

На правах рукописи



Христунова Екатерина Петровна

**РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА НА
ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К
ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент *Короткова Елена Ивановна*

Официальные оппоненты:

Козицина Алиса Николаевна, доктор химических наук, доцент, заведующая кафедрой аналитической химии Химико-технологического института, «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург

Отмахов Владимир Ильич, доктор технических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии химического факультета, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Защита состоится «11» февраля 2021 года в «14.00»

на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Национальном исследовательском Томском политехническом университете по адресу: **634050, г. Томск, пр. Ленина 43 а.**

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: dis.tpu.ru

Автореферат разослан «__» декабря 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета

Е. В. Дорожко

Е. В. Дорожко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Диагностика клещевого энцефалита (КЭ) в Сибирском регионе является важным вопросом в связи с распространенностью данного заболевания, которое характеризуется лихорадкой и способствует повреждению серого вещества головного мозга, что в свою очередь вызывает стойкое неврологическое и психиатрическое нарушение с возможным летальным исходом. После инфицирования вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) в организме человека развиваются специфические клеточные и гуморальные реакции, и в результате начинается выработка антител к этому заболеванию. Для подтверждения диагноза «клещевой энцефалит» проводят исследования по определению выработанных организмом специфических антител свидетельствующих о текущей, либо перенесенной инфекции. Наиболее распространенный метод для обнаружения антител – иммуноферментный анализ (ИФА), в котором при обнаружении молекул-мишеней в качестве метки для регистрации сигнала используют ферменты. Маркерные ферменты хранятся только при низких температурах или в консервирующих растворах, что приводит к необходимости периодической оценки их активности и рутинным валидационным процедурам ИФА тест-систем. Кроме того, для проведения ИФА необходимо сложное, дорогостоящее лабораторное оборудование, требующее высокой квалификации обслуживающего персонала.

Таким образом, несмотря на имеющийся метод ИФА, существует необходимость создания альтернативного метода определения антител к ВКЭ. В последнее десятилетие возрос интерес к разработке электрохимических иммуносенсоров для определения антител в клинических и биологических образцах, где вместо ферментной метки антивидовых антител используют наночастицы (НЧ) металлов. Такие электрохимические иммуносенсоры сочетают в себе специфичность иммунохимической реакции с преимуществами электрохимического обнаружения металлической метки и представляют собой новую тенденцию в разных областях аналитической химии, благодаря их высокой чувствительности, низкой стоимости и присущей миниатюризации использованного оборудования.

Данное исследование открывает путь к разработке электрохимического иммуносенсора на основе наночастиц серебра для обнаружения соответствующих антител в крови человека и к контролю качества иммунологических продуктов, содержащих антитела к ВКЭ, которые используются в качестве постконтактной профилактики после укуса клеща.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к вирусу клещевого энцефалита в биологических объектах с использованием биоконъюгатов на основе наночастиц серебра.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

– получить наночастицы серебра и осуществить разные стратегии биоконъюгирования антител к ВКЭ с НЧ серебра для создания конъюгатов со специфической активностью ($Ab@AgНЧ$, $Ab_s@AgНЧ$);

- изучить электрохимические свойства синтезированных НЧ серебра и их биоконъюгатов на разных электродах: импрегнированный графитовый электрод (ИГЭ), золото-ансамблевый углеродсодержащий электрод (ЗАУСЭ);
- исследовать электрохимические свойства биоконъюгатов НЧ серебра на разных этапах иммобилизации антигена ВКЭ на поверхности ИГЭ;
- осуществить разработку алгоритма проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$);
- провести сравнительные испытания оценки специфичности и правильности разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ со стандартным методом ИФА;
- рассчитать основные метрологические характеристики разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ (показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности);
- провести апробацию разработанного электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ в реальных объектах анализа.

Научная новизна работы:

- Впервые определены способы получения стабильных и электроактивных биоконъюгатов на основе наночастиц серебра: $Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$. Исследованы их электрохимические свойства. Показана возможность их использования для количественного определения антител к ВКЭ в электрохимическом бесферментном иммуноанализе, где НЧ серебра используются в качестве сигналообразующих меток;
- Разработан алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$) и широкодоступных углеродсодержащих материалов электродов. Установлено, что для определения антител к ВКЭ предпочтительнее регистрировать аналитический сигнал биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ методом катодной инверсионной вольтамперометрии (КИВ) с использованием золото-ансамблевого углеродсодержащего электрода (ЗАУСЭ) через труднорастворимое соединение $AgCl\downarrow$, а для биоконъюгатов $Ab_s@AgHЧ$ предпочтительнее использовать метод анодной инверсионной вольтамперометрии (АИВ) на импрегнированном графитовом электроде (ИГЭ) путем окисления Ag^0 на поверхности электрода;
- Найдены оптимальные условия проведения электрохимического иммуноанализа, обеспечивающие чувствительное (диапазон концентраций 100 – 1600 Ед/см³) и специфичное количественное определение антител к ВКЭ. Показана возможность применения разработанного электрохимического иммуносенсора в широком диапазоне концентраций (100 – 1600 Ед/см³) в реальных объектах (лекарственный препарат иммуноглобулин человеческий против КЭ, сыворотка крови человека).

Практическая значимость.

Разработан электрохимический иммуносенсор и методики для количественного определения антител к ВКЭ методами инверсионной вольтамперометрии с использованием синтезированных $Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$, не требующий наличия сложного и дорогостоящего оборудования, который обладает сопоставимой чувствительностью с традиционным ИФА.

Разработанный электрохимический иммуносенсор можно рекомендовать к применению в аналитических лабораториях для контроля качества лекарственных препаратов, содержащих иммуноглобулин человеческого против КЭ. Кроме того, в диагностических лабораториях, он может являться альтернативой традиционно-используемому методу ИФА для определения антител к ВКЭ в образцах сыворотки крови человека.

Замена традиционно используемых в ИФА ферментных меток на сигналообразующую серебряную метку, в перспективе позволит значительно удешевить процедуру анализа, а также упростить технологию хранения реагентов.

Личный вклад автора: состоял в обобщении, систематизации литературных данных по разработке электрохимического иммуносенсора для диагностики заболевания КЭ, а также в проведении экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методики получения электроактивных $Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$ на основе НЧ серебра с оптимизацией соотношения компонентов. Результаты просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), подтверждающие взаимодействие НЧ серебра с антителами к ВКЭ и отображающие размер, формы и морфологию синтезированных НЧ серебра и их биоконъюгатов;

2. Результаты электрохимических исследований синтезированных НЧ серебра и их биоконъюгатов на разных электродах: ИГЭ, ЗАУСЭ методом инверсионной вольтамперометрии;

3. Результаты исследования электрохимических свойства биоконъюгатов НЧ серебра на разных этапах иммобилизации ИГЭ антигеном к ВКЭ;

4. Алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$);

5. Основные метрологические характеристики разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ (специфичность, показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности);

6. Результаты апробации разработанного электрохимического иммуносенсора для анализа реальных объектов и сравнение полученных данных со стандартным методом ИФА используемого в РФ для определения специфических антител к ВКЭ.

Апробация результатов работы: Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва

«Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2017); VI International scientific conference «Theoretical and experimental chemistry» (Karaganda, 2017); 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis, IMA- 2017 (Heraklion, Greece, 2017); Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017); 1st Cross-Border Seminar on Electroanalytical Chemistry (Furth im Wald, Germany, 2018); 6th International Conference on Chemical Technology (Mikulov, Czech Republic, 2018); XIX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2018); 17th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2018) (Rhodos, Greece, 2018); 14th International Students Conference «Modern Analytical Chemistry» (Prague, Czech Republic, 2018); 7th International Symposium on Sensor Science (Napoli, Italy, 2019); XX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2019); X международной научной конференции «Современные методы в теоретической и экспериментальной электрохимии» (Плес, 2019).

Публикации: Результаты проведенных исследований отражены в 16 печатных работах, в том числе в 13 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях, в 3 статьях научных журналов, индексируемые базами Web of Science и Scopus.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.х.н., профессору Коротковой Е.И. за постановку цели и помощь при написании диссертации. Особая благодарность к.х.н, доценту Е.В. Дорожке, д.х.н., профессору И. Бареку, д.х.н. Ph.D. В. Выскочилу, д.х.н., профессору Б. Кратохвилу за ценные советы и интерес к работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта «Исследования в области фармацевтики и биоматериалов» Химико-технологического университета, Прага (грант № A2_FCNT_2019_058); гранта специальных исследований университета Химического и технологического университета, Прага (грант № A2_FCNT_2020_016); гранта РФФИ № 19-53-26001 и Чешского научного фонда (проект GACR 20-01417J).

Структура и объём работы: Научно-квалификационная работа выполнена на 128 страницах машинописного текста и включает 28 рисунков, 21 таблицу и список литературы из 113 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, обозначена цель работы, сформулированы задачи исследования, отражена научная и практическая значимость исследований.

В первой главе проведен анализ литературных данных по различным типам иммуносенсоров, которые разработаны и применены для обнаружения широкого спектра веществ. Основное внимание в главе уделено разработке электрохимических иммуносенсоров. Был проведен обзор литературы, касающейся детектирования сигналообразующих меток, используемых в электрохимических иммуносенсорах. Кроме того, представлены стратегии

получения электроактивных биоконъюгатов с метками генерирующие аналитический сигнал. Отражены перспективы применения электрохимического иммуноанализа для диагностики клещевого энцефалита.

Вторая глава посвящена описанию реактивов, оборудования, необходимых для проведения исследований по разработке электрохимического иммуносенсора. Представлена характеристика объектов исследования. Описана методика проведения экспериментальных измерений.

Третья глава посвящена получению и исследованию электроактивных биоконъюгатов. Чувствительность электрохимических иммуносенсоров напрямую зависит от синтезированных биоконъюгатов, где НЧ серебра является электрохимической меткой. Для этих целей в качестве элементов распознавания были выбраны антитела к ВКЭ и фрагменты расщепленных антител к ВКЭ, которые конъюгировали с НЧ серебра. Наночастицы серебра были получены путем химического восстановления из нитрата серебра. Размер и форма полученных НЧ были определены методом просвечивающей электронной микроскопии (средний размер $5,3 \pm 1,2$ нм). Биоконъюгаты серебряных наночастиц с антителами к ВКЭ получали методами физической адсорбции ($Ab@AgNP$) и ковалентного взаимодействия ($Ab_s@AgNP$). Спектрофотометрическим методом было подобрано оптимальное содержание антител к ВКЭ [$4,5 \text{ Ед/см}^3$] в растворе НЧ серебра [$1 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ AgNO}_3$] с средним размером коллоидной частицы $5,3 \pm 1,2$ нм. Полученные биоконъюгаты ($Ab@AgNP$, $Ab_s@AgNP$) были исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии (Рис.1).

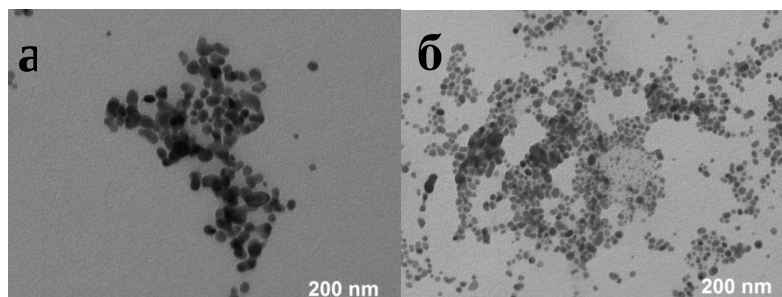


Рисунок 1 – Изображения ПЭМ биоконъюгатов (а) $Ab@AgNP$, (б) $Ab_s@AgNP$

В случае синтеза биоконъюгата $Ab@AgNP$ взаимодействие происходит путем простого смешивания двух растворов коллоидного серебра и антител к ВКЭ, без использования дополнительных химических реагентов. В случае другого биоконъюгата $Ab_s@AgNP$ дисульфидные связи селективно восстанавливались 2-меркаптоэтиламином с образованием активных сульфгидрильных групп, с которыми ковалентно связываются НЧ серебра. Следовательно, в случае расщепления дисульфидных связей антител к ВКЭ, наблюдается большее количество НЧ серебра в составе конъюгатов $Ab_s@AgNP$ по сравнению с $Ab@AgNP$ в соответствии с рисунком 1. Одной из задач работы являлась возможность использования полученных биоконъюгатов для разработки электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ (Ig G), работающего в формате твердфазного непрямого неконкурентного иммуноанализа, где НЧ серебра выступают в качестве сигналообразующих меток.

Большой интерес с научной и прикладной точек зрения в рамках настоящего исследования представлял метод обнаружения серебряной метки биоконъюгатов посредством химического растворения НЧ серебра конъюгатов в кислой среде до ионного состояния с последующей регистрацией сигнала окисления серебра методом анодной инверсионной вольтамперометрии (АИВ). Другим перспективным подходом являлся метод обнаружения серебряной метки биоконъюгатов посредством твердофазного накопления $\text{AgCl}\downarrow$ на поверхности электрода, где ионное серебро, полученное после химического растворения НЧ серебра, связывалось с хлорид ионами из водного раствора электролита, содержащем KCl . Электрохимическое определение осуществлялось методом катодной инверсионной вольтамперометрии (КИВ).

Исследование электрохимических свойств наночастиц серебра на ЗАУСЭ и ИГЭ

На первом этапе были подобраны наиболее оптимальные способы для определения НЧ серебра на электроде с обновляемой поверхностью (УСЭ), и на ИГЭ. Для увеличения электроактивной площади поверхности, УСЭ был модифицирован золотом. Процент токопроводящей составляющей на поверхности ИГЭ составляет более 70%. По этой причине ИГЭ не подвергался модификацией золотом. Хлоридсеребряные электроды использовали в качестве вспомогательного и электрода сравнения. Вольтамперограммы окисления НЧ серебра были записаны в области потенциалов от $-0,2$ В до $0,6$ В. Вольтамперограммы восстановления НЧ серебра были записаны от $0,6$ В до $-0,2$ В. Все измерения проводились со скоростью развертки 100 мВ/с, время накопления 60 с, потенциал накопления $-0,6$ В, в различных фоновых электролитах содержащих $0,01$ ммоль/дм³ НЧ серебра. Сравнительные исследования определения НЧ серебра методами КИВ и АИВ на ЗАУСЭ и ИГЭ представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Разные подходы инверсионного вольтамперометрического определения НЧ серебра с использованием ЗАУСЭ

Способ регистрации сигнала	Инверсионная стадия электродного процесса	Фоновый электролит, моль/дм ³	Значение потенциала аналитического сигнала, В	I сигнал / I шум	Ток, мкА	Дисперсия воспроизводимости сигнала $P=0,95, n=5$
КИВ	Накопление – $\text{AgCl}\downarrow$	$0,1 \text{ HNO}_3 + 0,01 \text{ KCl}$	$E_{\text{пк}}=0,10$	85	$-0,45$	0,106
АИВ	Накопление – Ag^0	$0,1 \text{ HNO}_3 + 0,5 \text{ KNO}_3$	$E_{\text{па}}=0,25$	72	0,25	0,085

Таблица 2 – Разные подходы инверсионного вольтамперометрического определения НЧ серебра с использованием ИГЭ

Способ регистрации сигнала	Инверсионная стадия электродного процесса	Фоновый электролит, моль/дм ³	Значение потенциала аналитического сигнала, В	I сигнал / I шум	Ток, мкА	Дисперсия воспроизводимости сигнала $P=0,95, n=5$
КИВ	$\text{AgCl}\downarrow$	0,1 HNO_3 + 0,01 KCl	$E_{\text{пк}}=0,10$	35	–0,03	0,106
АИВ	Ag^0	0,1 HNO_3 + 0,5 KNO_3	$E_{\text{па}}=0,30$	98	0,11	0,074

На основании данных представленных в таблицах 1 и 2, можно сделать вывод, что в случае использования ЗАУСЭ предпочтительнее является способ КИВ регистрации сигнала от НЧ серебра, где инверсионной электродной стадией является накопление фазы $\text{AgCl}\downarrow$ на поверхности электрода. В случае использования ИГЭ предпочтительнее является способ АИВ регистрации сигнала от НЧ серебра, где инверсионной электродной стадией является накопление фазы Ag^0 .

Выбор рабочих условий определения НЧ серебра на ЗАУСЭ и ИГЭ методом инверсионной вольтамперометрии

Принцип обнаружения антител к ВКЭ основан на предварительном растворении НЧ серебра в кислом растворе. Для перевода НЧ серебра в ионное серебро предложено использовать 1 моль/дм³ HNO_3 , которая входит в состав фоновых электролитов двух процессов электровосстановления $\text{AgCl}\downarrow$ и электроокисления Ag^0 . Определена концентрация хлорид ионов в ячейке – 0,01 моль/дм³ для формирования $\text{AgCl}\downarrow$ на поверхности электрода с последующим восстановлением. Съемку вольтамперограмм проводили при скорости развертки 100 мВ/с. Потенциал накопления соответствовал –0,6 В. Время накопления соответствовал 60 с. Данные условия приняты для определения, как НЧ серебра, так и биоконъюгатов в электрохимической ячейке.

Как уже было отмечено, в настоящей работе НЧ серебра, связанные с антителами к ВКЭ, сначала растворяли в HNO_3 , чтобы высвободить ионы Ag^+ , которые впоследствии определяли методом инверсионной вольтамперометрии. На рис. 2 показаны примеры интенсивностей вольтамперограмм окисления серебра на ИГЭ от концентрации НЧ серебра в растворе.

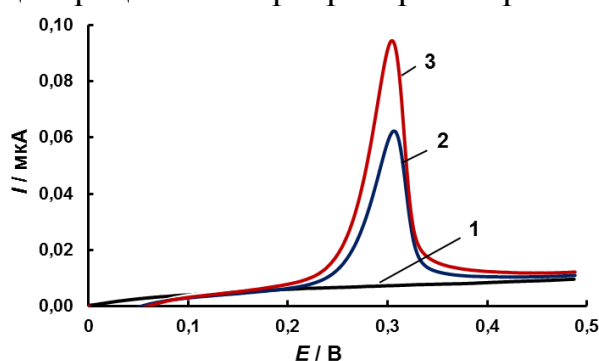
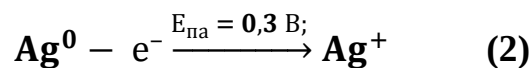
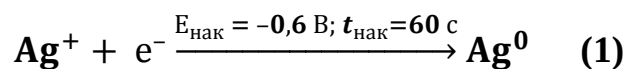


Рисунок 2 – Анодные вольтамперограммы серебра на ИГЭ в фоновом электролите (1 – 0,5 моль/дм³ KNO_3 + 0,1 моль/дм³ HNO_3); 2 – НЧ серебра (1 мкмоль/дм³); 3 – НЧ серебра (10 мкмоль/дм³) $W=0,1$ В/с, $E_{\text{нак}}=-0,6$ В, $t_{\text{нак}}=60$ с

Наночастицы серебра предварительно растворяли в 1 моль/дм³ растворе HNO₃ и вводили в электрохимическую ячейку с раствором KNO₃ (0,05 моль/дм³), регистрацию сигнала окисления Ag⁰ проводили на ИГЭ при потенциале 0,03±0,01 В (рис.19). Электродный механизм представлен уравнениями (1,2):



Другой высокочувствительный способ обнаружения НЧ серебра – КИВ, в котором инверсионная стадия включает накопление осадка или твердой фазы AgCl↓. На рисунке 3 представлены вольтамперограммы восстановления серебра из AgCl↓ на ЗАУСЭ от НЧ серебра в присутствии хлорид ионов в фоновом электролите.

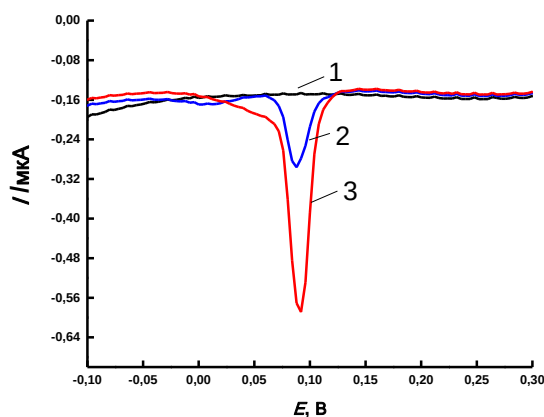
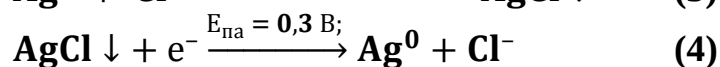
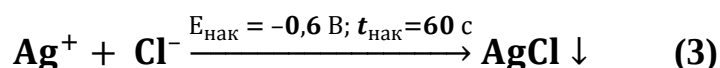


Рисунок 3 – Катодные вольтамперограммы серебра из AgCl↓ на ЗАУСЭ, 1 – фоновый электролит (0,01 моль/дм³ KCl + 0,1 моль/дм³ HNO₃); 2 – НЧ серебра (1 мкмоль/дм³); 3 – НЧ серебра (10 мкмоль/дм³), W=0,1 В/с, E_{нак} = -0,6 В, t_{нак}=60 с

НЧ серебра предварительно растворяли в 1 моль/дм³ растворе HNO₃ и вводили в электрохимическую ячейку, в которой концентрация хлорид ионов составила 0,01 моль/дм³, регистрацию сигнала вели на ЗАУСЭ. При растворении НЧ серебра в HNO₃ происходит их деградация до свободной ионной формы серебра с последующим формированием AgCl↓ на поверхности ЗАУСЭ во время стадии накопления. После этого, регистрировали аналитический сигнал восстановления серебра из AgCl↓ при +0,1 В. Электродные механизмы представлены уравнениями (3,4):



Регистрация электрохимического отклика от биоконъюгатов методами инверсионной вольтамперометрии

При подобранных рабочих условиях далее были исследованы электрохимические свойства биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$). На рис. 4 показаны катодные инверсионные вольтамперограммы восстановления $AgCl\downarrow$ от биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$).

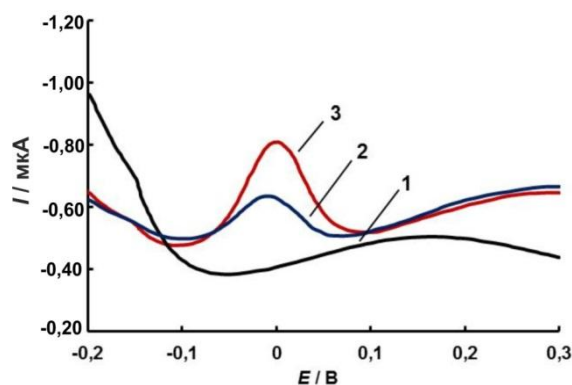


Рисунок 4 – Катодные вольтамперограммы серебра из $AgCl\downarrow$ на ЗАСУЭ от биоконъюгатов; 1 – фоновый электролит (0,01 моль/дм³ KCl + 0,1 моль/дм³ HNO₃), 2 – $Ab_s@AgHЧ$; 3 – $Ab@AgHЧ$; $C_{HЧ} = 10$ мкмоль/дм³, $W=0,1$ В/с; $E_{нак} = -0,6$ В; $t_{нак}=60$ с

На рисунке 5 показаны анодные вольтамперограммы серебра биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$) на ИГЭ. Полученные электрохимические пики биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ и $Ab_s@AgHЧ$ на ЗАСУЭ и ИГЭ в подобранных рабочих условиях можно использовать в качестве аналитических сигналов при разработке электрохимических иммуносенсоров, для определения антител к ВКЭ методами инверсионной вольтамперометрии.

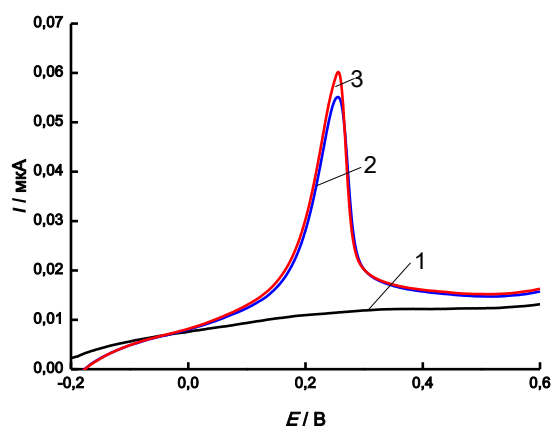


Рисунок 5 – Анодные вольтамперограммы серебра на ИГЭ от биоконъюгатов, 1 – фоновый электролит (0,5 моль/дм³ KNO₃ + 0,1 моль/дм³ HNO₃), 2 – $Ab@AgHЧ$; 3 – $Ab_s@AgHЧ$; $C_{HЧ} = 10$ мкмоль/дм³, $W=0,1$ В/с; $E_{нак} = -0,6$ В; $t_{нак}=60$ с

В четвертой главе проведены исследования возможности использования синтезированных биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$) на основе НЧ серебра в качестве электрохимических меток для определения антител к ВКЭ на

разработанном электрохимическом иммуносенсоре. Схематическое представление сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа $Ab@AgHЧ$, где электрохимическое обнаружение НЧ серебра осуществляется через труднорастворимое соединение $AgCl\downarrow$ методом КИВ на поверхности ЗАУСЭ представлено на Рис.6.

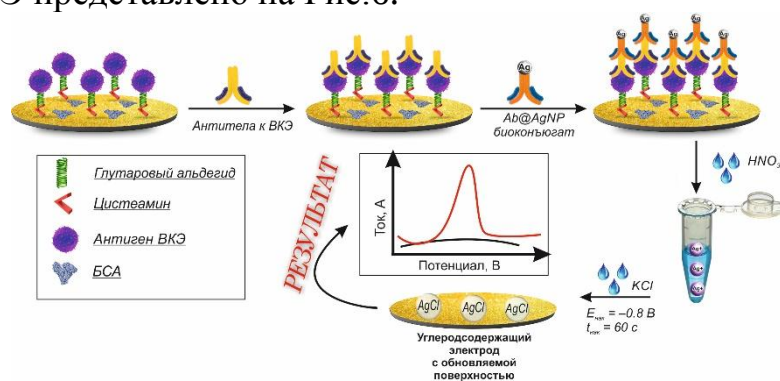


Рисунок 6 – Схематическое представление сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа $Ab@AgHЧ$

Другой вариант сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа $Ab_S@AgHЧ$ представлен на рисунке 7, где электрохимическое обнаружение НЧ серебра осуществляется методом АИВ.

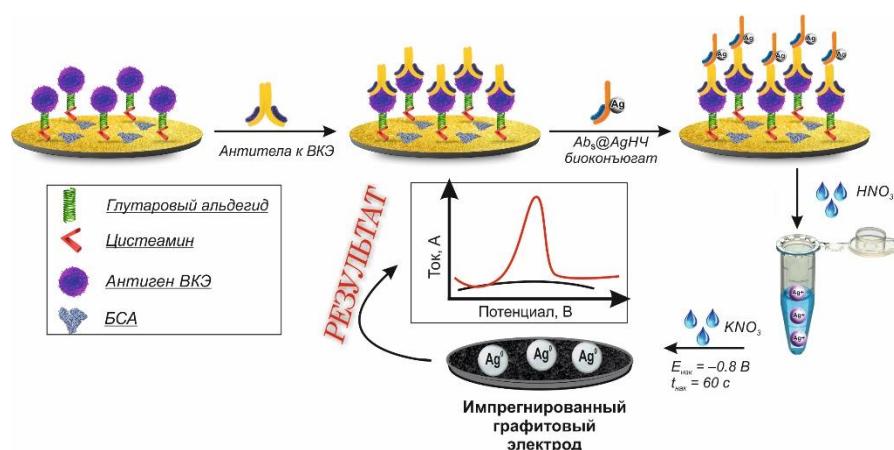


Рисунок 7 – Схематическое представление сборки электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов типа $Ab_S@AgHЧ$

В качестве контрольных экспериментов использовали опыты с антителами неспецифическими к антигену ВКЭ и холостой опыт без иммобилизованного на поверхности электрода антигена ВКЭ, вся поверхность электрода была заблокирована БСА. В четвертой главе представлена процедура иммобилизации антигена ВКЭ. Эффективность модификации поверхности электрода оценивалась методом ЦВА с использованием стандартной окислительно-восстановительной паре $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$. Уделено внимание оценке достоверности вольтамперометрического сигнала от НЧ серебра в составе биоконъюгата, на всех этапах разработки электрохимического иммуносенсора для определения ВКЭ.

Применение биоконъюгатов полученных методом физической адсорбции ($Ab@AgHЧ$) и методом ковалентного взаимодействия ($Ab_s@AgHЧ$) для определения антител к вирусу клещевого энцефалита

На этом этапе работы произведено сравнение чувствительности определения антител к ВКЭ с использованием $Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$ на разных поверхностях электродов (ЗАСУЭ, ИГЭ). Анализируемый раствор представлял собой калибровочные образцы антител к ВКЭ из коммерческого набора «ВектоВКЭ IgG» (Новосибирск, Россия) с содержанием антител к ВКЭ от 100 до 1600 Ед/см³. На рис. 8а представлены вольтамперные кривые восстановления $AgCl \downarrow$ на ЗАСУЭ в присутствии антигена ВКЭ и антител к ВКЭ от 100 до 1600 Ед/см³ с использованием биоконъюгата состава $Ab@AgHЧ$. На основании полученных данных была построена градуировочная зависимость (рис.8б), позволяющая определять антитела к ВКЭ в диапазоне концентраций от 50 до 1600 Ед/см³.

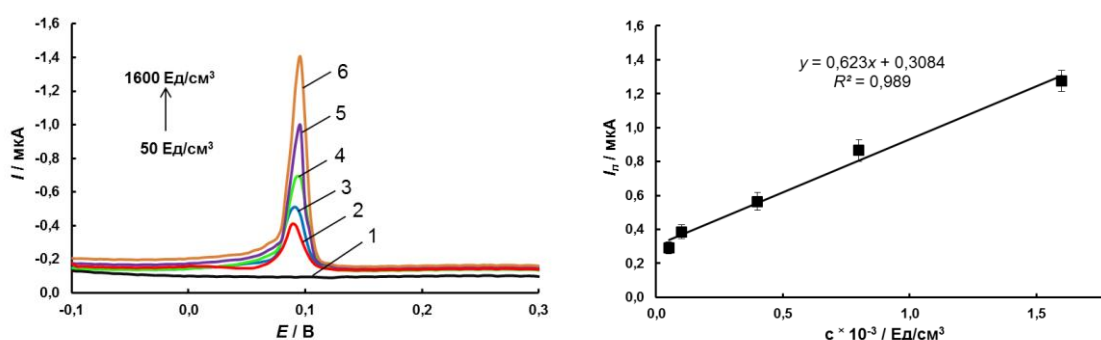


Рисунок 8 – (а) Катодные вольтамперограммы серебра $Ab@AgHЧ$ на ЗАСУЭ (1 – фоновая кривая, холостой опыт без антител к ВКЭ, 2-6 – антиген на поверхности электрохимического иммуносенсора с различной концентрацией антител (50 до 1600 Ед/см³) в фоновом электролите 0,01 моль/дм³ KCl и 0,1 моль/дм³ HNO₃, $W = 0,1$ В/с, $E_{\text{нак}} = -0,6$ В, $t_{\text{нак}} = 60$ с (б) Зависимость тока восстановления серебра биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ от концентрации антител к ВКЭ в электрохимической ячейке.

Аналогично были проведены эксперименты с использованием $Ab@AgHЧ$ методом АИВ на ИГЭ. В таблице 3 представлены результаты сравнительного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата $Ab@AgHЧ$ методами инверсионной вольтамперометрии на ЗАСУЭ и ИГЭ

Таблица 3 – Параметры градуировочных характеристик определения антител к ВКЭ методом инверсионной вольтамперометрии на ЗАСУЭ и ИГЭ с использованием биоконъюгата $Ab@AgHЧ$

Электрод	Аналитический сигнал	Уравнение регрессии	Линейный диапазон концентраций, Ед/см ³	Предел обнаружения, Ед/см ³
ЗАСУЭ	восстановление серебра из $AgCl \downarrow$	$y = 0,623x + 0,3084$ $R^2 = 0,9890$	50 – 1600	50
ИГЭ	окисление Ag^0	$y = 0,330x - 0,048$ $R^2 = 0,9775$	400 – 1600	168

На рис. 9 представлены вольтамперные кривые окисления серебра на ИГЭ в присутствии антигена ВКЭ и антител к ВКЭ в диапазоне концентраций от 100 до

1600 Ед/см³ с использованием биоконъюгата состава $Ab_s@AgHЧ$. На основании полученных данных была построена градуировочная зависимость (рис. 9б), позволяющая определять антитела к ВКЭ в диапазоне концентраций от 100 до 1600 Ед/см³.

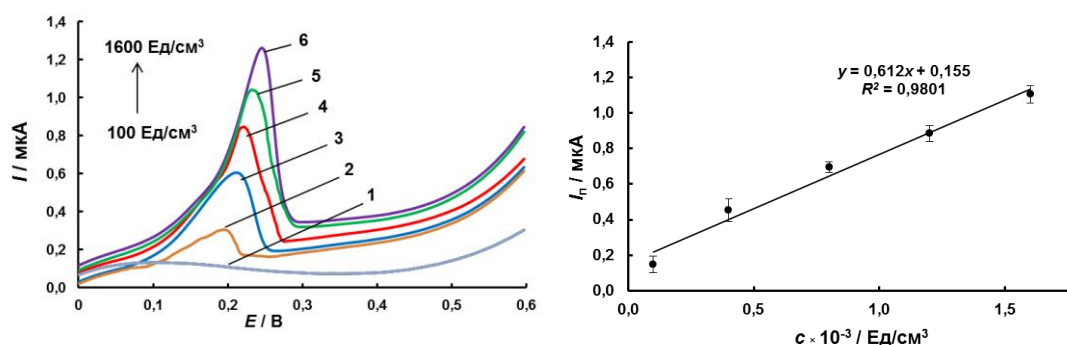


Рисунок 9 – (а) Анодные вольтамперограммы серебра биоконъюгатов $Ab_s@AgHЧ$ на ИГЭ (1 – фоновая кривая, холостой опыт без антител к ВКЭ, 2-6 – антиген на поверхности электрохимического иммуносенсора с различной концентрацией антител (100 до 1600 Ед/см³) в фоновом электролите 0,5 моль/дм³ KNO₃ и 0,1 моль/дм³ HNO₃, $W = 0.1$ В/с, $E_{нак} = -0,6$ В, $t_{нак} = 60$ с; (б) Зависимость тока окисления серебра биоконъюгатов $Ab_s@AgHЧ$ от концентрации антител к ВКЭ в электрохимической ячейке

Аналогично были проведены эксперименты с использованием $Ab_s@AgHЧ$ методом катодной инверсионной вольтамперометрии на ЗАСУЭ. В таблице 4 представлены результаты сравнительного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгата $Ab_s@AgHЧ$ методами инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ.

Таблица 4 – Параметры градуировочных характеристик определения антител к ВКЭ методом инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ с использованием биоконъюгата $Ab_s@AgHЧ$

Электрод	Аналитический сигнал	Уравнение регрессии	Линейный диапазон концентраций, Ед/см ³	Предел обнаружения, Ед/см ³
ЗАУСЭ	восстановление серебра из AgCl↓	$y = 0,498x + 0,244$ $R^2 = 0,9771$	200 – 1600	110
ИГЭ	окисление Ag ⁰	$y = 0,612x + 0,155$ $R^2 = 0,9801$	100 – 1600	90

Анализируя данные представленные в таблицах 3,4 можно сделать вывод, что полученные биоконъюгаты $Ab@AgHЧ$ и $Ab_s@AgHЧ$ были успешно применены в разработке электрохимического иммуносенсора для определения антител к ВКЭ. Для $Ab@AgHЧ$, метод КИВ с использованием ЗАУСЭ, где происходит обнаружение через труднорастворимое соединение AgCl↓, является предпочтительным, ввиду большей чувствительности проведения анализа. Вероятно, это связано с физическими свойствами УСЭ. В случае использования ЗАУСЭ поверхность электрода представляет собой нано/микроэлектродный золотой ансамбль, обладающий высокой чувствительностью регистрации аналитического сигнала серебра в режиме КИВ. Для $Ab_s@AgHЧ$ предпочтительнее использовать ИГЭ, где был достигнут меньший предел обнаружения, обнаружение происходит путем окисления серебра на поверхности

электрода. Для количественного определения антител к ВКЭ в реальных объектах возможно применение градуировочных зависимостей представленных на рисунках 86,96.

Пятая глава посвящена определению аналитических характеристик разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$.

С целью оценки правильности разрабатываемого электрохимического иммуносенсора с использованием $Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$ был проведен сравнительный анализ калибровочных образцов антител к ВКЭ из набора «ВектоВКЭ-IgG» с концентрацией 100, 400, 1600 Ед/см³ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) методами ИФА и разработанным электрохимическим методом. В таблице 5 представлены результаты сравнительного анализа.

Таблица 5 – Сравнительные результаты тестирования калибровочных образцов, содержащих антитела к ВКЭ, с помощью различных методов ($n = 10$, $P = 0.95$)

Метод	Биоконъюгат	Концентрация антител, Ед/см ³		C ₂ / C ₁ , %
		Введено (C ₁)	Найдено (C ₂)	
КИВ с использованием ЗАУСЭ	$Ab@AgHЧ$	100	123 ± 24	123
		400	412 ± 31	103
		1600	1643 ± 44	103
АИВ с использованием ИГЭ	$Ab_s@AgHЧ$	100	72 ± 32	72
		400	385 ± 31	96
		1600	1554 ± 46	97
ИФА	Антитела к ВКЭ меченные пероксидазой хрена	100	117 ± 18	117
		400	385 ± 26	96
		1600	1625 ± 35	102

Из полученных результатов видно, что полученные результаты хорошо согласуются между собой. Электрохимический подход по определению антител к ВКЭ с использованием двух биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$) совпадает с возможностями традиционного ИФА.

Также при разработке электрохимического иммуносенсора с использованием $Ab@AgHЧ$ и $Ab_s@AgHЧ$ были проведены исследования специфичности разрабатываемого метода. Для этого проводили контрольные эксперименты с антителами неспецифическими к антигену ВКЭ: калибровочный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий IgG к ВКЭ (0 Ед/см³) из набора реагентов «ВектоВКЭ-IgG» (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия); антитела моноклональные мышинные Anti- β -Actin

(MFCD00164531, Sigma-Aldrich, США). Анализ проводили по разработанной схеме: электрод с иммобилизованным антигеном ВКЭ инкубировали в растворах не содержащих антитела к ВКЭ, после электроды помещали в растворы $Ab@AgHЧ$ и $Ab_S@AgHЧ$ и проводили определение на ЗАСУЭ и ИГЭ соответственно. Кроме того, проводили холостой опыт без иммобилизованного на поверхности электрода антигена ВКЭ, вся поверхность электрода была заблокирована БСА.

В случае контрольных экспериментов, где электрохимическое определение серебра биоконъюгатов проводили по методу КИВ на ЗАСУЭ, откликов не наблюдалось, поскольку иммунокомплекс на поверхности электрода не сформировался. Однако в случае контрольных экспериментов, где электрохимическое определение серебра биоконъюгатов происходило по методу АИВ на ИГЭ наблюдался электрохимический сигнал от серебра, который не превышал 5% от максимума значения тока окисления серебра в образцах, содержащих минимальную концентрацию антител к ВКЭ (100 Ед/см³). При построении калибровочных зависимостей для определения антител к ВКЭ с использованием $Ab_S@AgHЧ$ вычитали абсолютное значение тока окисления серебра, полученного в отрицательных контрольных экспериментах, от значения тока окисления серебра полученных в положительных образцах с присутствием антигена на поверхности электрода и образцов содержащих специфические антитела к ВКЭ.

Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и $Ab@AgHЧ$, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и $Ab@AgHЧ$ ($P=0,95$, $n=10$)

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, σ_{R_L}		Показатель правильности $\pm \Delta c$		Показатель точности $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
100	4,72	4,17	4,98	4,40	17,2	15,2	23,8	21,0
400	5,26	1,27	5,55	1,33	26,3	6,3	30,9	7,4
1600	7,48	0,46	7,89	0,49	40,9	2,5	43,7	2,7

Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и $Ab_S@AgHЧ$ представлены в таблице 7.

Таблица 7 –Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для определения антител к ВКЭ (концентрации 100, 400 и 1600 Ед/см³) с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и $Ab_s@AgHЧ$, ($P=0,95$, $n=10$)

Концентрация антител к ВКЭ, Ед/см ³	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{Rл}$		Показатель правильности $\pm \Delta c$		Показатель точности $\pm \Delta$	
	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%	Ед/см ³	%
100	4,24	5,44	4,47	5,73	25,8	33,0	31,5	40,4
400	8,35	2,16	8,80	2,28	25,96	6,7	35,1	9,1
1600	10,1	0,64	10,6	0,67	41,1	2,6	46,1	2,9

В шестой главе проводили апробацию разработанного электрохимического иммуносенсора для анализа реальных объектов: лекарственный препарат иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита (НПО «Вирион», Томск, Россия) и модельный раствор сыворотки крови человека с добавками калибровочных образцов антител к ВКЭ из коммерческого набора «ВектоВКЭ IgG». Биоконъюгат $Ab@AgHЧ$ использовали для анализа лекарственного препарата иммуноглобулина человеческого против клещевого энцефалита. Альтернативный биоконъюгат $Ab_s@AgHЧ$ использовали для анализа модельного раствора сыворотки крови человека. Процедура сборки электрохимического иммуносенсора была аналогичной вышеописанной (рис. 6, 7). Пробоподготовки образцов не производилось. Для каждого эксперимента проводили построение калибровочной кривой с использованием аттестованных контрольных образцов на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащие IgG к ВКЭ, в наборе реагентов «Антитела к вирусу клещевого энцефалита» с концентрациями 100, 400, 1600 Ед/см³ (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия). Таблица 8 иллюстрирует сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в образцах.

Таблица 8 – Сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в лекарственном препарате с концентрацией антител к ВКЭ не менее 80, 160 Ед/см³, с помощью различных методов ($n=5$, $P=0,95$, $F_{кр}=6,39$, $t_{кр}=2,31$)

Метод	Заявленное содержание антител, Ед/см ³	Концентрация антител, Ед/см ³	F -критерий	t -критерий
	Введено	Найдено		
КИВ с использованием ЗАУСЭ	не менее 80	87 ± 4	1,09	0,43
ИФА	не менее 80	86 ± 4		
КИВ с использованием ЗАУСЭ	не менее 160	165 ± 4	1,37	2,26
ИФА	не менее 160	172 ± 4		

Для другого объекта исследования, содержащего антитела к ВКЭ, был выбран альтернативный биоконъюгат $Ab_s@AgHЧ$. Различные концентрации антител к ВКЭ добавляли к образцам сыворотки крови человека предварительно протестированную на отсутствие антител к ВКЭ методом ИФА. Образцы сыворотки крови разводили фосфатный буфером содержащим антитела к ВКЭ (800 и 1200 Ед/см³) в соотношении 1 объем сыворотки и 9 объемов буфера (1:10). Таблица 9 иллюстрирует сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в модельных растворах сыворотки крови человека.

Таблица 9 – Сравнительные результаты определения концентраций антител к ВКЭ в модельных растворах сыворотки крови человека, с помощью различных методов ($n=5$, $P=0,95$, $F_{кр}=6,39$, $t_{кр}=2,31$)

Метод	Концентрация антител, Ед/см ³		F– критерий	t– критерий
	Введено	Найдено		
АИВ с использованием ИГЭ	800	808 ± 19	1,13	2,65
ИФА	800	840 ± 18		
АИВ с использованием ИГЭ	1200	1223 ± 26	1,24	0,26
ИФА	1200	1219 ± 23		

Результаты исследований показали возможность применения разработанного электрохимического иммуносенсора с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$) в качестве сигналообразующих меток для определения антител к ВКЭ в модельных растворах сыворотки крови и лекарственных препаратах содержащих иммуноглобулины против КЭ. По рассчитанным F– и t – критериям можно утверждать, что различие результатов, полученных методом ИФА и электрохимическим методом статистически незначимо. В работе представлено две разработанные методики определения антител к ВКЭ в условиях инверсионной вольтамперометрии на ЗАУСЭ и ИГЭ. В качестве метода сравнения применяли наиболее распространенный метод, используемый в РФ для определения антител к ВКЭ в биологических объектах – ИФА. Результаты электрохимического иммуноанализа согласуются с результатами, полученными с использованием метода ИФА.

ВЫВОДЫ:

1) Получены НЧ (средний размер $5,3 \pm 1,2$ нм) и оптимизировано соотношение компонентов при получении биоконъюгатов. С использованием разных стратегий осуществлен процесс биоконъюгирования с НЧ серебра для создания электроактивных биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$ со специфической активностью к антителам к ВКЭ. Морфология НЧ серебра и их биоконъюгатов подтверждена методом ПЭМ;

2) Исследованы электрохимические свойства НЧ серебра и их биоконъюгатов на разных электродах: ИГЭ, ЗАУСЭ методами инверсионной вольтамперометрии;

3) Исследованы электрохимические свойства биоконъюгатов НЧ серебра на разных этапах иммобилизации антигена ВКЭ на поверхности ИГЭ;

4) Разработан алгоритм проведения электрохимического иммуноанализа для определения антител к ВКЭ с использованием биоконъюгатов ($Ab@AgHЧ$, $Ab_s@AgHЧ$) в качестве меток на широкодоступных материалах электродов. Показано, что для регистрации аналитического сигнала серебра биоконъюгатов $Ab@AgHЧ$ методом КИВ, предпочтительнее использовать ЗАУСЭ, где на его поверхности накапливается труднорастворимое соединение $AgCl\downarrow$, а для регистрации аналитического сигнала серебра биоконъюгатов $Ab_s@AgHЧ$ предпочтительнее использовать метод АИВ, где происходит окисления Ag^0 на поверхности ИГЭ;

5) Показана специфичность разработанного электрохимического иммуносенсора с контрольными образцами не содержащими антитела к ВКЭ, и рассчитаны основные метрологические характеристики разработанного электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к ВКЭ;

6) Разработанный иммуносенсор апробирован на реальных объектах (модельных растворах сыворотки крови человека и лекарственных препаратах, содержащих иммуноглобулины против КЭ). Результаты анализа совпадают с результатами, полученными традиционным ИФА методом.

Результаты исследования открывают возможности для дальнейшего развития дешевых, надежных и простых электрохимических иммунодиагностических тест – систем с использованием металлических маркёров, на примере НЧ серебра, как альтернатива ИФА с ферментными метками. Замена ферментной метки на серебряную позволит увеличить срок хранения диагностикумов и не использовать концевирующие реактивы. Использование не дорогих вольтамперометрических анализаторов и электродных материалов отечественного производства позволит снизить себестоимость иммунодиагностикумов и решить вопрос с импортозамещением.

Перспективы дальнейших исследований связаны с проведением испытаний по использованию разработанного электрохимического иммуносенсора для совместного определения антител к различным заболеваниям (КЭ, боррелиоз) с использованием разнотипных металлических меток (Ag, Au, Cu). Полученные результаты уже могут стать основой для создания электрохимической тест-системы для определения антител к ВКЭ в полуавтоматическом режиме. Таким образом, разработанный электрохимический иммуносенсор на основе НЧ серебра может быть успешно использован в лабораторно-диагностических и медицинских областях.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. **Khristunova, Y.** Preparation and Investigation of Silver Nanoparticle-Antibody Bioconjugates for Electrochemical Immunoassay of Tick-Borne Encephalitis / Y. Khristunova, E. Korotkova, B. Kratochvil, J. Barek, E. Dorozhko, V. Vyskocil, E. Plotnikov, O. Voronova, V. Sidelnikov // *Sensors*. – 2019. – Vol. 19. – №. 9. – P. 2103–2113.

2. **Христунова, Е.П.** Исследование электрохимических свойств наночастиц серебра, конъюгированных с антителами к вирусу клещевого энцефалита, для разработки электрохимического иммуносенсора / Христунова Е.П., Дорожко Е.В., Короткова Е.И., Крадохвил Б. // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. – 2020. – Т. 63. – №. 4. – С 28–33.

3. **Khristunova, E.** Electrochemical immunoassay for the detection of antibodies to tick-borne encephalitis virus by using various types of bioconjugates based on silver nanoparticles / Khristunova, E., Barek, J., Kratochvil, B., Dorozhko, E., Korotkova, E., Vyskocil, V. // *Bioelectrochemistry*. – 2020. – Vol. 135. – P. 107576–584.

4. **Христунова, Е.П.** Изучение взаимодействия бычьего сывороточного альбумина с наночастицами серебра / Е.П. Христунова, L. Miklikova, E.B. Дорожко // *Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П.Кулева*. – Томск: Изд-во ТПУ, 2017. – С. 237-238.

5. **Khristunova, Ye.P.** Obtaining and investigation silver nanoparticles and their bioconjugates with the Bovine serum albumin for the electrochemical immunoassay / Ye.P. Khristunova, E.V. Dorozhko, E.I. Korotkova, B. Kratochvil // *Theoretical and experimental chemistry: Abstracts of the VI International scientific conference*. – Karaganda, 2017. – P. 29.

6. **Khristunova, Ye.** Synthesis of the silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin and investigation of their electrochemical properties / Ye. Khristunova, E. Korotkova, J. Barek, B. Kratochvil // *Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2017): Book of Abstracts 10th International Conference*. – Heraklion: Crete University Press, 2017. – P. 288.

7. **Христунова, Е.П.** Получение наночастиц серебра, стабилизированных бычьим сывороточным альбумином и изучение их электрохимических свойств / Е.П. Христунова, Е.В. Дорожко, Е.И. Короткова // *Третий съезд аналитиков России*. – Москва: ГЕОХИ РАН, 2017. – С. 146.

8. **Khristunova, Ye.** Silver nanoparticles as labels for electrochemical immunosensors / Ye. Khristunova, J. Barek, B. Kratochvil, V. Vyskocil, E. Korotkova, E. Dorozhko // *1st Cross-Border Seminar on Electroanalytical Chemistry: Book of Abstracts*. – Furth im Wald, Germany, 2018. – P. 48.

9. **Khristunova, Ye.** Modification of the silver nanoparticles for bioanalytical applications / Ye. Khristunova, J. Barek, B. Kratochvil, V. Vyskocil, E. Korotkova, E. Dorozhko // *6. mezinárodní chemicko-technologická conference / 6th International Conference on Chemical Technology: Book of Abstracts*. – Mikulov, Czech Republic, 2018. – ISBN: 978-80-86238-77.

10. **Христунова, Е.** Модификация наночастиц серебра для биоаналитического применения / Е. Христунова, К. Галдецкая, Е. Дорожко // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П.Кулева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2018. – С. 301–302.

11. **Христунова, Е.** Получение и исследование биоконъюгатов наночастиц серебра / К. Галдецкая, Е. Христунова // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П.Кулева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2018. – С. 311–312.

12. **Khristunova, Ye.** Development of a voltametric method for detection of antibodies conjugated with silver nanoparticles / Ye. Khristunova, J. Barek, B. Kratochvil, V. Vyskocil, E. Korotkova, E. Dorozhko // 17th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2018): Book of Abstracts of 17th International Conference on Electroanalysis. – Rhodes: Publ. Rhodes Press, 2018. – P. 305.

13. **Khristunova, Ye.** Control of electrochemical signal from silver nanoparticles at different modification steps for electrochemical immunosensor development / Ye. Khristunova, J. Barek, B. Kratochvil, V. Vyskocil, E. Korotkova, E. Dorozhko // Proceedings of the 14th International Students Conference «Modern Analytical Chemistry»: Proceedings paper. – Prague, Charles University, 2020. – Vol. 14. – P. 280–284.

14. **Христунова, Е.** Подбор стабилизаторов для наночастиц серебра, применяемых в качестве меток для электрохимических сенсоров / Е. Христунова, П. Шевелёва, Е. Дорожко // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П.Кулева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2019. – С. 291–292.

15. **Khristunova, Ye.** Selection of optimal stabilizers for silver nanoparticles as labels for electrochemical sensors / **Ye. Khristunova**, E. Korotkova, E. Dorozhko // 7th International Symposium on Sensor Science: Book of Abstracts. – Napoli, 2019. – P. 147.

16. **Христунова, Е.П.** Возможности определения антител к вирусу клещевого энцефалита методом вольтамперометрии / Е.П. Христунова, Е.В. Дорожко, Е.И. Короткова // X международная научная конференция «Современные методы в теоретической и экспериментальной электрохимии»: Тезисы докладов. – Иваново: Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, 2019. – С. 54.