

УДК 543.062

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПОДХОДЫ К КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ ИОНОВ МЕДИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

© 2020 г. Р. В. Тимошенко^{1,*}, А. Н. Ванеев^{1,2}, Н. А. Савин¹, Н. Л. Клячко²,
Ю. Н. Пархоменко¹, С. В. Салихов¹, А. Г. Мажуга^{1,2}, П. В. Горелкин¹, А. С. Ерофеев^{1,2}

¹ Национальный исследовательский технологический университет “МИСиС”, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: timoshenkoroma@mail.ru

Поступила в редакцию 04.05.2020 г.

После доработки 01.06.2020 г.

Принята к публикации 02.06.2020 г.

В обзоре приведены и классифицированы современные аналитические методы количественного определения ионов меди, ориентированные преимущественно на возможность или перспективу их применения в биологических системах. Проведен сравнительный анализ спектроскопических, электрохимических, флуоресцентных методов по ключевым критериям: предел обнаружения метода, возможность применения *in vivo/in vitro*, возможность проведения измерений в режиме реального времени.

DOI: 10.1134/S1992722320020193

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Роль меди в живых организмах
 - 1.1. Медь в биохимических процессах
 - 1.2. Нарушение регуляции меди в организме
 - 1.3. Лекарственные препараты на основе меди
2. Количественное определение ионов меди в биологических системах
 - 2.1. Спектроскопические и спектрометрические методы анализа
 - 2.2. Сенсоры на основе микрокантилеверов
 - 2.3. Сенсоры на основе транзисторов
 - 2.4. Хемосенсоры
 - 2.5. Электрохимические методы
 - 2.6. Сенсоры на основе нанокapилляров и нанопор

Выводы

1. РОЛЬ МЕДИ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

1.1. Медь в биохимических процессах

В организме человека медь является третьим по распространенности микроэлементом после железа и цинка [1]. Ее содержание в организме взрослого человека варьируется в диапазоне от 75 до 100 мг [2]. При этом большая часть меди находится в скелете и костном мозге (~46 мг), скелетных мышцах (~26 мг), печени (~10 мг), мозге

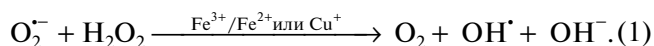
(~8.8 мг), крови (~6 мг) [3–5]. Значительное количество ферментов, ответственных за метаболизм, функционирует должным образом благодаря ионам меди [6]. Ионы меди участвуют в производстве гемоглобина, меланина, миелина, тироксина, а также являются компонентами таких ферментов, как лизилоксидаза, церулоплазмин, супероксиддисмутаза, цитохром с-оксидаза и т.д. [7, 8]. В биологических системах ионы меди в зависимости от заряда могут выступать как антиоксиданты и прооксиданты [9, 10].

В организме человека медь находится преимущественно в двух формах Cu^+ (восстановленная форма) и Cu^{2+} (окисленная форма), образуя многочисленные комплексы как с органическими, так и неорганическими лигандами [11, 12].

1.2. Нарушение регуляции меди в организме

Помимо обеспечения жизненно важных процессов ионы меди в организме человека могут инициировать нежелательные реакции, например окислительно-восстановительные, взаимодействуя с активными формами кислорода (АФК), наиболее распространенными из которых являются пероксид водорода (H_2O_2) и супероксидный радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Впервые уравнение реакции превращения перекиси водорода и супероксид-аниона в присутствии ионов переходных ме-

таллов, в том числе ионов меди, было описано Габером и Вейссом [13] и имеет следующий вид:



Результатом этой реакции являются высоко-реакционноспособные гидроксильные радикалы, которые, как и АФК, могут реагировать практически с любым типом биомолекул [14]. Также в процессе реакции (1) могут образовываться другие виды АФК, например синглетный кислород [15]. Кроме того, уравнение Габера–Вейсса показывает, что метаболизм АФК тесно связан с метаболизмом металлов, в том числе меди, обладающих различными степенями окисления.

Для всех биологических систем характерен баланс между образованием АФК и их нейтрализацией за счет антиоксидантных систем. Увеличение скорости образования АФК или недостаточная эффективность антиоксидантных систем приводят к окислительному стрессу в клетках организма [16]. Увеличение концентрации меди и окислительный стресс являются отличительными признаками ряда злокачественных новообразований. Медь участвует в процессе канцерогенеза. Вызывая пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток путем активации различных ангиогенных факторов (например, эндотелиальный фактор роста, основной фактор роста фибробластов, фактор некроза опухоли), медь приводит к образованию новых кровеносных сосудов и росту опухоли [17]. Кроме того, доказано, что повышенный уровень меди напрямую коррелирует с прогрессированием рака [18].

Окислительный стресс, вызванный чрезмерным образованием АФК, может способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний. Один из ярких примеров – болезнь Альцгеймера. При заболевании Альцгеймера функция, отвечающая за связывание и транспортировку меди по всей длине нейрона, нарушается. Параллельно происходят его агрегация и фрагментация. Кроме того, медь накапливается в амилоидных бляшках, что приводит к уменьшению активности цитохром с-оксидазы и супероксиддисмутазы. Последствиями всех этих процессов являются повреждение нейронов и ослабление основных метаболических и защитных механизмов [19].

Как было отмечено ранее, медь является кофактором для некоторых ферментов, поэтому нарушение ее регуляции может приводить к неправильному функционированию ферментов. Примером заболевания, связанного с нарушением регуляции меди в организме человека, является болезнь Вильсона, при которой нарушается работа аденозинтрифосфатазы (АТФазы) Вильсона из-за наличия мутаций в гене АТР7В, экспрессирующей в основном в клетках печени [20, 21]. Это ведет к затруднению процесса выведения меди

вместе с желчью, что в дальнейшем приводит к ее накоплению в гепатоцитах. Когда гепатоцеллюлярная емкость хранилища переполнена, свободная медь медленно выделяется в кровь и откладывается в различных органах [22]: в мозге [23], почках [24] и роговице [22]. В отдельных случаях может происходить резкое выделение большого количества меди, приводящее к печеночной недостаточности [25], обширному внутрисосудистому гемолизу [26] и почечной дисфункции [27]. Еще одним примером является болезнь Менкеса [28], для которой характерны изогнутые, ломкие и бесцветные волосы, гипопигментация, дряблая кожа, нарушение роста, умственная отсталость и поражение нервной системы, что обусловлено нарушением транспорта ионов меди в клетках. Одной из причин заболевания является мутация в гене АТР7А, который кодирует АТФазу Р-типа, отвечающую за транспорт Cu^+ через клеточную мембрану в клетках, что приводит к отклонениям в распределении меди в организме: одни ткани испытывают дефицит этого микроэлемента, в то время как другие страдают от токсических эффектов ее избытка [29].

Таким образом, большое значение имеет разработка чувствительных и селективных методов обнаружения ионов меди с целью понимания механизмов, лежащих в основе заболеваний Вильсона и Менкеса, и контроля уровня меди в биологических системах.

1.3. Лекарственные препараты на основе меди

На сегодняшний день противоопухолевые препараты на основе меди доказали свою перспективность в терапии рака [30, 31]. Один из эффективных методов противоопухолевой терапии заключается в фототермической индукции апоптоза опухолевых клеток путем увеличения образования АФК, приводящих к деструкции ДНК и белков в раковых клетках [32]. Лекарственные препараты на основе меди приводят к высокой степени повреждения опухолевых образований [33–37]. Широкое распространение получила иммунотерапия с применением соединений меди [38–40].

Помимо противоопухолевых препаратов разработаны противомикробные средства на основе наночастиц меди [41, 42], которые доказали свою высокую эффективность [43]. При этом не прекращаются исследования, направленные на разработку новых лекарственных средств подобного рода [44, 45]. При разработке данных препаратов важно изучение распределения меди в клетках и тканях. Поэтому методы, которые позволяют быстро и селективно определять ионы меди в живых системах, в дальнейшем ускорят разработку и последующие доклинические испытания лекарственных препаратов на основе меди. Это откроет

возможности для дальнейшего изучения фармакокинетики новых перспективных препаратов, оценки их эффективности и определения механизмов действия.

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ МЕДИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

2.1. Спектроскопические и спектрометрические методы анализа

Существует большое количество физических методов определения ионов металлов: атомно-абсорбционная спектроскопия (AAS), атомно-абсорбционная спектрометрия с пламенной ионизацией (FAAS) [46–48], атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией в графитовой печи (GF-AAS) [49, 50], масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) [51–53], атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES) [54], рентгеновский флуоресцентный анализ, основанный на возбуждении излучения протонами (PIXE) [55]. Некоторые из них демонстрируют возможность определения ионов меди в единичных клетках и имеют внушительные пределы обнаружения (до 0.20–0.40 фг) [56]. Недостатками данных методов являются невозможность проведения измерений непосредственно в живых системах, трудоемкая пробоподготовка, отсутствие возможности получения информации в режиме реального времени в живых системах, высокая стоимость проведения анализа и сложность эксплуатации измерительных приборов.

Возможными альтернативами атомно-абсорбционной спектроскопии или масс-спектрометрии различных типов стали метод рентгеновской флуоресценции с полным отражением (TXRF) [57, 58] и метод рентгеновской флуоресцентной микроскопии (XFM) с синхротронным источником (Advanced Photon Source, Аргоннская национальная лаборатория, США), позволяющий получать информацию по распределению меди в клетках [59]. В последнем исследовании живые ооциты иммобилизовали на нагретую до 37°C подложку из нитрида кремния с минимальным количеством питательной среды, после чего проводили измерения с получением распределения меди в ооците, при этом ооцит оставался морфологически неизменным. Таким образом, описанные методы обладают возможностью проведения элементного анализа в биологических системах с минимальной пробоподготовкой.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (SERS) стала мощным инструментом для исследования живых клеток [60], обнаружения патогенов [61] и биомолекул [62]. Суть метода заключается в определении изменений

спектра комбинационного рассеяния при взаимодействии органических лигандов, иммобилизованных на поверхности наночастиц золота, с ионами меди [63, 64]. Однако главный недостаток SERS – это невозможность применения в биологических системах. Учитывая тенденции в развитии области, можно предполагать появление новых подходов для применения в биологических системах.

2.2. Сенсоры на основе микрокантилеверов

Появление недорогих микрокантилеверов массового производства расширяет возможности в области разработки сенсоров. Принцип действия данных сенсоров основан на определении изгиба микрокантилевера, который обусловлен образованием поверхностного напряжения, вызванного адсорбцией молекул аналита на поверхность микрокантилевера [65]. Поскольку данные системы не обладают какой-либо химической селективностью, то для ее достижения часто используются различные агенты химической или биологической природы, иммобилизованные на поверхности микрокантилеверов [66, 67]. Такие функционализированные кантилеверы могут быть использованы в качестве платформ для разработки сенсоров [68–70].

В [71] информация, полученная при изгибе кантилевера, дополнена параллельными вольт-амперометрическими измерениями. Таким образом, микрокантилевер выступал в качестве рабочего электрода. Когда на поверхности микрокантилеверного электрода протекает электрохимическая реакция (восстановление или окисление меди), возникает измеримое поверхностное напряжение, что приводит к изгибу кантилевера. Такой метод стремится объединить чувствительность обнаружения за счет изгиба микрокантилевера с химической селективностью, обеспечиваемой вольтамперометрией.

Микрокантилевер, модифицированный монослоем L-цистеина, был разработан для селективного определения Cu^{2+} в водном растворе (рис. 1) [72]. С использованием этой технологии в жидкостной ячейке обнаружена концентрация 10^{-10} М Cu^{2+} . Показана селективность сенсоров в присутствии других катионов, таких как Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} и т.д.

С помощью модифицированного моноклональным антителом (mAb6A9) микрокантилеверного сенсора было продемонстрировано определение комплексов (в воде) Cu^{2+} с этилендиаминтетрауксусной кислотой до 1×10^{-6} М. К недостаткам сенсора можно отнести отсутствие возможности многократного использования сенсора [73].

Таким образом, в перспективе возможно количественное определение ионов меди в биоло-

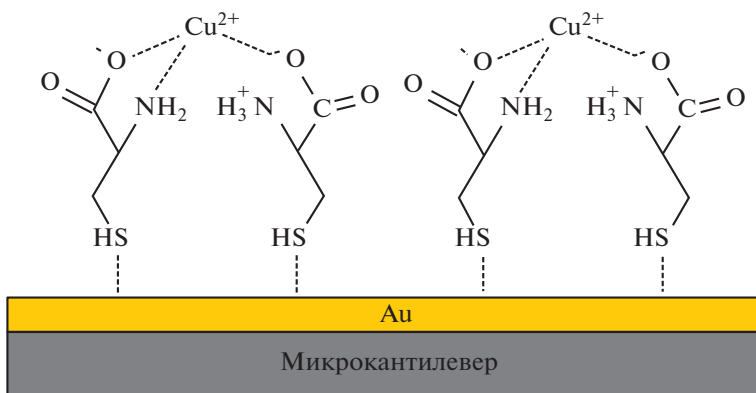


Рис. 1. Схематическое представление молекулярной структуры самоорганизующегося монослоя L-цистеина на золотой поверхности микроантилевера и его комплексообразование с Cu^{2+} [72].

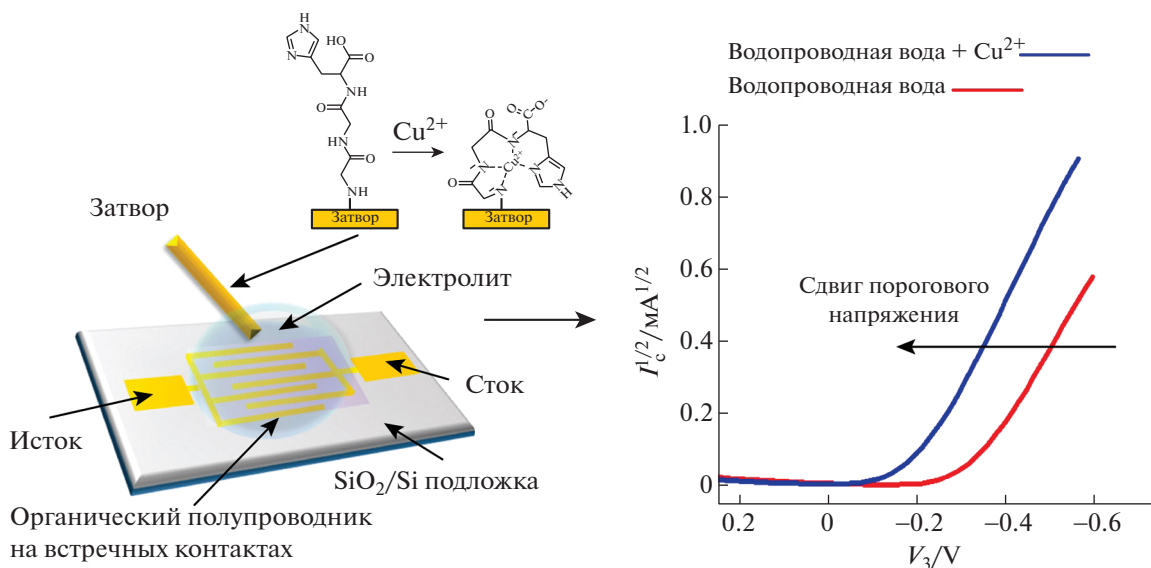


Рис. 2. Схематическое представление модифицированного электролитически-управляемого полевого транзистора [77].

гических жидкостях селективными кантилеверными сенсорами. Описанные выше сенсорные системы обладают пределами обнаружения, схожими с физиологическими концентрациями меди в биологических системах, однако на текущий момент использование предложенного подхода довольно трудоемко.

2.3. Сенсоры на основе транзисторов

Наиболее перспективным транзистором для определения ионов меди является электролитически-управляемый жидкостным. Он представляет собой тонкопленочный транзистор на основе органических полупроводников, где между затвором и полупроводником проводящим материалом явля-

ются электролиты [74–76]. В отличие от оптических устройств такие транзисторы способны работать при очень низком напряжении и не содержат хрупких элементов.

Транзистор такого типа изготовлен для определения ионов меди в образцах воды [77]. Схематическое изображение модифицированного электролитически-управляемого полевого транзистора показано на рис. 2. Затвор транзистора был модифицирован пептидом (глицил–глицил–гистидин), который специфично образует комплекс с ионами Cu^{2+} . Комплексообразование Cu^{2+} приводит к положительному сдвигу порогового напряжения транзистора. Предел обнаружения такого транзистора составляет 10^{-12} М. К недостаткам

относят большую площадь поверхности и дрейф тока при проведении измерений.

Одна из первых работ по изготовлению транзисторов такого типа опубликована относительно недавно [78]. Учитывая развитие технологии нанолитографии, в дальнейшем возможно появление работ по исследованию реализации сенсоров в наноразмерном масштабе.

Перспективы применения электролитически-управляемых полевых транзисторов связаны с изучением возможных областей применений и разработкой новых путей модификации транзисторов.

2.4. Хемосенсоры

В последнее десятилетие появилось большое количество хемосенсоров (сенсоров, способных изменять свойства системы при селективном и необратимом связывании с молекулой анализируемого вещества), базирующихся на тех или иных особенностях: на свойствах квантовых точек [79], на переносе заряда [80] и т.д.

Большую часть хемосенсоров распределяют на три группы: хромогенные, флуоресцентные и фотопереключаемые.

Принцип работы хромогенных (колориметрических) хемосенсоров [81] основан на изменении спектра раствора при взаимодействии с аналитом, что вводит соответствующие ограничения на применение такого вида хемосенсоров. Современные работы показали возможность определения наномолярных концентраций ионов меди (предел обнаружения 0.8×10^{-9} М) в биологических жидкостях [82]. Сенсор на основе наноллистов оксида молибдена использовался для определения ионов меди в образцах сыворотки крови и волос человека. Принцип работы такого сенсора основан на восстановлении Mo(VI) в Mo(V). В отсутствие Cu^{2+} аскорбиновая кислота не может эффективно восстанавливать Mo(VI), поскольку этот процесс требует как восстановителей, так и H^+ . Однако при введении в эту систему Cu^{2+} происходит реакция между аскорбиновой кислотой и Cu^{2+} , что заметно увеличивает скорость реакции с образованием наноллистов MoO_{3-x} . В наноллистах MoO_{3-x} (богатых кислородными вакансиями) возникает локальный плазмонный резонанс, приводящий к значительному увеличению поглощения. Данные сенсоры на основе оксида молибдена лишены недостатков, свойственных сенсорам на основе наночастиц благородных металлов (нестабильность агрегатов наночастиц [83], воздействие экспериментальных условий, приводящее к нежелательной модификации поверхности, и высокая стоимость реактивов [84]).

Молекулярная визуализация с помощью флуоресцентных сенсоров позволяет в реальном времени исследовать процессы накопления, переноса, функционирования или токсичности металлов в клетках [85] и в организме [86, 87]. Дополнительными преимуществами являются простота эксплуатации, высокая селективность и низкая стоимость, что делает флуоресцентное обнаружение достаточно перспективным подходом [88]. Однако большинство сенсоров имеет недостатки, проявляющиеся в низкой растворимости в воде или тушении флуоресценции при связывании с ионами Cu^{2+} , медленном отклике, плохой химической стабильности, тушении люминесценции в водных средах, необратимости и короткого срока службы [89].

Флуоресцентные сенсоры условно разделяют на две большие группы: генетически кодируемые сенсоры (флуоресцентные белки) [90] и синтетические флуоресцентные сенсоры [91]. Основные преимущества генетически кодируемых сенсоров – это возможность применения их в качестве прижизненных маркеров и способность образовывать хромофор без участия вспомогательных веществ, а также низкая токсичность по отношению к клеткам. Экспрессию таких белков (сенсоров) в клетке можно легко контролировать, что позволяет локализовать данные сенсоры внутри любых клеточных структур. Созданы конструкции, состоящие из белков YFP и CFP, которые были связаны между собой медьсвязывающим доменом. При взаимодействии с медью возникали конформационные изменения, что приводило к изменению интенсивности излучения. Главное отличие от синтетических флуоресцентных сенсоров – слабое влияние на гомеостаз внутриклеточных металлов [92]. Основными недостатками являются неприменимость сенсоров для анализа содержания ионов меди при динамическом изменении концентрации, медленное время отклика [93], отсутствие возможности применения в моделях, где нельзя допустить генетическую модификацию клеток, трудности при получении сенсоров [94].

В качестве основы для синтетических флуоресцентных сенсоров может выступать множество соединений: различные синтетические пептиды [95], нанокластеры [96] и т.д.

В работе [95] методом твердофазного пептидного синтеза получен сенсор, позволяющий визуализировать ионы меди в микромолярных концентрациях. Возможности сенсора были продемонстрированы на клеточной линии HeLa. Флуорофор обладает хорошей проникающей способностью сквозь клеточную мембрану и пригоден для применения в живых системах.

Третья группа хемосенсоров – фотопереключаемые [97, 98]. Они способны к обратимому

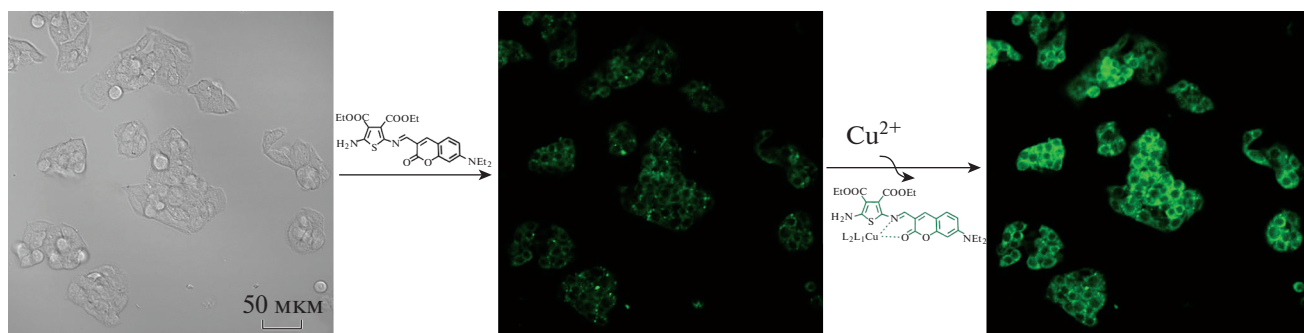


Рис. 3. Визуализация ионов Cu^{2+} в клетках HepG2 [97].

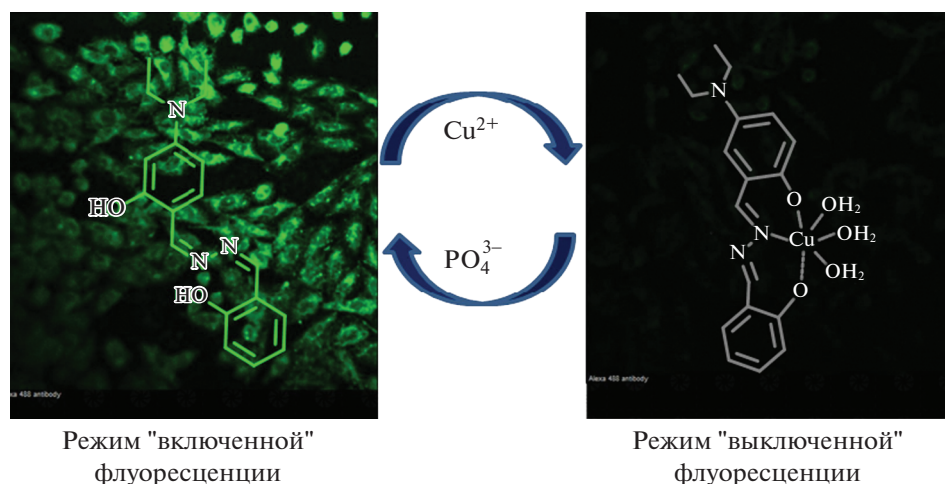


Рис. 4. Схематичное представление сенсора на основе азина для определения Cu^{2+} и его медного комплекса для определения фосфата в физиологических условиях [99].

“включению—выключению” своих сенсорных свойств под действием электромагнитного излучения.

С помощью азометинов на основе тиофена была показана возможность визуализации ионов меди в микромолярных концентрациях на примере нескольких клеточных линий, таких как HepG2 (рис. 3), BV2, A549, MH-S и HeLa [97].

На примере клеточной линии A549 с помощью сенсора на основе 5-диэтиламино-2-[(2-гидрокси-бензилиден)гидразонометил]фенола показано селективное количественное определение ионов Cu^{2+} . Было установлено, что предел обнаружения Cu^{2+} составляет $\sim 10^{-7}$ М. Кроме того, комплекс использовали для обнаружения фосфат-ионов в микромолярных концентрациях на основе восстановления флуоресценции благодаря связыванию Cu^{2+} с фосфат-ионами. Схематическое представление работы сенсора показано на рис. 4. При разработке комплекса удалось добиться отсутствия излучения, индуцированного агрегацией, сильной флуоресценции как в орга-

ническом, так и в водном растворе, минимального воздействия ионов других металлов на определение Cu^{2+} [99]. Флуоресцентный сенсор фотопереключаемого типа разработан для быстрого селективного обнаружения Cu^{2+} в растворах и биологических системах (рис. 5) [100]. В присутствии Cu^{2+} наблюдается излучение при длине волны 425 нм, обусловленное Cu^{2+} -индуцированным окислением имида с образованием карбоксилат-аниона. Предел обнаружения сенсора составил 10^{-9} М. Возможности сенсора подтверждены на нескольких клеточных линиях (RAW 264.7, HeLa и HT-29).

Селективный фотопереключаемый сенсор на основе пептида (Gly-Cys-NH₂) с дансилхлоридом был синтезирован [101] для визуализации и количественного определения ионов Cu^{2+} и Cd^{2+} в растворах и биологических системах. Механизм связывания пептида с ионами $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ показан на рис. 6. Предел обнаружения для Cu^{2+} составлял 26.3×10^{-9} М. К преимуществам сенсора можно

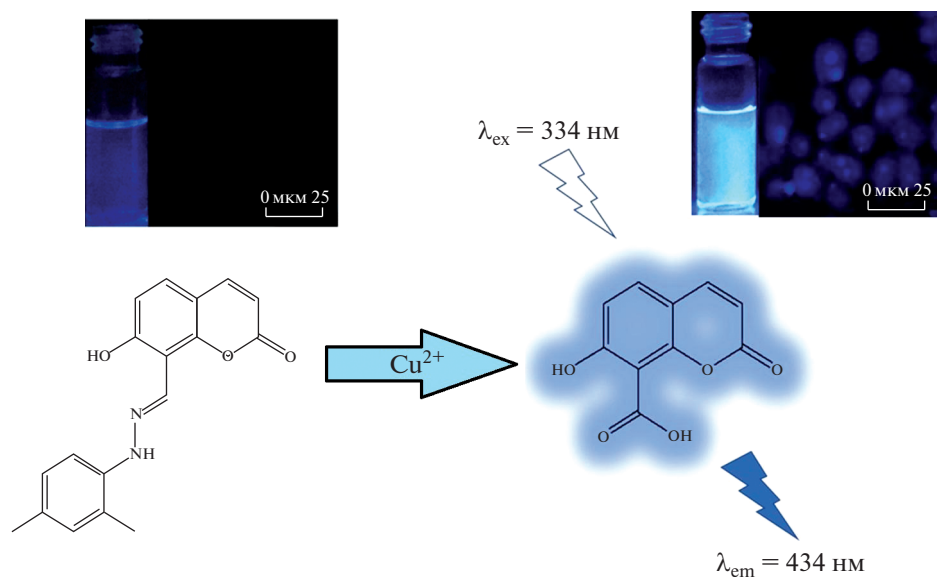


Рис. 5. Схематичное представление фотопереключаемого сенсора на основе азина [100].

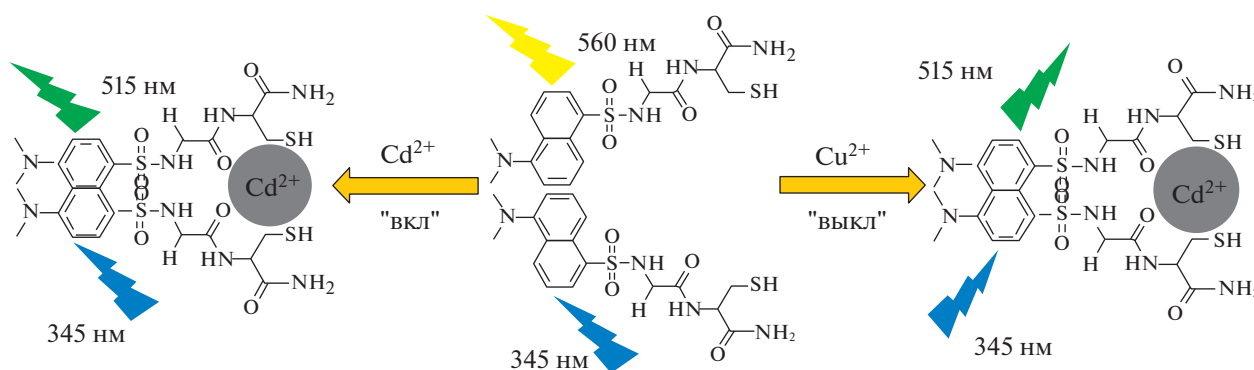


Рис. 6. Механизм связывания флуорофора с ионами $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ [101].

относительную высокую чувствительность, широкий рабочий диапазон pH 7–12. Что еще более важно, эксперименты с флуоресцентной визуализацией показали, что использованный флуорофор обладает хорошей проникаемостью сквозь мембраны и низкой токсичностью по отношению к клетке.

Фотопереключаемые и флуоресцентные хемосенсоры хорошо зарекомендовали себя в качестве одного из мощных инструментов для визуализации, а также изучения процессов переноса, функционирования или токсичности ионов меди в живых системах с дальнейшей перспективой расширения возможностей применения таких сенсоров. На текущий момент нет единого комплексного решения для устранения всех приведенных выше недостатков хемосенсоров, что накладывает ограничение на их использование.

2.5. Электрохимические методы

Вольтамперометрия является одним из самых распространенных электрохимических методов анализа для определения ионов меди в растворе и биологических системах [102–104]. Одно из преимуществ вольтамперометрических измерений заключается в вариации способов развертки потенциала в зависимости от поставленных задач. Так, для измерений в реальном времени чаще используют вольтамперометрию с высокой скоростью развертки. При необходимости определения малых концентраций аналита применяют дифференциальную импульсную вольтамперометрию (ДИВ) или квадратно-волновую вольтамперометрию. В последнее время стали актуальны всевозможные комбинации вольтамперометрических методик [105].

В [106] разработан селективный и чувствительный сенсор для электрохимического опреде-

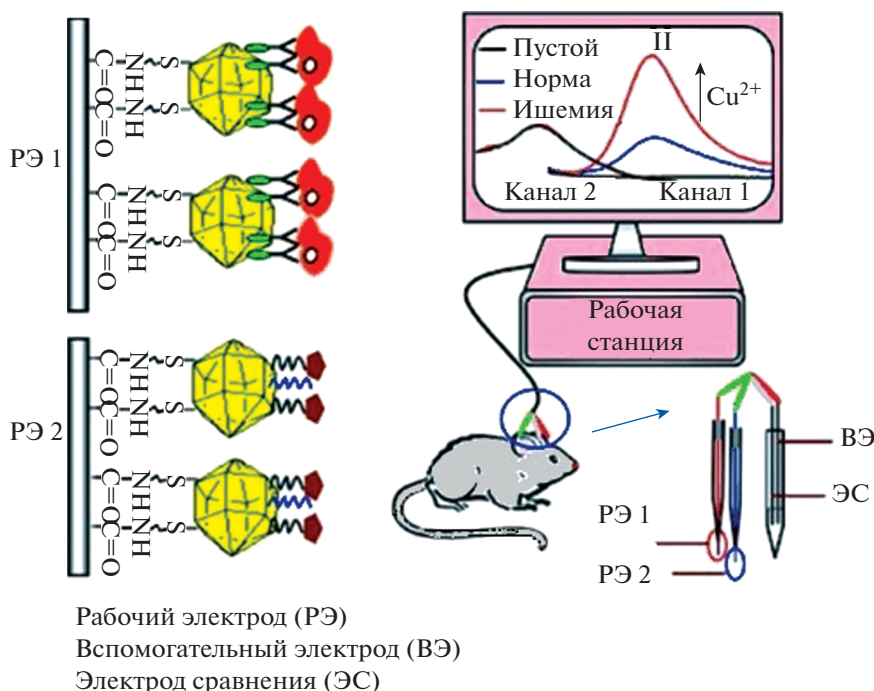


Рис. 7. Стадии изготовления модифицированных электродов [106].

ления (с помощью циклической вольтамперометрии и ДИВ) Cu^{2+} на наномолярных уровнях в биологических системах. Электроды из стеклоуглеродного волокна (электроды 10 мкм в диаметре) были функционализированы модифицированной супероксиддисмутазой $E_2\text{Zn}_2\text{SOD}$, где E – свободный от меди активный центр. $E_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ и Cu^{2+} взаимодействуют с высокой специфичностью, что обеспечивает высокую чувствительность, селективность и точность (с пределом обнаружения до 3×10^{-9} М и рабочим диапазоном от 0.01×10^{-6} до 35×10^{-6} М). Сенсорная система была применена для надежного обнаружения Cu^{2+} в мозге крысы (рис. 7). Концентрация ионов Cu^{2+} в мозге крысы до и после церебральной ишемии составила $\sim 2 \times 10^{-6}$ и $\sim 9 \times 10^{-6}$ М соответственно. Настоящим исследованием разработана методика создания сенсоров и был установлен надежный подход для мониторинга *in vivo*.

В [107] разработан сенсор, способный работать в режиме реального времени *in vivo*, для определения ионов Cu^{2+} методом ДИВ. Продемонстрирована селективность, достигнутая иммобилизацией разветвленного полиэтиленimina на предварительно функционализированной (последовательно: цистеином, золотыми наночастицами, 3-меркаптопропионовой кислотой) поверхности стеклоуглеродного электрода (рис. 8). Экспериментально подтверждена стабильная чувствительность к ионам Cu^{2+} после нескольких циклов измерений. Предел обнаружения составил 1.3×10^{-8} М. Кон-

центрация ионов Cu^{2+} в мозге крысы до и после глобальной церебральной ишемии составила $\sim 1.7 \times 10^{-6}$ и $\sim 5 \times 10^{-6}$ М соответственно. К недостаткам можно отнести высокую инвазивность применяемых сенсоров из-за их физических размеров (~ 3 мкм).

Еще одним электрохимическим методом анализа является потенциометрия. Потенциометрические измерения с использованием ионоселективных электродов являются простыми, точными, селективными, экономичными и быстрыми методами анализа, применяемыми для определения ионов меди в том числе [108, 109].

С помощью сенсоров на основе угольно-пастовых электродов было продемонстрировано потенциометрическое количественное определение ионов Cu^{2+} в воде и биологических пробах мочи больных с заболеванием Вильсона. Сенсоры просты в изготовлении и показывали высокую селективность, чувствительность, широкий диапазон рабочих концентраций (10^{-6} – 10^{-2} М), относительно быстрый отклик на ионы меди (6 с). К технологическим преимуществам сенсора можно отнести возможность массового производства с минимальными затратами; легкая модификация поверхности сенсора, селективность. Однако есть существенный функциональный недостаток, выраженный в относительно низкой чувствительности метода [110].

Среди многих методов обнаружения ионов меди электрохимические являются одними из са-

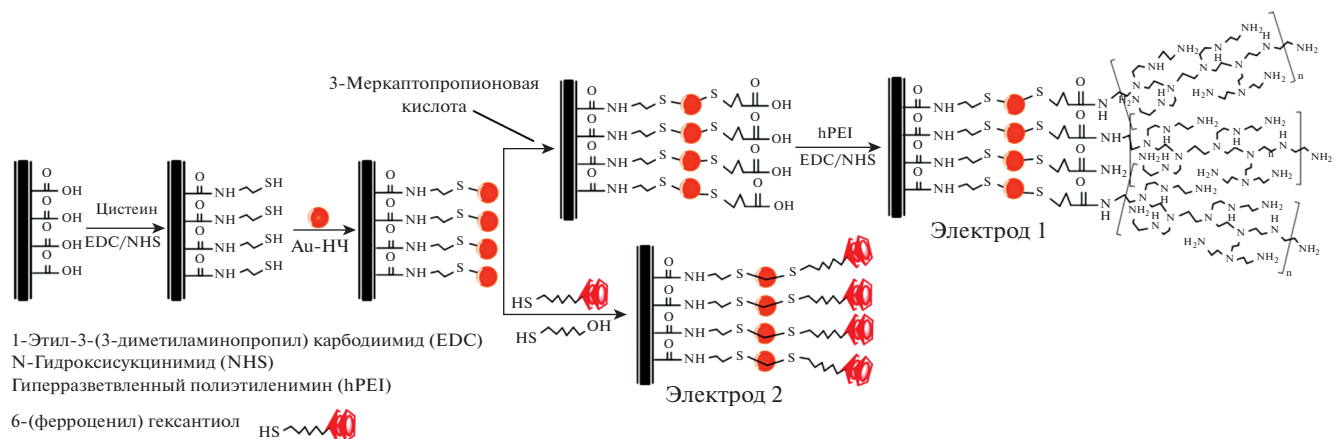


Рис. 8. Стадии изготовления электрохимического сенсора [107].

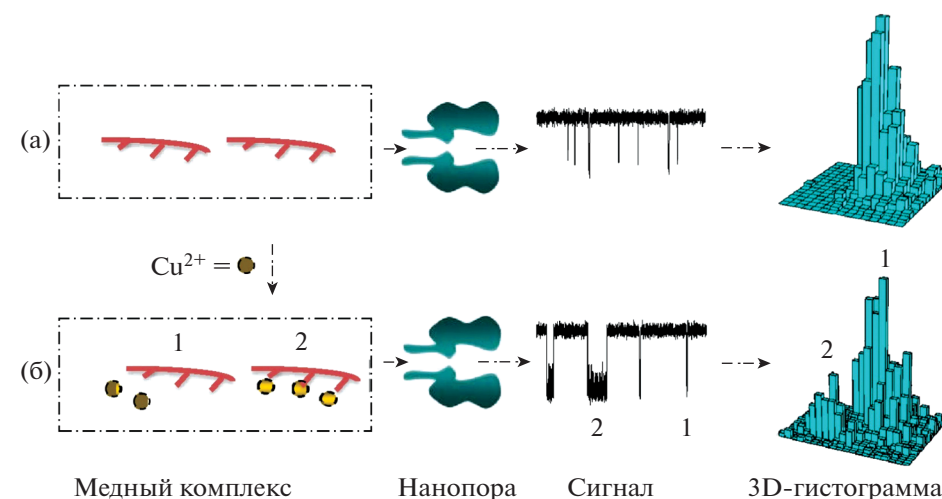


Рис. 9. Схематическое представление процесса обнаружения Cu^{2+} с помощью белковой нанопоры [129]: а – в отсутствие Cu^{2+} , б – в присутствии Cu^{2+} .

мых многообещающих благодаря хорошей чувствительности, простоте в эксплуатации, низкой стоимости изготовления сенсоров и хорошему соотношению сигнал/шум. Однако не все электрохимические сенсоры имеют возможность применения в биологических системах. Для большей части электродов отсутствует возможность малоинвазивного вмешательства из-за их физических размеров и конструктивных особенностей измерительных установок [111, 112].

2.6. Сенсоры на основе нанокapилляров и нанопор

Сенсоры на основе нанопор/нанокapилляров являются перспективным устройством для обнаружения аналитов в режиме реального времени с чувствительностью на уровне одной молекулы и возможностью применения в биологических системах [113–117]. Чтобы достичь высокой специфичности к конкретным мишеням, таким как

ионы металлов [118–120], ДНК [121], аминокислоты [122], белки [123], а также органические молекулы [124], используются два типа подходов.

Часть подходов заключается в иммобилизации специфичного лиганда на внутренней поверхности нанопор/нанокapилляра, с которым впоследствии происходит связывание анализируемого вещества, что в итоге приводит к изменению протекающего ионного тока через нанопоры/нанокapилляр [125–127]. Другой подход предполагает специфическое взаимодействие молекулы-мишени и сенсора без связывания на внутренней области нанокapилляра [128].

Оценка процесса транслокации полигистидина (используемого в качестве хелатирующего агента меди) через нанопору α -гемолизина легла в основу создания селективного сенсора [129]. Без ионов Cu^{2+} этот процесс имеет постоянные характеристики (например, время пребывания

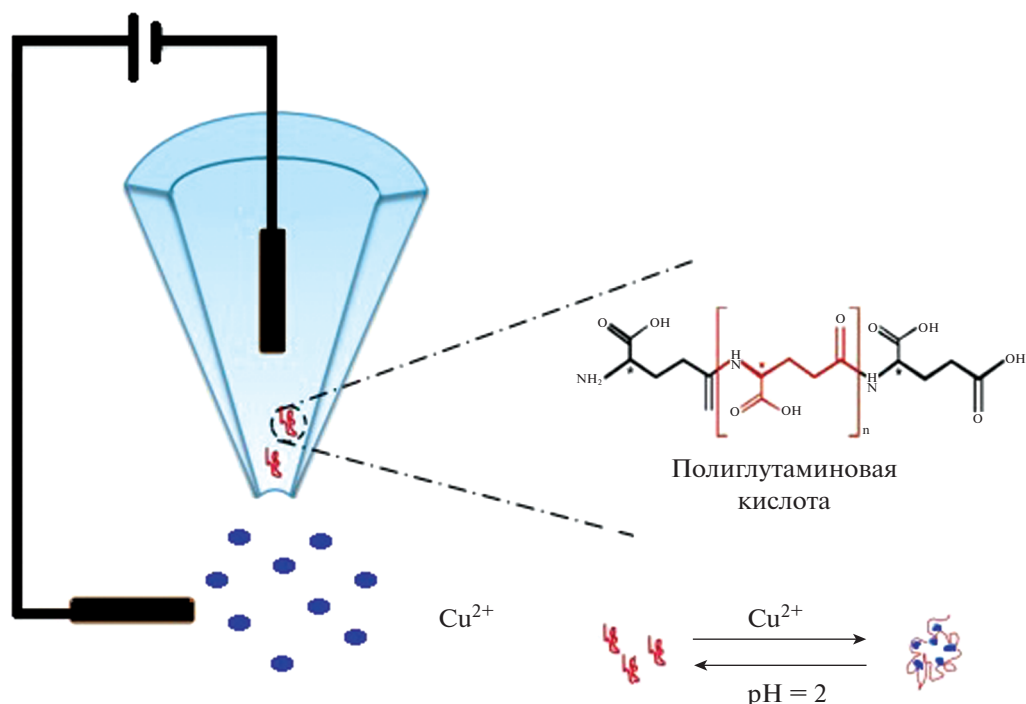


Рис. 10. Схематическое представление сенсора на основе нанокпилляра с иммобилизированной полиглутаминовой кислотой для определения ионов меди [130].

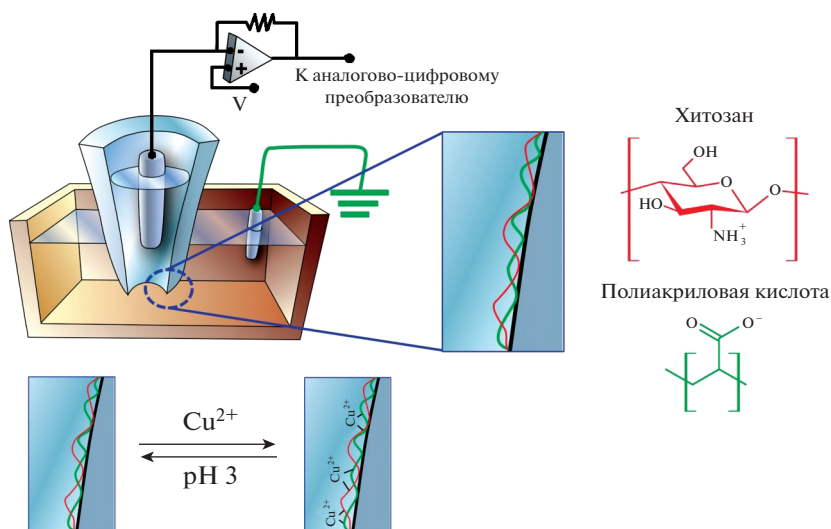


Рис. 11. Схематическое представление электролитической ячейки и обратимого связывания ионов меди на нанокпилляре, модифицированного хитозаном и полиакриловой кислотой [122].

хелатирующего агента внутри нанопоры или степень ее закупорки) (рис. 9а). После добавления Cu^{2+} ионы взаимодействуют с молекулами медь-хелатирующего агента. Взаимодействие между образованными медными комплексами и белковой нанопорой при транслокации приводит к значительным различиям в специфических сиг-

налах, что в конечном итоге позволяет легко распознавать медные комплексы (рис. 9б). С помощью данного метода возможно обнаружить следовые количества ионов меди с пределом обнаружения 4×10^{-8} М.

На основе нанокпилляров из кварца с иммобилизированной полиглутаминовой кислотой

Таблица 1. Сравнительный анализ способов количественного определения ионов меди

Способы количественного определения [Cu ⁺], [Cu ²⁺]	C _{min} [*] , М	Применение				Литература
		Раствор	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Измерения в реальном времени	
Сенсоры на основе транзисторов	10 ⁻¹²	+	–	–	–	[77]
Спектроскопические и спектрометрические методы анализа (AAS, FAAS, GF-AAS, ICP-MS, ICP-AES, PIXE, TXRF, SXFM, SERS)	10 ⁻¹¹	+	+	–	–	[46, 49–54, 56–58, 63, 64]
Сенсоры на основе микрокантиллеров	10 ⁻¹⁰	+	–	–	–	[71–73]
Колориметрические хемосенсоры	~10 ⁻⁹	+ (б.ж.)	–	–	–	[82]
Флуоресцентные хемосенсоры	10 ⁻⁹	+ (б.ж.)	+	+	–	[95, 96]
Электрохимические сенсоры	~10 ⁻⁹	+	+	+	+	[106, 107, 110]
Фотопереключаемые хемосенсоры	8 × 10 ⁻⁹	+	+	+	–	[97, 99–101]
Сенсоры на основе нанопор	~10 ⁻⁸	+	–	–	–	[129]
Сенсоры на основе нанокапилляров	~10 ⁻⁸	+	+	–	+	[125, 128, 130]

Примечание. б.ж. – биологические жидкости.

* Максимальный предел обнаружения ионов меди.

разработан сенсор для селективного обнаружения ионов меди в растворах (рис. 10) [130]. В исследовании была продемонстрирована сенсорная система для быстрого и избирательного обнаружения ионов меди (до 7.5 × 10⁻⁶ М) через значительное уменьшение ионного тока, проходящего через нанокапилляр. Датчик показывает высокую специфичность обнаружения для ионов меди из-за высокого сродства полиглутаминовой кислоты к Cu²⁺.

В [125] исследовано обратимое связывание Cu²⁺ на поверхности нанокапилляров, модифицированных хитозаном и полиакриловой кислотой в водных растворах (рис. 11). К недостаткам можно отнести низкую чувствительность (предел обнаружения составил 10⁻⁶ М) и узкий рабочий диапазон измеряемых концентраций (4 × 10⁻⁶–10⁻⁴ М).

Примером специфического взаимодействия молекулы-мишени и сенсора без связывания на внутренней области нанокапилляра является патент [128], где на заполненный углеродом стеклянный нанокапилляр электрохимическим путем осаждено золото, которое впоследствии было модифицировано лигандом на основе трипептида (глицил-L-гистидил-L-лизин-SH) для селективного связывания Cu²⁺ (электрохимический сенсор). Был проведен сравнительный анализ концентрационных кривых, полученных модифицированным сенсором и сенсором без лиганда. Установлено, что дополнительная стадия модификации позволяет существенно повысить чувствительность сенсора. Предел обнаружения сен-

сорной системы с лигандом составил 3 × 10⁻⁷ М. Показано применение сенсоров *in vitro* на клеточной линии MCF-7.

В заключение приведем результаты сравнительного анализа способов количественного определения ионов меди (табл. 1).

ВЫВОДЫ

В обзоре рассмотрены современные подходы к качественному и количественному определению ионов меди с возможностью или перспективой применения для биологических систем. Проведен сравнительный анализ спектроскопических, электрохимических, флуоресцентных методов, а также сенсоров на основе нанотранзисторов, кантиллеров, нанопор, нанокапилляров. Большая часть представленных сенсоров позволяет определять с высокой точностью и селективностью ионы меди только в растворах. Количественное определение ионов меди в “живых” системах возможно лишь некоторыми из них, которые, как правило, имеют большое количество недостатков. Флуоресцентные сенсоры, преимущественно направленные на определение меди в “живых” системах, почти не имеют возможности определения концентрации меди в режиме реального времени. Спектроскопические и спектрометрические методы анализа обладают высокой чувствительностью (~10⁻¹¹ М), однако проведение измерений *in vivo/in vitro* невозможно. Область применения сенсоров на основе микрокантиллеров и нанотранзисторов ограничена рас-

творами. Электрохимические сенсоры при их высокой чувствительности ($\sim 10^{-9}$ М) обладают наименьшим количеством недостатков, выраженных в физических размерах электродов и многостадийных процессах изготовления сенсоров. Однако сравнительно недавно появившиеся электроды на основе нанокапилляров позволяют уменьшить инвазивность при электрохимических измерениях и существенно упростить методику их изготовления, а также открывают новые возможности для создания различных электрохимических сенсоров.

Таким образом, из представленного экспертно-аналитического обзора открытой информации за последние 10 лет можно сделать вывод, что растет интерес к созданию сенсоров, позволяющих проводить измерения в режиме реального времени в живых системах, происходит ежегодное улучшение существующих методов анализа, выраженное в повышении чувствительности, селективности, снижении времени отклика и уменьшении инвазивности при изучении биологических систем.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10059).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lewińska-Preis L., Jabłońska M., Fabiańska M., Kita A.* // Environ. Geochem. Health. 2011. V. 33. № 6. P. 595.
<https://doi.org/10.1007/s10653-011-9373-7>
2. *Willis M.S., Monaghan S.A., Miller M.L. et al.* // Am. J. Clin. Pathol. 2005. V. 123. № 1. P. 125.
<https://doi.org/10.1309/V6GVYW2QTYD5C5PJ>
3. *Minoia C., Sabbioni E., Apostoli P. et al.* // Sci. Total Environ. 1990. V. 95. P. 89.
[https://doi.org/10.1016/0048-9697\(90\)90055-Y](https://doi.org/10.1016/0048-9697(90)90055-Y)
4. *Osredkar J., Sustar N.* // J. Clin. Toxicol. 2011. V. 3. № 1. P. 2161.
<https://doi.org/10.4172/2161-0495.S3-001>
5. *Linder M.C., Wooten L., Cerveza P. et al.* // Am. J. Clin. Nutr. 1998. V. 67. № 5. P. 965S.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.965S>
6. *Harris E.D.* // Nutrition Rev. V. 59. № 9. P. 281.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07017.x>
7. *Bhattacharya P.T., Misra S.R., Hussain M.* // Scientifica (Cairo). 2016. V. 2016. P. 1.
<https://doi.org/10.1155/2016/5464373>
8. *Araya M., Pizarro F., Olivares M. et al.* // Biol. Res. 2006. V. 39. № 1. P. 183.
<https://doi.org/10.4067/S0716-97602006000100020>
9. *Davis C.D.* // J. Nutr. 2003. V. 133. № 2. P. 522.
<https://doi.org/10.1093/jn/133.2.522>
10. *Christen Y.* // Am. J. Clin. Nutr. 2000. V. 71. № 2. P. 621S.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.621s>
11. *Rubino J.T., Franz K.J.* // J. Inorg. Biochem. 2012. V. 107. № 1. P. 129.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024>
12. *Tisato F., Marzano C., Porchia M. et al.* // Med. Res. Rev. 2009. V. 30. P. 708.
<https://doi.org/10.1002/med.20174>
13. *Haber F., Weiss J.* // Proc. R. Soc. London. A. 1934. V. 147. № 861. P. 332.
<https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0221>
14. *Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al.* // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007. V. 39. № 1. P. 44.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
15. *Khan A.U., Kasha M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. V. 91. № 26. P. 12365.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12365>
16. *Sies H.* // Exp. Physiol. 1997. V. 82. № 2. P. 291.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
17. *Tisato F., Marzano C., Porchia M. et al.* // Med. Res. Rev. 2009. № 4. P. 708.
<https://doi.org/10.1002/med.20174>
18. *Gupte A., Mumper R.* // Cancer Treat. Rev. 2009. V. 35. № 1. P. 32.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004>
19. *Pavelková M., Vysloužil J., Kubová K., Vetchý D.* // Ces. Slov. Farm. 2018. V. 2018. № 4. P. 143.
20. *Roberts E.A.* // Medicine (Baltimore). 2011. V. 39. № 10. P. 602.
<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.08.006>
21. *Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M. et al.* // Nat. Genet. 1993. V. 5. № 4. P. 327.
<https://doi.org/10.1038/ng1293-327>
22. *Scheinberg I.* // Major Probl. Intern. Med. 1984. V. 23. P. 9.
23. *Scheiber I.F., Mercer J.F.B., Dringen R.* // Prog. Neurobiol. 2014. V. 116. P. 33.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.01.002>
24. *Fenu M., Liggi M., Demelia E. et al.* // Eur. J. Intern. Med. 2012. V. 23. № 6. P. e150.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.04.005>
25. *Datar S., Wijdicks E.F.M.* // Handbook of Clinical Neurology. 2014. V. 120. P. 645.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00044-9>
26. *Lenartowicz M., Starzyński R.R., Jończy A. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 2017. V. 1863. № 6. P. 1410.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.020>
27. *Galhardi C.M., Diniz Y.S., Faine L.A. et al.* // Food Chem. Toxicol. 2004. V. 42. № 12. P. 2053.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.07.020>
28. *Strausak D., Mercer J.F., Dieter H.H. et al.* // Brain Res. Bull. 2001. V. 55. № 2. P. 175.
[https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00454-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00454-3)
29. *DiDonato M., Sarkar B.* // Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 1997. V. 1360. № 1. P. 3.
[https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(96\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(96)00064-6)
30. *Majouga A.G., Zvereva M.I., Rubtsova M.P. et al.* // J. Med. Chem. 2014. V. 57. № 14. P. 6252.
<https://doi.org/10.1021/jm500154f>
31. *Ceramella J., Mariconda A., Iacopetta D. et al.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2020. V. 30. № 3. P. 126905.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126905>
32. *Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F.* // Apoptosis. 2000. V. 5. № 5. P. 415.
<https://doi.org/10.1023/A:1009616228304>

33. Tian Q., Tang M., Sun Y. et al. // *Adv. Mater.* 2011. V. 23. № 31. P. 3542. <https://doi.org/10.1002/adma.201101295>
34. Li Y., Lu W., Huang Q. et al. // *Nanomedicine.* 2010. V. 5. № 8. P. 1161. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.85>
35. Zhou M., Zhang R., Huang M. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 43. P. 15351. <https://doi.org/10.1021/ja106855m>
36. Goel S., Chen F., Cai W. // *Small.* 2014. V. 10. № 4. P. 631. <https://doi.org/10.1002/smll.201301174>
37. Huang X., Xu C., Li Y. et al. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. V. 96. P. 129. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.062>
38. Yang Y. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 9. P. 3335. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>
39. Lee A., Sun S., Sandler A., Hoang T. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018. V. 44. P. 56. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.006>
40. Zhou P., Qin J., Zhou C. et al. // *Biomaterials.* 2019. V. 195. P. 86. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.007>
41. Leont'ev V.K., Pogorel'skii I.P., Frolov G.A. et al. // *Nanotechnologies Russ.* 2018. V. 13. № 3–4. P. 195. <https://doi.org/10.1134/S1995078018020040>
42. Mamonova I.A., Matasov M.D., Babushkina I.V. et al. // *Nanotechnologies Russ.* 2013. V. 8. № 5–6. P. 303. <https://doi.org/10.1134/S1995078013030142>
43. Ingle A.P., Duran N., Rai M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 3. P. 1001. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8>
44. Mokhtar A., Djelad A., Bengueddach A., Sassi M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 118. P. 2149. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.058>
45. Rajeshkumar S., Rinitha G. // *OpenNano.* 2018. V. 3. P. 18. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2018.03.001>
46. Litwin T., Gromadzka G., Szpak G.M. et al. // *J. Neurol. Sci.* 2013. V. 329. № 1–2. P. 55. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.03.021>
47. Colon M., Todolí J.L., Hidalgo M., Iglesias M. // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 609. № 2. P. 160. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.001>
48. Hill S.J., Fisher A.S. // *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* UK: Elsevier, 2017. 3584 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00099-6>
49. White A.R., Reyes R., Mercer J. F. et al. // *Brain Res.* 1999. V. 842. № 2. P. 439. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01861-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01861-2)
50. Giese A., Buchholz M., Herms J., Kretschmar H.A. // *J. Mol. Neurosci.* 2005. V. 27. № 3. P. 347. <https://doi.org/10.1385/JMN:27:3:347>
51. Goullé J.-P., Mahieu L., Castermant J. et al. // *Forensic Sci. Int.* 2005. V. 153. № 1. P. 39. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.020>
52. Hasegawa S., Koshikawa M., Takahashi I. et al. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2008. V. 22. № 3. P. 248. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2008.05.001>
53. Jones L.C., Beard J.L., Jones B.C. // *Hippocampus.* 2008. V. 18. № 4. P. 398. <https://doi.org/10.1002/hipo.20399>
54. Rahil-Khazen R., Bolann B.J., Myking A., Ulvik R.J. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2002. V. 16. № 1. P. 15. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(02\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(02)80004-9)
55. Lindh U., Johansson E., Gille L. // *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.* 1984. V. 3. № 1–3. P. 631. [https://doi.org/10.1016/0168-583X\(84\)90451-8](https://doi.org/10.1016/0168-583X(84)90451-8)
56. Cao Y., Feng J., Tang L. et al. // *Talanta.* 2020. V. 206. P. 120174. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120174>
57. Szoboszlai N., Réti A., Budai B. et al. // *Spectrochim. Acta. B.* 2008. V. 63. № 12. P. 1480. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.025>
58. Jeffery J., Frank A.R., Hockridge S. et al. // *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* 2019. V. 56. № 1. P. 170. <https://doi.org/10.1177/0004563218793163>
59. Kim A.M., Vogt S., O'Halloran T.V., Woodruff T.K. // *Nat. Chem. Biol.* 2010. V. 6. № 9. P. 674. <https://doi.org/10.1038/nchembio.419>
60. Cialla-May D., Zheng X.-S., Weber K., Popp J. // *Chem. Soc. Rev.* 2017. V. 46. № 13. P. 3945. <https://doi.org/10.1039/C7CS00172J>
61. Lee J.-H., Kim B.-C., Byeung-Keun O., Choi J.-W. // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015. V. 11. № 12. P. 2223. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2117>
62. Avella-Oliver M., Puchades R., Wachsmann-Hogiu S., Maquieira A. // *Sensors Actuators. B. Chem.* 2017. V. 252. P. 657. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.058>
63. Wang Y., Su Z., Wang L. et al. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 12. P. 6392. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05106>
64. Dugandžić V., Kupfer S., Jahn M. et al. // *Sensors Actuators. B. Chem.* 2019. V. 279. P. 230. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.098>
65. Gorelkin P.V., Kiselev G.A., Mukhin D.S. et al. // *Polym. Sci. A.* 2010. V. 52. № 10. P. 1023. <https://doi.org/10.1134/S0965545X10100044>
66. Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Kiselev G.A. et al. // *Analyst.* 2015. V. 140. № 17. P. 6131. <https://doi.org/10.1039/C5AN01102G>
67. Beloglazkina E.K., Majouga A.G., Zyk N.V. et al. // *Thin Solid Films.* 2007. V. 515. № 11. P. 4649. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2006.12.131>
68. Wu G., Ji H., Hansen K. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. V. 98. № 4. P. 1560. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1560>
69. Peng R., Xing L., Wang X. et al. // *Anal. Sci.* 2016. V. 32. № 10. P. 1065. <https://doi.org/10.2116/analsci.32.1065>
70. Du Y., Dong S. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 1. P. 189. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04190>
71. Bange A.F., Brown G.M., Senesac L.R., Thundat T. // *Surf. Sci.* 2009. V. 603. № 21. P. L125. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2009.09.009>
72. Xu X., Zhang N., Brown G.M. et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 183. P. 555. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2511-7>

73. Zhao H., Xue C., Nan T. et al. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 676. № 1–2. P. 81.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.07.041>
74. Taniguchi M., Kawai T. // *Appl. Phys. Lett.* 2004. V. 85. № 15. P. 3298.
<https://doi.org/10.1063/1.1801167>
75. Bäcklund T.G., Sandberg H.G.O., Österbacka R., Stubb H. // *Appl. Phys. Lett.* 2004. V. 85. № 17. P. 3887.
<https://doi.org/10.1063/1.1811798>
76. Panzer M.J., Frisbie C.D. // *Adv. Funct. Mater.* 2006. V. 16. № 8. P. 1051.
<https://doi.org/10.1002/adfm.200600111>
77. Nguyen T.T.K., Tran H.V., Vu T.T. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 127. P. 118.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.005>
78. Kergoat L., Herlogsson L., Piro B. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. V. 109. № 22. P. 8394.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1120311109>
79. Chen J., Li Y., Lv K. et al. // *Sensors Actuators. B. Chem.* 2016. V. 224. P. 298.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.046>
80. Fan J., Zhan P., Hu M. et al. // *Org. Lett.* 2013. V. 15. № 3. P. 492.
<https://doi.org/10.1021/ol3032889>
81. Upadhyay S., Singh A., Sinha R. et al. // *J. Mol. Struct.* 2019. V. 1193. P. 89.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.05.007>
82. Li M., Huang X., Yu H. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. V. 101. P. 614.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.022>
83. Guo L., Xu Y., Ferhan A.R. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 33. P. 12338.
<https://doi.org/10.1021/ja405371g>
84. Yaling Y., Yi H. // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 35. № 2. P. 159.
<https://doi.org/10.2116/analsci.18P345>
85. Feng S., Gao Q., Gao X. et al. // *Inorg. Chem. Commun.* 2019. V. 102. P. 51.
<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.01.012>
86. Xue X., Fang H., Chen H. et al. // *Dye. Pigment.* 2016. V. 130. P. 116.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.03.017>
87. Xu Z., Wang H., Chen Z. et al. // *Spectrochim. Acta. A.* 2019. V. 216. P. 404.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.062>
88. Ko K.C., Wu J.-S., Kim H.J. et al. // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. № 11. P. 3165.
<https://doi.org/10.1039/C0CC05421F>
89. Jung H.S., Kwon P.S., Lee J.W. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 5. P. 2008.
<https://doi.org/10.1021/ja808611d>
90. Carter K.P., Young A.M., Palmer A.E. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. № 8. P. 4564.
<https://doi.org/10.1021/cr400546e>
91. Domaille D.W., Que E.L., Chang C.J. // *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. № 3. P. 168.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.69>
92. McGhee C.E., Loh K.Y., Lu Y. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017. V. 45. P. 191.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.002>
93. Liang J., Guo L., Ding Y. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 443. № 3. P. 894.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.101>
94. Hao Z., Zhu R., Chen P.R. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018. V. 43. P. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.12.002>
95. Hao C., Li Y., Fan B. et al. // *Microchem. J.* 2020. V. 154. P. 104658.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104658>
96. Zhang N., Si Y., Sun Z. et al. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 23. P. 11714.
<https://doi.org/10.1021/ac503102g>
97. Luo Q., Bandi K.R., Dong Y. et al. // *Spectrochim. Acta. A.* 2019. V. 214. P. 146.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.013>
98. Zhao X., Gao C., Li N. et al. // *Tetrahedron Lett.* 2019. V. 60. № 21. P. 1452.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.04.049>
99. Tiwari K., Kumar S., Kumar V. et al. // *Spectrochim. Acta. A.* 2018. V. 191. P. 16.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.09.072>
100. Wei L.-F., Chen C.-Y., Lai C.-K. et al. // *Methods.* 2019. V. 168. P. 18.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.04.023>
101. Wang P., Wu J., Zhao C. // *Spectrochim. Acta. A.* 2020. V. 226. P. 117600.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117600>
102. Prasad B.B., Fatma S. // *Sensors Actuators. B. Chem.* 2016. V. 229. P. 655.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.028>
103. Liu T., Luo Y., Kong L. et al. // *Sensors Actuators. B. Chem.* 2016. V. 235. P. 568.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.116>
104. Pathirathna P., Yang Y., Forzley K. et al. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 15. P. 6298.
<https://doi.org/10.1021/ac301358r>
105. Holmes J., Pathirathna P., Hashemi P. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019. V. 111. P. 206.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.003>
106. Chai X., Zhou X., Zhu A. et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013. V. 52. № 31. P. 8129.
<https://doi.org/10.1002/anie.201302958>
107. Gu H., Hou Q., Liu Y. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 135. P. 111.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.014>
108. Mahajan R.K., Kaur I., Lobana T.S. // *Talanta.* 2003. V. 59. № 1. P. 101.
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00473-3](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00473-3)
109. Ding J., Qin W. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2020. V. 124. P. 115803.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115803>
110. Frag E.Y., El Badry Mohamed M., Fahim E.M. // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 131. P. 309.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.034>
111. Singh V.K., Kushwaha C.S., Shukla S.K. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 147. P. 250.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.209>
112. Romero-Cano L.A., Zárate-Guzmán A.I., Carrasco-Marín F., González-Gutiérrez L.V. // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 837. P. 22.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.02.005>
113. Karhanek M., Kemp J.T., Pourmand N. et al. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. № 2. P. 403.
<https://doi.org/10.1021/nl0480464>

114. *Howorka S., Siwy Z.* // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. № 8. P. 2360.
<https://doi.org/10.1039/B813796J>
115. *He H., Xu X., Jin Y.* // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 10. P. 4815.
<https://doi.org/10.1021/ac404168s>
116. *Vilozny B., Actis P., Seger R.A. et al.* // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. № 16. P. 6121.
<https://doi.org/10.1021/ac201322v>
117. *Erofeev A., Gorelkin P., Garanina A. et al.* // *Sci. Rep.* 2018. № 2. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25852-4>
118. *Sa N., Fu Y., Baker L.A.* // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 24. P. 9963.
<https://doi.org/10.1021/ac102619j>
119. *Zhai Q., Wang J., Jiang H. et al.* // *Talanta. Elsevier.* 2015. V. 140. P. 219.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.035>
120. *Kaya D., Kececi K.* // *Bulgarian Chem. Commun.* 2017. V. 49. P. 37. <https://www.semanticscholar.org/paper/Preparation-of-nanopores-and-their-application-for-Kaya-Kececi/7211e19fc2bef6de60ad87b0bf0aa5db22d133c2>
121. *Steinbock L.J., Bulushev R.D., Krishnan S. et al.* // *ACS Nano.* 2013. V. 7. № 12. P. 11255.
<https://doi.org/10.1021/nn405029j>
122. *Han C., Hou X., Zhang H. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. № 20. P. 7644.
<https://doi.org/10.1021/ja2004939>
123. *Umehara S., Karhanek M., Davis R.W., Pourmand N.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. V. 106. № 12. P. 4611.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0900306106>
124. *He H., Xu X., Wang P. et al.* // *Chem. Commun.* 2015. V. 51. № 10. P. 1914.
<https://doi.org/10.1039/C4CC09185J>
125. *Actis P., Vilozny B., Seger R.A. et al.* // *Langmuir.* 2011. V. 27. № 10. P. 6528.
<https://doi.org/10.1021/la2005612>
126. *Gornall J.L., Mahendran K.R., Pambos O.J. et al.* // *Nano Lett.* 2011. V. 11. № 8. P. 3334.
<https://doi.org/10.1021/nl201707d>
127. *Papp S., Jágerszki G., Gyurcsányi R.E.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018. V. 57. № 17. P. 4752.
<https://doi.org/10.1002/ange.201800954>
128. *Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Majouga A.G. et al.* pat. WO2017/116267AI USA. Russia, 2017. P. 1–25.
129. *Wang G., Wang L., Han Y. et al.* // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 53. P. 453.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.013>
130. *Chen L., He H., Xu X., Jin Y.* // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 889. P. 98.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.051>