

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРОССЛИНКЕРОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОРАСПОЗНАЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ИМПЕДИМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМАХ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Рябко А. А.¹, Ситков Н. О.^{2,3}, Марценюк Е. Н.², Зими́на Т. М.^{2,3},
Гареев К. Г.^{2,3}, Шевцов М. А.³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Ситков Никита Олегович,
СПбГЭТУ «ЛЭТИ»,
ул. Профессора Попова, д. 5, лит. Ф,
Санкт-Петербург, Россия, 197376.
E-mail: sitkov93@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 26.03.2024
и принята к печати 07.06.2024.

Резюме

Одними из наиболее перспективных типов биосенсорных систем для детектирования белковых маркеров заболеваний являются импедиметрические биосенсоры. Важной задачей при разработке таких сенсоров является иммобилизация биораспознающих элементов на поверхности электродов. Молекулы, которые содержат активные функциональные группы и обеспечивают связывание поверхности электродов с функциональными группами биораспознавателей, называют сшивающими агентами, или кросслинкерами. В данном обзоре рассмотрены различные типы кросслинкеров, применяемые для иммобилизации биораспознающих элементов на поверхности электродов из различных материалов, а также описаны технологические особенности их использования для создания биосенсорных структур для обнаружения маркерных белков. Данный обзор будет полезен специалистам в медицинской химии, биохимии и нанотехнологии.

Ключевые слова: белковые маркеры, биосенсоры, иммобилизация, импедиметрия, кросслинкеры, нанотехнологии.

Для цитирования: Рябко А.А., Ситков Н.О., Марценюк Е.Н. и др. Использование кросслинкеров для иммобилизации биораспознающих элементов в импедиметрических биосенсорных системах обнаружения белковых маркеров заболеваний. *Трансляционная медицина*. 2024; 11(3): 264-283. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-3-264-283. EDN: IHL CGV

THE USE OF CROSSLINKERS FOR IMMOBILIZATION OF BIORECOGNITION ELEMENTS IN IMPEDIMETRIC BIOSENSORS FOR PROTEIN BIOMARKERS DETECTION

Andrey A. Ryabko¹, Nikita O. Sitkov^{2,3}, Elizaveta N. Martsenyuk²,
Tatiana M. Zimina^{2,3}, Kamil G. Gareev^{2,3}, Maxim A. Shevtsov³

¹ Ioffe Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

³ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Nikita O. Sitkov,
Saint Petersburg Electrotechnical University
"LETI",
Professora Popova str., 5, Saint Petersburg,
Russia, 197376.
E-mail: sitkov93@yandex.ru

Received 26 March 2024; accepted 07 June 2024.

Abstract

One of the most promising types of biosensor systems for detection of protein markers of diseases are impedimetric biosensors. An important issue in the development of such sensors is the immobilization of biorecognition elements on the electrode surface. Molecules that contain active functional groups and provide binding of the electrode surface to the functional groups of biorecognition elements are called crosslinkers. This review discusses different types of crosslinkers used for immobilization of biorecognition elements on various electrode materials and describes the technological features of their use to create biosensor structures for the detection of marker proteins. This review will be useful to experts in medicinal chemistry, biochemistry and nanotechnology.

Key words: biosensors, crosslinkers, immobilization, impedimetric detection, nanotechnology, protein markers.

For citation: Ryabko AA, Sitkov NO, Martsenyuk EN, et al. The use of crosslinkers for immobilization of biorecognition elements in impedimetric biosensors for protein biomarkers detection. Translational Medicine. 2024; 11(3): 264-283. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-3-264-283. EDN: IHL CGV

Список сокращений: БСА — бычий сывороточный альбумин, МИП — молекулярно-импринтированные полимеры, ТЭА — триэтоксисилановый альдегид 4-АТР — 4-аминотиофенол, АРТЕS — (3-аминопропил) триэтоксисилан, EDC — N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид, FTO — легированный фтором оксид олова, ITO — оксид индия-олова, NHS — N-гидроксисукцинимид, PBS — фосфатный буфер, SAM — самоорганизующиеся монослои.

Белки — это важные биомолекулы, которые участвуют в различных жизненных процессах в орга-

низме, таких как катализ, транспорт, сигнализация, регуляция, защита и поддержание структуры. Белки являются молекулярными маркерами различных физиологических состояний. Поэтому детектирование и количественная оценка уровней белков имеют важное значение для диагностики и мониторинга многих заболеваний, в том числе инфекционных, онкологических, аутоиммунных и др. [1–3]. Специалистами отмечается, что точная и своевременная диагностика таких заболеваний требует совершенствования и развития существующих методик детектирования (иммуноферментный анализ (ИФА), иммунофлуоресцентный анализ, хроматография,

электрофорез и т. д.) [4, 5], а также создания новых методов, способных осуществлять более быстрое, высокочувствительное, специфическое, простое и экономичное детектирование белковых маркеров. Еще одной важной задачей современной биомедицины является разработка новых устройств, позволяющих осуществлять экспресс-диагностику заболеваний на месте исследования (Point-of-Care Testing). Подобные системы могут быть реализованы на основе биосенсорных устройств, использующих специфичные биохимические реакции для обнаружения аналита [6, 7]. Точность данных, полученных с помощью биосенсоров, определяется составом анализируемых образцов, биохимическими свойствами используемого распознающего элемента, конструкцией устройства, а также характеристиками преобразователя сигналов.

Наиболее распространенными в биосенсорике являются оптические и электрохимические методы детектирования. При этом электрохимические биосенсоры обладают рядом преимуществ, таких как простота конструкции и миниатюризации, низкий уровень помех от окружающей среды, а также возможность имплантации в тело человека для осуществления непрерывного мониторинга [8]. Электрохимические биосенсоры принято разделять на три группы в зависимости от типа измеряемого параметра: потенциметрические, амперометрические и импедиметрические [9]. Импедиметрические биосенсоры фиксируют изменение комплексного электрического сопротивления (импеданса) в электрохимической ячейке при связывании целевого белка с поверхностью электрода, которая модифицирована специфическими биорецепторами. В отличие от потенциметрических и амперометрических биосенсоров, импедиметрическим биосенсорам не требуются метки для определения аналита, что делает их производство более простым, технологичным и экономичным.

На сегодняшний день импедиметрические биосенсоры являются одним из самых востребованных направлений для детектирования белковых аналитов. Среди распространенных примеров белковых мишеней импедиметрической биосенсорики можно выделить:

- *Воспалительные биомаркеры:* С-реактивный белок [10] и интерлейкин-6 (IL-6) [11], которые часто ассоциируются с воспалительными и аутоиммунными заболеваниями.

- *Биомаркеры сердечной недостаточности:* Сердечные тропонины [12], креатинкиназа [13], миоглобин [14] или В-типа натрийуретический пептид (BNP) [15], которые могут указывать на сердечную недостаточность.

- *Онкомаркеры:* Простатический специфический антиген (ПСА) [16], СА-125 для диагностики рака яичников [17], альфа-фетопrotein (AFP) — для рака печени [18] и белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70), ассоциируемый с различными опухолями [19].

- *Маркеры неврологических расстройств:* Бета-амилоид [20] или тау-белок [21], которые могут быть связаны с болезнью Альцгеймера.

- *Инфекционные маркеры:* Антигены или антитела, специфичные для определенных патогенов, например, коронавируса COVID-19 [22], вируса гепатита [23] или ВИЧ [24].

Эти биомаркеры могут быть обнаружены в различных биологических жидкостях, таких как кровь, моча или слюна, что делает импедиметрические биосенсоры мощным инструментом для ранней диагностики и мониторинга заболеваний. При этом предел детектирования с помощью таких систем может достигать атто- и фемтомолярных концентраций в биологических образцах [25]. В обзоре [26] представлено многообразие примеров применения импедиметрических биосенсоров для обнаружения белковых мишеней.

Для обнаружения белковых мишеней импедиметрические биосенсоры имеют ряд достоинств перед другими электрохимическими системами детектирования. Electroды импедиметрических биосенсоров могут быть модифицированы с помощью различных наноструктурированных материалов, которые увеличивают площадь электродов, улучшая перенос электронов и усиливая детектируемый сигнал. В качестве биораспознающих элементов для обнаружения белковых биомаркеров заболеваний чаще всего используются антитела, пептиды, нуклеотиды и ферменты, которые обеспечивают стабильное и специфичное связывание целевого белка на поверхности электрода. Анализ частотной зависимости электрического импеданса позволяет исследовать различные аспекты связывания целевого белка с рецепторами, включая кинетику, термодинамику, массоперенос и структурные особенности. Важным достоинством импедиметрических биосенсоров является возможность проведения измерений на одной частоте и возможность создания мультисенсорных электродных матриц для обнаружения сразу нескольких биомаркеров на одном чипе. Кроме того, импедиметрические биосенсоры позволяют достаточно удобно применять новые методы обработки сигнала, информационные подходы на основе искусственного интеллекта и нейронных сетей для повышения разрешения, уменьшения шума, оптимизации параметров, классификации данных

и автоматизации анализа [27]. Структурная схема импедиметрического биосенсора для обнаружения белков представлена на рисунке 1.

Одним из важных факторов, влияющих на устойчивое функционирование импедиметрических биосенсоров, являются качество и ста-

бильность биораспознающего слоя, который формируется на поверхности электродов. Для этого необходимо использовать специальные химические соединения, называемые кросслинкерами (или сшивающими агентами), которые способны связывать биораспознаватели с электродами или

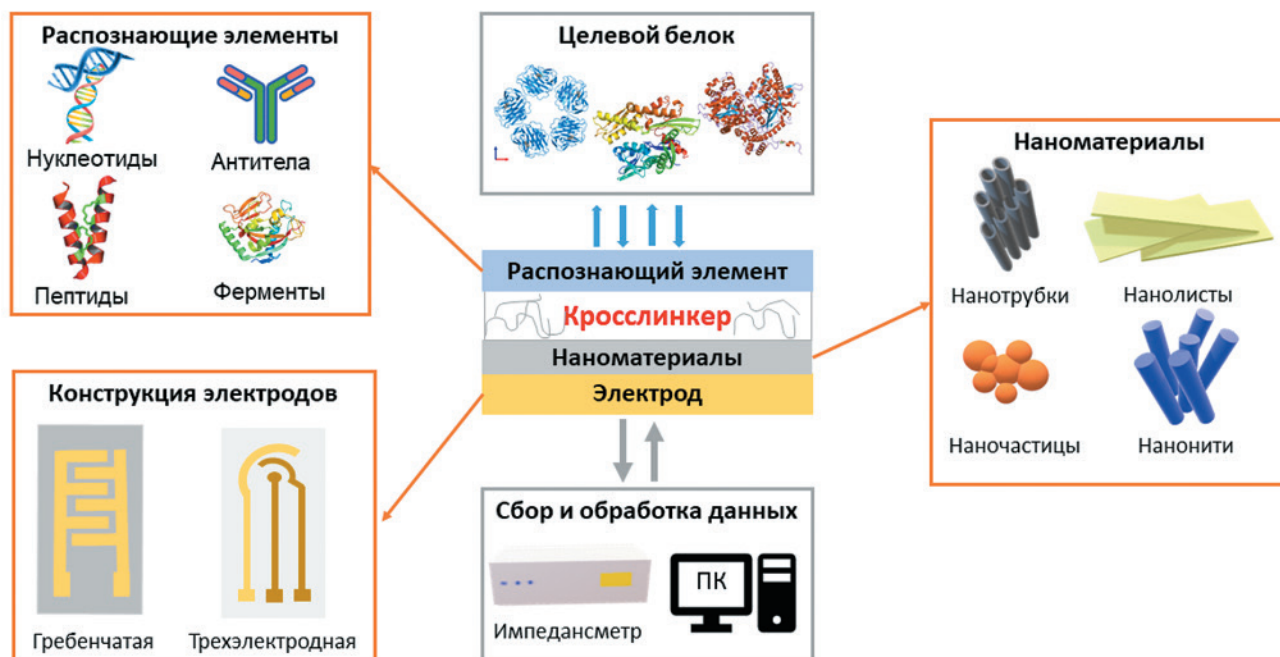


Рис. 1. Структурная схема импедиметрического биосенсора для обнаружения белковых маркеров заболеваний

Figure 1. Structure of impedimetric biosensor for detecting protein markers of diseases

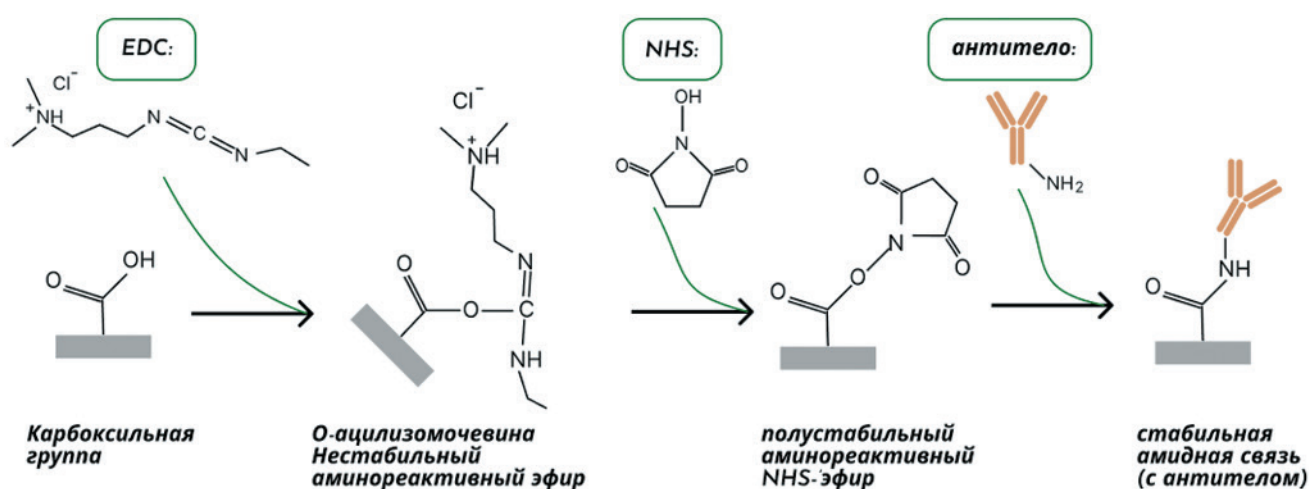


Рис. 2. Активация карбоксильных групп на поверхности материала электрода для образования амидной связи с помощью EDC/NHS химии для связывания биораспознавателя-антитела

Figure 2. Activation of carboxyl groups on the electrode surface to form an amide bond using EDC/NHS chemistry for binding of antibody

друг с другом, образуя сетчатую структуру [28]. Кросслинкеры содержат активные функциональные группы, которые надежно обеспечивают связывание поверхности электродов с функциональными группами биораспознавателей. Выбор подходящего кросслинкера может зависеть от типа биораспознавателя, типа электрода, условий иммобилизации и детектирования. Кросслинкеры могут влиять на такие параметры биосенсора, как плотность, толщина и однородность биораспознающего слоя, а также на специфичность, чувствительность, селективность и стабильность рабочих характеристик [29]. Поэтому исследование влияния кросслинкеров на свойства и функции биораспознающих элементов и биосенсоров в целом является достаточно актуальной задачей для современной трансляционной медицины.

Функционализация поверхности NHS-эфиром

Одним из наиболее широко распространенных методов сшивания биораспознавателей с модифицированными электродами является активация карбоксильных групп с помощью раствора N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) гидрохлорида и N-гидроксисукцинимид (NHS) для образования аминореактивных промежуточных продуктов [30], которые спонтанно реагируют с первичными аминогруппами (EDC/NHS coupling chemistry), как показано на рисунке 2.

EDC гидрохлорид является сшивающим агентом нулевой длины для образования амидных связей [31, 32]. EDC активирует карбоксильные группы с образованием нестабильного промежуточного продукта (О-ацилизо мочевины), который легко вытесняется реакцией нуклеофильного замещения первичными аминогруппами. Для связывания с биораспознающими молекулами EDC используется вместе с NHS либо с его водорастворимым аналогом (sulfo-NHS) [33], который приводит к образованию более стабильного аминореакционного NHS-эфира, вследствие чего эффективность EDC-опосредованных реакций связывания увеличивается. Активированный эфир карбоновой кислоты также реагирует с аминогруппой с образованием амидной связи. NHS-эфиры обладают также относительной устойчивостью и могут храниться при низкой температуре в безводном состоянии.

Поскольку механизм сшивания EDC/NHS наиболее широко используется для формирования чувствительных элементов импедиметрических сенсоров для детектирования белковых маркеров заболеваний, то примеры его реализации можно

сгруппировать по типу используемого материала электродов.

Самоорганизующиеся монослои.

Золотые электроды

Самоорганизующиеся монослои (*self-assembled monolayers, SAM*) содержат карбоксильные группы, которые активируют с помощью EDC/NHS для связывания с биораспознавателем [34]. Молекулы, образующие SAM, также содержат тиольную группу и ковалентно связываются с золотым электродом через Au-S связи. Формирование SAM обеспечивается, как правило, инкубацией золотого электрода в растворе молекул, образующих SAM, в течение длительного времени (около 16–24 ч.) при комнатной температуре. После чего проводят EDC/NHS активацию карбоксильных групп. Поверхность электродов, модифицированных SAM с переходным NHS-эфиром, становится пригодной к иммобилизации биораспознавателя.

Более подробно пример протокола формирования биосенсора с использованием EDC/NHS химии можно рассмотреть на основе работы [35], где для создания SAM использовалась 3-меркаптопропионовая кислота (3-MPA). Общая схема создания биосенсора для обнаружения Альфа-1-В гликопротеина (A1BG), являющегося биомаркером эндометриоза III и IV стадии, представлена на рисунке 3.

Перед формированием SAM золотой электрод подвергали ультразвуковой очистке, промывали деионизованной водой, этанолом и сушили в атмосфере азота. После очистки электроды погружали в раствор 3-MPA (в этаноле) и инкубировали в течение 24 часов, чтобы обеспечить правильное образование SAM на поверхности рабочих электродов. Модифицированные SAM электроды промывали деионизованной водой, сушили в азоте и помещали в смесь 0,4 М EDC и 0,1 М NHS в водном растворе на 15 минут, чтобы обеспечить конверсию карбоксильной группы (–COOH) на переходный NHS-эфир. После следующей промывки деионизованной водой и сушки, поверхность функционализированного электрода покрывали 50 мкл антитела anti-A1BG (8 мкг/мл) в растворе фосфатного буфера (PBS) и инкубировали в течение 30 минут, чтобы обеспечить ковалентную связь между антителом и электродом. Модифицированные электроды трижды промывали раствором PBS для удаления остатков антител. Затем обрабатывали 3 % (по массе) раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) для пассивации ковалентно-активных поверхностных групп. Затем электроды снова трижды промывали раство-

ром PBS и инкубировали в 50 мкл растворенного в PBS антигена A1BG в течение 30 минут.

Этапы создания биосенсоров с использованием золотых электродов с SAM и EDC/NHS активацией сходны. Следует подчеркнуть, что в данном случае особую важность представляет тщательная предварительная очистка Au-электродов, а также их промывка между этапами функционализации и иммобилизации. А для формирования SAM используются различные молекулы, как правило, содержащие меркаптогруппу (тиолы). Так, в работе [36] для формирования SAM использовалась 4-меркаптобензойная кислота, в работе [37] применяли 4-меркаптофенилуксусную кислоту, в работах [38] и [39] SAM формировались из 11-меркаптоундекановой кислоты с протяженной углеродной цепью. Также SAM из молекул с длинной углеродной цепью формировали из (полиэтиленгликоль)3-пропионовой кислоты. В работе [40] SAM на золотых электродах формировали из молекул тиоктовой кислоты.

Проводящие оксиды металлов

Помимо золотых электродов достаточно широко используются прозрачные проводящие электроды на основе оксидов металлов, такие как оксид индия-олова (ITO) и легированный фтором оксид олова (FTO). Молекулы SAM для последующей EDC/NHS обработки также содержат карбоксильные группы, однако связывание молекул SAM с поверхностью ITO (или FTO) обеспечивают, как правило, Р-О или Si-О связи. Для этого электроды из проводящих оксидов металлов дополнительно гидроксилируют, то есть функционализируют OH-группами погружением в раствор NH_4OH , H_2O_2 , H_2O . Айдин Э. Б. и соавторы [41] для ковалентного связывания с гидроксильными группами на поверхности ITO и образованием Р-О связи использовали 3-фосфонопропионовую кислоту (РНР). Аналогично, в работе [42] SAM на поверхности гидроксильированного FTO образовывали с помощью 6-фосфоногексановой кислоты (РНА). Образование SAM производили также погруже-

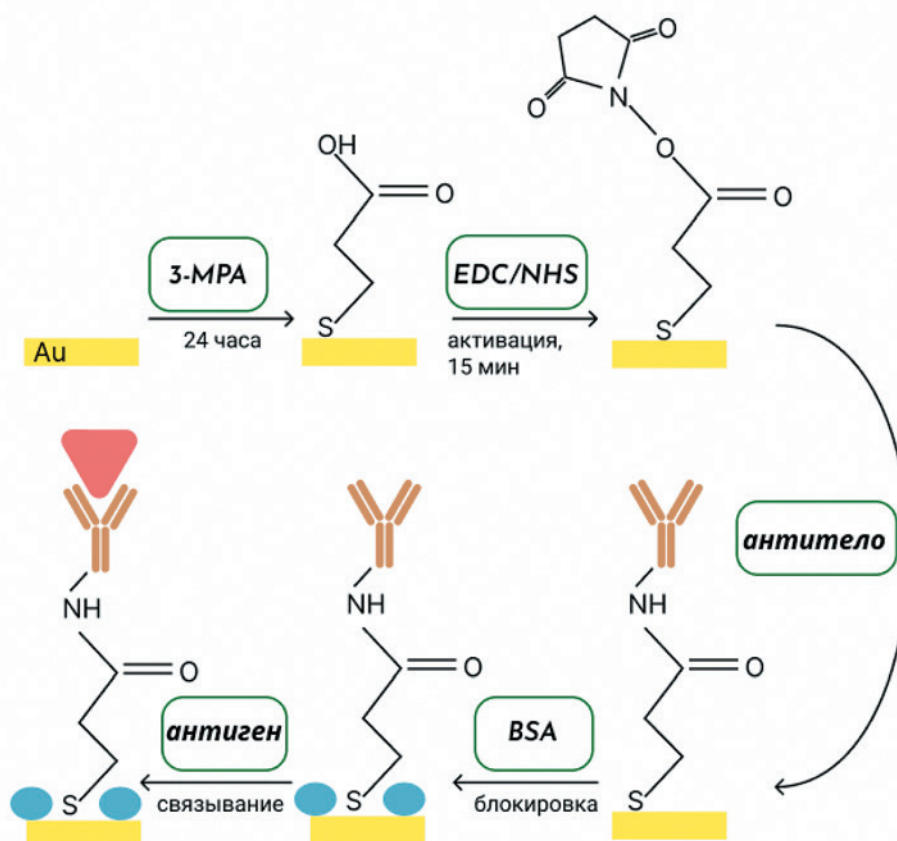


Рис. 3. Схема создания биосенсора с SAM из 3-MPA с использованием EDC/NHS активации карбоксильных групп для регистрации антигена A1BG

Figure 3. Scheme of a biosensor with SAM from 3-MPA using EDC/NHS activation of carboxyl groups for detection of the A1BG antigen

нием электродов в растворы. Иначе производилось связывание SAM в работе [43], где в качестве молекул для формирования SAM использовался карбоксиэтилсилантриол, а связывание обеспечивалось через Si-O связи.

Таким образом, самоорганизующиеся монослои (SAM) на золотых электродах, функционализированные с использованием EDC/NHS химии, представляют собой мощный инструмент для создания высокочувствительных биосенсоров. Тщательная очистка и последующая модификация электродов обеспечивают оптимальное связывание биораспознавателей и позволяют точно регистрировать специфические биомаркеры заболеваний. Использование различных тиольных молекул для формирования SAM расширяет возможности адаптации биосенсоров под конкретные диагностические задачи.

Углеродные материалы

Из достаточно обширного набора углеродных материалов наиболее актуальными для использования в импедиметрических биосенсорах являются углеродные наноматериалы и наноструктуры. Они обеспечивают высокую шероховатость поверхности, повышая тем самым ее активную площадь для дальнейшей иммобилизации, что позволяет повысить динамический диапазон детектирования до клинически релевантных значений. Поэтому, как правило, графитовые или стеклоуглеродные электроды модифицируют различными углеродными наноматериалами.

Рорбах Ф. и коллеги из Университета Бонна (Германия) [44] отмечают, что многостенные углеродные нанотрубки содержат на своей поверхности некоторое количество карбоксильных групп. Тем не менее, в работе [45] экспериментально показали, что электрохимическая обработка многостенных углеродных трубок путем приложения окислительного потенциала 1,4 В привела к значительному увеличению концентрации карбоксильных групп и более эффективному связыванию поверхности электродов с аминоклассами аптамеров в результате использования EDC/NHS активации. Кроме того, отмечается, что аптамеры могут закрепляться на карбоксильных группах окисленных нанотрубок путем химической реакции, а также самостоятельно собираться в углеродные нанотрубки за счет π -стекинговых взаимодействий между основаниями нуклеиновых кислот и стенками углеродных нанотрубок.

Джозгорбани М. и соавторы [46] показали, что частично восстановленный графен в их исследовании содержит достаточное количество карбок-

сильных групп для эффективной иммобилизации. Тем не менее, в работе [47] наноккомпозит из восстановленного оксида графена с золотыми наночастицами дополнительно функционализировали 3-меркаптопропионовой кислотой с образованием SAM. В работе [48] в качестве гибкого электрода использовали графеновую пену, которую функционализировали пиренкарбоновой кислотой также через π -стекинг.

Демирбакан Б. и коллеги использовали [49] одноразовые электроды из графитовой бумаги, модифицированные фуллеренами C_{60} . Чтобы обеспечить формирование карбоксильных групп, электрод инкубировали в растворе H_2SO_4 , после чего проводили активацию в растворе EDC/NHS. В работе [50] в качестве материала электрода использовали лабиринтоподобные углеродные «наностенки», легированные бором. Функционализацию карбоксильными группами проводили путем модификации поверхности электрода молекулами бензойной кислоты.

Углеродные наноматериалы и наноструктуры, благодаря своей высокой шероховатости и активной площади, играют важную роль в улучшении динамического диапазона импедиметрических биосенсоров. Электрохимическая обработка и функционализация этих материалов значительно увеличивают эффективность иммобилизации биораспознавателей, что открывает новые перспективы для клинической диагностики.

Полимерные материалы

Поверхность электродов модифицируют также тонкими слоями полимеров, что в некоторой степени сходно с использованием самоорганизующихся монослоев из молекул с длинными углеродными цепочками. Для связывания с аминоклассами с помощью EDC/NHS-кросслинкера полимеры нулевой длины на своей поверхности также должны содержать карбоксильные группы.

В работе [51] кислотозамещенный пиррольный полимер (N-пирролилпропановая кислота, P(Pyr-Pac)), содержащий на концевых участках множество карбоксильных групп, получали с использованием общих методов гидролиза из метоксизамещенного пиррольного полимера P(Pyr-Ome). Метильные группы боковой цепи полимера P(Pyr-Ome) удаляли нагревом в растворе гидроксида натрия при 100 °C. После чего проводили этапы фильтрации и очистки. В целом получение полимера P(Pyr-Pac) в работе обеспечивали также несколькими предварительными этапами с получением: кислотозамещенного пиррольного мономера (Pyr-Pac) из 1-(2-цианоэтил) пиррола, метоксизамещен-

ного пиррольного мономера (Pyr-Ome) из мономеров (Pyr-Pac) и из (Pyr-Ome) полимера P(Pyr-Ome). Нанесение самоорганизующихся полимерных монослоев P(Pyr-Pac) на электрод (гидроксированный ИТО) проводили с помощью погружения электродов в раствор с полимером. Однако, как правило, полипиррол чаще модифицируют пиррол-карбоновыми кислотами, что несколько упрощает функционализацию. Так, профессор Грандарилья М. и соавторы из Университета Амазонас (Бразилия) [52] для модификации электрода наносили сополимер методом электроосаждения из раствора мономеров пиррола (0,05 моль/л) и пиррол-3-карбоновой кислоты (0,1 моль/л) посредством 5 CV (current-voltage) циклов в диапазоне от 0 до 1 В. В работе [53] сначала проводили электрополимеризацию полипиррола (5 CV-циклов, от 0 до 0,7 В), а затем модифицировали пиррол- α -карбоновой кислотой при постоянном смещении 2 В (15 мин.) для обеспечения C–C связей между полипирролом и карбоновой кислотой. Профессор Ким М. и коллеги [54] при создании биосенсора использовали поли(3,4-этилендиокситиофен) (PEDOT), однако для функционализации карбоксильными группами полимеризацию проводили с включением золотых наночастиц, стабилизированных цитратом натрия. Таким образом, в полученном композите полимер обеспечивал перенос заряда, а золотые частицы в цитратной оболочке обеспечивали карбоксильные группы для дальнейшей активации и связывания с антителами.

Таким образом, в ряде случаев использование полимеров с карбоксильными группами, таких как кислотозамещенный пиррольный полимер, в значительной степени упрощает процесс функционализации электродов для биосенсоров. Методы электроосаждения и электрополимеризации позволяют точно контролировать нанесение полимерных слоев, обеспечивая необходимую функциональность для связывания биораспознавателей.

Другие материалы

Очевидно, что для модификации электродов возможно использование также композитов различных материалов, например, для обеспечения необходимого значения сопротивления, концентрации функциональных групп, шероховатости поверхности и достаточной адгезии. Такими материалами могут быть композиты на основе полимеров и углеродных материалов и наночастиц, а также композиты на основе различных наноматериалов. Например, Ганавати и соавторы [55] модифицировали углеродный электрод многостенными углеродными нанотрубками, декори-

рованными графеновыми квантовыми точками и золотыми наночастицами. Карбоксильные группы данного нанокompозита также активировали в EDC/NHS-растворе.

Известно применение и других типов материалов, карбоксильные группы которых также активировались с помощью EDC/NHS. Так, в работе [56] для создания биосенсора использовались FeCo-металлоорганические каркасы (MOF) для модификации Ni-пены и последующей EDC/NHS-активации. Гупта и коллеги [57] использовали металлоорганические каркасы $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ в составе композита с проводящим полимером полианилином. В работе [58] при модификации электродов использовались фталоцианины кобальта (CoTAPc и CoTPPc), обеспечивающие устойчивое формирование карбоксильных групп. В работах [59] и [60] для модификации электродов использовались коллоидные квантовые точки SnTeSe и CdTe, покрытые L-Цистеином и меркаптоэтантарной кислотой соответственно.

Следует отметить, что EDC/NHS, как и другие кросслинкеры, могут обеспечивать активацию функциональных групп самих биораспознающих элементов [61]. Также EDC/NHS-активацию используют в многоэтапных протоколах иммобилизации. Так, Тетрис М. из университета Клуж-Напоки (Румыния) и коллеги [62] после EDC/NHS-активации карбоксильных групп на функционализированном электроде проводили связывание п-аминотиофенола, к тиоловой группе которого иммобилизовали золотые наночастицы, к которым в свою очередь через Au-S связь присоединили тиолированный аптамер.

Композитные материалы, обогащенные функциональными группами, открывают новые горизонты в модификации электродов для биосенсоров. Использование EDC/NHS для активации этих групп значительно усиливает возможности иммобилизации биораспознающих элементов, что способствует созданию более чувствительных и точных диагностических устройств.

Таким образом, метод EDC/NHS является ключевым в создании импедиметрических биосенсоров, позволяя эффективно связывать биораспознаватели с электродами. Эта технология обеспечивает стабильность и долговечность амидных связей, что критически важно для точности и надежности биосенсоров. Применение EDC/NHS в различных материалах электродов расширяет возможности детектирования белковых маркеров, что делает этот метод весьма перспективным для клинической диагностики и мониторинга заболеваний.

Кросслинкеры с концевой NHS-группой

Помимо использования EDC/NHS химии для связывания с биораспознающими элементами используются также кросслинкеры, которые в своем составе уже содержат NHS-эфир (или sulfo-NHS) на своих концах. Так, в работе [63] для связывания антитела и тонкого слоя оксида цинка использовался дитиобис (сукцинимидил пропионат) (DSP). В работе [64] профессор Ванг и соавторы в качестве кросслинкера использовали 3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидил пропионат) DTSSP, содержащий сульфо-NHS, который обеспечивал иммобилизацию белка G. В работе [65] самоорганизующийся монослой на золотом электроде формировали с помощью Sulfo-LC-SPDP (сульфосукцинимидил 6-(3'-(2-пиридилдитио) пропионамидо) гексаноат) для последующего связывания антител. Шамсуддин С. и коллеги [66] представили многоэтапный процесс формирования биосенсоров на основе аффимеров (каркасных белков, получаемых методом фагового дисплея). Для связывания с аффимерами раствор октопамина (содержащий аминокислоты) смешивали с sulfo-SMCC (сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат) и оставляли для проведения реакции. Аффимеры, содержащие остаток цистеина в С-концевой области, восстанавливали, смешивали с октопамидом-SMCC и инкубировали. Затем осуществляли электрохимическое осаждение комплекса октопамид-SMCC-аффимер.

Функционализация электродов карбоксильными группами

Несмотря на то, что карбоксильные группы, как правило, активируют с помощью кросслинкеров, известны примеры их самостоятельного использования для иммобилизации биораспознавателей с аминокислотами. Так, в работе [67] для иммобилизации ДНК-аптамера поверхность электрода модифицировали дендримером поли(амидоамина) (ПАММ) второй генерации с 1,4-диаминобутановым ядром (G2-PS), который имеет 16 поверхностных групп янтарной кислоты. Поверхностные карбоксильные группы связывались с аминокислотами ДНК-аптамеров. Профессор Ванг С. и коллеги [68] использовали этот подход для создания 8-канальной электрохимической матричной системы. В работе группы авторов из Университета Измира (Турция) [69] углеродные нановолокна активировали электрохимически в ацетатном буфере. Карбоксильные группы на поверхности нановолокон обеспечивали связывание с NH_2 -функционализированными аптамерами.

Функционализация электродов альдегидной группой

Для связывания с аминокислотами биораспознающих элементов также используются кросслинкеры, содержащие альдегидную группу.

Как было упомянуто выше, самоорганизующиеся монослои на оксидах могут быть образованы путем связывания через Si-O связи. Профессор Лоу И. и соавторы [70] представили подход к созданию импедиметрического биосенсора с возможностью интеграции с подложками кремния, а именно использовалась структура, состоящая из кремниевой подложки *p*-типа проводимости, диоксида кремния и нитрида кремния $\text{Si-p/SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$. Для функционализации поверхности Si_3N_4 подложку гидроксильировали в растворе H_2O_2 и H_2SO_4 с небольшим окислением приповерхностной области. А функционализацию триэтоксисилановым альдегидом (ТЭА) проводили в паровой фазе. Связывание антитела к человеческому сывороточному альбумину (anti-HSA) с ТЭА обеспечивалось реакцией между аминокислотой антитела и альдегидной группой ТЭА.

Основным же кросслинкером, содержащим альдегидные группы, является глутаровый альдегид, содержащий концевые альдегидные группы с двух сторон, что позволяет обеспечить связывание с множеством материалов, содержащих концевые аминокислоты. Так, в работе [71] поверхность тонкого слоя SiO_2 функционализировали аминокислотами с помощью (3-аминопропил) триэтоксисилана (APTES). А аминокислоты служили для связывания с глутаровым альдегидом в качестве кросслинкера (также в процессе инкубации) для связывания с антителами. В данной работе поверхность SiO_2 перед функционализацией APTES не гидроксильировали, а подвергали плазменной обработке аргоном (75 %) и кислородом (25 %).

Бялбжешка В. и коллеги из Польши [72] модифицировали золотые электроды SAM из 4-аминотиофенола (4-АТР) путем погружения в раствор абсолютированного этанола (4 °C на 20 ч), который связывается с золотым электродом через тиоловую группу с образованием связи Au-S. К аминокислоте 4-АТР присоединялся глутаровый альдегид, обеспечивающий иммобилизацию антител. Для этапа блокировки использовался BSA. Пример общей схемы иммобилизации через глутаровый альдегид представлен на рисунке 4.

В качестве модифицирующих материалов для связывания с глутаровым альдегидом также используют полимеры и композиты, содержащие аминокислоты. Закария Н. и соавторы из Технологического университета Селангора (Малайзия)

[73] на поверхность Pt/Ir электроосаждали полимер орто-фенилендиамина, аминогруппы которого функционализировали глутаральдегидом в качестве сшивающего агента. В работе [74] поверхность ИТО электрода модифицировали проводящим композитом из углеродной сажи C45 и политиофенового полимера, содержащего концевые аминогруппы. Композит наносился методом центрифугирования и затем инкубировался в растворе глутарового альдегида для связывания альдегидных групп с аминогруппами полимера, а затем в растворе антител в течение часа для иммобилизации антител.

В работе [75] поверхность золотого электрода последовательно модифицировали SAM молекулами 4-АТР, полигидроксильными фуллеренами ($C_{120}O_{30}(OH)_{30}$) с предварительной EDC/NHS-активацией OH-групп и, наконец, полиамидоаминовыми дендримерами пятой генерации РАМAM(G5), содержащими множество концевых аминогрупп на своей поверхности. Активацию аминогрупп обеспечивало также связывание с глутаровым альдегидом, в свою очередь взаимодействующим

с антителами. Несвязанные группы глутарового альдегида блокировались глицином.

Таким образом, кросслинкеры с альдегидными группами, такие как глутаровый альдегид, обеспечивают надежное связывание аминогрупп биораспознающих элементов, что является ключевым для создания эффективных импедиметрических биосенсоров. Их использование в сочетании с самоорганизующимися монослоями и различными модифицирующими материалами позволяет достигать высокой точности и стабильности в детектировании белковых биомаркеров.

Функционализация эпоксидной группой

Йылмаз Н. и коллеги из Текирдагского университета (Турция) [76] для функционализации электродов эпоксидными группами (3-глицидоксипропил) триметоксисилана (GPTMS) предварительно гидроксильировали их поверхность в растворе ($H_2O/H_2O_2/NH_4OH$). Для инкубации ИТО электрода его оставляли на ночь в растворе GPTMS. После промывки электрода этанолом и деионизованной водой инкубировали в растворе PBS, содержащем

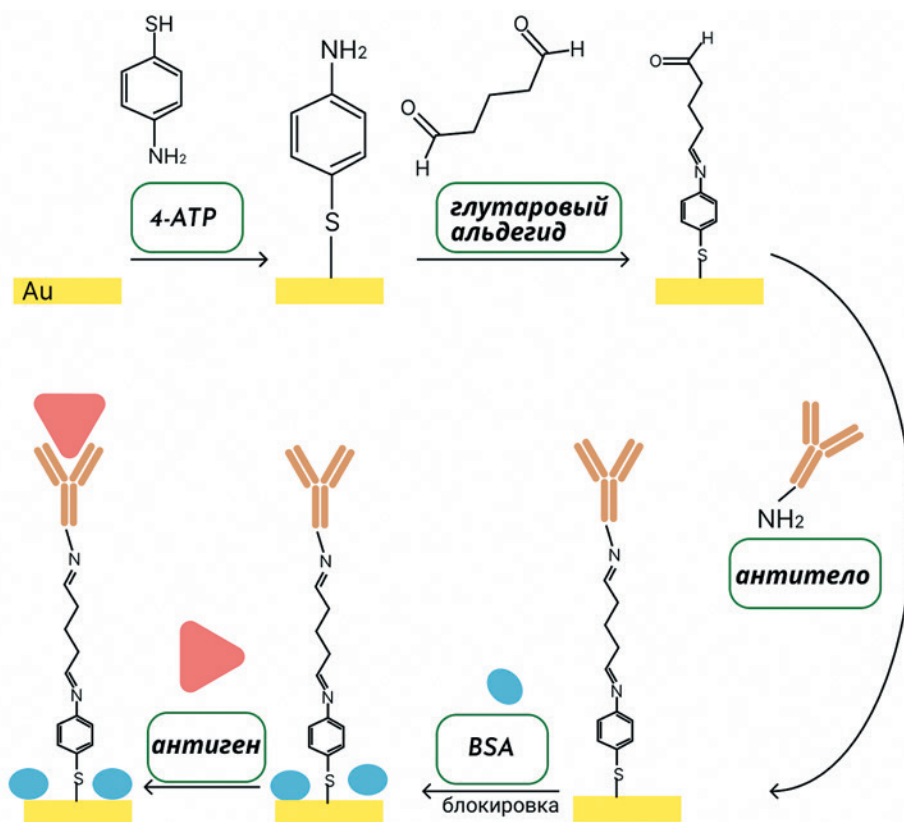


Рис. 4. Пример общей схемы иммобилизации биораспознающего элемента с помощью глутарового альдегида

Figure 4. Example of immobilization of a biorecognition element using glutaraldehyde

антитела. Пример общей схемы иммобилизации биораспознающего элемента с помощью эпоксидной группы представлен на рисунке 5.

Аналогичным образом в работе [77] гидроксильрованную поверхность функционализировали эпоксидными группами путем силанизации с помощью (3-глицидоксипропил) диэтоксиметилсилана (GPDMS) для связывания с аминокруппами антител.

В работе [78] функционализацию ИТО-электрода эпоксидными группами проводили путем модификации поверхности электрода тонким слоем полипиррола, содержащего активные эпоксидные группы. Мономеры данного полимера были синтезированы путем этерификации пирролпропионовой кислоты и глицидола. Тонкий слой полимера наносился методом электрополимеризации. После чего электрод инкубировали в растворе рецептора IL-6 для иммобилизации через реакцию аминокруппы рецептора и эпоксидной группы полимера с формированием амидной связи. Аналогично, Айдин М. и соавторы [79] для связывания рецептора IL-6 использовали полипиррол с концевыми эпоксидными группами. Однако для увеличения шероховатости, удельной площади поверхности электрода полипиррол с концевыми эпоксидными группами наносился в составе композита с ацетиленовой сажой. Композит с концевыми эпоксидными группами наносился на поверхность ИТО-электрода методом центрифугирования, после чего инкубировался для иммобилизации рецептора.

Функционализация электрода аминокруппой

Очевидно, что если биораспознаватели сами активированы функциональными группами для связывания с аминокруппами, то функционализация электродов может быть ограничена только NH_2 -группами.

В работе [80] для связывания с антителами гидроксильрованную поверхность стеклянной подложки функционализировали 3-аминопропилтриэтоксисиланом в паровой фазе без использования дополнительных кросслинкеров. Филип Дж. и коллеги из Университета Дохи (Катар) [81] сшивали глутаровый альдегид с биораспознавателем, лектином конканавалином А (ConA). При этом функционализация электрода, модифицированного восстановленным оксидом графена, с помощью аминокрупп проводилась с использованием молекул тионина. Положительно заряженный тионин адсорбировался на поверхности восстановленного оксида графена преимущественно за счет электростатических взаимодействий. В работе [66] для модификации электродов иммуноглобулинами использовался аминифункционизированный непроводящий полимер полиоктопамин (POct), который наносился методом электрополимеризации. Для связывания с аминокруппами POct олигосахарид антитела окисляли для преобразования углеводов на кристаллизующемся фрагменте иммуноглобулина в альдегидные группы.

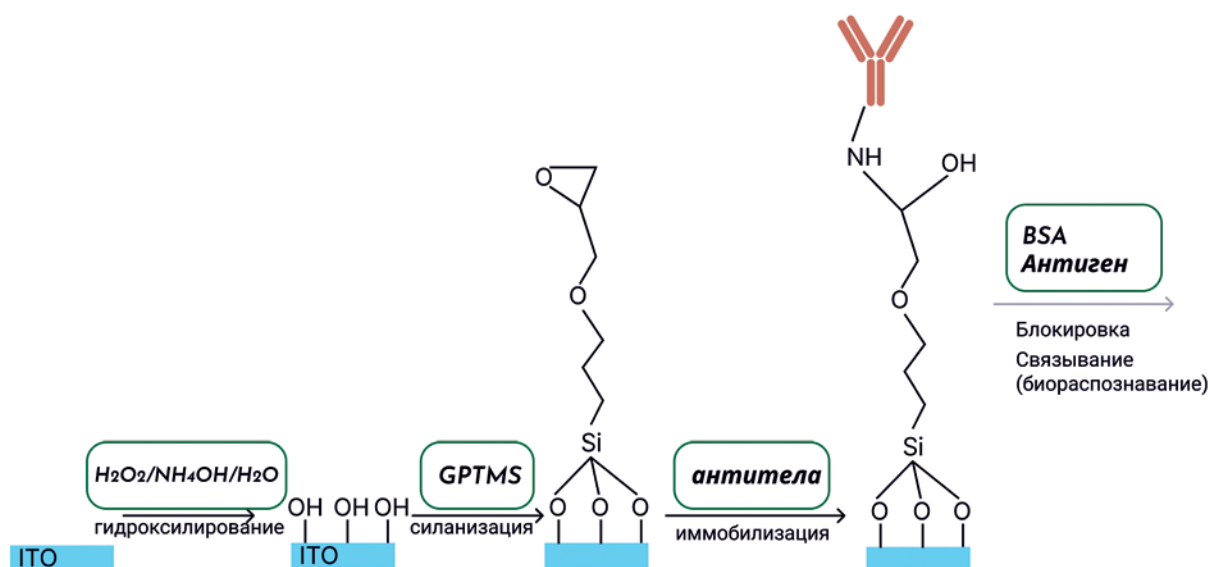


Рис. 5. Пример общей схемы иммобилизации биораспознающего элемента с помощью эпоксидной группы

Figure 5. Example of immobilization of a biorecognition element with an epoxy group

Взаимодействие «авидин-биотин»

Для формирования импедиметрических биосенсоров также широко используется связывание белка стрептавидина или дегликозилированного авидина (нейтравидина) с биотином (витамином B₇). Гомотетрамеры стрептавидина обладают высоким сродством к биотину, обеспечивая сильное нековалентное взаимодействие порядка $K_d \approx 10^{-14}$ моль/л.

Профессор Тангсунан и соавторы [82] использовали взаимодействие «нейтравидин-биотин» для прикрепления биотинилированных аффимеров к поверхности электродов. Для этого на первом этапе поверхность золотых электродов модифицировали слоем политирамина, содержащим аминогруппы, после чего проводили инкубацию в растворе NHS-биотина для связывания с политирамином и инкубировали в растворе нейтравидина. Перед иммобилизацией также проводили процедуру блокировки для снижения неспецифического связывания. Иммобилизацию биотинилированных аффимеров проводили инкубацией в течение 1 часа. Схематичное представление формирования импедиметрического биосенсора, основанного на взаимодействии «нейтравидин-биотин», представлено на рисунке 6.

Аналогично, в работе [83] связывание биотина с электродом также обеспечивалось путем моди-

фикации поверхности золотого электрода полимером. В качестве него использовался сополимер из политирамина 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты. Использование 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты в составе сополимера привело к снижению емкости двойного электрического слоя сопротивления переноса заряда, что позволило получить ровную полукруглую форму графика Найквиста и более точно определить сопротивление переноса заряда. Политирамин в составе полимера за счет аминогрупп также обеспечил связывание с NHS-биотином и затем нейтравидином для иммобилизации биотинилированного фрагмента прионного белка клеточной формы PrP^C в качестве биораспознавателя.

В работе [84] иммобилизацию стрептавидина проводили путем адсорбции на модифицированном золотыми наночастицами углеродном электроде (на углеродных участках электрода). Стрептавидин обеспечивал связывание с биотинилированным укороченным аптамером Gli4-T для биораспознавания глиаина (для количественного определения глютена в образцах). Перед иммобилизацией аптамеров проводилась блокировка неспецифического связывания с помощью БСА и сорбитола. Профессор Моро Дж. и коллеги из Университета Венеции (Италия) [85] в качестве сенсорной платформы использовали коммерческий углеродный электрод,

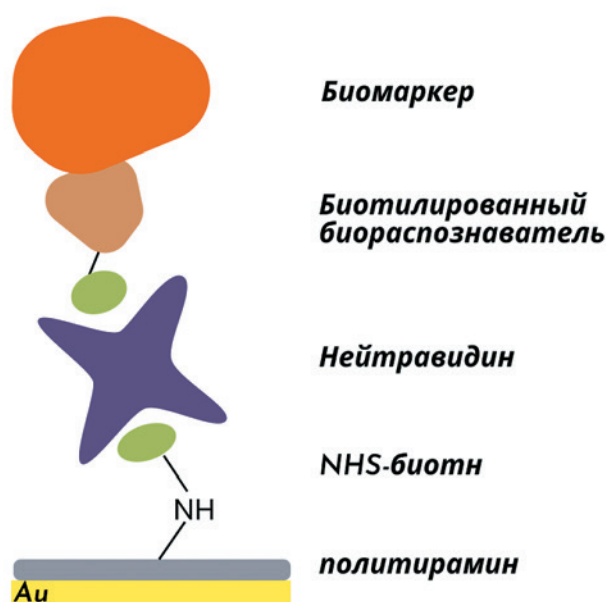


Рис. 6. Формирование импедиметрического биосенсора на основе нейтравидин-биотинового взаимодействия

Figure 6. Formation of an impedimetric biosensor based on neutravidin-biotin interaction

модифицированный стрептавидином (Strep-SPCE; DRP-110STR, Metrohm DropSens). Стрептавидин-биотиновое взаимодействие использовалось для иммобилизации бициклических пептидов, в качестве небольших синтетических биораспознавателей активатора плазминогена урокиназного типа человека (h-uPA), биомаркера рака. Модифицированный стрептавидином электрод иммобилизовали биотинилированными пептидами путем капельного нанесения.

Взаимодействие «авидин-биотин» дополнительно расширяет возможности иммобилизации, предоставляя сильное и специфическое связывание, необходимое для высокоселективного обнаружения белковых мишеней.

Другие типы связывания

Как было показано выше, принципы иммобилизации биораспознающих элементов, как правило, основаны на использовании аминокислотных, тиоловых, карбоксильных, альдегидных и эпоксидных групп или авидин-биотинового взаимодействия. Тем не менее, встречаются и другие типы иммобилизации биораспознавателей, демонстрирующие успешное применение в биосенсорике.

Профессор Ли и коллеги [86] модифицировали электроды цирконий-порфириновым комплексом (Zr-TAPP) без дополнительных этапов активации для иммобилизации антител. Авторы отмечают, что сильное сродство к антителам (AntiNSE) обеспечивалось координационными центрами Zr(III), аминокислотными и π - π^* связями комплекса. В работе [87] в качестве биораспознавателя антигена использовался ДНК-биомиметический зажим (DNA-BC) (образованный парой аптамеров). Для иммобилизации DNA-BC поверхность электрода модифицировали металлоорганическим каркасом $\text{Au}@ \text{UiO}-66\text{-NH}_2$. Который имеет большую площадь поверхности и большое количество активных центров Zr^{4+} . Таким образом, закрепление обеспечивалось специфической координацией между Zr^{4+} и фосфатной группой ($-\text{PO}_4^{3-}$) фосфатированного DNA-BC с образованием связи Zr-O-P.

Группа авторов из Яньчэнского технологического института [88] модифицировали электрод гибридным материалом из золотых наночастиц (AuNP) и максена из карбида титана ($\text{Ti}_3\text{C}_2\text{-MXenes}$). Такой материал позволил иммобилизовать на электроды аптамеры, специфичные к сердечным миоглобину (Myo) и тропонину I (cTnI). Тиол-функционализированный ДНК-аптамер, специфичный к cTnI, связывался посредством стандартной самосборки Au-S. В то время как аптамер для миоглобина адсорбировали посред-

ством металл-хелатного взаимодействия между фосфатными группами и титаном для обеспечения специфического распознавания.

Физическая адсорбция

Иммобилизация биораспознавателей на оксидных наноструктурах часто обеспечивается физической адсорбцией. Так, физическая адсорбция использовалась для иммобилизации различных антител на поверхности нанокомпозита из наночастиц ZnO/CuO [63, 89, 90]. В работе [91] для иммобилизации антител использовали матрицу нанотрубок диоксида титана. При этом отмечается, что оксидные наноструктуры имеют положительный заряд в фосфатном буферном растворе, в то время как антитела заряжены отрицательно. Таким образом, связывание обеспечивается путем прямой физической адсорбции, возникающей в результате слабого электростатического (или Ван-дер-Ваальсового) взаимодействия. Физическая адсорбция использовалась также для иммобилизации антител на поверхности «наноцветков» MoS_2 (двумерный полупроводниковый материал) [92]. Авторы предполагают, что именно морфология «наноцветков» способствовала успешной адсорбции антител. Кхан Р. и коллеги [93] при использовании многостенных углеродных нанотрубок для иммобилизации антител также не применяли активацию функциональных групп и кросслинкеров. Однако можно предположить, что в данной работе связывание обеспечивалось небольшим содержанием поверхностных карбоксильных групп.

Молекулярно-импринтированные полимеры

Одним из перспективных материалов для иммобилизации биораспознающих элементов являются молекулярно-импринтированные полимеры (МИП). МИП — это синтетические полимеры, которые имеют специфические молекулярные отпечатки, соответствующие стерической структуре и размеру молекулы аналита [94]. МИП, получаемые путем полимеризации функциональных мономеров в присутствии молекул-шаблонов, которые затем удаляются из полимерной сетки, оставляя в ней трехмерные отпечатки, способны к специфическому распознаванию и сорбции молекул-шаблонов или их аналогов. В качестве молекул-шаблонов могут использоваться белки или их фрагменты, имеющие структурное сходство с аналитом и обеспечивающие его конформное встраивание в распознающую матрицу [95]. Схематическое представление создания импедиметрического биосенсора на основе МИП показано на рисунке 7.

В импедиметрических биосенсорах для обнаружения белков МИП могут применять как в качестве кросслинкеров, так и в качестве самостоятельных биорецепторов. В первом случае МИП служат для фиксации биораспознающих элементов на поверхности электрода, обеспечивая их ориентацию и сохранение активности [96]. МИП увеличивают площадь контакта между биорецептором и аналитом, а также предотвращают нежелательную денатурацию или десорбцию биорецептора. Во втором случае МИП сами выступают в роли биораспознающих элементов, распознающих и связывающихся с целевыми белками. Для создания такого распознающего элемента необходимо выбрать подходящий мономер, который может образовывать нековалентные связи с молекулой-шаблоном. Таким образом, МИП имитируют функционал биорецепторов без использования биологических компонентов. На их основе могут быть созданы биосенсорные матрицы для мультимодального детектирования целевых биомолекул [97].

Таким образом, методы иммобилизации биораспознающих элементов, такие как использование различных функциональных групп и авидин-биотинового взаимодействия, обладают как преимуществами, так и недостатками. Применение аминокислотных, тиоловых, карбоксильных, альдегидных и эпоксидных групп позволяет создавать стабильные и специфические связи, что увеличивает точность и чувствительность биосенсоров. Однако такие методы могут быть сложными в реализации и требуют строгого контроля условий реакции. В то же время физическая адсорбция и молекулярно-импринтированные полимеры предлагают более простые и быстрые способы иммобилизации, но могут страдать от низкой специфичности и стабильности связывания. Взаимодействие «авидин-биотин» яв-

ляется одним из самых сильных нековалентных взаимодействий, что делает его идеальным для создания высокоселективных биосенсоров, но ограниченность выбора биотинилированных биораспознающих элементов может сужать область применения этого метода.

Заключение

Разработка новых технологий формирования кросслинкеров для иммобилизации распознающих элементов на поверхности электродов в импедиметрических биосенсорах является одной из ключевых задач для улучшения функциональных характеристик биосенсоров, в частности, повышения их чувствительности и специфичности. Исследования в данной области должны включать синтез новых соединений с улучшенными сшивающими свойствами, а также разработку методов поверхностной модификации, способных улучшить стабильность и функциональность интерфейса «электрод-биораспознаватель». На сегодняшний день для создания импедиметрических биосенсорных платформ все большее распространение находит использование самоорганизующихся монослоев, полимерных и композитных покрытий, а также наноматериалов и наноструктур. Оптимизация процессов иммобилизации биораспознающих элементов включает не только улучшение самих кросслинкеров, но и разработку новых высокоточных методов контроля ориентации и плотности биораспознающих молекул на поверхности электродов.

Сопряжение биосенсоров с микрофлюидными системами открывает новые возможности для разработки портативных экспресс-аналитических устройств [98, 99]. В случае интеграции импедиметрического биосенсора в микрофлюидную систему необходимо учитывать технологические

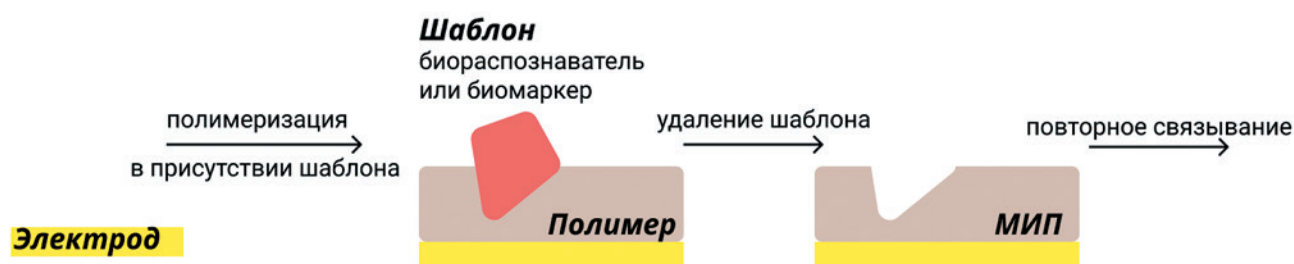


Рис. 7. Пример общей схемы иммобилизации биораспознающего элемента с использованием молекулярно-импринтированных полимеров

Figure 7. Example of immobilization of a biorecognition element using molecularly imprinted polymers

особенности ее формирования, в частности сопряжение с технологией иммобилизации распознающих элементов [100, 101]. Подобного рода интеграция требует разработки совместимых материалов и процессов, способных выдерживать условия формирования микрофлюидных систем или формироваться непосредственно в микрофлюидных системах. Активация поверхности с помощью кросслинкеров зачастую представляет собой достаточно сложный процесс, поэтому слой микрофлюидной системы должен быть стойким ко всем реагентам, используемым в ходе функционализации. Также слой микрофлюидной системы может быть смонтирован на подложку с уже иммобилизованными распознавателями, однако в этом случае не могут быть использованы высокотемпературные процессы соединения слоев биосенсорных систем, такие как термокомпрессионное связывание, способные нарушить функциональность биораспознающего элемента.

Для успешного внедрения в клиническую практику современные биосенсорные устройства должны быть способны детектировать белки в низких концентрациях в сложных биологических образцах. Совершенствование каждого этапа формирования биосенсорных систем обеспечивает улучшение стабильности устройств, их гетерогенную интеграцию с узлами сбора и обработки информации для создания умных диагностических систем и разработку многоканальных матричных платформ для одновременного обнаружения нескольких биомаркеров в пробе малого объема. Развитие биосенсорных технологий имеет важное значение для трансляционной медицины, позволяет ускорить процесс диагностики, сделать его более доступным и точным, а также обеспечить мониторинг состояния пациентов в реальном времени.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Ситков Н.О. выражает благодарность Российскому научному фонду за грантовую поддержку работы, проект № 23-79-01136, <https://rscf.ru/project/23-79-01136/>. Шевцов М.А., Гареев К.Г. выражают благодарность Министерству науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022) за финансовую поддержку. / Nikita O. Sitkov acknowledges Russian Science Foundation for grant

support of the work, project No. 23-79-01136, <https://rscf.ru/project/23-79-01136/>. Maxim A. Shevtsov, Kamil G. Gareev acknowledge the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-301 dated April 20, 2022) for financial support.

Список литературы / References

1. Wang X, Huang J, Chen W, et al. The updated role of exosomal proteins in the diagnosis, prognosis, and treatment of cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2022 Sep;54(9):1390–400. DOI: 10.1038/s12276-022-00855-4.
2. Tumani H, Brettschneider J. Biochemical markers of autoimmune diseases of the nervous system. *Current pharmaceutical design*. 2012 Oct 1;18(29):4556–63. DOI: 10.2174/138161212802502143.
3. Ogulur I, Pat Y, Ardicli O, Barletta E, et al. Advances and highlights in biomarkers of allergic diseases. *Allergy*. 2021 Dec;76(12):3659–86. DOI: 10.1111/all.15089.
4. Song JG, Baral KC, Kim GL, et al. Quantitative analysis of therapeutic proteins in biological fluids: recent advancement in analytical techniques. *Drug Delivery*. 2023 Dec 31;30(1):2183816. DOI: 10.1080/10717544.2023.2183816.
5. Swami S, Kayenat F, Wajid S. SPR biosensing: Cancer diagnosis and biomarkers quantification. *Microchemical Journal*. 2024 Feb 1;197:109792. DOI: 10.1016/j.microc.2023.109792.
6. Zimina TM, Sitkov NO, Gareev KG, et al. Biosensors and Drug Delivery in Oncotheranostics Using Inorganic Synthetic and Biogenic Magnetic Nanoparticles. *Biosensors*. 2022 Sep 25;12(10):789. DOI: 10.3390/bios12100789.
7. Singh AK, Mittal S, Das M, et al. Optical biosensors: A decade in review. *Alexandria Engineering Journal*. 2023 Mar 15;67:673–91. DOI: 10.1016/j.aej.2022.12.040.
8. Sitkov NO, Karasev VA, Luchinin VV, et al. Development of biosensors for express-detection of protein markers of diseases in blood using peptide biorecognition elements. In *AIP Conference Proceedings* 2019 Aug 9 (Vol. 2140, No. 1). AIP Publishing. DOI: 10.1063/1.5121997.
9. Antiochia R. Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection: Voltametric or impedimetric transduction? *Bioelectrochemistry*. 2022 Oct 1;147:108190. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108190.
10. Sohrabi H, Kordasht H, Pashazadeh-Panahi P, et al. Recent advances of electrochemical and optical biosensors for detection of C-reactive protein as a major inflammatory biomarker. *Microchemical Journal*. 2020 Nov 1;158:105287. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105287.
11. Yang T, Wang S, Jin H, et al. An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013 Mar 1;178:310–5. DOI: 10.1016/j.snb.2012.12.107.

12. Vasantham S, Alhans R, Singhal C, et al. Paper based point of care immunosensor for the impedimetric detection of cardiac troponin I biomarker. *Biomedical Microdevices*. 2020 Mar;22:1–9. DOI: 10.1007/s10544-019-0463-0.
13. Moreira FT, Dutra RA, Noronha JP, et al. Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014 Jun 15;56:217–22. DOI: 10.1016/j.bios.2013.12.052.
14. Sun L, Li W, Wang M, et al. Development of an electrochemical impedance immunosensor for myoglobin determination. *International Journal of Electrochemical Science*. 2017 Jul 1;12(7):6170–9. DOI: 10.20964/2017.07.72.
15. Ghedir EK, Baraket A, Benounis M, et al. Electrochemical Multiplexed N-Terminal Natriuretic Peptide and Cortisol Detection in Human Artificial Saliva: Heart Failure Biomedical Application. *Chemosensors*. 2023 Jul 24;11(7):416. DOI: 10.3390/chemosensors11070416.
16. Pihiková D, Belický Š, Kasák P, et al. Sensitive detection and glycoprofiling of a prostate specific antigen using impedimetric assays. *Analyst*. 2016;141(3):1044–51. DOI: 10.1039/C5AN02322J.
17. Razmi N, Hasanzadeh M. Current advancement on diagnosis of ovarian cancer using biosensing of CA 125 biomarker: Analytical approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018 Nov 1;108:1–2. DOI: 10.1016/j.trac.2018.08.017.
18. Taheri N, Khoshsavar H, Ghanei M, et al. Dual-template rectangular nanotube molecularly imprinted polypyrrole for label-free impedimetric sensing of AFP and CEA as lung cancer biomarkers. *Talanta*. 2022 Mar 1;239:123146. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.123146.
19. Karaboğa MN, Şimşek ÇS, Sezgintürk MK. AuNPs modified, disposable, ITO based biosensor: Early diagnosis of heat shock protein 70. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016 Oct 15;84:22–9. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.044.
20. Park JS, Kim HJ, Lee JH, et al. Amyloid beta detection by faradaic electrochemical impedance spectroscopy using interdigitated microelectrodes. *Sensors*. 2018 Feb 1;18(2):426. DOI: 10.3390/s18020426.
21. Karaboga MN, Sezgintürk MK. Analysis of Tau-441 protein in clinical samples using rGO/AuNP nanocomposite-supported disposable impedimetric neuro-biosensing platform: Towards Alzheimer's disease detection. *Talanta*. 2020 Nov 1;219:121257. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121257.
22. Zeng J, Duarte PA, Ma Y, Savchenko O, et al. An impedimetric biosensor for COVID-19 serology test and modification of sensor performance via dielectrophoresis force. *Biosensors and Bioelectronics*. 2022 Oct 1;213:114476. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114476.
23. Shariati M. Impedimetric biosensor for monitoring complementary DNA from hepatitis B virus based on gold nanocrystals. *Journal of The Electrochemical Society*. 2021 Jan 27;168(1):016512. DOI: 10.1149/1945-7111/abdc72.
24. Nandi S, Mondal A, Roberts A, et al. Biosensor platforms for rapid HIV detection. *Advances in Clinical Chemistry*. 2020 Jan 1;98:1–34. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.02.001.
25. Bertok T, Lorencova L, Chocholova E, et al. Electrochemical impedance spectroscopy based biosensors: Mechanistic principles, analytical examples and challenges towards commercialization for assays of protein cancer biomarkers. *ChemElectroChem*. 2019 Feb 15;6(4):989–1003. DOI: 10.1002/celec.201900061.
26. Sitkov N, Ryabko A, Moshnikov V, et al. Hybrid Impedimetric Biosensors for Express Protein Markers Detection. *Micromachines*. 2024 Jan 25;15(2):181. DOI: 10.3390/mi15020181.
27. Shimizu FM, de Barros A, Braunger ML, et al. Information visualization and machine learning driven methods for impedimetric biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023 May 29;117:115. DOI: 10.1016/j.trac.2023.117115.
28. Robinson C, Juska VB, O'Riordan A. Surface chemistry applications and development of immunosensors using electrochemical impedance spectroscopy: A comprehensive review. *Environmental Research*. 2023 Aug 12;116877. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116877.
29. Cholewinski A, Si P, Uceda M, et al. Polymer binders: Characterization and development toward aqueous electrode fabrication for sustainability. *Polymers*. 2021 Feb 20;13(4):631. DOI: 10.3390/polym13040631.
30. Smith S, Goodge K, Delaney M, et al. A comprehensive review of the covalent immobilization of biomolecules onto electrospun nanofibers. *Nanomaterials*. 2020 Oct 27;10(11):2142. DOI: 10.3390/nano10112142.
31. Alavarse AC, Frachini EC, da Silva RL, et al. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. *International journal of biological macromolecules*. 2022 Mar 31;202:558–96. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029.
32. Bhattacharjee P, Ahearne M. Significance of crosslinking approaches in the development of next generation hydrogels for corneal tissue engineering. *Pharmaceutics*. 2021 Feb 28;13(3):319. DOI: 10.3390/pharmaceutics13030319.
33. Sapsford KE, Algar WR, Berti L, et al. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical reviews*. 2013 Mar 13;113(3):1904–2074. DOI:10.1021/cr300143v.
34. Bryan T, Luo X, Bueno PR, et al. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013 Jan 15;39(1):94–8. DOI: 10.1016/j.bios.2012.06.051.
35. Pal A, Biswas S, Kare SP, et al. Development of an impedimetric immunosensor for machine learning-based

detection of endometriosis: A proof of concept. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021 Nov 1;346:130460. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130460.

36. Alsabbagh K, Hornung T, Voigt A, et al. Microfluidic Impedance Biosensor Chips Using Sensing Layers Based on DNA-Based Self-Assembled Monolayers for Label-Free Detection of Proteins. *Biosensors*. 2021 Mar 13;11(3):80. DOI: 10.3390/bios11030080.

37. YaĖar H, Özcan HM, Mehmet O. A new electrochemical impedance biosensor based on aromatic thiol for alpha-1 antitrypsin determination. *Turkish journal of chemistry*. 2021;45(1):104–18. DOI: 10.3906/kim-2007-6.

38. Cecchetto J, Carvalho FC, Santos A, et al. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015 Jul 5;213:150–4. DOI: 10.1016/j.snb.2015.02.068.

39. Schrattenecker JD, Heer R, Hainberger R, et al. Impedimetric IgG-Biosensor with In-Situ Generation of the Redox-Probe. In *Proceedings 2017 Aug 4 (Vol. 1, No. 4, p. 534)*. MDPI. DOI: 10.3390/proceedings1040534.

40. Chinnadayala SR, Park J, Abbasi MA, et al. Label-free electrochemical impedimetric immunosensor for sensitive detection of IgM rheumatoid factor in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019 Oct 15;143:111642. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111642.

41. Aydın EB, Sezgintürk MK. Ultrasensitive detection of interleukin 1 α using 3-phosphonopropionic acid modified FTO surface as an effective platform for disposable biosensor fabrication. *Bioelectrochemistry*. 2021 Apr 1;138:107698. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107698.

42. Aydın EB, Sezgintürk MK. An impedimetric immunosensor for highly sensitive detection of IL-8 in human serum and saliva samples: A new surface modification method by 6-phosphonohexanoic acid for biosensing applications. *Analytical biochemistry*. 2018 Aug 1;554:44–52. DOI: 10.1016/j.ab.2018.05.030.

43. GündoĖdu A, Aydın EB, Sezgintürk MK. A novel electrochemical immunosensor based on ITO modified by carboxyl-ended silane agent for ultrasensitive detection of MAGE-1 in human serum. *Analytical biochemistry*. 2017 Nov 15;537:84–92. DOI: 10.1016/j.ab.2017.08.018.

44. Rohrbach F, Karadeniz H, Erdem A, et al. Label-free impedimetric aptasensor for lysozyme detection based on carbon nanotube-modified screen-printed electrodes. *Analytical biochemistry*. 2012 Feb 15;421(2):454–9. DOI: 10.1016/j.ab.2011.11.034.

45. Kara P, de la Escosura-Muñiz A, Maltez-da Costa M, et al. Aptamers based electrochemical biosensor for protein detection using carbon nanotubes platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010 Dec 15;26(4):1715–8. DOI: 10.1016/j.bios.2010.07.090.

46. Jozghorbani M, Fathi M, Kazemi SH, et al. Determination of carcinoembryonic antigen as a tumor marker using a novel graphene-based label-free

electrochemical immunosensor. *Analytical biochemistry*. 2021 Jan 15;613:114017. DOI: 10.1016/j.ab.2020.114017.

47. Yagati AK, Pyun JC, Min J, et al. Label-free and direct detection of C-reactive protein using reduced graphene oxide-nanoparticle hybrid impedimetric sensor. *Bioelectrochemistry*. 2016 Feb 1;107:37–44. DOI:10.1016/j.bioelechem.2015.10.002.

48. Frias IA, Zine N, Sigaud M, et al. Non-covalent π – π functionalized Gii-sense $\square$ graphene foam for interleukin 10 impedimetric detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2023 Feb 15;222:114954. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114954.

49. Demirbakan B, Sezgintürk MK. An impedimetric biosensor system based on disposable graphite paper electrodes: Detection of ST2 as a potential biomarker for cardiovascular disease in human serum. *Analytica Chimica Acta*. 2021 Feb 1;1144:43–52. DOI: 10.1016/j.aca.2020.12.001.

50. Brodowski M, Kowalski M, Skwarecka M, et al. Highly selective impedimetric determination of Haemophilus influenzae protein D using maze-like boron-doped carbon nanowall electrodes. *Talanta*. 2021 Jan 1;221:121623. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121623.

51. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. Fabrication of electrochemical immunosensor based on acid-substituted poly (pyrrole) polymer modified disposable ITO electrode for sensitive detection of CCR4 cancer biomarker in human serum. *Talanta*. 2021 Jan 15;222:121487. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121487.

52. Gandarilla AM, Glória JC, Barcelay YR, et al. Application of egg yolk IgY on carboxylated polypyrrole films for impedimetric detection of PfHRP2 antigen. *Bioelectrochemistry*. 2022 Dec 1;148:108273. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108273.

53. Yuan G, He J, Li Y, et al. A novel ultrasensitive electrochemical immunosensor based on carboxy-encapped conductive polypyrrole for the detection of gypican-3 in human serum. *Analytical methods*. 2015;7(5):1745–50. DOI: 10.1039/c4ay02820a.

54. Kim M, Iezzi Jr R, Shim BS, et al. Impedimetric biosensors for detecting vascular endothelial growth factor (VEGF) based on poly (3, 4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT)/gold nanoparticle (Au NP) composites. *Frontiers in Chemistry*. 2019 Apr 16;7:234. DOI: 10.3389/fchem.2019.00234.

55. Ghanavati M, Tadayon F, Bagheri H. A novel label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of prostate specific antigen using Au nanoparticles/MWCNTs-graphene quantum dots nanocomposite. *Microchemical Journal*. 2020 Dec 1;159:105301. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105301.

56. Vijayaraghavan P, Wang YY, Palanisamy S, et al. Hierarchical ensembles of FeCo metal-organic frameworks reinforced nickel foam as an impedimetric sensor for detection of IL-1RA in human samples. *Chemical*

- Engineering Journal. 2023 Feb 15;458:141444. DOI: 10.1016/j.cej.2023.141444.
57. Gupta A, Sharma SK, Pachauri V, et al. Sensitive impedimetric detection of troponin I with metal-organic framework composite electrode. *RSC advances*. 2021;11(4):2167–74. DOI: 10.1039/d0ra06665f.
 58. Centane S, Mgidlana S, Openda Y, et al. Electrochemical detection of human epidermal growth factor receptor 2 using an aptamer on cobalt phthalocyanines–Cerium oxide nanoparticle conjugate. *Bioelectrochemistry*. 2022 Aug 1;146:108146. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108146.
 59. Januarie KC, Oranzie M, Feleni U, et al. Quantum dot amplified impedimetric aptasensor for interferon-gamma. *Electrochimica Acta*. 2023 Sep 20;463:142825. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142825.
 60. Abazar F, Noorbakhsh A. Chitosan-carbon quantum dots as a new platform for highly sensitive insulin impedimetric aptasensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020 Feb 1;304:127281. DOI: 10.1016/j.snb.2019.127281.
 61. Ruecha N, Shin K, Chailapakul O, et al. Label-free paper-based electrochemical impedance immunosensor for human interferon gamma detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019 Jan 15;279:298–304. DOI: 10.1016/j.snb.2018.10.024.
 62. Tertis M, Leva PI, Bogdan D, et al. Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019 Jul 15;137:123–32. DOI: 10.1016/j.bios.2019.05.012.
 63. Tanak AS, Jagannath B, Tamrakar Y, et al. Non-faradaic electrochemical impedimetric profiling of procalcitonin and C-reactive protein as a dual marker biosensor for early sepsis detection. *Analytica chimica acta: X*. 2019 Nov 1;3:100029. DOI: 10.1016/j.acax.2019.100029.
 64. Wang SX, Acha D, Shah AJ, et al. Detection of the tau protein in human serum by a sensitive four-electrode electrochemical biosensor. *Biosensors and bioelectronics*. 2017 Jun 15;92:482–8. DOI: 10.1016/j.bios.2016.10.077.
 65. Messaoud NB, Dos Santos MB, Trocadero V, et al. A novel label-free electrochemical immunosensor for detection of surfactant protein B in amniotic fluid. *Talanta*. 2023 Jan 1;251:123744. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123744.
 66. Shamsuddin SH, Gibson TD, Tomlinson DC, et al. Reagentless Affimer- and antibody-based impedimetric biosensors for CEA-detection using a novel non-conducting polymer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021 Apr 15;178:113013. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113013.
 67. Erdem A, Congur G. Dendrimer enriched single-use aptasensor for impedimetric detection of activated protein C. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014 May 1;117:338–45. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.03.003.
 68. Erdem A, Congur G. Dendrimer modified 8-channel screen-printed electrochemical array system for impedimetric detection of activated protein C. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014 Jun 1;196:168–74. DOI: 10.1016/j.snb.2014.01.103.
 69. Senturk H, Eksin E, Işık Ö, et al. Impedimetric aptasensor for lysozyme detection based on carbon nanofibres enriched screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta*. 2021 May 1;377:138078. DOI: 10.1016/j.electacta.2021.138078.
 70. Caballero D, Martinez E, Bausells J, et al. Impedimetric immunosensor for human serum albumin detection on a direct aldehyde-functionalized silicon nitride surface. *Analytica Chimica Acta*. 2012 Mar 30;720:43–8. DOI: 10.1016/j.aca.2012.01.031.
 71. Low YK, Chan J, Soraya GV, et al. Development of an ultrasensitive impedimetric immunosensor platform for detection of Plasmodium lactate dehydrogenase. *Sensors*. 2019 May 29;19(11):2446. DOI: 10.3390/s19112446.
 72. Białobrzęska W, Ficek M, Dec B, et al. Performance of electrochemical immunoassays for clinical diagnostics of SARS-CoV-2 based on selective nucleocapsid N protein detection: Boron-doped diamond, gold and glassy carbon evaluation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2022 Aug 1;209:114222. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114222.
 73. Zakaria N, Mohd Y, Chin LY, et al. Poly-Ortho-Phenylenediamine Modified Pt/Ir Microelectrode as Impedimetric Biosensor. *International Journal of Electrochemical Science*. 2021 Jan 1;16(7):210736. DOI: 10.20964/2021.07.66.
 74. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. A novel electrochemical impedance immunosensor for the quantification of CYFRA 21-1 in human serum. *Microchimica Acta*. 2023 Jun;190(6):235. DOI: 10.1007/s00604-023-05813-z.
 75. Uygun ZO, Şahin Ç, Yılmaz M, et al. Fullerene-PAMAM (G5) composite modified impedimetric biosensor to detect Fetuin-A in real blood samples. *Analytical biochemistry*. 2018 Feb 1;542:11–5. DOI: 10.1016/j.ab.2017.11.007.
 76. Yılmaz N, Aydın EB, Sezgintürk MK. An epoxysilane modified indium tin oxide electrode for the determination of PAK 2: application in human serum samples. *Analytica chimica acta*. 2019 Jul 25;1062:68–77. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.020.
 77. Altay DN, Yagar H, Ozcan HM. A new ITO-based Aβ42 biosensor for early detection of Alzheimer's disease. *Bioelectrochemistry*. 2023 Oct 1;153:108501. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108501.
 78. Aydın EB. Highly sensitive impedimetric immunosensor for determination of interleukin 6 as a cancer biomarker by using conjugated polymer containing epoxy side groups modified disposable ITO electrode. *Talanta*. 2020 Aug 1;215:120909. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120909.
 79. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. A novel electrochemical immunosensor based on acetylene black/epoxy-substituted-polypyrrole polymer composite for the highly sensitive and selective detection of interleukin

6. Talanta. 2021 Jan 15;222:121596. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121596.
80. Chuang YH, Chang YT, Liu KL, et al. Electrical impedimetric biosensors for liver function detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011 Oct 15;28(1):368–72. DOI: 10.1016/j.bios.2011.07.049.
81. Filip J, Zavahir S, Klukova L, et al. Immobilization of concanavalin A lectin on a reduced graphene oxide-thionine surface by glutaraldehyde crosslinking for the construction of an impedimetric biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2017 Jun 1;794:156–63. DOI: 10.1016/j.jelechem.2017.04.019.
82. Thangsunan P, Lal N, Tiede C, et al. Affimer-based impedimetric biosensors for fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3): a novel tool for detection and surveillance of recurrent bladder cancer. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021 Jan 1;326:128829. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128829.
83. Rushworth JV, Ahmed A, Griffiths HH, et al. A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *Biosensors and bioelectronics*. 2014 Jun 15;56:83–90. DOI: 10.1016/j.bios.2013.12.036.
84. Svigelj R, Zuliani I, Grazioli C, et al. An effective label-free electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles for gluten detection. *Nanomaterials*. 2022 Mar 17;12(6):987. DOI: 10.3390/nano12060987.
85. Moro G, Ferrari L, Angelini A, et al. An Impedimetric Biosensing Strategy Based on BicyclicPeptides as Bioreceptors for Monitoring h-uPA Cancer Biomarkers. *Chemosensors*. 2023 Apr 9;11(4):234. DOI: 10.3390/chemosensors11040234.
86. Li Y, Wang C, Li Z, Wang M, et al. Zirconium-porphyrin complex as novel nanocarrier for label-free impedimetric biosensing neuron-specific enolase. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020 Jul 1;314:128090. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128090.
87. Han C, Xing W, Li W, et al. Aptamers dimerization inspired biomimetic clamp assay towards impedimetric SARS-CoV-2 antigen detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2023 Apr 1;380:133387. DOI: 10.1016/j.snb.2023.133387.
88. Mi X, Li H, Tu Y. An Aptamer Biosensing Strategy for Label-Free Assay of Dual Acute Myocardial Infarction Biomarkers Built upon AuNPs/Ti3C2-MXenes. *Chemosensors*. 2023 Feb 24;11(3):157. DOI:10.3390/chemosensors11030157.
89. Cao L, Kiely J, Piano M, et al. Nanoparticle-based 3D membrane for impedimetric biosensor applications. *Bioelectrochemistry*. 2020 Dec 1;136:107593. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107593.
90. Cao L, Kiely J, Piano M, et al. A copper oxide/zinc oxide composite nano-surface for use in a biosensor. *Materials*. 2019 Apr 6;12(7):1126. DOI: 10.3390/ma12071126.
91. Arkusz K, Paradowska E. Impedimetric detection of femtomolar levels of interleukin 6, interleukin 8, and tumor necrosis factor alpha based on thermally modified nanotubular titanium dioxide arrays. *Nanomaterials*. 2020 Nov 30;10(12):2399. DOI: 10.3390/nano10122399.
92. Sri S, Chauhan D, Lakshmi GB, et al. MoS2 nanoflower based electrochemical biosensor for TNF alpha detection in cancer patients. *Electrochimica Acta*. 2022 Feb 10;405:139736. DOI: 10.1016/j.electacta.2021.139736.
93. Khan R, Pal M, Kuzikov AV, et al. Impedimetric immunosensor for detection of cardiovascular disorder risk biomarker. *Materials Science and Engineering: C*. 2016 Nov 1;68:52–8. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.107.
94. Tse Sum Bui B, Mier A, Haupt K. Molecularly imprinted polymers as synthetic antibodies for protein recognition: The next generation. *Small*. 2023 Mar;19(13):2206453. DOI: 10.1002/sml.202206453.
95. Ben Hassine A, Raouafi N, Moreira FT. Novel electrochemical molecularly imprinted polymer-based biosensor for Tau protein detection. *Chemosensors*. 2021 Aug 25;9(9):238. DOI: 10.3390/chemosensors9090238.
96. Yaman YT, Vural OA, Bolat G, et al. Peptide nanotubes/self-assembled polydopamine molecularly imprinted biochip for the impedimetric detection of human Interleukin-6. *Bioelectrochemistry*. 2022 Jun 1;145:108053. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108053.
97. Karami P, Bagheri H, Johari-Ahar M, et al. Dual-modality impedimetric immunosensor for early detection of prostate-specific antigen and myoglobin markers based on antibody-molecularly imprinted polymer. *Talanta*. 2019 Sep 1;202:111–22. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.061.
98. Wu CC, Singh K, Ye JX, et al. A microfluidic chip integrating electrochemical impedimetric immunosensors constructed by top-bottom opposite electrodes for rapid detection of peanut allergen-Ara h 1. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2023 Dec 1;396:134637. DOI: 10.1016/j.snb.2023.134637.
99. Torul H, Arslan ZÇ, Tezcan T, et al. Microfluidic-based blood immunoassays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023 May 10;228:115313. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115313/.
100. Sitkov N, Zimina T, Kolobov A, et al. Study of the fabrication technology of hybrid microfluidic biochips for label-free detection of Proteins. *Micromachines*. 2021 Dec 24;13(1):20. DOI: 10.3390/mi13010020.
101. Shahbazi F, Jabbari M, Esfahani MN, et al. Microfluidic-Integrated Biosensors. In *Applied Complex Flow: Applications of Complex Flows and CFD* 2023 Feb 2 (pp. 21-42). Singapore: Springer Nature Singapore. DOI: 10.1007/978-981-19-7746-6_2.

Информация об авторах:

Рябко Андрей Андреевич, к.т.н., младший научный сотрудник лаборатории неравновесных процессов в полупроводниках, ФТИ им. А. Ф. Иоффе РАН;

Ситков Никита Олегович, к.т.н., ассистент кафедры микро- и нанoeлектроники, ФГАОУ ВО СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина); старший научный сотрудник НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Марценюк Елизавета Николаевна, студент, кафедры микро- и нанoeлектроники, ФГАОУ ВО СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина);

Зими́на Татьяна Михайловна, к.ф.-м.н., доцент кафедры микро- и нанoeлектроники, ФГАОУ ВО СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина); старший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гареев Камилъ Газинурович, к.т.н., доцент кафедры микро- и нанoeлектроники, ФГАОУ ВО СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина); старший научный сотрудник НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шевцов Максим Алексеевич, д.б.н., заведующий НИО трансляционной онкологии, НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Andrey A. Ryabko, PhD, Junior Researcher, Laboratory of Nonequilibrium Processes in Semiconductors, Ioffe Institute of the Russian Academy of Sciences;

Nikita O. Sitkov, PhD, assistant lecturer, Department of Micro- and Nanoelectronics, Saint Petersburg Electrotechnical University «LETI»; Senior Researcher, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Elizaveta N. Martsenyuk, student, Department of Micro- and Nanoelectronics, Saint Petersburg Electrotechnical University «LETI»;

Tatiana M. Zimina, PhD, Associate Professor, Department of Micro- and Nanoelectronics, Saint Petersburg Electrotechnical University «LETI»; Senior Researcher, Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Kamil G. Gareev, PhD, Associate Professor, Department of Micro- and Nanoelectronics, Saint Petersburg Electrotechnical University «LETI»; Senior Researcher, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Maxim A. Shevtsov, PhD, Dr.Sc., Head of Department Translational Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre.