

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»

Ерофеев Александр Сергеевич

Нанокapилляpные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных
клеток под действием внешних факторов

1.5.2 – Биофизика

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Научный консультант д.х.н., проф. РАН Мажуга А.Г.

Москва – 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Исследование физико-химических, биохимических и молекулярно-генетических процессов, происходящих на уровне единичных клеток, является основой фундаментального знания о работе клеточного аппарата, которое включает в себя процессы обмена веществ, роста и деления. Исследование этих процессов в клетке, как основной структурно-функциональной единице всего живого открывают перспективы к ускоренному и более эффективному процессу разработки новых методов диагностики и фармакологических препаратов, созданию сенсоров для мониторинга токсикологических загрязнений окружающей среды и исследованию поверхностей инновационных материалов.

Областью биофизики клетки является исследование динамики физико-химических и физико-химических параметров биомолекул в функционирующей клетки в норме и при патологии, которые можно использовать для объективной диагностики функционального состояния клеток и тканей организма. Известно, что такие параметры как концентрация активных форм кислорода, молекулярный кислород, pH и ионы металлов имеют одни из ключевых ролей в функциональных свойствах клетки и ее жизнедеятельности. Уровень данных параметров может меняться при различных патологиях, в том числе, онкологических и нейродегенеративных. По отклонению данных физико-химических параметров можно осуществлять диагностику патологических процессов, а также использовать в разработке новых методов терапии.

Для выживания клетки необходимо поддержание относительно стабильной нейтральной внеклеточной среды. Экстраклеточный ацидоз часто возникает при активации анаэробного гликолиза в условиях опухолевого роста и воспаления. Кислая внеклеточная среда может, например, способствовать метастазированию опухолей и регулировать воспалительные реакции. Для опухолевых клеток свойственен повышенный уровень активных форм кислорода (АФК) по сравнению с нормальными клетками из-за изменения метаболизма и нарушения внутренних регуляций окислительно-восстановительных реакций. В свою очередь, опухолевым тканям свойственна ярко выраженная область гипоксии.

При нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, в отделах мозга наблюдается окислительное повреждение, и во многих из них, по-видимому, участвует окислительный стресс. Мозг может быть особенно чувствителен к окислительному повреждению при окислительном стрессе из-за очень высокого потребления мозгом кислорода (20% от общего потребления организмом). Помимо окислительного стресса одним из ключевых факторов генезиса болезни Альцгеймера является локальное повышение ионов цинка и меди, что делает их определение важной научно-практической задачей.

Степень разработанности

Для обнаружения клеточных аналитов обычно используют ряд физико-химических методов, включающих в себя оптические, флуоресцентные, электрохимические методы, а также подходы, основанные на ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография), МРТ (магнитно-резонансная томография) и МРС (магнитно-резонансная спектроскопия). Для внутриклеточной детекции аналитов на данный момент наиболее часто используются оптические методы, которые обладают рядом недостатков: необходима дополнительная пробоподготовка, использование меток, которые могут влиять на достоверность данных, многостадийность и сложность методов детекции. Помимо этого, данные методы не позволяют устанавливать концентрационные зависимости, нет возможности определения концентрации внутри единичной клетки. Использование столь сложных методов и техник имеют повышенные требования к квалификации оператора, что делает невозможным проведение рутинных анализов.

Методы, основанные на флуоресценции, не позволяют проводить длительные измерения вследствие быстрого выгорания зонда и способны детектировать только определенные виды активных форм кислорода и азота, а измерения в тканях затруднены. В связи с этим наиболее перспективными являются электрохимические методы определения аналитов. В основе большинства электрохимических сенсоров используются белки (в том числе ферменты), которые связываются с аналитом. Также существуют неэнзимные сенсоры на основе благородных

металлах, включая Ag, Au, Pt и Pd. Тем не менее, все еще сложно разработать легко производимые нанозонды, которые были бы способны определить наличие и измерить АФК в клетках или исследовать клеточные микроструктуры, не причиняя особых повреждений или изменений клеточной активности вследствие размеров зонда.

Перспективным является создание электрохимических сенсоров на основе нанокапилляров. Благодаря нано размеру такие сенсоры не оказывают существенного воздействия на клетку и ткани. Таким образом, метод не вносит дополнительных факторов на достоверность измерений в исследуемой системе. Наноразмерная электрохимически активная рабочая поверхность позволят осуществлять малоинвазивные измерения с высоким пространственным и временным разрешением внутри живых единичных клеток, 3D моделей опухоли – сфероидов, а также проводить измерения внутри лабораторных животных *in vivo*.

В работе продемонстрирована возможность использования сенсоров на основе нанокапилляров для определения кинетики формирования внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), градиента кислорода и профиля локальных значений pH, детекция ионов меди и платины в единичных клетках и тканях. Разработан универсальный подход определения биофизических параметров клетки, позволяющий с использованием нанокапиллярных сенсоров проводить дифференцирование клеток и структур на их основе в нормальных и патологических состояниях.

По изменению биофизических параметров клеток с помощью разработанных новых подходов будет определяться эффективность инновационных терапевтических и диагностических препаратов. Будет продемонстрирована возможность коррелятивных исследований их распределения внутри здоровых и патологических тканей в зависимости от внутренних градиентов гипоксии и окисленных областей.

Цели и задачи работы

Целью данной работы заключается в разработке методов локального исследования биофизических процессов на единичных клетках и биологических моделях *in vivo* с помощью нанокапиллярных сенсоров для выявления физико-химических параметров, которые можно использовать для объективной диагностики функционального состояния клеток и тканей организма, формирования принципиально новых подходов для определения эффективности инновационных препаратов.

Поставленная цель требует выполнения следующих логически связанных задач:

1) Разработка новых методов и подходов для проведения динамических малоинвазивных исследований физико-химических параметров единичных клеток на основе нанокапиллярных сенсоров. Проведение математической оценки аналитических характеристик разрабатываемых методов и нанокапиллярных сенсоров, оценка перспективности их применения для исследования биофизических параметров клетки.

2) Разработка и валидация метода и нанокапиллярного сенсора для 3D-pH-картирования с нанометровым пространственным разрешением для *in vitro* и *in vivo* систем на основе универсальной платформы для исследований физико-химических параметров единичных клеток.

3) Разработка методики изготовления платинизированных дисковых углеродных наноэлектродов на основе нанокапилляров. Разработка метода для локального количественного определения АФК и молекулярного кислорода в режиме реального времени на уровне единичных клеток, тканей и животных с помощью платинизированных наноэлектродов. Определение кинетики генерации АФК в единичных клетках и на различных глубинах опухолей живых мышей под действием терапевтических препаратов, ФДТ и аттрактантов в режиме реального времени. Исследование градиентов кислорода вблизи клеток растений, сфероидов, в нейрональных тканях и мозге мыши. Проведение сравнительной математической оценки распределения градиентов потребления кислорода с полученными экспериментальными данными.

4) Разработка метода количественной локальной электрохимической детекции платиносодержащих противоопухолевых препаратов с помощью дисковых наноэлектродов с пределом обнаружения 1 мкМ. Проведение сравнительного анализа накопления и распределения цисплатина и его современных аналогов в единичных клетках, 3D сфероидах и опухолях мыши *in vivo* прижизненно.

5) Разработка метода для количественной локальной электрохимической детекции медьсодержащих препаратов с помощью золотых модифицированных нанoeлектродов с пределом обнаружения 0,1 мкМ. Проведение сравнительного анализа накопления и распределения инновационных медьсодержащих препаратов и их эффективность генерации АФК в единичных клетках, 3D сфероидов и опухолях мыши.

Научная новизна

Были разработаны новые подходы для исследования биофизических параметров единичных клеток, что позволяет получать фундаментальные знания отклика биологических систем на нано- и субмикронном уровне с высоким временным разрешением. Впервые разработана система локального измерения концентрации молекулярного кислорода, АФК, ионов металлов и уровня pH внутри и вблизи поверхности живых клеток в режиме реального времени на основе методов определения ионного и фарадеевского тока, проходящего через нанокapиллярные сенсоры с нанометровым пространственным разрешением. Разработанная система для исследования биофизических процессов в клетке имеет улучшенные параметры для измерения в живых системах по сравнению с существующими, в том числе, малоинвазивность и возможность локальных измерений с нанометровым пространственным разрешением, высокая скорость отклика, количественный анализ аналитов.

Впервые были разработаны и созданы pH-чувствительные нанозонды на основе наномембран, состоящих из разноименно заряженных биополимеров. Данный универсальный подход позволил достичь высокого пространственного разрешения pH картирования поверхности клеток (50 нм), быстрого времени отклика (около 2мс) и высокой чувствительности (0,01 pH). Представленный в работе метод 3D pH-картирования выступает в качестве инструмента для диагностики онкологических патологий, прогнозирования и оценки эффективности терапии, направленной на снижение кислотности pH.

Впервые разработан способ изготовления наноразмерных платиновых дисковых электродов для локального определения АФК и молекулярного кислорода. Продемонстрирована уникальная возможность исследования образования АФК под действием терапевтических препаратов и внешних раздражителей на уровне единичных клеток, а также в ходе малоинвазивных исследований на *in vivo* моделях. Впервые предложенный подход позволил контролировать продукцию АФК методом электрохимического измерения в режиме реального времени до и в процессе облучения при фотодинамической терапии, что невозможно при использовании традиционных флуоресцентных методов. Предложенный метод может быть использован для оценки эффективности противоопухолевой терапии, исследования доставки и накоплений химиотерапевтических средств, а также изучения механизмов действия препаратов, воздействующих на пути, связанные с АФК.

Впервые разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции медьсодержащих препаратов с помощью золотых модифицированных нанoeлектродов с пределом обнаружения 0,1 мкМ. Разработанный метод открыл возможность осуществлять таргетный сравнительный анализ накопления и распределения инновационных медных препаратов и их эффективность генерации в единичных клетках, 3D-сфероидов и опухолях мыши. Таким образом, была продемонстрирована возможность создания широкого спектра сенсоров на базе наноразмерных капиллярных сенсоров за счет использования специфических окислительно-восстановительных потенциалов и селективных лигандов. Полученные результаты открывают широкие перспективы для дальнейшей разработки темы.

Практическая значимость работы

Представленные научные достижения легли в основу функционала уникальной научной установки «Сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем» (рег. номер 2512530), в частности, в следующие методики, представленные на официальном сайте МИСИС (<https://misis.ru/university/struktura-universiteta/lab/105/equipment/>):

- 1) «Методика картирования поверхности электрохимически активного материала»;
- 2) «Методика обнаружения биологических аналитов внутри живых организмов».

Данные методики востребованы у таких научно-исследовательских научных учреждений как:

1. «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Договор на НИР №81-23-ЕП/Н-240-2-2023-2026 от «24» августа 2023;
2. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Договор на НИР №1539-223-2023 от «30» октября 2023;
3. ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, Договор на НИР №439/223/439 от «19» сентября 2023.

Научные достижения, полученные в рамках данной диссертационной работы «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов» легли в основу новых нанобиотехнологических подходов для исследования механизмов возникновения и регуляции дисфункций мозга, в т.ч. нейродегенеративных заболеваний с использованием уникальной научной установки "Сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем» в рамках федерального проекта «Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов по приоритетным исследовательским направлениям национального проекта «Наука и университеты» № 075-15-2022-264 от 12.04.2022 г.. Данные подходы вызвали особый интерес таких организаций как ИМБ РАН им. В.А. Энгельгардта, РНИМУ им. Н.Н. Пирогова, НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского. Разработанные нанобиотехнологические подходы позволяют вывести понимание механизмов нейродегенеративных заболеваний на новый уровень. Ранняя диагностика дисфункций мозга позволит в дальнейшем предпринять меры для уменьшения прогрессирования нейродегенеративных заболеваний.

Основной результат диссертационного исследования заключается в разработке уникального инструмента для изучения эффективности и механизма действия различных препаратов. Подбор перспективных кандидатов лекарственных препаратов для проведения клинических испытаний позволит создавать новые эффективные химиотерапевтические агенты. Результаты научных исследований, описанные в данной работе, нашли практический интерес у таких предприятий, как ООО ИКАППИК, ООО «МНТ», ООО «Изварино-Фарма» и ООО «Дермавитал групп». Разработанные наносенсоры и методы исследования метаболитов единичных клеток активно применяются в различных доклинических испытаниях. Универсальность и эффективность предлагаемых методов были продемонстрированы в рамках совместных работ с Изварино-Фарма, успешно проведены работы в рамках доклинических испытаний таргетных противоопухолевых препаратов, совместно с ООО «МНТ» были проведены работы в рамках доклинических испытаний препаратов, применяемых для магнитной гипертермии опухолей, а также противовоспалительного препарата, применяемого при увеите. Разработанные сенсоры для определения АФК применялись для исследования токсичности противогрибковых инновационных препаратов, разработанных ООО ««Дермавитал Групп».

Практическую значимость подтверждает акт внедрения и применения компаниями:

- ООО «МНТ»: Акт о применении результатов диссертационной работы «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов» для проведения доклинических испытаний;

- ООО «ИКАППИК»: Акт о применении рН чувствительных зондов, описанных в диссертационной работе «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов»;

- ООО «Дермавитал Групп»: Акт о применении результатов диссертационной работы «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов» для исследования токсичности противогрибковых препаратов.

Методология и методы исследования

В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: изготовление нанокапилляров, контролируемого размера с помощью лазерного пуллера; термическая декомпозиция углерода внутри кварцевых нанокапилляров, методы электрохимического травления и осаждения металлов; методы химической и физической модификации поверхностей стеклянных нанокапилляров и золотых наноэлектродов; различные виды микроскопии (сканирующая ион-проводящая микроскопия, растровая электронная микроскопия с различными приставками, в том числе для EDX анализа и FIB, оптическая микроскопия, в том числе

флуоресцентная); различные виды снятия вольтамперных характеристик (хроноамперометрия, циклическая вольтамперометрия, потенциометрический анализ).

Положения, выносимые на защиту

1) Разработана универсальная платформа для определения внутри- и внеклеточных концентрации молекулярного кислорода, АФК, ионов металлов и уровня pH на основе методов определения ионного и фарадеевского тока проходящего через нанокапиллярные сенсоры. Платформа позволяет осуществлять локальные измерения с нанометровым пространственным разрешением в режиме реального времени. Математическая оценка показала, что у разработанных нанокапиллярных сенсоров время релаксации τ_{RC} не превышает 10 нс, а время достижения системой предельного диффузионного тока не превышает 1 мс, что в 10^6 лучше соответствующих характеристик существующих микро- и макросенсоров.

2) Разработан метод для 3D-картирования pH с нанометровым пространственным разрешением для живых *in vitro* и *in vivo* систем на основе нанокапилляра с цвиттер-ионной мембраной, основанный на явлении выпрямления тока. pH-чувствительный сенсор обладает следующими характеристиками: пространственное разрешение не более 50 нм, скорость отклика не более 2 мс, точность измерения не более 0,01 pH. 3D-pH-внеклеточное картирование меланомы A375M выявило неоднородный pH-градиент по сравнению со здоровыми меланоцитами. Было получен профиль градиента pH внутри опухоли 4T1 мыши *in vivo* прижизненно.

3) Разработан метод для локального количественного определения АФК и молекулярного кислорода в режиме реального времени на уровне единичных клеток, тканей и животных с помощью нанокапиллярных электрохимических сенсоров на основе платинизированного углерода. Установлена кинетика генерации АФК в единичных клетках и на различных глубинах опухолей мышей *in vivo* прижизненно под действием терапевтических препаратов, ФДТ и аттрактантов в режиме реального времени. Определено распределение кислорода вблизи модельных клеток (растений), клеток млекопитающих сфероидов, в нейрональных тканях и мозге мыши. Определена кинетика количественного изменения концентрации кислорода в мозге крысы в норме и в условиях модели ишемии.

4) Разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции платиносодержащих препаратов с помощью дисковых наноэлектродов с пределом обнаружения 1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения цисплатина и его современных аналогов в единичных клетках, 3D-сфероидов и опухолях мыши. На примере 3D-сфероидов (MCF-7) продемонстрирована возможность локального определения зон с повышенной и пониженной (гипоксия) концентрацией кислорода. Определена прямая корреляция между распределением метронидазолсодержащего производного цисплатина и областью гипоксии в 3D-сфероидов. Обнаружено одновременное высвобождение цисплатина и генерация АФК за счет фотоактивации пролекарства Pt(IV) (Рибоплатина) внутри опухолевых сфероидов.

5) Разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции медьсодержащих препаратов с помощью золотых модифицированных наноэлектродов с пределом обнаружения 0,1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления, распределения и эффективности генерации АФК инновационных препаратов меди (I, II) в единичных клетках, 3D-сфероидов и опухолях мыши. Выявлено распределение АФК и ионов меди в разных отделах и полушариях мозга в нормальном состоянии мыши и при модели БА. На примере клиохинола продемонстрирована возможность осуществления мониторинга эффективности терапии БА на моделях мышей *in vivo* прижизненно.

Личный вклад автора

Автор лично осуществлял анализ литературных данных, постановку целей и планирование эксперимента. Автор разработал новые методы и методики, и системы для исследования биофизических процессов на уровне единичных клеток. Автор непосредственно участвовал в выполнении экспериментов. Автор лично проводил анализ экспериментальных данных и результатов исследования, подготовку публикаций, патентов и докладов по теме диссертационной работы.

Степень достоверности

Подтверждение достоверности полученных экспериментальных результатов основано на соответствии результатов измерений тестовых образцов с результатами из научных баз данных и их многократным воспроизведением. Данные, полученные с помощью новых разработанных методов исследования, хорошо коррелируют с результатами альтернативных независимых методов анализа. Полученные данные были многократно подтверждены в литературе исследовательскими группами, цитирующими статьи, которые лежат в основе данной диссертации.

Апробация результатов

Результаты работы были апробированы на международных и всероссийских научных конгрессах, конференциях и открытых школах: The 43th FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018), Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues (Ираклион, Греция, 2018); 1-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2019» (Москва, Россия, 2019); Bio AFM 2019 (Мюнстер, Германия, 2019); ISPM 2019 (Левин-ла-нев, Бельгия, 2019), The 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019); 10th International conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» (Ираклион, Греция, 2019); 12th International Conference «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (Санкт-Петербург, Россия, 2019); Joint 12th EBSA European Biophysics Congress / 10th IUPAP International Conference on Biological Physics (ICBP) (Мадрид, Испания, 2019); 2-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2020» (Москва, Россия, 2020); XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021» (Москва, Россия, 2021); European Biophysics Conference 2021 (EBSA 2021) (Вена, Австрия, 2021); 3-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2021» (Москва, Россия, 2021); Microscopy and Microanalysis 2021 (онлайн, США, 2021); 4-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2022» (Москва, Россия, 2022), Bio AFM 2022 (Осака, Япония, 2022); IEEE 3M-Nano 2024 (Жонгшан, Китай, 2024), MUM OIP Workshop Series 2024 (Куала Лумпур, Малайзия, 2024).

Публикации

Результаты диссертационной работы опубликованы в 32 статьях в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, а также получено 5 патентов на изобретение.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, оборудования и методов исследований, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, состоящего из 377 литературных источников. Диссертация изложена на 255 страницах и включает 125 рисунков и 5 таблиц.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту, д.х.н., профессору РАН Мажуге Александру Георгиевичу за постоянную поддержку и обсуждение результатов.

Особую благодарность сотрудникам, аспирантам и студентам лаборатории биофизики НИТУ МИСИС за участие в подготовке статей и проведении исследований.

Автор признателен коллегам из НИТУ МИСИС, а также отечественных и зарубежных научных центров, в том числе научным коллективам профессора Корчева Ю.Е., Имперский колледж Лондона, профессору Плесковой С.Н., ННГУ им. Н.И. Лобачевского, профессору Белоглазкиной Е.К., МГУ, член-корреспонденту РАН Миткевичу В.А., профессору Клячко Н.Л., МГУ.

Автор выражает отдельную благодарность своей Семье и своим Учителям за многолетнюю поддержку и вдохновение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, разработанность темы, сформулированы цель и задачи исследования, теоретическая и практическая значимость работы, описана новизна, представлены основные положения, выносимые на защиту, отражены структура, содержание и объем диссертационной работы.

В **Главе 1** изложены современные представления о развитии нанокапиллярных технологий, от использования капилляров для фиксации потенциала клеток и измерения ионных каналов до технологий создания нанокапиллярных сенсоров. В обзоре литературы показана важность исследования АФК, уровня внеклеточного рН, ионов металлов для внутри и внеклеточной регуляции клеток и тканей. В первой главе также рассмотрены современные достижения и ограничения существующих физико-химических методов для исследования аналитов клеток.

В **Главе 2** представлено описание используемого оборудования, материалов, объектов для *in vitro* и *in vivo* исследований, а также методики исследования и анализа экспериментальных данных, использованные в диссертационной работе.

В **Главе 3** приведены основные результаты исследования, объединенные в 5 разделов.

В разделе **3.1 Разработка системы для локального исследования биофизических процессов единичных клеток на основе нанокапиллярных дисковых электродов (математическая оценка возможностей системы)** приводятся научно-технические решения разработки уникальной научной установки для проведения измерений на единичных клетках. Схематическое изображение установки представлено на рисунке 1. Ключевым измерительным элементом системы является нанокапиллярный сенсор. В качестве сенсоров будут рассмотрены дисковые наноэлектроды и нанокапилляры, работающие на основе явления выпрямления тока. Применение таких типов сенсоров будет продемонстрировано в разделе 3.2 для локального измерения рН. Данные наносенсоры могут быть использованы как в разработанной установке, представленной на рисунке 1, так и в составе сканирующего ион-проводящего микроскопа (СИПМ). Подробная схема использования с СИПМ будет описана в разделе 3.2.

Наноэлектроды представляют собой кварцевые нанокапилляры, заполненные углеродом, поверхность которого модифицирована платиной или золотом. Известно, что платиновые макро и микроэлектроды могут быть использованы для электрохимической детекции молекулярного кислорода, АФК и ионов металлов. В данной работе используются дисковые электроды наноразмеров. Методы изготовления наноэлектродов и их применение для живых систем будут подробно представлены в разделах 3.3-3.5. В данном разделе будет дана математическая оценка аналитических характеристик таких электродов в составе разработанной уникальной установки.

В мире не существует коммерчески доступных систем, которые позволяли бы осуществлять локальные исследования биофизических процессов единичных клеток с высоким пространственным и временным разрешением с помощью наноэлектродов. Для реализации такой системы были совмещены несколько технических решений. Рассмотрим основные узлы разработанной установки и их назначение:

А) Нанокапиллярный сенсор - основной измерительный зонд, который за счет своих малых размеров позволяет проводить локальные измерения с нанометровым пространственным разрешением и также осуществлять малоинвазивные внутриклеточные измерения;

Б) Микроманипулятор PatchStar (Scientifica, Великобритания) был разработан для проведения экспериментов по локальной фиксации потенциала, записи ионных каналов и мембранного потенциала клеток. Он позволяет работать с микро- и нанокапиллярами. Моторизованный манипулятор может держать позицию с высокой точностью и обладает пространственной стабильностью. Управление может осуществляться чувствительным джойстиком или с помощью программного обеспечения на ПК. Манипулятор может осуществлять позиционирование наноэлектрода с минимальным шагом 20 нм.

В) Patch-clamp усилитель Axon MultiClamp 700B (Molecular Devices, США) - многофункциональный усилитель, созданный изначально для локальной фиксации потенциала для клеток, который может работать как в режиме постоянного тока, так и потенциала. Он поддерживает до двух выносных головок для предусиления тока, которые имеют несколько вариаций обратной связи, что позволяет измерять ток в широком диапазоне от микро до долей

пикоампер. Усилитель имеет ряд встроенных фильтров для подавления шумов, особенно высокочастотных. Одним из важных преимуществ данного усилителя является автоматическая компенсация паразитных RC цепочек, в том числе от нанoeлектрода, которые могут лимитировать скорость проведения измерений, ограниченную временем релаксации и побочными емкостными токами.

Г) АЦП-ЦАП преобразователь Axon Digidata 1550B (Molecular Devices, США) представляет собой устройство с высокой частотой дискретизации (до 500 кГц) и низким уровнем шума. Оно имеет цифровые фильтры и встроенные методы шумопоглощения, в том числе на 50 Гц. Устройство имеет телеграфные каналы с Axon MultiClamp 700B как для входящих, так и исходящих каналов. Преобразователь имеет мал шумящие аналоговые и цифровые каналы, и позволяет формировать развертки потенциала практически любой формы и скорости.

Д) Оптический микроскоп необходим для контролируемой навигации нанoeлектрода. На схеме установки на рисунке 1 представлен инвертированный оптический микроскоп, но также возможно использовать и прямой оптический микроскоп, в зависимости от текущих экспериментальных задач. Можно применять оптические микроскопы различных марок. Нами в экспериментах использовались такие микроскопы как Nikon Ti-U, Olympus IX 73, Микромед. В некоторых экспериментах целесообразно использовать флуоресцентный микроскоп, например, в разделе 3.5 будут выбираться для анализа клетки содержащие амилоидные красители.

Е) Антивибрационный оптический стол. Предпочтительными является стол, который совместим для работы с зондовыми микроскопами.

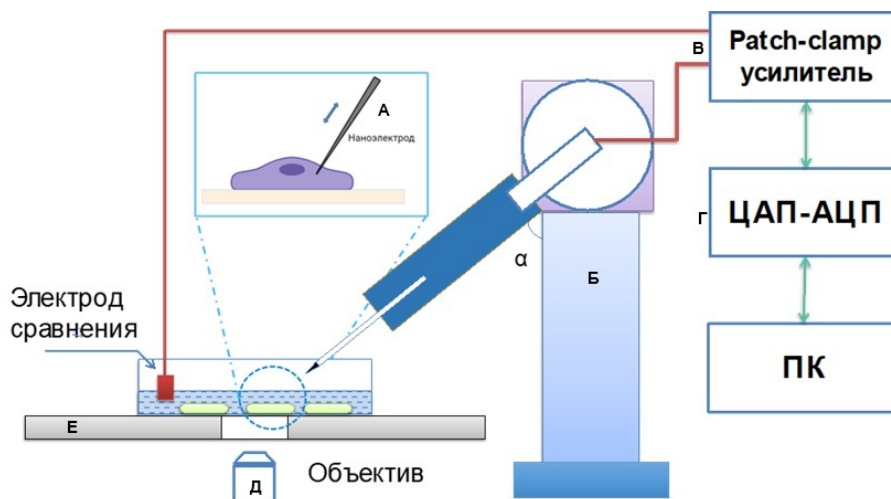


Рисунок 1 - Система для локального исследования биофизических процессов единичных клеток на основе нанокapиллярных дисковых электродов

У поверхности любого электрода, помещенного в раствор электролита, возникает двойной электрический слой. В электрической цепи, в которой измеряется ток, протекающий через рабочий электрод, двойной слой может рассматриваться как конденсатор. В данном случае электрохимическая ячейка может быть представлена в виде классической параллельно соединенной $R_f C_d$ электрической схемы (C_d - дифференциальная емкость двойного электрического слоя; R_f - сопротивление фарадеевскому току у поверхности электрода). Для достижения необходимого потенциала рабочего электрода сначала должен зарядиться конденсатор двойного слоя. Это означает, что в электрической цепи будет протекать емкостной ток, не связанный с восстановлением или окислением вещества. Ступенчатый скачок потенциала создает экспоненциально убывающий емкостной ток со временем релаксации $\tau = R_f C_d$. Ток падает до 37% от своего первоначального значения при $t = \tau$ и до 5% от своего первоначального значения при $t = 3\tau$.

$R_f C_d$ определяет время, необходимое для зарядки электрода до требуемого потенциала, поэтому оно устанавливает нижний временной диапазон проведения эксперимента. Размер электрода является наиболее важным фактором, определяющим постоянную времени релаксации.

Емкость для такого электрода определяется следующей формулой:

$$C_d = \pi r^2 C_d^0, \quad (1)$$

где C_d - дифференциальная емкость двойного электрического слоя;

r - радиус электрода;

C_d^0 - межфазная емкость на единицу площади.

Рассмотрим рабочий электрод в форме диска, у которого межфазная емкость на единицу площади, C_d^0 , находится в типичном диапазоне 10-50 мкФ/см². Тогда C_d при радиусе r , равном 1 мм, C_d составляет 0,3-1,5 мкФ, но при $r = 1$ мкм C_d на 6 порядков меньше, всего 0,3-1,5 пФ. Нескомпенсированное сопротивление также зависит от размера электрода и определяется формулой:

$$R_f = \frac{1}{4\pi\kappa r}, \quad (2)$$

где R_f – сопротивление фарадеевскому току у поверхности электрода;

κ - проводимость электролита;

r – радиус электрода.

Время релаксации будет определяться следующим образом:

$$C_d R_f = \frac{r C_d^0}{4\kappa}, \quad (3)$$

где κ - проводимость электролита [1].

Несмотря на то, что R_f увеличивается обратно пропорционально уменьшению r , C_d увеличивается пропорционально квадрату радиуса, следовательно, время релаксации увеличивается прямо пропорционально r . Это важный результат, указывающий на то, что электроды меньшего размера могут обеспечить доступ к более коротким временным интервалам. При $r = 1$ мм время релаксации составляет около 30 мкс, а время проведения эксперимента, включая время регистрации данных, будет составлять порядка 1 мс. Этот вывод согласуется с общим мнением о том, что эксперименты с электродами обычного (миллиметрового) размера должны проводиться в миллисекундной временной области или дольше [2].

Таким образом, для разработанных наноэлектродов с радиусом не более 100 нм время релаксации τ_{RC} не будет превышать 10 нс, соответственно, временные границы перезарядки емкости в системе не будет превышать 1 мкс, что граничит с пределом временного разрешения систем для детекции токов порядка нескольких пА.

Далее в разделе рассматриваются характерные особенности протекания процессов в условиях стационарного состояния, при скачке потенциала и в условиях циклической вольтамперометрии (ЦВ) для наноразмерных электродов.

В стационарных условиях параметры электродного процесса не зависят от времени и вольтамперограмма имеет S-образную форму. Наиболее важная характеристика-концентрационный профиль в фазе раствора. Для стационарного процесса толщина диффузионного слоя не зависит от времени и остается постоянной. При хроноамперометрических измерениях после скачка потенциала граница диффузионного слоя непрерывно смещается в фазу раствора. В условиях ЦВ в начальный момент диффузионный слой также смещается в фазу раствора. Однако его расширение сопровождается изменением концентрационного градиента, происходящего после изменения направления сканирования потенциала.

Чем больше микроэлектрод, тем больше времени требуется для достижения стационарного состояния. Время достижения предельного диффузионного тока определяется уравнением:

$$t_{ss} = 81 \frac{d^2}{D}, \quad (4)$$

где D - коэффициент диффузии (м²/с);

d - диаметр дискового электрода [3].

Таким образом, для дисковых платиновых и золотых электродов на основе кварцевых накопительных слоев с размером 100 нм время выхода на стационарное состояние, т.е. достижение предельного диффузионного тока составляет не более 1 мс. В свою очередь выход на стационарное состояние для макроэлектродов размером больше 100 мкм, которые больше

распространены в текущих аналитических электрохимических методах, может достигать нескольких минут и более.

Вид зависимости тока от потенциала обусловлена с одной стороны размером электрода, с другой стороны скоростью развертки потенциала. При достаточно высокой скорости развертки даже при использовании нанoeлектродов система будет переходить из стационарного состояния к случаю циклической вольтамперометрии с явными пиками в зависимостях тока от напряжения. Вид зависимости тока от потенциала обусловлена с одной стороны размером электрода, с другой стороны скоростью развертки потенциала. При достаточно высокой скорости развертки даже при использовании нанoeлектродов система будет переходить из стационарного состояния к случаю циклической вольтамперометрии с явными пиками в зависимостях тока от напряжения. Однако для нанoeлектродов вклад радиального рассеивания к краям электрода становится более значимым, поэтому стационарные состояния отклика тока могут быть получены при гораздо более высоких скоростях сканирования, чем в случае макроэлектродов.

Ранее было получено соотношение [2], которое устанавливает переход от стационарного состояния к циклической вольтамперометрии.

$$v \ll \frac{RTD}{Fr^2}, \quad (5)$$

где $R = 8,314 \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ (газовая постоянная);

T - температура (К);

$F = 96485 \text{ Кл/моль}$;

v - скорость сканирования потенциала (В/с).

Таким образом, v – скорость ограничена соотношением $1/r^2$. Ранее была проведена оценка скорости при, которой должен достигаться предельный диффузионный ток для микроэлектродов с радиусом 5 мкм. При $v < 100 \text{ мВ/с}$ должно быть стационарное состояние, которое не зависит от скорости развертки потенциала. Таким образом, для разработанных платиновых и золотых электродов на основе нанокapилляра, радиус которых не превышает 100 нм, должно сохраняться стационарное состояние при скоростях развертки потенциала менее 40 мВ/с. В стационарном состоянии точное измерение величины предельного диффузионного тока наиболее простая задача. Предельный диффузионный ток связан достаточно простым законом с концентрацией и коэффициентом диффузии. Таким образом, за счет наноразмеров электродов можно достичь высокого пространственного разрешения при точном определении концентрации аналитов.

В случае использования режима ЦВ с зависимостью от скорости развертки потенциала не используются законы для предельного диффузионного тока. Теоретическое выражение для тока пика обратимой ЦВ описывается в виде функции скорости сканирования потенциала и называется уравнением Рэндлса-Шевчика [4]. Согласно этому уравнению, зависимость тока пика I_p от скорости сканирования пропорциональна квадратному корню из v , что указывает на процесс, контролируемый диффузией:

$$I_p = 0,4463 \cdot nFAc \sqrt{\frac{nFvD}{RT}}, \quad (6)$$

где A - площадь поверхности электрода;

n - число переносимых электронов, приходящихся на одну молекулу;

c - объемная концентрация аналита.

Диагностические критерии и характеристики ЦВ для обратимого переноса электрона:

$I_{p,a} / I_{p,c} = 1$, ΔE_p при 298 К не зависят от скорости сканирования v , I_p пропорционален $v^{\frac{1}{2}}$.

Известно, то в системе ток состоит из двух компонент: I_f - фарадеевского и I_c - емкостного тока [5][6]. Причем $I_f \sim Cv^{\frac{1}{2}}$, а $I_c \sim Cv$, что означает, что емкостной ток растет быстрее со скоростью развертки потенциала при ЦВ. Для достоверного определения пикового тока и соответствующей концентрации аналита необходимо вычитать базовую линию, обусловленную емкостным током при высоких скоростях. Так как емкостной ток зависит от некомпенсированной емкости системы, которая пропорциональна квадрату радиуса электрода, то в случае использования наноразмерных электродов, вклад от емкостного тока будет в 10^6 раз меньше по сравнению с микро и макроэлектродами, что значительно упрощает измерения при больших скоростях и расширяет аналитические возможности системы.

Разработанная система для исследования биофизических процессов в клетке имеет улучшенные параметры измерения в живых системах, в том числе, малоинвазивность и возможность локальных измерений с нанометровым пространственным разрешением, высокая скорость отклика, количественный анализ аналитов.

В разделе **3.2. 3D pH картирование с нанометровым пространственным разрешением** описана возможность изготовления pH чувствительного сенсора на основе нанокапилляра с цвиттер-ионной мембраной, в принципе работы которого лежит явление выпрямления ионного тока на острие капилляра. Впервые продемонстрировано 3D pH картирование с нанометровым пространственным разрешением для живых систем *in vitro* и *in vivo*.

Измерение ионного тока через нанокапилляр можно использовать для создания чувствительных сенсоров. Сопротивление нанокапилляра (рисунок 2А) можно описать с помощью следующего уравнения [7] описывается формулой:

$$R = \frac{\rho l}{\pi r_s^2} + \frac{\rho \cot(\theta/2)}{\pi} \left(\frac{1}{r_t} - \frac{1}{r_s} \right), \quad (7)$$

где ρ - удельное сопротивление;

l - длина цилиндрической части капилляра;

r_s - радиус цилиндрической части капилляра;

r_t - радиус отверстия острия;

Θ - угол конуса.

Как правило, радиус стержня значительно превышает радиус отверстия, то есть $r_s \gg r_t$. По мере увеличения длины сопла капилляра сопротивление нанокапилляра уменьшается.

Наибольший вклад в общее сопротивление приходится на область, расположенную вблизи острия нанокапилляра. Уравнение можно упростить и представить в виде:

$$R \cong \frac{\rho \cot(\theta/2)}{\pi r_t} \quad (8)$$

Сопротивление, сосредоточенное на острие нанокапилляра определяет сопротивление в системе. В виду наноразмеров капилляра присутствие аналитов может значительно изменять удельное сопротивление в данной области что, делает эту технологию особенно привлекательной для разработки высокочувствительных платформ, способных детектировать события на уровне отдельных молекул.

Электрохимические свойства нанокапилляров значительно отличаются от характеристик традиционных микрокапилляров. Например, стеклянные нанокапилляры, при подаче симметричного напряжения, демонстрируют асимметричный выходной ток - эффект выпрямления тока [8]. Это явление объясняется образованием двойного электрического диффузного слоя на внутренней поверхности капилляра. Когда толщина этого слоя становится сравнимой с диаметром нанокапилляра, электростатическое взаимодействие между ионными поверхностными зарядами начинает влиять на свойства ионного тока. На рисунке 2 показано выпрямление тока для нанокапилляров с разными поверхностными зарядами. Было установлено, что на выпрямление тока влияют концентрация электролита, уровень pH и приложенное напряжение [9].

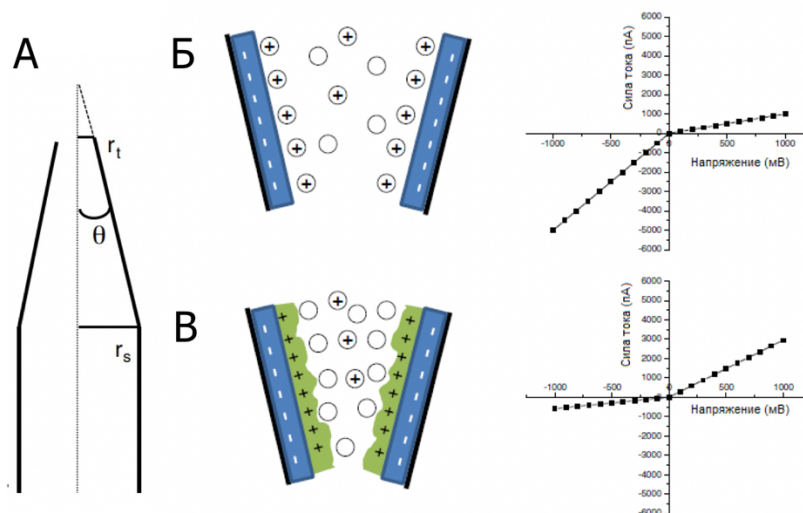


Рисунок 2 – А) Схематическое изображение капилляра. Схематическое изображение устройства ДЭС на кончике нанокapилляра и соответствующие графики вольтамперных характеристик: Б) без покрытия; В) с покрытием поли-Л-лизин

Степень выпрямления или коэффициент выпрямления (r) (формула 9) рассчитывается как отношение абсолютных значений тока при положительных (I_+) и отрицательных напряжениях (I_-).

$$r = \left| \frac{I_-}{I_+} \right| \quad (9)$$

Коэффициент выпрямления используется для оценки изменений электрических свойств нанокapилляра во время формирования функционализированного слоя на его острие. Непокрытые стеклянные поверхности нанокapилляра (например, кварцевые или боросиликатные) вызывают отрицательное выпрямление тока ($r > 1$). Функционализация поверхности кварцевого нанокapилляра положительно заряженными полиэлектролитами, такими как поли-Л-лизин, приводит к инверсии выпрямления тока ($r < 1$). Таким образом, любая заряженная молекула, адсорбированная на острие нанокapилляра, будет изменять поверхностную плотность зарядов и удельное сопротивление. Таким образом, процесс связывания аналитов со специфическими молекулами, сорбированными на поверхности нанокapилляра, можно отслеживать, анализируя изменения коэффициента выпрямления тока во времени.

Кислая внеклеточная среда может, например, способствовать метастазированию опухолей и регулировать воспалительные реакции. Поэтому точное измерение локального внеклеточного pH (pHe) имеет ключевое значение для понимания биофизики клетки, а также его влияния на диагностику и лечение онкологических патологий [10][11]. Оценка локального pHe также важна для определения степени инвазии опухоли и иммунного ответа [12][13]. Однако картирование пространственного распределения pHe в клеточной среде представляет собой сложную задачу из-за высокой подвижности и быстрого распространения внеклеточных протонов [14][15]. Поэтому существует необходимость в разработке метода для эффективного и чувствительного мониторинга изменений pHe с высоким пространственным разрешением на уровне отдельных клеток [16].

Нами впервые был разработан наноразмерный pH чувствительный наносенсор, основанный на самосборке гидрогеля полил-Л-лизина/глюкозооксидазы (PLL/GOx), с дальнейшей сшивкой в парах глутарового альдегида (рисунок 4а). Положительно заряженные четвертичные амины PLL и отрицательно заряженные карбоксильные остатки GOx способствуют самосборке цвиттер-ионных мембран, что обеспечивает повышенную чувствительность к ионам H^+ . Кроме того, такие наномембраны позволяют ионному току проходить через их матрицу, что может использоваться для управления в режиме обратной связи при комбинировании с методами визуализации живых клеток, такими как сканирующая ионно-

проводящая микроскопия (СИПМ). Это обеспечивает возможность получения 3D-изображений живых клеток с высоким разрешением [17]. Более того, можно изготавливать двухканальные СИПМ-pH нанозонды, которые объединяют преимущества сканирования с обратной связью СИПМ с высокой чувствительностью pH-детекции, что позволяет одновременно получать топографические и pH-карты отдельных живых клеток в режиме реального времени.

Схема процесса самосборки цвитер-ионной мембраны на острие стеклянного нанокapилляра представлена на рисунке 4 Б. Глутаровый альдегид ввиду наличия двух крабонильных групп позволяет вводить как свободные альдегидные группы в матрицу мембраны, так и связывает свободные аминогруппы PLL (рисунок 4 Б-В) [18]. В результате образуется стабильная наномембрана на конце нанокapилляра, наличие которой приводит к выпрямлению ионного тока из-за присутствия положительно заряженных четвертичных аминов PLL и отрицательно заряженные карбоксильные остатки. Соотношение положительных и отрицательных зарядов определяется локальным pH раствора (рисунок 4 Д).

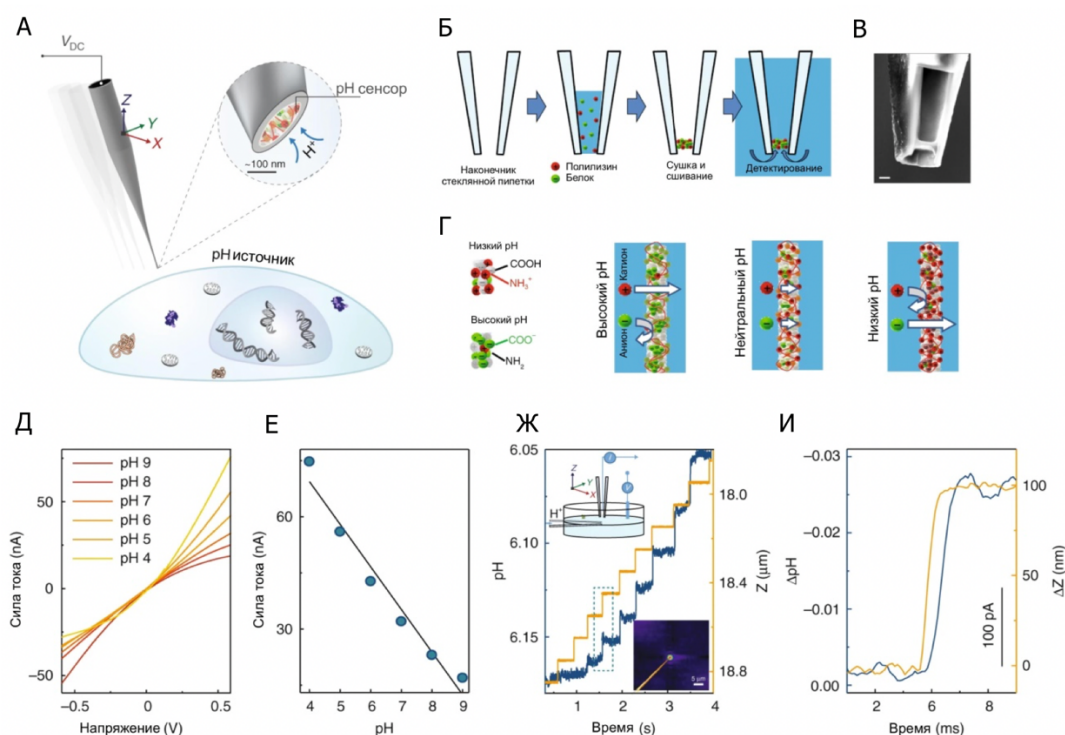


Рисунок 4 – А) Схематическое изображение, демонстрирующее динамическое картирование внеклеточного pH; Б) схема изготовления pH сенсора; В) СЭМ изображение острия pH сенсора (масштабный отрезок 500 нм); Г) принцип работы сенсора: наномембрана проявляет избирательную проницаемость для анионов при низком pH и катионов при высоком pH; Д) ВАХ при различных значениях pH; Е) график зависимости тока от pH при 0,6 В, показывающий хорошую линейную зависимость в диапазоне pH от 4 до 9 ($R^2 = 0,96$, $p < 0,001$, корреляция по Пирсону); Ж) нанокapилляр использовалась как высоколокализованный источник H^+ для тестирования способности pH-зонда к картированию (зонд перемещался к источнику H^+ по оси z с использованием быстрого пьезоманипулятора); И) увеличенный график из пунктирной рамки, показанной на изображении г, демонстрирующий чувствительность и разрешение pH сенсора

Структурные свойства мембраны играют ключевую роль в pH чувствительности сенсора. Для визуализации острия нанокapилляра использовалась сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком с функцией «срез и просмотр». Прямая визуализация срезов стала возможна благодаря прочной сшивке PLL/GOx наномембран. Поперечное изображение показала, что PLL/GOx наномембрана, образовавшаяся на кончике нанокapилляра, имеет толщину около 200 нм (рисунок 4 В).

Изменения в выпрямлении ионного тока можно наблюдать на ВАХ при различных значениях pH. Линейная зависимость может использоваться не только в качестве индикатора pH, а также для сигнала обратной связи для контроля расстояния между зондом и образцом при 3D-изображении с высоким разрешением в сочетании с СИПМ [17]. Поскольку пространственное разрешение СИПМ тесно связано с размерами зонда, миниатюризация нанозонда имеет решающее значение для максимизации пространственного разрешения. В сочетании с СИПМ, нанозонд способен проводить бесконтактное сканирование поверхности и точно позиционироваться в нужных точках над клеткой или любым другим источником высвобождения H^+ . Для всесторонней оценки возможностей сенсора мы создали искусственный градиент H^+ (рисунок 4 Ж), подаваемый через нанокapилляр, управляемый напряжением [15][19]. Полученный градиент H^+ можно регулировать, изменяя расстояние до нанокapилляра, подающего H^+ (рисунок 4 Ж). Для иллюстрации пространственного разрешения мы провели картирование pH в плоскости X–Y с помощью капиллярного pH сенсора с внутренним диаметром ~ 100 нм (рисунок 4 Ж).

Для оценки времени отклика и чувствительности сенсора был использован быстрый пьезоманипулятор, способный быстро изменять положение сенсора (рисунок 4 Ж). Время отклика составило около 2 мс при чувствительности лучше, чем 0,01 pH единицы и пространственном разрешении выше 50 нм (рисунок 4 Ж).

Для разделения функций сканирования СИПМ и измерения pH разработан нанозонд с двумя каналами. На рисунке 5 показана схема изготовления и работы двухканального SICM-pH нанозонда. Такой нанозонд состоит из немодифицированного открытого канала (SICM-канал) для контроля обратной связи СИПМ и другого канала с pH-чувствительной PLL/GOx мембраной (pH-канал), что позволяет одновременно и независимо проводить как измерение pH, так и топографическое сканирование в режиме СИПМ.

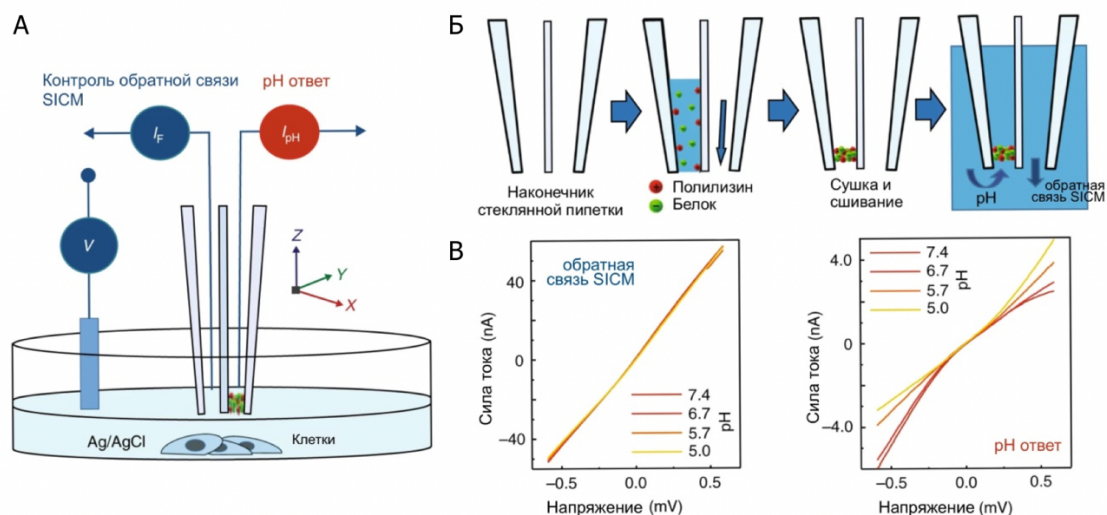


Рисунок 5 - Независимое сканирование с обратной связью СИПМ и одновременное 3D картирование pH в живых клетках: А) схема работы двухканального нанозонда для одновременного получения изображений СИПМ и измерения pH; Б) pH-чувствительная наномембрана формируется внутри одного канала (pH-канал) двухканального кварцевого нанокapилляра, в то время как второй канал (канал для получения изображений СИПМ) остается открытым благодаря подаче обратного давления во время изготовления; В) ионные токи, протекающие в двух отдельных каналах двойного нанокapилляра, имеют разные I–V характеристики при различных pH

Ионные токи, протекающие в независимых каналах нанокapилляра, продемонстрировали разные ВАХ при изменении pH (рисунок 5 В). Подобно одноканальному зонду, динамический диапазон, линейность и чувствительность оставались схожими для pH детектирования.

Валидация разработанного двухканального зонда осуществлялась при картировании pH в живых клетках меланомы A375M (рисунок 6). Меланома является одной из самых агрессивных и гетерогенных форм опухолевых патологий, проявляющей разнообразие клеточных

субпопуляций и характеризующейся внеклеточным ацидозом [20]. Топографическое изображение СИПМ с высоким пространственным разрешением, представленное на рисунке 7 слева, и 3D карта рНе (правая панель рисунка 7) тех же клеток меланомы были получены одновременно.

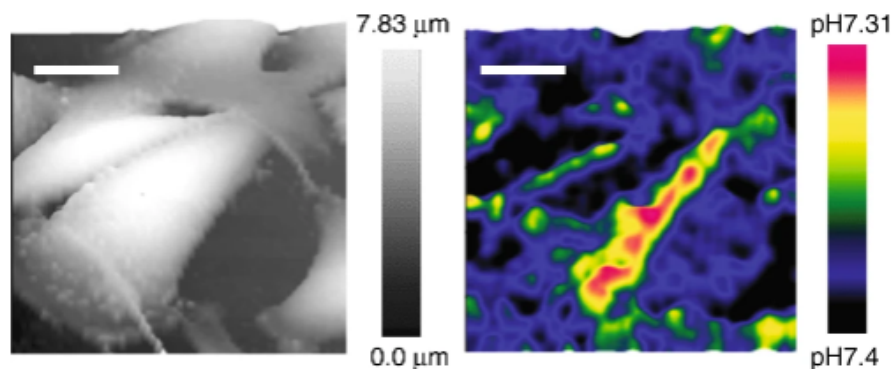


Рисунок 6 - Одновременное 3D картирование топографии (изображение слева) и рНе (изображение справа) трех различных групп живых клеток меланомы A375M с высоким пространственным разрешением (масштабный отрезок равен 20 мкм)

Как и ожидалось, картирование рНе с высоким разрешением клеток меланомы показало неоднородное распределение рН, что согласуется с гетерогенной природой клеток меланомы. В отличие от этого, картирование рНе нормальных меланоцитов не выявило заметных рНе градиентов.

Предложенная двухканальная платформа SICM-pH нанозонда обеспечивает динамическое 3D картирование рНе гетерогенных опухолевых клеток в реальном времени с контролем обратной связи без дополнительных меток и с субклеточным разрешением. Разработанный метод может помочь в диагностике опухолевых заболеваний, прогнозировании и оценке эффективности терапии, направленной на снижение кислотности рНе.

В разделе **3.2.2 «Исследования профиля распределения рН внутри опухоли *in vivo*. Использование рН-чувствительного наносенсора для оценки влияния степени кислотности опухоли на накопление магнитных наночастиц»** представлены исследования картирования опухоли мыши *in vivo* прижизненно. Ацидоз внеклеточного матрикса, являющийся характерной чертой многих солидных опухолей, широко используется для физиологически обусловленной доставки контрастных агентов, лекарств и наночастиц в опухоль. Однако рН микроокружения опухоли варьируется как внутри одной опухоли, так и между различными опухолями. В данном исследовании с помощью разработанных рН сенсоров оценивали влияние этих вариаций на рН-активируемую доставку магнитных наночастиц (МНЧ), модифицированных пептидом, связывающимся при низком рН (pHLIP). Эффективность накопления pHLIP-конъюгированных МНЧ в опухолях 4T1 после внутривенного введения, отслеживаемая *in vivo* с помощью магнитно-резонансной томографии, показала значительные вариации. Анализ профилей рН опухолей, записанных с использованием разработанного рН сенсора, выявил явную корреляцию между измеренным в опухоли рН и количеством накопленных МНЧ.

Синтез наночастиц осуществляла группа Першиной А.Г. Магнитные наночастицы (Fe_3O_4) диаметром около 9 нм были покрыты тонким слоем SiO_2 , после чего APS ковалентно связывался с поверхностью частиц, образуя МНЧ-APS. Для улучшения коллоидной стабильности полученных МНЧ использовали ПЭГ с последующей ковалентной иммобилизацией pHLIP.

Накопление MNP, конъюгированных с pHLIP, в опухоли 4T1 зависит от рН профиля опухоли. Способность MNP-PEG-pHLIP выступать в качестве контрастного объекта для опухолей протестирована на модели мышей BALB/c с подкожно имплантированной опухолью 4T1 (рисунок 7 А-В).

рН профили опухолей 4T1 были записаны с помощью разработанного одноканального рН сенсора. Прижизненные исследования потребовали разработку протокола работы с экспериментальными животными. Перед измерениями мышам ($n = 3$) вводили внутривенно смесь золетила и ксилазина (50 и 5 мг/кг соответственно), для поддержания анестезии в ходе

экспериментов использовали внутривенный катетер. Для доступа рН сенсора к опухоли был сделан разрез вдоль позвоночника животного, начиная с ~0,5 см от основания хвоста до верхнего изгиба позвоночника. Опухоль была аккуратно отделена от подлежащих тканей, на спине мыши был сформирован кожный карман, который заполнили PBS. рН профиль определяли в опухолях мышей, которым вводили MNP-PEG-rHLIP, после последнего MPT сканирования. рН измеряли в обоих направлениях движения рН сенсора: «внутри опухоли» и «из опухоли» в трех участках опухоли.

В целом, два рН профиля в разных направлениях («внутри» и «из опухоли») были близки, и их различия находились в пределах погрешности метода. Из-за риска загрязнения внешним буфером во время измерений «из опухоли», для анализа были выбраны данные «внутри опухоли». Мы обнаружили, что самое низкое значение рН в опухолях, измеренное на глубине 1200 мкм, коррелировало с концентрацией железа в тканях опухоли (рисунок 7).

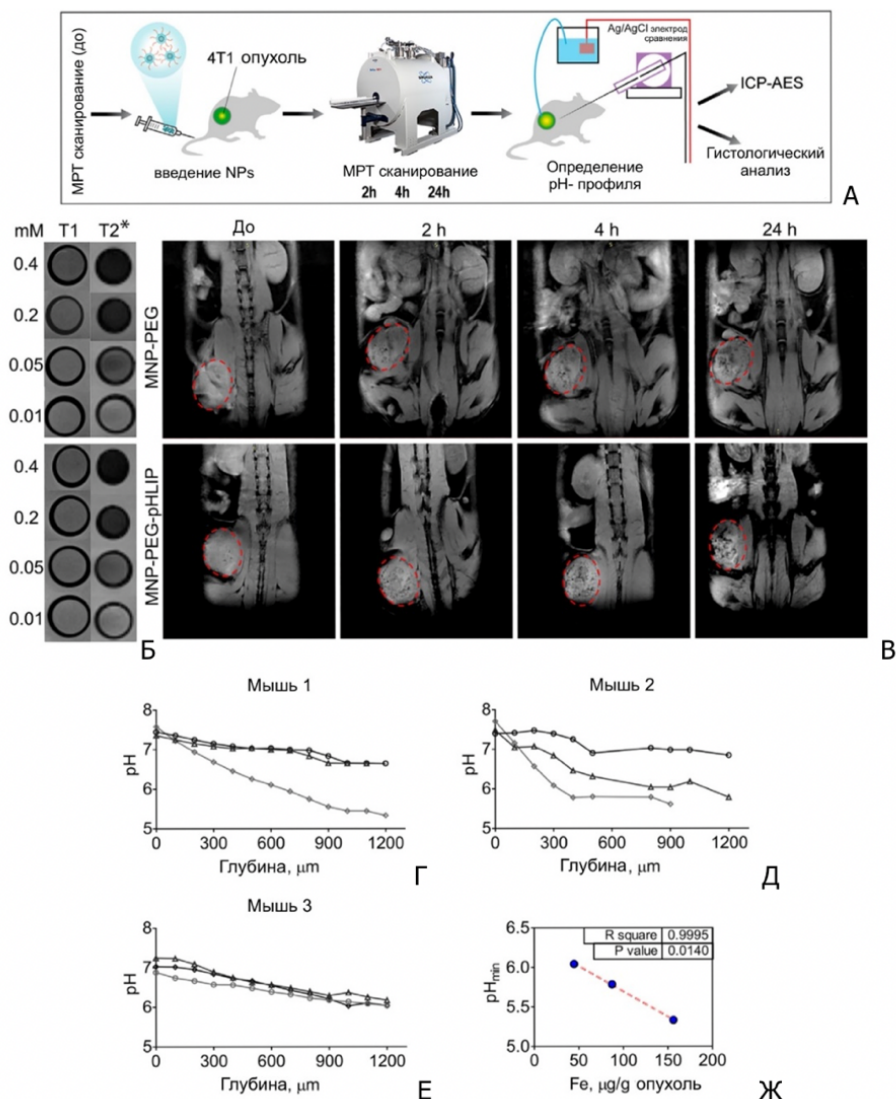


Рисунок 7 - МР-изображения и рН-профили опухолей 4Т1, сформированных в задней области бедра мышей BALB/c: А) схема рабочего процесса *in vivo* эксперимента; Б) T1- и T2*-взвешенные МРТ изображения MNP-PEG и MNP-PEG-rHLIP, диспергированных в воде при различных концентрациях (0,01-0,40 мМ); В) T2*-взвешенные МР-изображения опухоли 4Т1 (до и через 2, 4 и 24 часа после введения MNP-PEG и MNP-PEG-rHLIP), полученные на ClinScan 7 T (Bruker Biospin); Г-Е) рН-профили опухолей 4Т1 (24 часа после введения MNP-PEG-rHLIP), записанные с использованием разработанного рН сенсора (n = 3 на мышь); Ж) самое низкое значение рН, измеренное на глубине 1200 мкм в опухолях 4Т1 (24 часа после введения MNP-PEG-rHLIP), в зависимости от концентрации Fe в ткани опухоли

Результаты *in vivo* показывают, что эффективность доставки MNP, конъюгированных с pHLP, в опухоль зависит от распределения pH внутри нее. Известно, что уровень pH может различаться между различными участками одной опухоли, а также между опухолями одного и того же типа. В опухолях 4T1 мы зарегистрировали падение pH до 5,3-5,6, что соответствует самым низким значениям pH, измеренным в опухоли среди различных типов опухолевых патологий [21]. Таким образом, разработанный pH сенсор позволяет достоверно подтвердить эффективность доставки pH чувствительных диагностических и терапевтических препаратов.

В разделе 3.3 «Локальное определение АФК и молекулярного кислорода на уровне единичных клеток, тканей и животных с помощью нанокapиллярных электрохимических сенсоров на основе платинизированного углерода» приводится описание разработки изготовления платиновых нанoeлектродов и их применение в различных живых системах для детекции АФК и молекулярного кислорода.

Исследования показывают, что нарушение баланса АФК является ключевой причиной старения и приводит к развитию таких патологий, как опухолевые, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые. Микро- и нанoeлектроды зарекомендовали себя как мощные инструменты для биологических исследований. Для создания нанокapиллярных сенсоров на основе углерода была разработана методика изготовления воспроизводимых углеродных нанoeлектродов на основе кварцевых нанокapилляров с заданными размерами и функциональными покрытиями. Протокол производства нанoeлектродов с требуемыми размерами включает следующие этапы: 1) вытягивание кварцевых нанокapилляров с использованием лазерного пуллера; 2) заполнение пиролитическим углеродом методом термической декомпозиции смеси бутана и пропана. Полный процесс изготовления одного нанoeлектрода занимает в среднем меньше минуты. Радиус нанoeлектрода можно точно контролировать, изменяя параметры вытягивания в процессе производства нанокapилляров. Размер таких дисковых нанoeлектродов может определяться по предельному диффузионному току I_{ss} :

$$r = \frac{I_{ss}}{4.64nFC_0D} \quad (10)$$

Для того чтобы углеродные электроды стали чувствительными к кислороду и АФК, их необходимо функционализировать платиной. Платина выступает катализатором реакций восстановления кислорода и пероксида водорода.

В 2014 году мы впервые продемонстрировали возможность определения АФК с использованием углеродного электрода, модифицированного платиной (рисунок 8). Осаждение платины проводилось из раствора платинохлористоводородной кислоты H_2PtCl_6 .

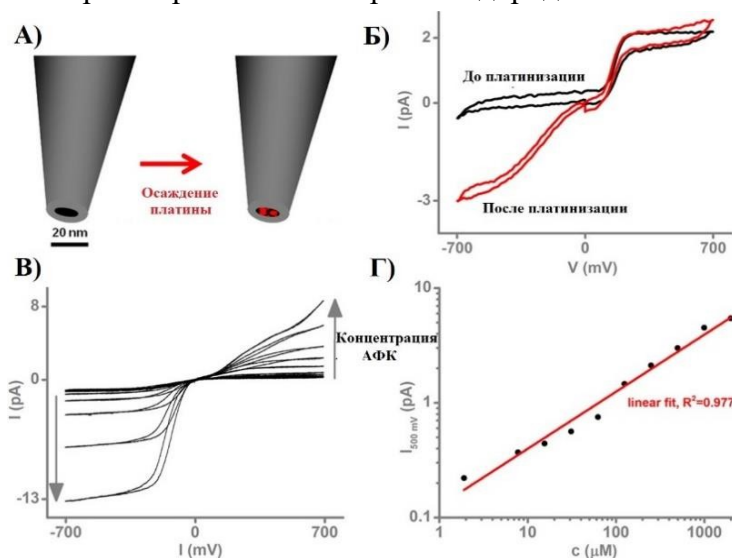


Рисунок 8 –А) схематическое изображение предложенной концепции модификации; Б) ЦВ в 1 мМ ферроцен метанола нанoeлектрода до (черная кривая) и после (красная кривая) платинизации; В) процесс обнаружения АФК платинированным углеродным нанoeлектродом; Г) калибровочная кривая платинированного электрода по перекиси водорода

Теоретический расчет физического размера электрода был произведен на основе вольтамперограмм, которые были получены до и после осаждения металла. Установлено, что осаждение платины не привело к значительному увеличению физических размеров электродов, что означает отсутствие роста инвазивности сенсора. Однако данная модификация существенно повысила его каталитическую активность.

Мы применили данный тип наноэлектродов для внутриклеточных измерений в культивируемых клетках меланомы (рисунок 9). Меланома - агрессивная форма опухолевой патологии кожи, которая вызывает значительные структурные изменения меланосом, органелл, содержащих светопоглощающие пигменты, ответственные за удаление свободных радикалов. Однако в клетках меланомы меланосомы, вместо защиты клеток от окислительного стресса, сами продуцируют свободные радикалы [22]. На рисунке 9 показано, что при проникновении наноэлектрода в клетки меланомы анодный ток резко увеличивается, а затем стабилизируется на уровне, превышающем уровень, измеренный в клеточной среде. Интересно отметить, что при первом проникновении наблюдается значительный всплеск тока, тогда как при последующих введениях его величина либо снижается, либо отсутствует вовсе. Это может указывать на связь между первоначальным скачком тока и механическим повреждением клетки во время введения наноэлектрода. Эти результаты демонстрируют потенциал функциональных наноэлектродов для изучения эндогенных процессов в клетках меланомы и могут способствовать исследованию окислительного стресса при данном типе опухолей.

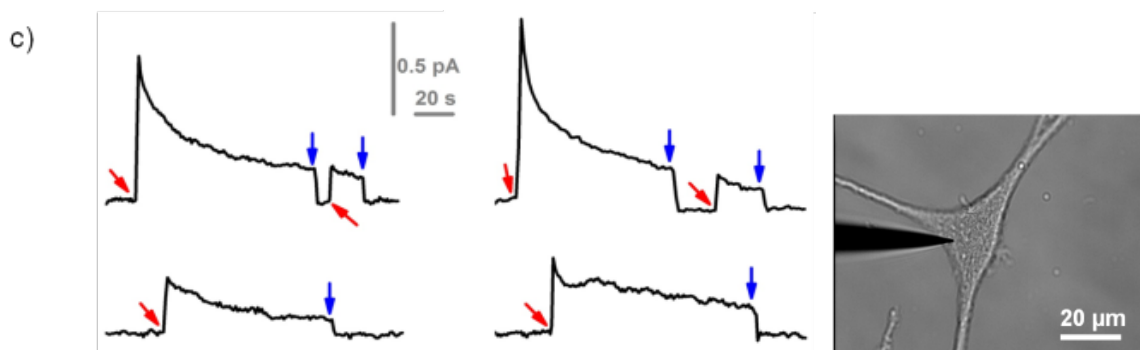


Рисунок 9 - Внутриклеточные измерения в клетках меланомы: фотография наноэлектрода, проникающего в клетку меланомы (вид сверху). Графики тока при потенциале +850 мВ внутри и снаружи клетки меланомы в культуре. Красные стрелки указывают момент ввода, синие - момент вывода электрода

Для улучшения адгезии платины на углеродной основе применялась методика создания нанополостей на поверхности электрода, что способствовало более прочному закреплению платины. Изготовление платинированных наноэлектродов включало два этапа: травление в щелочном растворе и последующую платинизацию. Все этапы тщательно контролировались с помощью электрохимических измерений (рисунок 10). Полученные ВАХ для исходного углеродного электрода, электрода с нанополостями и с нанесенным платиновым покрытием подтвердили успешность модификации.

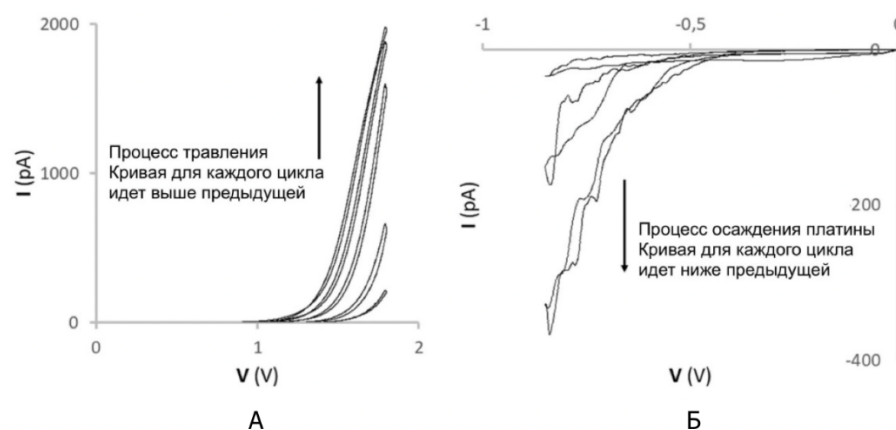


Рисунок 10 – Вольтамперные характеристики: А) Вольтамперные характеристики, полученная при травлении углеродного нанoeлектрода в 0,1 м растворе NaOH и 10 мм растворе KCl в течение 40 циклов по 10 секунд каждый, для создания полости на поверхности нанoeлектрода. Каждая следующая кривая расположена выше предыдущей, что указывает на постепенное изменение структуры электрода в процессе травления. Б) Вольтамперная характеристика, полученная при осаждении платины, которое осуществлялось путем изменения потенциала от 0 до -800 мВ относительно Ag/AgCl в растворе, содержащем 2 мМ H_2PtCl_6 . Этот процесс демонстрирует успешное покрытие нанoeлектрода платиной.

По значению предельного диффузионного тока была проведена оценка размеров нанoeлектродов, размер которых составляет менее 100 нм. Платинированный нанoeлектрод продемонстрировал повышенную каталитическую активность в реакции восстановления кислорода. Для подтверждения наномасштабного размера и присутствия платины на острие электрода получили изображения СЭМ с анализом EDX на всех этапах до и после платинизации. Размер электрода не изменялся на каждом этапе, а платина была обнаружена только на последнем этапе после платинизации.

Ранее было установлено, что инкубация клеток с наночастицами оксида железа (НЧ) приводит к образованию внутриклеточных АФК [23][24]. В нашем исследовании мы использовали наночастицы оксида железа диаметром 10 нм (Magn) в качестве модели для оценки токсичности НЧ. Для стабилизации был выбран Pluronic F127, так как было показано, что он повышает биосовместимость НЧ Magn, предотвращая агрегацию, адсорбцию белков [25]. Мы предположили, что покрытие Magn с помощью Pluronic F127 (Magn-Plu) создаст менее токсичную модель НЧ, которая должна вызывать более низкий уровень АФК. Внутриклеточные измерения АФК были выполнены в клетках HEK293 и опухолевых клетках LNCaP до и после воздействия НЧ оксида железа. Сравнительные измерения проводили до и после воздействия Magn на клетки HEK293 (при концентрации 8,56 мкг/мл) в течение 3 часов в буферном растворе HBSS. Наличие наночастиц Magn значительно увеличило генерацию АФК внутри клетки. Уровень внутриклеточных АФК: 0,2 мкМ H_2O_2 до и 0,5 мкМ H_2O_2 после воздействия наночастиц Magn.

Аналогичные измерения были проведены на клетках LNCaP, которые без наночастиц Magn не продуцируют измеряемый уровень АФК (рисунок 11 - Контроль). Наличие наночастиц Magn значительно увеличило генерацию АФК внутри клеток (рисунок 11 - Magn). Покрытие наночастиц Magn биосовместимым Плуроником F127 уменьшило внутриклеточный уровень АФК до исходного уровня в HBSS. Наночастицы Magn-Plu не вызвали заметного повышения внутриклеточных АФК в клетках LNCaP после 3-часового воздействия при концентрации 8,56 мкг/мл. Как показано на рисунке 11, уровень АФК в клетках LNCaP после воздействия Magn был оценен как 0,1 мкМ H_2O_2 . Все измерения заняли менее 30 минут для анализа уровня АФК в одной клеточной линии с использованием одного электрода.

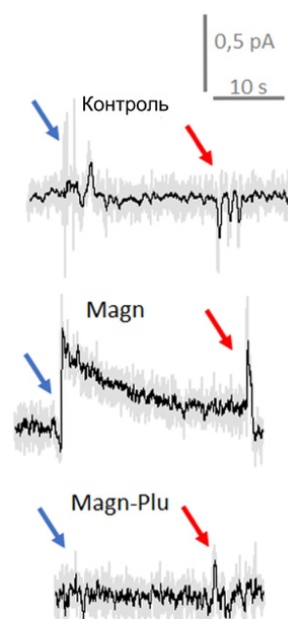


Рисунок 11 -
Внутриклеточные
измерения активных
форм кислорода
(АФК) в отдельных
клетках LNCaP

образование АФК при воздействии наночастиц Magn, чем Magn-Plu, при инкубации с клетками LNCaP.

На рисунке 11 представлены характерные кривые тока нанозлектрода, поляризованного на +800 мВ относительно Ag/AgCl, внутри и снаружи клеток LNCaP. Красные и синие стрелки указывают, соответственно, моменты проникновения и извлечения. Контроль - внутриклеточные измерения АФК в чистых клетках после 3 часов инкубации в HBSS; Magn - измерения АФК в клетках, инкубированных с Magn NP в течение 3 часов; Magn-Plu - измерения АФК в клетках, инкубированных с Magn-Plu NP в течение 3 часов. Серые кривые - исходные записи, черные кривые - записи с усреднением по 100 точкам.

Сравнительное исследование цитотоксичности наночастиц Magn и Magn-Plu проводили с использованием коммерчески доступного метода обнаружения АФК с помощью окрашивания клеток 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетатом (H2DCFDA). Гистограммы интенсивности флуоресценции красителя H2DCFDA в клетках LNCaP после инкубации с наночастицами Magn-Plu и Magn при различных концентрациях и временах представлены на рисунке 12. Уровень АФК в контрольных клетках был принят за нулевой. Эти результаты показывают, что содержание АФК в клетках, инкубированных с Magn и Magn-Plu при концентрации 8,56 мкг/мл в течение 3 часов, не может быть обнаружено этим флуоресцентным методом. Сигналы значительно увеличивались при концентрации наночастиц 16 мкг/мл ($P < 0.01$) (рисунок 12). Уровень АФК в клетках, культивированных с Magn-Plu и Magn в течение 24 часов, в среднем был выше, чем после 3 часов инкубации. Следует отметить, что все методы показали более активное

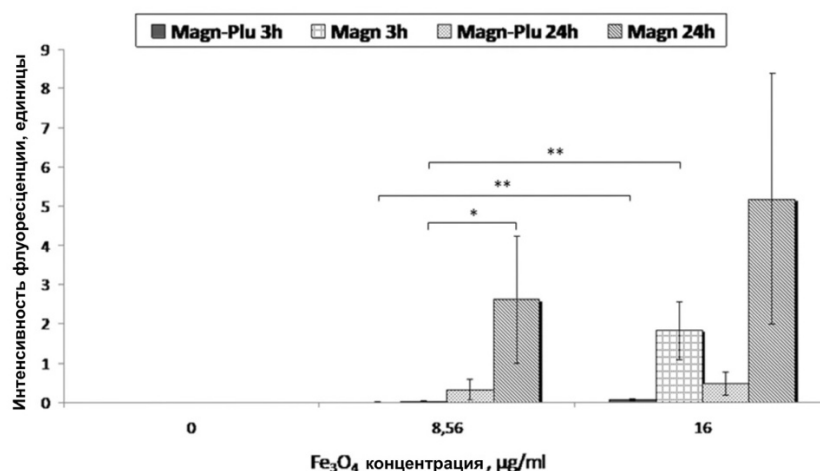


Рисунок 12 - Гистограмма интенсивности флуоресценции H2DCFDA в клетках LNCaP после инкубации с наночастицами Magn-Plu и Magn в течение 3 и 24 часов. Результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Флуоресцентные тесты не достигли предела обнаружения, который был выявлен с помощью нового метода электрохимического измерения АФК после 3 часов инкубации. Следует отметить, что флуоресцентный метод требовал дополнительной стадии подготовки для инкубации клеток с H2DCFDA, что делает исследования цитотоксичности более длительными и сложными.

В разделе 3.3.2.3 приведено описание исследований генерации АФК под действием коммерческих противоопухолевых препаратов *in vitro* и *in vivo*.

Почти во всех злокачественных новообразованиях отмечается повышенная концентрация АФК, что способствует развитию и прогрессированию опухоли. В то же время опухолевые клетки экспрессируют антиоксидантные белки в повышенных уровнях, чтобы поддерживать

баланс внутриклеточного уровня АФК, необходимый для их жизнедеятельности. Тип и место генерации АФК, а также их локальная концентрация играют ключевую роль в поведении опухоли [26]. Следовательно, требуется высокочувствительный метод, позволяющий измерять уровень АФК в конкретных областях опухоли *in vivo*.

Разработанный метод был валидирован на модели опухоли предстательной железы. В ходе проведения экспериментов были использованы две линии опухолевых клеток 22Rv1 и PC3 (карцинома предстательной железы). Перед измерением внутриклеточной концентрации АФК клетки PC-3 и 22Rv1 инкубировали в течение 1 часа в среде при 37°C и 5% CO₂ с противоопухолевыми препаратами в концентрациях, соответствующих IC₅₀ для каждой клеточной линии. В качестве тестируемых противоопухолевых средств были выбраны следующие препараты: доксорубин, доцетаксел, цисплатин и абиратерон. Все препараты, за исключением абиратерона, способствуют образованию АФК в опухолевых клетках. В качестве положительного контроля использовали пероксид водорода в концентрации 100 мкМ. Внеклеточное введение H₂O₂ вызвало повышение его внутриклеточного уровня, что было зафиксировано на уровне отдельных клеток с помощью нанозлектрода. При инкубации опухолевых клеток с тестируемыми лекарственными средствами наблюдались различные значения тока внутри клеток, что указывает на вариативность концентрации АФК (рисунок 13).

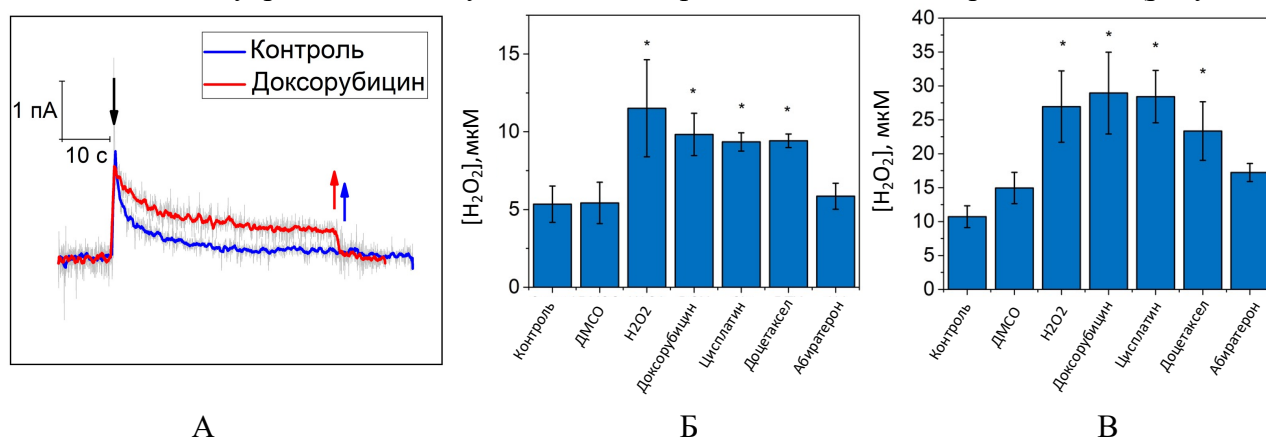


Рисунок 13 - Результаты измерения АФК в клетках под воздействием противоопухолевых препаратов. (А) Амперограммы, полученные внутри контрольной клетки и клетки, инкубированной с доксорубицином. Измерения проведены при постоянном потенциале +800 мВ относительно ХСЭ. Сравнение уровня АФК/АФА в клетках PC-3 (Б) и 22Rv1 (В) под воздействием различных противоопухолевых препаратов. Результаты представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ (ANOVA) .

На рисунке 13 А показано, что уровень тока внутри клетки под воздействием доксорубина значительно выше, чем в контрольной клетке, что указывает на влияние препарата на клетки и последующую внутриклеточную продукцию АФК. Аналогичные исследования были проведены с другими противоопухолевыми препаратами (рисунок 13 Б,В). Эти результаты демонстрируют, что разработанный метод позволяет определять генерацию АФК клетками под воздействием противоопухолевых препаратов. Основным преимуществом этого метода является короткое время инкубации с препаратом, что важно при скрининге большого количества лекарственных средств. Помимо использования относительно низких концентраций препарата, высокая чувствительность метода позволяет обнаруживать более низкие концентрации АФК по сравнению с другими методами. При использовании метода флуоресцентного анализа с использованием зонда CellROX Deep Red не удалось зарегистрировать образования АФК при добавлении противоопухолевых препаратов.

Наиболее важными с практической точки зрения является валидация метода *in vivo* на опухолевых моделях. Для этого был выбран доксорубин, вызывающий окислительный стресс, что ранее было продемонстрировано на клетках PC-3 и 22Rv1. Липосомальный доксорубин вводили внутривенно группе мышей (n=3), и через 24 часа оценивали уровень АФК внутри

опухоли на глубинах 200, 600, 1500 и 2000 мкм, сравнивая результаты с группой контрольных животных, которым вводили буферный раствор PBS.

Уровень АФК определяли по предельному диффузионному току в диапазоне потенциалов от -800 до +800 мВ относительно ХСЭ со скоростью развертки 400 мВ/с (рисунок 14). В контрольной группе мышей при проникновении в опухоль на глубину наблюдалось небольшое снижение тока, что связано с гипоксией при потенциале +800 мВ (отн. Ag/AgCl). В группе мышей, получивших доксорубин, значения тока значительно увеличивались на глубине 1000-1500 мкм. Поскольку опухоль является неоднородной, проникновение доксорубина варьируется по её частям.

После проведения электрохимических измерений опухоли у мышей удаляли и исследовали накопление доксорубина с использованием флуоресцентной системы визуализации IVIS *ex vivo*. Результаты показали, что флуоресценция доксорубина была значительно выше по сравнению с автофлуоресценцией контрольных опухолей, что подтверждает накопление доксорубина в опухолях мышей, получавших липосомальный доксорубин (рисунок 14).

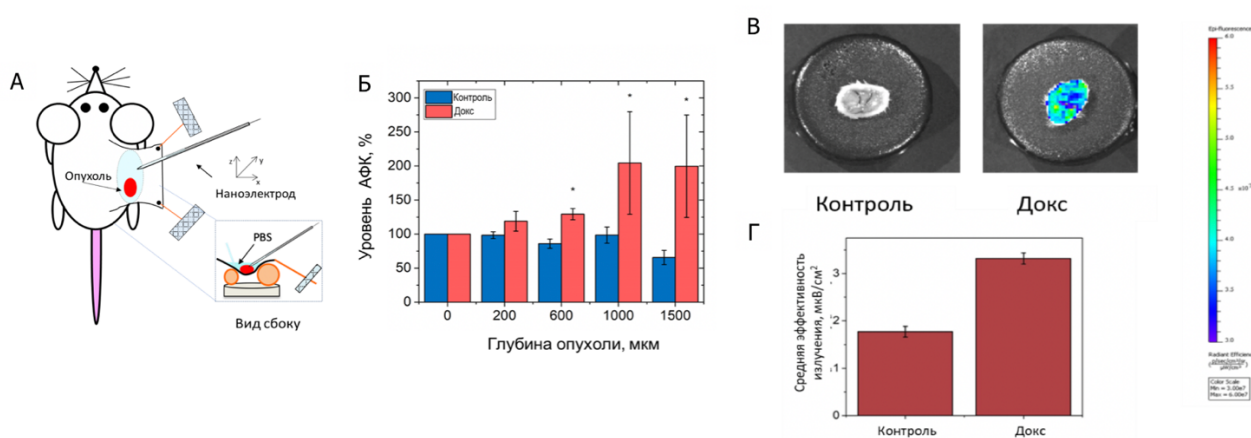


Рисунок 14 - *In vivo* измерения АФК внутри опухоли мыши. (А) Схема проведения эксперимента. (Б) Профиль АФК внутри опухолей мыши. Представлены данные по двум группам мышей: контрольная группа и группа мышей, получавших липосомальный доксорубин в дозе 2 мг/кг. (В) IVIS-изображения опухолей мышей *ex vivo*. (Г) График средней эффективности излучения опухолей, визуализированных *ex vivo*, у мышей, получавших доксорубин, и у контрольных животных

Было показано, что наноэлектрод можно использовать для измерения АФК у мышей с опухолями прижизненно. Это было впервые осуществлено с помощью стационарных вольтамперограмм *in vivo*. Применение доксорубина позволило нам впервые продемонстрировать возможность обнаружения АФК и оценки реакции на лечение у живых опухоленосителей. Это исследование подчеркивает практическую ценность данного подхода и указывает на его потенциал для изучения механизмов действия и мониторинга эффективности противоопухолевых препаратов, воздействующих на пути, связанные с АФК.

В разделе 3.3.2.4 Исследование эффективности новых таргетных органических молекул с помощью наноэлектродов с повышенной адгезией платины представлено применение разработанных сенсоров при проведении испытаний влияния новых препаратов на генерацию АФК в клетках.

В ходе работы был протестирован ряд таргетных препаратов, представляющих собой конъюгаты векторов, специфичных к рецепторам на поверхности клеток, таким как рецептор простат-специфического мембранного антигена (ПСМА) и асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R). ASGP-R и галактозамин (GalNAc) взаимодействуют и играют ключевую роль в регуляции метаболизма гликопротеинов и липопротеинов в организме. ASGP-R содержит специфические связывающие участки, распознающие GalNAc, что приводит к образованию комплекса между рецептором и гликопротеином с последующим переносом внутрь клетки.

Кроме того, взаимодействие ASGP-R с GalNAc используется для целевой доставки лекарств и генов в печень, что является основой для разработки таргетных препаратов.

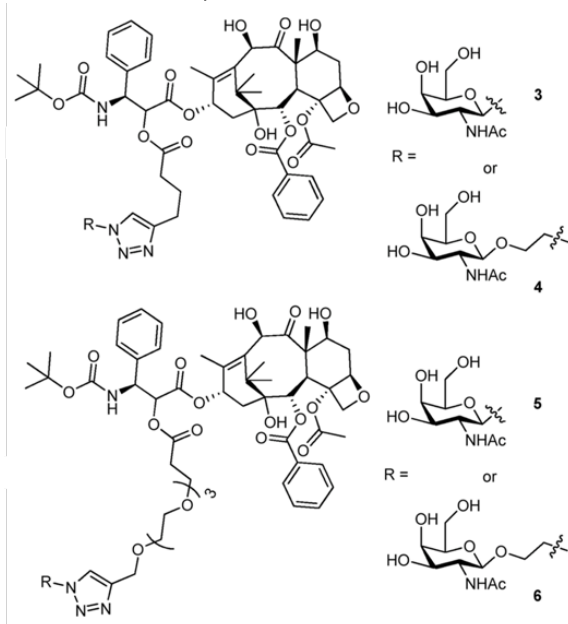


Рисунок 15 - Исследуемые конъюгаты на основе доцетаксела

Были исследованы соединения, специфичные к рецептору ASGP-R, на основе доцетаксела. Изучено влияние четырёх конъюгатов доцетаксела с вектором GalNAc, отличающихся длиной углеродной цепи между доцетакселем и GalNAc (рисунок 15). Эксперименты проводились на двух клеточных линиях: HEPG2, экспрессирующих рецепторы ASGP-R, и PC3, не содержащих этих рецепторов. В качестве контрольного соединения использовался непосредственно доцетаксел.

После инкубации конъюгатов и доцетаксела с клетками PC3 наблюдалось повышение уровня АФК, за исключением образца с конъюгатом 3. Однако общий уровень АФК не превышал значения, зафиксированного в клетках под воздействием доцетаксела. Это позволяет предположить, что проникновение конъюгатов 3-6 в клетки PC-3 аналогично проникновению доцетаксела (рисунок 16 А). При инкубации конъюгатов с клетками HepG2 (ASGP-R+) также было зарегистрировано значительное увеличение уровня АФК по сравнению

с контрольными клетками более чем в 1,5 раза. При сравнении с уровнем АФК в клетках, инкубированных с доцетакселем, конъюгат 6 вызвал значительное увеличение уровня АФК на 55% (рисунок 16 Б), что свидетельствует о его улучшенном проникновении внутрь клетки. Для оценки рецепторно-опосредованного эндоцитоза проводили ингибирование ASGP-R, инкубируя клетки с избыточным количеством GalNAc (100 мкМ). При добавлении соединения 6 уровень АФК уменьшился более чем в 1,6 раза по сравнению с экспериментом без ингибирования ASGP-R. Это указывает на то, что конъюгат 6 проникает в клетку благодаря механизму рецепторно-опосредованного эндоцитоза (рисунок 16 В).

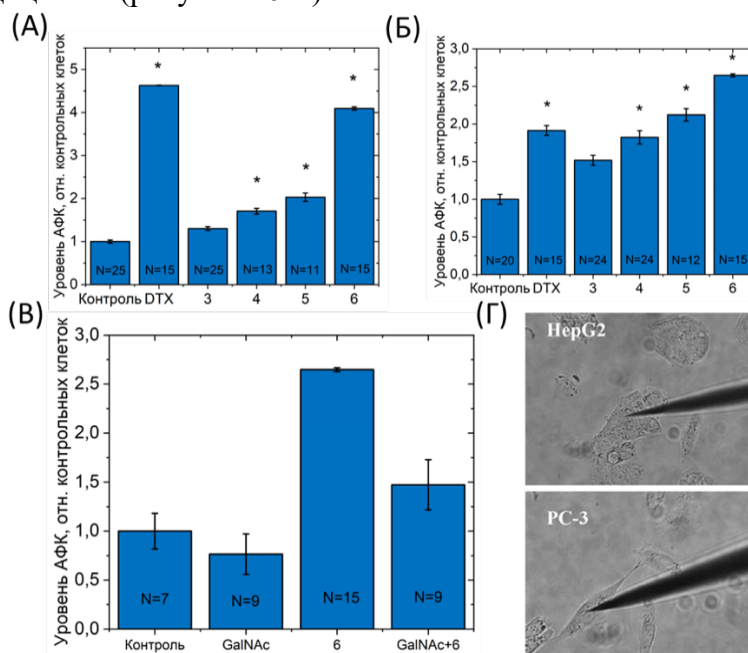


Рисунок 16 - Измерения уровня АФК внутри клеток: PC-3 (А), HepG2 (Б) и HepG2 в присутствии 100 мкМ GalNAc (В), обработанных конъюгатами 3–6 или доцетакселем (DTX) в течение 1 часа. Количество измеренных клеток указано на графике: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

С помощью разработанных сенсоров, чувствительных к АФК, удалось подтвердить эффективность новых низкомолекулярных конъюгатов бетулина и N-ацетил-D-галактозамина в качестве агентов, воздействующих на гепатоциты, а также их потенциал в качестве терапевтических средств против гепатоцеллюлярной карциномы.

В качестве препаратов, специфичных к ПСМА-рецепторам, были выбраны конъюгаты с активным веществом на основе доцетакселя и монометилауристатина Е (ММАЕ). Ранее нами была продемонстрирована эффективность этих ПСМА-векторов для доставки веществ с помощью флуоресцентных меток в экспериментах *in vivo*.

Было проведено сравнительное исследование влияния доцетакселя и его конъюгата на внутриклеточную продукцию АФК. Клетки были инкубированы в течение 1 часа при 37°C с этими препаратами, чтобы обеспечить их проникновение в одиночные клетки. После инкубации клеток РС3 с доцетакселем и его конъюгатом (ПСМА-Доц) статистически значимых изменений концентрации АФК по сравнению с контролем не наблюдалось (рисунок 18А). Этот факт свидетельствует об резистентности данной клеточной линии к этим веществам в течение 1 часа.

В случае клеточной линии 22Rv1 наблюдалось достоверное увеличение уровня АФК при воздействии как доцетакселя, так и его конъюгата. Конъюгат ПСМА-Доц, благодаря своей специфичности к ПСМА-рецепторам, вызвал значительное усиление окислительного стресса в клетках 22Rv1 (рисунок 17 Б).

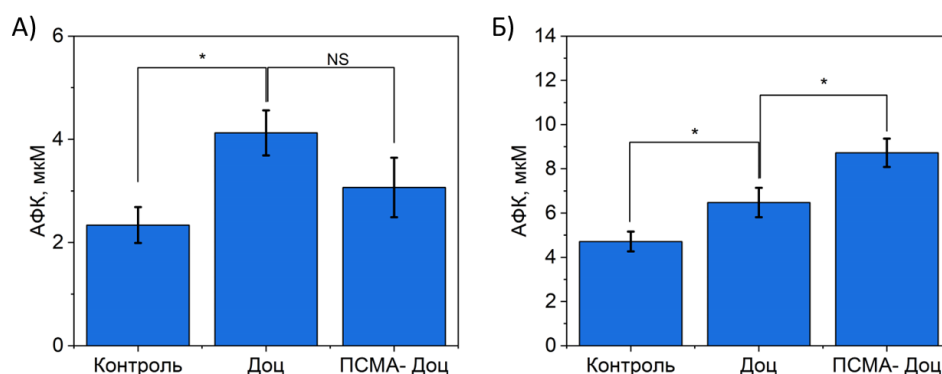


Рисунок 17 - Сравнение уровня АФК внутри клеток РС3 (А) и 22Rv1 (Б) под влиянием доцетакселя и ПСМА-доцетакселя. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ)

В течение часа значительное повышение уровня АФК наблюдалось при добавлении ММАЕ и ПСМА-ММАЕ. Следует отметить, что уровень АФК при воздействии ПСМА-ММАЕ превышал эффект самого ММАЕ и был в два раза выше значений для контрольной клеточной линии без препаратов, что указывает на высокую эффективность этого вещества для ПСМА-положительной клеточной линии. Эксперименты на клеточной линии 22Rv1 также подтвердили эффективность ММАЕ и ПСМА-ММАЕ. Уровень АФК при воздействии ПСМА-ММАЕ увеличился в 3 раза по сравнению с контролем. Таким образом, ММАЕ и ПСМА-ММАЕ эффективно индуцировали окислительный стресс в обеих клеточных культурах, вызывая гибель клеток. Таким образом, на примере таргетных препаратов было показано, что они могут проникать в клетки при наличии соответствующих рецепторов значительно эффективнее своих предшественников. Результаты измерений АФК и проникновения в клетки были подтверждены с использованием флуоресцентных и других методов. Данные представлены в опубликованных статьях.

В разделе 3.3.3.1 Исследование эффективности образования АФК при ФДТ за счет облучения флавиномононуклеотида в клетках меланомы продемонстрирована возможность проведения измерений генерации токсичных радикалов в режиме реального времени. Фотодинамическая терапия (ФДТ) - клинически утвержденный метод лечения онкологических патологий, включая немеланомный рак кожи. В этом исследовании нами изучена эффективность генерации активных форм кислорода под воздействием синего света на флавиномононуклеотид (ФМН), водорастворимую форму рибофлавина (витамин В2), как перспективный агент для

фотодинамической терапии меланомы. В этом исследовании нами впервые был применен стабильный электрохимический зонд, основанный на платинированных углеродных нанoeлектродах, для измерения уровня внутриклеточных АФК во время ФДТ. Для эксперимента клетки меланомы A375 и Mel IL инкубировали в темноте в течение 30 минут с 100 мкМ ФМН с последующей промывкой от несвязанного препарата. Первоначально введение нанoeлектрода вызвало резкое увеличение уровня АФК из-за механического стресса, однако, благодаря малым размерам (диаметр около 100 нм), нанoeлектрод минимально повреждал клетку, и уровень АФК возвращался к исходному значению в течение 10-50 секунд.

Важно отметить, что в клетках A375 всплеск АФК был в 10 раз выше, чем в клетках Mel IL (рисунок 18), что можно объяснить антиоксидантной активностью меланина в клетках Mel IL. Измерения АФК, индуцированные светом, начинались, когда сигнал достигал плато, что можно рассматривать как фоновый уровень АФК для этой клеточной линии. Облучение светом приводило к быстрому увеличению продукции АФК, что можно было количественно оценить (рисунок 18 А). В результате клетки A375, предварительно инкубированные с 100 мкМ ФМН, продуцировали 56 ± 15 мкМ АФК, в то время как клетки Mel IL – всего $18,5 \pm 4$ мкМ (рисунок 19 В). Прекращение облучения светом приводило к немедленному возврату уровня АФК к фоновому внутриклеточному уровню из-за короткого времени жизни АФК. Этот подход позволил контролировать продукцию АФК методом электрохимического измерения в режиме реального времени до и в процессе облучения, что невозможно при использовании традиционных флуоресцентных методов.

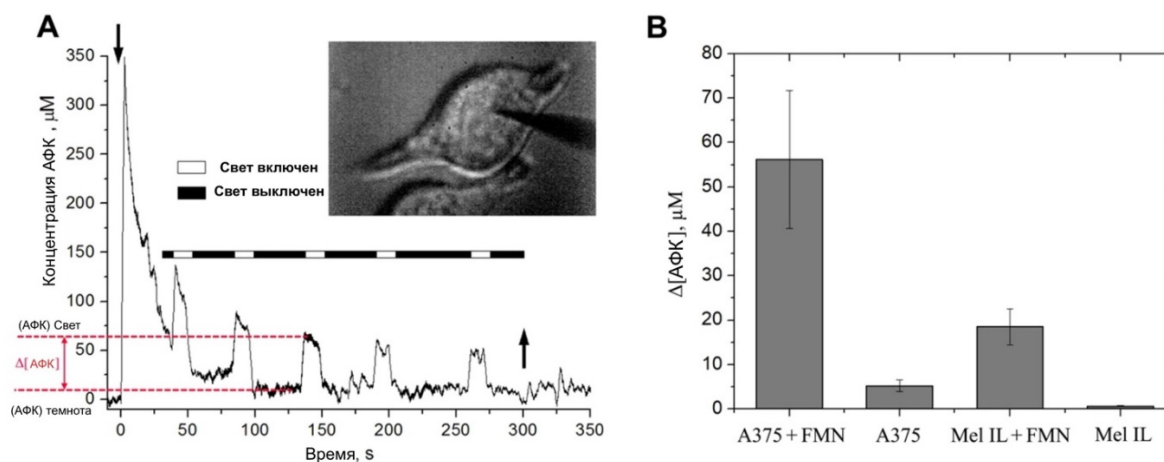


Рисунок 18 - (А) Черная шкала указывает на отсутствие света, белая шкала - на включение света. Моменты введения и извлечения электрода из клетки обозначены стрелками вниз и вверх соответственно; в правом верхнем углу показано изображение нанoeлектрода, введенного в клетку. Изменение уровня АФК под воздействием светового облучения рассчитывалось по формуле: $\Delta[\text{АФК}] = [\text{АФК}]_{\text{свет}} - [\text{АФК}]_{\text{темнота}}$. (В) Сравнение $\Delta[\text{АФК}]$, измеренных в облученных синим светом клетках меланомы A375 и Mel IL, как предварительно инкубированных с ФМН, так и контрольных

В разделе 3.3.3.2 «Исследования активации генерации АФК нейтрофилами человека при воздействии бактерий» продемонстрирована возможность использования разработанных электродов для исследования миллисекундных биофизических процессов, таких как продуцирование АФК нейтрофилами. Исследование активных форм кислорода в нейтрофилах имеет важное значение для понимания механизмов иммунной реакции и роли этих клеток в защите организма от инфекций и воспалительных процессов. Нейтрофилы вырабатывают АФК для уничтожения бактерий и других патогенов. При проведении внутриклеточных измерений фаголизомы нейтрофила случайным образом взаимодействовали с поверхностью платинового нанoeлектрода (рисунок 19 А). Окисление активных форм кислорода, высвобождаемых из отдельных везикул, приводило к увеличению тока на электроде в виде спайка, процесс занимал около 2 мс. Измерения проводились кулонометрически, и площадь под амперограммой отражала полное окисление АФК в каждой везикуле (рисунок 19 Б, В).

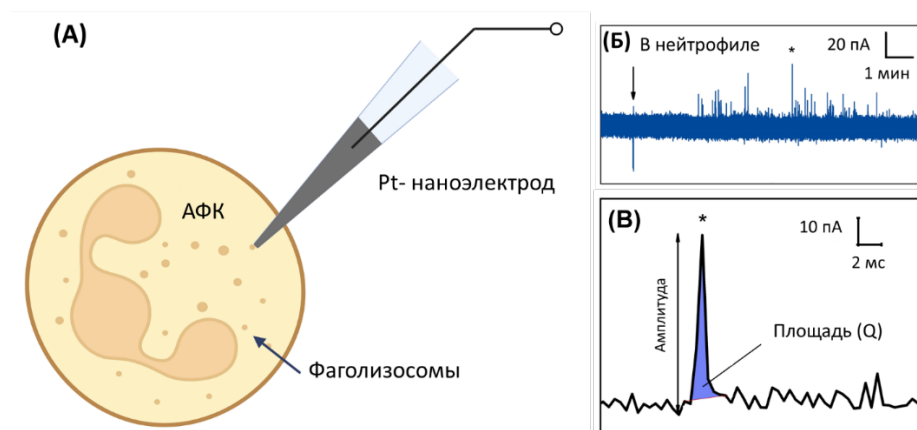


Рисунок 19 - Принцип электрохимического определения АФК внутри нейтрофилов с использованием Pt нанoeлектрода. А) Схема эксперимента, демонстрирующая внутриклеточное измерение. Б) Хроноамперограмма, записанная внутри нейтрофила. В) Спайк тока за счет генерации АФК

В работе продемонстрирована активация разными видами бактерий: *E.coli* и *S.aureus*. На рисунке 20 представлен статистический анализ заряда, проходящего после высвобождения АФК из везикулы, и амплитуды пиков. Соответствующие распределения демонстрируют, что количество АФК, высвобождаемое каждой фаголизосомой, варьировалось. Количество АФК, производимых под воздействием *S. aureus*, было в 5.5 раз больше по сравнению с воздействием *E. coli*. Таким образом, разработанный метод позволил исследовать быстрые процессы с временным разрешением ~ 0.5 мс, что дало возможность измерить заряд и амплитуду возникающих спайков тока при столкновении фаголизосом с поверхностью нанoeлектрода.

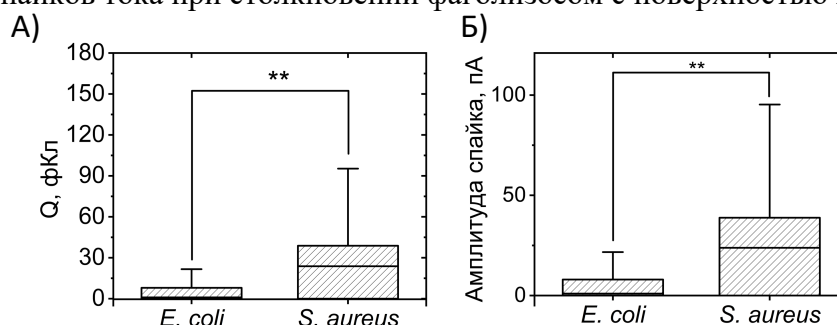


Рисунок 20 - Сравнение продукции АФК внутри нейтрофилов под воздействием двух различных культур. а) средняя площадь под кривой спайка, представленная как заряд, прошедший при окислении фаголизосомы. Значения указаны в фемтокуллонах. б) средняя амплитуда спайков, значения приведены в пикоамперах. Количество спайков: для *E.coli* (N = 166), для *S.aureus* (N = 392). ** - $p < 0.001$ (ANOVA)

В разделе **3.3.4 Локальное измерение градиентов молекулярного кислорода в биологических системах** представлены расширенные возможности использования платинового нанoeлектрода на отрицательных потенциалах относительно ХСЭ.

Для этого был разработан метод, обеспечивающий высокочувствительное и селективное определение кислорода как в растворах, так и в живых системах. Рисунок 21 показывает типичную вольт-амперную зависимость для углеродного и платинового нанoeлектродов. Характерное плато на вольт-амперной кривой платинового нанoeлектрода обусловлено реакцией $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$. Ток, измеряемый при этих потенциалах, находится в прямой зависимости от концентрации кислорода в растворе.

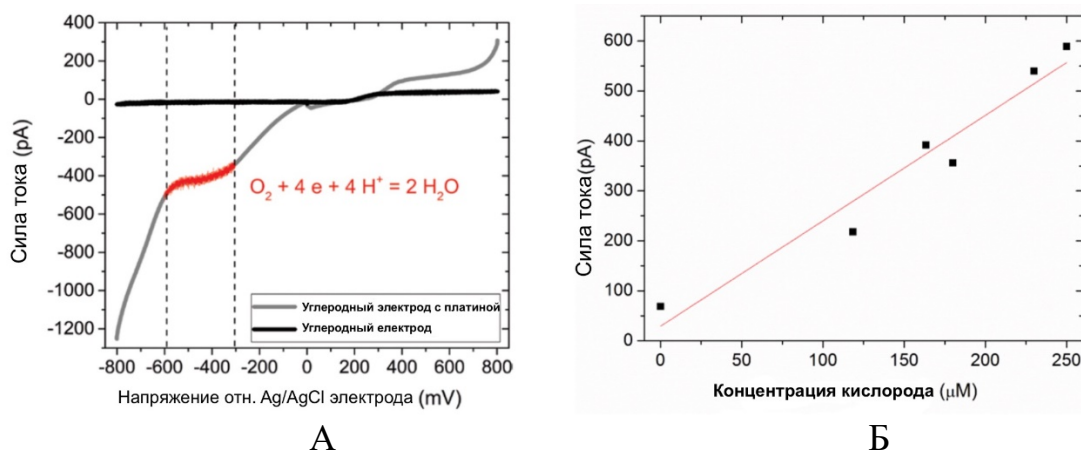


Рисунок - 21 (А) Вольтамперные кривые углеродного и платинизированного электрода; (Б) Калибровочный график для платинизированного нанoeлектрода

Для построения калибровочного графика проводились одновременные измерения восстановления O_2 с помощью коммерческого электрода типа Кларка (модель Expert-001, Expert, Россия) и разработанного платинового нанoeлектрода, погружённых в искусственную прудовую воду (ИПВ). Содержание O_2 в растворе регулировалось добавлением Na_2SO_3 в различных концентрациях. Концентрация растворённого кислорода определялась по значениям электрического тока стандартного электрода Кларка для pO_2 .

Для проверки работоспособности кислородных сенсоров на клетках *C. corallina* были измерены изменения концентрации O_2 вблизи поверхности клетки при переходах от света к темноте (рисунок 22). Фотосинтетическое образование O_2 на свету увеличивало его концентрацию до 20-30 мкМ. После перехода в темноту дыхание снижало уровень O_2 рядом с поверхностью клетки. Одним из ключевых преимуществ этих электродов является их высокое пространственное разрешение, что позволяет отслеживать изменения концентрации O_2 на расстоянии всего нескольких микрометров от места микроповреждения клеточной стенки.

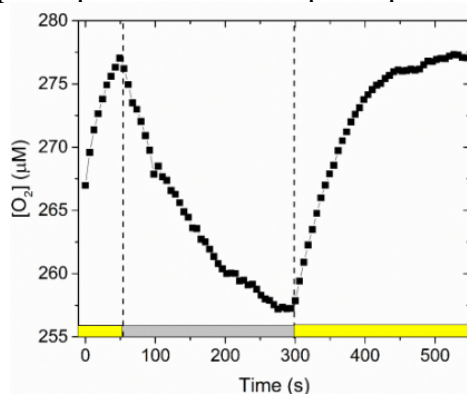


Рисунок 22 - Изменения концентрации кислорода на расстоянии нескольких микрометров от поверхности клетки *Chara corallina* при прерывистом освещении. Желтые и серые полосы вдоль оси абсцисс

В работе нами была продемонстрирована возможность измерения в верхних слоях коры головного мозга крысы (рисунок 23). Стабильность тока и низкая инвазивность метода позволили осуществлять мониторинг содержания O_2 *in vivo* в мозге крыс. Было установлено, что концентрация кислорода уменьшалась при продвижении электрода внутрь, а резкое увеличение уровня кислорода можно объяснить гетерогенным распределением кровеносных сосудов (рисунок 23).

Также был смоделирован процесс церебральной ишемии средней степени тяжести путем зажима обеих общих сонных артерий хирургическими зажимами (рисунок 23В). Затем зажимы удаляли, и кровоток в сонных артериях восстанавливался. После освобождения от зажимов артерий наблюдалось постепенное увеличение содержания кислорода, которое со временем

превышало базовую концентрацию кислорода. За счет наноразмеров электрода можно было наблюдать динамические процессы в мозге крысы *in vivo* (рисунок 23).

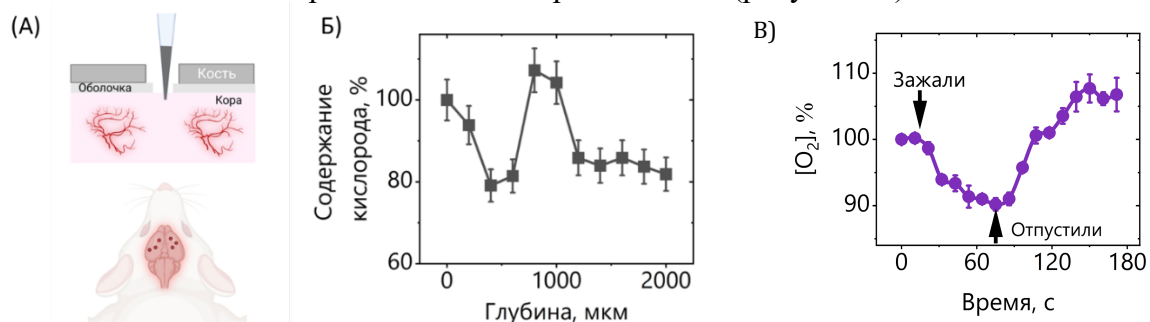


Рисунок 23 - (А) Схема проведения эксперимента *in vivo* с помощью платинового элетрода (Б) Кислородный профиль, полученный в коре головного мозга крысы

Раздел 3.4 Исследование распределения платиносодержащих соединений в биосистемах методом электрохимической локальной детекции с помощью платиновых наноэлектродов посвящен расширению возможностей разработанных электродов для селективной детекции платиносодержащих препаратов, в том числе цисплатина и его производных. Детекция комплексов Pt(II) осуществлялась в режиме циклической вольтамперометрии, Наличие Pt(II) в растворе соответствовало пику окисления при потенциале 0,65-0,7 В относительно ХСЭ. На рисунке 24 А приведена зависимость пика в виде функции скорости сканирования потенциала, которая может быть описана уравнением Рэндлса-Шевчика. Согласно этому уравнению, зависимость пика тока I_p от скорости сканирования пропорциональна квадратному корню из v , что указывает на процесс, контролируемый диффузией.

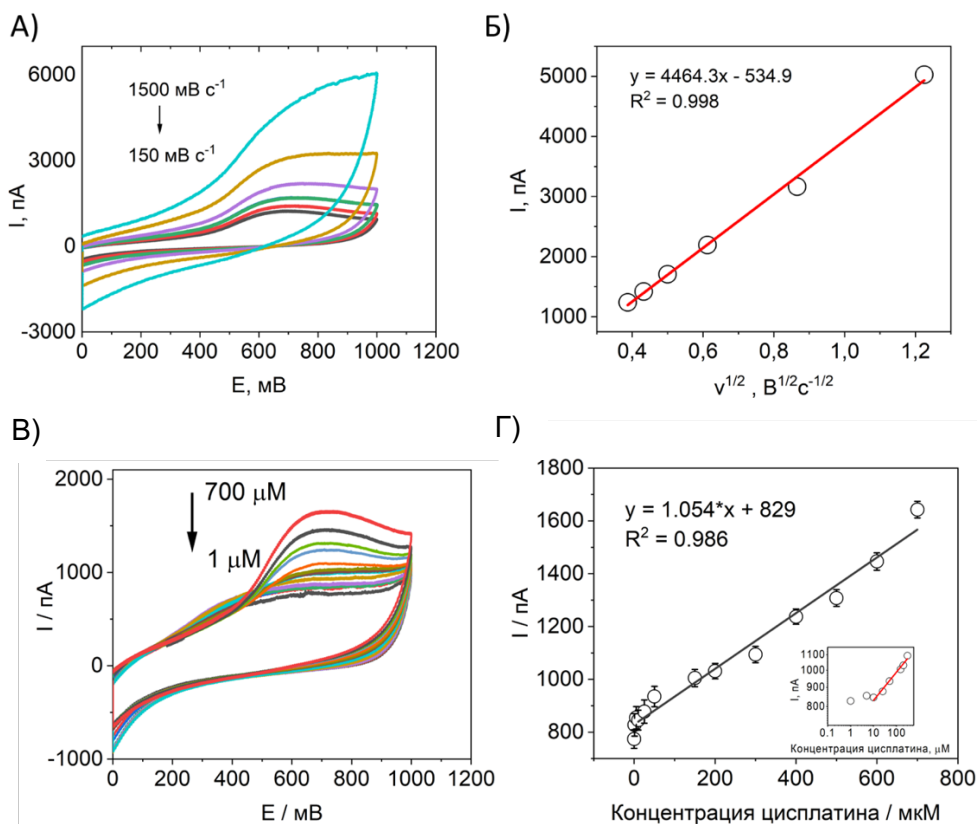


Рисунок 24 - А) Влияние скорости сканирования (150-1500 мВс⁻¹) на ЦВ в присутствии 0,5 мМ цисплатина в растворе PBS. Б) График зависимости I_p от $v^{1/2}$ А) ЦВ для различных концентраций цисплатина. Б) Калибровочный график пика тока для цисплатина в растворе PBS

С увеличением скорости сканирования (150-1500 мВ/с) наблюдался незначительный сдвиг потенциала для I_p , что объясняется вкладом емкостных токов, которые особенно проявляются на больших скоростях развертки потенциала. Таким образом, надо учитывать вклад базовой линии на I_p при проведении измерений. Для процессов, контролируемых диффузией и описываемых уравнением Рэндлса-Шевчика свойственна линейная зависимость $I_f \sim C$. Для количественной оценки детекции комплексов Pt (II) в живых системах предварительно была проведена калибровка нанoeлектрода с использованием растворов цисплатина в PBS (рисунок 24 В).

Экспериментальные данные зависимости пикового тока от объемной концентрации имеют хорошо аппроксимируемую линейную зависимость (рисунок 24 Г). Предел обнаружения этого сенсора составил 1 мкМ. Перед проведением *in vitro/in vivo* экспериментов была выполнена оценка влияния ДНК и БСА на форму пика ЦВ. Результаты показали, что указанные биомолекулы существенно не влияют на проведение *in vitro/in vivo* электрохимических измерений.

Нами был исследован вклад в амплитуду тока ЦВ присутствие H_2O_2 , по причине того, что цисплатин индуцирует образование АФК в клетках. ЦВ регистрировались в растворах цисплатина с добавлением H_2O_2 в физиологической концентрации (0-10 мкМ), что сопровождалось увеличением тока при добавлении H_2O_2 (рисунок 25 А).

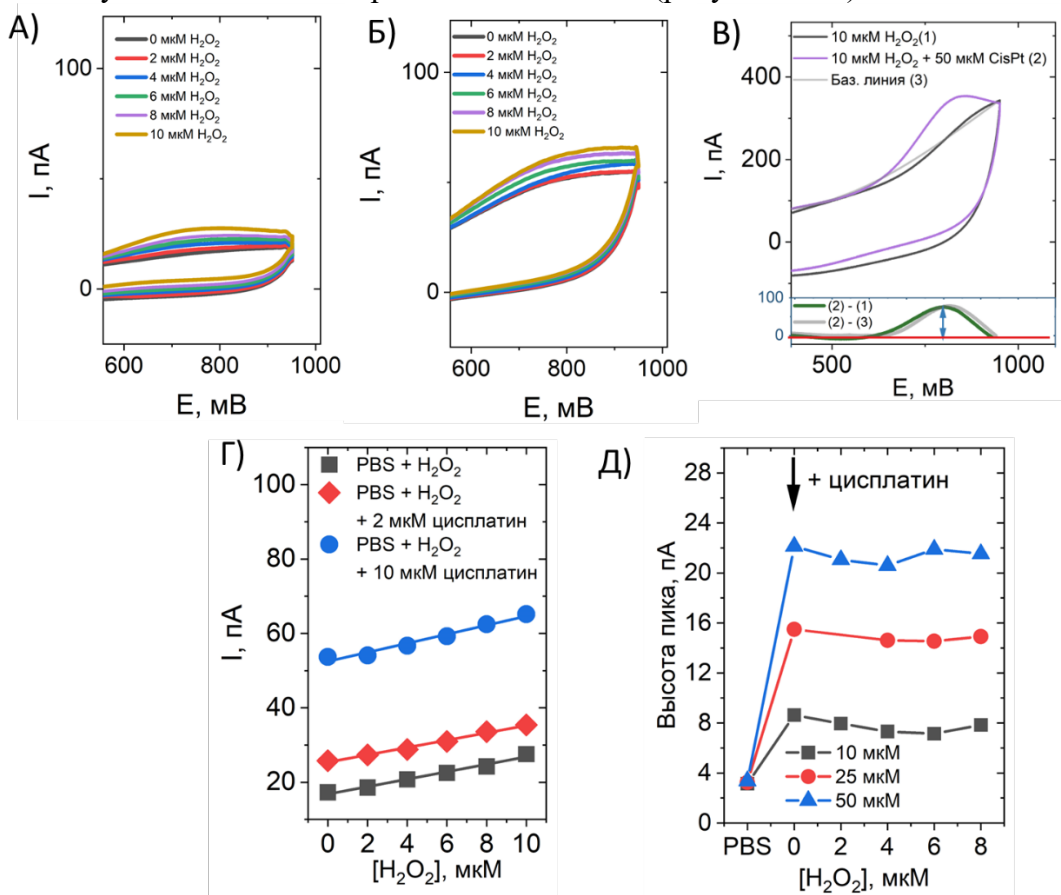


Рисунок 25 - (А) Циклические вольтаммограммы H_2O_2 в PBS в различных концентрациях (0-10 мкМ) (Б) ЦВ в растворе 10 мкМ цисплатина с варьированием концентрации H_2O_2 (0-10 мкМ) (В) ЦВ в 10 мкМ H_2O_2 и 10 мкМ H_2O_2 + 50 мкМ цисплатина. В нижней вставке график пика анодного тока за вычетом базового значения, обусловленного предельным диффузионным током перекиси водорода и емкостного тока (Г) Измеренный ток при потенциале +800 мВ в разных растворах перекиси водорода (0-10 мкМ) и смеси перекиси водорода и 2 или 10 мкМ цисплатина (Д) Зависимость высоты анодного пика окисления цисплатина от концентрации H_2O_2 . Все измерения проводились в растворе PBS (pH 7,4).

Скорость сканирования - 250 мВ с⁻¹

В 10 мкМ растворе цисплатина ток в диапазоне 200-800 мВ увеличивался по мере увеличения концентрации H_2O_2 (рисунок 25 Б). Для определения высоты анодного пика была рассчитана базовая линия (рисунок 25 В). Был визуализирован пик высоты анодного тока за вычетом базового значения, обусловленного предельным диффузионным током перекиси водорода и емкостного тока. Наклон зависимости тока при +800 мВ от концентрации добавленного перекиси водорода был одинаковым в растворах цисплатина с различными концентрациями (рисунок 25 Г). Исходная линия соответствовала ЦВ в 10 мкМ растворе пероксида водорода. Было показано, что с увеличением концентрации H_2O_2 фоновый ток в диапазоне 200-800 мВ возрастал, однако высота анодного окислительного пика Pt(II)/Pt(IV) оставалась неизменной (рисунок 25 Д). Следовательно, предложенный способ вычета базовой линии, обусловленной окислением пероксида водорода, позволяет исключить влияние содержания H_2O_2 на обнаружение Pt(II) в образцах.

В диссертационной работе далее будет продемонстрирована возможность определение комплексов Pt(II) внутри единичных клеток, сфероидов и опухолей *in vivo*. Для оценки внутриклеточных концентраций цисплатина в клеточной линии проводили инкубацию клеток MCF-7 с 100 мкМ цисплатина в течение 6 и 24 часов. После 6-часовой инкубации был выявлен воспроизводимый пик окисления цисплатина. С течением времени, после 24-часовой инкубации наблюдалось снижение концентрации цисплатина в клетках (рисунок 26). Нами было проведено сравнительное исследование по накоплению высоколипофильного пролекарства DNP с немодифицированным цисплатином. DNP представляет собой цисплатин, модифицированный двумя аксиальными лигандами напроксена, с целью улучшения его накопления в клетках.

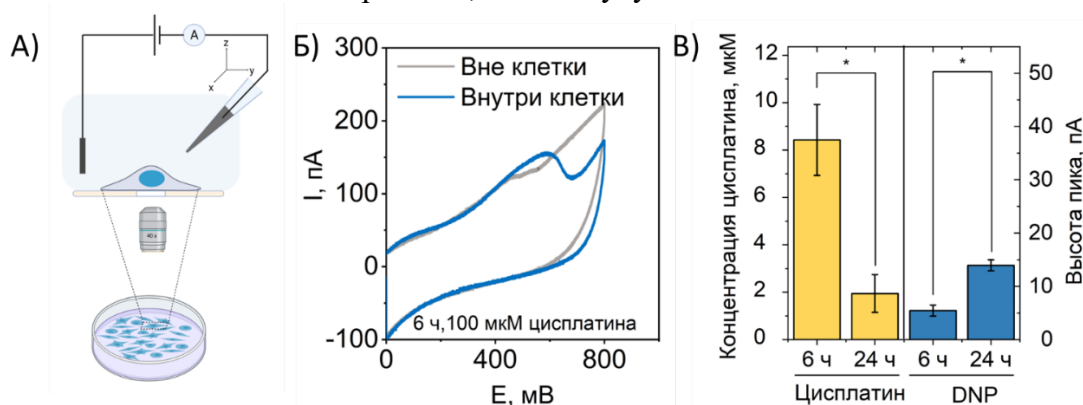


Рисунок 26 - А) Схематическое изображение электрохимической детекции цисплатина в единичных клетках. Б) ЦВ внеклеточного и внутриклеточного измерения цисплатина после инкубации клеток в 100 мкМ растворе в течение 6 часов. В) Накопление DNP и цисплатина в клетках MCF-7 через 6 и 24 часа

DNP действует как пролекарство, проникая в клетку в форме Pt(IV) и медленно высвобождая цисплатин. В ходе исследования клетки MCF-7 инкубировались с 5 мкМ DNP в течение 6 и 24 часов. По истечении 24 часов инкубации с DNP наблюдался рост анодного пика, что связывалось с накоплением DNP и последующим высвобождением цисплатина. Увеличение концентрации цисплатина при использовании DNP оказалось сопоставимым с результатами для 100 мкМ цисплатина, несмотря на значительно меньшую концентрацию DNP. С помощью разработанных наноэлектродов был проведен сравнительный анализ накопления цисплатина и DNP внутри 3D-сфероидов. Наличие области гипоксии, соответствующих градиентов кислорода, ограниченная диффузия препаратов делают их максимально приближенными к моделям опухоли *in vivo*.

Для измерения концентрации цисплатина на разных уровнях сфероида на основе MCF-7 использовался наноэлектрод, вводимый в сфероид с шагом в 5 мкм. Полученные ЦВ (рисунок 27) показали присутствие Pt(II) как в предварительно инкубированных с цисплатином, так и с DNP сфероидах MCF-7. Внутри сфероидов наблюдалось высокое накопление более липофильного пролекарства DNP по сравнению с цисплатином (рисунок 27 Б). Установлено, что наибольшие концентрации цисплатина и DNP наблюдались во внешнем слое сфероидов,

снижаясь по мере приближения к ядру. Эти результаты соответствуют ранее опубликованным данным, полученным с применением LA-ICP-MS для анализа цисплатина и его производных в сфероиде. После успешной валидации измерений на опухолевых сфероидах были проведены измерения *in vivo* на модели мышинной карциномы молочной железы EMT6 (рисунок 28). Группам мышей вводили внутривенно 2 мг/кг цисплатина или DNP, тогда как контрольной группе вводили PBS. Следует отметить, что стабильность нанозэлектрода и его электрохимические характеристики сохранялись после *in vivo* измерений. Так, в опухолях, обработанных DNP, наблюдалось более глубокое проникновение препарата по сравнению с цисплатином, что согласуется с ранее полученными результатами, подтверждающими более эффективное накопление DNP в клетках и сфероидах по сравнению с цисплатином, как было описано выше (рисунок 28).

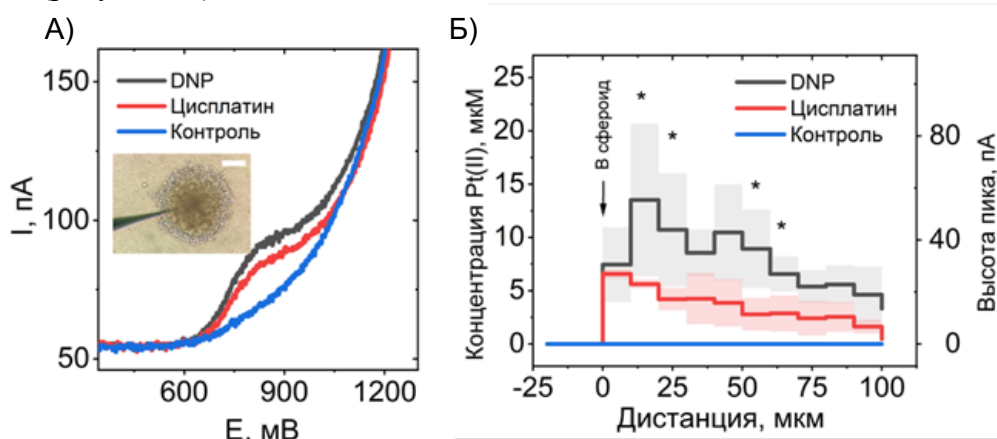


Рисунок 27 - А) ЦВ, зарегистрированные внутри сфероида под воздействием цисплатина и DNP. Б) Профили накопления DNP и цисплатина внутри сфероидов

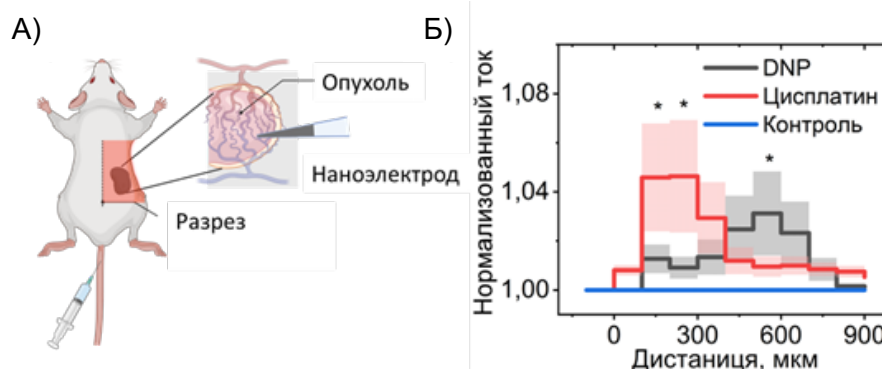


Рисунок 28 - (А) Схема проведения эксперимента (Б) Профиль распределения цисплатина и DNP внутри опухоли

Эффективность противоопухолевой терапии во многом зависит от способности лекарственных препаратов достигать целевого участка в организме. Метод электрохимического определения ионов Pt^{2+} с помощью платинированного нанозэлектрода позволяет проводить прямую количественную оценку содержания платинсодержащих препаратов в терапевтической зоне, что дает возможность оценивать их эффективность. В данной работе исследовано производное $Pt(II)$ - $Pt-Mnz$, индуцированный гипоксией. Предполагается, что нитроароматический компонент комплекса $Pt-Mnz$ способствует его направленной доставке в зоны гипоксии благодаря необратимому восстановлению нитрогруппы. В качестве контрольных соединений были синтезированы два пролекарства $Pt(IV)$ - $Pt-COOH$ и $Pt-Pcm$, в которых использованы невосстанавливаемые аксиальные лиганды (рисунок 29).

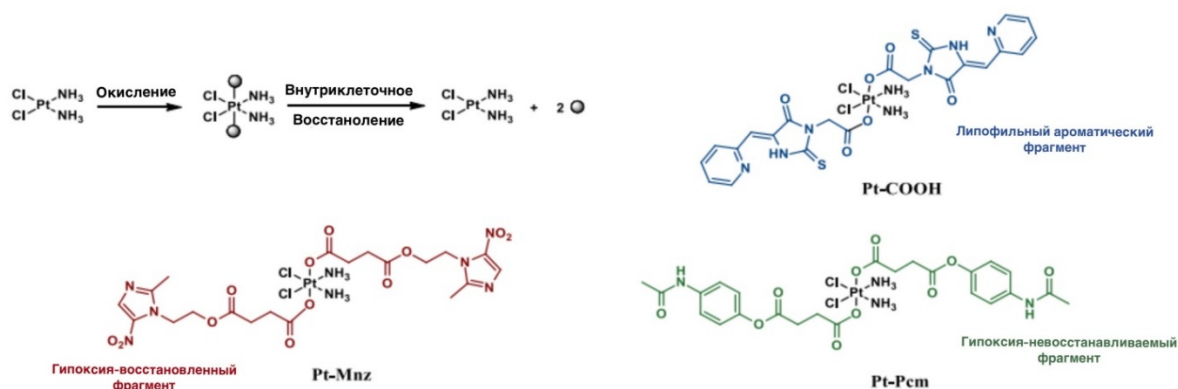


Рисунок 29 - Пролекарства платины(IV) с гипоксически-чувствительными аксиальными лигандами Pt-Mnz и контрольные соединения Pt-Pcm, Pt-COOH

3D-сфероиды являются полезным инструментом для исследования гипоксии и активируемых гипоксией агентов, поскольку такие клеточные модели более точно имитируют реальные опухоли. ЦВ были записаны на различных глубинах сфероидов, пик окисления Pt(II)/Pt(IV) наблюдался при потенциале 0,6–0,7 В относительно Ag/AgCl. Предполагалось, что конъюгат метронидазола с цисплатином должен восстанавливаться в глубине сфероидов, способствуя удержанию цисплатина в гипоксической зоне (рисунок 30 А). С использованием платинового нанозэлектрода для электрохимических измерений в отдельных сфероидов можно также зафиксировать восстановление метронидазола внутри сфероидов. В качестве модели гипоксической опухоли использовали сфероид MCF-7. Для подтверждения наличия гипоксии внутри сфероидов MCF-7 был измерен профиль распределения кислорода на разных глубинах. Уровень pO_2 в 3D-модели опухоли определяли, погружая платиновый нанозлектрод на различные глубины внутри сфероидов. На глубине 40 мкм уровень кислорода уменьшался в пять раз по сравнению с уровнем на поверхности (рисунок 30 А). Результаты ЦВ-измерений в сфероидов MCF-7, инкубированных с пролекарствами Pt-Mnz, Pt-Pcm, Pt-COOH и цисплатином, демонстрируют, как концентрация Pt^{2+} меняется с увеличением глубины сфероидов (рисунок 30 В). Профиль распределения Pt^{2+} типичен для сфероидов: наибольшая концентрация Pt^{2+} наблюдается у поверхности сфероидов, а с увеличением глубины концентрация снижается из-за ограниченной диффузии. Для пролекарств Pt-COOH и Pt-Pcm профили распределения Pt^{2+} схожи с аналогичными для цисплатина (рисунок 31 В, фиолетовая и синяя линии). Несмотря на высокую липофильность, Pt-COOH не накапливается в гипоксических зонах сфероидов. Сравнение способности накапливать Pt^{2+} между Pt-COOH и цисплатином показывает, что быстрая деградация пролекарств Pt(IV) снижает их эффективность. Это указывает на то, что эффективность пролекарств Pt-COOH и Pt-Pcm сопоставима с цисплатином.

Для подтверждения роли метронидазола в поведении Pt-Mnz внутри сфероидов было изучено восстановление нитрогруппы метронидазола Pt-Mnz на глубине сфероидов. Сначала было проведено электрохимическое исследование раствора метронидазола в буфере PBS с использованием платинового нанозэлектрода. Восстановление нитрогруппы наблюдалось в диапазоне от (–860) до (–700) мВ ($-NO_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow -NHOH + H_2O$).

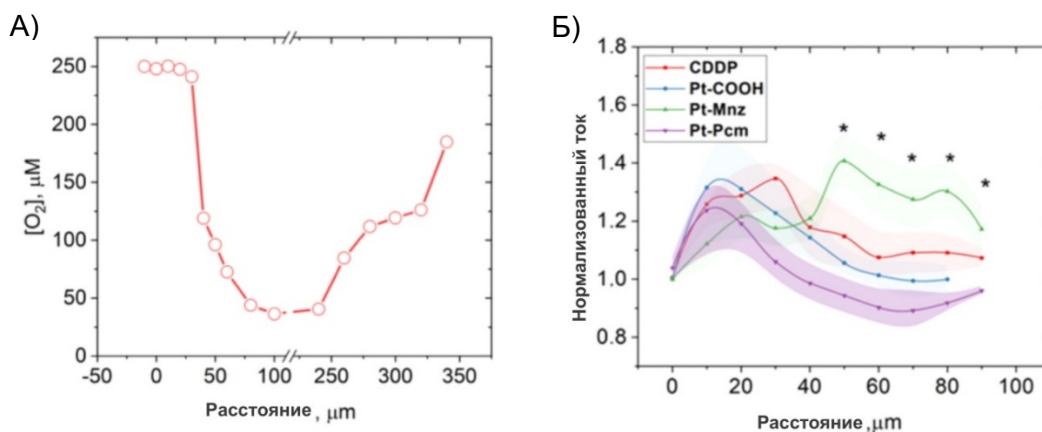


Рисунок 30 - (А) Профиль содержания кислорода на разных глубинах сфероидов MCF-7, измеренный с использованием платинового нанозэлектрода. (Б) Профиль распределения Pt^{2+} в сфероидах MCF-7, инкубированных с пролекарствами Pt(IV) и цисплатином в течение 6 ч.

Нормализованный ток в зависимости от расстояния от поверхности сфероида MCF-7, инкубированного с Pt-Mnz ($n = 3$), Pt-COOH ($n = 4$), Pt-Pcm ($n = 4$) и цисплатином ($n = 3$). Ток прямо пропорционален концентрации Pt^{2+} . Стандартная ошибка обозначена цветным фоном. * $p < 0,05$ (ANOVA)

Затем сфероиды MCF-7 инкубировали с Pt-Mnz в течение 2 часов и фиксировали электрохимически восстановление метронидазола по мере его проникновения в гипоксическую зону. Пик тока, указывающий на восстановление метронидазола, постепенно появлялся на внутриклеточных ЦВ по мере увеличения глубины проникновения наносенсора в сфероид с Pt-Mnz (рисунок 31 В). Чем ниже концентрация кислорода в сфероиде, тем более выражен пик восстановления метронидазола до гидроксиламина. Таким образом, чувствительное к гипоксии восстановление метронидазола было впервые подтверждено в сфероиде MCF-7 при помощи электрохимического метода. Примечательно, что электрохимическое обнаружение возможно по всему объему сфероидов, тогда как флуоресцентные метки обычно ограничиваются только поверхностным слоем (до 50 μm).

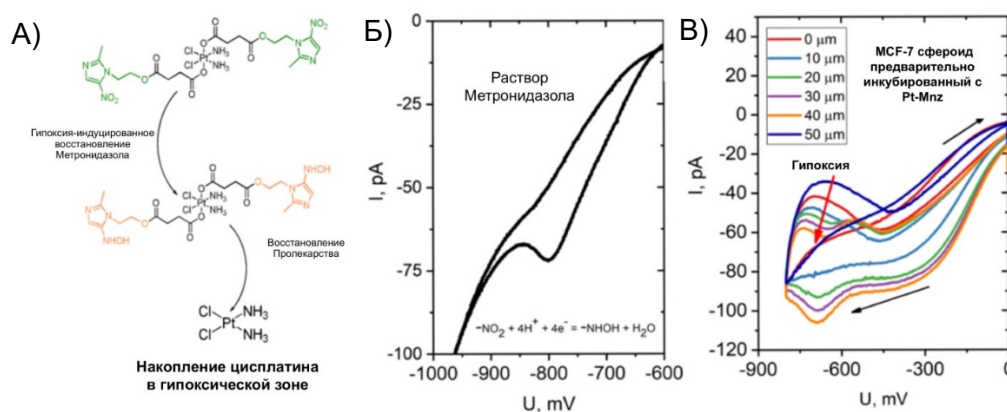


Рисунок 31 - (А) Схематическое изображение внутриклеточного метаболизма Pt-Mnz. (Б)

Циклические вольтамперограммы раствора метронидазола (1 mM) в буфере PBS, зарегистрированные с использованием платинового нанозэлектрода при скорости сканирования 400 мВ/с. (В) Вольтамперограммы, снятые на разных глубинах сфероидов MCF-7, предварительно инкубированных с Pt-Mnz в течение 2 часов. Восстановление метронидазола и снижение уровня кислорода указаны стрелками. Скорость сканирования составила 400 мВ/с

Фотоактивируемые пролекарства являются инновационными соединениями, представляющими собой конъюгаты комплексов Pt(II) с фотосенсибилизатором, который активируется видимым или ближним ИК-светом. Возбуждение фотосенсибилизатора вызывает перенос электрона к центру комплекса Pt(IV), что приводит к восстановлению пролекарства и

высвобождению активного комплекса Pt(II). Кроме того, использование фотосенсибилизатора, генерирующего АФК, в сочетании с комплексами Pt(II) позволяет объединить ФДТ и химиотерапию в одном препарате. В данной работе использовалось пролекарство Pt(IV) (рибоплатин), основанное на цисплатине и тетраацетилрибофлавине (TARF) в аксиальном положении. На рисунке 32 А представлена схема проведения электрохимических измерений внутри сфероидов с использованием платинового нанoeлектрода. Для внутрисфероидного обнаружения и количественного анализа H_2O_2 измерения проводили при постоянном напряжении +800 мВ относительно ХСЭ. Разница между силой тока при включении и выключении света измерялась на различных глубинах сфероидов (рисунок 32 Б). Облучение синим светом приводило к значительному увеличению значений тока.

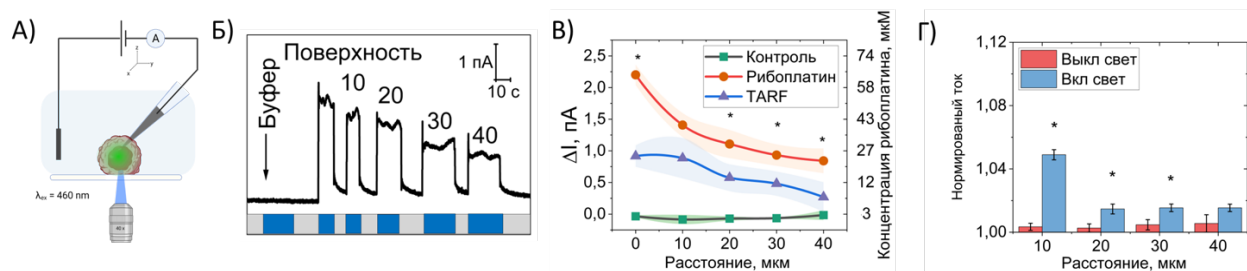


Рисунок 32 - А) Схема проведения эксперимента на сфероиде. Б) Хроноамперограмма, записанная внутри сфероидов на глубине от 0 до 40 мкм. Синим цветом показано включение света. В) Измерение АФК внутри сфероидов под воздействием света на накопленные рибоплатин и TARF. Г) Измерение комплексов Pt(II) внутри сфероидов под воздействием света

Выключение света приводило к возвращению уровня тока к исходному значению. Обобщенные данные по накоплению АФК, обнаруженных на различных глубинах сфероидов при облучении, представлены на рисунке 33В. В сфероиде, предварительно инкубированном с рибоплатином, уровень АФК был выше, чем в сфероиде, инкубированном с TARF, что подтверждало способность рибоплатина лучше накапливаться в клетках.

Для электрохимического обнаружения фотоиндуцированного высвобождения цисплатина записывали ЦВ внутри сфероидов, предварительно инкубированных с препаратом. В необлученных сфероиде отчетливого пика окисления цисплатина не наблюдалось. Облучение синим светом приводило к увеличению пика тока, что свидетельствовало о высвобождении цисплатина из пролекарства (рисунок 32 Г).

Таким образом, впервые фотоуправляемое высвобождение цисплатина и выработка АФК были обнаружены электрохимически в режиме реального времени внутри сфероидов MCF-7.

В разделе **3.5 Исследование коррелятивной генерации АФК и распределения медьсодержащих соединений внутри единичных клеток и тканей животных с помощью модифицированных золотых нанoeлектродов** приводится описание исследования генерации АФК ионами меди и медными металлокомплексами, продемонстрирована возможность создания золотых дисковых нанoeлектродов с дальнейшей модификацией селективными лигандами на ионы меди.

С помощью разработанного платинового нанoeлектрода, чувствительного к АФК, были протестированы инновационные медьсодержащие координационные соединения на клеточной линии MCF-7. Изучена их возможность генерировать АФК на разных глубинах 3D-сфероидов. Были определены наиболее перспективные координационные соединения для проведения дальнейших доклинических испытаний.

Для разработки инновационных препаратов важно осуществлять прямую детекцию распределения медьсодержащих комплексов. В разделе далее описывается разработка модифицированных золотых нанoeлектродов для селективной количественной детекции меди. Для разработки золотых нанoeлектродов использовали аналогичный способ как для платиновых нанoeлектродов. Нанокapилляры размером 50-150 нм заполняли углеродом за счет термической декомпозиции бутан-пропановой смеси. Аналогично разработанным платиновым электродам для повышения адгезии золотого покрытия осуществлялось электрохимическое травление углеродных электродов с последующим осаждением золота. Наличие золота на углеродной

поверхности нанозэлектрода было подтверждено методами EDX и ЦВ в растворе H_2SO_4 . Размер электродов характеризовали по предельному диффузионному току в FcMeOH и с помощью СЭМ.

Для повышения чувствительности и селективности метода осуществлялась дополнительная модификация специфическим к ионам меди лигандом. Был использован лиганд на основе липоевой кислоты и трипептида GHK, который способен хелатировать ионы меди с образованием координационного соединения. Тиолсодержащие соединения образуют плотный монослой на поверхности золота за счет ковалентных связей в течение 24 часов.

Для количественного определения ионов Cu^{2+} применялась методика циклической вольтамперометрии с быстрым сканированием, что должно повысить чувствительность сенсора, также уменьшить временное разрешение, что необходимо при исследовании динамических процессов *in vitro* и *in vivo*. В ходе калибровки сенсора были проанализированы высоты пиков окисления Cu^+ и построены градуировочные зависимости как до, так и после химической модификации золотого нанозэлектрода GHK-лигандом (рисунок 33).

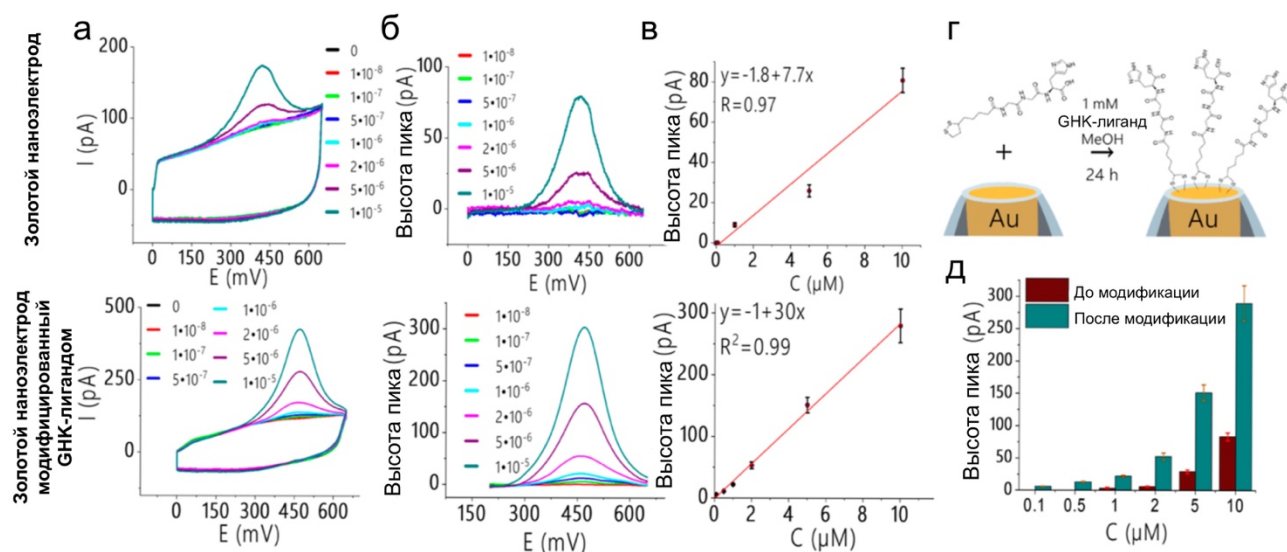


Рисунок 33 – А) ЦВ для разных концентраций Cu^{2+} при скорости развертки потенциала 13 В/с относительно ХСЭ. (Б) Высоты пиков тока с учетом вычитания фоновго уровня.

(В) Градуировочная зависимость в буферном растворе HBSS. Результаты представлены как средние значения $\pm$ SEM, $n = 7$. (Г) Схематическое изображение процесса модификации GHK-лигандом. (Д) Сравнение высоты пиков тока (за вычетом фона) до и после модификации золотого нанозэлектрода GHK-лигандом

На рисунке 33 А,Б представлены ЦВ до и после вычета базовой линии соответственно. Как было показано ранее в разделе 3.4, такой прием позволяет избежать вклада предельного диффузионного тока от АФК и исключить влияние емкостных токов. Использование специфического лиганда к ионам меди позволяет увеличить локально их приповерхностную концентрацию, которая вносит основной вклад в фарадеевский ток, проходящий через золотой нанозлектрод. Предел обнаружения ионов меди для немодифицированного золотого нанозэлектрода составил 1 мкМ. После химической пришивки лиганда GHK (Рисунок 33, нижняя панель) предел обнаружения модифицированного нанозэлектрода был уменьшен на порядок и составил 0,1 мкМ. В обоих случаях наблюдалась линейная зависимость высоты пика тока от концентрации ионов меди. Таким образом, была продемонстрирована возможность проведения количественных концентрационных измерений ионов меди в диапазоне 0,1-10 мкМ с помощью разработанного модифицированного золотого нанозэлектрода.

Были проведены измерения ЦВ в разных растворах, содержащих Cu^{2+} и нецелевые аналиты (10 мкмоль/л для Ni^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} и 1 мМ для K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). В прикладываемом диапазоне напряжений (от 0 до 650 мВ) нецелевых окислительно-восстановительных реакций не наблюдалось.

В качестве модельного медьсодержащего препарата было использовано координационное соединение 72k, которое продемонстрировало хорошие цитотоксические свойства, а также возможность вызывать окислительный стресс у опухолевых клеток и в 3D-сфероидах. Для увеличения растворимости в водных растворах и дальнейшего использования в *in vivo* экспериментах использовалась липосомальная форма комплекса 72k (далее «Cu-комплекс (лип.)»). Без инкубации с комплексом в контрольной группе клеток MCF-7 и B16 не наблюдалось соответствующих окислительно-восстановительных реакций. Однако после 2 часов инкубации с 50 мкмоль/л Cu-комплекса (лип.) на ЦВ, полученных на единичных клетках MCF-7 и B16, наблюдались соответствующие пики тока (Рисунок 36А). Концентрация Cu^{2+} в отдельных клетках MCF-7 и B16 составляла $0,4 \pm 0,1$ и $1 \pm 0,2$ мкмоль/л соответственно (рисунок 34 Б).

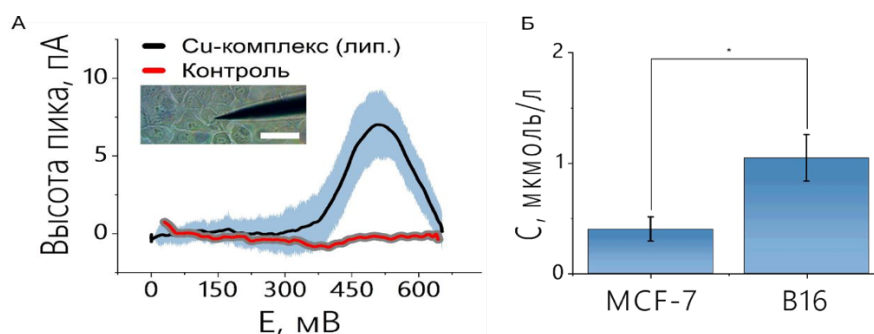


Рисунок 34 – Электрохимическое обнаружение Cu^{2+} внутри клеток MCF-7 и B16 после 2-часовой инкубации с 50 мкмоль/л липосомального комплекса Cu. (А) Пики тока до и после обработки единичных клетках MCF-7. (Б) Сравнение способности к накоплению липосомального Cu-комплекса в клетках MCF-7 и B16. Результаты представлены как средние значения $\pm$ SEM, $n = 3$, $*p < 0,05$ (ANOVA)

Далее эффективность использования разработанных сенсоров была продемонстрирована на наиболее релевантных *in vivo* моделях. B16 высоко метастатическая опухоль с выраженной способностью к накоплению меди [27]. В экспериментах использовалась доза липосомального Cu-комплекса 2 мг/кг. Измерения проводились через 16 часов после внутривенного введения препарата. На ЦВ контрольной группы мышей не наблюдалось электрохимических реакций в используемом диапазоне потенциалов (рисунок 35 Б). Хорошо различимые пики тока были обнаружены в группе мышей, которым вводили медный комплекс (лип.) (рисунок 35 В). На глубине 100 мкм наблюдается значительное уменьшение концентрации ионов меди, далее наблюдается равномерное распределение липосомальной формы медь-содержащего комплекса до 1000 мкм по глубине (рисунок 35 Г).

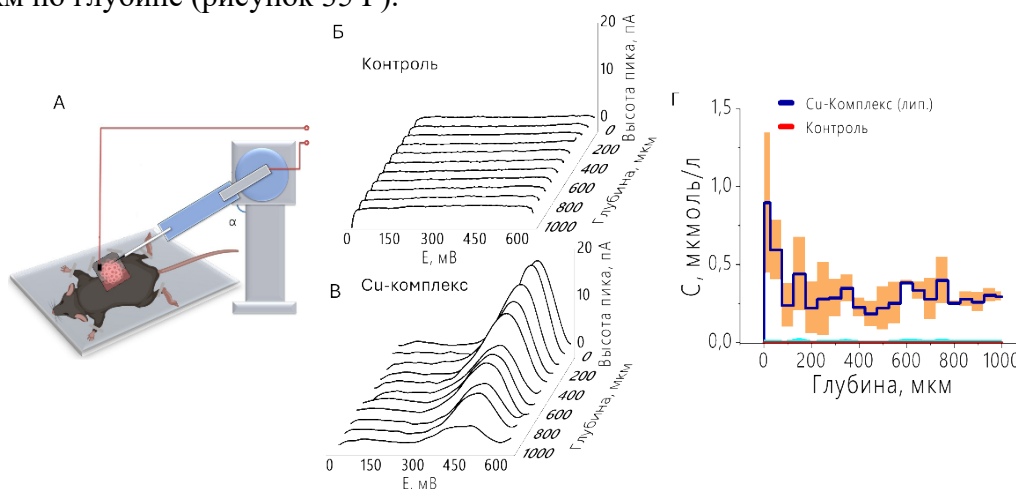


Рисунок 35 – (А) Схематическое изображение установки для проведения *in vivo* измерений. ЦВ, полученные внутри опухоли у контрольных мышей (Б) и у мышей, которым предварительно вводили комплекс (В), на разных глубинах до 1000 мкм. (Г) Профиль накопления меди до (контроль) и после введения Cu-комплекса (лип.)

Накопление препарата в реальной опухоли позволяет сделать предварительные выводы о направленности его действия, а также косвенно оценить его эффективность, которая напрямую зависит от процента накопленной введенной дозы.

Для решения задачи обнаружения лекарственных средств и метаболитов в мозге *in vivo* необходимы высокочувствительные, специфичные и минимально инвазивные методы. Сложная структура мозга и изменчивая природа нейрохимических веществ при различных физиологических и патологических процессах предъявляют строгие требования к методам мониторинга мозга *in vivo*. Разработанный метод может быть применим для измерения уровня Cu^{2+} на модели трансгенной мыши APP/PS1 с БА *in vivo* (рисунок 36 А).

Для модели БА у APP/PS1 мышей свойственно значительное увеличение продукции β -амилоида, что сопровождается повышением локальной концентрации Cu^{2+} [28]. Наши малоинвазивные измерения концентрации Cu^{2+} в разных отделах мозга показали: в контрольной группе концентрация ионов меди в коре составила $0,26 \pm 0,03$ мкмоль/л и $0,37 \pm 0,04$ мкмоль/л в гиппокампе. Однако в таламусе уровень меди был выше, чем в коре, и концентрация была равна $0,43 \pm 0,04$ мкмоль/л (рисунок 37 Б). Значения концентрации Cu^{2+} в контрольной группе близки к литературным данным, полученным не для прижизненных измерений. В гиппокампе ($0,66 \pm 0,06$ мкмоль/л) и таламусе ($0,73 \pm 0,09$ мкмоль/л) у трансгенных мышей APP/PS1 были выявлены повышенные уровни ионов меди по сравнению с контрольной группой. Примечательно, что концентрация ионов меди в коре головного мозга оставалась схожей как в контрольной группе, так и для мышей с БА.

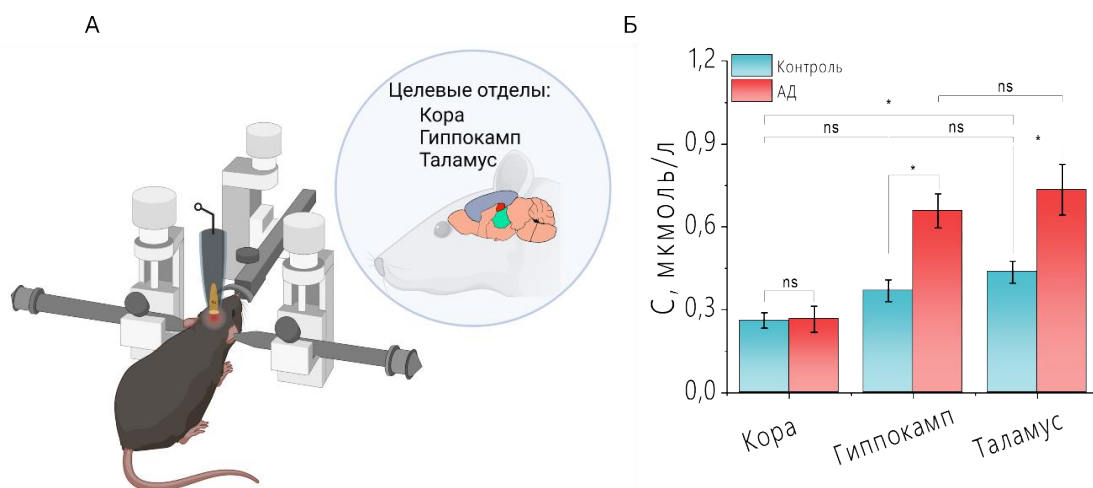


Рисунок 36 – Обнаружение Cu^{2+} *in vivo* в мозге трансгенной мышинной модели APP/PS1 с БА. (А) Схематическое изображение, демонстрирующее измерения *in vivo* в целевых областях мозга. (Б) Концентрации Cu^{2+} в различных областях мозга у контрольных мышей и мышей APP/PS1.

Таким образом, комбинируя стандартные стереотаксические процедуры с точным позиционированием сенсора, мы продемонстрировали возможность таргетных малоинвазивных измерений в различных областях мозга мышей *in vivo* прижизненно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении диссертации приводятся основные выводы выполненного исследования, рекомендации, а также перспективы дальнейшей разработки темы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1) Разработана универсальная платформа для определения внутри- и внеклеточных концентраций молекулярного кислорода, АФК, ионов металлов и уровня pH на основе методов определения ионного и фарадеевского тока проходящего через нанокапиллярные сенсоры. Платформа позволяет осуществлять локальные измерения с нанометровым пространственным разрешением в режиме реального времени. В разработанной платформе был использован ряд технических решений, которые позволили достичь высокого временного разрешения и малых пределов обнаружения АФК, платина- и медьсодержащих металлокомплексов.

2) За счет малого размера разработанных дисковых наноэлектродов на основе нанокапилляров удалось получить улучшенные аналитические характеристики для исследования биофизических параметров клетки. Математическая оценка показала, что у разработанных нанокапиллярных сенсоров время релаксации τ_{RC} не превышает 10 нс, а время достижения системой предельного диффузионного тока не превышает 1 мс, что в 10^6 лучше соответствующих характеристик существующих микро- и макросенсоров. За счет аналитических характеристик разработанных наноэлектродов универсальная платформа имеет улучшенные параметры для измерения в живых системах, в том числе, малоинвазивность и возможность локальных измерений с нанометровым пространственным разрешением, высокая скорость отклика, количественный анализ аналитов.

3) Разработан метод для 3D-pH-картирования с нанометровым пространственным разрешением для живых *in vitro* и *in vivo* систем на основе нанокапилляра с цвиттер-ионной мембраной, основанный на явлении выпрямления тока. pH-чувствительный сенсор обладает следующими характеристиками: пространственного разрешение не более 50 нм, скорость отклика не более 2 мс, точность измерения не более 0,01 pH. 3D pH внеклеточное картирование меланомы A375M выявило неоднородный pH градиент по сравнению со здоровыми меланоцитами. Был получен профиль градиента pH внутри опухоли 4T1 мыши *in vivo* прижизненно, зарегистрировано падение pH до 5,3-5,6. На примере магнитных наночастиц, конъюгированных с pHILIP, продемонстрирована возможность достоверно определять эффективность доставки pH чувствительных диагностических и терапевтических препаратов в опухоль мыши *in vivo* прижизненно с помощью 3D-pH-картирования.

4) Разработан метод для локального количественного определения АФК и молекулярного кислорода в режиме реального времени на уровне единичных клеток, тканей и животных с помощью нанокапиллярных электрохимических сенсоров на основе платинизированного углерода. Разработана методика изготовления платинизированных дисковых углеродных наноэлектродов на основе нанокапилляров. Методика позволила изготавливать углеродные наноэлектроды с улучшенной адгезией каталитически активной платины, что открыло возможности для многократных воспроизводимых измерений. Установлена кинетика генерации АФК в единичных клетках и на различных глубинах опухолей мышей *in vivo* прижизненно под действием коммерчески доступных и инновационных терапевтических препаратов. Впервые были проведены исследования по эффективности ФДТ в режиме реального времени на *in vitro* и *in vivo* моделях. Была выявлена дельтообразная кинетика генерации АФК нейтрофилами при активации последних E.coli.

5) Исследованы градиенты кислорода вблизи модельных клеток (растений), клеток млекопитающих сфероидов, в нейрональных тканях и мозге мыши. Определена кинетика количественного изменения концентрации кислорода в мозге крысы в норме и в условиях модели ишемии.

6) Разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции платиносодержащих препаратов с помощью дисковых наноэлектродов с пределом обнаружения 1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения цисплатина и его

современных аналогов в единичных клетках, 3D-сфероидов и опухолях мыши. На примере 3D-сфероидов (MCF-7) продемонстрирована возможность локального определения зон с повышенной и пониженной (гипоксией) концентрацией кислорода. Определена прямая корреляция между распределением метронидазолсодержащего производного цисплатина и области гипоксии 3D-сфероида. Обнаружено одновременное высвобождение цисплатина и генерация АФК за счет фотоактивации пролекарства Pt(IV) (Рибоплатина) внутри опухолевых сфероидов.

7) Разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции медьсодержащих препаратов с помощью золотых модифицированных наноэлектродов с пределом обнаружения 0,1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения инновационных медьсодержащих препаратов и их эффективность в генерации АФК в единичных клетках, 3D сфероидов и опухолях мыши. Выявлено распределение АФК и ионов меди в разных отделах и полушариях мозга в нормальном состоянии мыши и при БА. На примере клиохинола продемонстрирована возможность осуществлять мониторинг эффективности препаратов для терапии БА на моделях мышей *in vivo* прижизненно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ, ЦИТИРУЕМОЙ В АВТОРЕФЕРАТЕ

1. Allen D. et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management // *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015. Vol. 13, № 6. P. 787–798.
2. Bard A.J., Faulkner L.R., White H.S. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications.* John Wiley & Sons, Ltd, 2022.
3. Montenegro M.I., Queirós M.A., Daschbach J.L. *Microelectrodes: Theory and Applications.* Dordrecht: Springer Science+Business Media Dordrecht, 1991.
4. Шольц Ф. Электроаналитические методы. Теория и практика / trans. Майстренко В.Н. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006.
5. Прохорова Г.В. Введение в электрохимические методы анализа / ed. Агасян П.К., Иванов В.М. Москва: МГУ, 1991.
6. Bard A.J., Faulkner L.R. *Fundamentals and Applications Fundamentals and Applications* // America. 2002.
7. Sakmann B., Neher E. *Single-Channel Recording.* Boston, MA: Springer US, 1995.
8. Weit C., Bard A.J., Feldberg S.W. Current Rectification at Quartz Nanopipet Electrodes // *Anal Chem.* 1997. Vol. 69, № 22. P. 4627–4633.
9. Umehara S. et al. Current rectification with poly-L-lysine-coated quartz nanopipettes // *Nano Lett.* 2006. Vol. 6, № 11. P. 2486–2492.
10. Daniel C. et al. The role of proton dynamics in the development and maintenance of multidrug resistance in cancer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2013. Vol. 1832, № 5. P. 606–617.
11. Parks S.K., Chiche J., Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth // *J Cell Physiol.* 2011. Vol. 226, № 2. P. 299–308.
12. Swietach P. et al. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer // *Phil. Trans. R. Soc. B. The Royal Society*, 2014. Vol. 369, № 1638. P. 20130099.
13. Huber V. et al. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation // *Semin Cancer Biol.* 2017. Vol. 43. P. 74–89.
14. Chen M. et al. Hydroxide diffuses slower than hydronium in water because its solvated structure inhibits correlated proton transfer // *Nat Chem.* 2018. Vol. 10, № 4. P. 413–419.
15. Piper J.D. et al. Characterization and Application of Controllable Local Chemical Changes Produced by Reagent Delivery from a Nanopipet // *J Am Chem Soc.* 2008. Vol. 130, № 31. P. 10386–10393.
16. Hou H. et al. Single-cell pH imaging and detection for pH profiling and label-free rapid identification of cancer-cells // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1759.
17. Novak P. et al. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy // *Nat Methods.* Nature Publishing Group, 2009. Vol. 6, № 4. P. 279–281.
18. Zhao C. et al. Polymeric pH-sensitive membranes—A review // *Prog Polym Sci.* 2011. Vol. 36, № 11. P. 1499–1520.
19. Babakinejad B. et al. Local Delivery of Molecules from a Nanopipette for Quantitative Receptor Mapping on Live Cells // *Anal Chem.* 2013. Vol. 85, № 19. P. 9333–9342.
20. Grzywa T.M., Paskal W., Włodarski P.K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma // *Transl Oncol.* 2017. Vol. 10, № 6. P. 956–975.
21. Wike-Hooley J.L., Haveman J., Reinhold H.S. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease // *Radiotherapy and Oncology.* 1984. Vol. 2, № 4. P. 343–366.
22. Fruehauf J.P., Trapp V. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? // *Expert Rev Anticancer Ther.* Taylor & Francis, 2008. Vol. 8, № 11. P. 1751–1757.
23. Hanot C. et al. Effects of Iron-Oxide Nanoparticle Surface Chemistry on Uptake Kinetics and Cytotoxicity in CHO-K1 Cells // *Int J Mol Sci.* 2015. Vol. 17, № 1. P. 54.
24. Alarifi S. et al. Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line // *Biol Trace Elem Res.* 2014. Vol. 159, № 1–3. P. 416–424.

25. Batrakova E. V., Kabanov A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers // *Journal of Controlled Release*. 2008. Vol. 130, № 2. P. 98–106.
26. Kumari S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival // *Biomark Insights*. 2018. Vol. 13. P. 117727191875539.
27. Scheinberg I.H. Wilson's disease // *Major Probl Intern Med*. 1984. Vol. 23. P. 9–16.
28. Scheiber I.F., Mercer J.F.B., Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain // *Prog Neurobiol*. 2014. Vol. 116. P. 33–57.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых журналах:

1. Timoshenko R. V., Gorelkin P. V., Vaneev A. N., Krasnovskaya O. O., Akasov R. A., Garanina A. S., Khochenkov D. A., Iakimova T. M., Klyachko N. L., Abakumova T. O., Shashkovskaya V. S., Chaprov K. D., Makarov A. A., Mitkevich V. A., Takahashi Y., Edwards C. R. W., Korchev Y. E., Erofeev A. S. Electrochemical Nanopipette Sensor for In Vitro/In Vivo Detection of Cu²⁺ Ions // *Analytical Chemistry*. - 2024. – Vol. 96, No. 1. - P. 127-136. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03337>
2. Vaneev A. N., Gorelkin P. V., Garanina A. S., Lopatukhina H. V., Vodopyanov S. S., Alova A. V., Ryabaya O. O., Akasov R. A., Zhang Y., Novak P., Salikhov S. V., Abakumov M. A., Takahashi Y., Edwards C. R. W., Klyachko N. L., Majouga A. G., Korchev Y. E., Erofeev A. S. In Vitro and In Vivo Electrochemical Measurement of Reactive Oxygen Species After Treatment with Anticancer Drugs // *Analytical Chemistry*. - 2020. – Vol. 92, No. 12. - P. 8010-8014. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01256>
3. Vaneev A. N., Gorelkin P. V., Krasnovskaya O. O., Akasov R. A., Spector D. V., Lopatukhina E. V., Timoshenko R. V., Garanina A. S., Zhang Y., Salikhov S. V., Edwards C. R. W., Klyachko N. L., Takahashi Y., Majouga A. G., Korchev Y. E., Erofeev A. S. In Vitro/In Vivo Electrochemical Detection of Pt(II) Species // *Analytical Chemistry*. - 2022. – Vol. 94, No. 2. - P. 4901-4905. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00136>
4. Abakumova T., Vaneev A., Naumenko V., Shokhina A., Belousov V., Mikaelyan A., Balysheva K., Gorelkin P., Erofeev A., Zatsepin T. Intravital electrochemical nanosensor as a tool for the measurement of reactive oxygen/nitrogen species in liver diseases // *Journal of Nanobiotechnology*. - 2022. – Vol. 20, No. 1. - P. 497. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01688-z>
5. Actis P., Tokar S., Clausmeyer J., Babakinejad B., Mikhaleva S., Cornut R., Takahashi Y., Córdoba A. L., Novak P., Shevchuck A. I., Dougan J. A., Kazarian S. G., Gorelkin P. V., Erofeev A. S., Yaminsky I. V., Unwin P. R., Schuhmann W., Klenerman D., Rusakov D. A., Sviderskaya E. V., Korchev Y. E. Electrochemical Nanoprobes for Single-Cell Analysis // *ACS Nano*. - 2014. – Vol. 8, No. 1. - P. 875–884. <https://doi.org/10.1021/nn405612q>
6. Akasov R. A., Sholina N. V., Khochenkov D. A., Alova A. V., Gorelkin P. V., Erofeev A. S., Generalova A. N., Khaydukov E. V. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide // *Scientific Reports*. - 2019. – Vol. 9, No. 1. - P. 9679. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46115-w>
7. Alova A., Erofeev A., Gorelkin P., Bibikova T., Korchev Y., Majouga A. Prolonged oxygen depletion in microwounded cells of *Chara corallina* detected with novel oxygen nanosensors // *Journal of Experimental Botany*. – 2020. – Vol. 71, No. 1. – P. 386-398. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz433>
8. Erofeev A., Gorelkin P., Garanina A., Alova A., Efremova M., Vorobyeva N., Edwards C., Korchev Y., Majouga A. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles // *Scientific Reports*. - 2018. – May. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25852-4>
9. Kolmogorov V. S., Erofeev A. S., Barykin E. P., Timoshenko R. V., Lopatukhina E. V., Kozin S. A., Gorbacheva L. R., Salikhov S. V., Klyachko N. L., Mitkevich V. A., Edwards C. R. W., Korchev Y. E., Makarov A. A., Gorelkin P. V. Scanning Ion-Conductance Microscopy for Studying β -Amyloid Aggregate Formation on Living Cell Surfaces // *Analytical Chemistry*. - 2023. – Vol. 95, No. 43. – P. 15943–15949. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02806>
10. Krasnovskaya O., Abramchuk D., Vaneev A., Gorelkin P., Abakumov M., Timoshenko R., Kuzmichev I., Chmelyuk N., Vadehina V., Kuanaeva R., Dubrovin E., Kolmogorov V., Beloglazkina E., Kechko O., Mitkevich V., Varshavskaya K., Salikhov S., Erofeev A. Bifunctional Copper Chelators Capable of Reducing A β Aggregation and A β -Induced Oxidative Stress // *ACS Omega*. - 2024. – Vol. 9, No. 43. – P. 43376–43384. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c03152>
11. Krasnovskaya O., Naumov A., Guk D., Gorelkin P., Erofeev A., Beloglazkina E., Majouga A. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2020. – Vol. 21, No. 11. – P. 3965. <https://doi.org/10.3390/ijms21113965>
12. Krasnovskaya O. O., Akasov R. A., Spector D. V., Pavlov K. G., Bubley A. A., Kuzmin V. A., Kostyukov A. A., Khaydukov E. V., Lopatukhina E. V., Semkina A. S., Vlasova K. Yu., Sypalov S. A., Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Vaneev A. N., Nikitina V. N., Skvortsov D. A., Ipatova D. A., Mazur

D. M., Zyk N. V., Sakharov D. A., Majouga A. G., Beloglazkina, E. K. Photoinduced Reduction of Novel Dual-Action Riboplatin Pt(IV) Prodrug // *ACS Applied Materials & Interfaces*. - 2023. – Vol. 15, No. 10. - P. 12882-12894. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c01771>

13. Krasnovskaya O. O., Guk D. A., Naumov A. E., Nikitina V. N., Semkina A. S., Vlasova K. Y., Pokrovsky V., Ryabaya O. O., Karshieva S. S., Skvortsov D. A., Zhirkina I. V., Shafikov R. R., Gorelkin P. V., Vaneev A. N., Erofeev A. S., Mazur D. M., Tafeenko V. A., Pergushov V. I., Melnikov M. Y., Soldatov M. A., Shapovalov V. V., Soldatov A. V., Akasov R. A., Gerasimov V. M., Sakharov D. A., Moiseeva A. A., Zyk N. V., Beloglazkina E. K., Majouga, A. G. Novel Copper-Containing Cytotoxic Agents Based on 2-Thioxoimidazolones // *Journal of Medicinal Chemistry*. - 2020. – Vol. 63, No. 21. - P. 13031-13063. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01196>

14. Krasnovskaya O., Spector D., Zlobin A., Pavlov K., Gorelkin P., Erofeev A., Beloglazkina E., Majouga, A. Metals in imaging of alzheimers disease // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2020. – Vol. 21, No.23. – P. 1–35. <https://doi.org/10.3390/ijms21239190>

15. Machulkin A., Uspenskaya A., Zyk N., Nimenko E., Ber A., Petrov S., Shafikov R., Skvortsov D., Smirnova G., Borisova Y., Pokrovsky V., Kolmogorov V., Vaneev A., Ivanenkov Y., Khudyakov A., Kovalev S., Erofeev A., Gorelkin P., Beloglazkina E., Majouga A. PSMA-targeted small-molecule docetaxel conjugate: Synthesis and preclinical evaluation // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021. – Vol. 227. – P. 113936. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113936>

16. Novotortsev V. K., Kukushkin M. E., Tafeenko V. A., Skvortsov D. A., Kalinina M. A., Timoshenko, R. V., Chmelyuk N. S., Vasilyeva L. A., Tarasevich B. N., Gorelkin P. V., Erofeev A. S., Majouga A. G., Zyk N. V., Beloglazkina E. K. Dispirooxindoles Based on 2-Selenoxo-Imidazolidin-4-Ones: Synthesis, Cytotoxicity and ROS Generation Ability // *International Journal of Molecular Sciences* - 2021. – Vol. 22, No. 5. – P. 2613. <https://doi.org/10.3390/ijms22052613>

17. Pershina A. G., Brikunova O. Y., Demin A. M., Abakumov M. A., Vaneev A. N., Naumenko V. A., Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Nizamov T. R., Muslimov A. R., Timin A. S., Malkeyeva D., Kiseleva E., Vtorushin S. V., Larionova I. V., Gereng E. A., Minin A. S., Murzakaev, A. M., Krasnov V. P., Majouga, A. G., Ogorodova L. M. Variation in tumor pH affects pH-triggered delivery of peptide-modified magnetic nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. - 2021. – Vol. 32. – P. 102317. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102317>

18. Petrov R. A., Mefedova S. R., Yamansarov E. Y., Maklakova S. Y., Grishin D. A., Lopatukhina E. V., Burenina O. Y., Lopukhov A. V., Kovalev S. V., Timchenko Y. V., Ondar E. E., Ivanenkov Y. A., Evteev S. A., Vaneev A. N., Timoshenko R. V., Klyachko N. L., Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Beloglazkina E. K., Majouga, A. G. New Small-Molecule Glycoconjugates of Docetaxel and GalNAc for Targeted Delivery to Hepatocellular Carcinoma // *Molecular Pharmaceutics*. - 2021. – Vol. 18, No. 1. – P. 461–468. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00980>

19. Pleskova S. N., Erofeev A. S., Vaneev A. N., Gorelkin P. V., Bobyk S. Z., Kolmogorov V. S., Bezrukov N. A., Lazarenko, E. V. ROS Production by a Single Neutrophil Cell and Neutrophil Population upon Bacterial Stimulation // *Biomedicines*. - 2023. – Vol. 11, No. 5. – P. 1361. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051361>

20. Pleskova S. N., Vaneev A. N., Bezrukov N. A., Erofeev A. S., Bobyk S. Z., Kolmogorov V. S., Gorelkin P. V., Mamed-Nabizade V. V., Gorshkova E. N. Changes in ROS/RNS Levels in Endothelial Cells in Experimental Bacteremia // *ChemBioChem*. - 2024. – Vol. 25, No. 18. <https://doi.org/10.1002/cbic.202400341>

21. Spector D., Erofeev A., Gorelkin P., Skvortsov D., Trigub A., Markova A., Nikitina V., Ul'yanovskiy N., Shtil A., Semkina A., Vlasova K., Zyk N., Majouga A., Beloglazkina E., Krasnovskaya O. Biotinylated Pt(IV) prodrugs with elevated lipophilicity and cytotoxicity // *Dalton Transactions*. - 2022. – Vol. 52, No. 4. – P. 866–871. <https://doi.org/10.1039/D2DT03662B>

22. Spector D., Erofeev A., Gorelkin P., Vaneev A., Akasov R., Ul'yanovskiy N., Nikitina V., Semkina A., Vlasova K., Soldatov M., Trigub A., Skvortsov D., Finko A., Zyk N., Sakharov D., Majouga A., Beloglazkina E., Krasnovskaya O. Electrochemical Detection of a Novel Pt(IV) Prodrug with the Metronidazole Axial Ligand in the Hypoxic Area // *Inorganic Chemistry*. - 2022. – Vol. 61, No. 37. – P. 14705–14717. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c02062>

23. Spector D., Pavlov K., Akasov R., Vaneev A., Erofeev A., Gorelkin P., Nikitina V., Lopatukhina E., Semkina A., Vlasova K., Skvortsov D., Roznyatovsky V., Ul'yanovskiy N., Pikovskoi

- I., Sypalov S., Garanina A., Vodopyanov S., Abakumov M., Volodina Y., Krasnovskaya O. Pt(IV) Prodrugs with Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Axial Position // *Journal of Medicinal Chemistry*. - 2022. – Vol. 65, No. 12. – P. 8227–8244. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02136>
24. Vaneev A. N., Timoshenko R. V., Gorelkin P. V., Klyachko N. L., Korchev Y. E., Erofeev A. S. Nano- and Microsensors for In Vivo Real-Time Electrochemical Analysis: Present and Future Perspectives // *Nanomaterials*. - 2022. – Vol. 12, No. 21. – P. 3736. <https://doi.org/10.3390/nano12213736>
25. Yamansarov E. Yu., Lopatukhina E. V., Evteev S. A., Skvortsov D. A., Lopukhov A. V., Kovalev S. V., Vaneev A. N., Shkil' D. O., Akasov R. A., Lobov A. N., Naumenko V. A., Pavlova E. N., Ryabaya O. O., Burenina O. Yu., Ivanenkov Y. A., Klyachko N. L., Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Beloglazkina E. K., Majouga A. G. Discovery of Bivalent GalNAc-Conjugated Betulin as a Potent ASGPR-Directed Agent against Hepatocellular Carcinoma // *Bioconjugate Chemistry*. - 2021. – Vol. 32, No. 4. – P. 763–781. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00042>
26. Zhang Y., Takahashi Y., Hong S. P., Liu F., Bednarska J., Goff P. S., Novak P., Shevchuk A., Gopal S., Barozzi I., Magnani L., Sakai H., Suguru Y., Fujii T., Erofeev A., Gorelkin P., Majouga A., Weiss D. J., Edwards C., Korchev Y. High-resolution label-free 3D mapping of extracellular pH of single living cells // *Nature Communications*. - 2019. – Vol. 10, No. 1. – P. 5610. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13535-1>
27. Machulkin A., Uspenskaya F., Zyk N., Nimenko E., Ber A., Petrov S., Polshakov V., Shafikov R., Skvortsov D., Plotnikova E., Pankratov A., Smirnova G., Borisova Y., Pokrovsky V., Kolmogorov V., Vaneev A., Khudyakov A., Chepikova O., Kovalev S., Zamyatnin Jr A., Erofeev A., Gorelkin P., Beloglazkina E., Zyk N., Khazanova E., Majouga A. Synthesis, Characterization, and Preclinical Evaluation of a Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Monomethyl Auristatin e Conjugate // *Journal of Medicinal Chemistry* - 2021. – Vol. 64, No. 23. – P. 17123–17145. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01157>
28. Тимошенко Р. В., Ванеев А. Н., Савин Н. А., Клячко Н. Л., Пархоменко Ю. Н., Салихов С. В., Мажуга А. Г., Горелкин П. В., Ерофеев А. С. Перспективные подходы к количественному определению ионов меди в биологических системах // *Российские Нанотехнологии*. - 2020. – Том 15, № 2. – С. 137–151. <https://doi.org/10.1134/S1992722320020193>
29. Усманов А. Р., Ерофеев А. С., Горелкин П. В., Корчев Ю. Е., Мажуга А. Г. Нанокapилляры – универсальный инструмент для современных биомедицинских приложений // *Российские Нанотехнологии*. - 2017. – Том 12, № 7–8. – С. 119–131. <https://doi.org/10.1134/S199272231704015X>
30. Vaneev A. N., Timoshenko R. V., Gorelkin P. V., Klyachko N. L., Erofeev A. S. Recent Advances in Nanopore Technology for Copper Detection and Their Potential Applications // *Nanomaterials*. - 2023. – Vol. 13, No. 9. – P. 1573. <https://doi.org/10.3390/nano13091573>
31. Ванеев А. Н., Алова А. В., Ерофеев А. С., Горелкин П. В., Алексашкин А. Д., Безнос О. В., Чеснокова Н. Б., Кост О. А., Мажуга А. Г., Корчев Ю. Е., Клячко Н. Л. Определение активных форм кислорода в биологических жидкостях с помощью платинового наноэлектрода амперометрическим методом // *ВЕСТНИК РГМУ*. - 2018. – С. 157–163. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.045>
32. Iakimova T. M., Bublely A. A., Boychenko O. P., Guk D. A., Vaneev A. N., Prusov A. N., Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Krasnovskaya O. O., Klyachko N. L., Vlasova K. Yu. Liposomal form of 2-Alkylthioimidazolone-Based Copper Complexes for Combined Cancer Therapy // *Nanomedicine*. - 2023. – Vol. 18, No. 28. <https://doi.org/10.2217/nnm-2023-0210>

Патенты:

1. RU 2725065 C1 29.06.2020

Абакумов М. А., Гаранина А. С., Ванеев А. Н., Горелкин П. В., Ерофеев А. С., Мажуга А. Г. Способ измерения концентрации кислорода в подкожной опухоли экспериментальных животных.

2. RU 2726074 C1 12.08.2022

Абакумов М. А., Гаранина А. С., Ванеев А. Н., Горелкин П. В., Ерофеев А. С., Мажуга А. Г. Способ измерения концентрации активных форм кислорода (АФК) в подкожной опухоли живых экспериментальных животных.

3. RU № 2777971 C1 12.08.2022

Горелкин П. В., Ерофеев А. С., Ванеев А. Н., Корчев Ю.Е., Новак П.Б Шевчук А., Эдвардс К. Р. В. Устройство для тестирования эффективности биологически активных веществ на клетках.

4. RU 2647464 C1 15.03.2018

Ерофеев А. С., Горелкин П. В., Гаранина А. С., Корчев Ю. Е., Мажуга А. Г. Способ определения цитотоксичности веществ.

5. WO 2017116267 A1 06.07.2017

Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Majouga A. G., Usmanov A. R., Yaminsky I. V., Korchev A. Y. Nanoelectrode for Detection Cu (II) Ions and a Method of Producing and Using Thereof.