорбентов, стабилизаторов биологических препаратов, их вводят в состав катализаторов и модифицирующих добавок. Применение дендримеров в составе биосенсорных устройств отражено в ряде обзоров [2–5]. В настоящей работе основное внимание уделено принципам функционирования биосенсоров, включающих дендримеры, и аналитическим харак-

теристикам определения с их помощью органических соединений биологического значения.

**Общая характеристика дендримеров.** Дендримеры — это монодисперсные трехмерные сверхразветвленные наноразмерные полимерные архитектуры с очень высокой плотностью поверхностных функциональных групп. Их получают, последовательно наращивая число слоев путем присоединения структурно однотипных элементов к так называемым точкам ветвления. Число таких слоев определяет генерацию (поколение) дендримера. Наиболее распространенные дендримеры на основе полиалкиленамидов и аминов относятся к четвертой генерации. Молекулы дендримера состоят из трех различных доменов: ядра, дендрона и концевых функциональных групп (рис. 1). Отдельные ветви молекулы формируют внутренние полости (дендримерные щели), в ряде случаев доступные для низкомолекулярных соединений, для которых дендримеры выступают в качестве молекулярных “контейнеров”.

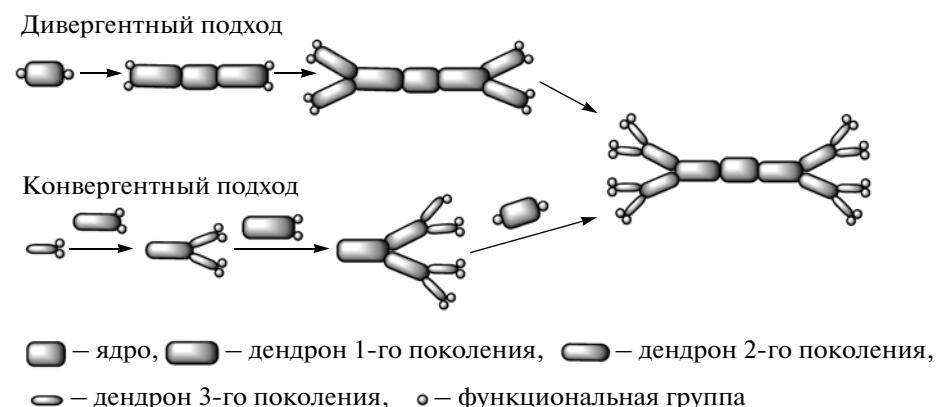


Рис. 2. Дивергентный и конвергентный рост дендримерной структуры.

ров". Свойства дендримеров и возможность применения в составе биосенсоров в большей степени определяются периферическими функциональными группами, хотя внутренняя функциональность дендримерных трещин и центрального ядра также имеют значение [2].

Синтез дендримеров на основе полифункциональных мономеров типа  $\text{ARB}_2$ , где А и В реагируют только друг с другом, но не с себе подобными, теоретически предсказан еще в 1941 г. [6], а доступен стал лишь с 1980-х годов. Дендримеры получают с использованием двух подходов (дивергентного [7] и конвергентного [8]), в которых рост ответвлений достигается через последовательное сопряжение и/или реакции присоединения и снятия защитных групп (рис. 2). Дивергентный подход успешно используют для синтеза дендримеров полиамидоамина (**ПАМАМ**), полипропиленамина (**ППИ**), поли-L-лизина, меламина, лимонной кислоты и полиглицерина [9, 10]. Он разработан независимо несколькими исследовательскими группами [7]. Конвергентный подход, в котором рост молекулы идет "внутрь" за счет связывания концевых групп в каждом домене мономера, реализован при получении дендримеров полиэстера, полиэфира и меламина. На основе указанных базовых методов разработаны и иные подходы, такие как двухступенчатый конвергентный рост, двойной экспоненциальный рост и ортогональное связывание [11–14]. Всего существует более ста семейств дендримеров с различными внутренними и внешними функциональными группами.

Общими периферийными группами в дендримерах являются  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CHO}$ . Их использовали для получения более чем 1000 типов биоконьюгатов с биохимическими компонентами, необходимыми для функционирования

биосенсоров. Помимо генерации дендримеры часто характеризуют особенностями пространственного строения молекулы, выделяя такие формы, как звезда, шар, конус, чаша, турбина, крест, снежинка, гантель и т.д. [15–22].

Несмотря на разнообразие синтезированных дендримеров, значительная часть публикаций посвящена ПАМАМ, коммерчески доступным в нескольких генерациях и модификациях периферических функциональных групп. Форма ПАМАМ зависит от поколения, физико-химических свойств ядра и дендрона. Они претерпевают конформационные изменения и, как правило, становятся более компактными с увеличением номера поколения. ПАМАМ 4–8 поколения имеют форму мягких сфер, для более высоких генераций – твердых сфер [23].

**Применение дендримеров в составе электрохимических биосенсоров.** Изначально стимулом для применения дендримеров в составе биосенсорных устройств было достижение высокой эффективности иммобилизации биомолекул. Это связано со стабилизирующим действием разветвленных полимеров на трехмерную структуру белков и нуклеиновых кислот. Благодаря большому числу полярных и ионизированных группировок на поверхности молекул дендримера они легко адсорбируются на рабочей поверхности и в полостях. Поскольку дендримеры ограниченно растворимы в воде и полярных органических растворителях, после адсорбции дендримеры можно достаточно легко осадить на рабочей поверхности биосенсора, формируя, таким образом, его биочувствительный слой. Благодаря монодисперсности дендримеры обладают хорошо воспроизводимыми характеристиками модифицирующих покрытий,

что выгодно отличает их от полидисперсных материалов со сходными функциями, например, полимерами или наночастицами [2, 3].

Помимо стабилизации биополимеров выявлены и другие преимущества использования дендримеров в составе биосенсоров. К ним относятся высокая плотность функциональных групп, используемых для ковалентной иммобилизации белков и нуклеиновых кислот, сохранение диффузационной проницаемости слоя для низкомолекулярных носителей заряда, совместимость с традиционными модификаторами — медиаторами электронного переноса и кофакторами ферментов. Включение дендримеров в состав биосенсоров повышает чувствительность сигнала, снижает неспецифическое связывание мешающих компонентов, обеспечивает более высокую доступность центра связывания биокомпонента для определяемого соединения и более высокую стабильность отклика по сравнению с аналогичными конструкциями на основе традиционных полимерных носителей (желатин, производные целлюлозы и полисилоксаны).

За последние 10 лет опубликовано свыше 100 работ, посвященных использованию дендримеров в составе биосенсоров. Следует отметить, что помимо гиперразветвленных полимеров термин “дендример” иногда используют в отношении высокопористых композитных материалов, содержащих поверхностные функциональные группы, участвующие в модификации или ковалентном связывании биополимеров. Подобные структуры получают с помощью золь–гель модификации поверхности электродов с помощью поликонденсации замещенных силанов и силоксанов [24]. В отличие от дендримеров, такие материалы не отличаются строго определенным составом и помимо ковалентно связанных повторяющихся единиц содержат аморфные области гидратированных олигомеров и низкомолекулярных компонентов, удерживаемых во внутренних слоях. Таким образом, речь идет не об индивидуальных соединениях, как в случае гиперразветвленных полимеров, а о составных композитах, не имеющих определенного стехиометрического состава. Указанные “дендримероподобные” материалы применяют в составе электрохимических сенсоров и биосенсоров в сходных с дендримерами целях. Они могут включать электрохимически активные группы или служить матрицей для иммобилизации дополнительных модификаторов.

**Композитные материалы из наночастиц металлов и дендримеров.** Значительное количество работ посвящено композитным покрытиям, полу-

чаемым путем сочетания электростатической адсорбции катионов благородных металлов в слое дендримера с последующим их химическим восстановлением [25–31]. При этом образуются ультрамалые частицы свободных металлов, обладающие высокой каталитической активностью, в ряде случаев — медиаторными свойствами. Помимо сорбционного концентрирования исходных катионов металлов, молекулы дендримера играют роль защитной оболочки образующихся наночастиц, препятствуя их агрегации и ограничивая их рост. Это позволяет получать наночастицы металлов определенного размера, равномерно распределенные в органической матрице.

Для синтеза нанодисперсий металлов сначала готовят растворы, содержащие дендримеры и соли металлов или их комплексов в водной или водно-органической фазе. Условия получения растворов должны обеспечивать гидролитическую устойчивость катиона металла и его электростатическое взаимодействие с дендримером. Для частиц золота и платины используют анионные комплексы в сочетании с аминозамещенными дендримерами, для свободных катионов металлов — производные с терминальными карбоксильными и карбамидными группами.

Размер образующихся наночастиц металлов определяется, прежде всего, числом функциональных групп дендримера, участвующих в координации ионов металлов. Для старших поколений число атомов в образующихся нанокластерах может в несколько раз превышать число центров координации. Для 1–3 поколения оптимальным считается стехиометрическое соотношение количеств вещества металла и функциональных групп дендримера. Высокая унификация размера образующихся нанокластеров металлов неоднократно подтверждалась данными трансмиссионной электронной микроскопии. Близкий размерный состав получаемых наночастиц предположительно связан с самоагрегацией первично образующихся кластеров, которая определяется гидрофильно-гидрофобным балансом поверхности и внутренней полости молекулы дендримера. Дополнительная модификация поверхностных групп реакционноспособными фрагментами, участвующими в восстановлении ионов металлов (например, в случае ППИ — остатками мальтозы [28]), способствует уменьшению размера наночастиц металлов и увеличению их дисперсности. Средний размер частиц в зависимости от природы металла и лиганда варьирует от 1.2 до 3.5 нм, что существенно меньше, чем при ограничении роста наночастиц цитрат-ионами (образуются частицы размером 13–100 нм) и сопоставимо с результатами при-

менения в тех же целях меркаптанов (5–10 нм, все данные для наночастиц серебра и золота [29]).

Реакция ассоциатов металлов и дендримеров с восстановителями протекает достаточно медленно — в течение суток и более. После получения инкапсулированные частицы металлов иммобилизуют на поверхности носителей, используя для этого ковалентную пришивку к поверхности с помощью тиолированных линкеров [29], включение в органические и неорганические гели [24] и полиэлектролитные комплексы [4]. Для предотвращения агрегации частиц металлов на данной стадии их дополнительно обрабатывают стабилизаторами, например, для Ag и Au реагентами с карбоксильными и тиольными группами соответственно [32, 33].

**Дендримеры с редокс-активными функциональными группами.** Агрегаты наночастиц металлов и дендримерной “капсулы” находят применение в электрокатализе, но они как правило малоактивны в медиаторном переносе электрона. Это ограничивает их использование в электрохимических биосенсорах, где лимитирующей стадией часто является перенос электрона от биологического компонента. Для улучшения электрической коммуникации синтезированы функционализированные дендримеры, концевые группы которых ковалентно связаны с электрохимически активными фрагментами, способными к обратимому окислению—восстановлению на электроде.

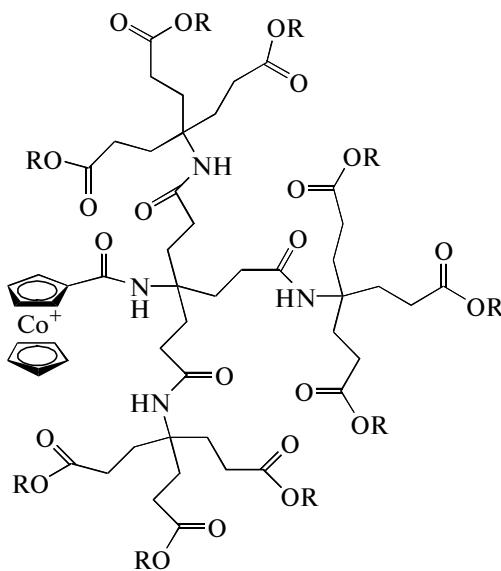
Среди таких материалов наиболее известны дендримерные производные ферроцена. Они отличаются высокой эффективностью переноса электрона, химически и электрохимически устойчивы. Реакция обратимого окисления—восстановления ферроцен—ферроциний не зависит от pH среды. Это особенно важно при определении субстратов оксидоредуктаз, окисление которых сопровождается выделением ионов водорода.

Эффективность переноса электрона ферроцензамещенных дендримеров 0, 1 и 2 поколения с 9, 18 и 27 ферроценовыми фрагментами соответственно оценивали с помощью зондовой электрохимической микроскопии [34]. Дендримеры иммобилизовали путем электростатической адсорбции на подложке, которой придавали отрицательный заряд обработкой арилдиазониевой солью и ее восстановлением. Обратимость переноса электрона снижалась при увеличении размера непроводящей капсулы дендримера. Интересно, что при использовании растворимых (диффузионно свободных) медиаторов электронного переноса (алкилпроизводные ферроцена) реализуется челночный механизм переноса электрона между медиатором и ферроцильными группами дендримера, но не между диффузионно свободным медиатором и электродом.

Влияние микроокружения ферроцильных фрагментов в составе дендримера на их электро-

химические характеристики подтверждено сравнением поведения линейного и гиперразветвленного метилсилоксана с ковалентно связанными ферроцильными фрагментами [35]. Гиперразветвленный полимер показал более высокие значения константы скорости переноса электрона и тока обмена, что было объяснено более высокой концентрацией противоионов в глобуле дендримера.

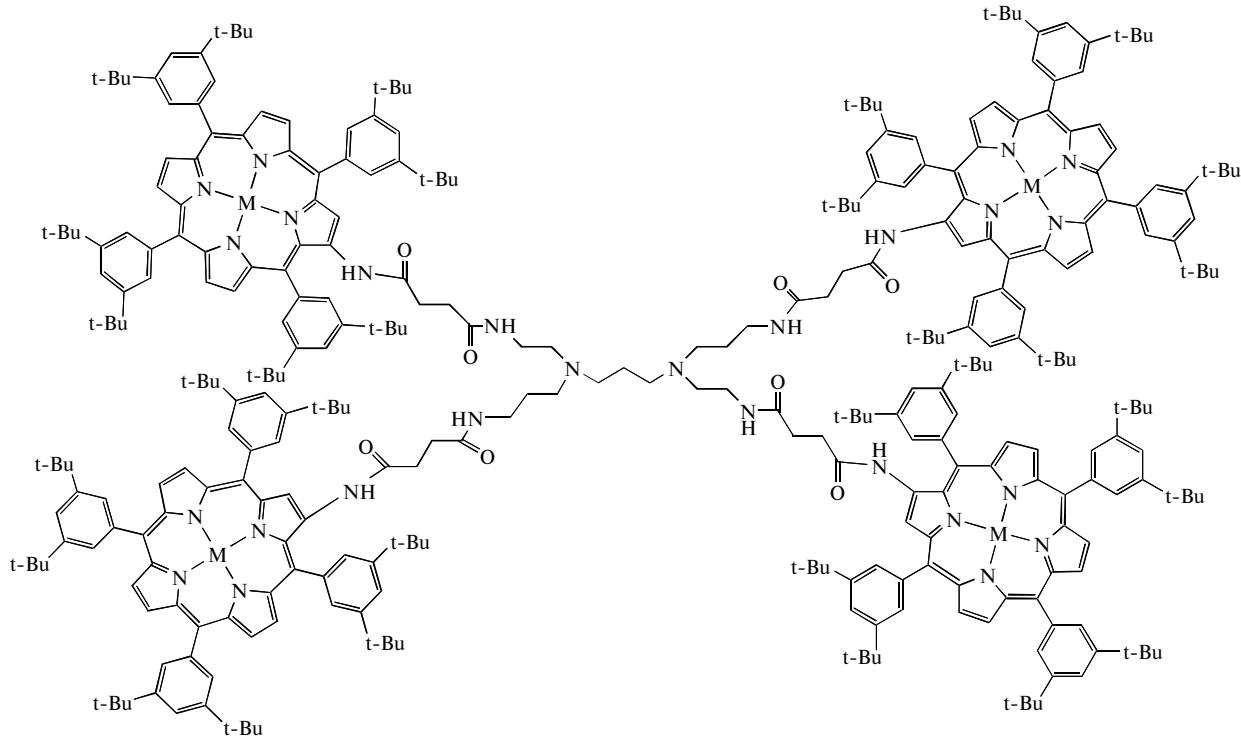
Близким аналогом ферроцена является кобальтоцен, способный к обратимому одноэлектронному окислению—восстановлению [36]. Дендримеры 1–3 поколения, монозамещенные кобальтоценевым фрагментом 1, способны к одноэлектронному окислению в воде и полярных органических растворителях. Перенос электрона подавляется при адсорбции  $\beta$ -циклодекстрина.



Строение дендримера 1, R = H, t-Bu .

Наибольшая чувствительность электрохимической регистрации сигнала такого сенсора достигается для дендримера второго поколения. Зависимость потенциала полуволны и обратимость переноса электрона от pH и размера глобулы дендримера связаны с электростатическими взаимодействиями и реакциями протонирования—депротонирования карбоксильных групп полимера.

Дендримеры 2 с 2, 4, 8, 16, 32 и 64 концевыми порфириновыми фрагментами в свободном состоянии и в виде комплексов с ионами Zn(II) изучали методом циклической вольтамперометрии [37]. Отмечено отсутствие зависимости редокспотенциала порфириновых фрагментов от их числа в молекуле дендримера.



Строение дендримера 2, М = 2H или Zn(II).

**Ферментные сенсоры с включением дендримеров.** Наиболее широко дендримеры используют в сочетании с оксидоредуктазами. Сигнал соответствующих биосенсоров связан с окислением–восстановлением продукта биохимической реакции или кофактора фермента. Дендримеры с включением наночастиц металлов или редокс-активных групп обеспечивают усиление сигнала и снижение рабочего потенциала его измерения за счет включения в цепь переноса заряда или обеспечения наиболее благоприятной ориентации фермента (его кофактора) в биочувствительном слое. Характеристики определения субстратов ферментов с помощью биосенсоров с включением дендримеров приведены в табл. 1.

ПАМАМ с ковалентно связанными ферроценовыми фрагментами использовали в составе “безреагентного” ферментного сенсора на глюкозу [38]. Для этого концевые аминогруппы ПАМАМ модифицировали ферроценальдегидом, затем дендример вводили в монослой цистамина на золотом рабочем электроде. Иммобилизацию фермента проводили, окисляя периодатом сахаридный фрагмент молекулы. Сусpenзии дендримера и фермента осаждали на электрод послойно для увеличения общего количества фермента в составе биосенсора (рис. 3). Поверхностная концентрация ферроцена, участвующего в переносе электрона, по данным циклической вольтамперометрии (ЦВА) составила  $2.5 \times 10^{-9}$  моль/см<sup>2</sup>, или 32% от общего числа ферроценовых фрагментов в

составе дендримера (для пяти слоев дендример–фермент). Аналогично иммобилизовали фермент на молекулах дендримера с концевыми ферроценовыми группами, включенных в состав самоорганизующегося монослоя [39].

Предложена [40] обратная последовательность включения в состав сенсора ферроцена и дендримера: Au электрод покрывали тиолированным производным ферроцена, после чего ковалентно иммобилизовали ПАМАМ и глюкозооксидазу. Сигналом служил ток медиатора электронного переноса, регистрируемый при 0.35 В. Следует отметить, что чувствительность этого биосенсора уступает другим прототипам с теми же модификаторами (табл. 1).

Предложены композитные покрытия на стеклоуглеродном электроде, модифицированном многостенными углеродными нанотрубками, ПАМАМ (4 поколение) с концевыми карбоксильными группами и наночастицами Au как основа для конструирования амперометрического глюкозного сенсора [41]. Иммобилизацию фермента проводили путем его физической адсорбции на модифицирующем покрытии с последующим покрытием белковой пленки нафционом. Биосенсор характеризуется высокой чувствительностью и стабильностью сигнала и широким линейным диапазоном определяемых содержаний, что делает его перспективным для создания портативного глюкометра.

**Таблица 1.** Характеристики ферментных сенсоров с включением дендримеров в состав чувствительного слоя

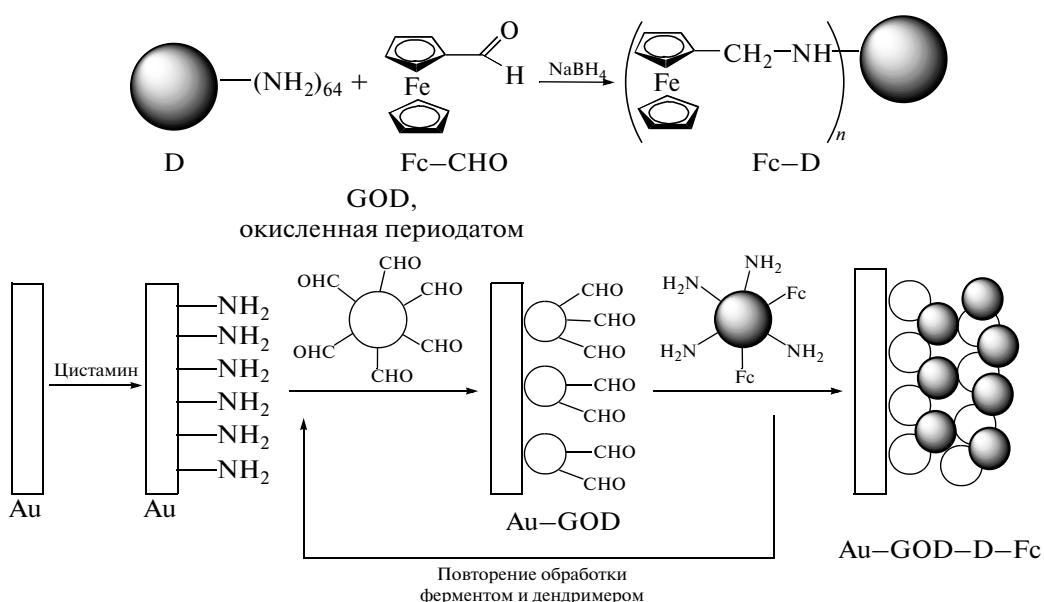
Фермент	Определяемое соединение	Дендример (редокс-активная группа)	Аналитические характеристики*	Литература
Глюкозооксидаза	Глюкоза	ПАМАМ (ферроцен)	$c_{\text{в}} 40 \text{ мМ}$ , $c_{\text{min}} 1 \text{ мкМ}$ , время отклика 6 с	[38]
	То же	ПАМАМ (наночастицы золота)	ДОС 1–5 мМ, $c_{\text{min}} 0.6 \text{ мМ}$	[40]
	»	То же	ДОС 0.1–15.8 мкМ, $c_{\text{min}} 0.05 \text{ мкМ}$ , чувствительность $2.9 \text{ мкА} \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-2}$ , время отклика менее 5 с	[41]
	»	ПАМАМ (наночастицы платины)	ДОС 0.02–10 мМ, $c_{\text{min}} 4 \text{ мкМ}$	[42]
	»	ПАМАМ (наночастицы платины), диоксид титана	ДОС 2 мкМ–12 мМ, $c_{\text{min}} 1 \text{ мкМ}$ , время отклика менее 3 с	[43]
	»	Порфириновый комплекс кобальта	$c_{\text{в}} 1 \text{ мМ}$ , $c_{\text{min}} 5.33 \text{ мкМ}$ , чувствительность $16.57 \text{ мкА} \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-2}$ , измерение в присутствии аскорбиновой и мочевой кислоты	[44]
	»	ПАМАМ (пероксидаза)	Время жизни биосенсора 68 дней	[45]
Глюкозооксидаза–пероксидаза	»	Полиглицерин	ДОС 1–50 мМ, время жизни 60 ч	[46]
Глюкозооксидаза, стрептокиназа	»	ППИ	$c_{\text{в}} 4 \text{ мМ}$ , $c_{\text{min}} 12.8–22.1 \text{ мкМ}$ , чувствительность $0.51 \text{ мкА} \text{ мМ}^{-1}$	[47]
Глюкозооксидаза (ингибирование)	Ртуть(II)	ПАМАМ	$c_{\text{min}} 100 \text{ нМ}$	[48, 49]
Лакказа	Катехол	ПАМАМ (наночастицы золота)	ДОС 0.1–50 мкМ, $c_{\text{min}} 0.05 \text{ мкМ}$	[50]
Тирозиназа	Пеницилламин	То же	$c_{\text{min}} 54 \text{ нМ}$	[51]
Холинэстераза, холиноксидаза	Ингибиторы	ПАМАМ	$c_{\text{min}} 1.3 \times 10^{-3}$ (ДДВФ)**, 0.01 (карбофуран), 0.03 (эзерин) мкг/кг	[52, 53]
Ацетилхолинэстераза	Карбофуран	ПАМАМ (наночастицы золота)	ДОС 4.8–90 нМ, $c_{\text{min}} 4.0 \text{ нМ}$	[54]
Фруктозодегидрогеназа	Фруктоза	ПАМАМ (феррицианид)	ДОС 0.25–5.0 мМ, время отклика 35 с	[55]
Алкогольдегидрогеназа, пиранозооксидаза	Этанол, глюкоза	ПАМАМ	$c_{\text{в}} 0.5 \text{ мМ}$ , 11 ч работы в потоке	[56]
Алкогольоксидаза	Этанол	То же	ДОС 0.025–1.0 мМ, $c_{\text{min}} 0.016 \text{ мМ}$ , время отклика 100 с	[57]

\*  $c_{\text{в}}$  – верхняя граница диапазона определяемых содержаний, ДОС – диапазон определяемых содержаний,  $c_{\text{min}}$  – предел обнаружения.

\*\* ДДВФ – диметилдихлорвинилфосфат.

В качестве матрицы для иммобилизации глюкозооксидазы использовали гибридный материал, включающий мезопористые частицы оксида кремния и наночастицы платины, инкапсулированные в ПАМАМ и размещенные на поверхно-

сти стеклоуглерода [42]. Присутствие наночастиц платины в модифицирующем слое облегчает перенос электрона между активным центром фермента и электродом и повышает чувствительность определения глюкозы с помощью ЦВА.



**Рис. 3.** Модификация дендримера (D) ферроценом (Fc) и послойная иммобилизация на золотом электроде предварительно окисленной периодатом глюкозооксидазы (GOD) и дендримера с ковалентно пришитым ферроценом.

Аналогичная медиаторная система была включена в нанотрубки диоксида титана [43].

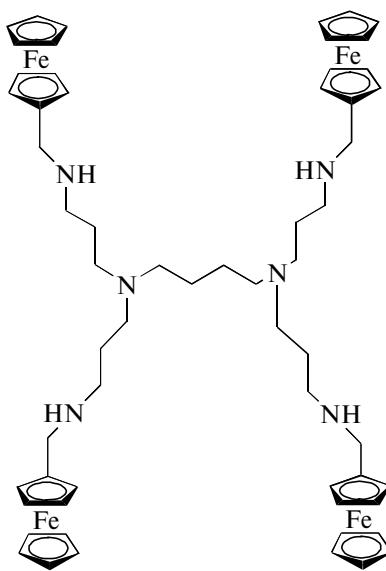
Описан [44] прямой электронный перенос на глюкозооксидазу, иммобилизованную на стеклоуглеродном электроде, модифицированном дендритным полипропиленом-тетракис(2-тиенил)порфиринатом кобальта(II) и одностенными углеродными нанотрубками. Иммобилизованная глюкозооксидаза демонстрирует обратимую реакцию быстрого переноса электрона (константа скорости  $1.01 \text{ с}^{-1}$ ) с низким потенциалом измерения вольтамперометрического отклика ( $-0.2 \text{ В}$ ). Возможно измерение уровня глюкозы на фоне  $0.2 \text{ мМ}$  мочевой и аскорбиновой кислот.

ПАМАМ с ковалентно пришитой пероксидазой использовали для физической адсорбции глюкозооксидазы путем ее включения в полиелектролитные комплексы с поликарболовой кислотой на золотом электроде [45]. Особенностью предлагаемого способа иммобилизации является зависимость характеристик покрытия от pH среды. В кислой среде за счет депротонирования катионных компонентов слой сжимался, защищая ферменты от внешнего воздействия, а в нейтральной и слабощелочной средах восстанавливал свою активность. Аналитические характеристики биосенсора в работе не приводятся.

Полиглицерин 4 поколения (48 гидроксидных групп на молекулу) использовали для иммобилизации глюкозооксидазы и стрептокиназы и создания биосенсора для определения глюкозы и оценки совместимости крови [46]. Ферменты иммобилизовали путем ковалентного присоединения к терминальным гидроксидным группам с помо-

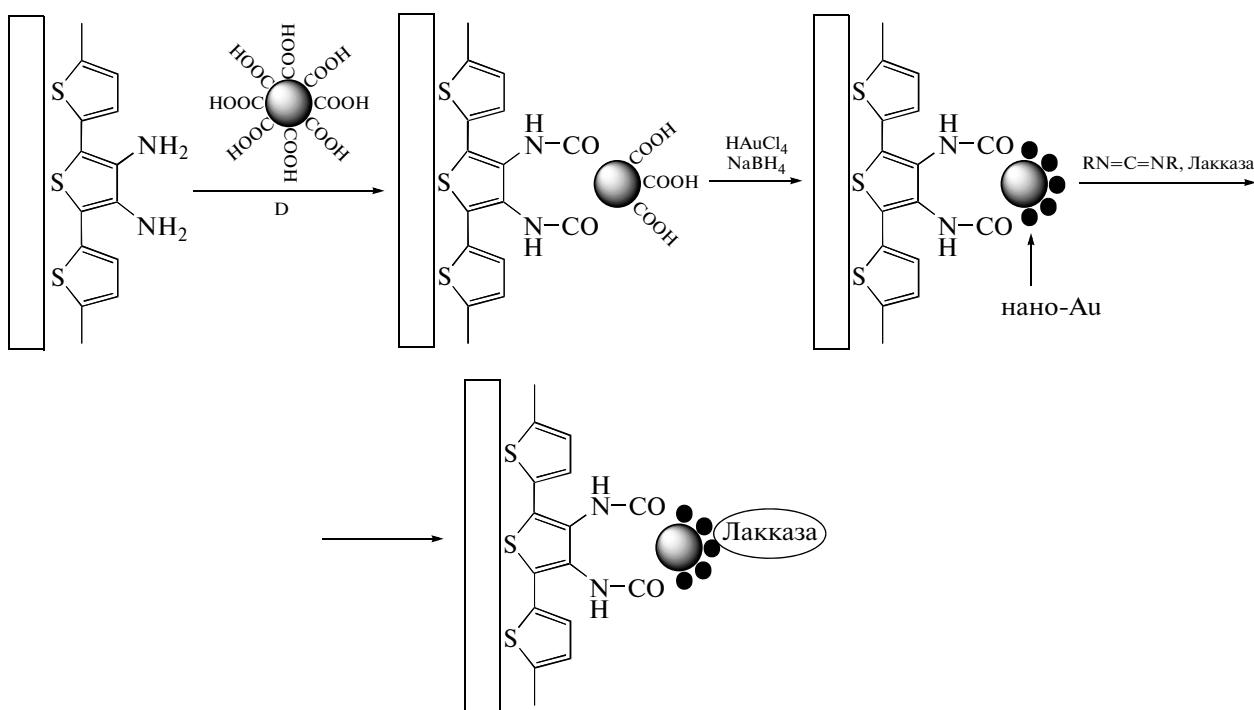
щью 1-циано-4-(диметиламино)пиридиний тетрафторбората. Дендример совместно с фосфолипидом электростатически иммобилизовали на пленке полианилина, получаемой электрохимически на платиновом электроде.

Совместную иммобилизацию глюкозооксидазы и пероксидазы использовали для чувствительного определения глюкозы с помощью сенсора на основе электрода, модифицированного ППИ 1–3 поколения 3 с терминальными метилферроценильными фрагментами [47] (рис. 3).



Строение дендримера 3.

Дендример 3 осаждали из дихлорметана на платиновом электроде с последующей иммобилиза-



**Рис. 4.** Лакказный сенсор на основе электрода, модифицированного политиофеном и композитом дендримера ПАМАМ с наночастицами Au.

цией пероксидазы и глюкозооксидазы кросс-широкой парами глутарового альбумина. Максимальный отклик зафиксирован для поверхностной концентрации дендримера  $1.8 \times 10^{-9}$  моль/см<sup>2</sup> (в пересчете на ферроцен). При переходе от первого к третьему поколению дендримера предел обнаружения глюкозы повышался от 12.8 до 22.1 мкМ из-за стерических препятствий электронного обмена и снижения эффективности медиаторного переноса электрона.

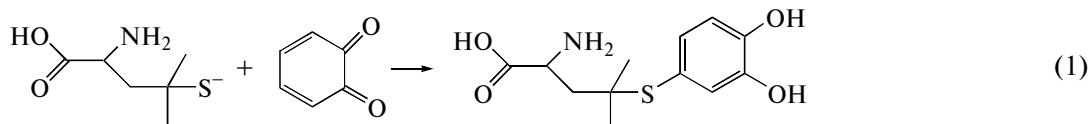
Монослои ПАМАМ использовали для физической адсорбции глюкозооксидазы на золотых электродах пьезокварцевых преобразователей сигнала [48]. Полученные глюкозные сенсоры апробированы для определения неорганической ртути, ингибитора фермента [49].

Обобщая результаты, полученные с помощью глюкозных сенсоров с включением дендримеров, можно отметить значительное различие в достигнутых характеристиках определения субстрата. Однако следует иметь в виду, что задачи определения глюкозы в биологических жидкостях и продуктах питания не связаны с определением сверхнизких содержаний, поэтому основное внимание исследователи уделяют стабилизации отклика и увеличению времени жизни биосенсора.

Кроме глюкозооксидазы применяют дендримеры в составе биосенсоров на основе ряда других ферментов. Так, установлен прямой электронный перенос с участием лакказы, ковалентно связанной с дендримером ПАМАМ с концевыми

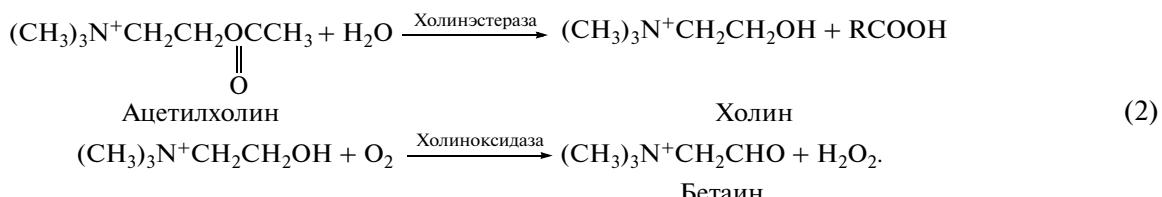
карбоксилатными группами (3 поколение), содержащим наночастицы золота [50]. Дендример ковалентно пришивали карбодиимидным способом к аминогруппам полимера диаминопроизводного тиофена, находящегося на электроде (рис. 4). Поверх слоя дендримера аналогичным образом ковалентно связывали лакказу. Скорость гетерогенного переноса электрона ( $1.28 \text{ с}^{-1}$ ) сопоставима с характеристикой фермента, включенного в липидные бислои. Электрокаталитические свойства полученного ферментного сенсора изучали в реакции окисления катехола. Исключение наночастиц золота из состава дендримера повышало нижнюю границу определяемых содержаний и предел обнаружения катехола в 5 раз, что свидетельствует об их участии в электронном переносе в пределах слоя.

Композит ПАМАМ (4 поколение) и наночастиц Au, ковалентно связанный со слоем 3-меркаптопропионовой кислоты на золотом электроде, использовали для сорбционной иммобилизации тирозиназы [51]. Присутствие наночастиц Au снижает сопротивление переноса заряда модифицирующего слоя в 3.5 раза по сравнению с гладким золотом. Биосенсор использовали для определения пеницилламина по реакции с продуктом ферментативного окисления катехола, субстрата тирозиназы – реакция (1). Этот сенсор может найти применение в контроле данного препарата в его лекарственных формах.



Разработаны холинэстеразные сенсоры на основе Au и углеродных электродов, в которых ПАМАМ (4 поколение) использовали как матрицу для иммобилизации ацетил- и бутирилхолинэстеразы [52, 53]. Дендримеры перед нанесением на золотой электрод смешивали с 1-гексадекантиолом, который, связываясь с золотом

посредством связей Au—S, формировал поверхностный слой, удерживающий дендример за счет гидрофобных взаимодействий. Сигналом биосенсора служил ток окисления пероксида водорода, образующегося в последовательности реакций (2) ферментативного превращения ацетилхолина.



Ферментные сенсоры демонстрировали высокую чувствительность сигнала к специфическим ингибиторам холинэстеразы, превышающую чувствительность аналогичного биосенсора, в котором ферменты иммобилизовали на пленке полианилина [53]. Это связано с благоприятной пространственной организацией поверхностного слоя и электростатическим контролем переноса заряженного субстрата.

Карбофуран определяли по его ингибирующему действию на ацетилхолинэстеразу, иммобилизованную методом послойного нанесения (*layer-by-layer*) совместно с углеродными нанотрубками и ПАМАМ с наночастицами золота [54]. Модифицирующая пленка улучшала электрохимические характеристики сенсора и условия измерения сигнала.

Электрохимический биосенсор на фруктозу получен путем иммобилизации фруктозодегидрогеназы на золотом электроде, модифицированном цистамином и ПАМАМ 2–4 поколения [55]. Сигналом служил ток диффузионно свободного медиатора (феррицианид-ион), регистрируемый при 350 мВ. Биосенсор показал высокую чувствительность определения фруктозы в пищевых продуктах, правильность результатов определения контролировали методом ВЭЖХ.

Возможен непрерывный мониторинг содержания этанола, глюкозы, растворенного кислорода и плотности клеток в культуральной жидкости для контроля технологических процессов дрожжевого брожения [56]. Для этого разработан гибридный датчик с оптоволоконным кислородным сенсором и золотым планарным электродом, модифицированным самоорганизующимся мо-

нослоем цистамина с включением ПАМАМ в качестве матрицы для сорбционной иммобилизации оксидоредуктаз. После адсорбции ферментов их подвергали кросс-сшивке глутаровым альдегидом. Гибридный сенсор обладает высокой стабильностью сигнала: после 11 ч непрерывной работы в потоке потери не превышали 6% первоначальной активности ферментов.

Разработан амперометрический биосенсор на основе алкогольоксидазы, иммобилизованной на ПАМАМ [57], с высокой стабильностью и чувствительностью сигнала на этианол. В качестве преобразователя сигнала использовали золотой электрод, покрытый монослоем цистамина. Сигналом служил ток восстановления растворенного кислорода, потребляемого при ферментативном окислении этианола. Измерение проводили при 0.7 В относительно Ag/AgCl-электрода. Биосенсор продемонстрировал стабильность — сохранение 67% первоначальной чувствительности отклика при хранении в течение 1 мес. при 4°C, воспроизводимость и субстратную специфичность отклика при определении этианола в алкогольных напитках, в том числе в режиме проточно-инжекционного анализа.

**ДНК-сенсоры.** К данной категории биосенсоров относят устройства, в состав которых присутствуют компоненты, производные от нативной ДНК или нуклеотидов, ее составляющих. Это в основном олигонуклеотиды, комплементарные ключевым последовательностям генов (ДНК-зонды) [58]. Их используют для регистрации гибридизации, свидетельствующей о присутствии соответствующих мишней в биологическом образце (как правило, после увеличения количества

генетического материала с помощью ДНК-амплификации). Такие ДНК-сенсоры применяют для диагностики заболеваний, установления полиморфизма генов, определения в пищевых продуктах тканей генномодифицированных организмов, для раннего обнаружения биомаркеров онкологических заболеваний. Помимо них, в составе ДНК-сенсоров присутствуют полностью синтетические последовательности (аптамеры), которые получают сочетанием комбинаторной химии и аффинной хроматографии для специфического связывания молекул определяемых соединений [59]. Аптамеры не имеют аналогов в составе нативной ДНК, они имеют сложную трехмерную структуру и могут включать фрагменты небиологического происхождения (гибридные молекулы ДНК-РНК [60], ковалентно пришитые флуорогены и хромофоры [61] и т.д.). Некоторые аптамеры проявляют каталитические свойства (так называемые ДНКзимы, аптазимы, рибозимы [62]). ДНК-сенсоры с включением аптамеров называют также аптасенсорами. К числу синтетических аналогов ДНК также относят пептидные нуклеиновые кислоты, в которых нуклеиновые основания входят в состав пептидной последовательности. Пептидные нуклеиновые кислоты более устойчивы к гидролизу, не несут отрицательного заряда и способны к гибридизации наряду с их природными аналогами.

Нативную ДНК в составе биосенсоров используют редко из-за трудности достижения воспроизводимого сигнала и многообразия факторов, влияющих на отклик такого биосенсора. Исключением является применение нативной ДНК для регистрации ее повреждения активными формами кислорода и для определения противораковых препаратов, повреждающих структуру ДНК раковой клетки [63].

Использование дендримеров в составе ДНК-сенсоров независимо от природы биохимического компонента имеет ряд особенностей. Во-первых, увеличивается значимость стерических факторов. Это связано с более высокими, чем для ферментов, требованиями обеспечения доступа определяемых соединений (прежде всего, олигонуклеотидов) к центрам связывания ДНК-зонда. Во-вторых, меньшее значение приобретает фактор многофункциональности молекул дендримера, поскольку размещение ДНК ограничено не столько числом поверхностных функциональных групп носителя, сколько собственными размерами молекулы биохимического рецептора. Во многих случаях решающее значение приобретает электростатический контроль иммобилизации и последующих биохимических и электрохимических реакций. Олигонуклеотиды обладают высоким отрицательным зарядом фосфатных групп остова молекулы, которые, отталкиваясь или притягиваясь к полярным группировкам дендри-

меров, определяют эффективность как переноса биомолекул в поверхностный слой, так и электрической коммуникации биосенсора при измерении сигнала. Наконец, дендримеры могут играть в ДНК-сенсорах ту же роль, что и в ферментных сенсорах (носители медиаторов или редокс-активных фрагментов), если используются как метки или как медиаторы для регистрации ферментативных реакций, применяемых для усиления сигнала ДНК-сенсоров.

Все ДНК-сенсоры с включением дендримеров можно разделить на биосенсоры с сэндвичевым форматом измерения сигнала и "безреагентные" биосенсоры. В первом случае регистрируется электрохимический сигнал метки, присоединяющейся к поверхностному слою вместе с молекулой анализа посредством двух различных ДНК-зондов, комплементарных различным участкам биологической мишени. В англоязычной литературе за ними закрепились названия "связывающий" (capture) и "регистрирующий" (signalling или reporter). В "безреагентных" ДНК-сенсорах регистрируется изменение характеристик слоя (электропроводность и проницаемость для низкомолекулярных носителей заряда) в результате присоединения биологической мишени с помощью спектроскопии электрохимического импеданса. Аналитические характеристики соответствующих биосенсоров для регистрации гибридизационных взаимодействий приведены в табл. 2.

При использовании сэндвичевого формата измерения сигнала [64] сначала биологическую мишень фиксировали на поверхности сенсора в реакции комплементарного связывания с ДНК-зондом, включенным в состав самоорганизующегося слоя меркаптопропионовой кислоты и дендримера ПАМАМ, частично модифицированного ферроценом. Далее биосенсор обрабатывали вторым олигонуклеотидом, несущим в качестве метки фермент щелочную фосфатазу. Реакцию последней с *n*-аминофенилфосфатом регистрировали амперометрически по медиаторному переносу электрона (рис. 5). Присоединение фермента-метки к слою гибридизированных олигонуклеотидов осуществляли посредством стрептавидин-биотинового связывания.

Аналогичный способ иммобилизации в самоорганизующемся слое реализован в ДНК-сенсоре с включением полиаминированного ПАМАМ как матрицы для иммобилизации олигомера, комплементарного биологической мишени [65]. После гибридизации концентрацию продукта регистрировали в сэндвичевом формате, обрабатывая электрод вторым ДНК-зондом, несущим молекулы дендримера с наночастицами Au. Сигналом служил ток редокс-индикатора – комплекса рутения(III), пропорциональный концентрации наночастиц Au в поверхностном слое.

**Таблица 2.** Характеристики ДНК-сенсоров с включением дендримеров для регистрации гибридизационных взаимодействий

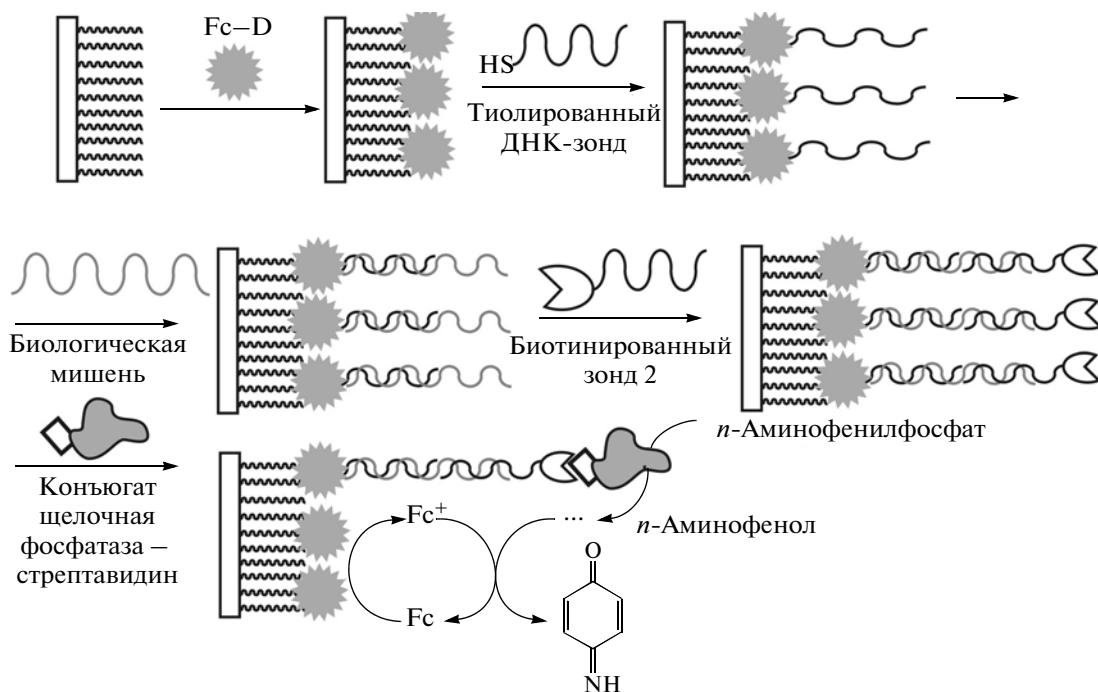
Формат измерения сигнала	Дендример (редокс-активная группа)	Аналитические характеристики определения	Литература
ДНК-сенсоры с использованием электрохимически активных меток (ферментов)			
Сэндвичевый	ПАМАМ–ферроцен	ДОС 0.1 нМ–10 мкМ комплементарной мишени	[64]
	ПАМАМ (наночастицы золота)–комплекс Ru(III)	ДОС $1.1 \times 10^{-11}$ – $2.7 \times 10^{-14}$ М комплементарного олигонуклеотида, $c_{\min} 1.4 \times 10^{-14}$ М	[65]
	ПАМАМ	ДОС 10 фМ–10 мкМ, $c_{\min} 0.45$ фМ	[68]
	ПАМАМ–ферроцен	ДОС 1 нМ–1 мкМ, $c_{\min} 1$ нМ	[69]
	Металлодендример Co(II)	$c_{\min} 3.4 \times 10^{-13}$ М (импеданс), $8 \times 10^{-12}$ М (по току дауномицина)	[67, 68]
Импедиметрические ДНК-сенсоры			
Редокс-индикатор $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	ПАМАМ в составе биологической мишени	ДОС $10^{-10}$ – $10^{-7}$ М, $c_{\min} 10^{-10}$ М	[71]
	ПАМАМ–углеродные нанотрубки	ДОС 0.5–500 пМ, $c_{\min} 0.1$ пМ	[72]
	ППИ–наночастицы золота	ДОС 0.01–5 нМ	[73]
	ПАМАМ–наноточки GaN	ДОС $10^{-18}$ – $10^{-9}$ М, $c_{\min} 0.1$ аМ	[74]
	ППИ–салицилальдиминовый комплекс Ni	$c_{\min} 5$ нМ	[75]

Помимо щелочной фосфатазы в качестве метки гибридизации комплементарных нуклеотидных последовательностей использовали эстеразу из *Alicyclobacillus acidocaldarius* [74]. Иммобилизацию тиолированного ДНК-зонда на Au-электроде осуществляли по концевой тиольной группе. Комплементарную последовательность ковалентно модифицировали с помощью дендримера ПАМАМ на ядре цистамина. Фермент-метку ковалентно связывали с концевыми аминогруппами дендримера. Образование продукта гибридизации регистрировали по концентрации продукта ферментативного гидролиза эфира нитрофенола.

Разработан электрохимический ДНК-сенсор на основе металлодендримера – производного салицилальдимина кобальта(II). В качестве биорецептора использовали аминированный 21-мерный олигонуклеотид  $\text{NH}_2\text{-}5'\text{-GAGGAGTTGGGGAG-CACATT-3'}$ , нанесенный с помощью послойной иммобилизации [68]. Комплементарный олигонуклеотид определяли по подавлению сигнала кобальта(II), измеренного с помощью квадратноволновой вольтамперометрии. Кроме того, гибридизация сопровождалась увеличением сопротивления переноса заряда, контролируемого с помощью спектроскопии электрохимического импеданса. Чувствительность импедиметрической регистрации сигнала образования продукта гибридизации со-

ставила 1.29 кОм/нмоль л<sup>-1</sup>. Кроме того, предложено регистрировать продукт комплементарных взаимодействий по току интеркалятора – соединения, встраивающегося в структуру двунитевой ДНК, но не способного к аналогичному взаимодействию с однонитевыми компонентами. В данном случае в качестве интеркалятора использовали противораковый антрациклиновый препарат дауномицин [66].

Разработан способ высокочувствительного определения ДНК по току электрокатализитического окисления гидразина, ковалентно связанного с дендримером ПАМАМ (4 поколение) с концевыми аминогруппами [67]. Схема формирования поверхностного слоя биосенсора и регистрации сигнала приведена на рис. 6. Преобразователем сигнала служит электрод, модифицированный продуктом электрополимеризации тертиофена, несущего карбоксильные группы. Далее к полимеру посредством карбодиimidного связывания ковалентно пришивается дендример, несущий наночастицы Au. Тиолированный ДНК-зонд образует монослой на золоте, а второй зонд, несущий биотин, комплементарно реагирует с продуктом взаимодействия первого зонда и определяемой последовательности. После этого к полученной конструкции присоединяется авидин-гидразид, обладающий электрокатализитическими свойства-



**Рис. 5.** ДНК-сенсор для определения гибридизации зонда с биологической мишенью с помощью сэндвичевого анализа. ДНК-зонд несет ферментную метку, присоединенную посредством стрептавидин-биотинового связывания. Сигналом служит ток окисления продукта ферментативной реакции *n*-аминофенола.

ми в реакции окисления пероксида водорода. Биосенсор характеризуется сверхвысокой чувствительностью (регистрация до 4500 молекул ДНК в 10 мкл пробы) и стабильностью отклика вследствие исключения фермента, наименее устойчивой части биосенсора.

Предложено использовать в качестве зонда пептидные нуклеиновые кислоты, включенные в самоорганизующийся слой на поверхности золотого электрода [75]. Для подавления неспецифической сорбции компонентов пробы биосенсор дополнительном обрабатывали 6-меркапто-1-гексанолом. Сигналом служил ток окисления ферроцена, ковалентно связанного с поламинированным дендримером ПАМАМ (сэндвичевый формат анализа), который регистрировали с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии при 0.3 В.

*Импедиметрические ДНК-сенсоры* регистрируют изменение сопротивления переноса заряда из-за уплотнения поверхностного слоя при включении в него объемной молекулы дендримера, либо электростатического отталкивания отрицательно заряженного редокс-индикатора (феррицианидионы) при увеличении заряда двунитевой ДНК относительно заряда зонда. Разработанные конструкции биосенсоров различаются строением поверхностного слоя и природой ДНК-зонда.

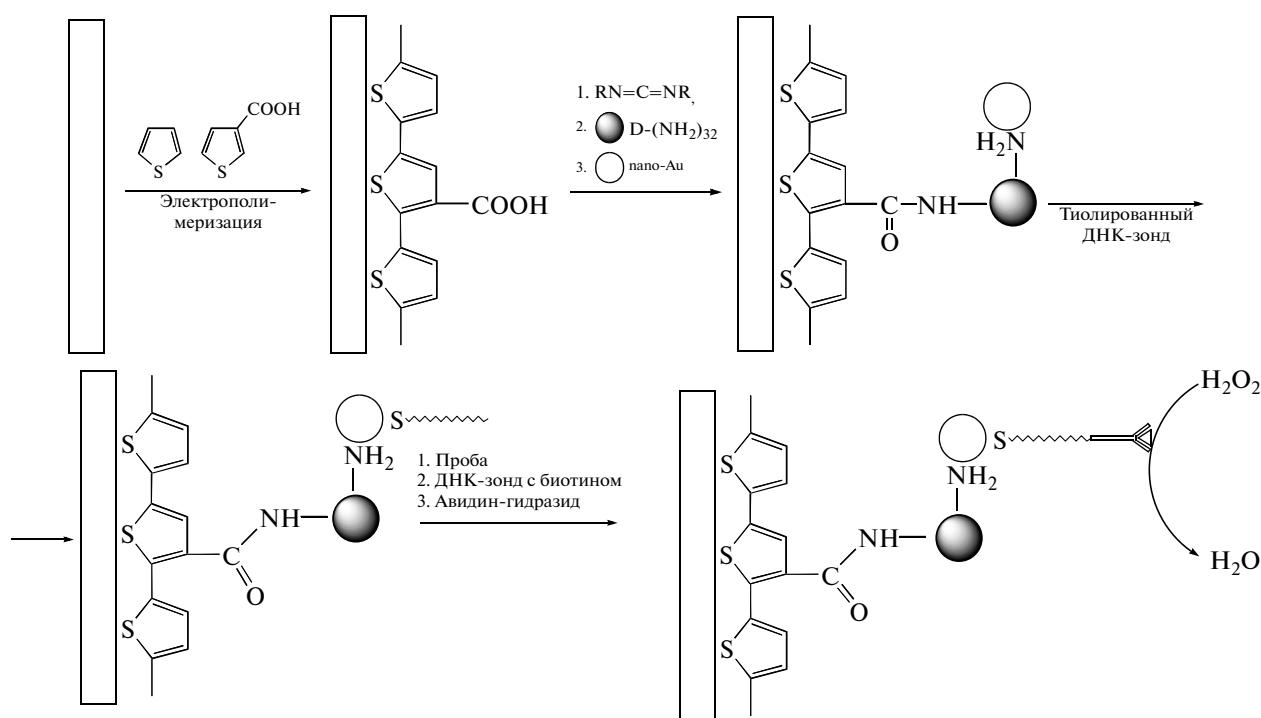
Описана иммобилизация аминированного ДНК-зонда к меркаптоуксусной кислоте в составе

монослоя на золотом электроде. Взаимодействие с меченной дендримером биологической мишенью приводило к резкому увеличению концентрации отрицательно заряженных олигонуклеотидов вблизи электрода и повышению сопротивления ДНК [69]. Аналогичным образом регистрировали гибридизацию ДНК при иммобилизации зонда на поверхности слоя углеродных нанотрубок [70].

ППИ (4 поколение) [71] использовали как матрицу для наночастиц Au, на поверхности которых закрепляли тиолированный ДНК-зонд. Сигналом сенсора служило изменение сопротивления переноса заряда в результате связывания комплементарного олигонуклеотида.

Дополнительное уплотнение поверхностного слоя происходит при иммобилизации дендримера ПАМАМ (4.5 поколение) совместно с нанотрубками нитрида галлия [72]. При этом существенно увеличивается регулярность и плотность заполнения поверхности электрода, что позволяет регистрировать вплоть до 0.1 аттомоль целевой последовательности ДНК в пробе. Использование наноточек позволяет контролировать процедуру иммобилизации по уровню флуоресценции слоя.

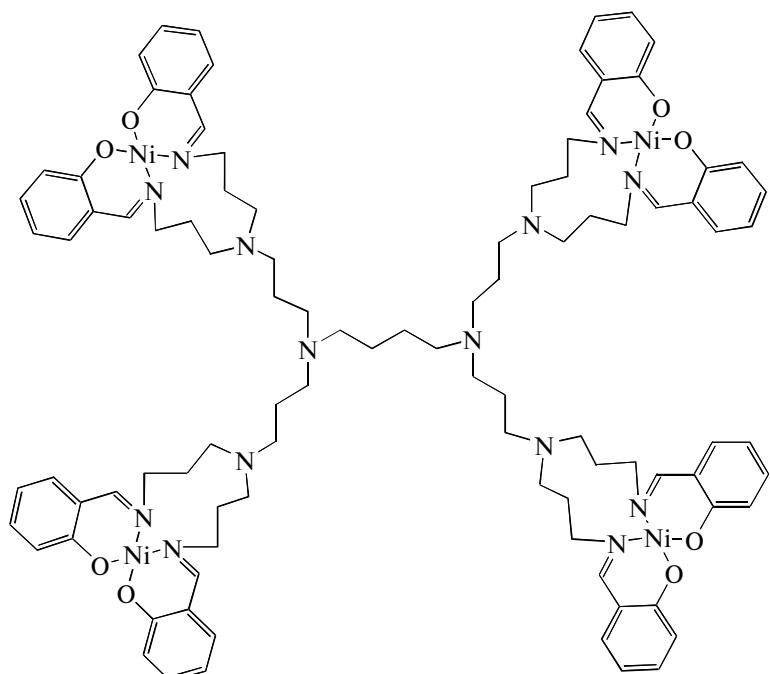
Разработан ДНК-сенсор на основе никельсодержащего производного 4 дендримера ППИ (1–3 поколение) [73]. Дендример демонстрировал процесс обратимого окисления–восстановления



**Рис. 6.** ДНК-сенсор для регистрации гибридизационных взаимодействий на основе электрода, модифицированного политиофеном, дендримером ПАМАМ и наночастицами золота. Сигналом является ток электрокаталитического окисления гидразина.

комплекса никеля(II) в поверхностном слое при достаточно высокой его проницаемости для но-

сителей заряда (коэффициент диффузии  $3.6 \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ ).



Строение дендримера 4.

Гибридизация увеличивала электронный обмен и ток восстановления феррицианида, однако сопротивление на межфазной границе при этом увеличивалось из-за включения в него непроводящего олигонуклеотида — мишени.

**Аптасенсоры.** Выше отмечено, что аптасенсоры содержат в составе чувствительного слоя синтетические олигонуклеотиды (аптамеры), не имеющие структурных аналогов в нативной молекуле ДНК. Для разработки новых способов регистрации сигнала часто используют аптамеры на тромбин — сериновую протеазу,ирующую в свертывании крови. Для тромбина получены несколько типов аптамеров, специфичных к гепарин- и фибриноген-связывающим участкам белка. Разработан импедиметрический сенсор, в котором аптамер 5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GGTTGGTGTGGTGG-3' иммобилизовали с помощью кросс-шивки глутаровым альдегидом к концевым аминогруппам ПАМАМ (4 поколение) [76]. Сам дендример был ковалентно связан с поверхностью золотого электрода, модифицированного цистамином, по аналогичной реакции. Аптасенсор позволяет определять 1–50 нМ тромбина по величине сопротивления переноса заряда, измеряемого в присутствии феррицианид-ионов как редокс-индикаторов.

Двойное — ферментативное и электрокаталитическое — усиление сигнала реализовано в аптасенсоре на тромбин, включающем аптамер 5'-SH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GTTGGTGTGGTGG-3' на поверхности наночастиц Au [77]. Частицы получали восстановлением тетрахлорозолотой кислоты боргидридом натрия в присутствии ПАМАМ (поколение 4.5) с карбоксильными концевыми группами. Тромбин, связываясь с аптамером, фиксировал агрегаты дендримера с наночастицами на поверхности золотого электрода. Образование комплекса регистрировали с помощью индикаторной реакции окисления глюкозы в присутствии глюкозодегидрогеназы. Наночастицы Au специфично окисляют кофактор данного фермента, NADH (никотинамидаденин динуклеотид), обеспечивая каталитический цикл, а присутствие дендримера как матрицы, удерживающей наночастицы, многократно умножает число превращающихся молекул субстрата в расчете на одну молекулу тромбина. Аптасенсор позволяет определять  $1.0 \times 10^{-14}$ – $5.0 \times 10^{-9}$  М тромбина ( $c_{\min} 3.3 \times 10^{-15}$  М).

Тот же принцип мультиплексности реализован в биосенсоре, занимающем промежуточное положение между ДНК- и аптасенсором [78]. В нем используют Au электрод, покрытый монослоем тиолированного ДНК-зонда. Его включают в реакцию гибридизации с комплементарными последовательностями, присоединенными к наночастицам Au. Стерический контроль реакции гибридизации обеспечивается размерами наночастиц, которые не допускают участия в реак-

ции всех олигонуклеотидов на их поверхности. В результате формируется дендримерный высококорпистый слой, в котором связи между повторяющимися фрагментами обеспечивают короткие участки гибридированных фрагментов ДНК-зондов. После такой модификации к оставшимся свободными зондам присоединяют квадруплексы — особые формы аптамеров с центральным плоским квадратом гуаниновых остатков. Данный аптамер специфически связывается с миоглобином, играющим роль медиатора электронного переноса. Поскольку миоглобин при такой архитектуре поверхностного слоя располагается далеко от электрода, его присутствие регистрируют по оксидазной функции в биокаталитическом восстановлении пероксида водорода. Органическим субстратом этой реакции служит фенотиазиновый краситель метиленовый синий, ток которого регистрируют с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии. Биосенсор имеет высокую чувствительность отклика в отношении олигонуклеотидной последовательности, использованной для “сборки” дендримерной конструкции. Сигнал метиленового синего пропорционален логарифму концентрации аналита в интервале концентраций 1.0 фМ–10 нМ ( $c_{\min} 0.5$  фМ).

**Иммуносенсоры.** Применение дендримеров в составе иммуносенсоров обусловливает схемы определения, во многом аналогичные применяемым в ДНК-сенсорах (см. прямое сравнение ДНК- и иммуносенсоров [69]). В сэндвичевом варианте иммуноанализа последовательно прибавляют реагенты, несущие определяемые и видоспецифичные антитела, меченные ферментами или электрохимически активными комплексами. Дендримеры можно использовать как на стадии иммобилизации антител, увеличивая их поверхностную концентрацию, так и в качестве носителей меток, повышая аналитический сигнал за счет увеличения числа редокс-центров, участвующих в переносе электрона. При этом сочетание различных реагентов (антитела, метки, дендримеры) в иммуносенсорах в целом осуществляется проще, чем в ДНК-сенсорах, за счет значительно большего числа потенциальных центров связывания — функциональных групп белков. Предпочтение отдается карбодиimidному связыванию, хотя электростатическая адсорбция и включение в полимерные пленки, в том числе белковые матрицы альбумина и желатина, также дают удовлетворительные результаты. Особенностью иммуносенсоров независимо от способа регистрации сигнала является нелинейный сigmoidный характер градиуровочной зависимости обычно в координатах сигнал метки — логарифм концентрации аналита. Чувствительность метода выражают величиной предела обнаружения, медианы (концентрации, отвечающей 50%-ному изменению

Таблица 3. Аналитические характеристики иммуносенсоров с включением дендримеров

Аналит	Метка	Состав слоя	$c_{min}$	Литература
Антитела к биотину	Щелочная фосфатаза	Стеклоуглерод, покрытый аддуктом ПАМАМ–ферроцен и антителами	0.1 мкг/мл	[79]
Иммуноглобулины мыши IgG	То же	Электрод из оксида индия и олова (ITO) с физически адсорбированным аддуктом ПАМАМ–ферроцен	10 пг/мл (100 фг/мл в присутствии гидразина)	[81]
Биомаркеры рака легких (аннексин II и MUC5AC)	Глюкозооксидаза	Стеклоуглеродный электрод, покрытый карбоксилированным политиофеном с наночастицами золота, дендримером и антителами	0.051 нг/мл аннексина II	[82]
Антитела к биотину	Пероксидаза	Золотой тонкопленочный электрод с физически адсорбированным аддуктом ПАМАМ–ферроцен, стрептавидин и антитела	1 нМ	[83]
Альфа-фетопротеин	То же	Стеклоуглеродный электрод, покрытый наночастицами золота с ковалентно пришитым ПАМАМ и антителами	1 нг/мл	[84]
Сальбутамол	»	Золотой электрод, модифицированный композитом хитозана, феррита, ПАМАМ и наночастиц золота	0.06 нг/мл	[85]
Бенз[а]пирен	»	Золотой электрод, покрытый аминированным политиофеном с ковалентно пришитым ПАМАМ	6.0 пг/мл	[86]
Бреветоксин В	»	Золотой электрод, модифицированный коньюгатом альбумина с бреветоксином	0.01 нг/мл	[87]
Антigen рака простаты	»	Стеклоуглеродный электрод, модифицированный золотыми наночастицами, инкапсулированными ПАМАМ, углеродными нанотрубками и хитозаном в ионной жидкости	1 пг/мл (вольтамперометрия), 0.48 пг/мл (импедиметрия)	[88]

сигнала относительно достигаемого максимума) либо интервалом концентраций, в пределах которого наблюдается изменение сигнала метки. Из них только предел обнаружения приводится во всех публикациях. Аналитические характеристики иммуносенсоров с включением дендримеров приведены в табл. 3.

Использовали сэндвичевый вариант иммуноанализа, в котором видоспецифичные антитела коньюгированы с щелочной фосфатазой [79]. Концентрацию фермента регистрировали по току медиатора – ферроцена, ковалентно связанного с ПАМАМ, при добавлении в раствор *n*-аминофенилфосфата, субстрата фермента.

Оценена чувствительность регистрации наночастиц Ag, инкапсулированных в ПАМАМ 5–7 поколения на основе ядра этилендиамина с концевыми гидроксильными группами [80]. Концентрацию метки определяли методом инверсионной вольтамперометрии, растворив Ag в азотной кислоте. Предел обнаружения 22.5 фемтомоль серебра(I) в 25 мл раствора.

Разработан иммуносенсор на основе металлооксидного электрода ITO (оксид индия и олова), покрытого дендримером ПАМАМ (поколение 4) с ферроцильными концевыми группами [81]. Антитела иммобилизовали посредством стрептавидин-биотинового связывания. Меткой служила щелочная фосфатаза, сигнал которой усиливали, вводя в систему гидразин для регенерации аминофенола из продукта его анодного окисления. Установлена зависимость чувствительности иммуносенсора от поверхностной концентрации дендримера и степени его дериватизации ферроценовыми фрагментами (5–20% концевых групп).

Для диагностики рака легких разработан амперометрический иммуносенсор [82], для изготовления которого на Au-электроде электрохимически получали композитное покрытие политиофена, несущего карбоксильные группы, с включением наночастиц Au. Поламинированный дендример ковалентно сшивали с композитным слоем, далее на него аналогичным образом наносили антитела на аннексин II и гидразин. Сигналом служил ток

биоэлектрокаталитического восстановления пероксида водорода, образующегося в реакции окисления глюкозы ферментом глюкозооксидазой, использованной в качестве метки. Гидразин выполнял функции катализатора указанной реакции, повышая чувствительность регистрации отклика. Иммуносенсор прошел испытания в анализе секрета сквамозных метапластиических клеток (уровень содержания аннексина II  $280 \pm 8.0$  пг/мл).

Предложен [83] универсальный способ регистрации сигнала иммуносенсора, включающего в качестве метки пероксидазу. Золотой электрод покрывали дендримером ПАМАМ с концевыми ферроценильными фрагментами, на поверхности которого с помощью биотинированного эфира сукциниамида закрепляли коньюгаты стрептавидина и специфических антител. Сигнал иммунной реакции с участием меченых пероксидазой антител регистрировали с помощью 4-хлор-1-нафтола. Его окисление сопровождается образованием полимерного непроводящего осадка, блокирующего перенос электрона с ферроценильных фрагментов дендримера.

Описана [84] аналогичная методика измерения сигнала. Амперометрический иммуносенсор для определения альфа-фетопротеина включает стеклоуглеродный электрод, модифицированный наночастицами Au размером 100 нм, покрытыми 2-аминоэтантионом в качестве линкера и дендримером ПАМАМ (поколение 1.5) с помощью карбодиимидного связывания. На поверхности дендримера тем же способом закрепляли моноклональные антитела. Концентрацию фетопротеина измеряли с использованием коньюгата антител с пероксидазой, реакцию которой с тионином регистрировали с помощью циклической линейной и линейно-ступенчатой вольтамперометрии. Достигнутые с помощью иммуносенсора уровни чувствительности определения фетопротеина достаточны для его клинического использования при прогнозировании развития беременности и онкологических заболеваний.

Для усиления сигнала метки в сэндвичевом варианте иммуноопределения сальбутамола использовали агрегаты хитозана, частиц феррита, ПАМАМ и наночастиц Au [85]. Пероксидазу включали в состав коньюгата антител на углеродных нанотрубках. Это позволило получить электрокаталитический отклик восстановления пероксида водорода и снизить более чем на 2 порядка предел обнаружения аналита. В оптимальных условиях измерения диапазон линейности для сальбутамола составил 0.11–1061 нг/мл.

Иммуносенсор на бенз[а]пирен [86] включает композиты ПАМАМ и наночастиц силиката с адсорбированным метиленовым синим, субстратом пероксидазы. Вторичные антитела коньюгиравали с пероксидазой. Для улучшения иммобилиза-

ции коньюгата антигена электрод покрывали продуктом полимеризации 2-амино-5,2':5'2"-тертиофена с ковалентно связанным ПАМАМ (поколение 2). Диапазон определяемых содержаний составил от 0.01 до 2.0 нг/мл.

Предложено [87] конкурентное определение бреветоксина В в пищевых продуктах. На поверхности сенсора иммобилизовали коньюгат аналита с альбумином на наночастицах Au, инкапсулированных в ПАМАМ. Активность пероксидазы в составе коньюгата с антителами определяли с помощью пероксида водорода и *o*-фенилендиамина. Иммуносенсор позволяет определять 0.03–8 нг/мл бреветоксина.

Антиген, специфичный раку простаты, определяли с помощью импедиметрического и вольтамперометрического сенсора на основе Au-электрода, модифицированного композитным слоем, включающим тиолированное производное ПАМАМ, многостенные углеродные нанотрубки и хитозан в ионной жидкости 1-бутилметилпиридиний-бис(трифторметилсульфонил)имид [88]. В вольтамперометрическом варианте использовали пероксидазный коньюгат, а в состав слоя дополнительно вводили тионин как субстрата фермента. В импедиметрическом варианте включение антигена в состав слоя регистрировали по увеличению сопротивления переноса заряда. Иммуносенсор характеризуется высокой стабильностью отклика: через 21 день после изготовления сохраняется до 90% исходного значения сигнала.

Анализ представленных данных по применению дендримеров в составе электрохимических сенсоров подтверждает перспективность указанных материалов, связанную с их уникальными свойствами. Дендримеры способны эффективно инкапсулировать наночастицы металлов и нести редокс-медиаторы, ковалентно связанные с концевыми функциональными группами. Липофильность и растворимость в воде контролируются как размерами молекулы (поколением дендримера), так и функционализацией поверхностного слоя. В отличие от гидрофильных полимеров, дендримеры демонстрируют монодисперсность состава и возможность точечной иммобилизации, что упрощает конструирование биочувствительного слоя и повышает воспроизводимость характеристик биосенсоров. Коммерчески доступные препараты ПАМАМ составляют абсолютное большинство представленных примеров реализации преимуществ дендримеров, однако появляются исследования и с другими структурами. В перспективе следует ожидать дальнейшего увеличения числа публикаций, посвященных функциональному усложнению дендримеров, в частности, их сочетанию с короткими биополимерами, такими как олигонуклеотиды или рецепторные белки. Применение дендримеров в составе био-

сенсоров связано также с их возможным применением в составе средств доставки лекарственных препаратов, ПАВ и катализитических систем.

Особо следует отметить применение наночастиц металлов, синтезированных в присутствии дендримеров, выполняющих функции стабилизаторов и инкапсулирующих составов. Высокая стабильность таких гибридных структур, сохранение электрохимической активности наночастиц в составе дендримеров, как и их совместимость с различными методами иммобилизации биопрепаратов выгодно отличают такие материалы от супензий наночастиц, полученных по стандартным методикам – восстановлением в присутствии цитратов, ПАВ, электрохимическим диспергированием и другими способами.

Важным преимуществом дендримеров является также дискретность изменения их свойств при изменении числа оболочек (поколения дендримера). Это позволяет выявить роль структурных и стерических факторов в переносе электрона в поверхностном слое, а также подобрать оптимальный его состав в зависимости от решаемой аналитической задачи.

Таким образом, применение дендримеров в составе электрохимических биосенсоров можно рассматривать как перспективное направление не только электроанализа, но и смежных областей, связанных с катализом, синтезом гибридных органико-неорганических материалов, развитием химических сенсоров для определения биологически активных соединений и инструментальных средств медицинской диагностики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mehdi A., Reye C., Corriu R. // Chem. Soc. Rev. 2010. V. 40. P. 563.
2. Hasirci V., Vrana E., Zorlutuna P., Ndreu A., Yilgor P., Basmanav F.B., Aydin E. // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 2006. V. 17. P. 1241.
3. Satija J., Saib V.V.R., Mukherji S. // J. Mater. Chem. 2011. V. 21. P. 14367.
4. Sato K., Anzai J. // Molecules. 2013. V. 18. P. 8440.
5. Hasirci V., Vrana E., Zorlutuna P., Ndreu A., Yilgor P., Basmanav F.B., Aydin E. // J. Biomater. Sci. Polymer. 2006. V. 11. P. 1241.
6. Flory P. // J. Am. Chem. Soc. 1941. V. 63. P. 3083.
7. Newkome G.R., Yao Z., Baker G.R., Gupta V.K. // J. Org. Chem. 1985. V. 50. P. 2003.
8. Hawker C.J., Frechet J.M.J. // J. Am. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 7638.
9. Tomalia D.A. // Macromol. Symp. 1996. V. 101. P. 243.
10. Grayson S.M., Frechet J.M.J. // Chem. Rev. 2001. V. 101. P. 3819.
11. Labbe G., Forier B., Dehaen W. // Chem. Commun. 1996. V. 18. P. 2143.
12. Ihre H., Hult A., Frechet J.M.J., Gitsov I. // Macromolecules. 1998. V. 31. P. 4061.
13. Kawaguchi T., Walker K.L., Wilkins C.L., Moore J.S. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 2159.
14. Zeng F., Zimmerman S.C. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 5326.
15. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P. // Polymer J. 1985. V. 17. № 1. P. 117.
16. Park J.Y., Kwon S.H., Park J.W., Park S.M. // Anal. Chim. Acta. 2008. V. 619. № 1. P. 37.
17. Launay N., Caminade A.M., Majoral J.P. // J. Organomet. Chem. 1997. V. 529. P. 51.
18. Hourani R., Whitehead M.A., Kakkar A. // Macromolecules. 2008. V. 41. № 3. P. 508.
19. Ito Y., Washio I., Ueda M. // Macromolecules. 2008. V. 41. № 8. P. 2778.
20. Kozaki M., Tujimura H., Suzuki S., Okada K. // Tetrahedron Lett. 2008. V. 49. P. 2931.
21. Kozaki M., Okada K. // Org. Lett. 2004. V. 6. № 4. P. 485.
22. Wong K.T., Lin Y.H., Wu H.H., Fungo F. // Org. Lett. 2007. V. 9. № 22. P. 4531.
23. Liu Y.C., Chen H.L., Su C.J., Lin H.K., Liu W.L., Jeng U.S. // Macromolecules. 2005. V. 38. № 23. P. 9434.
24. Sommerdijk N.A.J.M., Wright J.D. // J. Sol-Gel Sci. Technol. 1998. V. 13. P. 565.
25. Garcia-Martinez J.G., Crooks R.M. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 16170.
26. Esumi K., Suzuki A., Yamahira A., Torigoe K. // Langmuir. 2000. V. 16. P. 2604.
27. Manna A., Imae T., Aoi K., Okada M., Yogo T. // Chem. Mater. 2001. V. 13. P. 1674.
28. Pietsch T., Appelhans D., Gindy N., Voit B., Fahmi A. // Colloids Surfaces A. 2009. V. 341. P. 93.
29. Ju-Nam Y., Lead J.R. // Sci. Total Environ. 2008. V. 400. P. 396.
30. Kim Y.-G., Oh S.-K., Crooks R.M. // Chem. Mater. 2004. V. 16. P. 167.
31. Taubert A., Wiesler U.-M., Müllen K. // J. Mater. Chem. 2003. V. 13. P. 1090.
32. Wilson O.M., J.Scott R.W., Garcia-Martinez J.C., Crooks R.M. // Chem. Mater. 2004. V. 16. P. 4202.
33. Garcia-Martinez J.C., Crooks R.M. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 16170.
34. Wang A., Ornelas C., Astruc D., Hapiot P. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 6652.
35. Huo J., Wang L., Yu H., Deng L., Ding J., Tan Q., Liu Q., Xiao A., Ren G. // J. Phys. Chem. B. 2008. V. 112. P. 11490.
36. Sobrangsingh D., Kaifer A.E. // Langmuir. 2006. V. 22. P. 10540.
37. Hogan C.F., Harris A.R., Bond A.M., Slyc J., Crossley M.J. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2006. V. 8. P. 2058.
38. Yoon C.H., Hong M.-Y., Kim H.-S. // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 4420.
39. Frasconi M., Deriu D., Dannibale A., Mazzei F. // Nanotechnology. 2009. V. 20. № 50. P. 501.
40. Karadag M., Geyik C., Demirkol D.O., Ertas F.N., Timur S. // Mater. Sci. Eng. C. 2013. V. 33. P. 634.

41. Wei Y., Li Y., Zhang, N. Shi G., Jin L. // Ultrasonics Sonochem. 2010. V. 17. № 1. P. 17.
42. Han X., Zhu Y., Yang X., Zhang J., Li C. // J. Solid State Electrochem. 2011. V. 15. № 3. P. 511.
43. Han X., Zhu Y., Yang X., Li C. // J. Alloys and Compounds. 2010. V. 500. № 2. P. 247.
44. Chen W., Ding Y., Akhigbe J., Brückner C., Li C., Lei Y. // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 26. № 2. P. 504.
45. Franchina J.G., Lackowski W.M., Dermody D.L., Crooks R.M., Bergbreiter D.E., Sirkar K., Russell R.J., Pishko M.V. // Anal. Chem. 1999. V. 71. P. 3133.
46. Fernandes E.G.R., De Queiroz A.A.A. // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2009. V. 20. P. 473.
47. Losada J., Zamora M., García Armada P., Cuadrado I., Alonso B., Casado C.M. // Anal. Bioanal. Chem. 2006. V. 385. P. 1209.
48. Snejdarkova M., Cvobodova L., Gajdos V., Hianik T. // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2001. V. 21. P. 1079.
49. Svobodová L., Šnejdárková M., Hianik T. // Anal. Bioanal. Chem. 2002. V. 373. P. 735.
50. Rahman A., Noh H.-B., Shim Y.-B. // Anal. Chem. 2008. V. 80. P. 8020.
51. Li N.B., Kwak J. // Electroanalysis. 2007. V. 19. P. 2428.
52. Snejdarkova M., Svobodova L., Nikolelis D.P., Wang J., Hianik T. // Electroanalysis. 2003. V. 15. P. 1185.
53. Snejdarkova M., Svobodova L., Evtugyn G., Budnikov H., Karyakin A., Nikolelis D.P., Hianik T. // Anal. Chim. Acta. 2004. V. 514. P. 79.
54. Qu Y., Sun Q., Xiao F., Shi G., Jin L. // Bioelectrochem. 2010. V. 77. № 2. P. 139.
55. Damar K., Demirkol D.O. // Talanta. 2011. V. 87. № 1. P. 67.
56. Akin M., Prediger A., Yuksel M., Höpfner T., Demirkol D.O., Beutel S., Timur S., Schepers T. // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. № 11. P. 4532.
57. Akin M., Yuksel M., Geyik C., Odaci D., Bluma A., Höpfner T., Beutel S., Timur S. // Biotech. Prog. 2010. V. 26. № 3. P. 896.
58. Tosar J.P., Branas G., Laíz J. // Biosens Bioelectron. 2010. V. 26. P. 1205.
59. Tombelli S., Minunni M., Mascini M. // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 20. P. 2424.
60. Hahn S., Mergenthaler S., Zimmermann B., Holzgreve W. // Bioelectrochem. 2005. V. 67. P. 151.
61. Hamula C.L.A., Guthrie J.W., Zhang H., Li X.-F., Le X.C. // Trends Anal. Chem. 2006. V. 25. P. 681.
62. Breaker R.R. // Current Opinion in Biotechnology. 2002. V. 13. P. 31.
63. Евтушин Г.А., Будников Г.К., Порфирьев А.В. // Рос. хим. журн. 2008. Т. 52. № 2. С. 66.
64. Kim E., Kim K., Yang H., Kim Y.T., Kwak J. // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 5665.
65. Li G., Li X., Wan J., Zhang S. // Biosens. Bioelectron. 2009. V. 24. P. 3281.
66. Zhu N., Gu Y., Chang Z., He P., Fang Y. // Electroanalysis. 2006. V. 18. P. 2107.
67. Shiddiky M.J.A., Rahman M.A., Shim Y.-B. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 6886.
68. Martinovic J., Wyk J., Mapolie S., Jahed N., Baker P., Iwuoha E. // Electrochim. Acta. 2010. V. 55. № 14. P. 4296.
69. Zhu N., Gao H., Gu Y., Xu Q., He P., Fang Y. // Analyst. 2009. V. 34. P. 860.
70. Zhu N., Gao H., Xu Q., Lin Y., Su L., Mao L. // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 25. № 6. P. 1498.
71. Arotiba O., Owino J., Songa E., Hendricks N., Waryo T., Jahed N., Baker P., Iwuoha E. // Sensors. 2008. V. 8. P. 6791.
72. Sahoo P., Suresh S., Dhara S., Saini G., Rangarajan S., Tyagi A.K. // Biosens. Bioelectron. 2013. V. 44. P. 164.
73. Arotiba O.A., Ignaszak A., Malgas R., Al-Ahmeda A., Baker P.G.L., Mapolie S.F., Iwuoha E.I. // Electrochimica Acta. 2007. V. 53. P. 1689.
74. Humenik M., Pöhlmann C., Wang Y., Sprinzl M. // Bioconjugate Chem. 2008. V. 19. P. 2456.
75. Lee J.Y., Kim B.-K., Hwang S., Lee Y., Kwak J. // Bul. Korean Chem. Soc. 2010. V. 31. № 11. P. 3099.
76. Zhang Z., Yang W., Wang J., Yang C., Yang F., Yang X. // Talanta. 2009. V. 78. P. 1240.
77. Han J., Zhuo Y., Chai Y., Gui G., Zhao M., Zhu Q., Yuan R. // Biosens. Bioelectron. 2013. V. 50. P. 161.
78. Xu M., Zhuang J., Chen X., Chen G., Tang D. // Chem. Commun. 2013. V. 49. P. 7304.
79. Kwon S.J., Kim E., Yang H., Kwak J. // Analyst. 2006. V. 131. P. 402.
80. Štofík M., Stryhal Z., Malý J. // Biosens. Bioelectron. 2009. V. 24. P. 1918.
81. Das J., Jo K., Lee J.W., Yang H. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 2790.
82. Kim D.-M., Noh H.-B., Park D.S., Ryu S.H., Koo J.S., Shim Y.-B. // Biosens. Bioelectron. 2009. V. 25. № 2. P. 456.
83. Yoon H.C., Yang H., Kim Y.T. // Analyst. 2002. V. 127. P. 1082.
84. Giannetto M., Mori L., Mori G., Careri M., Mangia A. // Sens. Actuat. B: Chem. 2011. V. 159. № 1. P. 185.
85. Liu S., Lin Q., Zhang X., He X., Xing X., Lian W., Huang J. // Sens. Actuat. B: Chem. 2011. V. 156. № 1. P. 71.
86. Lin M., Liu Y., Liu C., Yang Z., Huang Y. // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. № 9. P. 3761.
87. Tang D., Tang J., Su B., Chen G. // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. № 5. P. 2090.
88. Kavosi B., Salimi A., Hallaj R., Amani K. // Biosens. Bioelectron. 2014. V. 52. P. 20.