

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Ванеев Александр Николаевич

**Нанокapиллярные сенсоры для мониторинга клеточных
метаболитов в биологических системах**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Научные руководители:

Клячко Наталья Львовна
доктор химических наук, профессор

Ерофеев Александр Сергеевич
кандидат физико-математических наук

Официальные оппоненты:

Горин Дмитрий Александрович
доктор химических наук, профессор
Автономная некоммерческая образовательная
организация высшего образования «Сколковский
институт науки и технологии», Центр фотоники и
фотонных технологий, профессор

Звягин Андрей Васильевич
доктор физико-математических наук
Автономная некоммерческая образовательная
организация высшего образования «Научно-
технологический университет «Сириус»,
Научный центр трансляционной медицины,
руководитель группы

Сергеев Владимир Глебович
доктор химических наук
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова», Химический факультет,
заведующий кафедрой коллоидной химии

Защита диссертации состоится «__» декабря 2024 года в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы д.1, стр.11Б, аудитория 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3160>

Автореферат разослан «___» ноября 2024 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время существует проблема определения клеточных метаболитов малоинвазивными методами с целью диагностики состояния живого организма. Определение концентрации ключевых клеточных метаболитов, таких как кислород, активные формы кислорода (АФК), нейротрансмиттеры в физиологических условиях в режиме *in vivo* позволит судить о наличии или об отсутствии патологического состояния в организме.

Для обнаружения клеточных метаболитов обычно используют ряд методов, включающих в себя оптические, флуоресцентные, электрохимические методы, а также подходы, основанные на позитронно-эмиссионной томографии, магнитно-резонансной томографии и спектроскопии. Электрохимические методы являются одними из самых простых, недорогих, надежных, быстрых аналитических подходов. В настоящее время существует большое количество электрохимических методов, которые позволяют определять содержание растворенного молекулярного кислорода, АФК, нейротрансмиттеров с высокой точностью и селективностью в растворе. Однако малоинвазивные электрохимические методы, позволяющие определять данные аналиты в условиях *in vitro/in vivo* практически отсутствуют. Разработка малоинвазивного метода важна, поскольку определение клеточных метаболитов необходимо проводить в условиях *in vivo* без значительных повреждений тканевых структур и влияния на живой организм.

Обнаружение ключевых метаболитов в биологических системах, как правило, затруднено и ограничено, во-первых, большим размером рабочего электрода. Электроды большого размера могут привести к значительным повреждениям тканей живого организма. Во-вторых, адсорбция белков на поверхность рабочего электрода снижает величину отклика сенсора. В-третьих, ткани живых организмов обладают неоднородностью и сложностью состава.

Для устранения указанных ограничений возможно использовать электроды с рабочей наноразмерной электрохимически активной поверхностью, которые позволят осуществлять малоинвазивные измерения внутри живых единичных клеток, 3D моделей опухоли – сфероидов, а также проводить измерения на животных моделях *in vivo*. Использование микро-, наноразмерных сенсоров в таком случае позволит проводить электрохимические измерения с высоким пространственным и временным разрешением.

В качестве основы для создания наносенсоров могут выступать капилляры с наноразмерным отверстием на одном из концов, так называемые нанокапилляры. Функционализация конца нанокапилляра открывает широкие перспективы для разработки наноразмерных сенсоров, чувствительных к огромному количеству аналитов. Несмотря на перспективность разработки наноразмерных электрохимических наносенсоров, их использование в условиях *in vitro/in vivo* в настоящее время не было широко продемонстрировано.

Таким образом, можно заключить, что разработка новых наноразмерных сенсоров и методов для *in vitro/in vivo* измерений является важной фундаментальной и практической задачей современной биотехнологии и биоаналитической химии. Наноразмерные сенсоры позволяют регистрировать электрохимические процессы в режиме реального времени, что открывает новые возможности для изучения биохимических реакций внутри клеток. Это может быть критически важным для понимания механизмов заболеваний и разработки новых методов лечения. Кроме того, использование наноразмерных сенсоров в 3D моделях опухолей

позволит исследовать их ответ на воздействие противоопухолевых лекарственных средств, что повысит эффективность разработки новых препаратов и персонализированных методов лечения.

Степень разработанности темы исследования. Ранее в литературе были разработаны электрохимические подходы для проведения исследований с использованием сенсоров, в том числе биосенсоров, на основе углеродного волокна. Данные сенсоры были чувствительны к ключевым клеточным метаболитам таким как, активные формы кислорода, дофамин, серотонин, пероксид водорода, кислород. Такие сенсоры обладали высокой степенью инвазивности, поскольку диаметр сечения углеродного волокна составлял от 1 до 10 мкм. С помощью ранее разработанных в литературе сенсоров невозможно было проведение неинвазивных внутриклеточных измерений. Несмотря на имеющуюся в литературе тенденцию к уменьшению размеров рабочей части сенсоров, данная проблема является одной из ключевых. Расширение спектра определяемых клеточных метаболитов представляет важную задачу для полного понимания клеточного метаболизма. Таким образом, необходимо разработать биоаналитические системы для медицинской диагностики, которые позволят определять ключевые клеточные аналиты не только внутри клеток, но и в животных моделях *in vivo* малоинвазивно.

Цели и задачи работы.

Целью данной работы была разработка электрохимических нанокapиллярных сенсоров для определения метаболитов в единичных живых клетках и биологических моделях *in vitro/in vivo*.

Поставленная цель требует выполнения следующих задач:

1. Разработка углеродных электрохимических нанокapиллярных сенсоров с малым временем отклика, пригодных для мониторинга дофамина;
2. Разработка высокочувствительного и малоинвазивного платинового нанoeлектрода для определения концентрации АФК и молекулярного кислорода, апробация его работы внутри единичных живых опухолевых клеток PC3, 22Rv1, MCF-7 и сфероидов, а также имплантированной мыши опухоли *in vivo*;
3. Определение концентрации АФК в единичных опухолевых клетках и сфероидах под воздействием известных и новых противоопухолевых препаратов, а также определение концентрации АФК внутри нейтрофилов под воздействием *E. coli* и *S. aureus* с помощью разработанного платинового нанoeлектрода;
4. Разработка метода определения молекулярного кислорода внутри сфероидов различного диаметра, полученных из клеток аденокарциномы протоков молочной железы MCF-7, а также внутри мозга крысы с использованием платинового нанoeлектрода с целью оценки степени гипоксии;
5. Разработка электрохимического метода определения соединений Pt (II) внутри живых единичных клеток, сфероидов и опухоли мыши *in vivo* после воздействия противоопухолевых платиносодержащих лекарственных препаратов с целью оценки эффективности их накопления в биологических моделях *in vitro/in vivo*.

Научная новизна. В работе впервые разработаны методы для оценки содержания АФК, молекулярного кислорода и соединений Pt (II) внутри живых единичных клеток, сфероидов и *in vivo* животных моделей с использованием нанокapиллярных сенсоров. Данные методы позволяют проводить высокоточные измерения на уровне отдельных единичных живых клеток и сложных биологических структур, что открывает новые возможности для детального изучения динамических процессов внутри живых клеток и тканей с высокой

пространственно-временной разрешающей способностью и способствует развитию новых направлений в биомедицинских исследованиях и медицинской диагностике.

Впервые продемонстрирована перспективность электрохимического анализа АФК и соединений на основе Pt (II) в микросреде опухолевой ткани мышцы. Разработан подход, позволяющий оценить эффективность противораковых препаратов, в том числе инновационных, по степени индуцированной генерации АФК внутри клеток. Данный подход позволяет более точно и объективно оценивать потенциал новых лекарственных средств и оптимизировать их использование в клинической практике.

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной работе проведена разработка нанокapиллярных сенсоров, предназначенных для определения концентрации дофамина, АФК, кислорода, соединений платины (II). Экспериментально доказана их работоспособность, продемонстрирована высокая чувствительность и стабильность при проведении *in vivo* измерений. В отличие от большинства ранее разработанных электрохимических сенсоров, набор разработанных подходов позволяет проводить измерения в единичных живых клетках, сфероидах и опухоли с минимальным воздействием в виду своего небольшого размера. В работе впервые проведено измерение генерации АФК внутри фаголизосом нейтрофилов под воздействием *E. coli* и *S. aureus*, что предоставляет новые данные о механизмах внутриклеточной защиты и реакции иммунной системы на бактерии. Данные результаты будут способствовать разработке новых методов лечения инфекционных заболеваний и улучшения понимания взаимодействий между патогенами и иммунными клетками. Разработанные в диссертации подходы могут представлять собой практические рекомендации к созданию устройств для определения вышеуказанных аналитов и имеют важное значение для прикладных исследований в области биологии и медицины. Анализ принципов разработанных методов показывает, что описанные в диссертационной работе подходы имеют универсальный характер и могут быть применены при разработке методов определения иных не рассмотренных в диссертационной работе аналитов.

Методология и методы исследования. В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: физико-химические методы характеризации нанoeлектродов (циклическая вольтамперометрия (ЦВ), циклическая вольтамперометрия с быстрой разверткой потенциала (FSCV), амперометрия, растровая электронная микроскопия, спектроскопия КР), методы клеточной биологии (метод культивирования клеток, определение цитотоксичности соединений на монослое клеток и сфероидах), методы микроскопии (оптическая и конфокальная микроскопия), методы создания животных моделей (разработка модели опухоли мышцы).

Положения, выносимые на защиту

1. Малоинвазивная высокочувствительная наноразмерная система на основе углеродного нанoeлектрода с размером электрохимически активной части 50–300 нм позволяет определять концентрацию дофамина с высоким временным и пространственным разрешением и применима для биоаналитических приложений;
2. Малоинвазивная высокочувствительная наноразмерная биоаналитическая система для определения АФК позволяет определять пероксид водорода с пределом обнаружения $0,5 \pm 0,2$ мкМ внутри живых единичных клеток;
3. Разработанный электрохимический метод позволяет определять концентрацию АФК в единичных живых опухолевых клетках и сфероидах под воздействием известных и новых противоопухолевых препаратов и применим для

- определения генерации АФК внутри нейтрофилов под воздействием *E. coli* и *S. aureus* в режиме реального времени;
4. Электрохимический метод определения содержания молекулярного кислорода в условиях *in vitro/in vivo* с использованием разработанного платинового нанозлектрода применим для проведения измерений в 3D моделях сфероидов MCF-7, имеющих гипоксическое ядро, а также внутри головного мозга крысы;
 5. Электрохимический метод определения концентрации цисплатина позволяет проводить малоинвазивные измерения и оценивать накопление платиносодержащих препаратов в единичных живых клетках MCF-7, сфероидах MCF-7 и опухоли мышцы ЕМТ-6.

Личный вклад автора.

Представленные в работе данные получены лично автором или при непосредственном участии автора на всех этапах исследований под руководством профессора д.х.н. Н.Л. Клячко и к.ф.-м.н. А.С. Ерофеева. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и на основании изученных работ составил литературный обзор, сформулировал цели и задачи работы. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнил все эксперименты. Автор самостоятельно собрал, обработал и проанализировал полученные данные, сформулировал выводы по проделанной работе, принимал участие в написании всех статей. Автор участвовал в переписке с редакторами и рецензентами. В работах, опубликованных в соавторстве, значительный вклад (более 30%) принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей. Работа по определению АФК внутри живых единичных клеток под воздействием новых противоопухолевых препаратов выполнялась совместно с сотрудниками Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н. Красновской О.О., к.х.н. Мачулкиным А.Э., к.х.н. Спектором Д.В., к.х.н. Ямансаровым Э.Ю, которые предоставили новые противоопухолевые соединения для исследований. Работа по определению АФК в единичных нейтрофилах выполнялась совместно с д.б.н., проф. С.Н. Плесковой (Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия). Работы по проведению измерений внутри животных моделей были проведены совместно с к.б.н. Т.О. Абакумовой (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия) и к.б.н. А.С. Гараниной (Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва, Россия).

Степень достоверности. Подтверждение достоверности полученных выводов основано на использовании комплекса современных инструментальных методов анализа, статистической обработке полученных данных и сходимости результатов измерений. Научные положения и практические рекомендации, сформулированные в данной диссертации, обусловлены реальными данными, которые были проиллюстрированы в представленных таблицах и графиках. Также важно отметить высокую степень воспроизводимости полученных данных, которая находит подтверждение в их соответствии с результатами альтернативных независимых методов анализа.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на всероссийских и международных научных конференциях и выставках: 9th International conference “Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues” (Ираклион, Греция, 2018); 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); II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Дагомыс, Россия, 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); Microscopy and Microanalysis 2021 (онлайн, США, 2021); 3-я Международная школа-конференция "Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем - 2021" (Москва, Россия, 2021); 4-я Международная школа-конференция "Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем - 2022" (Москва, Россия, 2022).

Публикации. Результаты диссертационной работы опубликованы в 12 статьях в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 4 патентах на изобретение и 11 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№19-79-30062, №19-74-10059).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, оборудования и методов исследований, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, состоящего из 261 ссылки. Диссертация изложена на 204 страницах и включает 74 рисунка и 12 таблиц.

Сокращения, принятые в тексте: АФК – активные формы кислорода, МУВ – микроэлектрод на основе углеродного волокна, КР – комбинационное рассеяние, РЭМ – растровая электронная микроскопия, ФДТ – фотодинамическая терапия, ХСЭ – хлорсеребряный электрод сравнения, ЦВ – циклическая вольтамперометрия, ASGP-R – асиалогликопротеиновый рецептор, FcMeOH – (гидроксиметил)ферроцен, FSCV-циклическая вольтамперометрия с быстрым сканированием, DNP – комплекс платины(IV), модифицированный напроксеном, GalNAc – галактозамин, IVIS – прижизненная флуоресцентная система визуализация, LA-ICP-MS – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой и лазерной абляцией, PBS – фосфатный буферный раствор.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, показана научная новизна работы и ее практическая значимость.

Обзор литературы

В литературном обзоре рассматриваются современные методы, позволяющие определять нейротрансмиттеры, молекулярный кислород, лекарственные средства и АФК в живых организмах в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Рассматриваются типы микро-, субмикроэлектродов, которые уже используются для определения ключевых клеточных метаболитов, рассмотрены принципы работы данных электродов, показаны их преимущества и недостатки. В рамках литературного обзора рассматриваются основные проблемы обнаружения клеточных метаболитов в биологических системах *in vivo* и принципы, позволяющие избежать данные проблемы.

Несмотря на уже разработанные методы, позволяющие определять ключевые биологические анализы, подавляющее большинство рассматриваемых методов имеет большое количество недостатков таких как, высокая инвазивность электрода, недостаточная чувствительность, высокая длительность отклика. В рамках литературного обзора был сделан вывод, что для разработки сенсоров, чувствительных к молекулярному кислороду, АФК и нейротрансмиттерам в качестве основной базы наиболее обосновано использовать кварцевые нанокапилляры, которые в дальнейшем возможно заполнить пиролитическим углеродом и функционализировать платиной. В литературном обзоре также рассматриваются электрохимические процессы, протекающие на наноуровне, обсуждаются основные проблемы, возникающие при работе с наноэлектродами. Основной упор производится на *in vivo* измерения и решение возникающих проблем при проведении подобного рода измерений.

Экспериментальная часть

В главе **материалы и методы** описаны реагенты и методы, использованные в экспериментах данной работы. Приведены методы изготовления углеродных наноэлектродов. Приведены условия для обнаружения дофамина с использованием углеродных наноэлектродов, приведено описание процедуры получения градуировочного графика. Описана процедура подготовки углеродной поверхности и ее модификация платиной. Описаны методы характеристики разработанных наноэлектродов, позволяющие оценить площадь поверхности наноэлектрода, степень ее модифицированности, диаметр наноэлектрода. Изложена последовательность определения активных форм кислорода, дофамина, цисплатина с использованием платинизированного наноэлектрода, а также приведено описание процедуры построения соответствующих градуировочных графиков. Изложена последовательность подготовки биологических образцов (клеточные культуры, культуры бактерий, сфероидов), а также приведено описание подготовки животных к проведению *in vivo* экспериментов.

Результаты и их обсуждение

1. Разработка методики изготовления углеродных электрохимических наноэлектродов

В рамках данного раздела проведена разработка методики изготовления углеродных наноэлектродов. Схема изготовления углеродных наноэлектродов включала в себя: изготовление нанокапилляров из кварцевых заготовок с использованием лазерного пуллера с наноразмерным отверстием на одном из концов и заполнение внутреннего объема пропан-бутановой смесью ($P = 0,1$ кПа) с последующим нагревом до ~ 1200 °С в пламени горелки в течение 5 с. В результате нагрева происходило пиролитическое разложение пропан-бутановой смеси в месте воздействия пламени горелки и образовавшийся пиролитический углерод заполнял часть объема нанокапилляра и его острый конец, осаждаясь внутри нанокапилляра.

Оценка диаметра диска электрохимической углеродной поверхности осуществлялась с помощью электрохимических методов (ЦВ), а также с использованием растровой электронной микроскопии (РЭМ). Размер диска углеродного наноэлектрода зависел исключительно от диаметра конца кварцевого нанокапилляра, поэтому диаметр конца нанокапилляра возможно варьировать в широких пределах (20–800 нм), изменяя параметры вытягивания кварцевых нанокапилляров в лазерном пуллере. Таким образом, были изготовлены углеродные

нанoelectроды с использованием различных нанокapилляров с оптимальным диаметром диска на конце отверстия от 50 до 300 нм (Рис. 1А, В).

ЦВ углеродных нанoelectродов в 1 мМ растворе FcMeOH имели S-образный вид, характерный для электродов, которые обладают наноразмерной электрохимически активной поверхностью. Был определен диаметр и площадь электрохимически активной поверхности с использованием величины предельного диффузионного тока (I_{ss}), который был определен по величине тока плато в диапазоне потенциалов (400-800 мВ) на ЦВ (Рис. 1Б).

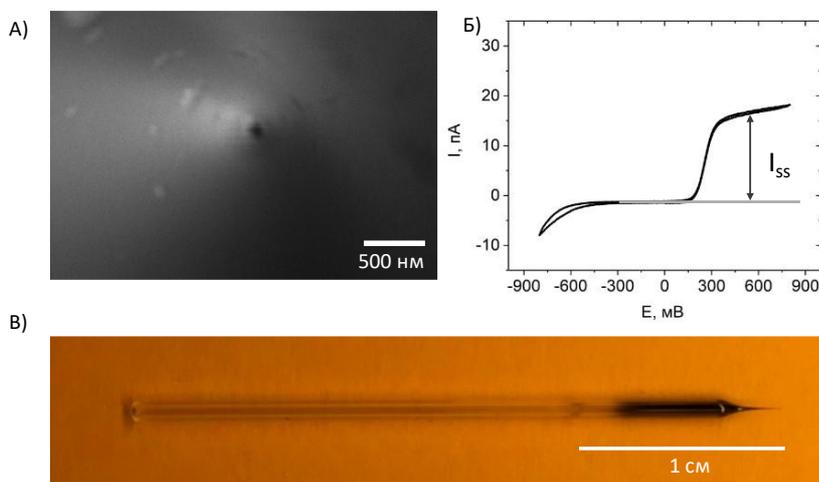


Рис. 1. Характеризация углеродного нанoelectрода (А) РЭМ-изображение конца нанoelectрода, приведено изображение с торца; (Б) ЦВ этого же нанoelectрода в 1 мМ FcMeOH в диапазоне от -800 до +800 мВ отн. ХСЭ (400 мВ/с). Стрелкой показана высота плато на ЦВ, обозначен предельный диффузионный ток; (В) Внешний вид изготовленного углеродного нанoelectрода.

нанoelectроды, у которых предельный диффузионный ток лежал в диапазоне $10 \leq I_{ss} \leq 25$ пА, были наиболее пригодными для проведения дальнейших экспериментов. Нанoelectроды с радиусом менее 30 нм ($I_{ss} < 10$ пА) были малоинвазивны и не приводили к существенным повреждениям единичных клеток. Однако площадь их электрохимической поверхности ($< 2800 \text{ нм}^2$) была мала, поэтому такие нанoelectроды, во-первых, имели недостаточную чувствительность и высокий предел обнаружения, во-вторых, электрохимическое осаждение платины на поверхность электрода было затруднено.

Изготовленные углеродные наносенсоры выступали в качестве малоинвазивной высокочувствительной биоаналитической системы для определения дофамина, а также использовались для дальнейшей электрохимической модификации их поверхности платиной с целью увеличения площади поверхности и повышения электрохимической активности нанoelectрода по отношению к наиболее стабильной форме АФК – пероксиду водорода.

2. Разработка методики изготовления платиновых нанoelectродов

Одна из основных проблем при создании нанoelectродов путем электрохимического осаждения металлов на поверхность заключается в недостаточной стабильности осаждаемого материала, поскольку толщина осаждаемого материала сопоставима с размерами поверхности, на которую он наносится. Для повышения адгезии платины к углеродным электродом было предложено создание нанополости в углеродном слое перед нанесением платины. Электрохимическое травление углеродных нанoelectродов было выполнено методом ЦВ в диапазоне от 0 до 1,9 В в 0,1 М растворе NaOH и 10 мМ KCl. Формирование

При сопоставлении размеров, полученных по микрофотографиям с использованием метода РЭМ, наблюдалась корреляция с электрохимически оценёнными радиусами электродов по формуле (1):

$$i_{ss} = 4.64cDFr \quad (1)$$

где c – концентрация FcMeOH, D – коэффициент диффузии FcMeOH ($7.6 \times 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$), F – постоянная Фарадея, r – радиус дисковой поверхности электрода.

На основании клеточных экспериментов углеродные

полости было подтверждено РЭМ изображениями электродов до и после электрохимического травления (Рис. 2А, Б). После травления контраст между цилиндрическим отверстием и стеклянной оболочкой был выше, чем контраст между углеродным диском и стеклом, что свидетельствует об успешном удалении углеродного материала. После проведения процедуры электрохимического травления углеродной поверхности нанoelectродов на ЦВ, полученной в 1 мМ растворе FcMeOH, были отмечены почти симметричные пики окисления и восстановления FcMeOH с небольшим разделением пиков ($\Delta E_p \sim 20$ мВ), что дополнительно указывало на изменение геометрии поверхности, образование полостей в углеродном слое (Рис. 2В).

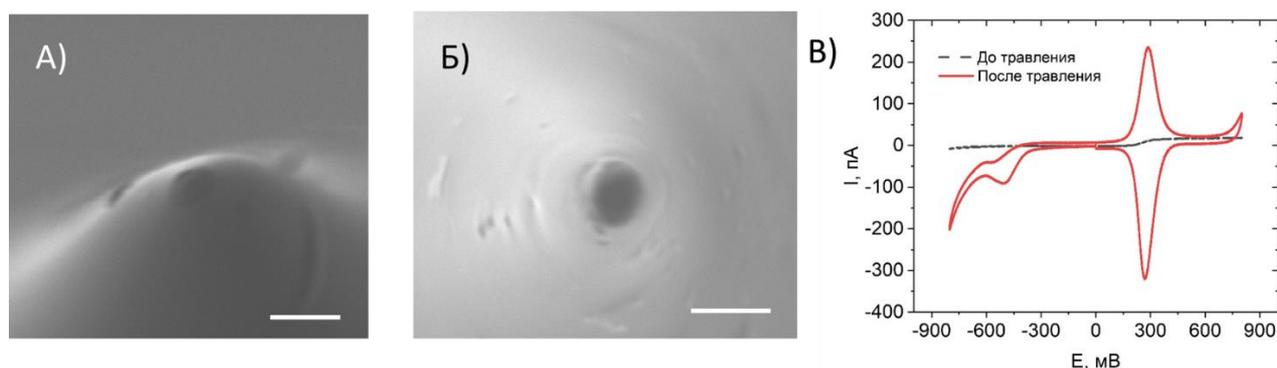


Рис. 2. Травление углеродной поверхности нанoelectрода. РЭМ изображение конца нанoelectрода до (А) и после (Б) травления. (В) ЦВ до и после травления получены в 1 мМ растворе FcMeOH. Скорость развертки 400 мВ/с.

В дальнейшем, в работе оптимизированы процесс осаждения платины на углеродную поверхность в потенциодинамическом режиме. Потенциодинамическое осаждение осуществляли в следующих условиях: диапазон потенциалов от 0 до -800 мВ относительно ХСЭ, состав раствора – 2 мМ H_2PtCl_6 в 0,01 М $HClO_4$. В рамках электрохимического осаждения количество осажденной платины зависело от количества циклов ЦВ. С каждым циклом обычно наблюдали увеличение значений тока, поскольку чем больше платины

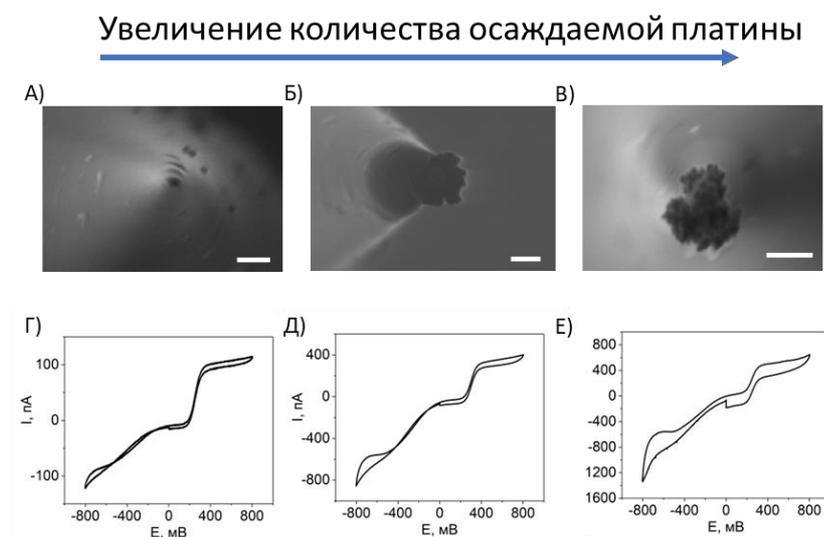


Рис. 3. Влияние степени осаждения платины на чувствительность нанoelectродов. РЭМ изображения концов нанoelectродов с различной степенью осаждения платины размером 250 нм (А), 800 нм (Б), 2 мкм (В). ЦВ в 1 мМ растворе FcMeOH для каждого нанoelectрода с различной степенью осаждения платины размером 250 нм (Г), 800 нм (Д), 2 мкм (Е). Скорость развертки потенциала 400 мВ/с. Градуировочный график по пероксиду водорода, полученный при постоянном потенциале $+800$ мВ отн. ХСЭ, для нанoelectродов размером 250 ± 30 нм (Ж), 800 ± 60 нм (З), $2,0 \pm 0,2$ мкм (И).

осаждалось на углеродную поверхность, тем площадь для следующего цикла осаждения платины была больше, и, следовательно, ток возрастал.

В качестве одного из стабильных аналитов нами была выбрана наиболее стабильная форма АФК – пероксид водорода. Каждый используемый в дальнейших экспериментах изготовленный нанoelectрод был отградуирован в стандартных растворах H_2O_2 (10^{-7} – 10^{-4} М) амперометрически при постоянном потенциале $+800$

мВ относительно ХСЭ. При увеличении количества осажденной платины увеличивался наклон градуировочного графика по H_2O_2 за счет увеличения площади поверхности (Рис. 3 Ж,З,И). Нанозлектрод с $I_{ss} \sim 100$ пА (Рис. 3 А, Г, Ж) был чувствителен по отношению к пероксиду водорода, однако его чувствительность была меньше, чем в случае нанозлектрода с $I_{ss} \sim 400$ пА (Рис. 3Б,Д,З). Однако было показано, что нанозлектрод с $I_{ss} > 500$ пА обладал высокой чувствительностью по сравнению с другими нанозлектродами, при этом не подходил для проведения малоинвазивных исследований, поскольку его физический размер превышал 1 мкм, что ограничивало проведение внутриклеточных измерений (Рис. 3В,Е,И). Была выявлена зависимость, демонстрирующая связь между количеством осажденной платины и углом наклона прямой на градуировочном графике. С увеличением количества осажденной платины, угол наклона прямой на градуировочном графике увеличивался (Табл. 1). Аналитические характеристики платиновых нанозлектродов с различным диаметром приведены в Табл. 1, где приведенный диаметр соотносится с количеством осажденной платины.

Табл. 1. Сравнение аналитических характеристик платиновых нанозлектродов с различным диаметром электрохимически активной поверхности

	Диаметр электрохимически активной поверхности платины		
	250±30 нм	800±60 нм	2,0±0,2 мкм
Предел обнаружения, мкМ	1,2±0,4	0,6±0,2	0,5±0,2
Чувствительность, пА/мкМ	1,28 * 10 ⁵	2,5*10 ⁵	3,04*10 ⁵
Точность (N= 5), %	97	95	94
Линейный диапазон, М	10 ⁻⁶ –10 ⁻⁴	10 ⁻⁶ –10 ⁻⁴	10 ⁻⁷ –10 ⁻⁴
Инвазивность метода	–	+/-	+

Таким образом, была разработана малоинвазивная высокочувствительная наноразмерная биоаналитическая система для внутриклеточного определения АФК, которая позволяет определять пероксид водорода.

3. Определение АФК внутри единичных клеток с использованием платинового нанозлектрода

3.1. Внутриклеточное определение АФК под действием противоопухолевых препаратов

Был разработан новый метод определения АФК в единичных живых клетках и опухоли ЕМТ6 мыши в режиме *in vivo* после воздействия противоопухолевых препаратов, широко используемых в клинической практике с различными механизмами действия: доксорубин, цисплатин, доцетаксел и абиратерон. Время инкубации с препаратами в концентрации IC_{50} составило 1 ч. Исследование было проведено на клеточных линиях рака предстательной железы двух типов РС-3 и 22Rv1. В качестве положительного контроля использовали пероксид водорода с концентрацией 100 мкМ. При проникновении нанозлектродом внутрь клетки значения тока под влиянием доксорубина были намного выше, чем в контрольной клетке, что указывало на более выраженное влияние доксорубина на клетки и последующую внутриклеточную продукцию АФК (Рис. 4А). Уровни АФК в клетках,

инкубированных с доксорубицином, цисплатином, и доцетакселом, были значительно выше, чем в клетках, инкубированных с абиратероном, и контрольных клетках (Рис. 4Б,В).

В рамках разработки методики были подобраны следующие условия проведения эксперимента: шаг проникновения в клетку – 2 мкм, угол проникновения в клетку – 51°. Было установлено, что после проведения внутриклеточного измерения не происходила деградация рабочей электрохимической части наноэлектрода и после манипуляций с клетками их жизнеспособность сохранялась.

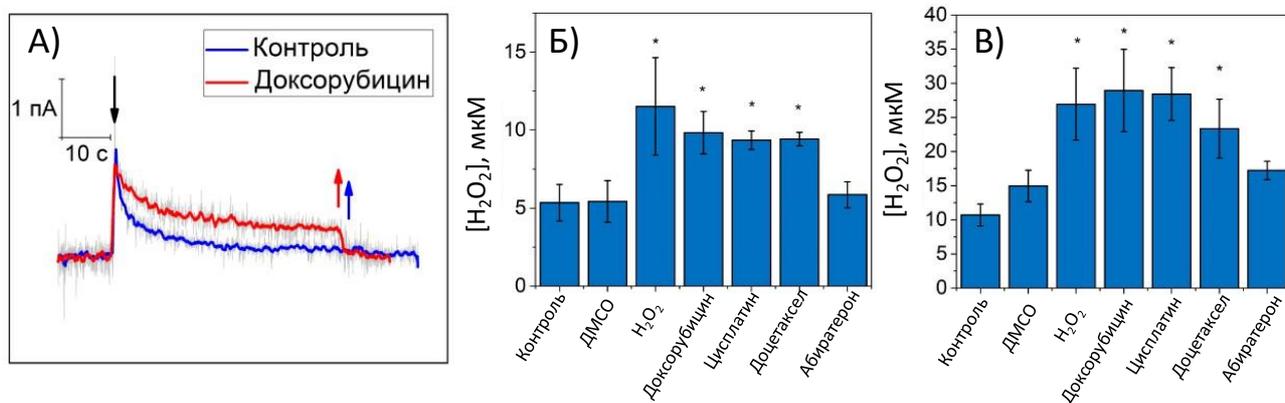


Рис. 4. Результаты измерения АФК внутри клеток под воздействием противоопухолевых препаратов. (А) Амперограммы, полученные внутри контрольной клетки и клетки, инкубированной с доксорубицином. Измерения проведены при постоянном потенциале +800 мВ отн. ХСЭ. Сравнение уровня АФК внутри клеток PC-3 (Б) и 22Rv1 (В) под влиянием различных противоопухолевых препаратов. Докс- Доксорубицин Результаты представлены в виде средних значений ±стандартная ошибка среднего; * - $p < 0,05$ (ANOVA).

Таким образом, разработанный метод позволил оценивать образование АФК клетками под воздействием известных противоопухолевых препаратов. Основными преимуществами этого метода является короткое время инкубации с препаратом, что является важным при скрининге большого количества разрабатываемых препаратов, и малая инвазивность метода. В дополнение к использованию относительно низких концентраций препарата высокая чувствительность метода позволяет обнаруживать более низкие концентрации АФК по сравнению с другими аналогичными методами анализа.

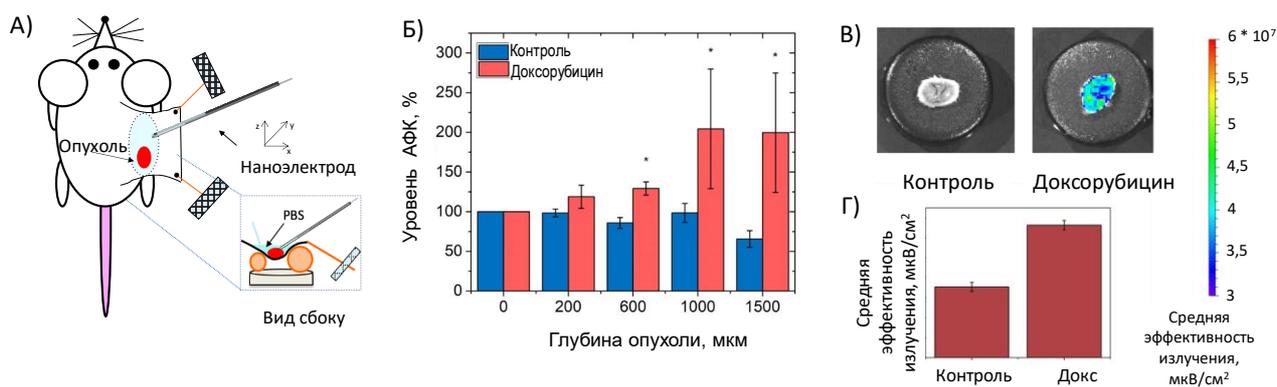


Рис. 5. Измерения АФК внутри опухоли мыши *in vivo*. (А) Схема измерения АФК *in vivo* (Б) Профиль АФК в опухоли мыши 4Т1. Измерение проводилось с использованием ЦВ от -800 мВ до +800 мВ отн. ХСЭ. Вводимая доза липосомального доксорубицина составляла 2 мг/кг. Измерения проводились через 24 часа после введения препарата. Дальнейшие измеренные значения нормировали к фоновому уровню в контрольной группе. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка, $n = 3$, * - $p < 0,05$ (ANOVA). (В) Изображения IVIS опухоли мышей *ex vivo*. (Г) Оценка средней эффективности излучения доксорубицина, накопленного внутри опухоли у мыши, получавшей доксорубицин, в сравнении с контрольной мышью.

Для валидации метода на *in vivo* модели опухоли 4T1 был взят известный противоопухолевый препарат – доксорубин, который вызывает окислительный стресс, как было описано ранее в литературе и показано нами на различных клеточных линиях. Липосомальный доксорубин (2 мг/кг) вводили внутривенно группе мышей (n = 3) и через 24 часа оценивали уровень АФК внутри опухоли на глубинах 200, 600, 1500, 2000 мкм, сравнивая с группой контрольных животных, которым был введен фосфатный буферный раствор (Рис. 5А). В группе мышей, которым был введен липосомальный доксорубин, значения тока значительно увеличивались на глубине 1000-1500 мкм (Рис. 5Б). Стоит отметить, что доксорубин проникает в различные части опухоли из-за ее неоднородности. Было продемонстрировано, что анодный ток значительно увеличился при измерении в опухолях мышей, которым был введен доксорубин, что указывало на увеличение концентрации АФК на глубине 1000-1500 мкм, то есть на проникновение доксорубина внутрь опухоли. Преимуществом разработанного подхода является возможность измерений на разных глубинах опухоли, что является важной задачей в виду неоднородности опухоли и невозможности проведения флуоресцентных измерений в глубоких слоях опухолевой ткани.

После электрохимических измерений у мышей удаляли опухоли и исследовали с помощью прижизненной флуоресцентной системы визуализации (IVIS) *ex vivo*. С помощью IVIS было подтверждено, что флуоресценция доксорубина была в 1,5 раза выше, чем автофлуоресценция контрольных опухолей, из чего следует, что доксорубин действительно накопился внутри опухоли мыши (Рис. 5В, Г).

Таким образом, было продемонстрировано, что наноэлектрод можно использовать для *in vivo* измерения АФК у мышей с опухолями. Кроме того, использование наноэлектрода позволило нам впервые продемонстрировать возможность обнаружения АФК и ответа на лечение доксорубином у живых мышей с опухолями, что указывает на потенциальную ценность этого практического подхода и предполагает, что его можно применять для изучения механизма действия и для мониторинга эффективности противоопухолевых препаратов.

3.2. Определение АФК внутри живых единичных клеток под воздействием новых противоопухолевых препаратов

После апробации работы нанокapиллярного сенсора внутри клеток под воздействием известных противораковых препаратов были проведены исследования с использованием новых синтезированных противораковых препаратов, которые были предоставлены научными группами под руководством к.х.н. Красновской О. О., к.х.н. Мачулкина Э.А. и к.х.н. Ямансарова Э.Ю.

Нами было изучено действие ряда таргетных препаратов, которые представляли собой конъюгаты противоопухолевого соединения и вектора, специфичного либо к асиалогликопротеиновым рецепторам (ASGP-R) на поверхности клеток либо к рецепторам простат-специфичного мембранного антигена (ПСМА).

На первом этапе было изучено влияние конъюгата доцетаксела с вектором к ПСМА (ПСМА-Доц) на генерацию АФК на клеточных линиях 22Rv1 (+ПСМА-рецепторы) и PC-3 (-ПСМА-рецепторы) (Рис. 6А). После инкубации клеточной линии PC3 с конъюгатом ПСМА-Доц на основе доцетаксела статистически значимых изменений концентрации АФК по сравнению с контролем не наблюдалось, что свидетельствовало об отсутствии влияния данного соединения к клеточной линии PC3 (Рис. 6Б).

На примере клеточной линии 22Rv1 наблюдалось достоверное увеличение АФК при действии обоих препаратов. Поскольку эта клеточная линия имеет ПСМА-рецепторы на своей поверхности, эффективность воздействия конъюгата была выше, чем для доцетаксела. Таким образом, доцетаксел и ПСМА-Доц оказывают влияние на гибель клеток в клеточных линиях, однако в клеточной линии 22Rv1 конъюгат ПСМА-Доц, благодаря своей специфичности к ПСМА рецепторам вызывает значительное усиление окислительного стресса и увеличение концентрации АФК более чем на 30% в клетках, что может способствовать дальнейшей гибели клеток (Рис. 6В).

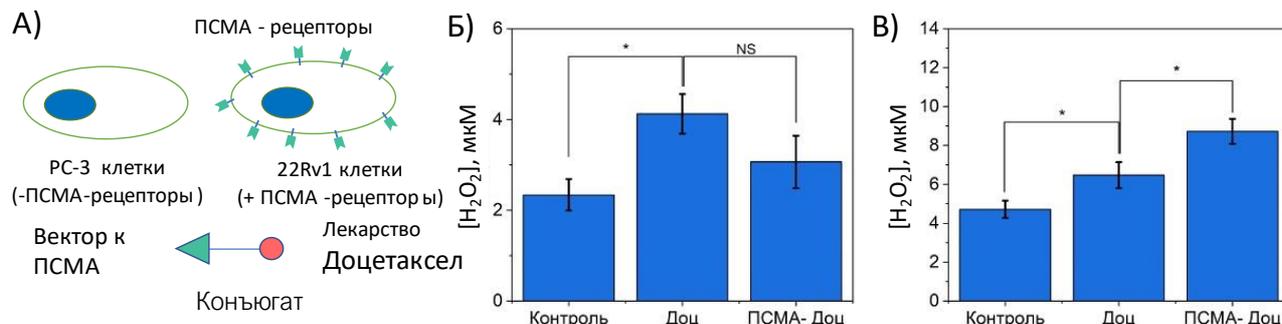


Рис. 6. Влияние конъюгата ПСМА-Доц на генерацию АФК в клеточных линиях рака предстательной железы PC3 и 22Rv1. (А)Схема эксперимента с ПСМА-Доц на клеточных линиях PC3 и 22Rv1. Сравнение уровня АФК внутри клеток PC3 (Б) и 22Rv1 (В) под влиянием доцетаксела и ПСМА-доцетаксела. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ (ANOVA).

На втором этапе было изучено влияние конъюгатов доцетаксела с вектором к ASGP-рецепторам. ASGP-R и галактозамин (GalNac) взаимодействуют между собой и играют критическую роль в регуляции метаболизма гликопротеинов и липопротеинов в организме. ASGP-R имеет специфические связывающие сайты, которые распознают GalNac, что приводит к образованию комплекса между рецептором и гликопротеином с последующим переносом внутрь клетки.

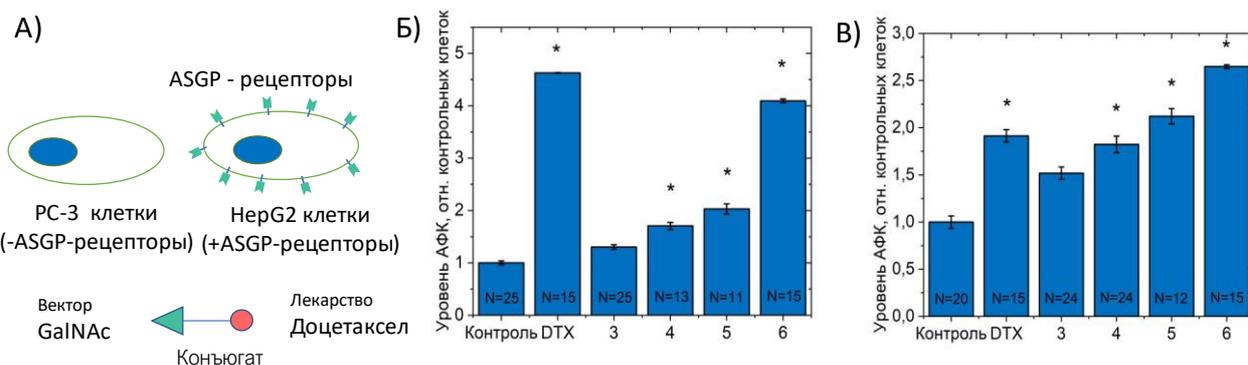


Рис. 7. Влияние конъюгата доцетаксела и GalNac на генерацию АФК в клетках. (А) Схема эксперимента с конъюгатами на основе доцетаксела и GalNac, отличающимися различными линкерами, на клеточных линиях PC3 и HepG2; Измерения АФК внутри клеток: PC-3 (Б) и HepG2 (В) в присутствии 100 мкМ GalNac (внизу), обработанных конъюгатами 3-6 или доцетакселом (DTX) в течение 1 часа. * - $p < 0,05$ (ANOVA).

Были исследованы 4 производных конъюгатов GalNac и доцетаксела, отличающихся различной длиной линкера, связывающего доцетаксел и GalNac. (Рис. 7А). Эксперименты были проведены на двух клеточных линиях, экспрессирующих ASGP-R рецепторы (HepG2 - гепатоцеллюлярная карцинома человека) и не экспрессирующие данный вид рецепторов (PC-3 -аденокарцинома предстательной железы человека).

После инкубации конъюгатов и доцетаксела с клетками РС3 значения уровня АФК возросли. Однако, общий уровень АФК не превышал значения, которое было измерено в клетках под влиянием доцетаксела. Поэтому можно предположить, что проникновение конъюгатов 3-6 в клетки РС-3 затруднено (Рис. 7Б).

После инкубации соединений с клетками НерG2 (ASGP-R +) наблюдали также значимое увеличение АФК в сравнении с контрольными клетками более чем в 1,5 раза. Причем при сравнении с уровнем АФК в клетках, инкубированных с доцетакселем, конъюгат 6 вызвал значительное увеличение уровня АФК на 50% (Рис. 7В), что свидетельствовало об его улучшенном проникновении.

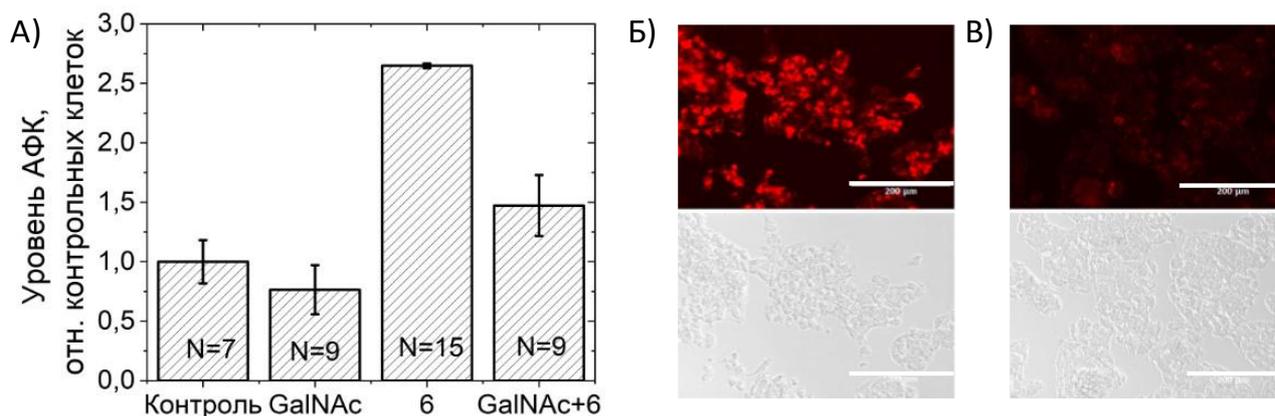


Рис. 8. Измерение уровня АФК в единичных живых клетках НерG2 при ингибировании ASGP-R под воздействием соединения 6. (А) Электрохимическое определение АФК в клетках НерG2 под воздействием конъюгата 6 и при ингибировании GalNAc. Флуоресцентные (вверху) и светлопольные (внизу) изображения клеток НерG2, обработанных соединением 6, меченных Cy5 (Б) и в присутствии 10 мМ GalNAc(В). Масштабный отрезок 200 мкм.

Для оценки рецептор-опосредованного эндоцитоза осуществляли ингибирование ASGP-R путем инкубации с избыточным количеством GalNAc (100 мкМ). При добавлении соединения 6 к клеткам НерG2 с использованием нанoeлектродов было показано, что существенное снижение уровня АФК было в более чем 1,6 раза после ингибирования рецепторов (Рис.8 А). Эксперименты с меченым Cy5 соединением 6 показали схожие результаты. После ингибирования ASGP-R вещество существенно хуже проникало внутрь клеток НерG2 (Рис. 8 Б, В). Таким образом, было установлено, что конъюгат 6 проникает внутрь клеток посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. С помощью разработанного метода возможно исследовать влияние таргетных препаратов без использования флуоресцентных меток, что является важным преимуществом.

3.3. Определение АФК в единичных нейтрофилах под воздействием *E. coli* и *S. aureus*

Генерация АФК в нейтрофилах является важнейшим бактерицидным фактором и защитным механизмом иммунной системы. При взаимодействии нейтрофилов с бактериями происходит образование фаголизосом, заполненных АФК. Поглощенная бактерия включается во внутриклеточную вакуоль -фагосому, которая сливается с лизосомами нейтрофила, образуя фаголизосому. При исследовании процесса взаимодействия важно оценивать не только суммарную способность образовывать АФК всей популяцией нейтрофилов, но и разрабатывать методы, которые позволили бы оценить способность генерировать АФК отдельными нейтрофилами с высоким временным разрешением. Исследование АФК-

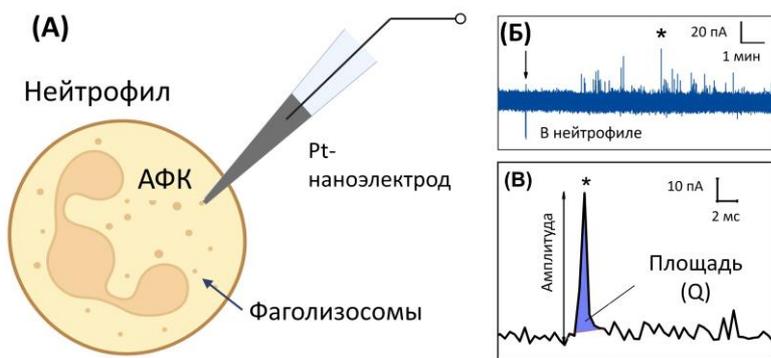


Рис. 9. Электрохимическое определение АФК внутри нейтрофила с использованием Pt нанoeлектрода. А) Схема эксперимента, демонстрирующая внутриклеточное измерение в нейтрофиле. Б) Хроноамперограмма, записанная внутри нейтрофила. В) Увеличенный спайк, отмеченный на хроноамперограмме звездочкой, с указанием измеряемых параметров (амплитуда и площадь).

Измерения проводили кулонометрически, площадь под каждым спайком представляла собой полное окисление АФК в каждой фаголизосоме (Рис. 9В).

Ответ на стимуляцию нейтрофилов *S. aureus* отличался от стимуляции *E. coli*. Во-первых, гораздо большее количество нейтрофилов активировалось и формировало спайки при инкубации с *S. aureus*. Во-вторых, спайки характеризовались гораздо более выраженной амплитудой и частотой, характер спайков существенно отличался – часто наблюдались серии спайков в случае с *S. aureus* (Рис. 10А, Б). В-третьих, время наступления первой серии спайков отодвигалось по сравнению с *E. coli* на более поздний срок. Время регистрации спайков у нейтрофилов, активированных *E. coli* составляло 10-15 мин, тогда как для нейтрофилов, стимулированных *S. aureus* – 7-8 мин, т.е. респираторный взрыв в первом случае имел более растянутый по времени и менее интенсивный характер, тогда как во втором – более кратковременный и более интенсивный (Рис. 10А, Б).

Для количественной оценки генерации АФК определяли площадь и амплитуду каждого спайка. На Рис. 11 показаны амплитуда спайка и заряд, протекающий после высвобождения из фаголизосомы АФК, которые характеризуют количество молекул внутри одной фаголизосомы. Таким образом, количество АФК, вырабатываемых под воздействием *S. aureus* было в 5,5 раз больше, чем под воздействием *E. coli*. В целом, уровень АФК в нейтрофилах

продуцирующей способности нейтрофилов было проведено с помощью платинового нанoeлектрода, с помощью которого проникали внутрь нейтрофилов, адгезированных на дне чашки Петри (Рис 9А). При столкновении фаголизосом внутри нейтрофила, заполненных АФК, с рабочей электрохимически активной поверхностью происходило окисление АФК. Данный процесс сопровождался увеличением тока на электроде

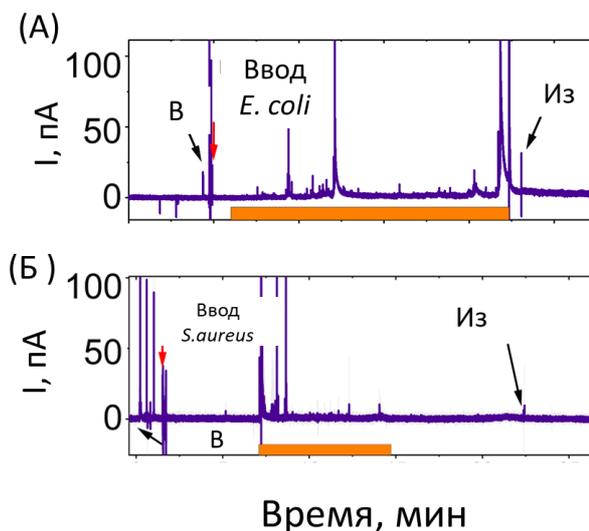


Рис. 10. Амперограммы, измеренные в единичном нейтрофиле, при потенциале +800 мВ отн. ХСЭ при воздействии *E. coli* (А) и *S. aureus* (Б). МОИ 50, измерения проводились в режиме реального времени, оранжевым выделены участки амперограммы с наиболее ярко выраженной генерацией АФК.

после активации *S. aureus* был значительно выше, чем уровень АФК после активации клеток *E. coli*.

Таким образом, с помощью разработанного метода были изучены быстрые процессы с временным разрешением ~ 0,5 мс, что позволило измерить заряд и амплитуду возникающих спайков.

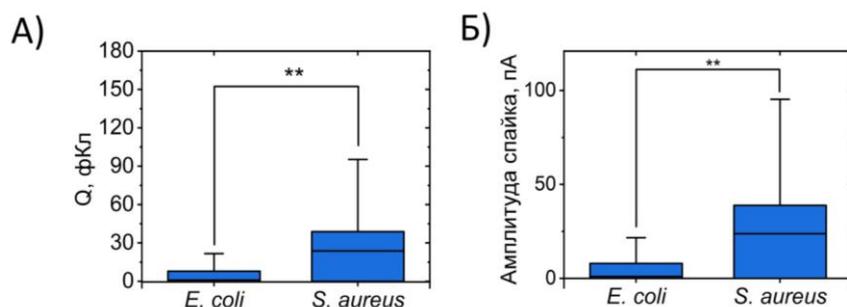


Рис. 11. Сравнение выработки АФК внутри нейтрофилов под действием двух разных культур. А) средняя площадь под кривой спайка, показанная как заряд, прошедший при окислении фаголизосомы. Б) средняя амплитуда спайков. Количество спайков для *E. coli* (N = 166), *S. aureus* (N=392)** - p < 0,001 (ANOVA)

4. Разработка методики электрохимического определения концентрации молекулярного кислорода с помощью платинового наноэлектрода

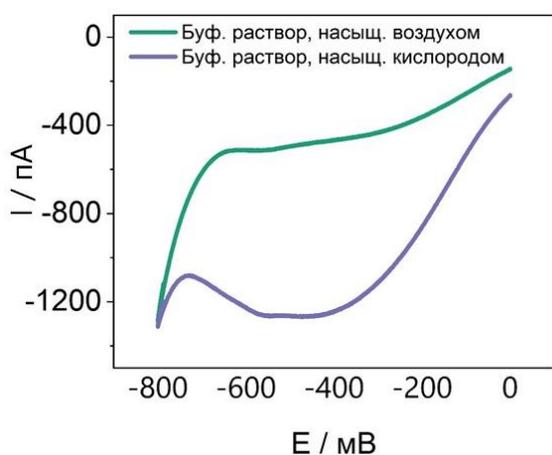


Рис. 12. ЦВ, записанные в 0,1 М фосфатном буферном растворе при рН 7,4 в насыщенном воздухе (21 %) (зеленая линия) и кислородом (синяя линия)

Ранее изготовленный платиновый наноэлектрод был использован для разработки метода определения концентрации молекулярного кислорода. Для этого была разработана методика, которая позволяет с высокой чувствительностью и селективностью определять молекулярный кислород в буферном растворе и в биологических моделях. Были записаны ЦВ (от -800 до +800 мВ, скорость развертки 400 мВ/с) в буферных растворах, насыщенных воздухом и кислородом. По мере увеличения концентрации кислорода в растворе величина плато тока в диапазоне потенциалов восстановления кислорода (-500 - -600 мВ отн. ХСЭ) увеличивалась (Рис. 12).

Для обеспечения надежности предлагаемого метода обнаружения кислорода в биологических моделях была осуществлена градуировка платинового наноэлектрода в растворах с различной концентрацией кислорода (0; 16; 28,6; 37,6; 44,4; 50; 60; 66,6; 71 %) (Рис. 13А,Б).

Селективность сенсора была проверена с использованием различных биологически активных веществ, присутствующих в живых системах, таких как глюкоза, нитрит натрия, нитрат натрия, аскорбиновая кислота, серотонин и дофамин, которые могут влиять на его работу. (Рис. 13В). Показано, что разработанный платиновый электрода обладал характеристиками, позволяющими осуществлять измерения в физиологических условиях, и эти соединения в физиологических концентрациях не влияют на измерения содержания кислорода в системе. Таким образом, предел обнаружения молекулярного кислорода в растворе составил 5 ± 2 мкМ, линейный диапазон работы 10 – 250 мкМ.

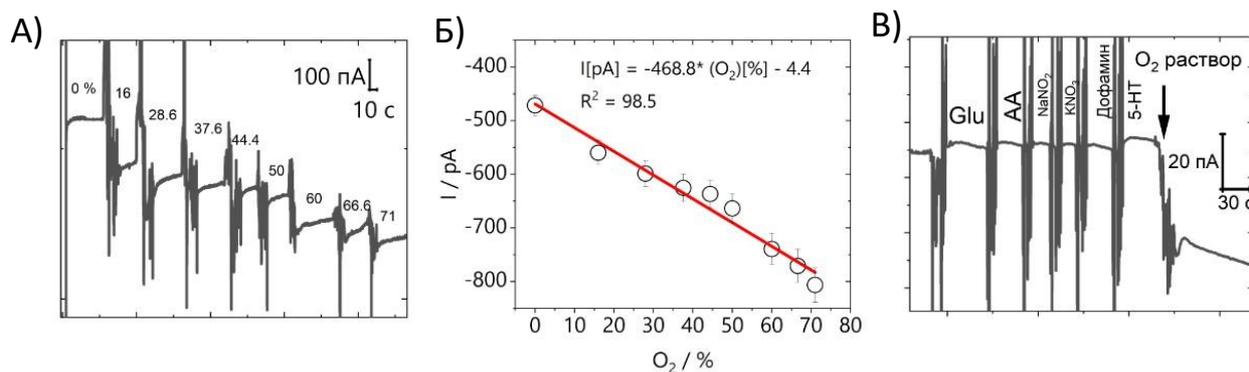


Рис. 13. Чувствительность и селективность платинового нанозэлектрода по отношению к кислороду. А) Амперограмма, полученная в фосфатном буферном растворе с различной концентрацией кислорода Б) Градуировочный график, полученный в растворах с концентрацией кислорода 0; 16; 28,6; 37,6; 44,4; 50; 60; 66,6; 71 %. В) Ответ нанозэлектрода по отношению к глутамату натрия (Glu), аскорбиновой кислоте (AA), нитриту натрия (NaNO_2), нитрату калия, дофамину, серотонину (5-НТ) и молекулярному кислороду. Эксперимент осуществлен в амперометрическом режиме.

4.1. Определение концентрации молекулярного кислорода внутри опухолевых сфероидов MCF-7

Для апробации работы разработанного наносенсора были проведены эксперименты на опухолевых сфероидах MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы человека) со средним диаметром 400–1000 мкм, которые представляют собой 3D модель опухоли и являются промежуточным звеном между 2D культурой и опухолью *in vivo*, также являются релевантной моделью гипоксии опухолевой ткани. С целью оценки влияния размера сфероида на уровень гипоксии внутри ядра сфероида были выращены сфериды, состоящие из ~4000, ~8000 и ~16000 клеток.

Измерения концентрации кислорода осуществляли как внутри, так и снаружи сфероида (Рис. 14А). Измерения на поверхности сфероида были необходимы, поскольку опухолевые клетки по причине своего активного метаболизма потребляют из питательной среды кислород с высокой скоростью. (Рис. 14А). Были построены зависимости концентрации кислорода от $R_s/(r + R_s)$ для определения поверхностных концентраций кислорода, где R_s – радиус сфероида, а r – расстояние между нанозлектродом и поверхностью сфероида. Из пересечений при $R_s/(r + R_s) = 1$ было установлено, что поверхностные концентрации кислорода для сфероидов разного размера находятся в диапазоне от 150 до 170 мкМ. Концентрация кислорода в буферном растворе составляла 220 мкМ.

Различная концентрация кислорода на поверхности сфероидов разного диаметра объяснялась различной скоростью потребления кислорода (Рис. 14Б). Скорость потребления кислорода сфероидом, состоящим из 16000 клеток, составила 710 фмоль/с, что согласуется с предыдущими исследованиями. При увеличении размера сфероида в 2 раза по количеству клеток скорость потребления кислорода увеличивается почти в 1,5 раза, а при увеличении размера сфероида в 4 раза скорость потребления кислорода на поверхности сфероида увеличивается практически в 2 раза (Рис. 14В). Таким образом, метод позволяет зафиксировать изменения скорости потребления кислорода сфероидными при изменении количества клеток в сфероиде.

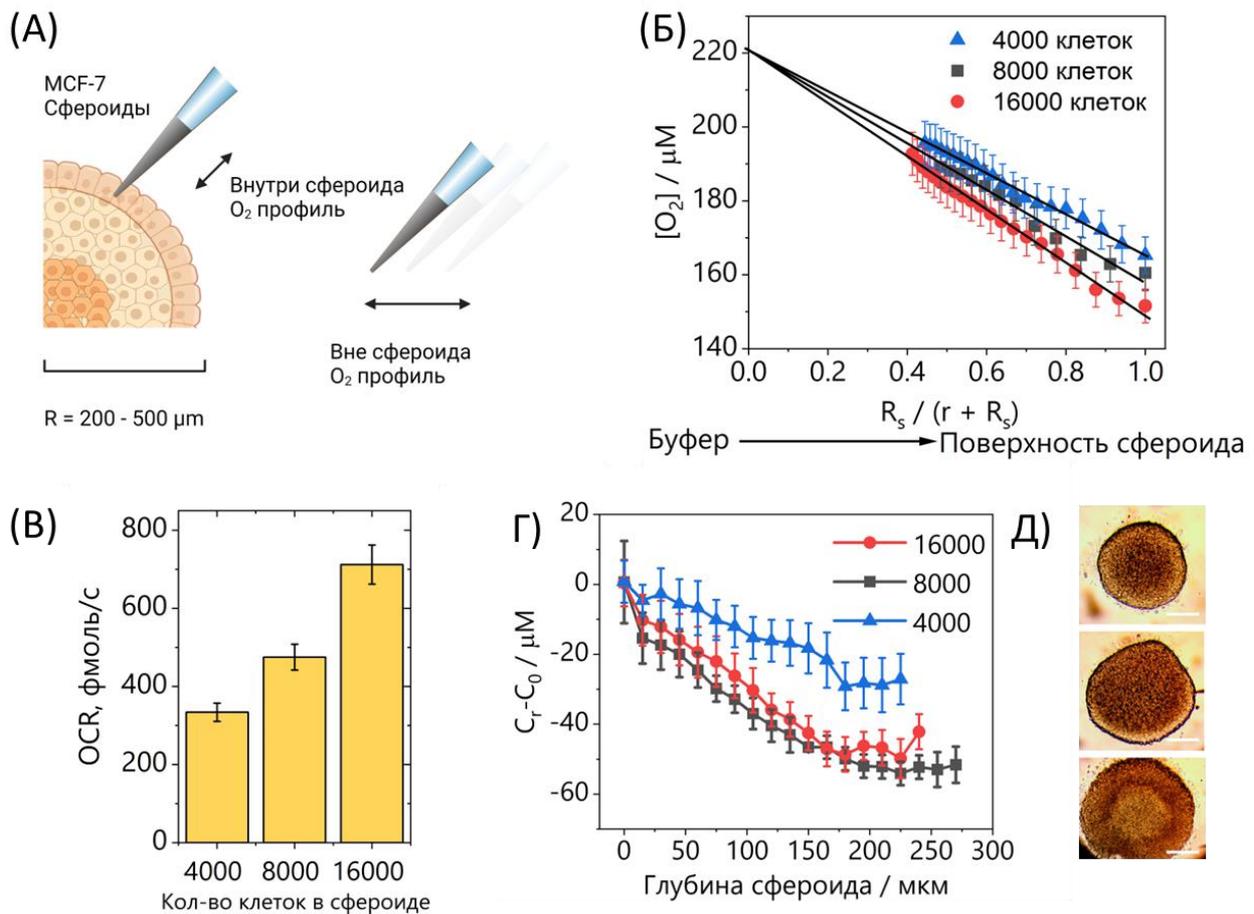


Рис. 14. Измерение концентрации молекулярного кислорода на поверхности и внутри сфероида (А) Схема проведения эксперимента. (Б) Кислородный профиль, измеренный вне сфероида (В) Скорость потребления кислорода сфероидами, содержащими разное количество клеток (4000, 8000, 16000 клеток) (Г) Кислородный профиль внутри сфероидов MCF-7 (n = 3, для каждого условия культивирования). Условия культивирования: 4000, 8000, 16000 клеток на сфероид. (Д) Микрофотографии сфероидов разного диаметра, используемых в эксперименте. Масштабный отрезок 100 мкм.

При проведении измерений внутри сфероидов концентрация кислорода уменьшалась при движении к центру сфероида (Рис. 14Г), что соответствовало литературным данным, свидетельствующим о том, что внутри сфероидов наблюдается снижение концентрации кислорода из-за ограничений транспорта кислорода к ядру и активного метаболизма опухолевых клеток. При этом гипоксия в сфероидах, состоящих из большего количества клеток, была наиболее выражена, а снижение концентрации кислорода наблюдалось при продвижении вглубь сфероида и начиналось значительно раньше (Рис. 14Г, Д).

Таким образом, с помощью разработанного метода удалось определить концентрацию молекулярного кислорода в приповерхностных и внутренних слоях на разных глубинах сфероидов и оценить потребление кислорода сфероидом диаметром 400-1000 мкм.

4.2. Определение концентрации кислорода в имплантированной глиобластоме С6 и здоровой ткани головного мозга крысы

Для апробации работы сенсора *in vivo*, были проведены измерения в верхних слоях коры головного мозга крысы. Высокая стабильность и малая инвазивность наноэлектрода позволили провести мониторинг и сравнение содержания молекулярного кислорода внутри глиобластомы С6, имплантированной в мозг крысы, с корой головного мозга в условиях *in*

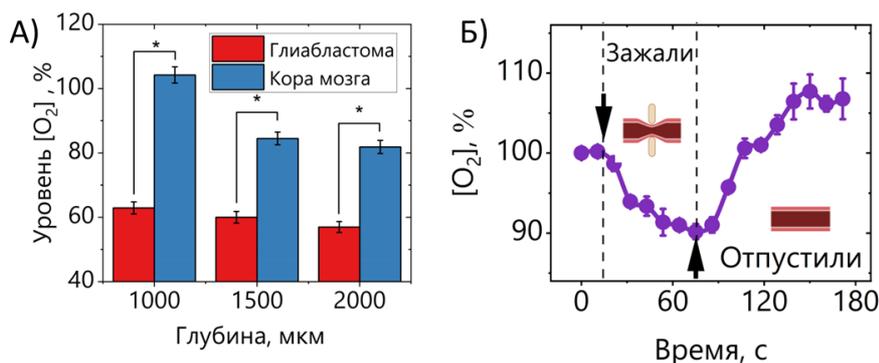


Рис. 15. Определение концентрации кислорода в имплантированной глиобластоме С6 и здоровой ткани головного мозга крысы (А) Относительный уровень кислорода в коре головного мозга крысы (N=3) на глубинах 1000, 1500, 2000 мкм. * - $p < 0,05$ (ANOVA) (Б) Моделирование процесса церебральной ишемии. На графике продемонстрировано изменение уровня кислорода в коре головного мозга в режиме реального времени (N =3).

vivo. Для измерения кислорода в области с имплантированной опухолью делали отверстие в черепе крысы диаметром 1,5 мм, с помощью манипулятора подводили наноэлектрод и проводили измерения на глубинах 1; 1,5; 2 мм от внутренней поверхности черепа. Содержание кислорода внутри опухоли было статистически значимо меньше по сравнению со здоровой

тканью, а при перемещении внутрь опухоли наблюдалось снижение содержания кислорода на ~ 40% (Рис. 15А). Из литературных данных известно, что опухоль глиобластомы С6 плохо васкуляризована, картина снижения содержания кислорода более четкая по сравнению со здоровой тканью головного мозга.

С целью валидации работы наноэлектрода в режиме реального времени был смоделирован процесс церебральной ишемии, который включал в себя пережатие артерий, ведущих к мозгу. Продемонстрировано существенное снижение содержания уровня кислорода после пережатия обеих общих сонных артерий хирургическими зажимами с последующим восстановлением кровотока в сонных артериях, в результате которого происходило постепенное увеличение содержания кислорода, что является еще одним подтверждением успешной работы сенсора в условиях *in vivo* (Рис. 15Б).

5. Определение соединений, содержащих Pt(II) внутри биологических моделей *in vitro/in vivo*

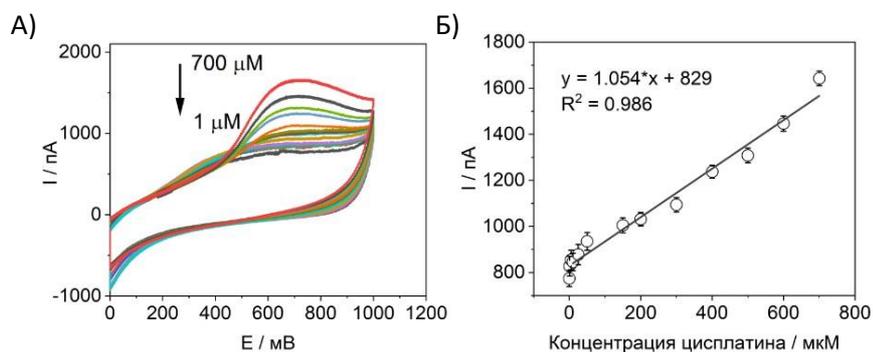


Рис. 16. Определение цисплатина в растворах с различной концентрацией цисплатина (А) ЦВ, записанные в растворах с концентрацией цисплатина от 1 до 700 мкМ. Диапазон -500 – 950 мВ, скорость развертки 400 мВ/с (Б) Градуировочный график по отношению к цисплатину.

Для определения комплексов Pt(II) с помощью платинового наноэлектрода был разработан протокол ЦВ с параметрами -500 – 950 мВ, 400 мВ/с, при котором происходило окисление Pt (II) до Pt(IV). В качестве основного контрольного аналита - комплекса Pt(II) был использован *цис-*

[Pt(NH₃)₂Cl₂] (цисплатин). На ЦВ, записанной в 0,5 мМ растворе цисплатина с помощью изготовленного углеродного наноэлектрода не наблюдалось четкого пика окисления $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$, в отличие от платинового наноэлектрода, который был чувствителен по

отношению к цисплатину. При записи ЦВ с использованием платинового нанoeлектрода присутствует выраженный пик окисления при потенциале 0,65–0,7 В отн. ХСЭ. При обратной развертке не наблюдалось четкого катодного пикового тока, что указывало на химически необратимый процесс окисления $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$.

Для обеспечения надежности предлагаемого способа обнаружения комплексов платины (II) в живых биологических системах предварительно была выполнена градуировка нанoeлектрода с использованием растворов цисплатина с разной концентрацией в буферном растворе PBS (Рис. 16А, Б). Предел обнаружения для платинового нанoeлектрода составил 1 мкМ, линейный диапазон составил от 5-500 мкМ.

Перед проведением *in vitro/in vivo* экспериментов была произведена оценка влияния ДНК и бычьего сывороточного альбумина на поверхность нанoeлектрода. Известно, что цисплатин способен взаимодействовать с молекулами ДНК, а белки, присутствующие в организме, способны адсорбироваться на поверхности нанoeлектрода, что обычно сказывается на снижении отклика нанoeлектрода. Однако данные биомолекулы в физиологических концентрациях существенно не влияли на электрохимически активную поверхность и, в целом, на проведение *in vitro/in vivo* электрохимических измерений.

Ранее нами и по литературным данным было показано, что цисплатин индуцирует образование АФК в клетках. ЦВ в растворе цисплатина были записаны в присутствии H_2O_2 в физиологической концентрации (0-10 мкМ) с целью оценки влияния пероксида водорода на определение цисплатина в растворе с физиологическими концентрациями пероксида водорода. В 10 мкМ растворе цисплатина ток в диапазоне 200-800 мВ увеличивался после увеличения концентрации H_2O_2 . Для определения высоты анодного пика была рассчитана базовая линия (Рис. 17А). Наклон зависимости тока при +800 мВ от концентрации добавленного пероксида водорода был одинаковым в растворах цисплатина при различных концентрациях (Рис. 17Б). Исходная линия (показана черным цветом) соответствовала ЦВ в 10 мкМ растворе пероксида водорода (Рис. 17Б). Было показано, что с увеличением концентрации H_2O_2 фоновый ток в диапазоне 200–800 мВ увеличивался, но высота анодного окислительного пика Pt^{II}/Pt^{IV} не изменялась (Рис. 17В). Следовательно, содержание H_2O_2 не влияло на обнаружение Pt(II) в образцах.

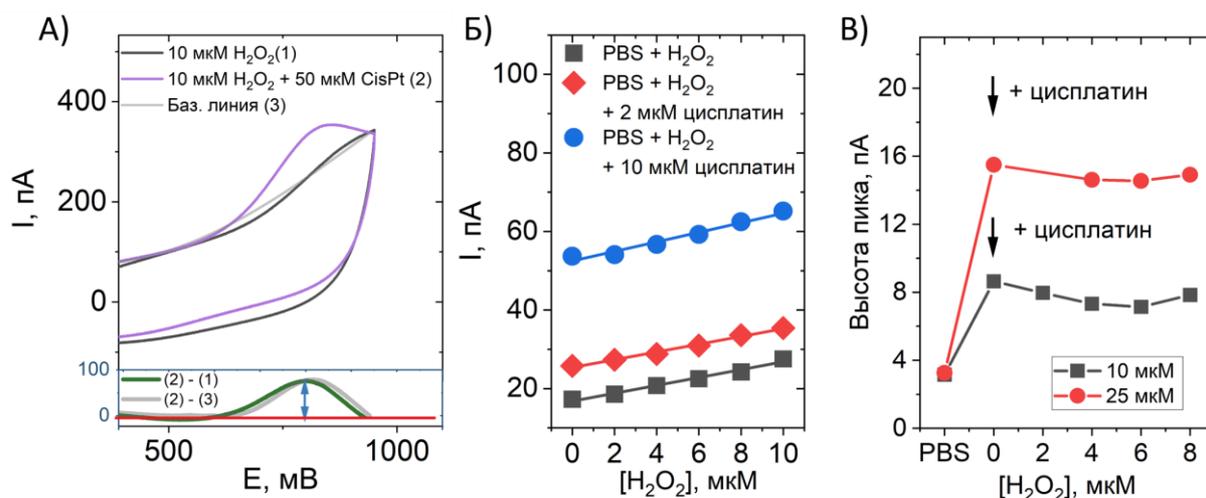


Рис. 17. Оценка влияния физиологических концентраций пероксида водорода на определение цисплатина в растворе. (А) ЦВ в 10 мкМ H_2O_2 и 10 мкМ H_2O_2 + 50 мкМ цисплатин. Диапазон -500 – 950 мВ, скорость развертки потенциала 400 мВ/с (Б) Измеренный ток при потенциале +800 мВ в разных растворах пероксида водорода (0-10 мкМ) и смеси пероксида водорода и цисплатина с концентрацией 2 или 10 мкМ (В) Зависимость высоты анодного пика окисления цисплатина от концентрации пероксида водорода. Все измерения проводили в растворе PBS (pH 7,4). Скорость развертки потенциала 250 мВ с⁻¹.

Для сравнения внутриклеточной концентрации цисплатина, накопленного в клеточной линии MCF-7 (рак молочной железы человека), клетки были проинкубированы со 100 мкМ цисплатина (Рис. 18А,Б) и с высоколипофильным пролекарством (DNP) на основе Pt(IV) (5 мкМ) в течение 6 и 24 часов. Молекула DNP представляет собой комплекс платины (IV), координируемый 2 лигандами напроксена. Из литературных данных известно, что комплексы платины (IV) гораздо эффективнее накапливаются в клетках и опухолях с последующим восстановлением до Pt(II). Ранее с использованием рентгеновской спектроскопии ближней адсорбции на опухолевых клетках, предварительно инкубированных с данным препаратом, было показано, что DNP функционирует как пролекарство, попадая в клетку в форме Pt(IV), после чего медленно высвобождает цисплатин.

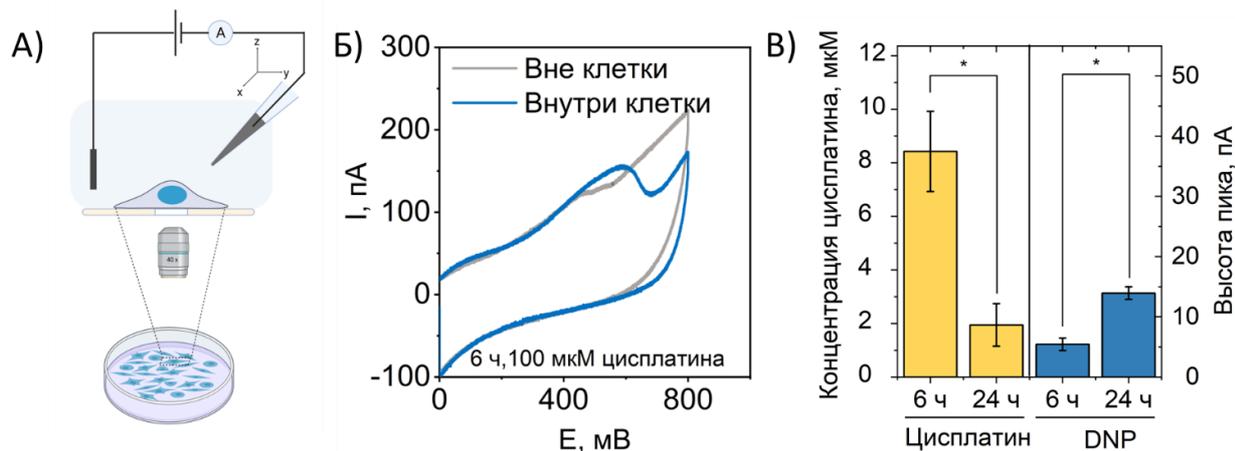


Рис. 18. Внутриклеточное определение цисплатина. (А) Схема определения цисплатина внутри клеток MCF-7. (Б) ЦВ внутри и снаружи клетки, инкубированной в 100 мкМ растворе цисплатина в течение 6 ч. Диапазон -500 – 800 мВ, скорость развертки потенциала 400 мВ/с (В) Накопление цисплатина и DNP в клетках MCF-7 через 6 и 24 ч.

После инкубации в течение 6 часов с цисплатином его внутриклеточное содержание составило около 8 мкМ (Рис. 18В), после 24 ч инкубации концентрация цисплатина в клетках снижалась до 2 мкМ (Рис. 18В). По истечении 24 часов инкубации с DNP наблюдался рост анодного пика $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$, что связано с накоплением DNP и последующим постепенным высвобождением цисплатина из DNP. Увеличение концентрации высвобожденного цисплатина вплоть до 3 мкМ, обнаруженное при использовании DNP, оказалось сопоставимым с результатами, полученными при использовании 100 мкМ цисплатина несмотря на то, что используемая концентрация DNP была на порядок ниже исходной концентрации цисплатина (10 мкМ).

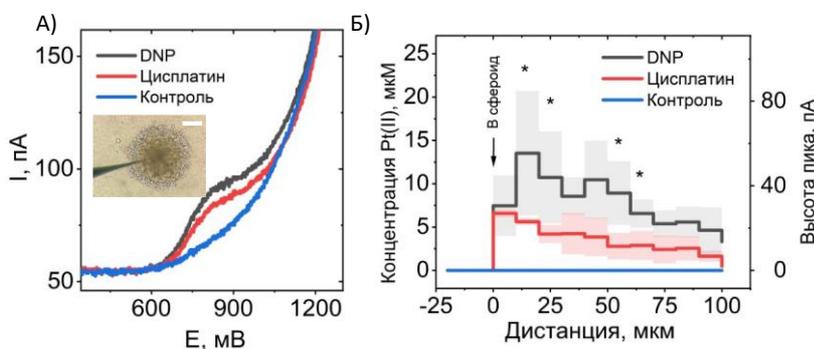


Рис. 19. Определение цисплатина внутри сфероидов (А) ЦВ, полученные внутри сфероидов, под воздействием цисплатина и DNP (Б) Профили накопления DNP и цисплатина внутри сфероидов. Масштабная шкала 100 мкм.

Ограниченная доступность лекарств, а также градиенты кислорода и питательных веществ, представляют важные параметры для сфероидов, делая их ближе к модели опухоли *in vivo*. Для измерения концентрации цисплатина на различных глубинах сфероидов MCF-7

после инкубации 6 часов с 100 мкМ цисплатина и DNP был использован наноэлектрод, вводимый в сфероид с шагом в 5 мкм. Полученные вольтамперограммы (Рис. 19А) показали присутствие цисплатина как в предварительно инкубированных цисплатином, так и DNP сфероидов MCF-7. Выявлено, что наиболее высокие концентрации цисплатина и DNP отмечались в поверхностных слоях сфероидов, снижаясь по мере приближения к ядру (Рис. 19Б). Таким образом, с помощью данного метода возможно проводить измерения на различных глубинах сфероида, что является важным преимуществом, поскольку большинство методов позволяют измерять лишь общее содержание аналитов в одном сфероиде. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными, полученными с применением LA-ICP-MS для анализа цисплатина и соединений на основе цисплатина в сфероидов, однако LA-ICP-MS не дает полную информацию о накоплении цисплатина на различных глубинах.

После успешной валидации методики на опухолевых сфероидов были проведены измерения *in vivo*, используя модель мышинной карциномы молочной железы EMT6 (Рис. 20А). Группам мышей были внутривенно введены растворы цисплатина или DNP, доза составила 2 мг/кг, контрольной группе был введен PBS. ЦВ были получены внутри опухоли на различных

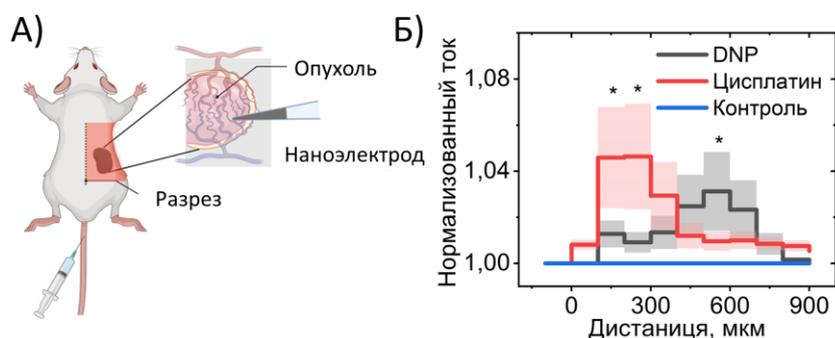


Рис. 20. Определение цисплатина внутри опухоли *in vivo* (А) Схема эксперимента (Б) Профиль накопления цисплатина и DNP внутри опухоли. Доза цисплатина и DNP 2 мг/кг. Время инкубации 24 часа.

глубинах вплоть до 800 мкм с шагом 100 мкм. Важно подчеркнуть, что стабильность наноэлектрода и его электрохимические характеристики сохранились после проведения *in vivo* измерений. В опухолях, подвергнутых воздействию DNP, наблюдалась более высокая глубина проникновения в сравнении

с цисплатином (Рис. 20Б). Это согласуется с предыдущими результатами, подтверждающими более эффективное накопление DNP в отдельных клетках и сфероидов по сравнению с цисплатином, как описано выше.

Таким образом, с помощью разработанного метода возможно проводить измерения по обнаружению цисплатина и пролекарств на основе цисплатина не только в буферных растворах, но и на различных глубинах в опухолевых сфероидов и внутри опухоли мыши.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы были разработаны и апробированы нанокапиллярные электрохимические сенсоры, чувствительные к молекулярному кислороду, АФК, дофамину и комплексам Pt(II), отличающиеся высокой чувствительностью и малой инвазивностью. В частности, были созданы углеродные сенсоры для измерения концентрации дофамина для проведения внутриклеточных биоаналитических исследований. Разработанные углеродные сенсоры могут применяться для исследования механизмов развития нейродегенеративных заболеваний. Были разработаны платиновые нанокапиллярные сенсоры для определения пероксида водорода, которые продемонстрировали стабильность и чувствительность при использовании как в живых клетках, так и в опухолевых моделях *in vivo*. Были предложены подходы к определению молекулярного кислорода внутри сфероидов и живых тканей с использованием платинового нанокапиллярного сенсора. Впервые было проведено измерение генерации АФК внутри фаголизосом нейтрофилов под воздействием *E.*

coli и *S. aureus*, что предоставляет новые данные о механизмах внутриклеточной защиты и реакции иммунной системы на бактерии. Анализ принципов разработанных методов показывает, что описанные в диссертационной работе подходы имеют универсальный характер и могут быть применены при разработке методов определения и других не рассмотренных в диссертационной работе аналитов.

Таким образом, перспективы дальнейшего развития включают разработку более широкого спектра сенсоров для определения различных биомолекул с высокой чувствительностью, селективностью и стабильностью, исследование их применения для *in vivo* мониторинга состояния пациента, что откроет новые возможности в диагностике и контроле эффективности терапии, а также совершенствование сенсоров для клинической практики, предполагающее миниатюризацию и интеграцию с современными диагностическими устройствами.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1) Разработаны универсальные углеродные электрохимические нанокapиллярные сенсоры, пригодные для проведения внутриклеточных биоаналитических измерений. Показана возможность проведения измерений дофамина в диапазоне 40 нМ-10 мкМ с пределом обнаружения 12 ± 5 нМ с помощью разработанных нанокapиллярных сенсоров.

2) На базе углеродных нанокapиллярных сенсоров разработан малоинвазивный платиновый нанoeлектрод для определения концентрации пероксида водорода с пределом обнаружения $0,5 \pm 0,2$ мкМ и диапазоном измерений 0,7–100 мкМ. Проведена апробация его работы внутри единичных живых опухолевых клеток РС3, 22Rv1, MCF-7 и опухолевых сфероидов MCF-7, а также в имплантированной мышце опухоли *in vivo*, продемонстрирована его стабильность и чувствительность после проведения измерений в живых системах.

3) Разработан метод определения АФК в единичных живых клетках и опухоли мышцы 4T1 в режиме *in vivo* после воздействия противоопухолевых препаратов. Продемонстрировано, что данный метод возможно использовать не только для оценки воздействия известных противоопухолевых препаратов, но и новых соединений. Обнаружена возможность проведения измерений сверхбыстрых процессов, протекающих в живой клетке.

4) Разработан метод определения молекулярного кислорода внутри сфероидов, полученных из клеток MCF-7, и мозга крысы *in vivo* с использованием платинового нанoeлектрода. Показана возможность работы нанoeлектрода в физиологических условиях *in vivo*. Обнаружена зависимость скорости потребления кислорода от размера сфероида. На модели церебральной ишемии у крыс продемонстрирована работоспособность разработанного нанoeлектрода *in vivo*.

5) Разработан метод определения концентрации комплексов Pt(II) на примере цисплатина в условиях *in vivo/in vitro*. Выявлено, что предел обнаружения разработанного метода составил $1 \pm 0,3$ мкМ, диапазон измерений 5–500 мкМ. С помощью метода была показана возможность определения концентрации цисплатина и пролекарства Pt(IV) внутри единичных клеток и сфероидов MCF-7, а также внутри опухоли ЕМТ-6 мышцы *in vivo*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. Pleskova S. N. et al. ROS Production by a Single Neutrophil Cell and Neutrophil Population upon Bacterial Stimulation / Pleskova S. N., Erofeev, A. S., Vaneev A. N., Gorelkin P. V., Bobyk S. Z., Kolmogorov V. S., Bezrukov S.Z., Lazarenko E. V. //Biomedicines. – 2023. –

- Vol. 11. – №. 5. – P. 1361. (объем п.л. 1,4 , авторский вклад 60%) [Импакт-фактор WOS JIF=3,9] doi: 10.3390/biomedicines11051361
2. Krasnovskaya O. O. et al. Photoinduced Reduction of Novel Dual-Action Riboplatin Pt (IV) Prodrug/ Krasnovskaya O. O., Akasov R. A., Spector D. V., Pavlov K. G., Bublely A. A., Kuzmin V. 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. // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2023. – Vol. 15., №. 10. – P. 12882-12894. (объем п.л. 1,5 , авторский вклад 35%) [Импакт-фактор WOS JIF=8,3] doi: 10.1021/acsmi.3c01771
 3. **Vaneev A.N.** et al. Nano- and Microsensors for In Vivo Real-Time Electrochemical Analysis: Present and Future Perspectives / **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., № 21. — P. 3736. (объем п.л. 3,2 , авторский вклад 75%) [Импакт-фактор WOS JIF=4,4] doi: 10.3390/nano12213736
 4. Abakumova T. et al. Intravital electrochemical nanosensor as a tool for the measurement of reactive oxygen/nitrogen species in liver diseases/ Abakumova T., **Vaneev A.**, Naumenko V., Shokhina A., Belousov V., Mikaelyan A., Balysheva K., Gorelkin P., Erofeev A., Zatsepin T. // *J. Nanobiotechnology*. — 2022. — Vol. 20. — № 1. — P. 497. (объем п.л. 1,7, авторский вклад 60%) [Импакт-фактор WOS JIF=10,6] doi: 10.1186/s12951-022-01688-z
 5. Machulkin A.E. et al. Synthesis and Preclinical Evaluation of Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Abiraterone Conjugate / Machulkin A.E., Nimenko E.A., Zyk N.U., Uspenskaia A.A., Smirnova G.B., Khan I.I., Pokrovsky V.S., **Vaneev A.N.**, Timoshenko R. V., Mamed-Nabizade V. V., Zavertkina M. V., Erofeev A., Gorelkin P., Majouga A.G., Zyk N. V., Khazanova E.S., Beloglazkina E.K. // *Molecules*. — 2022. — Vol. 27. — № 24. — P. 8795. (объем п.л. 1,8, авторский вклад 35%) [Импакт-фактор WOS JIF=4,2] doi: 10.3390/molecules27248795
 6. **Vaneev A.N.** et al. In Vitro / In Vivo Electrochemical Detection of Pt(II) Species / **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. // *Anal. Chem.*, — 2022. — Vol. 94. — № 12. — P. 4901–4905. (объем п.л. 0,4, авторский вклад 75%) [Импакт-фактор WOS JIF=6,7] doi: 10.1021/acs.analchem.2c00136
 7. **Vaneev A.N.** et al. Superoxide Dismutase 1 Nanoparticles (Nano-SOD1) as a Potential Drug for the Treatment of Inflammatory Eye Diseases / **Vaneev A.N.**, Kost O.A., Ereemeev N.L., Beznos O. V., Alova A. V., Gorelkin P. V., Erofeev A.S., Chesnokova N.B., Kabanov A. V., Klyachko N.L. // *Biomedicines*. — 2021. — Vol. 9. — № 4. — P. 396. (объем п.л. 1,7, авторский вклад 50%) [Импакт-фактор WOS JIF=3,9] doi: 10.3390/biomedicines9040396
 8. Yamansarov E.Y. et al. Discovery of Bivalent GalNAc-Conjugated Betulin as a Potent ASGPR-Directed Agent against Hepatocellular Carcinoma / Yamansarov E.Y., 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.Y., Ivanenkov Y.A., Klyachko N.L., Erofeev A.S., Gorelkin P. V., Beloglazkina E.K., Majouga A.G., Shkil' D.O., Akasov R.A., Lobov A.N., Naumenko V.A., Pavlova E.N., Ryabaya O.O., Burenina O.Y., Ivanenkov Y.A., Klyachko N.L., Erofeev A.S., Gorelkin P. V., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. // *Bioconjug. Chem.*, — 2021. — Vol. 32. — № 4. — P. 763–781. (объем п.л. 2,1, авторский вклад 35%) [Импакт-фактор WOS JIF=4,0] doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00042
 9. Petrov R.A. et al. New Small-Molecule Glycoconjugates of Docetaxel and GalNAc for Targeted Delivery to Hepatocellular Carcinoma / 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. // *Mol. Pharm.*, — 2021. — Vol. 18. — № 1. — P. 461–468. (объем п.л. 0,9, авторский вклад 35%) [Импакт-фактор WOS JIF=4,5] doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00980
10. Machulkin A.E. et al. Synthesis, Characterization, and Preclinical Evaluation of a Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Monomethyl Auristatin E Conjugate / Machulkin A.E., Uspenskaya A.A., Zyk N.U., Nimenko E.A., Ber A.P., Petrov S.A., Polshakov V.I., Shafikov R.R., Skvortsov D.A., Plotnikova E.A., Pankratov A.A., Smirnova G.B., Borisova Y.A., Pokrovsky V.S., Kolmogorov V.S., **Vaneev A.N.**, Khudyakov A.D., Chepikova O.E., Kovalev S., Zamyatnin Jr A.A., Erofeev A., Gorelkin P., Beloglazkina E.K., Zyk N. V., Khazanova E.S., Majouga A.G. // *J. Med. Chem.* — 2021. — Vol. 64. — № 23. — P. 17123–17145. (объем п.л. 2,6, авторский вклад 35%) [Импакт-фактор WOS JIF=6,8] doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01157
11. Krasnovskaya O.O. et al. Novel Copper-Containing Cytotoxic Agents Based on 2-Thioxoimidazolones/ 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. // *J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 63. — № 21. — P. 13031–13063. (объем п.л. 3,8, авторский вклад 35%) [Импакт-фактор WOS JIF=6,8] doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01196
12. **Vaneev A.N.** et al. In Vitro and In Vivo Electrochemical Measurement of Reactive Oxygen Species After Treatment with Anticancer Drugs / **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. // *Anal. Chem.* — 2020. — Vol. 92. — № 12. — P. 8010–8014. (объем п.л. 0,5, авторский вклад 75%) [Импакт-фактор WOS JIF=6,7] doi: 10.1021/acs.analchem.0c01256

Патенты на изобретение РФ

1. **Патент №2790004 Российская Федерация, МПК G01N 27/414, G01R 27/22, H01L 29/739, B82Y 30/00.** Наноразмерный сенсор электрического потенциала на полевом эффекте: №2021104000: заявл. 04.12.2020: опубл. 14.02.2023/ Кубасов И.В., Кислюк А.М., Темиров А.А., Турутин А.В., Малинкович М.Д., Пархоменко Ю.Н., Салихов С.В., Корчев Ю.Е., Ерофеев А.С., Горелкин П.В., Преловская А.О., Ванеев А.Н., Колмогоров В.С., Тимошенко Р.В. – 10 с.: ил. (объем п.л. 1,2; авторский вклад 35%).
2. **Патент № 2725065 Российская Федерация, МПК A61B 5/05, G09B 23/28, B82B 1/00.** Способ измерения концентрации кислорода в подкожной опухоли экспериментальных животных: 2019144506: заявл. 27.12.2019: опубл. 29.06.2020/ Абакумов М.А., Гаранина А.С., Ванеев А.Н., Горелкин П.В., Ерофеев А.С., Мажуга А.Г. – 15 с.: ил. (объем п.л. 1,7; авторский вклад 45%).
3. **Патент № 2726074 Российская Федерация, МПК G01N 33/483.** Способ измерения концентрации активных форм кислорода (АФК) в подкожной опухоли живых экспериментальных животных: 2019144513: заявл. 27.12.2019: опубл. 08.07.2020/ Абакумов М.А., Гаранина А.С., Ванеев А.Н., Горелкин П.В., Ерофеев А.С., Мажуга А.Г. – 15 с.: ил. (объем п.л. 1,7; авторский вклад 45%).
4. **Патент № 2777971 Российская Федерация, МПК G01N 33/50, C12M 3/00.** Устройство для тестирования эффективности биологически активных веществ на клетках: 2021108927: заявл. 01.04.2021: опубл. 12.08.2022/ Горелкин П.В., Ерофеев А.С., Ванеев А.Н., Корчев Ю.Е., Новак П., Шевчук А., Эдвардс Кристофер Р.-В. – 20 с.: ил. (объем п.л. 2,3; авторский вклад 60%).