

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шавокшина Вера Александровна

**Амперометрические (био)сенсоры
на основе наноструктурированной берлинской лазури
для анализа биологических жидкостей**

Специальность 1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель: *Карякин Аркадий Аркадьевич*
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: *Козицина Алиса Николаевна*
доктор химических наук, профессор
ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
Химико-технологический институт, заведующий кафедрой аналитической химии

Абакумов Артём Михайлович
доктор химических наук
Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования "Сколковский институт науки и технологии", профессор,
директор Центра энергетических технологий

Лауринавичюте Вероника Кестучё
кандидат химических наук
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Химический факультет, кафедра электрохимии, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «17» декабря 2025 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3648>

Автореферат разослан «__» ноября 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ананьева И. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Развитие персонифицированной медицины и потребность в эффективных методах ранней диагностики патологий обеспечивает возрастающий интерес к созданию компактных сенсоров, которые также позволяют проводить измерения непосредственно «у постели больного» (point-of-care testing). Электрохимические сенсоры обладают рядом преимуществ: возможностью миниатюризации и интеграции в портативные устройства, относительно невысокой стоимостью производства и простотой использования. Олигонуклеотиды, детектируемые в сыворотке крови, являются биомаркерами различных заболеваний, включая онкологические. Важной задачей при разработке электрохимических ДНК/РНК-сенсоров является выбор меток для регистрации сигнала, которые должны сочетать в себе стабильность, селективность, низкую стоимость и возможность конъюгации с биомолекулами.

Другое направление развития – разработка неинвазивных методов анализа. Перспективным объектом анализа является конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ), сбор которого не имеет противопоказаний и не доставляет пациенту серьезных неудобств. Однако анализ КВВ сопряжен с рядом трудностей: низкие концентрации основных маркеров, малый объем образца, вариабельность состава в зависимости от устройства сбора КВВ, в том числе за счёт разбавления парами воды при пробоотборе. Важным метаболитом, присутствующим в КВВ, является пероксид водорода – маркер окислительного стресса. Для его определения необходимо разработать высокочувствительные электрохимические сенсоры, способные функционировать в КВВ. Помимо H_2O_2 , представляющими интерес маркерами являются катионы калия и натрия, поскольку изменение содержания катионов в поте может свидетельствовать о нарушении электролитного баланса в организме. Для миниатюризации конструкции ионоселективных сенсоров перспективна разработка твердоконтактных ионоселективных электродов (ТК-ИСЭ), в которых внутренний стандартный раствор заменён на электронно-ионный проводник. Одним из актуальных подходов для повышения чувствительности таких сенсоров является создание ТК-ИСЭ, функционирующих в режиме ненулевого тока.

Ключевой компонент разрабатываемых сенсоров – наноструктуры берлинской лазури (БЛ). БЛ известна как высокоэффективный электрокатализатор восстановления пероксида водорода. Наночастицы БЛ могут использоваться в качестве меток для регистрации гибридизации в ДНК-сенсорах как альтернатива природному ферменту – пероксидазе. Для определения концентрации H_2O_2 в КВВ также предложено использовать сенсоры на основе наноструктурированной БЛ. Однако для многократного использования сенсора и измерения серии образцов

необходима дополнительная стабилизация БЛ, не приводящая к существенной потере чувствительности, одним из наиболее подходящих стабилизаторов БЛ является гексацианоферрат никеля. В то же время, помимо электрокаталитической активности, БЛ обладает электронно-ионной проводимостью, и ионы калия способны интеркалировать в решетку БЛ, что делает БЛ перспективным материалом для создания ТК-ИСЭ на её основе.

Таким образом, разработка усовершенствованных амперометрических сенсоров на основе гексацианоферратов железа и никеля, способных функционировать в биологических жидкостях (сыворотка крови, КВВ, пот) и определять значимые биомаркеры (катионы калия и натрия, нуклеиновые кислоты, H_2O_2), согласуется с потребностями современной персонифицированной медицины и задачами аналитической химии.

Цель работы

Создание амперометрических сенсоров на основе наноразмерных гексацианоферратов железа/никеля для определения биомаркеров (ДНК, РНК, H_2O_2 , K^+ , Na^+) в биологических жидкостях (сыворотка крови, пот, конденсат выдыхаемого аэрозоля).

Задачи

- Регистрация амперометрических сигналов электродов, модифицированных наноразмерными гексацианоферратами железа или никеля, на неэлектроактивные ионы в проточно-инжекционной системе.
- Создание ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов железа или никеля для определения концентрации ионов калия, натрия в сыворотке крови и поте в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале.
- Создание сенсорной платформы для электрохимических ДНК/РНК-сенсоров на основе проводящего полимера азидометил-замещенного поли(3,4-этилендиокситиофена).
- Исследование влияния условий гибридизации на аналитические характеристики ДНК-сенсоров. Определение немеченых олигонуклеотидов в режиме конкурентного и «сэндвич»-анализа.
- Разработка сенсоров на основе стабилизированной БЛ для определения концентрации пероксида водорода в конденсате выдыхаемого аэрозоля (КВА). Установление различий в уровне пероксида водорода в КВА у разных групп: некурящих и курящих добровольцев, пациентов с постковидным синдромом.

Научная новизна

1. Твердоконтактные ионоселективные электроды (ТК-ИСЭ) на основе гексацианоферратов железа или никеля, позволяющие проводить определение ионов K^+ или Na^+ в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале. Сенсоры применимы для анализа биологических жидкостей (сыворотка крови, пот). Калий-селективные сенсоры на основе наночастиц БЛ достигают рекордно низкого предела обнаружения (1 мкМ), по сравнению с другими ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов переходных металлов. Возможно одновременное определение содержания K^+ и Na^+ с использованием четырехэлектродной сенсорной структуры.

2. Модификация поверхности печатного графитового электрода поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофеном) (ПЭДОТ- N_3) обеспечивает повышение электрохимической константы скорости (k_s) до 2000 раз в присутствии отрицательно заряженного медиатора $K_3[Fe(CN)_6]$ в диапазоне pH 1.1 – 7.0. Для положительно заряженного медиатора ($[Ru(NH_3)_6]Cl_3$) k_s увеличивается от 2 до 6 раз, по сравнению с немодифицированным электродом.

3. Электрохимические ДНК-сенсоры, в которых впервые использованы композитные наночастицы берлинской лазури (НЧ БЛ/ПЭДОТ- N_3) в качестве электрокаталитических меток. Показано, что такая функционализация наночастиц БЛ позволяет конъюгировать их с алкин-модифицированными олигонуклеотидами в одну стадию в результате азид-алкиновой клик-реакции, причём после конъюгации композитные наночастицы сохраняют электрокаталитические свойства. Разработанные ДНК/РНК-сенсоры применимы для определения ДНК и РНК, не содержащих меток.

4. Сенсор на основе наноструктурированной БЛ, стабилизированной гексацианоферратом никеля, для определения субмикромольных концентраций H_2O_2 (предел обнаружения 0.1 мкМ, коэффициент чувствительности $0.38 \pm 0.05 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$). Показана применимость сенсора для определения H_2O_2 в конденсате выдыхаемого аэрозоля (КВА), собранного без дополнительного охлаждения. В результате анализа образцов КВА пациентов с постковидным синдромом впервые показано статистически значимое снижение концентрации H_2O_2 , по сравнению с некурящими добровольцами без бронхолегочных нарушений.

Практическая значимость

ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов переходных металлов, функционирующие в режиме проточно-инжекционной амперометрии, обеспечивают экспрессное (до 1 мин) и чувствительное (s достигает $75 \pm 10 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) определение содержания ионов калия и натрия. Это позволяет скорректировать недостатки потенциометрических ТК-ИСЭ, связанные с их конструктивной

особенностью – отсутствием внутреннего стандартного раствора. Использование наночастиц БЛ в качестве твердого контакта значительно упрощает модификацию поверхности электрода благодаря возможности простой адсорбции из суспензии наночастиц. Реализация одновременного определения концентрации калия и натрия, а также возможность получения градуировочной зависимости с использованием эквимольных растворов солей калия и натрия значительно ускоряет анализ серии образцов.

Синтез проводящего полимера ПЭДОТ- N_3 для создания сенсорных платформ методом «зелёной» электрохимической полимеризации не требует применения органических растворителей. Использование композитных наночастиц БЛ (НЧ БЛ/ПЭДОТ- N_3) с пероксидазной активностью в качестве электрокаталитических меток позволяет снизить стоимость ДНК-сенсоров, а также делает их менее требовательными к условиям хранения. Практическая значимость подтверждена успешным определением фрагмента РНК HULC (Highly Upregulated in Liver Cancer) – потенциального биомаркера гепатоцеллюлярной карциномы – в клинически значимом диапазоне концентраций. В связи с тем, что гибридизацию с ДНК-зондами, иммобилизованными на сенсорной платформе, возможно проводить в разбавленной сыворотке крови, созданные электрохимические ДНК/РНК-сенсоры открывают перспективы для разработки диагностических тест-систем.

Сенсоры на основе стабилизированной БЛ позволяют определять концентрацию H_2O_2 в КВА, собранном без дополнительного охлаждения. Установлено, что у пациентов с диагностированным постковидным синдромом концентрация H_2O_2 в образцах КВА понижена, а у курящих людей, наоборот, повышена по сравнению с некурящими. Практическая значимость результатов обусловлена отсутствием специфических диагностических тестов для постковидного синдрома. Таким образом, показана потенциальная применимость H_2O_2 как биомаркера для неинвазивной диагностики постковидного синдрома и нарушений, связанных с дисбалансом активных форм кислорода в организме.

Положения, выносимые на защиту

1. Твердоконтактные ионоселективные электроды на основе гексацианоферрата железа или никеля, функционирующие в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале, позволяют определять содержание ионов калия или натрия, включая их одновременное определение, в поте и сыворотке крови.

2. Сенсорные платформы на основе электрохимически синтезированного поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена) обеспечивают одностадийную иммобилизацию алкин-модифицированных биомолекул и увеличение

электрохимической константы скорости в присутствии диффузионно-подвижных медиаторов ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ или $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$).

3. Амперометрические ДНК-сенсоры и ДНК/РНК-сенсоры с электрокаталитическими метками на основе композитных наночастиц берлинской лазури (НЧ БЛ/ПЭДОТ- N_3) функционируют в режимах конкурентного (ДНК-сенсоры) и «сэндвич»-анализа (ДНК/РНК-сенсор) в сыворотке крови.

4. Электрохимические сенсоры на основе наноструктурированной берлинской лазури, стабилизированной гексацианоферратом никеля, позволяют выявлять статистически значимые различия в содержании пероксида водорода в конденсате выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения у пациентов с постковидным синдромом, курящих и некурящих добровольцев.

Степень достоверности

Достоверность получаемых результатов на каждом этапе обеспечена использованием реактивов достаточной степени чистоты, современного оборудования для электрохимических измерений и альтернативных методов исследования, применением подхода «введено-найдено», статистической обработкой получаемых результатов и погрешностей.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует специальности 1.4.2. Аналитическая химия по направлениям исследований: методы химического анализа; теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии; клинический анализ.

Апробация результатов исследования

Результаты работы были представлены на 11 всероссийских и международных научных конференциях (10 устных докладов и 1 стендовый): XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019» (Москва, Россия, 2019), 15th International Students Conference «Modern Analytical Chemistry» (Прага, Чехия, 2019), XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2020» (Москва, Россия, 2020), European Biosensor Symposium «EBS 2021 online» (Вильдау, Германия, 2021), XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021» (Москва, Россия, 2021), 13-я Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения (БИОКАТАЛИЗ-2023)» (Суздаль, Россия, 2023), 19th ISEAC (The Nineteenth International Symposium on Electroanalytical Chemistry) (Чанчунь, Китай, 2023), Всероссийская конференция по электрохимии с международным участием (Москва, Россия, 2023), XI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024» (Екатеринбург, Россия, 2024), 20th ISEAC (The Twentieth

International Symposium on Electroanalytical Chemistry) (Чанчунь, Китай, 2025), 40th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry (Чанчунь, Китай, 2025).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 1 патент и 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

Личный вклад автора

В основу диссертационной работы легли результаты научных исследований, выполненных под руководством д.х.н., проф. Карякина А.А. на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова в период с 2019 до 2025 г. Личный вклад автора состоял в постановке задач исследования, анализе и систематизации литературных данных, подготовке, планировании и проведении всех представленных электрохимических экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации и представлении работы на конференциях. Наночастицы берлинской лазури и композитные НЧ БЛ/ПЭДОТ-N₃ были синтезированы и охарактеризованы к.х.н., с.н.с. М.А. Комковой и А.А. Зарочинцевым. Изображения СЭМ были получены к.х.н. Леонтьевым А.П., спектроскопии КР – к.х.н., доц. Елисеевым А.А., НПВО-ИК – к.х.н., в.н.с. Бродманом В.А. Конденсоры были напечатаны Дубовым Л.А. и к.х.н., с.н.с. Андреевым Е.А. Измерения методом капиллярного электрофореза выполнены в ГИН РАН н.с. Максимовой Ю.А.

Структура и объём работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и выводов, списка литературы. Материал изложен на 138 страницах (275 тыс. знаков), включает 80 рисунков и 25 таблиц. В списке литературы 206 ссылок.

Используемые сокращения

БЛ – берлинская лазурь; **ГЦФ Ni** – гексацианоферрат никеля; **ДОК** – диапазон определяемых концентраций; **ИСМ** – ионоселективная мембрана; **КВА** – конденсат выдыхаемого аэрозоля; **КВВ** – конденсат выдыхаемого воздуха; **ЛДОК** – линейный диапазон определяемых концентраций; **НЧ** – наночастицы; **оцДНК** – одноцепочечная ДНК; **ПИА** – проточно-инжекционный анализ; **ПГЭ** – планарные графитовые электроды; **ПЭДОТ-N₃** – поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофен); **ТК-ИСЭ** – твердоконтактные ионоселективные электроды; **ЭДОТ-N₃** – 3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофен; **Г** – поверхностная концентрация электроактивной БЛ; **k_s** – электрохимическая константа скорости, **s** – коэффициент чувствительности, **s_r** – относительное стандартное отклонение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, представлены научная новизна и практическая значимость результатов, апробация работы и публикации по теме исследования, структура и объем работы.

В **обзоре литературы** описаны основные характеристики современных электрохимических сенсоров для определения различных аналитов (ионы калия и натрия, H_2O_2 , ДНК) с акцентом на сенсорах на основе берлинской лазури (БЛ). В *главе 1* приведены аналитические характеристики чувствительных сенсоров для определения пероксида водорода, рассмотрены подходы для создания наноструктур на поверхности электродов. *Глава 2* посвящена описанию твердоконтактных ионоселективных электродов: их устройству, принципу работы и возможностям функционирования в режиме ненулевого тока. В *главе 3* представлены подходы для иммобилизации ДНК-зондов на поверхности электрода и варианты модификации поверхности для этих целей. Также проведено сравнение характеристик ряда существующих ДНК-сенсоров, в которых использованы наночастицы с пероксидазной активностью. В *главе 4* описаны коммерческие устройства для сбора конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ), и оценена диагностическая значимость пероксида водорода в данном биологическом образце.

В *главе 5 (экспериментальная часть)* описаны используемые реактивы и оборудование. Все эксперименты проводили на печатных планарных графитовых электродах (ПГЭ). Представлены методики электрополимеризации ЭДОТ- N_3 , исследования электроактивности медиаторов на поверхности модифицированных электродов, проведения клик-реакции с алкин-модифицированными ДНК-олигонуклеотидами, а также условия гибридизации и регистрации сигналов ДНК-сенсоров с нанозимами в качестве электрокаталитических меток в стационарном режиме при перемешивании.

Описаны этапы модификации поверхности электродов при электрохимическом синтезе гексацианоферрата никеля (ГЦФ Ni) или адсорбции наночастиц БЛ. Приведены условия регистрации хроноамперограмм при постоянном потенциале в режиме проточно-инжекционного анализа (ПИА) в ячейке типа «wall-jet» или тонкослойной проточной ячейке. Описаны условия синтеза наноструктурированной БЛ из разбавленных растворов солей и дальнейшей стабилизации покрытия в режиме циклической вольтамперометрии. Приведены условия сбора КВА и амперометрического определения концентрации H_2O_2 при постоянном потенциале (-0.05 В) в ячейке типа «wall-jet».

Результаты и их обсуждение

Глава 6. Твердоконтактные ионоселективные электроды на основе гексацианоферратов железа и никеля.

В главе описаны ТК-ИСЭ для определения концентрации ионов калия или натрия, функционирующие в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале.

Амперометрические отклики твердого контакта в проточно-инжекционной системе

В качестве твердого контакта предложено использовать наночастицы берлинской лазури (НЧ БЛ), которые адсорбировали из суспензии для модификации электрода, или ГЦФ Ni, синтезированный электрохимически на поверхности ПГЭ. Раствором-носителем был выбран буферный раствор третичной аммонийной соли (Бис-Трис, pH 6.0), который содержит хлорид-ионы для нормального функционирования электрода сравнения и не содержит мешающих катионов.

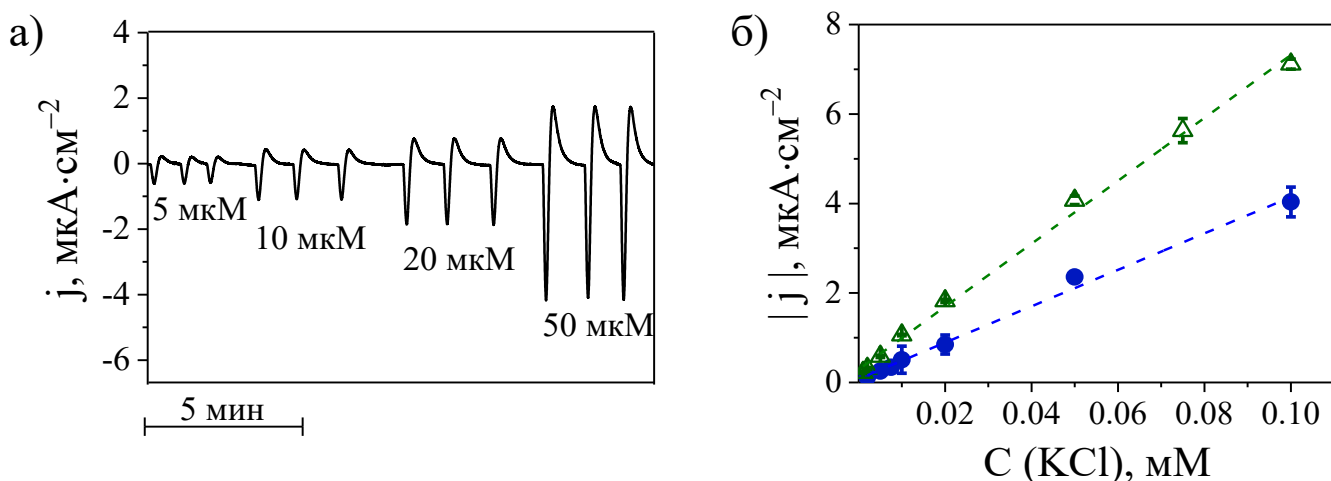


Рис. 1. а) Амперометрические отклики сенсора, модифицированного ГЦФ Ni, без ионоселективной мембраны, полученные в результате инъекции растворов KCl (0.2 В, pH 6.0). б) Начальный линейный участок градуировочной зависимости сенсора, модифицированного НЧ БЛ (●) или ГЦФ Ni (△).

На рис. 1а представлена хроноамперограмма, зарегистрированная на электроде, модифицированном ГЦФ Ni. При введении в систему растворов KCl формируется амперометрический отклик в виде пары разнонаправленных пиков, где аналитически значимый — катодный пик. Коэффициент чувствительности (s) электродов, модифицированных ГЦФ Ni, равен $70 \pm 12 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (рис. 1б). У электродов на основе НЧ БЛ s достигает $40 \pm 8 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (рис. 1б), что в два раза выше, чем у сенсоров на основе пленок БЛ с эквивалентным количеством электроактивной БЛ.

Высота пика зависит от потенциала регистрации хроноамперограммы. Максимум достигается при потенциале, близком к формальному потенциалу твердого контакта: при 0 В и 0.2 В для НЧ БЛ и ГЦФ Ni соответственно. Кроме того,

ГЦФ Ni и НЧ БЛ обладают селективностью к ионам калия: амперометрический отклик на введение раствора KCl в 2–4 раза превышает отклик на эквивалентную концентрацию NaCl, независимо от приложенного потенциала.

Ионоселективные электроды с пластифицированными мембранами в режиме проточно-инжекционной амперометрии

Для повышения селективности на модифицированные электроды наносили пластифицированные ионоселективные мембраны (ИСМ) с соответствующими ионофорами. ИСМ не повлияла на форму амперометрического отклика сенсора в режиме ПИА. Также показано, что для ТК-ИСЭ высота пика практически не зависит от потенциала регистрации хроноамперограммы.

При инжектировании раствора KCl в ячейку с сенсором из-за обменных процессов в ИСМ изменяется потенциал на границе ИСМ | раствор. В результате происходит частичное восстановление твердого контакта (ГЦФ Ni или НЧ БЛ). На хроноамперограмме это выражается в увеличении катодного тока. Благодаря проточно-инжекционному режиму измерений система возвращается в исходное состояние, и при обратной перезарядке твердого контакта на хроноамперограмме наблюдается анодный пик. Высота катодного пика хорошо воспроизводима ($s_r \leq 5\%$) и зависит от концентрации инжектируемой соли, градуировочную зависимость аппроксимировали уравнением гиперболы:

$$j = \frac{j_{\text{макс}} \cdot C}{K + C} \quad (1)$$

В таблице 1 приведены аналитические характеристики разработанных ТК-ИСЭ. Коэффициент чувствительности определяли как тангенс угла наклона начального линейного участка.

Таблица 1. Аналитические характеристики разработанных амперометрических ТК-ИСЭ с калий- или натрий-селективной мембраной в режиме ПИА ($n=3$, $P=0.95$).

Твердый контакт	Определяемый катион	ДОК, М	ЛДОК, М	s , $\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$
НЧ БЛ	K^+	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	46 ± 12
НЧ БЛ	Na^+	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	4 ± 1
ГЦФ Ni	K^+	$2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	75 ± 10
ГЦФ Ni	Na^+	$5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-6} - 7.5 \times 10^{-5}$	25 ± 8

Для сравнения с проточно-инжекционной амперометрией исследовали разработанные ТК-ИСЭ в режиме потенциометрии. Потенциометрическое определение ионов K^+ и Na^+ характеризуется коэффициентом чувствительности, близким к теоретическому, и достигает 58 ± 1 мВ (для ГЦФ Ni). Однако в режиме ПИА

благодаря снижению шума (до 0.08 нА) соотношение сигнал/шум в 6 раз выше, чем в режиме потенциометрии. Важным преимуществом амперометрического определения неэлектроактивных ионов является также повышение коэффициента чувствительности и снижение предела обнаружения, по сравнению с потенциометрией. Кроме того, метод ПИА отличается экспрессностью: время формирования амперометрического отклика не превышает 60 с.

Для исследования селективности ТК-ИСЭ инжестировали различные соли калия, натрия и аммония. Показано, что амперометрический сигнал не зависит от природы аниона, а определяется катионом инжеструемой соли. Логарифм коэффициента селективности ($\lg K_{K/Na}$), рассчитанный как отношение концентраций, соответствующих одинаковым амперометрическим откликам, составил -3.5 , что открывает перспективы для анализа биообъектов. Также показано, что с увеличением количества адсорбированных НЧ БЛ возрастает и чувствительность ТК-ИСЭ, достигая предельных значений при $\Gamma_{БЛ}$ $1-2 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2}$, что соответствует полному заполнению поверхности электрода [1].

Разработанные ТК-ИСЭ были использованы для определения содержания ионов калия или натрия в стандартизованных образцах сыворотки крови и поте человека. Результаты анализа сыворотки крови соответствуют паспортным значениям, а определенные содержания ионов калия или натрия в поте в пределах погрешности совпадают с данными, полученными методом капиллярного электрофореза. В течение 7 дней хранения ТК-ИСЭ на основе НЧ БЛ сохраняется 85 % чувствительности, у сенсора на основе ГЦФ Ni – 94 %. Кроме того, в течение 5 часов измерений растворов биообразцов сенсоры на основе ГЦФ Ni сохраняют 95 % чувствительности.

ТК-ИСЭ для одновременного определения ионов калия и натрия

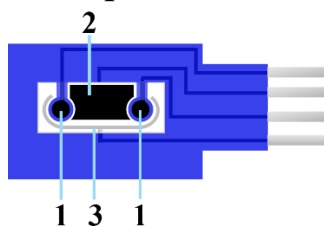


Рис. 2. Четырехэлектродная печатная планарная структура.

Для одновременного определения содержания ионов калия и натрия использовали четырехэлектродные печатные планарные структуры (рис. 2) с двумя индикаторными электродами (№1), вспомогательным электродом (№2) и электродом сравнения (№3). ПИА на данных структурах проводили в тонкослойной проточной ячейке.

Как показано на рис. 3а, инжектирование KCl приводит к амперометрическому сигналу только одного из электродов, с калий-селективной мембраной (сплошная линия), а инжектирование NaCl – только натрий-селективного электрода (пунктирная линия). При инжектировании эквимольной смеси KCl и NaCl наблюдаются отклики от обоих электродов сенсора, а высота пика при введении смеси такая же, как и при раздельном инжектировании солей.

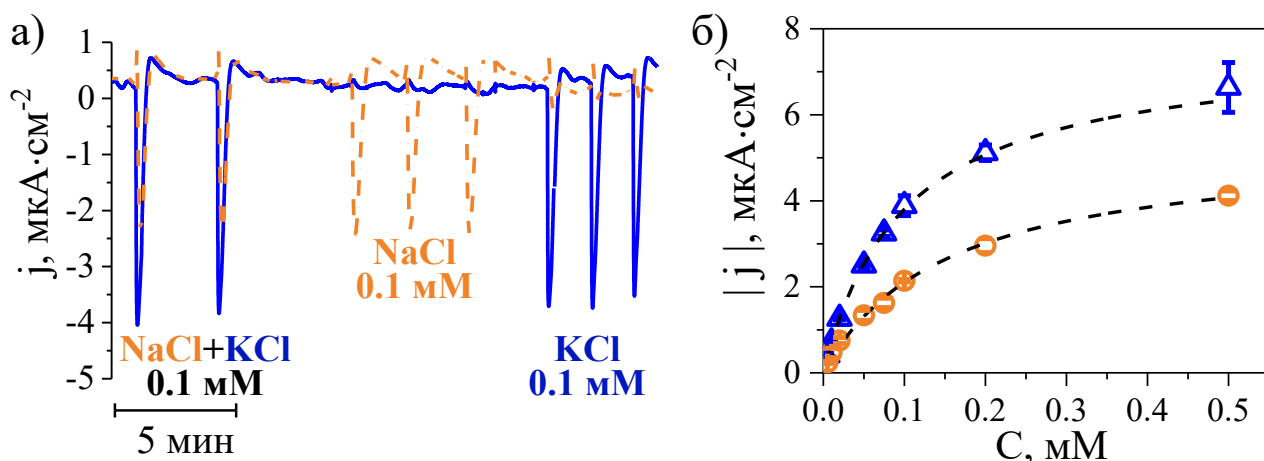


Рис. 3. а) Примеры амперометрических откликов ТК-ИСЭ с калий- (—) и натрий-селективными (---) сенсорами на основе ГЦФ Ni (50 mM Бис-Трис, pH 6.0). б) Градуировочные зависимости сенсора с калий- (Δ) и натрий-селективной мембраной (\circ); пунктиром отмечена аппроксимация уравнением (1).

На рис. 3б представлены соответствующие градуировочные зависимости. Несмотря на то, что s Na⁺-ИСЭ ($20 \pm 3 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) почти в 2 раза ниже, чем у K⁺-ИСЭ ($37 \pm 5 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), это не препятствует анализу биологических образцов, где концентрация натрия обычно значительно выше, чем калия. Электроды на основе ГЦФ Ni применяли для анализа образцов пота (таблица 2).

Таблица 2. Сравнение результатов одновременного определения содержания ионов калия и натрия в образцах пота ТК-ИСЭ и методом капиллярного электрофореза.

Образец пота	ТК-ИСЭ в режиме ПИА		Капиллярный электрофорез	
	C(K ⁺), mM	C(Na ⁺), mM	C(K ⁺), mM	C(Na ⁺), mM
1	8.5±0.1	31.4±0.8	8.46±0.08	33.2±0.5
2	7.56±0.05	33.1±0.7	7.49±0.03	30.7±0.1
3	9.3±0.2	35.6±0.6	8.67±0.08	36.57±0.04

Для исключения систематической погрешности и проверки правильности измерений использовали метод капиллярного электрофореза. В результате относительное отклонение от результатов капиллярного электрофореза не превышает 8 %, подтверждая применимость разработанных биамперометрических ТК-ИСЭ для мультиэлектролитного анализа биообразцов.

Глава 7. Электрохимические ДНК/РНК-сенсоры с использованием меток-нанозимов «искусственная пероксидаза»

Сенсорные платформы на основе ПЭДОТ- N_3

Электрополимеризацию ЭДОТ- N_3 проводили в режиме циклической вольтамперометрии из водного раствора $HClO_4$. Структуру полученного полимера подтверждали методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ИК-спектроскопии. По данным сканирующей электронной микроскопии толщина полимерной пленки после 10 циклов электрополимеризации составляет ~ 130 нм.

Для исследования электрон-транспортных свойств электродов, модифицированных ПЭДОТ- N_3 , регистрировали циклические вольтамперограммы при разных скоростях развертки потенциала в присутствии диффузионно-подвижных медиаторов. На основании зависимости разности потенциалов между пиками от скорости развертки рассчитывали электрохимическую константу скорости (k_s), используя расширенный метод Николсона. В результате исследования зависимости k_s от pH установлено, что тенденции изменения k_s различаются для медиаторов разного заряда (рис. 4). У немодифицированных электродов для отрицательно заряженного $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ величина k_s снижается с увеличением pH (рис. 4а), тогда как для положительно заряженного $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$ отмечается противоположная тенденция (рис. 4б).

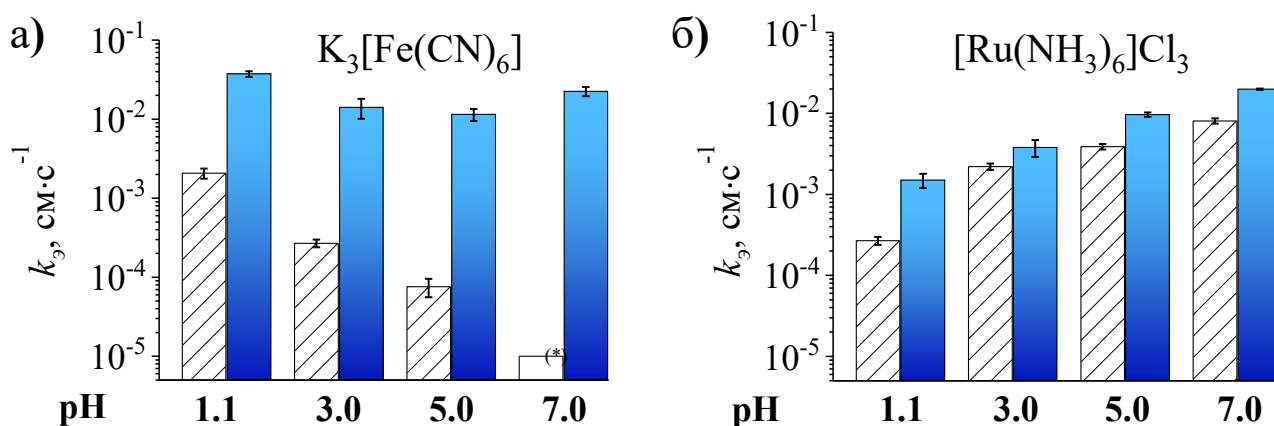


Рис. 4. Влияние pH на электрохимическую константу скорости в присутствии медиаторов 5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ (а), 5 мМ $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ (б) на поверхности немодифицированных электродов (столбцы со штриховкой) и модифицированных ПЭДОТ- N_3 (закрашенные столбцы); (*) – теоретическое значение k_s для необратимого процесса [2]).

Для сенсорных платформ на основе ПЭДОТ- N_3 константы меньше зависят от pH благодаря экранированию полимером поверхностных углеродных групп. Кроме того, во всём рассматриваемом диапазоне pH наблюдается значительное увеличение k_s , по сравнению с немодифицированными электродами.

Детектирование меченых олигонуклеотидов

В работе использовали ДНК-зонды, полученные методом обратной транскрипции участка некодирующей РНК HULC (Highly Upregulated in Liver Cancer). Иммобилизацию алкин-модифицированных ДНК-зондов на модифицированных ПЭДОТ- N_3 электродах осуществляли в результате азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого солями $Cu(I)$. После иммобилизации ДНК-зондов на циклической вольтамперограмме, зарегистрированной в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$, наблюдается увеличение разности потенциалов между пиками на 77 мВ, что может являться косвенным подтверждением иммобилизации, поскольку в контрольных экспериментах, проведенных для исключения неспецифической адсорбции, такого значительного увеличения не наблюдалось.

Для регистрации гибридизации в качестве олигонуклеотидных меток предложено использовать НЧ БЛ. Известно, что каталитически синтезированные НЧ БЛ отличаются высокой каталитической активностью, до 300 раз превосходящей активность природного фермента пероксидазы из корней хрена, не проявляют оксидазную активность и способны функционировать в физиологических растворах [3]. Благодаря этим особенностям НЧ БЛ получили название «нанозимы». Кроме того, НЧ БЛ стабильны, просты в получении, не требуют специальных условий хранения и дешевле ферментов.

При синтезе меток добавление ЭДОТ- N_3 в водно-спиртовую смесь, содержащую $FeCl_3$ и $K_3[Fe(CN)_6]$, инициирует каталитический синтез наночастиц и окислительную полимеризацию мономера. Это позволяет получить композитные наночастицы НЧ БЛ/ПЭДОТ- N_3 , содержащие азидные функциональные группы (\varnothing 35–40 нм). Данные спектроскопии комбинационного рассеяния подтверждают композитную природу синтезированных наночастиц, включая основные полосы ПЭДОТ, а также полосу колебаний азидной группы. После конъюгации композитных НЧ БЛ/ПЭДОТ- N_3 с олигонуклеотидами сохраняется не менее 20 % исходной электроактивности НЧ БЛ, а также не менее 85 % электрокаталитической активности, что подтверждает возможность их использования в качестве электрокаталитических меток в ДНК-сенсорах.

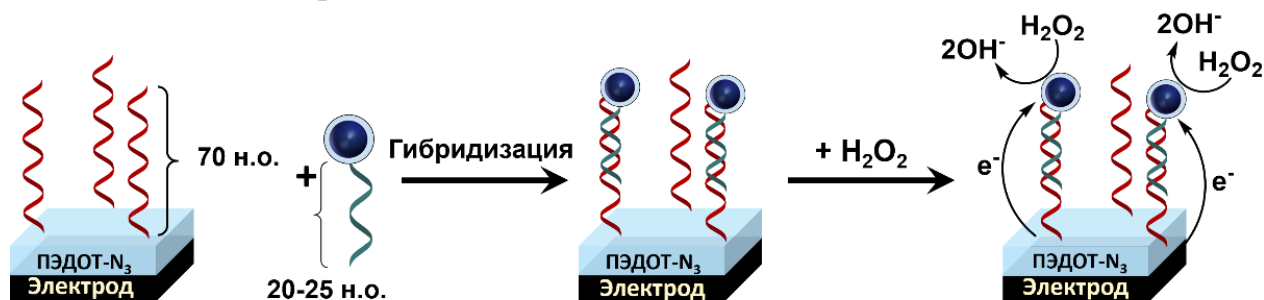


Рис. 5. Схема работы электрохимического ДНК-сенсора при прямом электрокатализе.

На рис. 5 представлена схема функционирования ДНК-сенсоров. После гибридизации иммобилизованных ДНК-зондов с ДНК-мишенями, меченными НЧ БЛ/ПЭДОТ- N_3 , регистрировали электрокаталитический ток восстановления, который возникает при добавлении в систему H_2O_2 (рис. 6а). Регистрацию сигнала ДНК-сенсоров проводили в ячейке фиксированного объема при потенциале 0.0 В и постоянном перемешивании.

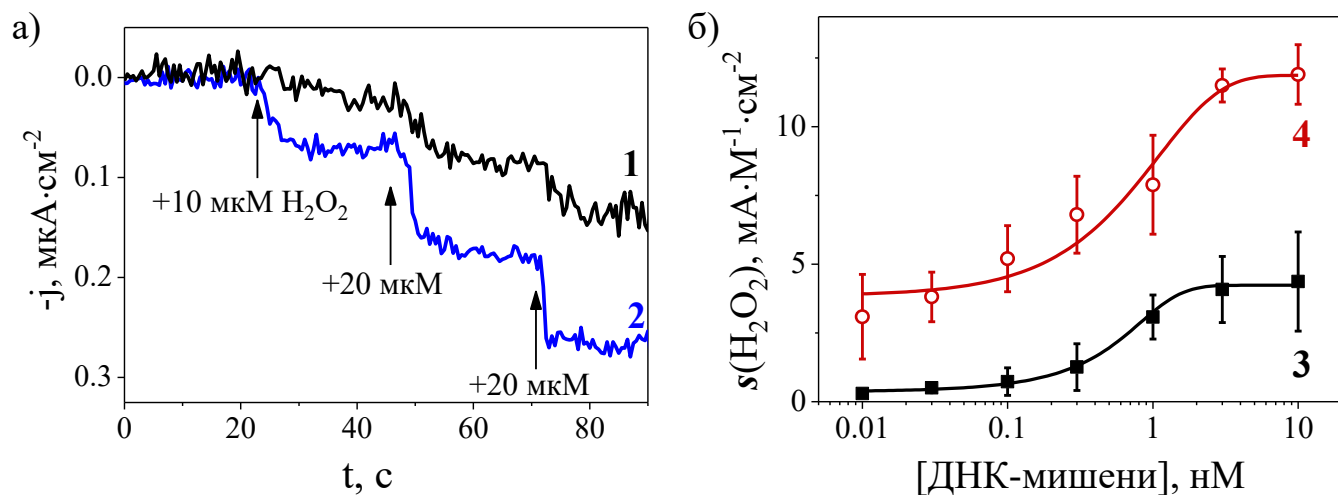


Рис. 6. а) Пример сигналов ДНК-сенсоров после гибридизации в растворах с концентрацией ДНК-мишеней 1 нМ (1) и 10 нМ (2) при добавлении H_2O_2 . б) Градуировочная зависимость коэффициента чувствительности ДНК-сенсоров от концентрации ДНК-мишеней при прямом ■ (3) и медиаторном ○ (4) электрокатализе.

На рис. 6б представлена зависимость коэффициента чувствительности ДНК-сенсоров в реакции восстановления пероксида водорода от концентрации меченых ДНК-мишеней (кривая 3). Её S-образная форма указывает на один тип участков связывания. Для аппроксимации градуировочной зависимости использовали классическое для данных систем уравнение:

$$s = s_{\max} + \frac{s_{\min} - s_{\max}}{(1 + (C_{\text{ДНК-мишень}}/K_d)^p)} \quad (2)$$

где s_{\max} – коэффициент чувствительности сенсора при бесконечно большой концентрации ДНК-мишеней, s_{\min} – коэффициент чувствительности сенсора без меченых ДНК-мишеней, p – коэффициент Хилла, $C_{\text{ДНК-мишень}}$ – концентрация ДНК-мишеней, K_d – константа диссоциации комплекса лиганд-рецептор.

Расчетная K_d ДНК-сенсоров после гибридизации в фосфатном буферном растворе составила (0.75 ± 0.02) нМ. В случае проведения гибридизации в сыворотке крови K_d практически не меняется и составляет (0.77 ± 0.04) нМ. На рис. 6б представлена также градуировочная зависимость, полученная в присутствии диффузионно-подвижного медиатора (пирокатехина). Медиатор повышает эффективность электрокатализа, поскольку в каталитический процесс вовлекаются

нанозимы, находящиеся на расстоянии от поверхности электрода. Однако s в присутствии медиатора возрастает не более чем в 3–8 раз, что свидетельствует о достаточной эффективности прямого безмедиаторного электрокатализа для аналитических целей, поэтому в дальнейшем медиатор не использовали.

Исследование влияние состава буферных растворов для гибридизации на чувствительность ДНК-сенсоров показало, что растворы с низкой ионной силой не предотвращают неспецифическую адсорбцию, а добавление блокирующих агентов приводит к значительному увеличению фоновых токов. При проведении гибридизации в фосфатном буферном растворе удалось избежать этих ограничений, поэтому он был использован для гибридизации. Также установлено, что после гибридизации с олигонуклеотидами, комплементарными различным участкам ДНК-зонда, наибольший коэффициент чувствительности достигался при гибридизации с центральным участком ДНК-зонда (таблица 3).

Таблица 3. ДНК-зонд и ДНК-мишень для конкурентного анализа.

5'-Алкин- TTTTТТААГААТГГАЦАТЦАТТТТАТТТЦАТТТТААТТТАГТТТТГТТТААТТЦАГТТТЦАГТТТТГА-3'
3'-ТАААГ ТААААТТАААТЦААААЦААА-5'-Алкин

Для оценки применимости сенсоров к анализу реальных объектов исследовали возможность определения оцДНК-олигонуклеотидов, не содержащих меток. Для этого использовали конкурентный анализ, когда при гибридизации были добавлены не только оцДНК, меченные нанозимами, но и оцДНК, не содержащие меток. При добавлении 0.2 нМ ДНК-мишеней без меток по смещению градуировочной зависимости обнаружено 0.17 ± 0.09 нМ немеченых ДНК (относительная погрешность 15%).

Другим вариантом использования ДНК-сенсора для анализа реальных объектов является реализация стратегии «сэндвич»-анализа. В этом подходе целевая молекула ДНК или РНК последовательно связывается с двумя зондами: иммобилизованным на поверхности электрода, а затем с зондом, содержащим электрокаталитическую метку (рис. 7а). В качестве целевой молекулы был выбран участок РНК HULC (63 основания, таблица 4), гибридизацию с РНК-мишенями выполняли в сыворотке крови человека, разбавленной в 10 раз.

Таблица 4. ДНК-зонд, целевая РНК и меченая оцДНК для «сэндвич»-анализа.

3'-Алкин- TTTTТТТЦТТАЦТГТАГТААААТА-5'
5'-ААГААУГГАЦАУЦАУУУАУУУЦАУУУААУУАУУУУГУУУААУУЦАГУУУЦАГУУУУГА-3'
3'-Алкин- TТААГАТЦАААГТЦААААЦТ-5'

Градуировочная зависимость ДНК/РНК-сенсоров представлена на рис. 7б; константа диссоциации, по сравнению с ДНК-сенсорами, возрастает и равна 28 ± 2 нМ. Диапазон определяемых концентраций сенсора составляет от 0.2 до 100 нМ, что включает ожидаемые уровни биомаркера в сыворотке крови человека (1 – 10 нМ [4]).

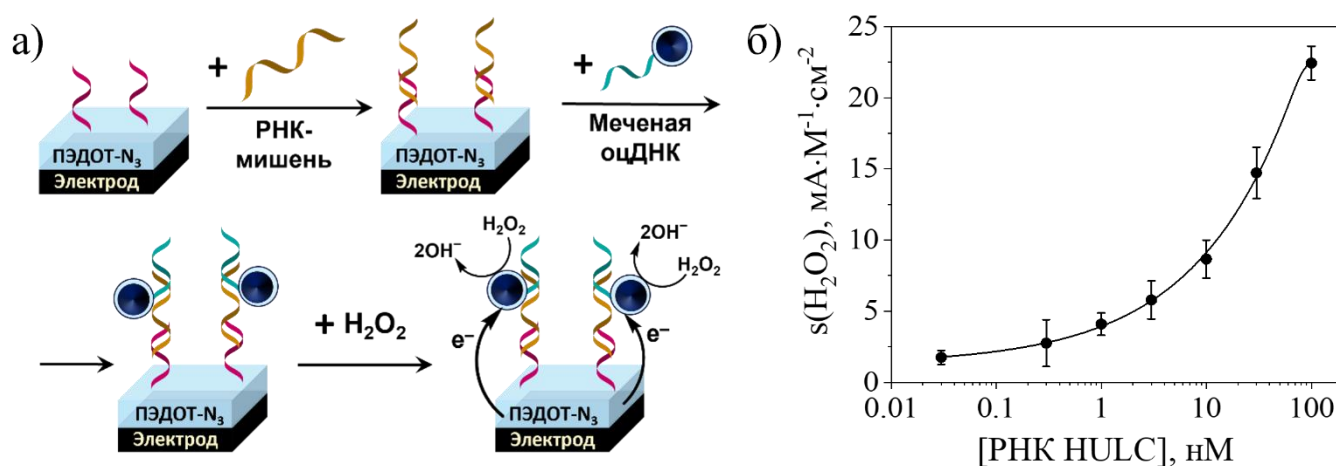


Рис. 7. а) Схема «сэндвич»-анализа ДНК/РНК-сенсора. б) Градуировочная зависимость определения целевой РНК (участок РНК HULC) методом «сэндвич»-анализа при проведении гибридизации в сыворотке крови ([ДНК-мишени] = 30 нМ).

Проверка правильности разработанного ДНК/РНК-сенсора была выполнена способом «введено-найдено». При добавлении 2 нМ целевой РНК в разбавленную сыворотку крови обнаружено 1.8 ± 0.2 нМ РНК ($n = 4$). Относительная погрешность определения не превышает 10%, что соответствует допустимым пределам для данного исследования. Таким образом, разработанный ДНК/РНК-сенсор демонстрирует высокую эффективность определения целевой РНК в сложной биологической матрице.

Глава 8. Сенсоры на основе наноструктурированной БЛ для определения субмикромольных концентраций H_2O_2 в конденсате выдыхаемого аэрозоля

Одним из подходов для концентрирования нелетучих метаболитов в КВВ является сбор конденсата без дополнительного охлаждения, что позволяет минимизировать разбавление пробы парами воды. В данной работе образцы КВВ, полученные без активного охлаждения, будут обозначены как конденсат выдыхаемого аэрозоля (КВА). Для конденсации паров выдыхаемого аэрозоля использовали разработанный в лаборатории компактный конденсор. Принцип его действия основан на повышении эффективности конденсации за счёт внутреннего строения, обеспечивающего формирование турбулентных потоков. Из-за турбулентности существенно возрастает частота столкновения частиц и увеличивается размер образующихся капель. Конструкция конденсора также включает элемент для улавливания слюны, предотвращая её попадание в образец.

Для обеспечения надежного определения субмикромольных концентраций H_2O_2 , необходимо повысить соотношение сигнал/шум, регистрируемое на электродах, модифицированных БЛ. Одним из подходов для минимизации шумов и повышения s сенсоров является оптимизация количества электрокаталитического материала, то есть снижение поверхностной концентрации БЛ. В процессе синтеза БЛ

на поверхности электрода образуются зародыши (нуклеационные центры), поэтому использование разбавленных растворов FeCl_3 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, а также малое число циклов электрополимеризации позволяет синтезировать наноструктурированные покрытия БЛ. В отличие от других подходов для получения наноструктурированных покрытий БЛ этот способ синтеза экспрессный, не требует использования дополнительных матриц, а также может быть реализован на печатных планарных электродах. Сенсоры на основе наноструктурированной БЛ в режиме ПИА характеризуются низким пределом обнаружения H_2O_2 (0.06 мкМ) при стандартном отклонении фонового сигнала, не превышающем $8 \text{ нА} \cdot \text{см}^{-2}$. Однако после непродолжительного анализа образцов КВА с таких сенсоров снижается почти в 2 раза.

С целью адаптации сенсоров к анализу реальных объектов наноструктурированную БЛ стабилизировали ГЦФ Ni, который синтезировали электрохимически на поверхности модифицированных электродов. Стабилизация наноструктурированной БЛ ГЦФ Ni не приводит к существенному изменению аналитических характеристик сенсоров в реакции электрокаталитического восстановления пероксида водорода: s достигает $0.38 \pm 0.05 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$, а предел обнаружения сенсоров равен 0.1 мкМ. Ранее было показано, что при значениях поверхностной концентрации (Γ) $\geq 1.1 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2}$ и сопротивлении переноса заряда ($R_{\text{пз}}$) $\sim 1 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ поверхность электрода покрыта сплошной пленкой БЛ, а при меньших значениях Γ и большем $R_{\text{пз}}$ поверхность электрода заполнена частично [5]. В результате электрохимического синтеза стабилизированной БЛ получены сенсоры с $\Gamma_{\text{БЛ}}$ 0.5–0.7 нмоль $\cdot \text{см}^{-2}$ и $\Gamma_{\text{ГЦФ Ni}}$ 0.9–1.0 нмоль $\cdot \text{см}^{-2}$, а по данным спектроскопии электрохимического импеданса $R_{\text{пз}}$ составляет не менее $7 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$, что подтверждает получение наноструктур БЛ на поверхности электрода.

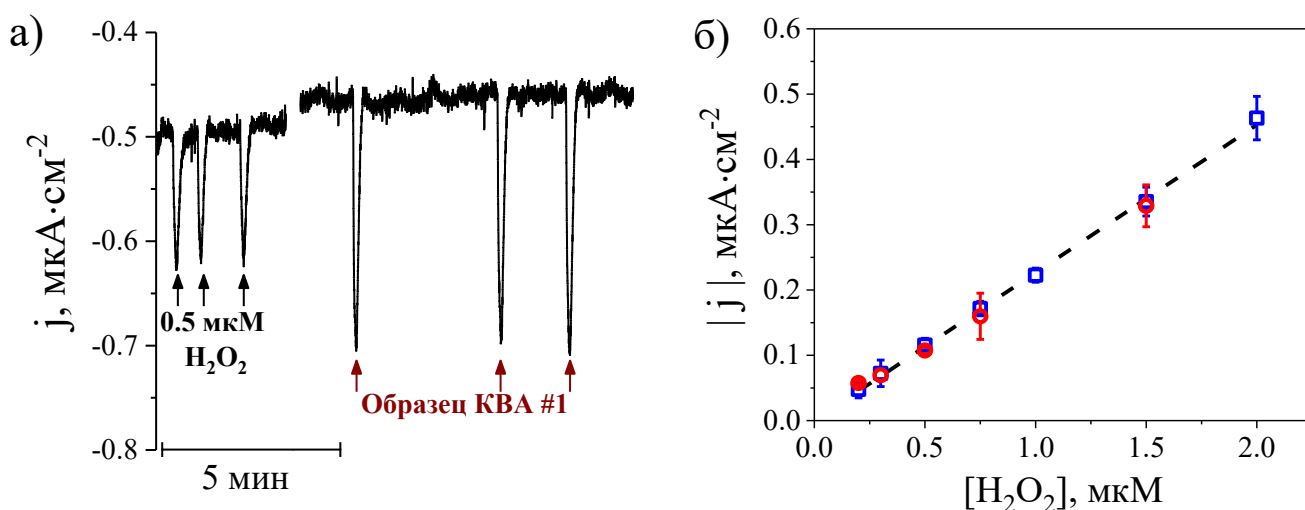


Рис. 8. а) Проточно-инжекционный анализ раствора H_2O_2 и образца КВА. б) Градуировочная зависимость сенсоров на основе наноструктурированной БЛ, стабилизированной ГЦФ Ni, до (■) и после (●) 4-го часа анализа образцов КВА.

Образцы КВА анализировали в режиме проточно-инжекционной амперометрии. При введении в систему образцов КВА формируются катодные амперометрические отклики, аналогичные по форме амперометрическим откликам на раствор H_2O_2 (рис. 8а). Образцы КВА разбавляли в 2 раза более концентрированным буферным раствором для создания ионной силы, соответствующей раствору-носителю. Стабилизация наноструктурированной БЛ гексацианоферратом никеля способствует сохранению коэффициента чувствительности сенсора и ЛДОК, в том числе после 4 часов анализа образцов КВА в режиме ПИА (рис. 8б).

Образцы КВА инкубировали с раствором фермента каталазы, катализирующей диспропорционирование H_2O_2 , в результате чего амперометрический отклик снижался более, чем на 90%. Это подтверждает, что регистрируемый отклик на образцы КВА – результат восстановления H_2O_2 . Также установлено, что при хранении образцов КВА ($+4^\circ\text{C}$) в течение минимум 4 часов концентрация H_2O_2 не меняется, это позволяет транспортировать образцы в присутствии хладагента.

Для определения референсного уровня H_2O_2 в КВА были проанализированы образцы от группы здоровых некурящих добровольцев. В результате анализа 59 образцов КВА установлено, что концентрация H_2O_2 в среднем составляет 2.7 ± 0.5 мкМ, что превышает концентрацию H_2O_2 в КВВ, собранном с дополнительным охлаждением (0.2 мкМ [6,7]). Для оценки динамики концентрации H_2O_2 в КВА собирали образцы у 4 некурящих добровольцев в разные дни. Рассчитанное относительное стандартное отклонение (15–20 %) свидетельствует об умеренном изменении уровня H_2O_2 у одного человека.

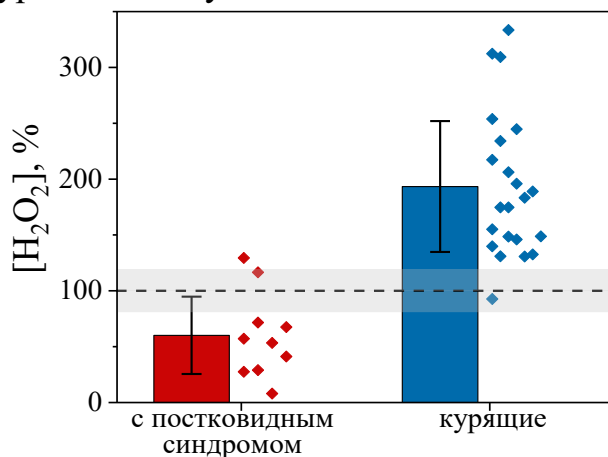


Рис. 9. Содержание пероксида водорода в образцах КВА разных групп добровольцев, относительно здоровых некурящих (100 ± 20 %, серая область на графике). Столбцами обозначено среднее значение.

На рис. 9 представлено относительное содержание пероксида водорода в образцах КВА курящих и пациентов с диагностированным постковидным синдромом. Среднее значение концентрации пероксида водорода в КВА здоровых

некурящих было принято за 100 % с доверительным интервалом 20%, что соответствует диапазону концентраций 2.2–3.2 мкМ (серая область на рис. 9).

Концентрация H_2O_2 в КВА курильщиков находится выше доверительного интервала для некурящих (рис. 9), а концентрация H_2O_2 в КВА у пациентов с постковидным синдромом, наоборот, в среднем ниже, чем у здоровых некурящих (рис. 9). Это снижение уровня H_2O_2 может указывать на измененный окислительный статус при постковидном синдроме, потенциально связанный с легочной гипоксемией. Также вирус, провоцирующий COVID-19, влияет на работу нейроэндокринной системы, что может приводить к дисбалансу гормонов, регулирующих окислительные процессы в организме [8].

По результатам однопараметрического дисперсионного анализа показано, что средние значения содержания H_2O_2 в КВА у здоровых некурящих, пациентов с постковидным синдромом и курящих людей статистически различаются. Следовательно, H_2O_2 в КВА является потенциальным биомаркером для постковидного синдрома, поскольку специфических диагностических тестов для данного заболевания до сих пор не существует. Комбинация метода сбора КВА и высокочувствительных сенсоров открывает новые возможности для неинвазивной диагностики нарушений, связанных с дисбалансом активных форм кислорода в организме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были созданы амперометрические сенсоры на основе наноразмерных гексацианоферратов железа/никеля для определения биомаркеров в биологических жидкостях. Были разработаны твердоконтактные ионоселективные электроды для определения содержания ионов калия, натрия в поте и сыворотке крови. Электроды, модифицированные наночастицами берлинской лазури или гексацианоферратом никеля, генерируют воспроизводимые отклики в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале, а высота катодного пика линейно зависит от концентрации инжектируемых катионов.

Разработанные сенсоры компактны и просты в изготовлении. В сравнении с существующими аналогами, функционирующими в режиме ненулевого тока, удалось сократить время анализа, достичь воспроизводимых амперометрических откликов ($s_r \leq 5\%$) и снизить предел обнаружения. Выбор соответствующего раствора-носителя, не содержащего мешающих катионов, позволил достичь селективности сенсоров, близкой к предельно возможной для используемых ионофоров.

Вторым направлением исследования стало создание амперометрических ДНК/РНК-сенсоров, функционирующих в сыворотке крови человека. Была разработана сенсорная платформа на основе проводящего полимера ПЭДОТ- N_3 , синтезированного в водной среде без поверхностно-активных веществ. Это

позволило достичь высоких значений электрохимической константы скорости в присутствии разнозаряженных медиаторов. Кроме того, наличие функциональных групп на поверхности полимера обеспечивает одностадийную иммобилизацию алкин-модифицированных олигонуклеотидов посредством биоортогональной клик-реакции.

В современных электрохимических ДНК-сенсорах в качестве метки традиционно используют природный фермент пероксидазу, однако природные ферменты имеют ряд ограничений – недостаточная стабильность, высокая стоимость и строгие требования к условиям хранения. Для преодоления этих ограничений в данной работе в качестве электрокаталитических меток предложено использовать нанозимы с пероксидазной активностью – функционализированные композитные наночастицы БЛ. Разработанные сенсоры демонстрируют высокую чувствительность при определении как меченых, так и немеченых олигонуклеотидов в режимах конкурентного и «сэндвич»-анализа.

Несмотря на известную диагностическую ценность конденсата выдыхаемого воздуха его состав существенно варьируется в зависимости от условий отбора проб и конструкции конденсора. В связи с этим необходимо было определить содержание пероксида водорода – маркера окислительного стресса – в конденсате выдыхаемого аэрозоля, полученном с использованием нового типа конденсора. Учитывая низкие содержания H_2O_2 в конденсате выдыхаемого аэрозоля и малые объемы образца, были разработаны высокочувствительные сенсоры для определения концентрации H_2O_2 в данной матрице. Электрохимический синтез наноструктурированной берлинской лазури из разбавленных растворов прекурсоров позволил снизить предел обнаружения сенсоров, в том числе за счет снижения шума. Проблема потери чувствительности сенсоров в процессе анализа конденсата выдыхаемого аэрозоля была решена благодаря стабилизации наноструктурированной берлинской лазури гексацианоферратом никеля. В результате показано, что концентрация H_2O_2 в конденсате выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения, у трех групп добровольцев (некурящих, курящих и пациентов с постковидным синдромом) статистически различаются.

По результатам диссертационной работы можно сформулировать следующие **выводы:**

1. Режим проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале для твердоконтактных ионоселективных электродов на основе гексацианоферратов железа или никеля позволяет проводить экспрессное (15–60 с), высокочувствительное (s до $75 \pm 10 \text{ мА} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$, $C_{\text{мин}}$ до 1 мкМ) определение ионов калия или натрия. Сенсоры функционируют в присутствии избытка мешающих ионов (K^+ или Na^+), показана возможность использования сенсоров для анализа содержания

ионов калия или натрия в сыворотке крови и поте человека (относительное отклонение от результатов капиллярного электрофореза не превышает 8 %). При использовании печатных планарных структур с двумя рабочими электродами возможно одновременное определение содержания ионов калия и натрия в образцах пота.

2. В результате модификации поверхности печатного графитового электрода проводящим полимером поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофеном) (ПЭДОТ-N₃) улучшаются электрон-транспортные свойства медиаторов на поверхности модифицированных электродов: для [Fe(CN)₆]^{3-/4-} электрохимическая константа скорости возрастает до 3 порядков (до $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$), для [Ru(NH₃)]^{3+/2+} – до 5 раз (до $(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$). В сочетании с наличием функциональных азидных групп, модифицированные ПЭДОТ-N₃ электроды являются подходящей сенсорной платформой для иммобилизации ДНК-зондов.

3. Композитные наночастицы берлинской лазури (НЧ БЛ/ПЭДОТ-N₃), сохраняющие 85 % электрокаталитической активности после конъюгации с олигонуклеотидами, использованы как эффективные электрокаталитические метки в ДНК-сенсорах. ДНК-сенсоры позволяют определять меченые ДНК-мишени в диапазоне 0.03 – 3 нМ. ДНК-сенсоры функционируют в режиме конкурентного анализа: при введении в систему 0.2 нМ олигонуклеотидов без меток обнаружено $0.17 \pm 0.09 \text{ нМ}$. ДНК/РНК-сенсоры с электрокаталитическими метками на основе наночастиц БЛ способны функционировать в сыворотке крови. Показана возможность определения РНК, которая является участком маркера гепатоцеллюлярной карциномы, в диапазоне 0.2 – 100 нМ, что включает клинически значимую концентрацию РНК. При определении 2 нМ РНК в сыворотке крови способом «введено-найдено» рассчитанная концентрация не более чем на 10 % отклоняется от истинного значения.

4. Стабилизированные гексацианоферратом никеля сенсоры на основе наноструктурированной БЛ применимы для определения H₂O₂ в конденсате выдыхаемого аэрозоля ($C_{\text{мин}} 0.1 \text{ мкМ}$, $s = 0.38 \pm 0.05 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$). 100 % чувствительности сенсора сохраняется в течение 4 часов измерений образцов конденсата выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения. Обнаружено значимое изменение концентрации H₂O₂ в конденсате выдыхаемого аэрозоля, по сравнению с некурящими добровольцами без бронхолегочных нарушений: у пациентов с постковидным синдромом наблюдается снижение на 39 %, у курящих добровольцев – повышение на 95 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Komkova M.A., Zarochintsev A.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Electrochemical and sensing properties of Prussian Blue based nanozymes “artificial peroxidase” // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2020. V. 872. P. 114048.
2. Bard A.J. and Faulkner L.R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. New York: Wiley, 2001, 850 p.
3. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase // Journal of the American Chemical Society. 2018. V. 140. P. 11302-11307.
4. Liu F., et al. Ultrasensitive strategy based on PtPd nanodendrite/nano-flower-like@GO signal amplification for the detection of long non-coding RNA // Biosensors and Bioelectronics. 2015. V. 74. P. 214-221.
5. Komkova M.A., Karpova E.V., Sukhorukov G.A., Sadovnikov A.A., Karyakin A.A. Estimation of continuity of electroactive inorganic films based on apparent anti-Ohmic trend in their charge transfer resistance // Electrochimica Acta. 2016. V. 219. P. 588-591.
6. Quimbar M.E., et al., Lippert A.R. Chemiluminescent Measurement of Hydrogen Peroxide in the Exhaled Breath Condensate of Healthy and Asthmatic Adults // Analytical Chemistry. 2020. V. 92. P. 14594-14600.
7. Kakeshpour T., Metaferia B., Zare R.N., Bax A. Quantitative detection of hydrogen peroxide in rain, air, exhaled breath, and biological fluids by NMR spectroscopy // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022. V. 119. № e2121542119.
8. Sasikumar S., Unniappan S. SARS-CoV-2 Infection and the Neuroendocrine System // Neuroendocrinology. 2024. V. 114. P. 1158-1175.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук:

1. **Vera A. Shavokshina**, Maria A. Komkova, Ilya O. Aparin, Timofei S. Zatsepin, Arkady A. Karyakin, Egor A. Andreev Improved Electroactivity of Redox Probes onto Electropolymerized Azidomethyl-PEDOT: Enabling Click Chemistry for Advanced (Bio)Sensors // ACS Applied Polymer Materials. 2021. V. 3. № 3. P. 1518–1524. EDN: WEVIYK. – 0.81 п.л. Вклад автора 60 %. Импакт-фактор **4.8** (JIF).
2. Maria A. Komkova, **Vera A. Shavokshina**, Alexander A. Zarochintsev, Denis M. Melnik, Ilya O. Aparin, Timofei S. Zatsepin, Arkady A. Karyakin Catalytically synthesized Prussian Blue nanozymes as labels for electrochemical DNA/RNA sensors // Talanta. 2023. V. 257. № 124337. EDN: HNYKUQ. – 0.92 п.л. Вклад автора 30 %. Импакт-фактор **6.1** (JIF).
3. **Vera A. Shavokshina**, Vita N. Nikitina, Arkady A. Karyakin Improved performance of Prussian blue solid contact allowing flow injection amperometric detection of potassium ions in the excess of sodium // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2024. V. 962. № 118264. EDN: QSFHJG. – 0.92 п.л. Вклад автора 65 %. Импакт-фактор **4.1** (JIF).
4. **Vera A. Shavokshina**, Artur A. Okoneshnikov, Vita N. Nikitina, Arkady A. Karyakin, Amperometric Signal Generation by Self-Doped Polyanilines for Ion-Selective Electrodes // Journal of Analytical Chemistry. 2024. V. 79. P. 740–748. EDN: BAXYBX. – 1.04 п.л. Вклад автора 50 %. Импакт-фактор **1.1** (JIF).
5. Egor A. Andreev, **Vera A. Shavokshina**, Vita N. Nikitina, Darya D. Pozdnyakova, Irina A. Baranova, Alexander G. Chuchalin, Arkady A. Karyakin Sensor platform for noninvasive evaluation of pulmonary oxidative status // Talanta. 2025. V. 290. № 127792. doi.org/10.1016/j.talanta.2025.127792. – 0.47 п.л. Вклад автора 40 %. Импакт-фактор **6.1** (JIF).
6. **В.А. Шавокишина**, Е.А. Андреев, М.А. Комкова, А.А. Карякин Способ изготовления сенсоров на основе замещенного поли(3,4-этилендиокситиофена). Патент РФ № 2781398. Заявка 2021125129 от 25.08.2021, опубл. 11 октября 2022. EDN: UPALEE. – 1.27 п.л. Вклад автора 25 %.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность д.х.н., проф. Карякину Аркадию Аркадьевичу за руководство диссертационной работой, к.х.н. Андрееву Егору Андреевичу, к.х.н. Никитиной Вите Николаевне, к.х.н. Комковой Марии Андреевне за неоценимую помощь, советы и возможность перенять знания и опыт. Автор благодарен к.х.н. Вохмяниной Дарье Владимировне и д.б.н. Супрун Елене Владимировне за ценные замечания и комментарии, а также остальным сотрудникам нашей лаборатории и всем, кто участвовал в настоящем исследовании и содействовал его выполнению.

Автор выражает благодарность к.х.н. Елисееву Андрею Анатольевичу за проведение КР-спектроскопических исследований, к.х.н. Броцману Виктору Андреевичу за проведение ИК-спектроскопических исследований, к.х.н. Леонтьеву Алексею Павловичу за данные СЭМ;

к.х.н. Максимовой Юлии Александровне за проведение измерений методом капиллярного электрофореза и обработку полученных результатов;

д.м.н., проф. Чучалину Александру Григорьевичу, д.м.н., проф. Барановой Ирине Александровне, к.м.н. Поздняковой Дарье Дмитриевне за помощь в организации исследования;

к.х.н. Зацепину Тимофею Сергеевичу и Мельнику Денису Михайловичу за синтез и предоставление необходимых олигонуклеотидов и реактивов;

Автор искренне благодарен семье, Ане и Полине за поддержку и помощь.

Автор выражает благодарность Российскому научному фонду за финансовую поддержку выполненных исследований в рамках грантов 19-13-00131, 24-13-00049.