

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук
Центр физики наногетероструктур
Лаборатория диагностики материалов и структур твердотельной электроники

Антонов Григорий Алексеевич

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ И ЭЛЕКТРОННЫХ СВОЙСТВ
ПРОИЗВОДНЫХ ГРАФЕНА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ
БИООЛИГОМЕРАМИ

Научный доклад

Направление:
03.06.01 – физика и астрономия

Специальность:
1.3.8 – физика конденсированного состояния

Санкт-Петербург
2025

Научный руководитель:

Байдакова Марина Владимировна,
кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник лаборатории двумерных
материалов для устройств микроэлектроники ФТИ им.
А.Ф. Иоффе

Рецензент:

Рецензент:

Содержание

Актуальность работы	3
Основное содержание работы	10
1. Получение аминированного графена и биокompозитов на его основе.....	10
1.1. Синтез аминированного графена	10
1.2. Ковалентная иммобилизация антител на аминированном графене	11
1.3. Ковалентная модификация аминированного графена полиглутаминовой кислотой	12
1.4. Синтез поликапролактона	13
1.5. Получение композитных пленок на основе поликапролактона и аминированного графена, модифицированного полиглутаминовой кислотой.....	14
2. Исследование химического состава и стереохимической структуры аминированного графена и биокompозитов на его основе.....	14
2.1. Аминированный графен	14
2.2. Аминированный графен, модифицированный антителами	16
2.3. Аминированный графен, ковалентно-модифицированный олигомерами глутаминовой кислоты	23
3. Морфология аминированного графена до и после иммобилизации биомолекул	27
4. Морфология аминированного графена ковалентно-модифицированный олигомерами глутаминовой кислоты	30
5. Электронная структура и электрофизические свойства аминированного графена до и после иммобилизации биомолекул	31
Заключение.....	34
Список источников	36

Актуальность работы

За последние десятилетия наноматериалы на основе углерода привлекли значительное внимание благодаря своим уникальным физико-химическим

свойствам. Среди них графен занимает особое место как двумерный материал, обладающий высокой электропроводностью, механической прочностью, теплопроводностью и большой удельной поверхностью. Благодаря этим характеристикам графен рассматривается как перспективная основа для создания новых сенсорных и биомедицинских систем [1,2].

Несмотря на выдающиеся свойства, графен химически инертен и слабо взаимодействует с полярными молекулами, включая биомолекулы. Для расширения области его применения часто используются производные графена — такие как оксид графена (ОГ) и восстановленный оксид графена (ВОГ), — обладающие функциональными группами (гидроксильными, эпоксидными, карбоксильными), улучшающими диспергируемость в полярных растворителях и обеспечивающими химическую активность поверхности [3,4]. Помимо вышеуказанных преимуществ, ОГ формы графена могут быть получены относительно простым и масштабируемым способом из доступного исходного материала — графита, что делает их перспективными для практического применения.

Однако ОГ имеет существенный недостаток — наличие большого количества различных функциональных групп, таких как гидроксильные, эпоксидные и карбоксильные. Их хаотичное распределение затрудняет точный контроль над химическими свойствами материала и снижает его селективность, что ограничивает применение ОГ в задачах, требующих высокой специфичности поверхностного взаимодействия. В связи с этим актуальным направлением является модификация графена с селективным введением целевых функциональных групп. Особенно перспективны в биомедицинском контексте производные графена, содержащие карбоксильные и аминогруппы, так как они повышают реакционную способность, обеспечивают возможность направленного связывания с биомолекулами — белками, пептидами, нуклеиновыми кислотами.

Существует широкий спектр подходов к модификации ОГ, включая ковалентное присоединение к базальной плоскости, связанное с частичным

разрушением π -сопряжённой структуры, избирательные реакции с определёнными функциональными группами, а также не ковалентные модификации, основанные на π - π -взаимодействиях или электростатическом притяжении [5]. Одним из эффективных методов получения биосовместимого материала является восстановление ОГ с последующим ковалентным аминированием поверхности [6]. Этот подход позволяет не только ввести аминогруппы, пригодные для последующей биофункционализации, но и удалить часть остаточных кислородсодержащих групп, частично восстанавливая проводящую π -систему графенового остова.

Для биомедицинских применений особенно важна модификация графена биологически активными молекулами, полимерами и другими функциональными соединениями, способными обеспечить специфическое взаимодействие с клетками, белками или другими компонентами биологической среды. Такая модификация, известная как биофункционализация, позволяет расширить область применения графеновых материалов в медицине, биосенсорике и тканевой инженерии.

Особый интерес в области создания биосовместимых графеновых материалов представляют биоолигомеры, такие как олиго(глутаминовая кислота) и поли(ϵ -капролактон). Эти соединения обладают высокой биосовместимостью, биоразлагаемостью и наличием функциональных групп, что делает их удобными для создания композитных материалов на основе графена. Прививка таких полимеров к функционализированной поверхности графена позволяет получить структуры с регулируемой морфологией, повышенной стабильностью в водной среде и улучшенными механическими характеристиками [8]. Кроме того, такие композиты могут быть использованы в тканевой инженерии, в качестве подложек для адгезии и пролиферации клеток [9].

Отдельное направление биофункционализации связано с прививкой к графену биомолекул, способных к высокоспецифичному взаимодействию с мишенями в биологических средах — таких как антитела и аптамеры.

Поверхность графена, модифицированная аминогруппами, обеспечивает возможность надёжного ковалентного связывания этих молекул через амидную связь, образуемую в реакции с карбоксильными группами при участии активаторов (например, EDC/NHS). Такие гибридные структуры находят широкое применение в составе биосенсоров для детектирования белков, ДНК, вирусных частиц и других биомаркеров [10]. Благодаря высокой удельной поверхности графена и его высокой электропроводности, сенсорные элементы на его основе демонстрируют высокую чувствительность, короткое время отклика и хорошую воспроизводимость сигнала.

Несмотря на перспективность обозначенных направлений, сохраняются существенные нерешенные проблемы в области эффективной иммобилизации биоолигомеров и биораспознающих молекул, особенно антител, а также отсутствует четкое понимание влияния этих процессов на морфологию, электронную структуру и физические свойства графеновых слоев. Критически важными остаются вопросы изменения плотности электронных состояний в валентной зоне и зоне проводимости, работы выхода материала и механизмов транспорта носителей заряда. Для преодоления этих ограничений требуются системные исследования графеновых композитов, направленные на всесторонний анализ трансформации их физико-химических свойств на всех этапах - от модификации биомолекулами до конечного применения. Такой подход позволит не только разработать оптимальную стратегию практического использования подобных систем, но и углубить фундаментальные знания о механизмах взаимодействия двумерных материалов с биологическими молекулами и полимерами.

Объектом исследования являются производные графена, в частности оксид графена и аминированный графен (АмГ), модифицированные биоолигомерами.

Предметом исследования являются морфология, структурные и электронные свойства аминированного графена и его композитов с биоолигомерами и биомолекулами, а также их взаимодействие с биологическими объектами.

Цель исследования заключается в определении влияния ковалентно-иммобилизованных биоолигомеров на морфологию, электронную структуру и физические свойства производных графена для дальнейшей оптимизации подходов и методов получения функциональных биокompозитов, в частности для задач регенеративной медицины и биосенсорики.

Поставленная цель предполагает решение следующих задач:

- разработать способ получения АмГ и изучить его физические свойства;
- развить методику ковалентной прививки моноклональных антител к иммуноглобулинам IgG человека к поверхности АмГ;
- синтезировать композитные материалы на основе аминированного графена и биоолигомеров: олиго(глутаминовой кислоты) и поли(ϵ -капролактона);
- выполнить комплексное исследование морфологии и стереохимической структуры аминированного графена и полученных композитов на его основе, установить влияние модификации на изменение данных параметров;
- изучить влияние модификации АмГ биомолекулами на его электронную структуру и электрофизические свойства с помощью фотоэлектронных методов исследований;
- проанализировать функциональные свойства полученных биокompозитов в контексте их потенциального применения в биомедицинских устройствах и сенсорах.

Научная новизна работы состоит в том, что в ней впервые:

- разработан подход к синтезу аминированного графена с достижением концентрация аминогрупп 4,36 ат.%, и высокой степени восстановления π -сопряжённой структуры (C/O ratio =12,25);
- сформированы методики ковалентной иммобилизации антител и олиго(глутаминовой кислотой) на АмГ с получением биокompозитных материалов для практических задач;
- установлено влияние антител и биоолигомеров на нано- и микроструктур аминированного графена;
- подробно изучена электронная структура и электрофизические свойства аминированного графена и их изменение в результате модификации биомолекулами;

Апробация работы и публикации Результаты проведенных исследований были представлены на следующих конференциях: 7ая международная школа-конференция "Saint-Petersburg OPEN 2020" по Оптоэлектронике, Фотонике, Нано- и Нанобиотехнологиям, ACNS'2021 15th International Conference Advanced Carbon NanoStructures, International Conference on Low-dimensional materials: theory, modeling, experiment (LDM2021), IV Байкальский Материаловедческий Форум (БМФ 2022), Четвертая российская конференция «ГРАФЕН: МОЛЕКУЛА И 2D КРИСТАЛЛ»

Материалы научного доклада опубликованы в 2 научных статьях в рецензируемых журналах:

1. Stepanova, M. Aminated Graphene-Graft-Oligo(Glutamic Acid)/Poly(ϵ -Caprolactone) Composites: Preparation, Characterization and Biological Evaluation / M. Stepanova, O. Solomakha, M. Rabchinskii, I. Averianov, I. Gofman, Y. Nashchekina, G. Antonov, A. Smirnov, B. Ber, A. Nashchekin, E. Korzhikova-Vlakh // Polymers. – 2021. – Vol. 13. – P. 2628.
2. Rabchinskii, M. K. Graphene Amination towards Its Grafting by Antibodies for Biosensing Applications / M. K. Rabchinskii, N. A. Besedina, M. Brzhezinskaya, D. Yu. Stolyarova, S. A. Ryzhkov, S. D. Saveliev, G. A.

Antonov, M. V. Baidakova, S. I. Pavlov, D. A. Kirilenko, A. V. Shvidchenko, P. D. Chervyakova, P. N. Brunkov // *Nanomaterials*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1730.

Основное содержание работы

1. Получение аминированного графена и биокomпозитов на его основе

1.1. Синтез аминированного графена

Аминированный графен (rGO-Am) синтезировали методом жидкофазного восстановительного аминирования оксида графена с использованием модифицированной реакции Лейкарта. 200 мл 1% водной суспензии оксида графена GO помещали в тefлоновый стакан, куда добавляли 150 мл формамида. Полученную реакционную смесь нагревали при температуре 165 °C в течение 48 часов при перемешивании со скоростью 250 об/мин. По завершении реакции суспензию охлаждали до комнатной температуры, после чего полученный материал многократно промывали деионизированной водой (3 цикла) и изопропиловым спиртом (3 цикла) с использованием стеклянного фильтра с размером пор 40 мкм. В результате получали порошок rGO-Am.

Для приготовления плёнок rGO-Am на подложках и решётках для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), необходимых для дальнейшего спектроскопического и микроскопического анализа до и после иммобилизации антител, полученный порошок диспергировали в изопропанол до концентрации 0,1 мг/мл. Нанесение материала осуществляли методом напыления (spray-coating), описанным в работе [11].

Исходные плёнки восстановленного оксида графена rGO были получены методом капельного нанесения водной суспензии GO объёмом 50–200 мкл и концентрацией 0,01 мас.% на подложки из кремния. Образцы сушили при комнатной температуре ($T = 25\text{ °C}$) в течение ночи, после чего проводили отжиг сформированных плёнок при температуре 650 °C в ультравысоковакуумной камере ($P = 10^{-9}$ Торр) в течение 3 часов: 1,5 часа — на разогрев до заданной температуры и последующие 1,5 часа — на выдержку при ней.

1.2. Ковалентная иммобилизация антител на аминированном графене

Для иммобилизации моноклональных антител к иммуноглобулинам человека IgG и IgM был разработан метод ковалентного связывания на основе активации карбоксильных групп с помощью EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида).

На первом этапе готовили буфер MES (125 мМ MES, 0,9% NaCl, pH = 5,0), суспендируя 2,44 г MES и 0,964 г NaCl в 75 мл деионизированной воды, после чего добавляли 3,4 мл 10 Н NaOH и доводили объём до 100 мл деионизированной водой.

Затем готовили маточный раствор EDC, растворяя 10 мг реагента в 100 мкл свежеприготовленного буфера MES. Рабочий реакционный раствор получали путём смешивания 1 мкл маточного раствора EDC с 94 мкл буфера MES, после чего добавляли 5 мкл раствора моноклональных антител (концентрация 1 мг/мл). Смесь интенсивно перемешивали на вихревом смесителе в течение 2 минут и выдерживали 15 минут для активации карбоксильных групп антител, необходимых для последующего ковалентного связывания с функционализированными графенами.

Для проведения иммобилизации подложки с нанесёнными слоями rGO и rGO-Am помещали в чашку Петри с увлажнённой ватой для поддержания влажности. На поверхность каждого образца наносили по 50 мкл реакционного раствора при помощи дозатора, следя за тем, чтобы капля полностью покрывала исследуемую область. После этого чашку Петри герметично закрывали, и образцы выдерживали в течение 2 часов для осуществления процесса прививки антител к поверхности модифицированного графена.

По завершении реакции подложки извлекали и тщательно промывали: сначала помещали в смесь 100 мл PBS и 100 мкл детергента Tween-20, затем — в 100 мл чистого PBS. Каждую стадию промывки проводили по 30 минут,

обеспечивая полное удаление несвязанных антител. В завершение образцы сушили при комнатной температуре в течение ночи. Аминированный графен с иммобилизованными антителами далее обозначается как Am-ABd.

Для оценки влияния добавок NHS и Sulfo-NHS на эффективность иммобилизации антител был проведён аналогичный эксперимент с внесением 1 мкл раствора NHS (0,6 мг/мл) или Sulfo-NHS (1,1 мг/мл), при этом объём буфера MES уменьшали до 93 мкл.

1.3. Ковалентная модификация аминированного графена полиглутаминовой кислотой

Для проведения реакции модификации 110 мг rGO-Am были помещены в стеклянную пробирку, куда добавляли 2 мл высушенного и дистиллированного этилацетата. Полученную суспензию диспергировали с помощью ультразвукового зонда при мощности 15–20% в течение 1 минуты. Затем смесь продували аргоном в течение 3 минут для удаления растворённого кислорода. Мономер N-карбоксангидрид γ -бензилового эфира глутаминовой кислоты (Glu(OBzl) NCA) синтезировали по стандартному протоколу, описанному в литературе [12, 13]. После этого 230 мг мономера растворяли в 2 мл сухого этилацетата и также продували аргоном в течение 10 минут. Полученный раствор добавляли к дисперсии rGO-Am, после чего смесь обрабатывали ультразвуковым зондом 1–2 минуты, затем реакционный сосуд запечатывали, повторно продували аргоном в течение 10 минут и выдерживали при температуре 35 °C в течение 2 суток.

По окончании реакции к смеси добавляли 5 мл ДМФА (диметилформамида), дисперсию обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 2 минут и центрифугировали при 15 300 g в течение 15 минут. Супернатант удаляли, а осадок повторно диспергировали в свежей порции ДМФА (5 мл). Процедуру диспергирования и центрифугирования повторяли пять раз для удаления непрореагировавших компонентов. Далее полученный продукт диспергировали в 7 мл метанола, центрифугировали аналогично

предыдущим этапам, а затем осадок сушили под вакуумом при температуре 22 °С в течение 12 часов. Масса полученного продукта составила 103 мг (~30%).

Для удаления бензильных защитных групп к 50 мг rGO-Am - oligo(Glu(OBzl)) добавляли 2 мл смеси ДМСО/ТФК (диметилсульфоксид/трифторметановая кислота, 1:1 по объёму). Реакцию проводили на ледяной бане (0–5 °С) в течение 1 часа. Затем лёд удаляли, и к смеси добавляли 50 мл раствора ДМСО/ТФМСА (трифторометансульфоновая кислота) в соотношении 4:1, продолжая перемешивание ещё 1 час при комнатной температуре. После завершения реакции добавляли 6 мл ДМФА, и полученную дисперсию подвергали диализу против воды в течение 5 суток с использованием диализной мембраны с порогом отсечения 1000 кДа. Очищенный продукт замораживали и высушивали сублимацией. Выход составил 33 мг (~66%).

1.4. Синтез поликапролактона

Полимеризация ϵ -капролактона проводилась в массе при температуре 130 °С в течение 20 часов. Перед началом реакции отмеренное количество мономера помещали в шленковскую колбу и продували аргоном в течение 10 минут. Соотношение мономера к инициатору (октоат олова(II)) составляло 3600:1. По завершении синтеза полученный полимер растворяли в минимальном объёме хлороформа, после чего осаждали в холодный метанол. Выпавший осадок сушили под вакуумом (~150 Па). Выход поли(ϵ -капролактона) (ПКЛ) составил 91%.

Молекулярно-массовые характеристики полученного полимера (M_w , M_n) и дисперсность (\mathcal{D}) определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ). Вязкость ПКЛ дополнительно оценивалась по измерениям текучести растворов разной концентрации в хлороформе с использованием капиллярного вискозиметра Освальда; на основе этих данных рассчитывали предельную вязкость (η).

1.5. Получение композитных пленок на основе поликапролактона и аминированного графена, модифицированного полиглутаминовой кислотой

Чистые и композитные плёнки на основе ПКЛ изготавливались по ранее разработанной методике для ПКЛ-композитов с нанокристаллической целлюлозой [14]. Кратко, 6,5 мл 5%-ного раствора ПКЛ в хлороформе заливали в стеклянный цилиндр (внутренний диаметр 75 мм) с закреплённым на дне целлофаном. Раствор оставляли на воздухе на 12 часов для испарения хлороформа. После удаления целлофановой подложки плёнки дополнительно сушили в термостате при температуре 45 °С в течение 3 суток.

Для получения композитных образцов модифицированный или немодифицированный rGO-Am диспергировали в растворе ПКЛ в хлороформе и обрабатывали ультразвуковым зондом в течение 15–20 секунд при мощности 15–20%. Содержание наполнителя составляло 0,5 и 1,0 мас.%. Для сравнения также были изготовлены плёнки с 3 мас.% немодифицированного rGO-Am. Все остальные стадии повторяли аналогично методике получения чистых ПКЛ-плёнок.

2. Исследование химического состава и стереохимической структуры аминированного графена и биокомпозитов на его основе

2.1. Аминированный графен

На рисунке 1а представлены обзорные спектры рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) исследуемых материалов. После восстановления GO методом восстановительного аминирования интенсивность пика O 1s с энергией связи (ЭС) 532,5 эВ существенно снижается, тогда как одновременно с этим появляется остоновая линия N 1s с ЭС 400,1 эВ. Эти изменения указывают на успешное удаление кислородсодержащих групп и их частичную замену на азотсодержащие. На основе количественного анализа спектров до и после выполненной модификации установлено, что атомарная концентрация кислорода

уменьшилась почти в 10 раз — с 46,58 ат.% до 5,74 ат.%, тогда как содержание введённого азота составило 5,86 ат.%.

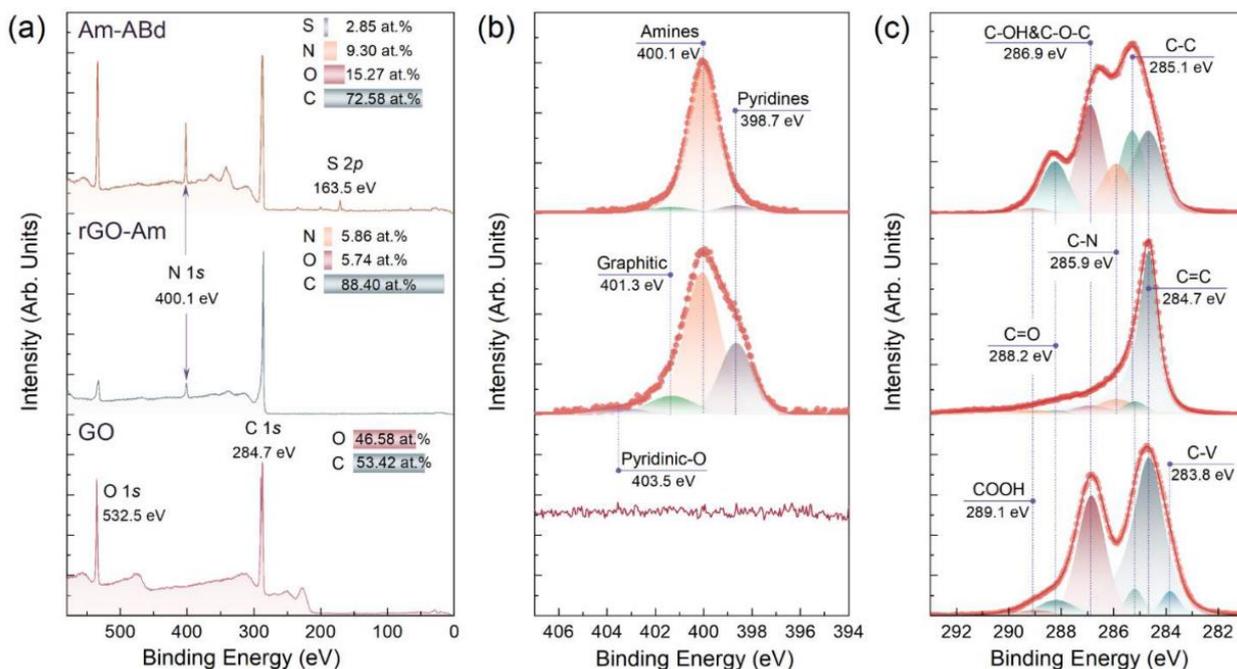


Рисунок 1 – Исследование химического состава исходного ОГ (GO), аминированного графена (rGO-Am) и аминированного графена с иммобилизованными антителами (Am-ABd) с помощью РФЭС: (a) обзорные спектры; (b) спектры высокого разрешения основной линии N 1s и (c) C 1s

Для детального анализа типа введенных азотсодержащих групп был рассмотрен спектры высокого разрешения N1s для образца rGO-Am (рисунок 1b). В результате деконволюции спектра были идентифицированы четыре пика с энергиями связи 398,7 эВ, 400,1 эВ, 401,3 эВ и 403,5 эВ, соответствующие пиридиновым циклам, аминогруппам, графитовому азоту и N-оксиду пиридина соответственно [15,16]. Относительное содержание обозначенных групп составило 17,34%, 74,47%, 5,52% и 2,67%. Таким образом, атомная концентрация аминогрупп в синтезированном rGO-Am составляет около 4,36 ат.%, что сопоставимо с наивысшими значениями, достигнутыми при прямом ковалентном функционализировании графена без использования промежуточных связующих [16-18].

С учётом полученных данных РФЭС, а также результатов анализа распределения частиц по размеру, полученных методом лазерной дифракции и

представленных на рисунке 2, была рассчитана молярная концентрация аминогрупп. Полученное значение составило около 2,57 ммоль/г.

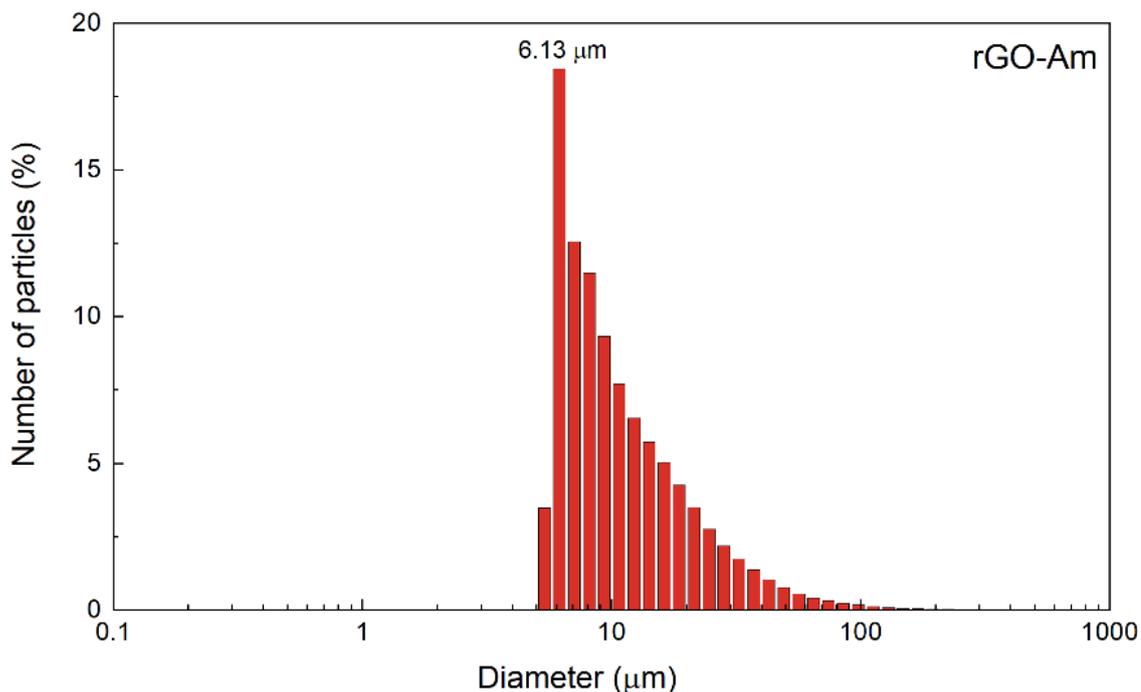


Рисунок 2 – Распределение размеров частиц rGO-Am, измеренное с помощью метода лазерной дифракции

2.2. Аминированный графен, модифицированный антителами

Переход от rGO-Am к модифицированному слою Am-ABd сопровождается заметным увеличением интенсивности основных линий O 1s и N 1s в обзорном РФЭС спектре, а также появлением пика S 2p с ЭС 163,5 эВ. Данные изменения обзорного спектра свидетельствует об успешной иммобилизации моноклональных антител [19]. Появление сигнала S 2p обусловлено присутствием атомов серы в аминокислотах, входящих в состав антител, в частности – тиольных групп, как показывают результаты деконволюции спектра S 2p в высоком разрешении (рисунок 3)

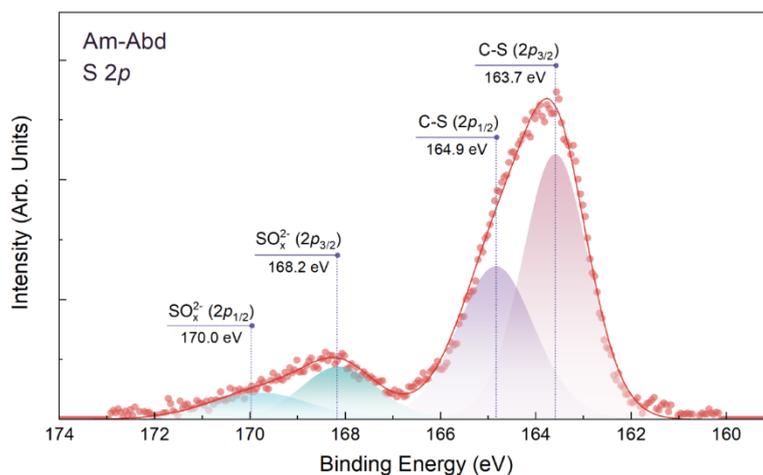


Рисунок 3 – Спектр высокого разрешения линии S 2p образца Am-ABd после процедуры деконволюции

По результатам количественного анализа относительные концентрации элементов в составе образца Am-ABd составили: C — 72,58 ат.%, O — 15,27 ат.%, N — 9,30 ат.%, S — 2,85 ат.%. Из-за неизвестной точной структуры иммобилизованных антител оценить степень их закрепления невозможно. Однако сравнительный анализ спектров Am-ABd и необработанного rGO, прошедшего ту же процедуру без аминогрупп (рисунок 4), показывает, что пики N 1s и S 2p отсутствуют, а сигнал O 2s имеет низкую интенсивность, что подтверждает полное удаление несвязанных антител при очистке и ключевую роль аминирования графена для ковалентной иммобилизации антител.

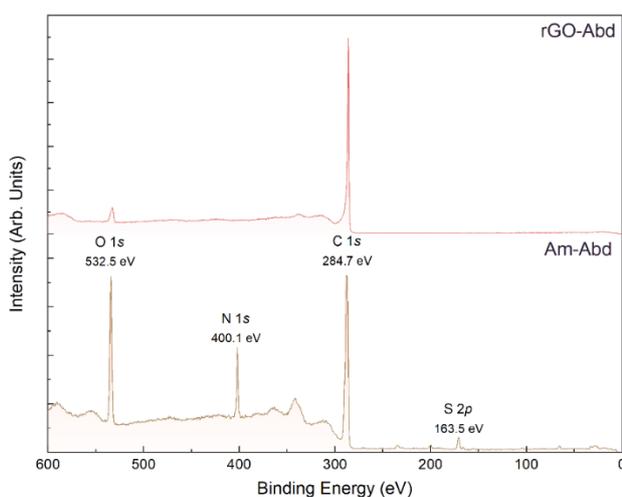


Рисунок 4 – Обзорные спектры rGO-Am и rGO после иммобилизации антител (Am-ABd и rGO-ABd соответственно), проведенные в других идентичных условиях.

Дополнительное использование активирующих агентов NHS и sulfo-NHS, часто применяемых для повышения эффективности конъюгации биомолекул [20-22], также не показало положительного эффекта. Сравнительный анализ обзорных спектров (рисунок 5), полученных при прочих идентичных условиях, но с добавлением/без добавления NHS, не выявил увеличения количества иммобилизованных антител.

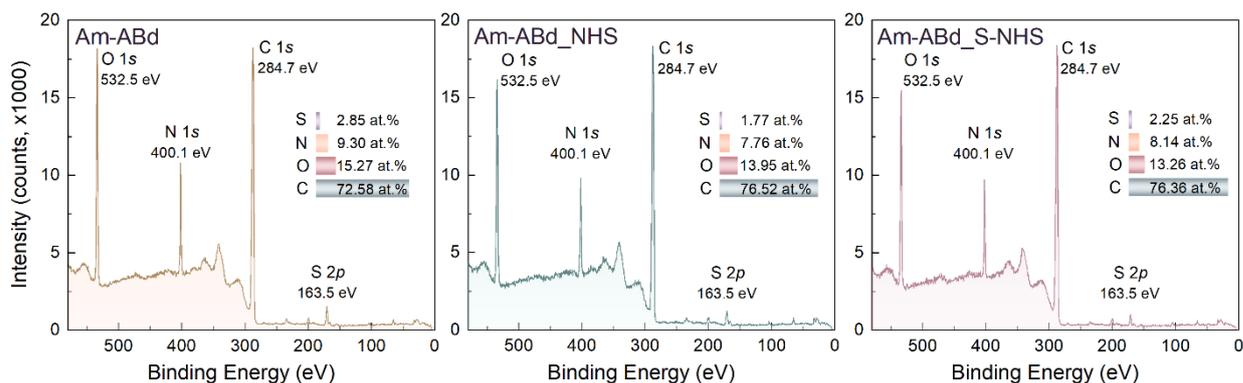


Рисунок 5 – Обзорные спектры rGO-Am, привитого антителами без (слева) и с добавлением либо NHS (в центре), либо Sulfo-NHS (справа). Вставки демонстрируют элементный состав полученных образцов, указывая на более низкую эффективность иммобилизации в случае использования как NHS, так и Sulfo-NHS.

Изменения, связанные с иммобилизацией антител, также отмечены и в спектрах высокого разрешения спектральных линий N 1s и C 1s. В случае N 1s пик, соответствующий аминам, становится преобладающим, достигая 93,41% общей интенсивности (рисунок 1b), что объясняется вкладом аминных групп из аминокислот, составляющих антитела. В спектре C 1s (рисунок 1c) после иммобилизации заметно увеличивается интенсивность пиков с ЭС 286,9 эВ, 288,2 эВ и 289,1 эВ, соответствующих группам C–OH/C–O–C, C=O и COOH соответственно [15,23,24], которые отсутствовали в rGO-Am вследствие удаления кислородсодержащих групп в процессе аминирования. Концентрации этих групп выросли с 4,23 ат.%, 0,97 ат.% и 1,48 ат.% до 24,90 ат.%, 12,70 ат.% и 1,5 ат.% соответственно, как показано в Таблице 1,

составленной на основе полуколичественного анализа РФЭС спектров C 1s после процедуры деконволюции

Таблица 1. Относительные концентрации функциональных групп в исследованных функционализированных материалах в процентах

	C-V	C=C	C-C	C-OH/ C-O-C	C=O	COOH	C-N	C/O Ratio
GO	3,97	55,34	4,23	29,70	4,95	1,81	–	2,61
rGO-Am	1,79	80,35	5,33	4,23	0,97	1,48	5,85	12,25
Am-ABd	0,00	28,50	18,95	24,90	12,70	1,50	13,45	2,46

Кроме того, наблюдается рост интенсивности пика C-N, с центром вблизи ЭС 285,9 эВ и связанный с присутствием азотсодержащих групп, увеличивается, что отражается в росте соответствующей относительной концентрации с 5,85 ат.% до 13,45 ат.%. Напротив, асимметричный пик C=C, лежащий вблизи ЭС = 284.7 эВ и соответствующий sp^2 -гибридизованным атомам углерода в сопряжённой π -системе, становится менее выраженным, являясь до этого доминирующим в спектре rGO-Am. Напротив, интенсивность пика C-C с ЭС 285.1 эВ, связанный с алифатическим углеродом в аминокислотах, усиливается [25,26].

Следует отметить, что пик C-V, располагающийся вблизи 283.9 эВ и выделяющийся в спектре исходного GO, отсутствует как в спектрах rGO-Am, так и Am-ABd. Этот спектральный сигнал возникает из-за не терминированных атомов углерода на краях вакансий, обусловленных стерическими ограничениями. Таким образом, его исчезновение после проведённой обработки указывает на то, что все атомы углерода либо функционализированы, либо включены в π -сопряжённую сеть [26].

Полученные данные РФЭС хорошо согласуются с результатами рентгеновской спектроскопии поглощения (РСП). На рисунке 6а представлены спектры поглощения вблизи К-края углерода для исследованных материалов.

Восстановительное аминирование GO привело к исчезновению ряда резонансов, обусловленных переходами электронов $C1s-\pi^*$ или $C1s-\sigma^*$ в группах C–ОН по краям, C–ОН в базальной плоскости и C=O/COOH, с максимумами при $h\nu = 286.5$ эВ, 289.8 эВ и 288.2 эВ соответственно [24,27,28].

В то же время π^* -резонанс C=C с центром вблизи $h\nu = 284.8$ эВ, связанный с переходами в связях C=C в исходных sp^2 -областях, смещается до $h\nu = 285.1$ эВ, а его отношение к σ^* -резонансу графеновой решётки (пик $C1s-\sigma^*$) увеличивается с 0.57 до 0.78. Одновременно с появлением σ^* -экситонного резонанса с энергией 291.65 эВ, данные изменения свидетельствуют о восстановлении делокализованной π -сопряжённой сети в графеновой решетке после аминирования [16,29].

В то же время последующая иммобилизация антител приводит обратно к резкому снижению интенсивности π^* -резонанса C=C, исчезновению σ^* -экситонного сигнала и одновременному увеличению π^* -резонанса C=O/COOH, что связано с введением большого количества алифатических, карбонильных и карбоксильных групп из структуры антител.

Спектры поглощения вблизи К-края азота для слоёв rGO-Am и Am-ABd, представленные на рисунке 6b, также демонстрируют усиление спектральных особенностей, связанных с функциональными группами аминокислот. Особенно заметно увеличение интенсивности π^* -резонанса аминогрупп ($N 1s-\pi^*$) с энергией $h\nu = 401.1$ эВ, изначально присутствовавшего в спектре rGO-Am, что указывает на существенное увеличение числа аминов [16].

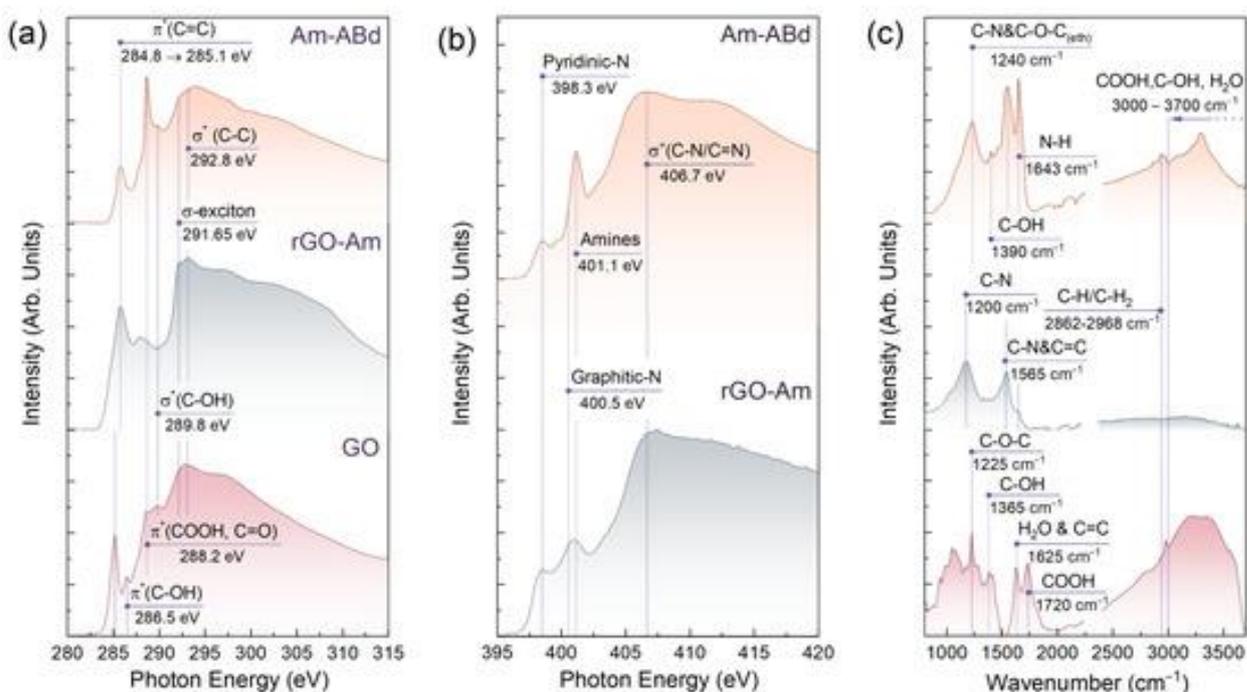


Рисунок 6 – Характеризация GO, rGO-Am и Am-ABd методами РСП и ИК-спектроскопии: (a) Спектры рентгеновского поглощения вблизи К-края углерода; (b) Спектры рентгеновского поглощения вблизи К-края азота; (c) ИК-спектры исследуемых материалов. Полосы поглощения в диапазоне 930–1080 cm^{-1} в спектре GO не обозначены. Для ясности, сигнал CO_2 в диапазоне 2220–2400 cm^{-1} удалён.

Спектры ИК-спектроскопии, представленные на рисунке 2с, окончательно подтверждают предполагаемое превращение GO в аминированный графен, а также последующую успешную иммобилизацию моноклональных антител на нем. После проведённого аминирования наблюдается исчезновение или значительное снижение интегральной интенсивности ряда полос поглощения вблизи волновых чисел $\nu = 935 \text{ cm}^{-1}$, 1040 cm^{-1} , 1225 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} и 1720 cm^{-1} , соответствующих лактольным группам, гидроксильным группам на краях, эпоксидным группам, гидроксильным группам базальной плоскости и карбоксильным группам, соответственно. Также значительно снижается интенсивность широкой спектральной особенности в диапазоне $\nu = 3000\text{--}3700 \text{ cm}^{-1}$, обусловленной наложением полос поглощения от групп C–OH, H₂O и COOH [30].

Одновременно с этим, усиливаются полосы поглощения на $\nu = 1200 \text{ см}^{-1}$, 1565 см^{-1} и 1643 см^{-1} , соответствующие изгибам C–N и деформационным колебаниям N–H, которые становятся доминирующими в спектре rGO-Am [31]. Примечательно, что полосы, соответствующие характерным модам растяжения N–H в диапазоне $3000\text{--}3350 \text{ см}^{-1}$ не наблюдаются. Предполагается, что это связано с тушением сигнала, вызванным взаимодействием колебательных мод с графеновой решеткой, что, однако, требует дополнительного изучения.

Последующая иммобилизация антител приводит к дальнейшему изменению ИК-спектра, включая усиление существующих полос, относящихся к аминогруппам, а также появление новых. В частности, пик C–N, ранее наблюдаемый на $\nu = 1200 \text{ см}^{-1}$, смещается в сторону более высоких волновых чисел из-за наложения с полосой $\nu = 1280 \text{ см}^{-1}$, обусловленной связями C=O. Также появляются новые полосы: $\nu = 1390 \text{ см}^{-1}$ (C–OH), $\nu = 2862\text{--}2968 \text{ см}^{-1}$ (C–H/C–H₂), и широкая полоса растяжения N–H при $\nu = 3298 \text{ см}^{-1}$ [31,32].

Учитывая, что эти полосы практически полностью совпадают со спектром моноклональных антител до иммобилизации (рисунок 7), такие изменения спектра rGO-Am после обработки указывают на успешное ковалентное связывание данного производного графена с антителами, что подтверждает результаты РФЭС и РСП.

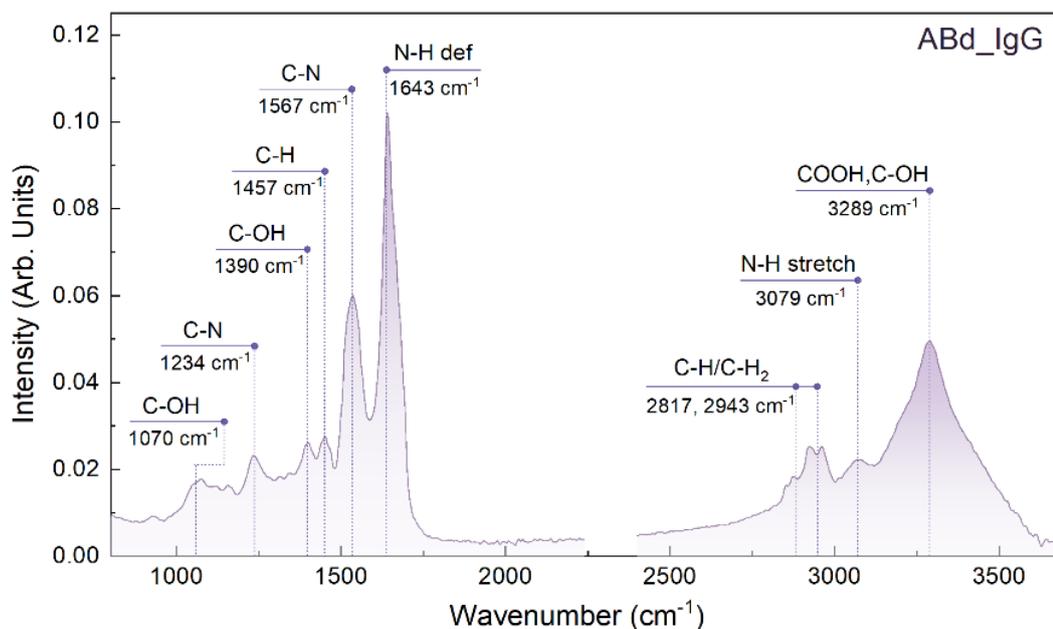


Рисунок 7 – ИК спектр моноклональных антител к иммуноглобулинам IgM человека. Для ясности, сигнал CO₂ при $\nu=2220-2400\text{ cm}^{-1}$ вырезан

2.3. Аминированный графен, ковалентно-модифицированный олигомерами глутаминовой кислоты

В случае ковалентной модификации rGO-Am олигомерами глутаминовой кислоты, иммобилизацию проводили по механизму «*grafting from*» (прививка с поверхности). Одним из распространённых методов синтеза олигомеров и полимеров аминокислот является анионная полимеризация с раскрытием цикла N-карбоксангидридов α -аминокислот (NCA), катализируемая первичными аминами [33]. В данной работе в роли иницирующих групп выступали первичные аминогруппы rGO-Am, которые инициировали полимеризацию γ -защищённого NCA глутаминовой кислоты, приводя к формированию олигомеров глутаминовой кислоты (oligo(Glu)), привитых к поверхности графена. Схема модификации rGO-Am олигомерами глутаминовой кислоты представлена на рисунке 8.

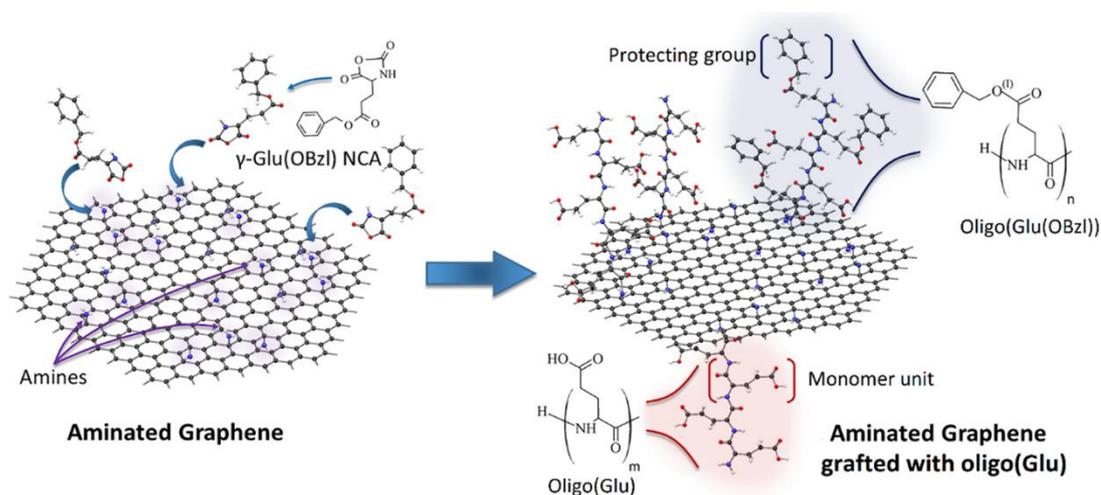


Рисунок 8 – Схема модификации rGO-Am олигомерами глутаминовой кислоты методом полимеризации с раскрытием цикла мономера Glu(OBzl) NCA

На первом этапе проводили полимеризацию Glu(OBzl) NCA (γ -бензилового эфира глутаминовой кислоты) с раскрытием цикла. Затем защитные Bzl-группы удаляли с γ -карбоксильных групп в кислой среде. Успешность прививки oligo(Glu) к rGO-Am была подтверждена методами ИК-спектроскопии и РФЭС.

По сравнению с исходным rGO-Am, а также с защищёнными и незащищёнными поли(глутаминовыми кислотами), использованными в качестве стандартов, в ИК-спектре образца rGO-Am-oligo(Glu) наблюдается усиление полос, характерных для структур PGlu. В частности, зафиксировано увеличение интенсивности полос при 1165, 1459, 1561 и 1744 cm^{-1} , соответствующих растяжению C–N, изгибу CH_2 , растяжению N–C=O (амид II) и растяжению C=O соответственно (рисунок 5).

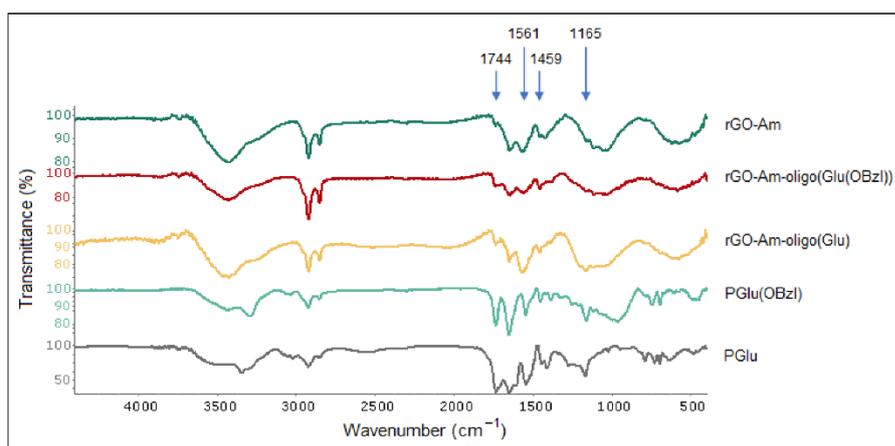


Рисунок 9 – ИК-спектры для исходного и модифицированного rGO-Am, а также для защищённой и незащищённой поли(глутаминовой кислоты), использованных в качестве стандартов

Результаты РФЭС также подтверждают успешную иммобилизацию oligo(Glu), о чём свидетельствуют изменения в обзорных спектрах (рисунок 10а). После проведения полимеризации Glu(OBzl) NCA на rGO-Am содержание азота увеличилось с 3.02 ат.% до 3.52 ат.% (в случае защищённой формы) и 3.47 ат.% (в случае де-защищённой формы). Исходя из этих данных и известной структуры oligo(Glu), было рассчитано количество привитых цепей — около 2.2×10^9 цепей на 1 г материала. Расчётная степень функционализации аминогрупп составила от 4 до 8 цепей и 6–12% от общего числа аминогрупп, что соответствует средней длине цепей oligo(Glu) от 4 до 8 звеньев.

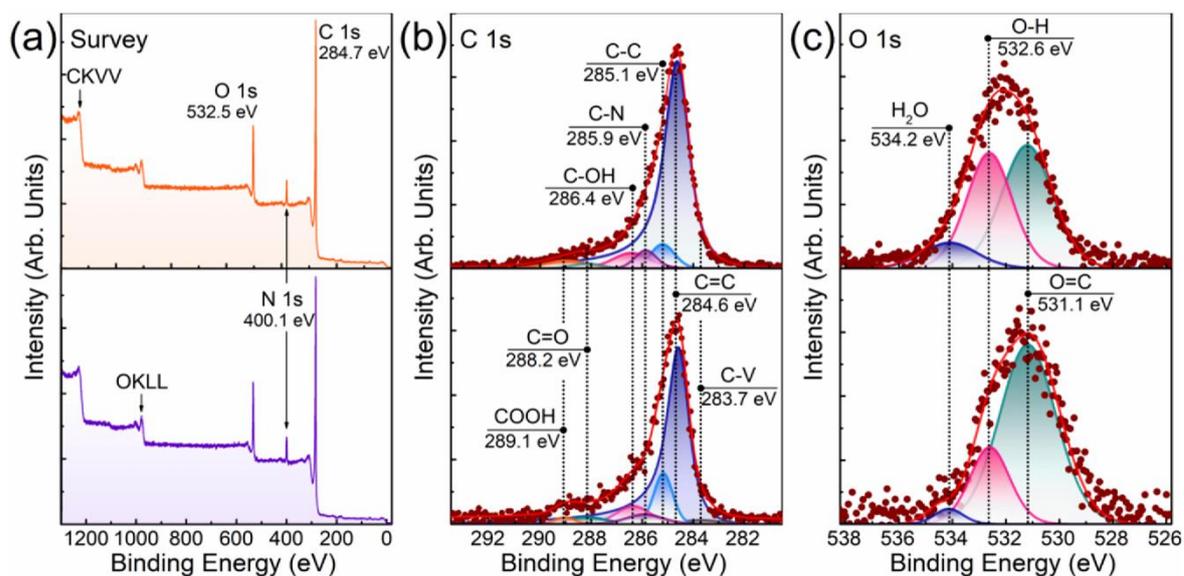


Рисунок 10 – Характеризация методом РФЭС образцов rGO-Am, модифицированных oligo(Glu) (верхний ряд) и oligo(Glu(OBzl)) (нижний ряд): (a) обзорные спектры, спектры (b) C 1s и (c) O 1s высоко разрешения

Изменения спектров C 1s (рисунок 10b) дополнительно подтверждают иммобилизацию oligo(Glu). После реакции усиливаются интенсивности пиков с ЭС 288.2 эВ и 289.1 эВ, соответствующие карбонильным и карбоксильным группами. Также появляется пик C–OH при 286.2 эВ, что может быть связано с одновременной модификацией графенового слоя при росте цепей oligo(Glu). Интенсивность пика C–C при 285.1 эВ также увеличивается — за счёт несопряжённых связей C–C в скелете oligo(Glu). Наибольший прирост интенсивности наблюдается для образца rGO-Am-oligo(Glu(OBzl)), где относительное содержание таких связей достигло 12.12 ат.% (таблица 2). Для rGO-Am-oligo(Glu) аналогичный показатель был почти вдвое ниже — 6.77 ат.%.

Также наблюдаются отличия в содержании карбоксильных и карбонильных групп: В rGO-Am-oligo(Glu(OBzl)): 1.48 и 3.39 ат.%; В rGO-Am-oligo(Glu): 2.84 и 1.65 ат.% соответственно. Это указывает на успешное удаление защитных групп не менее чем с 45% карбоксильных групп в привитых цепях oligo(Glu). Результаты анализа спектров O 1s (рисунок 10c) подтверждают данный вывод. В обоих спектрах можно выделить три пика —

пик C=O с ЭС 531.1 эВ, пик O–H с ЭС 532.5 эВ и пик H₂O с ЭС 534.2 эВ (кислород молекул воды) [34,35]. Относительное содержание O–H (гидроксильные группы карбоксилов) увеличилось с 22.39% до 40.48%, что характерно при переходе от карбонилированных к карбоксилированным структурам нанougлерода [35,36]. Одновременно возросло и содержание адсорбированной воды — с 3.19% до 10.83% — за счёт повышения гидрофильности поверхности при удалении защитных Bzl-групп. Таким образом, совместно, анализ C 1s и O 1s РФЭС спектров подтверждают как успешную прививку oligo(Glu) к поверхности rGO-Am, так и эффективное удаление защитных бензильных групп примерно с 45% карбоксильных групп.

Таблица 2. Состав функциональных групп (ат. %) и отношение C/O, рассчитанные по результатам анализа дековлюции C 1s РФЭС спектров

	C-V	C=C	C-C	C-OH/ C-O-C	C=O	COOH	C-N	C/O Ratio
rGO-Am- oligo(Glu(OBzl))	1,93	69,55	12,12	8,01	3,39	1,48	3,52	6,87
rGO-Am- oligo(Glu)	<0.1	78,79	6,77	6,48	1,65	2,84	3,47	7,38

3. Морфология аминированного графена до и после иммобилизации биомолекул

Изменения химического состава материала, происходящие при превращении оксида графена в аминированный графен и последующем связывании антител, сопровождаются также изменениями морфологии, что подтверждается данными микроскопических исследований. На рисунках 11а и 11б представлены изображения исследуемых образцов, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) при низком и высоком увеличении, соответственно. Исходный GO имеют плоскую ламеллярную структуру, однако после аминирования частицы становятся

корругированными с выраженными складками высотой до нескольких микрометров.

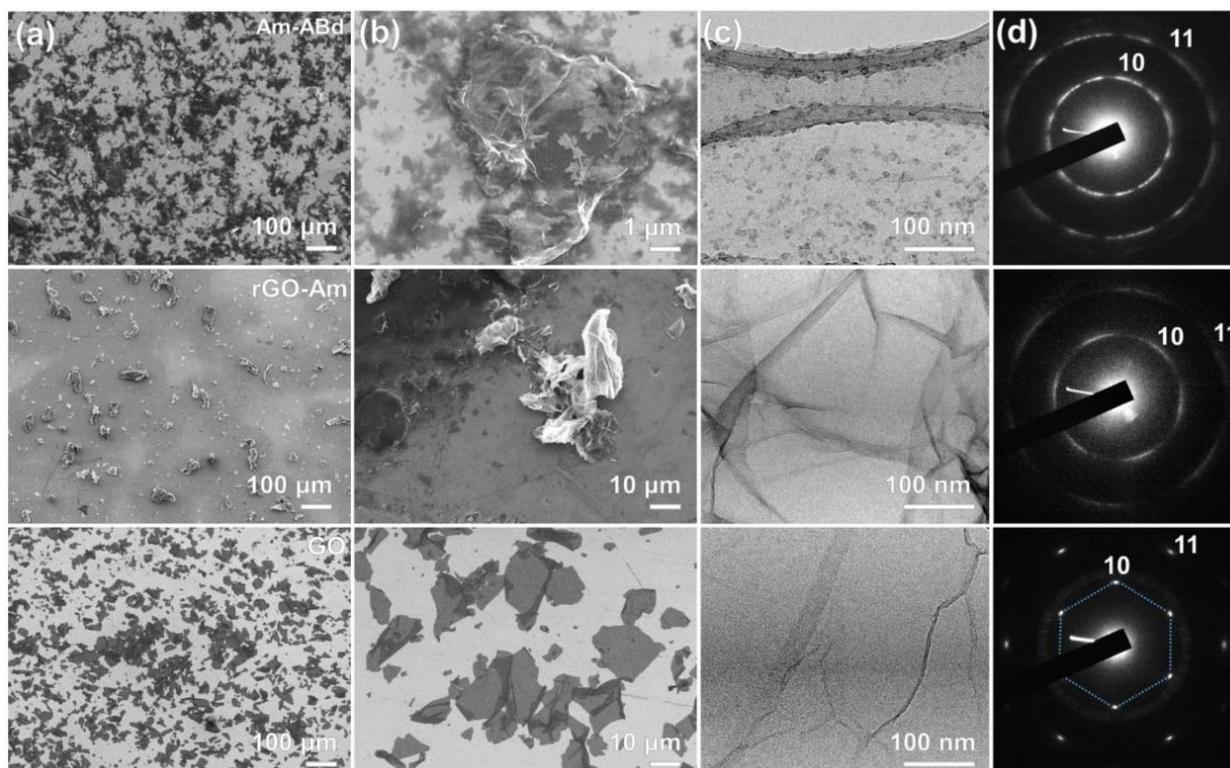


Рисунок 11 – Морфология полученных материалов: (а, б) СЭМ изображения исследуемых образцов; (с) Изображения образцов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ); (d) картины электронной дифракции (ЭД) для слоёв исходного GO (нижний ряд), rGO-Am (средний ряд) и Am-ABd (верхний ряд).

Такая интенсивная деформация графенового слоя при аминировании связана с удалением кислородсодержащих групп из базальной плоскости, перераспределением электростатических сил, выравниванием поверхности и искажением решётки графена под действием введённых аминогрупп [37,38]. Аминогруппы имеют склонность к образованию упорядоченных рядов и кластеров [39], что способствует формированию складок и компенсирует возникающее механическое напряжение, в результате чего и возникает характерная смятая структура данного производного графена.

Дополнительно возможно участие взаимодействий между аминогруппами и остаточными кислородсодержащими группами, в особенности карбоксильными, что также может способствовать сворачиванию

графеновых листов. Следует отметить, что подобная рельефная морфология наблюдается у rGO-Am независимо от используемого растворителя, типа подложки и параметров метода нанесения.

Корругированность слоев rGO-Am подтверждается также изображениями, полученными с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), представленными на рисунке 6с. Несмотря на наличие отдельных складок и в слое GO, их выраженность и масштаб значительно увеличиваются в случае rGO-Am, что видно на изображении и особенно отчётливо проявляется при сравнении картин электронной дифракции GO и rGO-Am на рисунке 11d. Для GO характерна картина ЭД, представленный одним набором из шести чётких максимумов дифракции от плоскостей (10) и (11). Однако в случае rGO-Am эти максимумы становятся размытыми, что связано с изменениями угла между электронным пучком и поверхностью графена вследствие наличия складок [40,41].

В отличие от исходного rGO-Am, его модифицированный аналог с иммобилизованными антителами демонстрирует более слоистую (ламеллярную) структуру, что подтверждается как данными СЭМ, так и ПЭМ. Такая обратная трансформация морфологии объясняется влиянием иммобилизованных антител на поверхности слоя rGO-Am. По изображениям ПЭМ расстояние между антителами составляет порядка 10–20 нм, хотя их форма не прослеживается отчётливо. Из-за плотного распределения антител значительное искажение слоя rGO-Am ограничивается стерическими эффектами. Примечательно, что несмотря на выравнивание графенового слоя, электронная дифракционная картина дополнительно трансформируется в кольцевую структуру из-за появления сигнала дифракции от алифатических углеродных цепей, содержащихся в антителах. Тем не менее, частичное восстановление ламеллярной структуры rGO-Am после прививки антител положительно сказывается на способности образовывать сплошные и однородные плёнки, что является важным фактором при создании сенсорных слоёв для биосенсорных платформ

4. Морфология аминированного графена ковалентно-модифицированный олигомерами глутаминовой кислоты

Анализ морфологии исходных и модифицированных пластинок rGO-Am не выявил выраженных изменений поверхности (рисунок 12). Все образцы демонстрируют характерную корругированную структуру с большим количеством складок и изгибов, размером до нескольких микрометров. Такая морфология приводит к снижению π - π^* межслоевого взаимодействия между пластинами rGO-Am, формируя сильно развитую поверхность и нерегулярную пористую сетчатую структуру материала. Это контрастирует с ламеллярными пластинами GO и rGO, которые обладают более гладкой поверхностью с минимальным количеством морщин и складок. Корругированная структура rGO-Am является его внутренним свойством, возникающим как из-за локального искажения графенового слоя под действием введённых аминогрупп, так и вследствие их взаимодействия с оставшимися кислородсодержащими группами, что приводит к складчатости на микромасштабе [42]. Важно отметить, что подобная морфология не зависит от типа растворителя, использованного при нанесении — будь то полярные (изопропиловый спирт) или неполярные (трихлорметан, тетрахлорметан) среды. Этот факт подтверждается и отсутствием морфологических изменений после прививки как PGlu, так и PGlu(OBzl), несмотря на модификацию смачиваемости поверхности.

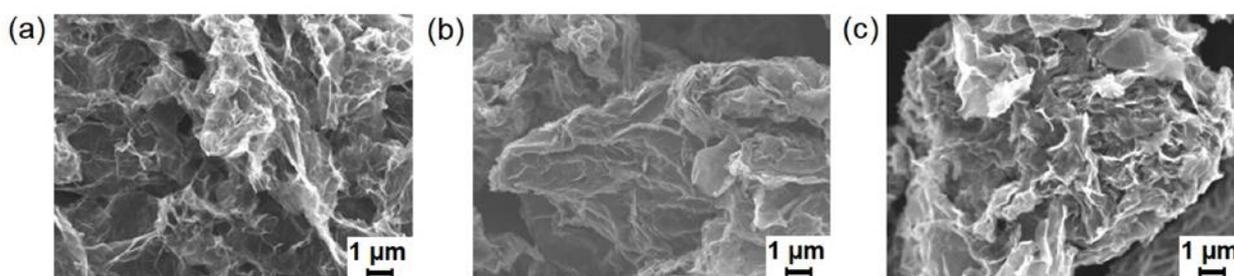


Рисунок 12. Изображения rGO-Am-пластинок на кремниевой подложке, полученные методом СЭМ ($\times 5000$): (a) исходный rGO-Am, (b) rGO-Am-oligo(Glu(OBzl)), (c) rGO-Am-oligo(Glu).

5. Электронная структура и электрофизические свойства аминированного графена до и после иммобилизации биомолекул

Для оценки влияния аминирования и прививки антител на электронную структуру графенового слоя, были проанализированы значения работы выхода и структура валентной зоны (ВЗ) полученных образцов. На рисунке 13а представлены спектры отсечки вторичных электронов, позволяющие оценить значения работы выхода, а также определить электронодонорный или электроноакцепторный характер присутствующих функциональных групп и выполненной модификации. Измеренное значение работы выхода для GO составляет 5,9 эВ, что соответствует ранее опубликованным данным для данной производной графена [43,44]. В свою очередь, проведённое аминирование приводит к смещению спектра отсечки вторичных электронов в сторону меньших кинетических энергий, а также к появлению дополнительного пика, интенсивность которого составляет 10% от основного. Значения работы выхода, соответствующие выделенным особенностям, оцениваются равными в 4,5 эВ и 4,1 эВ, соответственно. Первое значение соответствует областям с восстановленной π -сопряжённой графеновой структурой после удаления кислородсодержащих групп, тогда как второе связывают с локальными зонами высокой концентрации аминогрупп, обладающих выраженным электрон-донорным эффектом [37,44].

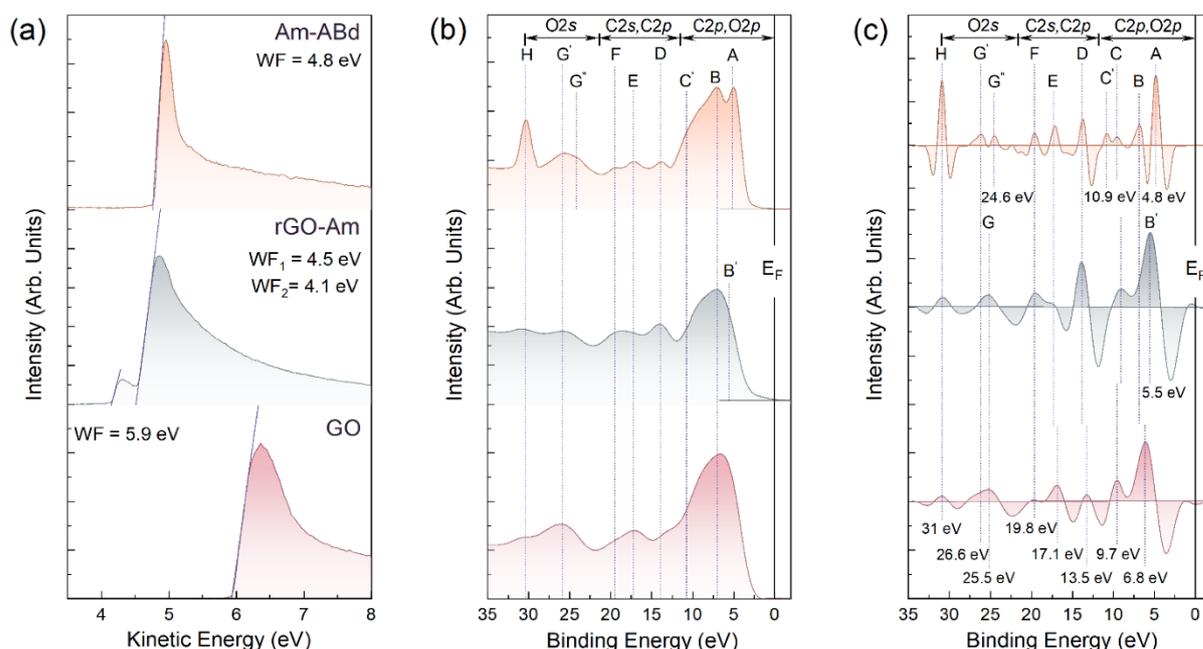


Рисунок 13 – (a) Спектры отсечки вторичных электронов (b) фотоэлектронные спектры ВЗ и (c) их вторые производные ($-d^2I/dE^2$) для исходного GO (нижний ряд), rGO-Am (средний ряд) и Am-ABd (верхний ряд)

Напротив, этот эффект исчезает после иммобилизации антител, что сопровождается небольшим смещением спектра отсечки вторичных электронов в область более высоких энергий и соответствующим увеличением значения работы выхода до 4,8 эВ, что на 0,3 эВ выше, чем у исходного rGO-Am. Это изменение дополнительно подтверждает ковалентную прививку антител, поскольку наблюдавшийся ранее электронодонорный эффект аминогрупп полностью исчезает. Повышение значения работы выхода указывает на выраженный электроакцепторный эффект антител, что также отражается в сужении спектров SE вблизи порогового уровня.

Сильное влияние аминирования и прививки антител на электронную структуру графенового слоя подтверждается результатом фотоэлектронных спектров ВЗ и их вторых производных, взятых с обратным знаком, представленных на рисунках 13b и 13c. Использование вторых производных позволяет выявить широкие и перекрывающиеся спектральные особенности и точно определить их положение, что особенно важно при исследовании

появления локализованных электронных состояний, индуцированных введёнными функциональными группами.

После аминирования плотность электронных состояний (ПЭС) в области ЭС 5–13 эВ, обусловленная как электронами $C2p$ решётки графена, так и $O2p$ из кислородсодержащих групп, уменьшается, а также исчезает полоса G вблизи ЭС 26,2 эВ, связанная с электронными состояниями орбиталей $O2s$. Появление новых полос D , E и F , соответствующих состояниям $K^+_{1}(\sigma_3)$, $K^+_{3}(\sigma_3)$, $M^+_{1u}(\sigma_2)$ и $M^+_{1g}(\sigma_1)$ в точках высокой симметрии зоны Бриллюэна графена [45-47], указывает на почти полное удаление кислородсодержащих групп, что согласуется со спектроскопическими данными. Появление ПЭС около уровня Ферми также указывает на восстановление π -сопряжённой графеновой решётки и появление полосы B' , обусловленной усиленной плотностью состояний от $2p$ - σ электронов графеновой решётки.

При этом не наблюдается появления дополнительных электронных состояний, которые можно было бы связать с аминогруппами — в отличие от ранее продемонстрированных случаев модификации карбоксильными и кетонными группами, при которых появлялись локализованные состояния, соответствующие молекулярным орбиталям (МО) [25,48,49]. В противоположность этому, в образцах аминированного графена, модифицированных антителями, подобные состояния чётко проявляются. В частности, обнаружен резкий пик A на уровне 4,8 эВ, а также менее выраженные, но различимые на спектре второй производной полосы B , C и C' на уровнях 6,8 эВ, 9,7 эВ и 10,9 эВ соответственно. Как было показано для карбонилированного графена (C -ху и C -пу) в [22] и в более ранних работах по формальдегиду и муравьиной кислоте [50,51], полосы A и B соответствуют МО, занятым неподелёнными парами электронов $O2p$ ($n'O2p$, НОМО) кетонных и карбоксильных групп соответственно. Полосы C и C' отражают локализованные состояния $\sigma(C-O)$ и $\pi(O-C-O)$ связей в этих функциональных группах. Кроме того, наблюдается истощение плотности состояний (DoS) с двумя максимумами G' и G'' на уровнях 24,6 эВ и 26,2 эВ соответственно, что

объясняется увеличением вклада электронных состояний $\sigma(\text{C}-\text{O})$, связанных с гидроксильными (G') и кетонными (G'') компонентами аминокислот. Полоса H при 31,0 эВ, преобладающая в спектрах VB образца Am-ABd, соответствует уровню Na2p, что обусловлено присутствием незначительного количества адсорбированного натрия, неизбежно оставшегося после синтеза.

Помимо появления состояний, связанных с MO, было также выявлено, что иммобилизация антител приводит к формированию запрещённой зоны шириной около 0,6–0,8 эВ. Это объясняется сильным электроноакцепторным эффектом привитых антител, что ранее уже было установлено при анализе WF. При этом, поскольку полосы D, E и F, характерные для графена, сохраняются, можно заключить, что структура графеновой решётки не искажена.

Учитывая высокую интенсивность полос A и B, отсутствует взаимодействие между кетонными и карбоксильными группами антител и графеновой поверхностью, так как при водородной связи плотность состояний, связанная с неподелёнными парами электронов $n^{\circ}\text{O}2p$, снижается. Это указывает на то, что антитела находятся в свободной (неплотно связанной) конфигурации на поверхности Am после иммобилизации, оставаясь активными для связывания с целевыми биомаркерами и одновременно оказывая выраженное влияние на транспорт заряда в графеновом слое — оба эти фактора являются преимуществом для применения слоёв Am-ABd в биосенсорике.

Заключение

В ходе выполнения настоящего научного исследования были достигнуты следующие результаты:

Разработан способ получения аминированного графена (rGO-Am) с высокой степенью восстановления и концентрацией аминогрупп до 4,36 ат.%, что обеспечивает возможность его эффективной биофункционализации.

Разработана методика ковалентной иммобилизации моноклональных антител к человеческим иммуноглобулинам на поверхность аминированного графена,

и показано, что только наличие аминогрупп обеспечивает надёжное связывание биомолекул.

Синтезированы новые композитные материалы на основе rGO-Am и биоолигомеров — олиго(глутаминовой кислоты) и поли(ϵ -капролактона), предназначенные для биомедицинских приложений.

Проведён комплексный анализ морфологии, химического состава и стереохимической структуры аминированного графена и его композитов до и после модификации биомолекулами.

Установлено, что иммобилизация антител и биоолигомеров вызывает значительные изменения в электронной структуре rGO-Am, включая сдвиг работы выхода, появление локализованных состояний и формирование запрещённой зоны, что критически важно для сенсорных применений.

Показано, что морфология графенового слоя подвержена существенным изменениям в результате аминирования и последующей биофункционализации, что влияет на способность к формированию равномерных сенсорных плёнок.

Исследовано влияние модификации на электрофизические свойства, подтверждены восстановление π -системы при аминировании и её последующее подавление при прививке биомолекул.

Полученные результаты расширяют представление о структуре и свойствах биофункционализированных производных графена и позволяют оптимизировать стратегии их применения в регенеративной медицине и биосенсорике. Разработанные подходы могут быть использованы при создании чувствительных сенсорных платформ нового поколения, обладающих высокой биосовместимостью и специфичностью к целевым биомаркерам.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- [1] Graphene and Graphene-Based Materials in Biomedical Science
- [2] Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences
- [3] Synthesis and Applications of Graphene Oxide
- [4] Ray S. C. Application and uses of graphene oxide and reduced graphene oxide //Applications of graphene and graphene-oxide based nanomaterials. – 2015. – Т. 6. – №. 8. – С. 39-55.
- [5] Yu W. et al. Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: A review //RSC advances. – 2020. – Т. 10. – №. 26. – С. 15328-15345
- [6] From graphene oxide towards aminated graphene: facile synthesis, its structure and electronic properties
- [7] Wang Y. et al. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology //Trends in biotechnology. – 2011. – Т. 29. – №. 5. – С. 205-212.
- [8] Stepanova M. et al. Aminated graphene-graft-oligo (glutamic acid)/poly (ϵ -caprolactone) composites: Preparation, characterization and biological evaluation //Polymers. – 2021. – Т. 13. – №. 16. – С. 2628.
- [9] Stepanova M. et al. Composite scaffolds based on poly (ϵ -caprolactone) and functionalized aminated graphene for bone regeneration //Emergent Materials. – 2024. – С. 1-20.
- [10] Amiri M., Nekoueian K., Saberi R. S. Graphene-family materials in electrochemical aptasensors //Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2021. – Т. 413. – С. 673-699.
- [11] Struchkov N. S. et al. Uniform graphene oxide films fabrication via spray-coating for sensing application //Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2020. – Т. 28. – №. 3. – С. 214-220.
- [12] Averianov I. V. et al. Chemical modification of nanocrystalline cellulose for improved interfacial compatibility with poly (lactic acid) //Mendeleev Communications. – 2019. – Т. 29. – №. 2. – С. 220-222.
- [13] Zashikhina N. et al. Novel formulations of C-peptide with long-acting therapeutic potential for treatment of diabetic complications //Pharmaceutics. – 2019. – Т. 11. – №. 1. – С. 27.
- [14] Stepanova M. et al. PGlu-modified nanocrystalline cellulose improves mechanical properties, biocompatibility, and mineralization of polyester-based composites //Materials. – 2019. – Т. 12. – №. 20. – С. 3435.

- [15] Stepanova M. et al. Aminated graphene-graft-oligo(glutamic acid)/poly(ϵ -caprolactone) composites: Preparation, characterization and biological evaluation // *Polymers*. 2021. Vol. 13. P. 2628.
- [16] Schultz B. J. et al. X-ray absorption spectroscopy studies of electronic structure recovery and nitrogen local structure upon thermal reduction of graphene oxide in an ammonia environment // *RSC Advances*. 2014. Vol. 4. P. 634–644.
- [17] Aguilar-Bolados H. et al. Facile and scalable one-step method for amination of graphene using Leuckart reaction // *Chemistry of Materials*. 2017. Vol. 29. P. 6698–6705.
- [18] Zhang W. et al. Preparation of amino-functionalized graphene oxide by Hoffman rearrangement and its performances on polyacrylate coating latex // *Progress in Organic Coatings*. 2016. Vol. 94. P. 9–17.
- [19] Yeo J.-S. et al. Sulfonic acid-functionalized, reduced graphene oxide as an advanced interfacial material leading to donor polymer-independent high-performance polymer solar cells // *Journal of Materials Chemistry A*. 2014. Vol. 2. P. 292–298.
- [20] Shan Y. et al. NHS-mediated QDs-peptide/protein conjugation and its application for cell labeling // *Talanta*. 2008. Vol. 75. P. 1008–1014.
- [21] Bartczak D. et al. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling // *Langmuir*. 2011. Vol. 27. P. 10119–10123.
- [22] Prasher P. et al. Emerging trends in clinical implications of bio-conjugated silver nanoparticles in drug delivery // *Colloids and Interface Science Communications*. 2020. Vol. 35. Article ID 100244.
- [23] Rabchinskii M. K. et al. Graphene oxide conversion into controllably carboxylated graphene layers via photoreduction process in the inert atmosphere // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2020. Vol. 28. P. 221–225.
- [24] Ganguly A. et al. Probing the thermal deoxygenation of graphene oxide using high-resolution in situ X-ray-based spectroscopies // *Journal of Physical Chemistry C*. 2011. Vol. 115. P. 17009–17019.
- [25] Shnitov V. V. et al. Valence band structure engineering in graphene derivatives // *Small*. 2021. Vol. 17. Article ID 2104316.
- [26] Rabchinskii M. K. et al. Modulating nitrogen species via N-doping and post annealing of graphene derivatives: XPS and XAS examination // *Carbon*. 2021. Vol. 182. P. 593–604.
- [27] Gandhiraman R. P. et al. X-ray absorption study of graphene oxide and transition metal oxide nanocomposites // *Journal of Physical Chemistry C*. 2014. Vol. 118. P. 18706–18712.

- [28] Rabchinskii M. K. et al. Manifesting epoxide and hydroxyl groups in XPS spectra and valence band of graphene derivatives // *Nanomaterials*. 2023. Vol. 13. P. 23.
- [29] Lee V. et al. Soft X-ray absorption spectroscopy studies of the electronic structure recovery of graphene oxide upon chemical defunctionalization // *Journal of Physical Chemistry C*. 2012. Vol. 116. P. 20591–20599.
- [30] Acik M. et al. The role of oxygen during thermal reduction of graphene oxide studied by infrared absorption spectroscopy // *Journal of Physical Chemistry C*. 2011. Vol. 115. P. 19761–19781.
- [31] Eda G. et al. Partially oxidized graphene as a precursor to graphene // *Journal of Materials Chemistry*. 2011. Vol. 21. P. 11217–11223.
- [32] Zabihiya O. et al. One-pot synthesis of aminated multi-walled carbon nanotube using thiolene click chemistry for improvement of epoxy nanocomposites properties // *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. P. 98692–98699.
- [33] Cheng J., Deming T. J. Synthesis of polypeptides by ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides // *Peptide-based materials*. – 2012. – C. 1-26.
- [34] Ganguly A. et al. Probing the thermal deoxygenation of graphene oxide using high-resolution in situ X-ray-based spectroscopies // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2011. – T. 115. – №. 34. – C. 17009-17019.
- [35] Rabchinskii M. K. et al. Hole-matrixed carbonylated graphene: Synthesis, properties, and highly-selective ammonia gas sensing // *Carbon*. – 2021. – T. 172. – C. 236-247.
- [36] Yu M. et al. A green method to reduce graphene oxide with carbonyl groups residual for enhanced electrochemical performance // *Carbon*. – 2018. – T. 133. – C. 101-108.
- [37] Rabchinskii M. K. et al. From graphene oxide towards aminated graphene: Facile synthesis, its structure and electronic properties // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. P. 6902.
- [38] Mkhoyan K. A. et al. Atomic and electronic structure of graphene-oxide // *Nano Letters*. 2009. Vol. 9. P. 1058–1063.
- [39] Glukhova O. E. et al. Aminated graphene nanomesh: Theoretical and experimental insights into process of decorating, topology and electron properties // *Journal of Composites Science*. 2022. Vol. 6. P. 335.
- [40] Kirilenko D. A. et al. Measuring the corrugation amplitude of suspended and supported graphene // *Physical Review B*. 2011. Vol. 84. Article ID 235417.
- [41] Shiyanova K. A. et al. Graphene oxide chemistry management via the use of $\text{KMnO}_4/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oxidizing agents // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11. P. 915.

- [42] Stepanova M. et al. Composite biomaterials based on poly (L-lactic acid) and functionalized cellulose nanocrystals // *Journal of Renewable Materials*. – 2020. – T. 8. – №. 4. – С. 383-395.
- [43] Naito K. et al. Work-function decrease of transparent conducting films composed of hydrazine-reduced graphene oxide and silver nanowire stacked layers by electrochemical treatment // *Synthetic Metals*. 2014. Vol. 195. P. 260–265.
- [44] Jiach S. et al. Work function engineering of graphene oxide via covalent functionalization for organic field-effect transistors // *Applied Surface Science*. 2017. Vol. 419. P. 252–258.
- [45] Yang C.-S. et al. Valence band of poly(sodium 4-styrenesulfonate) intercalated graphite oxide composites // *Chemical Physics Letters*. 2013. Vol. 559. P. 67–70.
- [46] Favaro M. et al. A synchrotron-based spectroscopic study of the electronic structure of N-doped HOPG and PdY/N-doped HOPG // *Surface Science*. 2016. Vol. 646. P. 132–139.
- [47] McFeely F. R. et al. X-ray photoemission studies of diamond, graphite, and glassy carbon valence bands // *Physical Review B*. 1974. Vol. 9. P. 5268–5278.
- [48] Eng A. Y. S. et al. Synthesis of carboxylated-graphenes by the Kolbe–Schmitt process // *ACS Nano*. 2017. Vol. 11. P. 1789–1797.
- [49] Rabchinskii M. K. et al. Guiding graphene derivatization for the on-chip multisensor arrays: From the synthesis to the theoretical background // *Advanced Materials Technologies*. 2022. Vol. 7. Article ID 2101250.
- [50] von Niessen W. 30.4-nm He (II) photoelectron spectra of organic molecules: Part III. Oxo-compounds (C, H, O) // *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. 1980. Vol. 21. P. 175–191.
- [51] Leach S. et al. He I photoelectron spectroscopy of four isotopologues of formic acid: HCOOH, HCOOD, DCOOH and DCOOD // *Chemical Physics*. 2003. Vol. 286. P. 15–43