

УДК 620.3

**ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
МАССИВОВ НАНОТРУБОК АНОДНОГО ОКСИДА
ТИТАНА АПТАМЕРАМИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ
БИОСЕНСОРОВ***

М. Ю. Прудникова¹, Д. Д. Бутманов¹, Т. С. Тихонова^{2,3},
А. А. Титов², А. К. Тарханов¹, Т. П. Савчук¹

¹ — Национальный исследовательский университет “МИЭТ”, Москва;

² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Научно-производственный комплекс “Технологический центр”, Scientific-Manufacturing
Complex “Technological Centre”;

³ — Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.08.2025 г.

Аннотация. Разработка высокочувствительных и селективных биосенсоров для ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний является актуальной задачей ввиду ограничений существующих методов анализа. Эта проблема может быть решена путем использования массивов нанотрубок анодного оксида титана (НТАОТ) в качестве основы для электрохимических биосенсоров, функционализированных аптамерами. В работе исследовано влияние различных методов предобработки поверхности НТАОТ на эффективность последующей функционализации. Массивы НТАОТ получены методом электрохимического анодирования слоя титана, нанесенного на кремниевую подложку, в неводном фторсодержащем электролите на основе этиленгликоля в потенциостатическом режиме. Представлены результаты исследования влияния методов предобработки, таких как реактивное ионное травление (РИТ) и химическое травление, на морфологию поверхности НТАОТ, изученную методом растровой электронной микроскопии. Эффективность иммобилизации ДНК-аптамеров оценивалась методом флуоресцентной микроскопии. Установлено, что комбинация РИТ и химического травления приводит к увеличению внутреннего диаметра нанопор до 100 нм. Показано, что наибольшая интенсивность флуоресцентного сигнала, свидетельствующая о наиболее эффективном связывании аптамеров, наблюдается на образцах, подвергнутых комбинированному реактивному ионному и химическому травлению и не обусловлена процессами адсорбции.

Ключевые слова: сенсорика, биомаркеры, наноматериалы, нанотрубки оксида титана, аптамеры.

* Работа выполнена в рамках государственного задания 2023–2025 гг. соглашение FSMR–2023–0003.

© Прудникова М. Ю., Бутманов Д. Д., Тихонова Т. С., Титов А. А., Тарханов А. К., Савчук Т. П., 2025

FUNCTIONALIZATION OF MODIFIED TITANIUM ANODIC OXIDE NANOTUBE ARRAYS WITH APTAMERS FOR ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

М. Yu. Prudnikova, D. D. Butmanov, T. S. Tikhonova,
A. A. Titov, A. K. Tarkhanov, T. P. Savchuk

Abstract. The development of highly sensitive and selective biosensors for early diagnosis of cardiovascular diseases is an urgent task due to the limitations of existing analysis methods. This problem can be solved by using anodic titanium oxide nanotube (ATN) arrays as a base for aptamer-functionalized electrochemical biosensors. In this work, the effect of various methods of TNT surface pretreatment on the efficiency of subsequent functionalization was investigated. TNT arrays were obtained by electrochemical anodization of a titanium layer deposited on a silicon substrate in a nonaqueous fluorine-containing electrolyte based on ethylene glycol in the potentiostatic mode. The results of a study of the effect of pretreatment methods, such as reactive ion etching (RIE) and chemical etching, on the TNT surface morphology studied by scanning electron microscopy are presented. The efficiency of DNA aptamer immobilization was estimated by fluorescence microscopy. It was found that a combination of RIE and chemical etching leads to an increase in the internal diameter of nanopores to 100 nm. It is shown that the highest intensity of the fluorescent signal, indicating the most effective binding of aptamers, is observed on samples subjected to combined reactive ion and chemical etching.

Keywords: Sensorics, biomarkers, nanomaterials, titanium oxide nanotubes, aptomers.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной смертности в России, ежегодно унося более 830 тысяч жизней (43,8% от общей смертности). Ранняя диагностика имеет решающее значение для эффективного лечения и улучшения прогноза для пациентов, однако существующие методы не всегда позволяют своевременно выявлять ССЗ, особенно на ранних стадиях, когда концентрация биомаркеров еще мала. Диагностический порог основных маркеров повреждения миокарда в крови для тропонина I (сTnI) составляет менее 30 нг/мл, для N-терминального пропептида натрийуретического гормона В-типа (NT-proBNP) – менее 125 пг/мл, для белка, связывающего жирные кислоты, сердечного типа (hFABP) – менее 5 нг/мл. Стандартные методы диагностики повреждения миокарда, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и электрохемилюминесценция (ЭХЛ), хотя и эффективны, имеют ряд ограничений: они требуют значительного времени (от 1 до нескольких часов) для получения результатов, дорогостоящего не портативного оборудования, что ограничивает их доступность для point-of-care диагностики. Решить описанные проблемы может введение в практику использования портативных биосенсоров на основе наноматериалов, обладающих большой удельной площадью поверхности, обеспечивающей высокую чувствительность устройства.

Электрохимические биосенсоры на основе наноматериалов привлекают внимание за счет высокой чувствительности, селективности, простоте конструкции и возможности повторного использования активного элемента. Новый подход к детектированию биомаркеров – использование массивов нанотрубок анодного оксида титана (НТАОТ) в качестве активного элемента электрохимического биосенсора. Массивы НТАОТ, благодаря своей упорядоченной структуре, большой удельной площади поверхности, направленному движению носителей заряда, являются перспективным материалом для создания биосенсоров. Метод электрохимического анодирования титановой фольги позволяет целенаправленно управлять геометрическими параметрами (диаметр, толщина стенок, длина) нанотрубок и модифицировать их состав, варьируя состав раствора электролита. После формирования массивов НТАОТ на титано-

вой подложке возможно управлять химическим и фазовым составом наноструктуры изменяя физико-химические свойства поверхности путем варьирования условий химической и термической обработки. Такой подход обеспечивает гибкость в настройке физико-химических свойств материала под конкретные задачи. Высокая химическая и термическая стабильность до 700 ° массивов НТАОТ может обеспечить длительный срок службы сенсора. Массивы НТАОТ являются биосовместимым материалом, что в перспективе может быть основой для разработки инвазивных биосенсоров маркеров повреждения миокарда. Необходимо отметить, что массивы НТАОТ также обладают повышенной фотокаталитической активностью в процессах очистки жидкостей и газов от органических веществ, что может быть потенциально полезно при реактивации будущих электрохимических биосенсоров [1], что невозможно для электродов на основе углеродных наноматериалов. Не смотря на описанные преимущества массивов НТАОТ, упоминаний о таком материале в последних обзорах, посвященных исследованию наноматериалов в электрохимических биосенсорах повреждения миокарда, нет [2, 3].

В отдельных работах [4, 5] массивы НТАОТ успешно применялись в качестве оптического флуорисцентного биосенсора тропонина I и кроличьего иммуноглобулина G (IgG). В тоже время есть работы по исследованию массивов НТАОТ как биосенсоров гербицидов, глюкозы [6] и мочевой кислоты [7], а также в других направлениях сенсорики [8]. Иные наноструктуры оксида титана также применяют для электрохимического детектирования биомаркеров повреждения миокарда, например, [9] где применяются наночастицы оксида титана, модифицированные оксидом марганца без дополнительной функционализации, для детектирования миоглобина. Стоит отметить, что при синтезе массивов НТАОТ в растворах электролитов на основе органических растворителей и последующей термической обработке в инертных атмосферах возможно модифицировать структуру материала углеродом.

Функционализация поверхности наноматериалов аптамерами или антителами зачастую необходима для увеличения селективности наноматериала к конкретному биомаркеру или группе биомаркеров [10 - 13]. Для электрохимических биосенсоров необходимо, чтобы функциональные группы связывались с поверхностью химически, избегая физической адсорбции [12], что необходимо для стабильности работы будущего сенсора. Работ, в которых описывались бы подходы к функционализации поверхности массивов НТАОТ, термически обработанных на воздухе, практически нет. В работе [4] функционализацию поверхности проводили в растворе 16- фосфоноксидекадекановой кислоты (16-РНА) в смеси этанола и деионизированной воды с дальнейшей активацией карбоксильных (-COOH) групп для нанесения антител.

Упоминаний по функционализации поверхности массивов НТАОТ, модифицированных углеродом, найти не удалось. В связи с этим в настоящей работе будут разработаны новые методики функционализации основываясь на уже опубликованных для наночастиц оксида титана и углеродных наноматериалов: формирование -ОН групп путем химической и силанизирования с дальнейшей активацией карбоксильных групп (-COOH) с помощью 1-этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорида (EDC) и осаждением аптамеров или антител для увеличения селективности биосенсора.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для синтеза массивов НТАОТ использовалась слой титана, нанесённый на поверхность кремниевой пластины с подслоем из нитрида титана. Слои нитрида титана и металлического титана на монокристаллическую пластину кремния микроэлектронного качества полировки (КДБ-12 (100)) были нанесены методом магнетронного распыления при помощи универсальной напылительной системы FHR MS 100X4. Режим: 500 Вт, скорость потока Ar 27 см³/мин, в случае нитрида титана дополнительно был напущен N₂ (3 см³/мин), примерная скорость осаждения 1 нм/с.

Для проведения процесса анодного окисления был использован неводный электролит на основе этиленгликоля с добавлением фторид ионов (98 мл этиленгликоля на 2 мл воды и 0,3 г NH_4F на 100 мл раствора).

Процесс анодного окисления был проведен в горизонтальной термостатируемой ячейке при температуре 20 °С. Для поддержания температуры термонесителя был использован термостат Termex ВТ-01. Окисление происходило в потенциостатическом режиме при напряжении 60 В. В качестве источника питания был использован источник питания АКИП-1125.

Процесс анодного окисления на первой проводился в течении 30 минут, после чего полученный слой нанотрубок удаляли с поверхности фольги при помощи генерации водорода на поверхности титана при электролизе 5% серной кислоты. После отрыва плёнки происходил второй процесс анодирования.

Для установления взаимосвязи условий подготовки поверхности с качеством функционализации поверхности образцов массивов НТАОТ аптамерами была подготовлена серия образцов, обработанных при разных условиях.

Использовались образцы 3 видов:

С1) Образцы без дополнительной обработки

F1) Обработка образцов методом реактивного ионного травления (РИТ) для удаления иницирующего слоя проводилась в установке МВУ ТМ РИТ 100 Режим процесса: обработка в плазме в среде Ar - 1 л/ч, O_2 - 1,1 л/ч, SF_6 - 0,6 л/ч при мощности 200 Вт, время обработки составляло 30с.

F2) Обработка образцов РИТ, после чего проводилась дополнительная обработка химическим травлением в перекиси водорода с серной кислотой с соотношением 50/50 при температуре 50 °С в течение 5 минут.

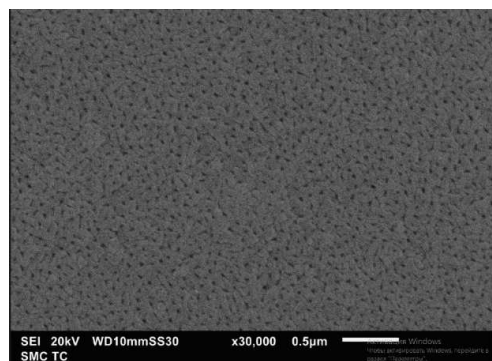
После модификации поверхности образцы термически обрабатывались для перехода оксида титана из аморфного состояния в фазу анатаза. Термическая обработка образцов происходила в муфельной печи АВЕРОН ЭМП-1.1 на воздухе в течение 1 часа, со скоростью нагревания 30 °С/минуту. Температура обработки составляла 450 °С.

Образцы инкубировали в 3% растворе АРТЕS в метаноле в течение 30 минут, после промывали метанолом и водой. После обработки АРТЕS образцы помещали в 3 мМ раствор NHS-эфира азидомасляной кислоты в 0,1 М трис- HCl , pH 8,65. Для предварительного растворения NHS-эфира азидомасляной кислоты использовали ДМСО из расчёта 10 мкл на каждые 0,1 мг навески. После инкубации в течение не менее 5 часов пластинки тщательно промывали водой. Раствор олигонуклеотида с алкиновой меткой и без неё с концентрацией 5 мкМ готовили в коммерческом буферном растворе для клик-химии (Люмипроб, Россия) с добавлением 1 мМ аскорбиновой кислоты. Образцы погружали в подготовленные растворы олигонуклеотидов и инкубировали в течение 2 часов, затем промывали водой.

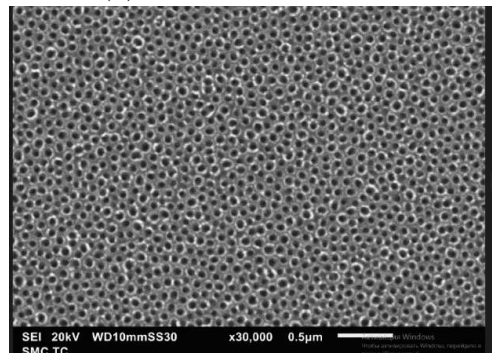
После иммобилизации связанную с поверхностью ДНК “подкрашивали” в растворе с SYBR Gold для специфического связывания олигонуклеотидов с красителем. Флуоресцентный сигнал красителя визуализировали с помощью системы гель-документации при возбуждении в синем спектре с длиной волны 470 нм и испускании в зелёном 525 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

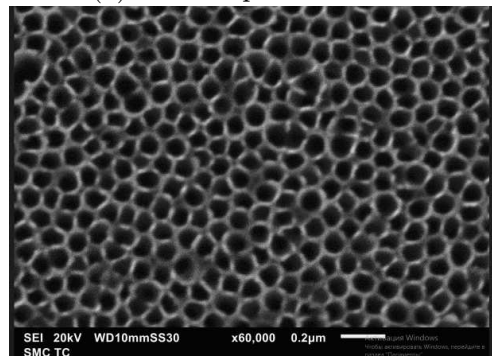
Для исследования влияния травления на морфологию массивов образцов, сначала поверхности полученных массивов НТАОТ на кремниевой подложке была исследована при помощи растрового электронного микроскопа. Полученные изображения показаны на рисунке 1. Из изображения на рисунке 1(а) можно заключить что поверхность массива представляет собой пористую структуру без отдельно стоящих нанотрубок. Четко выделенных стенок и расстояния между ними не наблюдается. Средний размер видимых нанопор составляет около 20 нм.



(а) C1 — без обработки



(б) F1 — обработка РИТ



(в) F2 — обработка хим. травлением

Рис. 1. РЭМ изображения поверхности массивов НТАОТ обработанных различным типами травления.

На рисунке 1(б) представлены РЭМ изображения поверхности массива НТАОТ, подверженного обработке методом реактивного ионного травления по методике, описанной ранее. Такая обработка позволяет удалить около 300 нм толщины в верхней части массива нанотрубок. После обработки видимый внутренний диаметр пор увеличивается и в среднем составляет около 70 нм. В тоже время, становятся различимы границы между нанотрубками. Увеличение видимого внутреннего диаметра пор связано в первую очередь с удалением иницирующего слоя.

На рисунке 1(в) представлены РЭМ изображения поверхности образца, подверженного дополнительному химическому травлению. Как можно видеть после обработки в РИТ и химическим травлением, видимый внутренний диаметр пор увеличивается и в среднем составляет около 100 нм.

Для контроля специфически ориентированного связывания аптамера с поверхностью мас-

сиров НТАОТ были проведены измерения двух типов образцов:

- (-) ДНК без алкиновой метки (неспецифическое связывание ДНК за счёт сорбции);
- (+) ДНК с алкиновой меткой (специфическое ориентированное связывание аптамера, обеспечивающее его функциональность и стабильность).

По распределению интенсивности свечения, представленного на рисунке 2, можно заключить, что наиболее эффективно осаждение аптамера проходило на химически обработанном образце. Однако, эффект изменения морфологии (увеличение диаметра нанопор) может быть избыточен. Эффект обработки РИТ, отрицательный, однако это может быть связано с использованием SF_6 , увеличивающего эффективность распыления верхнего слоя массива НТАОТ.

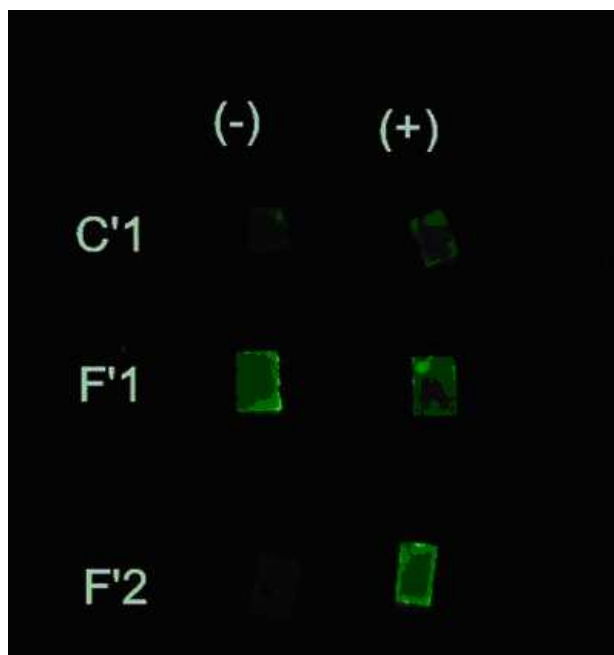


Рис. 2. Результаты с флюоресцентного микроскопа исследуемых образцов.

Свечение образцов, полученных при инкубировании с аптамером без специфической алкиновой метки, обусловлено неспецифическим связыванием (физической сорбции) ДНК на поверхности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе было исследовано влияние различных методов предобработки поверхности массивов нанотрубок анодного оксида, таких как обработка реактивным ионным травлением и обработка химическим травлением. Была проведена функционализация поверхности массивов нанотрубок анодного оксида титана аптамерами. Проведенная оценка по распределению интенсивности свечения после осаждения аптамера с алкиновой меткой и без метки, показала, что по распределению интенсивности свечения наиболее эффективно осаждение аптамера проходило на химически обработанном образце.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ikreedeegh, R. R. A comprehensive review on anodic TiO_2 nanotube arrays (TNTAs) and their composite photocatalysts for environmental and energy applications: Fundamentals, recent advances and applications / R. R. Ikreedeegh, M. A. Hossen, M. Tahir // Coordination Chemistry.

2. Recent advances in electrochemical nanobiosensors for cardiac biomarkers / M. Negahdary, A. Sharma, T. D. Anthopoulos, L. Angnes // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2023. — V. 164. — P. 117104.
3. Gerdan, Z. Biosensing platforms for cardiac biomarker detection / Z. Gerdan, Y. Saylan, A. Denizli // *ACS omega*. — 2024. — V. 9, № 9. — P. 9946–9960.
4. Kar, P. Ultrahigh sensitivity assays for human cardiac troponin I using TiO₂ nanotube arrays / P. Kar, A. Pandey, J. J. Greer // *Lab on a Chip*. — 2012. — V. 12, № 4. — P. 821–828
5. Song, Y. Y. TiO₂ nano test tubes as a self-cleaning platform for high Γ]sensitivity immunoassays / Y. Y. Song, F. Schmidt–Stein, S. Berger // *Small*. — 2010. — V. 6, № 11. — P. 1180–1184.
6. Bertel, L. Nanostructured titanium dioxide surfaces for electrochemical biosensing / L. Bertel, D. A. Miranda, J. M. García-Martín // *Sensors*. — 2021. — V. 21, № 18. — C. 6167.
7. Development of anodic titania nanotubes for application in high sensitivity amperometric glucose and uric acid biosensors / H. C. Lee, L. F. Zhang, J. L. Lin, Y. L. Chin // *Sensors*. — 2013. — V. 13, № 10. — P. 14161–14174.
8. Galstyan V. TiO₂ nanotubes: recent advances in synthesis and gas sensing properties / V. Galstyan, E. Comini, G. Faglia // *Sensors*. — 2013. — V. 13, № 11. — P. 14813–14838.
9. Label-free electrochemical sensor based on manganese doped titanium dioxide nanoparticles for myoglobin detection: biomarker for acute myocardial infarction / Al A. Fatease [et al.] // *Molecules*. — 2021. — V. 26, № 14. — P. 4252.
10. Speranza, G. Carbon nanomaterials: Synthesis, functionalization and sensing applications / G. Speranza // *Nanomaterials*. — 2021. — V. 11, № 4. — P. 967.
11. Sawan, S. Aptamers functionalized metal and metal oxide nanoparticles: Recent advances in heavy metal monitoring / S. Sawan, A. Errachid, R. Maalouf // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2022. — V. 157. — P. 116748.
12. Liu, B. Sensors and biosensors based on metal oxide nanomaterials / B. Liu, J. Liu // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2019. — V. 121. — P. 115690.
13. Nikolova, M. P. Metal oxide nanoparticles as biomedical materials / M. P. Nikolova, M. S. Chavali // *Biomimetics*. — 2020. — V. 5, № 2. — P. 27.

Прудникова Мария Юрьевна, инженер института ПМТ, НИУ “МИЭТ”, Москва, Россия
E-mail: prudnikovamaria81@gmail.com

Prudnikova Maria Yuryevna, engineer of the Institute of AMT, National Research University of Electronic Technology (MIET), Moscow, Russia
E-mail: prudnikovamaria81@gmail.com

Бутманов Данил Денисович, инженер института ПМТ, НИУ “МИЭТ”, Москва, Россия
E-mail: butmanovdanil@yandex.ru

Butmanov Danil Denisovich, engineer of the AMT Institute, National Research University of Electronic Technology (MIET), Moscow, Russia
E-mail: butmanovdanil@yandex.ru

Тихонова Татьяна Сергеевна, инженер научно-исследовательской лаборатории интегральных биохимических наносенсоров научно-производственного комплекса «Технологический центр» Зеленоград, Москва, Россия, аспирант Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: tanya-eremina-2017@mail.ru

Tikhonova Tatyana Sergeevna, engineer of the research laboratory of integrated biochemical nanosensors of the Scientific-Manufacturing Complex «Technological Centre» Zelenograd, Moscow, Russia, postgraduate student of the Chemistry Department of M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
E-mail: tanya-eremina-2017@mail.ru

Титов Алексей Александрович, ведущий инженер научно-исследовательской лаборатории интегральных биохимических наносенсоров научно-производственного комплекса «Технологический центр», канд. биол. наук, Зеленоград, Москва, Россия
E-mail: alextitov2187@mail.com

Titov Aleksey Aleksandrovich, leading engineer of the research laboratory of integral biochemical nanosensors of the Scientific-Manufacturing Complex «Technological Centre», Ph. D. in Biology, Zelenograd, Moscow, Russia
E-mail: alextitov2187@mail.com

Тарханов Андрей Константинович, научный сотрудник, НИУ «МИЭТ», Москва, Россия
E-mail: anvetkin@yandex.ru

Tarhanov Andrey Konstantinovich, researcher, National Research University of Electronic Technology (MIET), Moscow, Russia
E-mail: anvetkin@yandex.ru

Савчук Тимофей Павлович, старший преподаватель института ПМТ, НИУ «МИЭТ», Москва, Россия
E-mail: i@savchukt.ru

Savchuk Timofey Pavlovich, senior lecturer at the Institute of AMT, National Research University of Electronic Technology (MIET), Moscow, Russia
E-mail: i@savchukt.ru