

ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГРАММЫ И СЕРВИСЫ

ПОДГОТОВКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ АНАЛИЗА БИООБЪЕКТОВ: ОБОСНОВАННЫЙ ВЫБОР МОДИФИКАЦИЙ РАБОЧЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В РЕЖИМЕ «СМАРТ-ЭЛЕКТРОДОВ»

В.В. Шумянцева^{1,2*}, Л.Е. Агафонова¹, Т.В. Булко¹, А.В. Кузиков^{1,2}, Р.А. Масамрех^{1,2}¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Рассмотрен электрохимический метод регистрации биообъектов и их функциональной активности, основанный на реакции электроокисления/электровосстановления молекул. Описаны материалы и комбинированные системы для модификации электродов, а также методы и протоколы получения химически модифицированных электродов для повышения чувствительности регистрации протекания электрохимических реакций на поверхности электродов. Приведены методики получения электродов, модифицированных синтетическим липидоподобным соединением дидодецилдиметиламмония бромидом, наночастицами золота и серебра, одномерными наноструктурами на основе соединений свинца, наночастицами оксида титана, дисперсиями углеродных нанотрубок в органических растворителях, в полимерах различного строения. Показано, что функционализация рабочей электродной поверхности позволяет повысить чувствительность электрохимической биосенсорной системы и снизить предел определяемых концентраций. Результаты представлены в виде алгоритма, позволяющего осуществить выбор типа модифицированного электрода для проведения соответствующей электрохимической реакции и анализа биомолекулы.

Key words: электроанализ; углеродные нанотрубки; наночастицы металлов; полимерные композитные материалы; одномерные структуры; биосенсоры

DOI: 10.18097/BMCRM00119

ВВЕДЕНИЕ

Электрохимические методы в биомедицинских исследованиях основаны на регистрации процессов, происходящих при получении или отдаче электронов биологическими молекулами. Их отличительной особенностью является то, что это количественные методы, которые позволяют рассчитать количество электроактивного биокомпонента в пробе. Измерительные устройства, необходимые для такого рода исследований, относительно недороги и могут быть как стационарными для проведения фундаментальных исследований и работы в научно-исследовательских организациях, так и портативными для проведения анализов в «полевых» условиях. Для электроанализа биообъектов, в том числе для повышения его чувствительности, рабочий электрод модифицируют различными системами. Электроанализ с использованием наноматериалов, которые относятся по современной терминологии к «передовым, продвинутым материалам» (advanced materials), является одним из наиболее чувствительных, экономичных и информативных методов в современной аналитической химии, биохимии, фармакологии [1–3]. Электроанализ основан на реакции присоединения/отдачи электронов, поставляемых электродом (реакции электроокисления/электровосстановления) и регистрации концентрационно-зависимой амплитуды тока при потенциале окисления/восстановления биообъекта [4, 5].

Регистрируя зависимость тока, протекающего через рабочий 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. Для повышения чувствительности сенсорных систем применяют различные электроаналитические методы: циклическую (ЦВА), квадратно-волновую (КВВА), дифференциально-импульсную (ДИВА), инверсионную вольтамперометрию (ИВА).

Для проведения электроанализа возможно использование различных типов стационарных электродов: стеклоуглеродных, графитовых, золотых, допированных бором алмазных. Широко используются 3-х контактные печатные электроды (ПГЭ) – одноразовые, промышленно выпускаемые графитовые электроды, получаемые последовательным нанесением на пластиковую основу проводящих слоев и изоляции методом трафаретной печати. ПГЭ позволяют работать в широком диапазоне рабочих потенциалов (как правило, $-1.5 \div +1.5$ В) использовать разнообразный спектр модификаций и методов получения химически модифицированной рабочей поверхности электрода [6, 7].

Электроды, в том числе получаемые методом трафаретной печати, могут иметь различную конфигурацию, размер и материал рабочего (индикаторного) электрода, что расширяет возможности электроанализа (рис. 1).

В данной работе описаны системы и материалы для модификации ПГЭ, а также методы получения модифицированных электродов для усиления регистрации электрохимического сигнала биохимических процессов на поверхности электродов и повышения порога чувствительности в электроанализе различных биообъектов.





Рисунок 1. Дизайн электродов различной конфигурации, получаемых методом трафаретной печати.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном разделе приведены методические подходы, использованные нами для анализа изоформ цитохрома P450, миоглобина, кардиомаркеров, а также для анализа ДНК.

Электрохимические измерения проводят с использованием потенциостата PGSTAT 12 Autolab, μ Autolab Type III («Metrohm Autolab», Нидерланды) с программным обеспечением GPES (версия 4.9.7) и PGSTAT 312N Autolab с программным обеспечением NOVA (версия 2.0). В работе используют трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати («КолорЭлектроникс», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода составляет 0.2 см (площадь 0.0314 см^2). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl).

1.1. Модификация электрода дидодецилдиметиламмония бромидом для анализа изоформ цитохрома P450 [8]

На поверхность рабочего графитового электрода наносят 2 мкл 0.1 М раствора дидодецилдиметиламмония бромида (ДДАБ) в хлороформе. После испарения хлороформа (10 мин) наносят 1 мкл анализируемого белка соответствующей концентрации. Электроды оставляют при температуре 4°C на 12 ч в закрытой камере, предотвращающей высыхание пленки белка на модифицированной рабочей поверхности электрода.

Перед началом всех электрохимических измерений электроды инкубируют в электролитном ($0.1 \text{ M K}_2\text{H}_2\text{PO}_4 + 0.05 \text{ M NaCl}$) фосфатном буфере (ФБ), pH 7.4, 20 мин при комнатной температуре ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). Электрохимические измерения в анаэробных условиях проводят в герметично закрытой ячейке с помещенным в нее ферментным электродом. Ячейку заполняют 1 мл электролитного буфера, герметично закрывают, в течение 30 мин пропускают аргон. Измерения в аэробных условиях регистрируют в 1 мл электролитного ФБ.

1.2. Модификация электрода дидодецилдиметиламмония бромидом и коллоидным раствором золота для анализа изоформ цитохрома P450 [9, 10]

Методика приготовления коллоидного раствора золота (AuНЧ) стабилизированного ДДАБ описана в [10].

На поверхность рабочего графитового электрода наносят 2 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0.1 М ДДАБ в хлороформе (ДДАБ/Au), после испарения хлороформа (10 мин) наносят 1 мкл соответствующей изоформы цитохрома P450. Электроды оставляют при температуре 4°C на 12 ч в закрытой камере, предотвращающей высыхание пленки белка на модифицированной рабочей поверхности электрода. Электрохимические измерения в анаэробных условиях проводят в герметично закрытой ячейке с помещенным в нее ферментным электродом. Ячейку заполняют 1 мл электролитного буфера, герметично закрывают, в течение 30 мин пропускают аргон.

1.3. Модификация электрода дисперсией многостенных углеродных нанотрубок в хлороформе для анализа изоформ цитохрома P450 [8]

На поверхность рабочего графитового электрода наносят 2 мкл дисперсии многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) в хлороформе (1 мг/мл, ультразвуковая дезинтергация 5 мин). После испарения хлороформа (10 мин) наносят 1 мкл анализируемого белка соответствующей концентрации. Электроды оставляют при температуре 4°C на 12 ч в закрытой камере, предотвращающей высыхание пленки белка на модифицированной рабочей поверхности электрода.

1.4. Модификация электрода дисперсиями МУНТ в полимерных композитных материалах

Синтез полиионных жидкостей (ПИЖ) для получения стабильных дисперсий МУНТ описан в [11]. В водные растворы с концентрацией 3 г/л поли(1-этил-3-винилимидазолийбромида) и поли(1-бутил-3-винилимидазолийбромида) добавляют МУНТ таким образом, чтобы каждый 1 мл раствора ПИЖ содержал 1 мг углеродного материала. Дисперсии МУНТ (1 мг/мл) в водных растворах ПИЖ получают ультразвуковой дезинтеграцией 100 Вт при мощности 20% в импульсном режиме.

Для электроанализа ДНК рабочий электрод модифицируют 2 мкл соответствующей дисперсией МУНТ в ПИЖ (1 мг/мл). Электроды оставляют при температуре 37°C на 15 мин до полного высыхания. Иммунизацию аналита проводят в горизонтальном режиме, при нанесении 2 мкл анализируемой пробы в 0.1 М ФБ (pH 7.4), электроды инкубируют при температуре 37°C 15 мин до полного высыхания. Модифицированные электроды хранят при температуре 4°C до измерения в тот же день. ЦВА проводят в электрохимической ячейке объемом 1 мл. Эксперименты с ДИВА проводят в горизонтальном режиме в объеме 60 мкл электролитного буфера.

1.5. Модификация электрода МУНТ и ионным амфифильным (мицеллообразующим) diblock-сополимером (полибутадиен-блок-поли(2-(N,N-диметиламино)этилметакрилат), PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀) для анализа миоглобина (Mb) [12]

Для анализа Mb была использована следующая схема. ПГЭ модифицировали полимером полибутадиен-блок-поли(2-(N,N-диметиламино)этилметакрилат) (PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀) - 2 мкл раствора полимера с концентрацией 2 мг/мл в 0.1 М ФБ, pH 8.2, затем дисперсией МУНТ в

хлороформе, 2 мкл (1 мг/мл, ультразвуковая дезинтергация 1 мин, 38 Вт). Для изготовления электрохимических иммуносенсоров 1 мкл антител к Mb (105 нг/мкл в 0.1 М ФБ, pH 7.4) иммобилизуют на ПГЭ/МУНТ/PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀. Электроды оставляют на ночь при температуре 4°C.

Анализ связывания Mb с иммобилизованными антителами проводят по [12]. ЦВА проводят в электрохимической ячейке объемом 1 мл. Эксперименты с КВВА проводят в горизонтальном режиме в объеме 60 мкл электролитного буфера.

Дисперсии МУНТ в полианионом амфифильном поли-н-бутилакрилат-блок-полиакриловой кислоты (PnBA₁₀₀-b-РАА₁₄₀) диблок-сополимере были приготовлены аналогично и использованы для анализа цитохрома с [13]. Приготовление дисперсий МУНТ в поликатионных полимерах на основе поли-н-бутилметакрилат-блок-поли(диметиламино) этилметакрилат), (PnBMA(X)-b-PDMAEMA(Y)) для анализа ДНК будет описано в статье, подготовленной к печати (Shumyantseva et al., подготовлено к печати).

1.6. Модификация электрода коллоидными AuНЧ и AgНЧ, полученными химическим синтезом (ПГЭ/Au_x/ДДАБ, ПГЭ/Ag_x/ДДАБ) для анализа кардиомакеров [14]

Коллоидные растворы серебра (золота) готовят следующим образом: к 1 мл 0.1 М ДДАБ в хлороформе при интенсивном перемешивании добавляют 0.5 мл 10 мМ водного раствора нитрата серебра AgNO₃ (HAuCl₄ × 3H₂O тетрагидрохлорзолотой кислоты) соответственно, затем по каплям добавляют 0.2 мл 0.4 М свежеприготовленного боргидрида натрия NaBH₄. Через 2 ч окрашенный органический слой, содержащий коллоидные растворы серебра (золота), отделяют от воды.

На рабочую поверхность ПГЭ наносят 2 мкл раствора наночастиц Au_x или Ag_x, приготовленных как описано выше, после испарения хлороформа (5 мин) электрод хранят в холодильнике при 4°C.

Для приготовления иммуносенсоров на модифицированные Au_x или Ag_x электроды наносят 1 мкл 0.1 М ДДАБ (ПГЭ/Au_x/ДДАБ и ПГЭ/Ag_x/ДДАБ соответственно), электроды высушивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем наносят 1 мкл раствора антител (Ат) к соответствующему белку-маркеру (ПГЭ/Au_x/ДДАБ/Ат, ПГЭ/Ag_x/ДДАБ/Ат) и высушивают в течение 20 мин при комнатной температуре. Связывание белка (1 мкл аналита) со специфическими Ат проводят в течение 45 мин при 37°C в термостате. Электрод перед измерением сигнала помещают в электрохимическую ячейку с 1 мл ФБ, pH 7.4 на 30 мин при 37°C.

1.7. Модификация электрода AuНЧ и AgНЧ, полученными электросинтезом (ПГЭ/Au_x/ДДАБ, ПГЭ/Ag_x/ДДАБ) для анализа кардиомакеров [14]

Раствор 5 мМ HAuCl₄/0.1 М HCl для электросинтеза AuНЧ готовят следующим образом: к 0.003 г HAuCl₄, добавляют 150 мкл 1 М HCl. Полученный раствор растворяют в 1.35 мл дистиллированной воды. Раствор 5 мМ AgNO₃/0.1 М HNO₃ для электросинтеза наночастиц серебра готовят следующим образом: к 8.5 мг нитрата серебра (AgNO₃) добавляют 1 мл 1 М HNO₃. Полученный раствор растворяют в 9 мл дистиллированной воды.

На поверхность ПГЭ (покрывая рабочий электрод, вспомогательный и электрод сравнения) в горизонтальном режиме наносят 60 мкл 5 мМ раствора HAuCl₄/0.1 М HCl или 5 мМ раствора AgNO₃/0.1 М HNO₃ соответственно. Электросинтез проводят в течение 180 с при контролируемом потенциале (относительно Ag/AgCl) -0.5 В для синтеза AuНЧ и 1.2 В для синтеза AgНЧ. После электросинтеза наночастиц металлов поверхность электрода промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

Иммуносенсоры готовят аналогичным образом, как описано выше для AuНЧ и AgНЧ, полученных химическим синтезом.

1.8. Модификация электрода МУНТ и наночастицами оксида титана (IV) TiO₂ для электроанализа белков на основе окисления аминокислотных остатков [15]

Для измерения сигнала электроокисления аминокислот в составе белков электроды модифицируют МУНТ, диспергированными в хлороформе (1 мг/мл, ультразвуковая дезинтергация 5 мин) и суспензией наночастиц оксида титана (1 мг в 0.5 мл H₂O:C₂H₅OH, смесь 1:1, ультразвуковая дезинтергация 1 ч). На рабочий электрод наносят 2 мкл суспензии МУНТ в хлороформе, либо 2 мкл суспензии наночастиц оксида титана, после испарения хлороформа (10 мин) наносят 60 мкл исследуемого белка или аминокислоты.

Модификацию электрода МУНТ и суспензией наночастиц оксида титана проводят последовательным нанесением 2 мкл суспензии МУНТ и 2 мкл суспензии наночастиц оксида титана. Измерения проводят при комнатной температуре (22 ± 3°C) в горизонтальном режиме.

1.9. Модификация электрода нанопроводами (одномерными наноструктурами на основе свинца (Pb(OH)₂ и нанопроводами на основе свинца с адсорбированными AuНЧ для анализа гемопротеинов (кардиомиоглобина, цитохрома P450 2B4 и цитохрома с) [16, 17]

Синтез нанопроводов на основе свинца (PbНП) проводят по методике [16]. На поверхность рабочего графитового электрода наносят послойно 1 мкл суспензии PbНП (спирт), 1 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0.1 М ДДАБ в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносят 1 мкл исследуемого гемопротеина. Электроды оставляют на 12 ч при 4°C во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов [17].

2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

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. В качестве модификаторов поверхности электродов используются различные вещества и наноматериалы. В зависимости от цели (анализ маркера патологического процесса, ферментативный катализ, поиск потенциальных субстратов/ингибиторов, анализ фермент-зависимых межлекарственных взаимодействий, образование комплекса лиганд-рецептор) это могут быть: углеродные

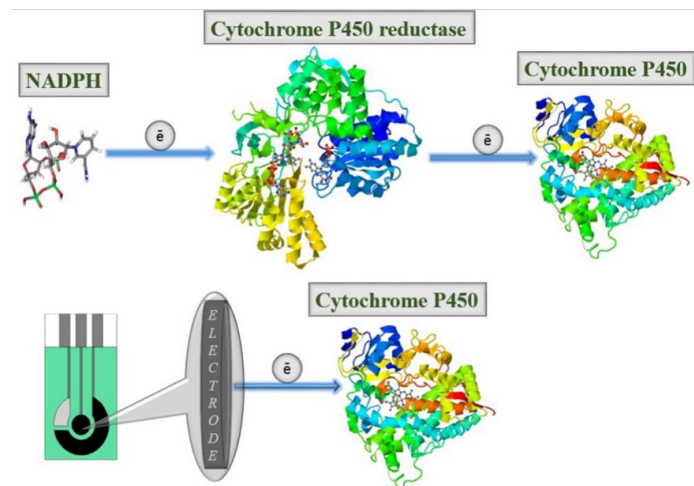


Рисунок 2. Проведение электроанализа цитохрома P450 с использованием электродов в качестве источника электронов [22]. Воспроизведено с разрешения журнала «Биомедицинская химия».

нанотрубки, графен, оксид графена, наночастицы металлов, липиды, синтетические мембраноподобные вещества, полимерные композиции, имеющие различные заряженные группы.

В работе [8] для проявления каталитической активности мембранных форм цитохрома P450 (рис. 2) было создано соответствующее микроокружение фермента с помощью природных липидов или липидоподобных синтетических соединений, таких как ДДАБ. ДДАБ и ранее применялся в наших работах [18-22] для иммобилизации гемопroteинов или антител на рабочем графитовом электроде в качестве биосовместимой мембраны для удержания и фиксации белков. ДДАБ используют также и для синтеза наночастиц золота в качестве стабилизирующего агента по отношению к коллоидным растворам золота [23, 24].

Результаты исследования каталитических функций и кинетических параметров изоформ цитохромов P450 показали предпочтительное использование ДДАБ как биосовместимого композиционного материала для модификации электродов, сохраняющего каталитическую активность этого уникального класса гемопroteинов [8].

Включение биосовместимых AuНЧ в пленках ДДАБ увеличивает чувствительность и стабильность электрохимических параметров электродов вследствие получения наноэлектродных систем [9, 25-28]. Модификация ПГЭ/ДДАБ/Au была применена авторами в работах для анализа цитохрома P450 17A1 [9], цитохромов P450 2B4, 1A2, 51v1 [23] и для анализа Mb [26]. Включение AuНЧ в модификатор электродной поверхности позволяет иммобилизовать на поверхности электрода антитела [14, 26, 29, 30]. Нековалентная иммобилизация осуществляется за счет взаимодействия SH-групп антител с золотыми наночастицами.

Авторами работы [8] была исследована модификация электрода дисперсиями МУНТ в хлороформе. Данная модификация ПГЭ повышает аналитическую чувствительность системы и количество электроактивного белка на электроде на порядок $(2.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-11}$ моль гемопroteина/см² рабочей поверхности электрода для модификации ПГЭ/ДДАБ и $(2.6 \pm 0.6) \cdot 10^{-10}$ моль гемопroteина/см² для модификации ПГЭ/МУНТ). Модификации с помощью углеродных наноматериалов

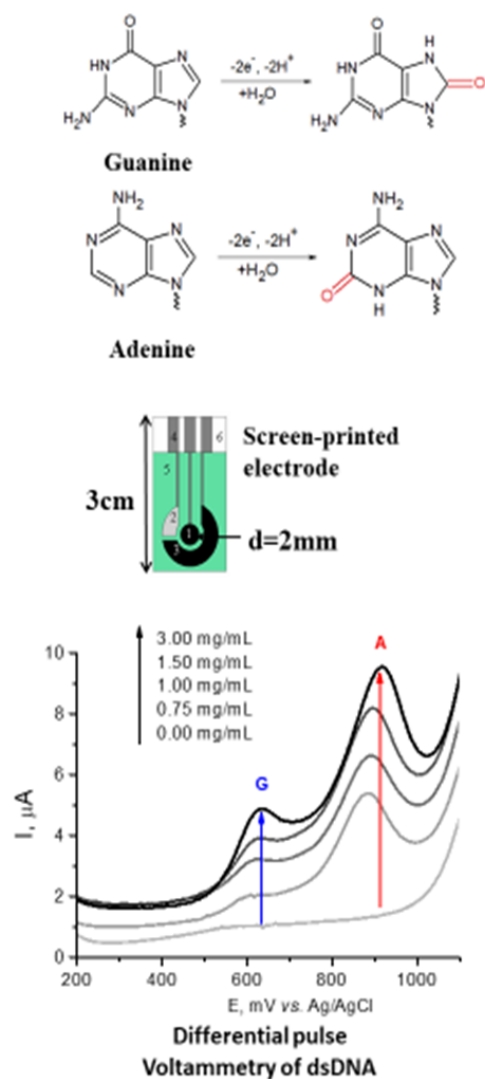


Рисунок 3. Принцип электрохимического анализа нуклеиновых кислот. (Адаптировано из [11].)

могут быть использованы для аналитического определения цитохромов P450 в различных биообъектах, включая микросомы, клетки, ткани, бакуломы, биологические жидкости, орган-специфические цитохром P450-содержащие экстракты.

С помощью полимерных дисперсантов, таких как ПИЖ на основе имидазолия, поли(1-этил-3-винилимидазолийбромида) и поли(1-бутил-3-винилимидазолийбромида), были получены и применены для модификации поверхности ПГЭ высокостабильные дисперсии МУНТ в водных средах. Такая модификация ПГЭ значительно увеличивает электроактивную площадь поверхности и ускоряет скорость переноса электронов за счет синергетического сочетания таких специфических свойств МУНТ, как сильная адсорбционная способность, высокие электронтранспортные свойства и высокая удельная поверхность, с такими преимуществами ПИЖ, как ионная проводимость и способность диспергировать углеродные наноматериалы. Авторами в работе [11] использованы модифицированные ПГЭ/ПИЖ/МУНТ для прямого электрохимического анализа двухцепочечной ДНК (дцДНК) на основе электроокисления гуаниновых и адениновых оснований. На рисунке 3 показан принцип электрохимического анализа нуклеиновых кислот.

Таблица 1. Аналитические характеристики химически модифицированных электродов для анализа биообъектов

Биообъект	Тип электрода, модификация	Электрохимический метод, тип процесса	Рабочие концентрации
Цитохромы P450 17A1 P450 2B4 P450 1A2 P45051B1 P450 3A4	ПГЭ/ДДАБ/Au _{хлороформ} / ПГЭ/ДДАБ _{хлороформ} / ПГЭ/МУНТ _{хлороформ} /	ЦВА, КВВА, ДИВА Перенос электронов в слое у поверхности электрода (protein film voltammetry)	Субстраты (1 – 100 мкМ), Прегненолон Прогестерон Диклофенак Эритромицин Тестостерон Бензфетамин Ланостерин
дцДНК	ПГЭ/ПИЖ/МУНТ	ДИВА, ЦВА	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
Миоглобин (Mb)	ПГЭ/МУНТ/PB ₂₉₀ -b-PDMAEMA ₂₄₀	ЦВА, КВВА Перенос электронов в слое у поверхности электрода (protein film voltammetry)	Физиологические концентрации 10 – 1780 нг/мл (0.56 нМ – 100 нМ)
Тропонин I (TnI) Миоглобин (Mb) Белок, связывающий жирные кислоты (H-FABP)	ПГЭ/Au _{эл} /ДДАБ ПГЭ/Ag _x /ДДАБ ПГЭ/Au _{эл} /ДДАБ	ИВА	0.1 – 32 нг/мл (4.25 пМ – 1.34 нМ) 1.8 – 32 нг/мл (76 пМ – 1.34 нМ) 10 нг/мл (0.6 нМ) 0.5 нг/мл (33 пМ)
Белки и пептиды, не содержащие простетические группы	ПГЭ/ МУНТ _{хлороформ}	ЦВА, КВВА, ДИВА, Диффузионно-контролируемый процесс	Тирозин: 1 нМ – 0.1 мМ (стандартные растворы) 0.025 – 1 мМ (сыворотка крови)
Цитохром P450 2B4	ПГЭ/PbНП/AuНЧ/ ДДАБ _{хлороформ}	ЦВА, КВВА Перенос электронов в слое у поверхности электрода (protein film voltammetry)	Бензфетамин (1 – 100 мкМ)
Цитохром c	ПГЭ/МУНТ/PnBA ₁₀₀ -b-РАА ₁₄₀	ЦВА, ДИВА Перенос электронов в слое у поверхности электрода (protein film voltammetry)	1 – 100 мкМ

Линейные диапазоны определения дсДНК соответствуют 5-500 мкг/мл для окислительного пика гуанина и 0.5 – 50 мкг/мл для окислительного пика аденина (табл. 1, рис. 3).

Электроанализ с использованием модифицированных наноматериалами электродов делает прямое электрохимическое обнаружение дцДНК на ПГЭ/ПИЖ/МУНТ конкурентоспособным с применяемыми в настоящее время спектральными и флуоресцентными методами. Кроме того, авторами показано, что разработанные системы способны распознавать точечную мутацию в 12-членных одноцепочечных олигонуклеотидах [11]. Такое обнаружение мутаций имеет большое клиническое значение при выборе адекватного противоопухолевого лечения, где электрохимическая идентификация точечной мутации может внести свой вклад в персонализированный подход к лечению (рис. 4).

Дисперсии УНТ в хлороформе были использованы для анализа миоглобина [19]. Модификация ПГЭ/УНТ

приводит к существенному повышению чувствительности электрода, что делает экспериментально обоснованным анализ миоглобина как кардиомаркера с помощью данной модификации (рис. 5).

Синергический эффект МУНТ в сочетании с ионным амфифильным (мицеллообразующим) диблок-сополимером был отмечен нами ранее в отношении количественного электрохимического детектирования миоглобина [12]. Было показано, что PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀ является подходящим материалом для встраивания Mb и облегчает прямой перенос электронов с электрода на гемопrotein. В водных растворах он образует мицеллы, которые при pH = 7 в фосфатном буфере проявляют хорошую адгезию к углеродным материалам и образуют однородные тонкие пленки на гидрофобной графитовой подложке. ЦВА и КВВА вольтамперометрии показали 180-кратное увеличение тока восстановления Mb в матрице ПГЭ/МУНТ/PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀ по сравнению с немодифицированным электродом ПГЭ. Таким образом, эти материалы могут быть использованы для конструирования

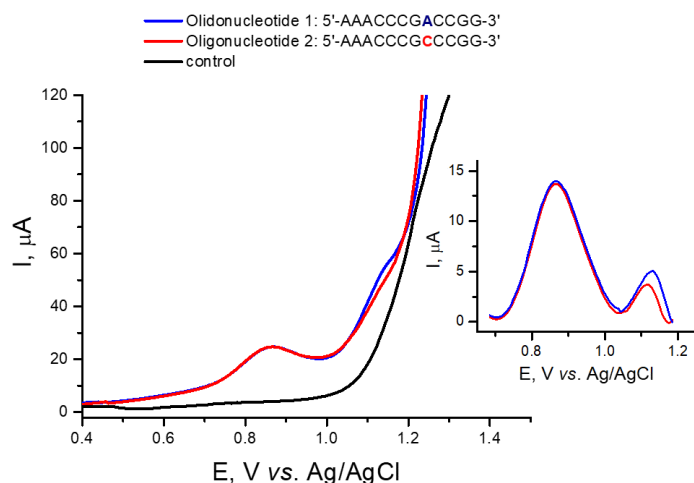


Рисунок 4. Электроанализ олигонуклеотидов (1): 5'-AAACCCGACCGG-3', и (2): 5'-AAACCCGCCCGG-3' с помощью наноструктурированных электродов (Адаптировано из [11].).

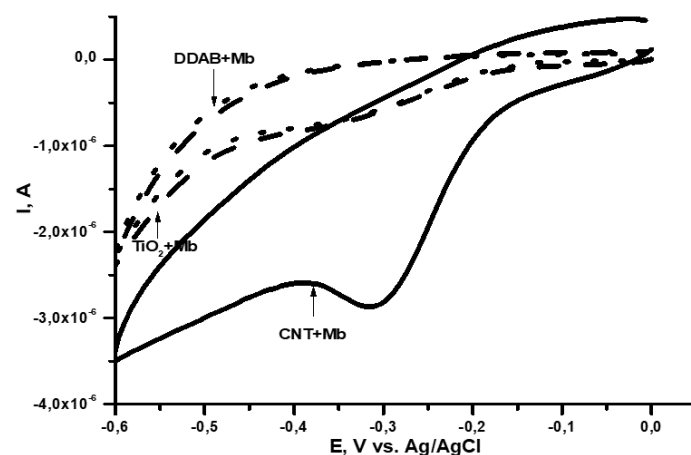


Рисунок 5. Сравнительные характеристики модифицированных электродов ПГЭ/ДДАБ, ПГЭ/ TiO₂ и ПГЭ/УНТ для анализа кардиомиоглобина в плазме крови [19]. Воспроизведено с разрешения журнала «Биомедицинская химия».

«умных» биосенсоров (смарт-электродов) и для регистрации низких концентраций функционально-значимых гемопротеинов. Чувствительность данной биосенсорной системы достаточна, чтобы охватить весь диапазон концентраций Mb, начиная с нормальной физиологической концентрация 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) (табл. 1).

Наночастицы металлов могут быть использованы не только для создания системы нанoeлектродов на рабочей поверхности электрода, но и как сенсорные элементы [14, 27, 30]. Метод инверсионной вольтамперометрии позволяет зарегистрировать процессы окисления/восстановления самих наночастиц металлов. Изменение микроокружения наночастиц металлов (т.е. присутствие маркера заболевания, например, миоглобина) концентрационно-зависимо меняет интенсивность сигнала. Как было показано в работе [14], наилучшие аналитические характеристики в определении кардиомаркеров показали электрохимические иммуносенсоры на основе наночастиц AuНЧ, полученных электросинтезом, и AgНЧ, полученных химическим синтезом. Аналитическая чувствительность для тропонина I методом ИВА (рис. 6) составила 0.1 нг/мл (4.25 пМ). Диагностическая чувствительность для AuНЧ, полученных электросинтезом, составила 87%, а для AgНЧ, полученных химическим синтезом, – 80%. Таким образом, электрохимические иммуносенсоры на тропонин I на основе AuНЧ, полученных электросинтезом, показали наилучшую аналитическую и диагностическую чувствительности, а также воспроизводимость (91%). Для потенциометрического метода определения тропонина I аналитическая чувствительность составила 18.0 пг/мл (0.8 пМ). Разработанные электрохимические иммуносенсоры на основе AuНЧ, полученных электросинтезом, также показали достаточную аналитическую чувствительность в определении физиологически значимых концентраций белка, связывающего жирные кислоты (0.5 нг/мл (33 пМ); 67%) и кардиомиоглобина (10 нг/мл (0.6 нМ); 86%) (рис. 6, табл. 1).

В работе [15] продемонстрировано, что ПГЭ/МУНТ и ПГЭ/МУНТ/TiO₂ показали высокую электрокаталитическую активность и хорошие аналитические характеристики

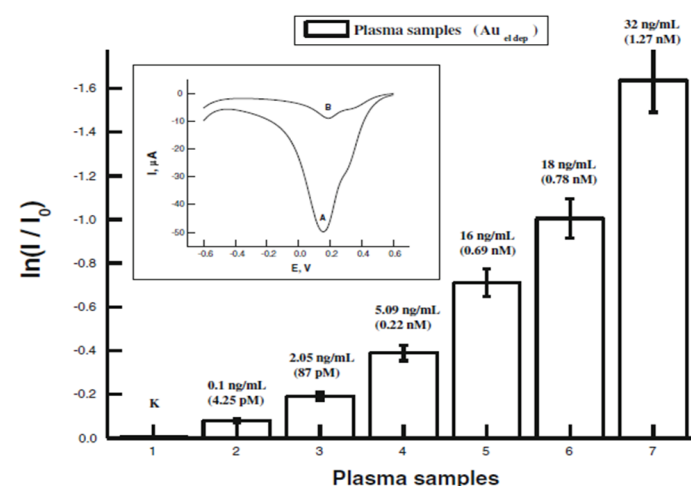


Рисунок 6. Метод анализа тропонина I на основе анализа сигналов AuНЧ с помощью инверсионной вольтамперометрии (ИВА) с пределом обнаружения 10–10 г/мл (4.25x10⁻¹²М). Зависимость $\ln(I/I_0)$ от концентрации тропонина I в плазме крови (ПГЭ/Auэл/ДДАБ/Ат). За величину базового тока (I_0) принят усреднённый сигнал высоты катодного пика оксида золота, полученный при анализе образцов плазм крови здоровых доноров. За величину I принята высота катодного пика оксида золота, полученная при анализе образцов плазм крови больных острым инфарктом миокарда (ОИМ) с известной концентрацией тропонина I. На врезке представлены ИВА, полученные при исследовании образцов плазмы крови здоровых доноров (А) и больных ОИМ (В). (Адаптировано из [14].)

в отношении окисления L-тирозина. При этом электрокаталитическое окисление тирозина с использованием ПГЭ/TiO₂ не было эффективным. Причиной данных различий может быть недостаточная электроактивность площади поверхности TiO₂ покрытия и низкая проводимость такого наноразмерного покрытия. Электроды, модифицированные ПГЭ/МУНТ и ПГЭ/МУНТ/TiO₂ имеют одинаково широкий линейный диапазон определяемых концентраций тирозина от 1 нМ до 0.1 мМ в калий-фосфатном буфере. Поскольку электроокисление тирозина происходит легче на электроде ПГЭ/МУНТ ($E=0.53$ В), данная модификация электрода была

использована для определения концентраций тирозина в сыворотке крови человека. Диапазон определяемых концентраций составил 0.025 – 1 mM (табл. 1).

Модификация печатных графитовых электродов с помощью нанопроводов (одномерных наноструктур) на основе свинца с адсорбированными AuНЧ (РbНП/AuНЧ) улучшает такие аналитические характеристики сенсора, как возрастание электроактивной площади поверхности электрода, усиление электрокаталитических свойств и кинетики переноса электронов. Так, в работе [17] показано, что наибольшую электроактивность проявляли электроды ПГЭ/РbНП/AuНЧ (30%) и ПГЭ/AuНЧ (10%) с иммобилизованным цитохромом с. При иммобилизации на рабочую поверхность 10^{-10} моль цитохрома Р450 2В4 электроактивность для ПГЭ/РbНП/AuНЧ, по сравнению с ПГЭ/AuНЧ, так же существенно возрастает, что позволяет электрохимически детектировать с помощью цикловольтамперометрии до 10^{-12} моль/электрод, а использование дифференциально-импульсной вольтамперометрии позволяет снизить определяемый предел детекции цитохрома Р450 до 10^{-15} моль/электрод. Такой эффект синергизма может быть связан с переходом AuНЧ в «режим одномерности» за счет выстраивания на одномерных нанопроводах на основе свинца. ПГЭ/РbНП/AuНЧ/Р450 2В4 электроды проявляли также высокую электрокаталитическую активность: при прибавлении бензфетамина – субстрата цитохрома Р450 2В4 – каталитический ток существенно возрастает. Синергизм действия AuНЧ и одномерных структур на основе свинца проявляется и при анализе кардиомиоглобина: интенсивность сигнала возрастает примерно в 10 раз.

Электроокисление субстратов цитохрома Р450 (диклофенака) использовано для регистрации ферментативной активности в режиме on-line (рис. 7). Для этого применяют два типа электродов: модифицированный мембраноподобным соединением ДДАБ для проявления каталитической активности цитохрома Р450 и модифицированный дисперсиями углеродных нанотрубок в полимерах (полибутадиен-блок-поли(2-(N,N-диметиламино)этил метакрилат) диблок сополимер PB₂₉₀-b-PDMAEMA₂₄₀/МУНТ) для регистрации электроокисления лекарственного препарата – субстрата цитохрома Р450 [31].

Полимерные материалы, несущие различные функциональные группы, могут быть использованы для иммобилизации биообъектов, отличающихся зарядом молекулы и значениями изоэлектрических точек. Для иммобилизации полианионных молекул ДНК предпочтительно использование поликатионных полимерных модификаторов, таких как полиионные жидкости на основе поли(1-этил-3-винилимидазолийбромид) или поли(1-бутил-3-винилимидазолийбромид) [11].

Дисперсии МУНТ в полимерах на основе полианионного полимера поли-н-бутилакрилат-блок-полиакриловой кислоты (МУНТ/PnBA₁₀₀-b-PAA₁₄₀) были использованы для модификации электродов и последующего анализа цитохрома с, имеющего положительный заряд при физиологических значениях pH [13]. Изоэлектрическая точка цитохрома с - pI = 10.1; это свидетельствует о том, что в молекуле преобладают аминокислотные остатки, боковые радикалы которых содержат положительно заряженные (катионогенные) группы при физиологических значениях pH. Такой тип модификации электродов позволяет получить панорамную вольтамперограмму в широком диапазоне потенциалов и

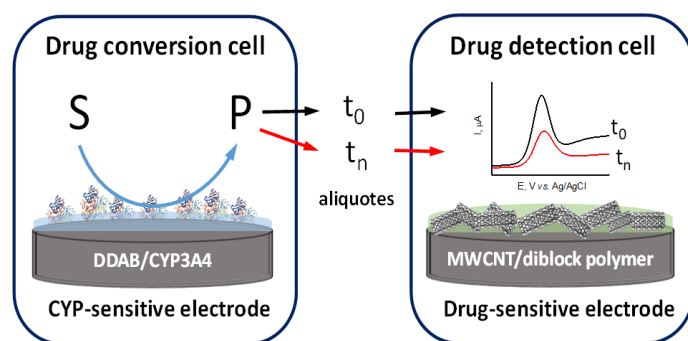


Рисунок 7. Схема анализа метаболизма лекарственных препаратов в качестве субстратов цитохрома Р450 3А4. (Адаптировано из [31].).

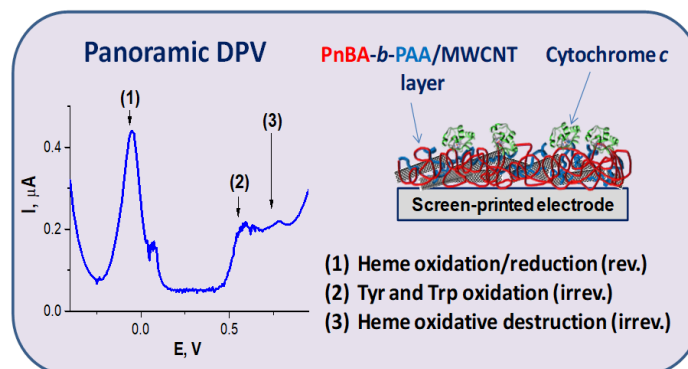
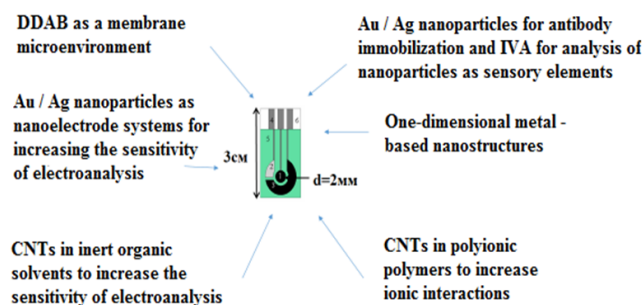


Рисунок 8. Панорамная дифференциально-импульсная вольтамперометрия (ДИВА) цитохрома с на ПГЭ/МУНТ/PnBA₁₀₀-b-PAA₁₄₀ как электрохимическая сигнатура: (1) гемовая область, (2) окисление аминокислот Tyr + Trp, (3) электроокислительная деструкция гема. (Адаптировано из [13].).

регистрировать не только окислительно-восстановительные процессы иона железа гема (в соответствии с реакцией $Fe^{+3} + 1e \leftrightarrow Fe^{+2}$), но и исследовать процессы электроокисления аминокислот полипептидной цепи цитохрома с (тирозина и триптофана), что важно для регистрации функционально значимых посттрансляционных модификаций этого гемопroteина [32] (рис. 8).

Расширение и углубление знаний о строении и функциях белков и пептидов, выявление новых путей развития заболеваний и обнаружение ранних биомаркеров как результат прогресса аналитических и биоинформационных технологий влечет за собой разработку «умных» устройств, доступных для массового использования. Современные биохимия и энзимология нуждаются в эффективных и надежных аналитических методах для оценки состояния биомолекул.

На основании рассмотренных в работе данных можно сделать вывод, что функционализация электродной поверхности в зависимости от поставленной цели эксперимента (анализ маркера патологического процесса, ферментативный катализ, поиск потенциальных субстратов/ингибиторов, 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



Objects: cytochromes P450, cardiac myoglobin, cytochrome c, DNA, oligonucleotides, drugs

Рисунок 9. Схема функционализации электродов для проведения электроанализа.

конструирования «умных» биосенсоров для электроанализа различных биообъектов (рис. 9).

Электрохимический анализ может с успехом дополнить, а в некоторых случаях и заменить, другие, более трудоемкие и дорогостоящие физико-химические и биохимические методы. Аналитические и сенсорные электрохимические системы перспективны в разработке новых лекарственных средств, терапевтическом мониторинге лекарственных средств и их метаболизма, в персонализированном подходе к эффективной и безопасной терапии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013 – 2020 гг.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akhtera, S., Basiruna, W., Aliasa, Y., Johanb, M., Bagherid, S., Shalauddinb, M., Ladane, M., Anuar, N. (2018) Enhanced amperometric detection of paracetamol by immobilized cobalt ion on functionalized MWCNTs - Chitosan thin film. *Analytical Biochemistry*, **551**, 29–36. DOI: 10.1016/j.ab.2018.05.004
2. Shaw, L., Dennany, L. (2017) Applications of electrochemical sensors: Forensic drug analysis. *Current Opinion in Electrochemistry*, **3**, 23–28. DOI: 10.1016/j.coelec.2017.05.001
3. Lima, H., da Silva, J., de Oliveira Farias, E., Teixeira, P., Eiras, C., Nunes, L. (2018) Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, **108**, 27–37. DOI: 10.1016/j.bios.2018.02.034
4. Rahi, A., Karimian, K., Heli, H. (2016) Nanostructured materials in electroanalysis of pharmaceuticals. *Analytical Biochemistry*, **497**, 39–47. DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.018
5. Cernat, A., Tertis, M., Sandulescu, R. (2015) Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. *Analytica Chimica Acta*, **886**, 16–28. DOI: 10.1016/j.aca.2015.05.044
6. Arduini, F., Micheli, L., Moscone, D., Palleschi, G., Piermarini, S., Francesco Ricci, F., Volpe, G. (2016) Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *Trends Anal. Chem.*, **79**, 114–126. DOI: 10.1016/j.trac.2016.01.032
7. Li, M., Li, D.-W., Xiu, G., Long, Y.-T. (2017) Applications of screen-printed electrodes in current environmental analysis. *Curr. Opin. Electrochem.*, **3**, 137–143. DOI: 10.1016/j.coelec.2017.08.016

8. Kuzikov, A.V., Bulko, T.V., Koroleva, P.I., Masamrekh, R.A., Babkina, S.S., Gilep, A.A., Shumyantseva, V.V. (2020) Cytochrome P450 3A4 as enzyme for drug biotransformation: the role of sensor systems modifications in electrocatalysis and electroanalysis. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(1), 64–70. DOI: 10.18097/PBMC20206601064
9. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Misharin, A.Yu., Archakov, A.I. (2011) Screening of Potential Substrates or Inhibitors of Cytochrome P450 17A1 (CYP17A1) by Electrochemical Methods. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **57**(4), 402–409. DOI: 10.18097/pbmc20115704402
10. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Kuznetsova, G.P., Samenkova, N.F., and Archakov, A.I. (2009) Electrochemistry of cytochromes P450: Analysis of current-voltage characteristics of electrodes with immobilized cytochromes P450 for the screening of substrates and inhibitors. *Biochemistry*, **74**, 438–444. DOI: 10.1134/S0006297909040129
11. Sigolaeva, L.V., Bulko, T.V., Kozin, M.S., Zhang, W., Köhler, M., Romanenko, L., 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. DOI: 10.1016/j.polymer.2019.02.005
12. 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. *J. Mater. Chem. B*, **3**(27), 5467–5477. DOI: 10.1039/c5tb00442j
13. 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*, in press
14. Shumkov, A. A., Suprun, E. V., Shatinina, S. Z., Lisitsa, A. V., Shumyantseva, V. V., Archakov, A. I. (2013) Gold and Silver Nanoparticles for Electrochemical Detection of Cardiac Troponin I based on Stripping Voltammetry. *BioNanoScience*, **2**(3), 216–222. DOI: 10.1007/s12668-013-0090-9
15. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Masamrekh, R.A., Archakov, A.I. (2018) Analysis of L-tyrosine based on electrocatalytic oxidative reactions via screen-printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes and nanosized titanium oxide (TiO₂). *Amino Acids*, **50**, 823–829. DOI: 10.1007/s00726-018-2557-z
16. Tong, H., Zhu, Y.-J., Yang, L.X., Zhang, L. (2006) Lead Chalcogenide Nanotubes Synthesized by Biomolecule-Assisted Self-Assembly of Nanocrystals at Room Temperature. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 7739–7742. DOI: 10.1002/anie.200602952
17. Shumyantseva, V. V., Bulko, T. V., Suprun, E. V. and Archakov, A. I. (2013) Electrochemical Sensor Systems Based on One Dimensional (1D) Nanostructures for Analysis of Bioaffinity Interactions. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **59**(2), 209–218. DOI: 10.18097/pbmc20135902209
18. Guto, P.M., Rusling, J.F. (2006) Myoglobin retains iron heme and near-native conformation in DDAB films prepared from pH 5 to 7 dispersions. *Electrochemistry Communications*, **8**, 455–459. DOI: 10.1016/j.elecom.2006.01.007
19. Shumyantseva, V.V., Suprun, E.V., Bulko, T.V., Dobrynina, O.V., Archakov, A.I. (2010) Sensor Systems for Medical Application Based on Hemoproteins and Nanocomposite Materials. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **56** (1), 55–71. DOI: 10.18097/pbmc20105601055
20. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Chalenko, Y.M., Vagin, M.Yu., Rudakov, Yu.O., Shatskaya, M.A., Archakov, A.I. (2011) Electrochemical investigations of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1814**(1), 94–101. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.07.008
21. Kuzikov, A.V., Dugin, N.O., Stulov, S.V., Shcherbinin, D.S., Zharkova, M.S., Veselovsky, A.V., Shumyantseva, V.V., Misharin, A.Y., Tkachev, Y.V., Timofeev, V.P. (2014) Novel oxazolonyl derivatives of pregna-5,17(20)-diene as 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) inhibitors. *Steroids*, **88**, 66–71. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.06.014
22. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Kuzikov, A.V., Agafonova, L.E., Archakov, A. I. (2015) Electrochemical Methods in Biomedical Studies. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(2), 188–202. DOI: 10.18097/PBMC20156102188
23. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A. I. (2007) Electrochemical properties of cytochromes P450 using nanostructured electrodes: Direct electron transfer and electro catalysis. *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 859–865. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2007.01.015
24. Han, X., Cheng, W., Zhang, Z., Dong, S., and Wang, E. (2002) Direct electron transfer between hemoglobin and a glassy carbon electrode facilitated by lipid-protected gold nanoparticles. *Biochem. Biophys. Acta*, **1556** (2-3), 273–277. DOI: 10.1016/S0005-2728(02)00372-9
25. Shumyantseva, V.V., Makhova, A.A., Bulko, T.V., Kuzikov, A.V., Shich, E.V., Kukes, V., Archakov, A.I. (2015) Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: the protective and stimulating roles of antioxidants. *RSC Advances*, **5**(87), 71306–71313. DOI: 10.1039/c5ra09998f
26. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Vagin, M.Yu., Suprun, E.V., Archakov, A. I. (2010) Electrochemical Immunoanalysis of Cardiac Myoglobin. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **56**(6), 758–768. DOI: 10.18097/PBMC20105606758

27. Suprun, E.V., Shilovskaya, A.L., Lisitsa, A.V., Bulko, T.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2011) Electrochemical Immunosensor Based on Metal Nanoparticles for Cardiac Myoglobin Detection in Human Blood Plasma. *Electroanalysis*, **23**(5), 1051 – 1057. DOI: 10.1002/elan.201000668
28. Shangguan, L., Zhao, Y., Mi, L., Jiang, L., Liu, S. (2016) Direct electrochemistry and electrocatalysis of cytochrome P450s immobilized on gold/graphene-based nanocomposites. *J. Electroanal. Chem.*, **772**, 46-51. DOI:10.1016/j.jelechem.2016.04.014
29. Suprun, E.V., Bulko, T.V., Lisitsa, A.V., Gnedenko, O.V., Ivanov, A.S., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2010) Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**(7), 1694–1698. DOI:10.1016/j.bios.2009.12.009
30. Shumyantseva, V.V., Suprun, E.V., Bulko, T.V., Archakov, A.I. (2009) Electrochemical Methods for the Investigation of Bioaffinity Interactions Based on Gold Nanoparticles Modified Sensors. *Electroanalysis*, **21**(3-5), 530 – 535. DOI: 10.1002/elan.200804439
31. 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 of their electrocatalytic conversion by cytochromes P450. *Electrochimica Acta*, **336**, 135579. DOI:10.1016/j.electacta.2019.135579
32. Lin, Y.-W. (2018) Structure and function of heme proteins regulated by diverse post-translational modifications. *Arch. Biochem. Biophys.*, **641**, 1-30. DOI:10.1016/j.abb.2018.01.009

Поступила: 03.02.2020
 После доработки: 17.02.2020
 Принята к публикации: 24.02.2020

PREPARATION OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR SYSTEMS FOR THE ANALYSIS OF BIOLOGICAL OBJECTS: A REASONABLE CHOICE OF MODIFICATIONS OF THE WORKING SURFACE OF ELECTRODES FOR PERFORMING RESEARCH IN THE "SMART ELECTRODE" MODE

V.V. Shumyantseva^{1,2*}, L.E. Agafonova¹, T.V. Bulko¹, A.V. Kuzikov^{1,2}, R.A. Masamrekh^{1,2}

¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya Street, Moscow, 119121 Russia;

*e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianova Street, Moscow, 117997 Russia

The electrochemical method of analysis of biological objects based on the reaction of electro-oxidation/electro-reduction of molecules is considered. Materials and complex systems for modifying electrodes as well as methods for producing modified electrodes to increase the sensitivity of recording the flow of electrochemical reactions on the surface of the electrodes are described. Methods of electrode modifications based on synthetic lipid-like didodecyldimethylammonium bromide, gold and silver nanoparticles, one-dimensional nanoparticles based on lead compounds, titan oxide nanoparticles, dispersions of carbon nanotubes in organic solvents, in polymers with different chemical structure are considered. It is shown that the appropriate functionalization of the working electrode surface makes it possible to increase the sensitivity of the electrochemical biosensor system and decrease the limit of detection. The results are presented in the form of an algorithm applicable for selection the beneficial type of modified electrode for the corresponding electrochemical reaction and biosample analysis.

Key words: electroanalysis; carbon nanotubes; metal nanoparticles; polymer composite materials, one-dimensional structures, biosensors

FUNDING

This work was performed within the framework of the Program for Basic Research of Russian State Academy of Sciences for 2013-2020.

Received: 03.02.2020, revised: 17.02.2010, accepted: 24.02.2020