

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

Ванеев Александр Николаевич

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

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор

Клячко Наталья Львовна,

кандидат физико-математических наук

Ерофеев Александр Сергеевич

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
2	ВВЕДЕНИЕ.....	7
3	ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	16
3.1.	Обзор проблемы обнаружения клеточных метаболитов <i>in vivo</i> .....	16
3.2.	Определение нейротрансмиттеров .....	20
3.3.	Определение активных форм кислорода .....	41
3.4.	Определение концентрации растворенного кислорода в живых системах .....	58
3.5.	Основные проблемы обнаружения аналитов в биологических системах....	65
3.6.	Электрохимия на микро и наномасштабе .....	71
3.7.	Электрохимические методы для проведения измерений.....	78
3.8.	Заключение к литературному обзору .....	82
4	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	83
4.1.	Материалы.....	83
4.2.	Оборудование.....	85
4.3.	Методы: .....	89
5	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	102
5.1.	Изготовление и характеристика углеродных нанокapиллярных электродов.....	102
5.2.	Разработка метода для определения дофамина с использованием углеродных наноэлектродов .....	109
5.3.	Процесс окисления углеродной поверхности .....	115
5.4.	Разработка методики изготовления платинизированных наноэлектродов для определения АФК.....	119
5.5.	Характеристика платинизированных наноэлектродов.....	121
5.6.	Электрохимическое определение АФК с помощью платинизированных наноэлектродов внутри единичных живых клеток .....	123
5.7.	Определение АФК внутри единичных нейтрофилов под воздействием <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i> .....	140

5.8. Измерение концентрации пероксида водорода в глазных жидкостях кроликов <i>ex vivo</i> .....	145
5.9. <i>In vivo</i> определение АФК внутри опухоли мыши под воздействием доксорубицина.....	147
5.10. Определение соединений, содержащих Pt(II), внутри биологических моделей <i>in vitro/in vivo</i> .....	151
5.11. Разработка методики электрохимического определения концентрации молекулярного кислорода с помощью платинового нанoeлектрода.....	164
6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	172
7 БЛАГОДАРНОСТИ.....	175
8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	176

# 1 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ASGP-R – асиалогликопротеиновый рецептор

CVD – химическое осаждение из газовой фазы

DNP – комплекс платины (IV), координируемый 2 лигандами напроксена

DCFDA – 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат

DCF – 2,7-дихлорфлуоресцеин

DTX – доцетаксел

EOGO – электрохимически окисленный оксид графена

FRET – фёрстеровская резонансная передача энергии

FSCV – циклическая вольтамперометрия с высокой скоростью развертки потенциала

GalNAc – галактозамин

GFP – зеленый флуоресцентный белок

ITO – смешанный оксид индия-олова

IVIS – *in vivo* система визуализации

LA-ICP-MS – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой с лазерной абляцией

MMAE – метил ауристатин E

MFB – медиальный переднемозговой пучок

NAc – область прилежащего ядра

OCR – скорость потребления кислорода

PBS – 0,01 М фосфатный буферный раствор с добавлением 137 мМ NaCl

PEDOT – поли(3,4-этилендиокситиофен)

PGlu-PEG – сополимер метокси-поли(этиленгликоль)<sub>113</sub>-блок-поли (L-глутаминовой кислоты натриевая соль)<sub>50</sub>

pH<sub>i</sub> – внутриклеточный показатель кислотности (внутриклеточные значения pH)

TARF – тетраацетилрибофлавин

RFP – красный флуоресцентный белок  
YFP – желтый флуоресцентный белок  
АФК – активные формы кислорода  
БСА – бычий сывороточный альбумин  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота  
ДИВА – дифференциально-импульсная вольтамперометрия  
ДМСО - диметилсульфоксид  
ДЭС – двойной электрический слой  
ИК – инфракрасный  
КВВ – квадратно-волновая вольтамперометрия  
КР – комбинационное рассеяние  
ЛПС – липополисахарид  
ЛС – лекарственное средство  
МРС – магнитно-резонансная спектроскопия  
МРТ – магнитно-резонансная томография  
МУВ – микроэлектрод из углеродного волокна  
НЧ – наночастицы  
НЧС – наночастицы серебра  
ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки  
ПАН – полианилин  
ПК – персональный компьютер  
ПСМА – простат-специфичный мембранный антиген  
ПТК-ПА – смесь полианилина и политаниновой кислоты  
ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография  
РЭМ – растровая электронная микроскопия  
СОД – супероксиддисмутаза  
СМЖ – спинномозговая жидкость  
УНТ – углеродные нанотрубки

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФИП – фокусированный ионный пучок

ХСЭ – хлорсеребряный электрод

ЦАП-АЦП – цифро-аналоговый(аналого-цифровой) преобразователь

ЦВ – циклическая вольтамперометрия

ЦНС – центральная нервная система

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

## 2 ВВЕДЕНИЕ

### 2.1. 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 (ПЭТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ) и спектроскопии (МРС). 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.

## **2.2. 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.

### 2.3. 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 РС3, 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 наноэлектрода с целью оценки степени гипоксии;
5. Разработка электрохимического метода определения соединений Pt (II) внутри живых единичных клеток, сфероидов и опухоли мышцы *in vivo* после воздействия противоопухолевых платиносодержащих лекарственных препаратов с целью оценки эффективности их накопления в биологических моделях *in vitro/in vivo*.

#### **2.4. 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 нанокапиллярных 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.

## **2.5. Теоретическая и практическая значимость работы**

В данной работе проведена разработка нанокапиллярных 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.

## **2.6. Методология и методы исследования**

В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: физико-химические методы характеристики наноэлектродов (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 сфероидов), методы микроскопии (оптическая и конфокальная микроскопия), методы создания животных моделей (разработка модели опухоли мыши).

### 2.7. Положения, выносимые на защиту

1. Малоинвазивная высокочувствительная наноразмерная система на основе углеродного наноэлектрода 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 сфероидов 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 наноэлектрода 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, сфероидов MCF-7 и опухоли мыши EMT-6.

## 2.8. 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).

## **2.9. 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.

## **2.10. 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.)

### **2.11. 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 в 11 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях.

### **2.12. Связь работы с государственными программами**

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№19–79-30062, №19-74-10059).

### **2.13. 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 261 ссылки. Диссертация изложена на 204 страницах и включает 74 рисунка и 12 таблиц.

### 3 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

#### 3.1. Обзор проблемы обнаружения клеточных метаболитов *in vivo*<sup>1</sup>

Определение клеточных метаболитов может дать существенное представление о механизме функционирования живого организма, а также приблизиться к пониманию механизмов заболеваний и действия ЛС.

Определение клеточных метаболитов требует либо отбор образцов биологической среды или жидкости, либо измерения непосредственно в живом объекте в режиме реального времени *in vivo*. Инвазивные измерения — это такие измерения, которые осуществляются в биологической системе (например, внутри клеток, ткани или органа), и способны оказывать влияние на целостность системы и состав при проведении измерений. Например, при проведении *in vivo* измерений возможно разрушение клеток, тканей или органа посредством электрода большого размера, что может привести к последующей выработке тканями маркеров воспаления, АФК, а также к повышению экспрессии белков «острой фазы» (например, С-реактивный белок, гаптоглобин).

В настоящее время наблюдается тенденция в более усовершенствованных и неинвазивных методах анализа и диагностики, направленных на обнаружение клеточных метаболитов и биомаркеров. Данный тренд способствует значительному прогрессу в области биомедицинских исследований. Современные аналитические методы, опирающиеся на применение углеродных материалов [1–3], НЧ[4], квантовых точек [5], флуорофоров [6] демонстрируют высокую чувствительность и селективность. Они также предоставляют возможность для проведения измерений в режиме реального времени внутри организмов, что открывает новые перспективы для более точных и малоинвазивных исследований в области биомедицины.

---

<sup>1</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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%) doi: 10.3390/nano12213736

Электрохимические сенсоры на сегодняшний день считаются одними из наиболее востребованных, перспективных и эффективных инструментов, позволяющих в режиме реального времени определять содержание клеточных метаболитов с высокой чувствительностью вплоть до наномолярных значений [7]. Электрохимические сенсоры предоставляют возможность исследования физиологических процессов на различных уровнях — от клеток до тканей и органов, а также оценку общего состояния организма в режиме реального времени [8–11].

Стоит отметить, что электрохимические методы должны соответствовать определенным основным критериям таким как, высокая чувствительность, специфичность, высокое временное разрешение и оптимальный для *in vivo* исследований размер электрода [12]. В случае живых систем, где концентрация аналитов динамически изменяется, высокое временное разрешение становится критически важным аспектом, например, такое наблюдается в случае нейротрансмиттеров. Использование микро-, наноэлектродов позволяет измерять концентрацию аналитов в тканях живого организма с минимальными возможными повреждениями.

Обнаружение нейротрансмиттеров имеет важное значение для глубокого понимания работы центральной нервной системы (ЦНС) и раскрытия механизма возникновения и развития неврологических и психоневрологических заболеваний [13]. Избыточная концентрация нейротрансмиттеров в определенных участках мозга часто свидетельствует о дисфункции ЦНС. Поэтому для изучения этих процессов необходимы высокочувствительные методы, с помощью которых возможно было бы осуществлять малоинвазивные измерения в мозгу с использованием микро- и наноэлектродов [13, 14]. При этом для электрохимического обнаружения нейротрансмиттеров существует ряд требований. Во-первых, важно определять наномолярные концентрации нейротрансмиттеров (10–100 нМ) Во-вторых, поверхность электродов необходимо модифицировать полимерными материалами/мембранами от нежелательной адсорбции белков, либо уменьшить площадь поверхности

нанозлектрода. В-третьих, необходимо достичь высокой селективности электрода для одновременного определения нескольких видов нейротрансмиттеров [15].

Помимо изучения процессов нейротрансмиссии и обнаружения нейротрансмиттеров, одной из важных областей в биологии является исследование процессов, связанных с окислительным стрессом, который играет огромную роль в развитии старения [16], канцерогенеза [17], нейродегенеративных заболеваний [18] и воспалений [19]. Несмотря на значимую роль кислорода в биохимических реакциях его участие может привести к образованию АФК, которые в больших количествах могут привести к перекисному окислению липидов, повреждению ДНК и окислению аминокислотных остатков [20, 21]. Большое количество исследований посвящено изучению АФК, антиоксидантных ферментов и антиоксидантной активности на клеточном уровне [22–26] с использованием электрохимических методов. Тем не менее, одним из недостатков существующих исследований является применение электродов размером ~ 10 мкм, что приводит к нарушению целостности как единичной клетки, ткани, так и живого организма.

Стоит отметить, что использование нанозлектродов не ограничивается определением клеточных метаболитов. В последнее время электрохимический метод активно стал использоваться для оценки накопления и эффективности новых ЛС [27]. В связи с тем, что важное значение при разработке ЛС имеет исследование фармакокинетики в режиме реального времени *in vivo*. Недавние исследования с использованием электрохимических методов демонстрируют обнаружение противоэпилептического препарата ламотриджина [28], противоопухолевого средства доксорубицина [28] и метилкобаламина [29] в головном мозге крысы. Однако количество работ, в которых проводят мониторинг содержания ЛС в режиме *in vivo*, в настоящее время крайне мало.

Тем не менее, нано-, микросенсоры представляют уникальные возможности для обнаружения нейротрансмиттеров, АФК, ЛС и других важнейших клеточных метаболитов. Нанозлектроды обладают высокой

чувствительностью, селективностью, малым воздействием на живую систему и возможностью работы в режиме реального времени, что делает их привлекательными для исследования биологических систем *in vitro/in vivo*.

В данном литературном обзоре будут рассмотрены исследования, которые направлены на разработку сенсоров для определения нейротрансмиттеров, АФК и кислорода. На Рис. 1 представлена обобщённая информация по последним электрохимическим исследованиям *in vivo* за последние 5 лет с использованием нано-, микроэлектродов, показаны наиболее используемые типы электродов, методы и используемые *in vivo* модели, которые наиболее часто встречаются в современных исследованиях.



Рис. 1. Краткое описание аналитов, типов электродов, методов обнаружения и моделей *in vivo*, представленных в литературном обзоре [30].

### 3.2. Определение нейротрансмиттеров

#### 3.2.1 Обзор подходов для *in vivo* обнаружения нейротрансмиттеров

Нейротрансмиттеры – это сигнальные молекулы, секретируемые нейронами для воздействия на другую клетку через синапс. По химической структуре нейротрансмиттеры можно разделить на нейротрансмиттерные аминокислоты (глутаминовая кислота, глицин, 3,4- дигидроксифенилаланин и др.), биогенные амины (к ним же относятся катехоламины) и нейропептиды (Табл. 1).

Табл. 1. Классификация нейротрансмиттеров по химической природе

Нейротрансмиттерные аминокислоты	Моноамины	Пептиды
Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК)	Дофамин	Бомбезиноподобные пептиды
Глутамат	Серотонин	Кальцитонин
Глицин	Норадреналин	Галанины
Таурин	Гистамин	Окситоцин
	Ацетилхолин	Вазопрессин
		Соматостатин
		Секретины
		Тахокинины
		Энкефалины
		Эндорфины

В настоящее время обнаружение нейротрансмиттеров в режиме реального времени может быть осуществлено с использованием электрохимических, оптических, магнитных и микродиализных методов [31]. Однако ключевой проблемой, особенно для клинических применений, остается недостаточная чувствительность и селективность методов, поскольку концентрация нейротрансмиттеров, распределенных по ЦНС, довольно низка и зачастую находится в наномолярном диапазоне [32]. Для изучения быстрых нейрохимических событий необходимы методы, позволяющие проводить измерения с секундным и субсекундным временным разрешением.

Существующие методы измерений несколько ограничены, поскольку они позволяют определять нейротрансмиттеры с низким временным разрешением более 5 мин, и, следовательно, не могут предоставить прямую информацию в режиме реального времени об изменениях, происходящих в живой системе. Данные ограничения способствовали разработке более эффективных инструментов измерения, таких как имплантируемые электрохимические зонды, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и магнитно-резонансная спектроскопия (МРС), микродиализ, которые позволяют осуществлять мониторинг и отслеживать изменения концентрации нейротрансмиттеров в режиме реального времени *in vivo*.

ПЭТ на сегодняшний день является одной из передовых технологий, которая позволяет исследовать метаболизм нейротрансмиттеров *in vivo* с помощью соответствующих лигандов, таких как [ $^{11}\text{C}$ ]943, [ $^{11}\text{C}$ ] Cimbi-36 и [ $^{18}\text{F}$ ] алтансерин [33, 34]. ПЭТ-технология обладает высокой чувствительностью и специфичностью благодаря связыванию нейротрансмиттеров с разработанными лигандами. Однако несмотря на то, что ПЭТ является наиболее чувствительной технологией в клинической практике, высокая стоимость прибора и наработки лигандов делает ПЭТ недоступной для многих медицинских учреждений и пациентов [35, 36].

МРС представляет собой адаптацию метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) к исследованию химических процессов в тканях. В  $^1\text{H}$  спектрах МРС нормального мозга человека, зарегистрированных с удалением сигнала воды, присутствуют сигналы N-ацетиласпартата, креатина + фосфокреатина, холинсодержащих соединений,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, аспартата, таурина, глицина, глутатиона, суммарный сигнал глутамата и глутамина [37–39]. Чувствительность и пространственное разрешение МРС являются ограничивающим фактором при проведении *in vivo* измерений, но параллельное использование МРС экстрактов тканей, жидкостей организма и клеточных линий *in vitro* при гораздо более высокой напряженности магнитного

поля (обычно 11-14 Тл) позволяет повысить чувствительность метода *in vivo* и делает его перспективным [40].

Флуоресцентная визуализация признана одним из наиболее эффективных методов для обнаружения нейротрансмиттеров и исследования процессов в биологических системах благодаря ее высокому временному и пространственному разрешению [31, 41]. Однако ее применение ограничено глубиной проникновения света в ткани, что является наиболее распространенной проблемой [42]. В отличие от инструментов, которые позволяют напрямую измерять концентрацию нейротрансмиттеров флуоресцентный метод можно применять для косвенного измерения концентрации нейротрансмиттеров [43] с использованием FM-красителей [44], квантовых точек [45] и pH-чувствительных флуоресцентных белков [46, 47] для визуализации экзоцитоза синаптических везикул.

Еще одним методом, который хорошо себя зарекомендовал в лабораторной практике, является микродиализ, который основан на получении биологической жидкости (внеклеточная жидкость) из ткани в процессе функционирования организма с последующим анализом компонентного состава жидкости. Принципиальной основой метода является проникновение аналита путём простой диффузии в перфузируемую жидкость (перфузат, изотоническая жидкость) с формированием анализируемой смеси – диализата [48]. Полупроницаемая мембрана на кончике зонда обеспечивает обмен исследуемыми молекулами между зондом и окружающей тканью. Основными материалами для полупроницаемой мембраны выступают: полисульфон, полиэфирсульфон, полиамид и поликарбонат. Предельная пропускаемая молекулярная масса мембраны обычно является параметром, который оказывает существенное влияние на производительность мембраны. Большинство экспериментов по диализу проводятся с мембранами, имеющими предельную пропускаемую способность в диапазоне 3–30 кДа и редко с 100 кДа. Наиболее часто используемой мембраной для отбора проб при диализе *in vivo* для самодельных зондов являются мембраны Spectrum с молекулярной массой 13

кДа. Когда зонд имплантируется в ткань, молекулы непрерывно диффундируют из тканевой жидкости в перфузионную среду. Как правило, катетер-зонд представляет тонкую трубку, изготовленную из полиуретана диаметром 1 мм и длиной 200-400 мм. Смысл применения зонда такого размера заключается в том, чтобы имитировать кровеносный сосуд (Рис. 2).

Пробы непрерывно собираются и анализируются с помощью стандартных химико-аналитических методов. Микродиализный метод является высокочувствительным методом, поскольку совмещается с ВЭЖХ, масс-спектрометрией, электрохимическими методами и т. п. Микродиализ подходит для мониторинга и сбора образцов из коры головного мозга крыс, а также определения внутримышечных уровней лактата [49–51]. Микродиализ имеет ряд недостатков по сравнению с другими методами, в частности, он имеет ограниченное временное разрешение ( $\geq 1$  мин; чаще 10 минут) по сравнению с вольтамперометрией (секунды и миллисекунды) [52].

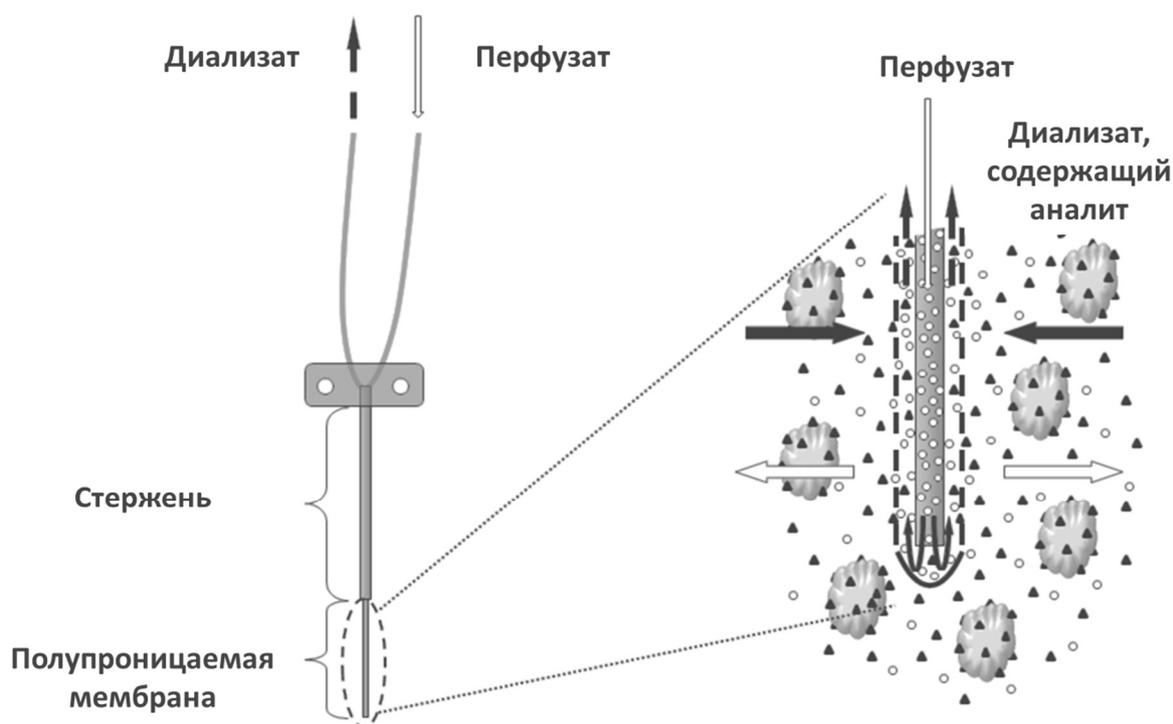


Рис. 2. Принцип работы микродиализного метода

Таким образом, рассмотрев наиболее используемые методы, можно отметить, что флуоресцентная визуализация является одним из чувствительных и простых методов, однако ее использование осложнено глубиной проникновения света и тушением флуоресценции флуорофора. ПЭТ и МРС наиболее перспективны среди неинвазивных методов исследования, поскольку представляют собой более чувствительные, универсальные и безопасные методы. Однако ПЭТ и МРС требует больших вложений и для реконструкции изображений необходимо использовать специальные ресурсозатратные и сложные алгоритмы [53]. Микродиализный метод хорошо подходит для получения информации о локальных концентрациях нейротрансмиттеров, однако он имеет два основных недостатка. Во-первых, микродиализ всегда связан с внешним аналитическим методом для совместного мониторинга нейротрансмиттеров и, следовательно, невозможно разработать носимое устройство, которое бы в режиме реального времени позволяло регистрировать изменения концентрации измеряемого аналита в живом организме. Во-вторых, данный метод предполагает физическое воздействие на мозг и представляет собой инвазивный метод, и с помощью данного метода осуществляется измерение только внеклеточной жидкости.

Электрохимические *in vivo* исследования с помощью нано-, микроэлектродов широко распространены в данной области. Для мониторинга концентрации нейротрансмиттеров в живых системах применяют амперометрию, ЦВ, FSCV, а также импульсные методы вольтамперометрии, такие как дифференциально-импульсная (ДИВА) и квадратно-волновая вольтамперометрии (КВВ). Данные методы основаны на обнаружении нейромедиаторов посредством их окисления или восстановления на поверхности электрода. Однако, определение нейротрансмиттеров с помощью электрохимических методов ограничено аналитами, которые являются электрохимически активными в определенном потенциальном окне буферного раствора или биологической среды. К таким электрохимически активным анализам относятся биогенные амины (например, дофамин, норадреналин,

серотонин), их метаболиты и аскорбиновая кислота. Первоначально сосредоточенные на электрохимически активных молекулах, таких как аскорбиновая кислота и серотонин, исследования на основе микроэлектродов имели некоторые трудности с катехоламинами, из-за перекрывающихся окислительно-восстановительных потенциалов.

В последнее время FSCV наиболее используемый электрохимический метод для обнаружения нейротрансмиттеров, поскольку обладает высокой чувствительностью (наномолярный диапазон) и субсекундным временным разрешением. К основным недостаткам данного подхода относят сложность измерения базальных уровней нейротрансмиттеров и невозможность определения неэлектрохимически активных биомолекул [54].

Амперометрия обладает высоким временным разрешением, однако с помощью нее сложно идентифицировать нейротрансмиттеры по типам в смеси, и использовать ее предпочтительнее в средах с известным химическим составом [55].

Временное разрешение критически важно для биоаналитических измерений в мозгу *in vivo*. Отдельные нейроны высвобождают нейротрансмиттеры путем экзоцитоза. В результате этого процесса колебания уровней нейротрансмиттеров могут происходить в миллисекундном масштабе времени, хотя устойчивые изменения в возбуждении или обратном захвате нейронов могут привести к долговременным изменениям уровней нейротрансмиттеров. Клеточные реакции на нейротрансмиссию и воздействие фармакологических агентов также происходят в течение более длительного времени. Таким образом, временное разрешение, которого можно достичь при измерении нейрохимических веществ, ограничивает типы вопросов, на которые может ответить тот или иной метод [7].

Основные преимущества и недостатки наиболее распространенных методов для обнаружения нейротрансмиттеров представлены в Табл. 2. В следующем разделе рассмотрим детально электрохимические методы *in vivo* определения нейротрансмиттеров за последние 5 лет.

Табл. 2. Преимущества и недостатки методов при обнаружении нейротрансмиттеров *in vivo*

Метод	Преимущества метода	Недостатки метода
<b>ПЭТ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Чувствительный,</li> <li>• Биосовместимый,</li> <li>• Работает в режиме реального времени,</li> <li>• Безопасный для клинической работы,</li> <li>• Неинвазивный метод,</li> <li>• Высокая воспроизводимость.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Дорогие расходные материалы,</li> <li>• Дорогое оборудование,</li> <li>• Высокая квалификация.</li> </ul>
<b>МРС</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Комплексный,</li> <li>• Биосовместимый,</li> <li>• Безопасный для клинических исследований,</li> <li>• Неинвазивный метод,</li> <li>• Высокая воспроизводимость.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Дорогой,</li> <li>• Не пригодный для некоторых пациентов,</li> <li>• Сложность в разделении сигнала похожих по структуре соединений.</li> </ul>
<b>Микродиализ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Необходимая чувствительность,</li> <li>• Высокая воспроизводимость, <ul style="list-style-type: none"> <li>• Совмещение с высокочувствительными методами ВЭЖХ, масспектрометрии.</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Имплантируемый,</li> <li>• Используемый в сочетании с другими инструментами,</li> <li>• Низкое временное разрешение.</li> </ul>
<b>Флуоресцентная визуализация</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Биосовместимый,</li> <li>• Простота в использовании <i>in vitro</i> и <i>ex vivo</i>,</li> <li>• Высокое пространственно-временное разрешение.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Сложный контроль,</li> <li>• Трудности при проведении <i>in vivo</i> экспериментов.</li> </ul>
<b>FSCV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокая чувствительность (10-100 нМ),</li> <li>• Высокое пространственно-временное разрешение,</li> <li>• Постоянное отслеживание,</li> <li>• Низкая стоимость.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Имплантируемый,</li> <li>• Высокий уровень шума,</li> <li>• Невозможность определять электрохимически неактивные молекулы.</li> </ul>
<b>Амперометрия</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Чувствительный,</li> <li>• Высокое пространственно-временное разрешение,</li> <li>• Постоянное отслеживание,</li> <li>• Недорогой.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Имплантируемый,</li> <li>• Нестабильное низко-временное-пространственное разрешение.</li> </ul>

### 3.2.2 Перспективные электрохимические методы обнаружения нейротрансмиттеров

В настоящее время существует ряд электрохимических методов для обнаружения нейротрансмиттеров. К таким методам можно отнести амперометрию, ЦВ, FSCV и т. п.

#### 3.2.2.1 Хроноамперометрия

В амперометрии измерения проводят при постоянном потенциале, достаточном для окисления или восстановления рассматриваемого аналита, и генерируемые токи лимитируются массопереносом. Поскольку потенциал на электроде постоянен на протяжении всего эксперимента, то прямое определение тока позволяет определить содержание аналита по закону Фарадея. Основным преимуществом амперометрии является обнаружение в режиме реального времени, поскольку ток контролируется в течение времени при постоянном потенциале, поэтому можно наблюдать за всеми динамическими изменениями тока, что делает этот метод наиболее подходящим для проведения динамического мониторинга. Временное разрешение данного метода ограничено только скоростью сбора данных [56].

При постоянном потенциале любая электрохимически активная молекула способна окисляться/восстанавливаться на электроде при определенных условиях, поэтому при анализе многокомпонентных систем существует проблема разделения сигнала от электрохимически активных компонентов системы при постоянном потенциале.

Клетки, культивируемые *in vitro*, зачастую выступают в качестве модельных объектов при амперометрическом анализе [57]. Везикулярный экзоцитоз является процессом межклеточной коммуникации, участвующим во множестве нормальных и патологических процессов в живых клетках. Амперометрия с использованием микроэлектродов является одним из самых подходящих методов мониторинга экзоцитозного высвобождения метаболитов в режиме реального времени из-за высокой чувствительности и субмиллисекундного временного разрешения [57, 58]. Моноаминовые

нейротрансмиттеры являются распространенными электрохимически активными сигнальными молекулами в клеточной коммуникации. С помощью электрохимических методов возможно отслеживать экзоцитозный процесс моноаминовых нейротрансмиттеров [59]. При проведении экспериментов по высвобождению нейротрансмиттеров клетку стимулируют химически (например, раствором с высоким содержанием  $K^+$  или ингибиторами обратного захвата катехоламинов), с целью деполяризации мембраны клетки и нейрохимического высвобождения. Для обнаружения высвобождаемых везикул используют небольшой дисковый микроэлектрод, расположенный непосредственно вблизи клеточной мембраны (Рис. 3).

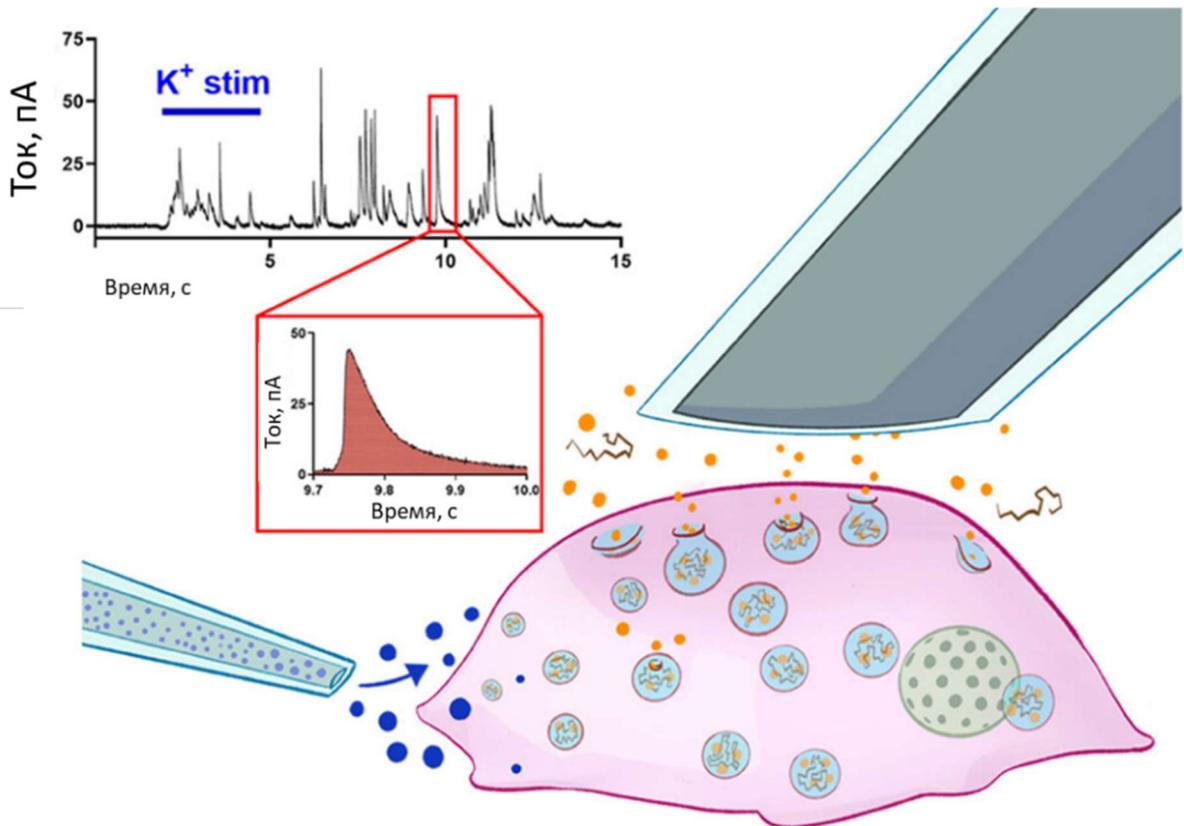


Рис. 3. Схема амперометрического измерения экзоцитозного высвобождения в единичной клетке. На рисунке представлены микропипетка для стимулирования клетки ионами калия (слева) и дисковый микроэлектрод из углеродного волокна (справа), на котором происходит окисление высвобождаемых везикул с нейротрансмиттерами. Вставка: амперограмма, демонстрирующая спайки, возникающие в момент окисления везикул нейротрансмиттеров [60].

Отдельные события экзоцитоза можно отслеживать как миллисекундные всплески (спайки) (Рис. 3 (вставка)). Однако, для получения более детальной

количественной и качественной информации обращают внимание на форму спайка. Время нарастания спайка коррелирует с кинетикой слияния между клеточной мембраной и наполненной нейротрансмиттерами везикулой. С помощью данного метода можно более точно определить количество высвобождаемых нейротрансмиттеров и получить дополнительную информацию о характеристиках экзоцитоза. Этот подход был применен к клеткам феохромоцитомы (PC12), дофаминергическим нейронам, тучным клеткам, нейронам симпатических ганглиев [61–63].

### 3.2.2.2 Циклическая вольтамперометрия. Вольтамперометрия с быстрой линейной разверткой потенциала

Основной характеристикой вольтамперометрических методов является линейное увеличение потенциала от начального значения, при котором происходит окисление аналита, до конечного значения с фиксированной скоростью развертки потенциала. Если после достижения точки максимума потенциал возвращается обратно к исходному значению, то такой метод относится к ЦВ.

ЦВ при медленных скоростях развертки потенциала в *in vivo* измерениях используется редко, так как большинство реакций окисления являются химически необратимыми в живых организмах. Однако FSCV, при которой окисленная форма вещества восстанавливается до того, как произойдет следующая химическая реакция, широко применяется в исследованиях *in vivo* [54, 64]. Такой подход находит много применений для изучения процессов нейротрансмиссии в живых системах и является важным инструментом для понимания биологических процессов и разработки новых методов диагностики и лечения. В методе FSCV скорость развертки потенциала составляет более 100 В/с, что позволяет увеличить временное разрешение и исследовать быстрые процессы. Например, для определения дофамина обычно используют развертку потенциала от -0,4 В до +1,3 В при скорости 400 В/с, с интервалами в 100 мс (Рис. 4А). Обычно эксперименты проводят с использованием электродов на основе углеродного волокна, которые в свою очередь изолированы в кварцевых

микрокапиллярах. Углеродные волокна содержат карбонильные, гидроксильные, карбоксильные функциональные группы, которые могут изменять электрохимические свойства углеродного волокна путем изменения его поверхностного заряда (Рис. 4Б) [65].

Поскольку запись ЦВ проводится с высокой скоростью, то для представления результатов в методе FSCV используют двухмерные построения на основе полученных ЦВ, на которых цветом обычно показана величина тока, по осям абсцисс и ординат приводят значения потенциалов и время (Рис. 4В).

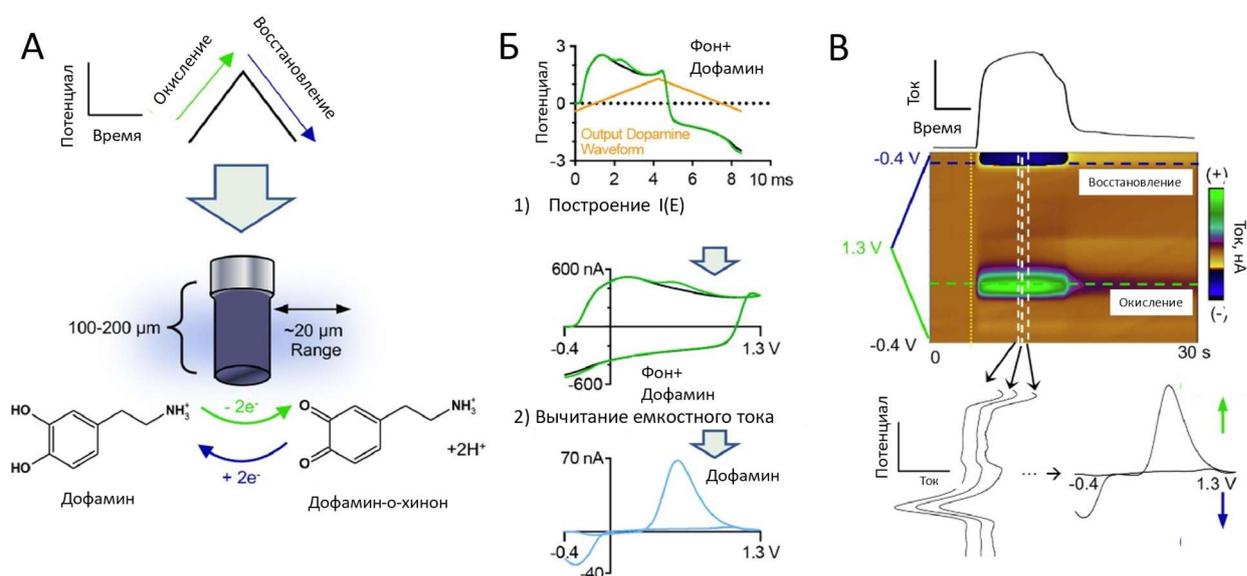


Рис. 4. Измерение дофамина с помощью метода FSCV(A) Развертки напряжения (формы сигналов) на микроэлектроре из углеродного волокна с заданной частотой и скоростью развертки потенциала для электрохимического окисления и/или восстановления химических анализитов и электрохимическая реакция окисления и восстановления дофамина на углеродном электроде. (Б) Процесс измерения и обработки полученных вольтамперограмм.

Из-за высокой скорости развертки возникают большие емкостные токи, которые можно вычесть для получения ЦВ анализита. Сверху: вольтамперограмма электрода, полученная в растворе дофамина, зарегистрированная на микроэлектроре из углеродного волокна с и без дофамина. Показано зеленым и черным цветом соответственно. В центре: вольтамперограмма I(E). Внизу: финальная вольтамперограмма с учетом вычета емкостного тока.

(В) Данные FSCV отображаются в виде цветных 3D-графиков. Вверху :

Горизонтальные срезы цветных графиков показывают динамику во времени; для максимальной чувствительности для количественного определения дофамина используются временные зависимости от его окислительного потенциала (зеленая пунктирная линия). В центре : цветной график, где время указано на оси X, приложенное напряжение — на оси Y, а амплитуды тока обозначены цветом [66].

В связи с высокой скоростью развертки потенциала возникает значительный емкостной ток, который обусловлен, в основном, зарядкой двойного электрического слоя (ДЭС) на поверхности электрода и пропорционален емкости ДЭС. Для разрешения меньших фарадеевских токов емкостной ток обычно вычитают программными методами. Таким образом, обработанная ЦВ содержит пики окисления/восстановления, которые позволяют идентифицировать обнаруженные электрохимически активные нейротрансмиттеры. По высоте пиков рассчитывают концентрацию определяемого нейротрансмиттера с использованием заранее построенных градуировочных зависимостей. Благодаря своей химической селективности метод FSCV широко применяется как в лабораторных условиях (*in vitro*), так и *in vivo* для определения изменений pH и обнаружения электрохимически активных нейротрансмиттеров таких как, дофамин, норадреналин, серотонин, а также кислород [67, 68]. В целом можно отметить, что данный метод имеет широкий потенциал применения в научных исследованиях и анализе биохимических процессов [54, 64, 69–71].

Из-за большого емкостного тока, который необходимо вычитать для разрешения фарадеевского тока, FSCV обеспечивает только измерения динамических изменений концентраций нейротрансмиттеров *in vivo*. С помощью FSCV сложно измерить базальные концентрации нейротрансмиттеров в течение нескольких часов *in vivo*, поскольку фоновый ток может изменяться с течением времени [72].

Для измерения базальных уровней нейротрансмиттеров в мозге в реальном времени было разработано несколько электрохимических методов, таких как FSCV с контролируемой адсорбцией [73] и импульсная вольтамперометрия [74]. Среди этих методов FSCV с контролируемой адсорбцией применялась для изучения базальных уровней дофамина [75, 76].

### 3.2.2.3 Дифференциальная импульсная вольтамперометрия и квадратно-волновая вольтамперометрия

ДИВА представляют собой последовательность импульсов постоянной амплитуды, наложенных на медленно изменяющийся потенциал. Измеряемый ток определяется как разница между значениями до начала импульса и после. Благодаря высокому отношению фарадеевского тока к емкостному, ДИВА является высокочувствительным аналитическим электрохимическим методом, позволяющим напрямую определять базальные концентрации аналитов. Короткая длительность импульса увеличивает измеряемый фарадеевский ток, а дифференциальный подход снижает влияние емкостного тока [77].

ДИВА использовалась для повышения селективности путем разделения пиков окисления при анализе смеси аналита. Например, углеродный нановолоконный электрод, обработанный азотной кислотой, использовался для одновременного обнаружения дофамина, серотонина и аскорбиновой кислоты [78]. В отличие от ЦВ, где потенциалы окисления аскорбиновой кислоты, дофамина и серотонина могут накладываться, ДИВА с использованием углеродных нановолоконных электродов позволила разделить три отдельных пика при 0,13, 0,45 и 0,7 В относительно ХСЭ. Кроме того, Чжу совместно с коллегами провели *in vivo* исследование на полосатом теле анестезированных мышей с использованием модифицированного микроэлектрода из углеродного волокна (МУВ) им удалось разделить пики окисления дофамина и серотонина при потенциалах 0,15 и 0,36 В соответственно [79]. Подобные исследования, как *in vitro*, так и *in vivo*, с использованием ДИВА для селективного обнаружения нейротрансмиттеров, были подробно описаны в литературе [80, 81].

Квадратно-волновая вольтамперометрия представляет собой особый тип вольтамперометрии, в которой волновая форма состоит из дифференциальных импульсов, наложенных на ступенчатый потенциал. Измерение тока производится в конце каждого пика и в следующей низшей точке квадратного импульса. Поскольку емкостный ток затухает значительно быстрее фарадеевского, КВВ минимизирует влияние емкостного тока. Временное

разрешение метода составило 10 с, что медленнее, чем FSCV, однако данный метод возможно использовать для определения базальных уровней дофамина. Поскольку в разработанном методе используется развертка потенциала с модуляцией прямоугольного сигнала большой амплитуды поверх симметричного сигнала, что приводит к более высокой чувствительности метода, чем другие методы измерения базальных уровней нейротрансмиттеров [82, 83].

### 3.2.3 Определение нейротрансмиттеров *in vivo*

В одном из первых *in vivo* исследований осуществляли измерение катехоламинов в ткани мозга крысы и для этого использовали углеродный пастовый электрод диаметром 50 мкм [84, 85]. На данный момент можно отметить значительный прогресс в разработке электродов и большое их разнообразие. В последних обзорах исчерпывающе описаны последние достижения в области *in vivo* определения нейромедиаторов [7, 86–92]. В данном подразделе остановимся на последних достижениях в области разработки электрохимических сенсоров, которые были недавно использованы для определения нейротрансмиттеров *in vivo*.

Недавно Динг совместно с коллегами разработал золотой наноэлектрод для обнаружения дофамина, который представлял собой золотую проволоку, запаянную в стеклянный капилляр диаметром 500 нм с эффективной рабочей поверхностью 60 нм. Конец проволоки был модифицирован наноструктурами золота, причем рабочая поверхность электрода была дополнительно модифицирована полимерным материалом Nafion. Разработанный электрохимический сенсор был использован для амперометрического определения дофамина в стриатуме крыс. Измеренная с помощью данного сенсора концентрация высвобождаемого дофамина, индуцированного номифензином, составила 37 нМ [93]. Данный сенсор обладал высокой селективностью и не реагировал на аскорбиновую кислоту, норадреналин, адреналин в физиологических концентрациях.

МУВ являются наиболее распространенным типом электродов для исследований *in vitro/in vivo*. Данные микроэлектроды получили широкое распространение для обнаружения нейротрансмиттеров *in vitro/in vivo* без необходимости дополнительной модификации их электрохимически активной поверхности (Рис. 5). Важно отметить, что углеродные материалы подходят для измерения нейротрансмиттеров благодаря своей поверхности с кислородсодержащими функциональными группами, способствующими адсорбции дофамина и серотонина.

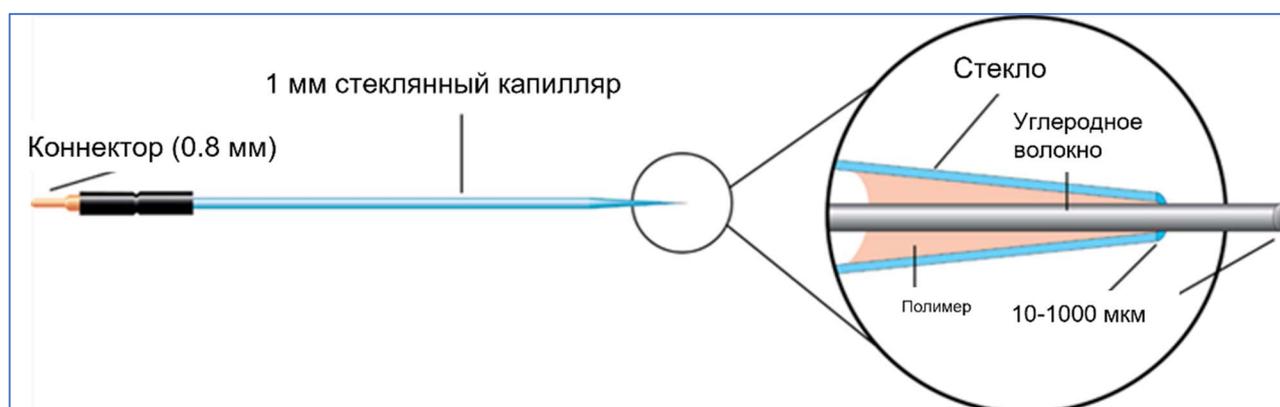


Рис. 5. Схема электрода на основе углеродного волокна.

С помощью подобного электрода изучали высвобождение эндогенного дофамина в изолированном головном мозге взрослой дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) с использованием FSCV, в качестве стимула для высвобождения эндогенного дофамина использовали ацетилхолин или никотин. Высвобождение дофамина, вызванное стимуляцией никотином, имело значительно более продолжительную длительность по сравнению с высвобождением, индуцированным ацетилхолином. Для получения результатов, был использован МУВ с диаметром 7 мкм, запаянный в стеклянный капилляр [94]. В предыдущих исследованиях этой группой ученых были разработаны углеродные наноэлектроды с диаметром кончика электрода порядка 250 нм. Аналогично МУВ, углеродные наноэлектроды, созданные на основе нанокapилляров, демонстрируют линейную зависимость отклика в диапазоне концентраций дофамина от 0,1 до 10 мкМ, а их предел обнаружения составил  $25 \pm 5$  нМ.

Углеродные наноэлектроды привлекают к себе большое внимание, благодаря своему наноразмерному диаметру по сравнению с типичными МУВ и иглоподобной геометрией, что облегчает проникновение наноэлектрода в конкретные области мозга [95].

Помимо определения отдельных нейротрансмиттеров наблюдается значительный интерес к одновременному определению нескольких аналитов в системе [96]. Например, недавно был разработан кольцевой дисковый микроэлектрод на основе углеродного волокна в середине и с кольцом из нанометрового золота, позволяющий одновременно определять дофамин и пероксид водорода. Для обнаружения дофамина была использована золотая часть микроэлектрода [97]. Обнаружение дофамина в мозгу мыши осуществляли при электрической стимуляции с частотой  $60 \text{ Гц} \pm 300 \text{ мкА}$  в области прилежащего ядра (NAc). После стимуляции на золотом микроэлектроде было зарегистрировано кратковременное импульсное изменение тока, свидетельствующее об увеличении концентрации дофамина в измеряемой области.

Использование электродов на основе МУВ для имплантации в мозг нередко сопровождается возникновением неспецифической адсорбции белков на поверхность [98]. Этот процесс может значительно влиять на чувствительность и воспроизводимость электрохимического метода анализа. С целью уменьшения нежелательных эффектов, связанных с загрязнениями электрохимически активной поверхности белками, МУВ модифицируют полимерными материалами. Проблема поверхностного загрязнения микроэлектродов стала особенно актуальной в контексте экспериментов *in vivo*, поскольку загрязнение существенно снижает чувствительность сенсоров при количественном анализе. Поэтому был разработан электрод, в основе которого лежит МУВ, но с дополнительным покрытием из нанопористого проводящего полианилина, обогащенного политаниновой кислотой (ПТК-ПА). Данная мембрана обладает способностью обеспечивать гидрофильность поверхности электрода и предотвращать адгезию белков.

Для демонстрации эффективности данного подхода, был проведен эксперимент с имплантацией модифицированных МУВ в НАс головного мозга крысы. Было продемонстрировано, что электрод, модифицированный мембраной ПТК-ПА, обладает высокой устойчивостью к неспецифической адсорбции белков в СМЖ [99]. Например, падение тока на немодифицированном МУВ при инкубации в растворе 10 мг/мл БСА составило около 60%, а на модифицированном мембраной ПТК-ПА электроде всего около 15% [79].

Для уменьшения загрязнения поверхности нанoeлектродов, была использована нетривиальная методика модификации поверхности лейкоцитарными мембранами. Хотя модификация поверхности электрода незначительно снизила его чувствительность к молекулам аналита, потеря чувствительности стала гораздо менее заметной даже после длительной имплантации в мозг *in vivo* в течение 8 часов [100].

В целом, использование имплантируемых микросенсоров в нейробиологических исследованиях значительно продвинулось вперед. Однако геометрия большинства электродов ограничена способами изготовления, поэтому необходимы новые методы для массового производства с высокой воспроизводимостью. Недавно был разработан новый метод изготовления углеродных микросенсоров с использованием двухфотонной нанолитографии. Разработанные электроды имели предел обнаружения для дофамина  $11 \pm 1$  (для сферических заготовок) и  $10 \pm 2$  нМ (для конусообразных заготовок), высокую воспроизводимость изготовления и стабильность. С помощью сферических 3D-печатных микроелектродов определяли дофамин в срезе головного мозга крысы *ex vivo*. Данное исследование является первой демонстрацией использования 3D напечатанных углеродных электродов (Рис. 6) [101].

Метод прямой лазерной литографии в настоящее время позволяет изготавливать сенсоры микрометрового размера и формы. Однако для обнаружения нейротрансмиттеров в биологических организмах или в синапсах требуются субмикро-, нанoeлектроды.

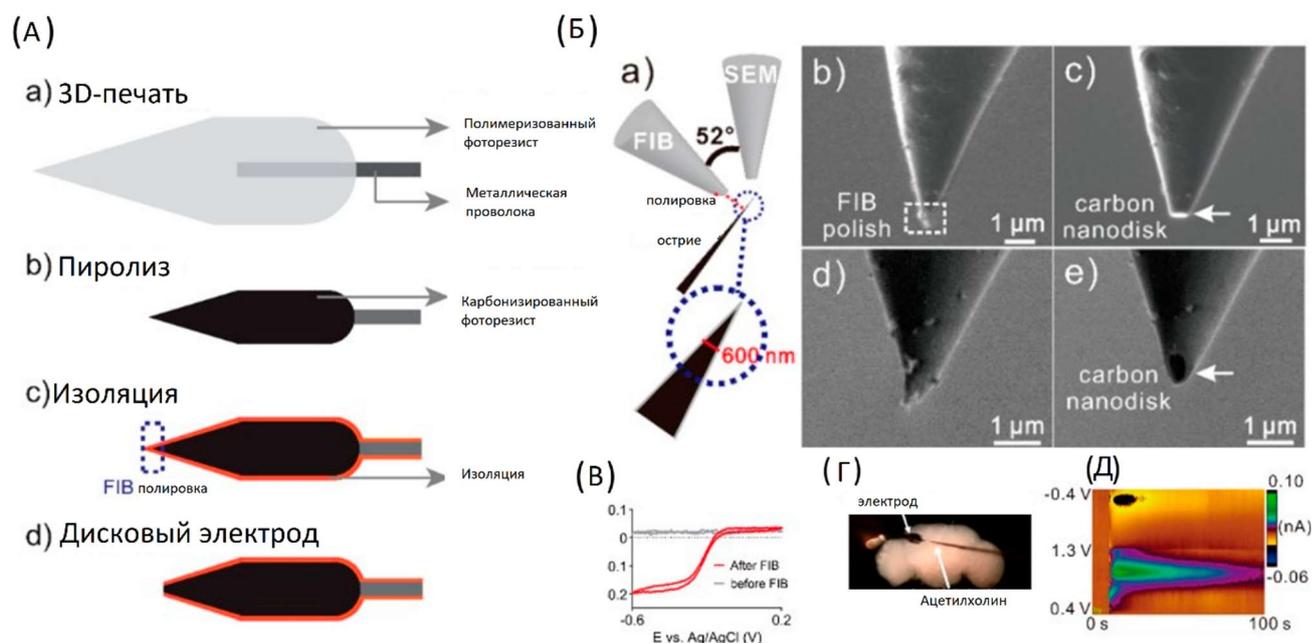


Рис. 6. Применение 3D-печатанных углеродных электродов. (А) Схема, демонстрирующая изготовление 3D-печатных углеродных нанозлектродов. (Б) Полировка сфокусированным ионным пучком (ФИП). (а) Схема установки образца. Детектор ФИП расположен вертикально к образцу с наноконечником, а детектор РЭМ расположен под углом  $52^\circ$  к детектору ФИП. Вид с детектора ФИП (b) до и (c) после полировки ФИП. Вид с детектора РЭМ (d) до и (e) после полировки ФИП. (В) ЦВ нанозлектродов до и после полировки ФИП в  $10 \text{ mM Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ . Скорость развертки потенциала  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . (Г) Микроскопическое изображение мозга с напечатанным на 3D-принтере нанозлектродом и микропипеткой, загруженной ацетилхолином. (Д) График, демонстрирующий обнаружение дофамина [101].

Так в исследовании Вентон был применен инновационный подход к созданию имплантируемых сенсоров для обнаружения нейротрансмиттеров, который основывался на методе прямой лазерной литографии для 3D-печати углеродных нанозлектродов. Эти нанозлектроды были изготовлены с использованием тонкого слоя  $\text{Al}_2\text{O}_3$  в качестве изоляции и подвергнуты обработке ионным пучком, чтобы придать им форму дисков. Данные углеродные нанозлектроды позволили определять дофамин в мозге *Drosophilla*. Предел обнаружения дофамина составил  $177 \pm 21 \text{ nM}$ , превосходя показатели углеродных волокон ( $20 \pm 4 \text{ nM}$ ) и микроэлектродов, созданных с помощью 3D-принтера ( $11 \pm 1 \text{ nM}$ ) [101]. Исследователи также провели стимуляцию мозга *Drosophilla* с использованием ацетилхолина, что привело к мгновенному

увеличению тока вследствие повышения концентрации дофамина через 10 секунд. Эти результаты подчеркивают значимость разработки новых технологий для точного анализа нейротрансмиттеров и их влияния на мозговую активность.

Определение серотонина ограничено его низкой концентрацией в мозгу (~5 нМ), а также взаимодействием серотонина с поверхностью нанозлектрода [55]. Поэтому обнаружение серотонина является более сложной задачей по сравнению с определением дофамина (в зависимости от отделов мозга концентрация варьируется от 1 нМ до 10 мкМ) [102].

При исследовании сигналов *in vivo* в основном сталкиваются с проблемой наличия других аналитов (дофамин, норадреналин, аскорбиновая кислота и т.п.). Для того чтобы добиться более точных результатов, обычно производится фильтрация сигналов от серотонина, дофамина и норадреналина [76]. В одном из проведенных исследований были изучены новые методы стимуляции и измерения концентрации серотонина в трех различных участках мозга: в области СА2 гиппокампа, медиального пучка переднего мозга (MFB) и черной субстанции. Данное исследование позволило выявить, что стимуляция аксонов ведет к активному выделению серотонина в трех изучаемых участках мозга [103].

Результаты *in vivo* измерений концентрации серотонина в области СА2 гиппокампа у самцов и самок мышей показали, что уровни серотонина у самок мышей на разных стадиях их эстрального цикла практически не различаются и близки к среднему значению. Кроме того, не было выявлено существенных различий между средними уровнями контрольных сигналов серотонина у самцов и самок. Эти важные измерения были проведены при помощи модифицированных МУВ [71].

Сероводород ( $H_2S$ ) представляет собой ещё один значимый аналит в мозге, выполняющий ключевую функцию в передаче сигналов, нейропротекции и регулировании физиологических и патологических процессов [104]. Тиан

совместно с коллегами продемонстрировали новый потенциометрический метод мониторинга сероводорода *in vivo* в мозге крысы с использованием МУВ, модифицированных наночастицами серебра (НЧС), которые были предварительно модифицированы  $\text{Na}_2\text{S}$  (т. е.  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{НЧС}/\text{МУВ}$ ). Данный тип электрода обладал линейным диапазоном измерений от 2,5 до 160 мкМ с пределом обнаружения 0,8 мкМ. Благодаря присутствию  $\text{Ag}_2\text{S}$ ,  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{НЧС}/\text{МУВ}$  проявляет хорошую селективность в отношении сероводорода, избегая влияния электрохимически активных нейрoхимических веществ, аскорбиновой кислоты и цистеина [105].

С появлением новых возможностей в области машинного обучения исследователи начали применять данный подход для оптимизации материалов электродов и условий обнаружения [106]. Применение методов машинного обучения позволяет обрабатывать получаемые ЦВ, извлекать из них полную информацию с последующим глубоким анализом полученных результатов. Недавно разработана уникальная вольтамперметрическая платформа, основанная на глубоком обучении, которая позволяет одновременно регистрировать ряд нейротрансмиттеров (например, дофамин и ацетилхолин) с высоким пространственно-временным разрешением *in vivo*. Этот метод позволяет получать обширные данные о содержании нейротрансмиттеров на основе одного вольтамперметрического измерения [107].

В будущем развитие и применение новых электрохимических нано-, субмикросенсоров позволит более точно определять нейротрансмиттеры, играющие важную роль в физиологических процессах в мозгу. В Табл. 3 приведены примеры работ, в которых успешно использовались микро- и наноэлектроды для обнаружения нейротрансмиттеров *in vivo* и которые были рассмотрены в данном разделе.

Табл. 3 – Последние достижения в области обнаружения нейротрансмиттеров *in vivo*

	Структура сенсора	Метод	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Животное/ исследуемый орган	Ссылка
ДА	Золотой нанoeлектрод, модифицированный полимерным материалом Nafion	Амперометрия	5,2 нМ	0,01 - 2,55 мкМ	(Крыса) Мозг, стриатум	[93]
ДА	МУВ, модифицированный берлинской лазурью и поли(2,3-дигидроотиено-1,4-диоксин (PEDOT)	Амперометрия	0,18 мкМ	0,5–25 мкМ	(Крыса) Мозг, прилежащее ядро	[97]
ДА	МУВ с нанопористым проводящим мембранным покрытием с РТА	Амперометрия	-	5-30 мкМ	(Крыса) Мозг, прилежащее ядро	[99]
ДА	МУВ, модифицированное УНТ и Nafion	Потенциометрия	5 нМ	5–185 нМ	(Мышь) Мозг, стриатум	[108]
ДА	МУВ, функционализированный аптамерными амфифилами холестерина	Амперометрия	0,5 мкМ	0,5–2 мкМ	(Крыса) Мозг, стриатум, NAc	[109]
ДА	3D напечатанные МУВ	FSCV	11 нМ (сферические) 10 нМ (конические)	0,01–10 мкМ	(Крыса) Мозг, полосатое тело	[101]
<b>Серотонин</b>	МУВ, модифицированное Nafion	FSCV	-	-	(Мышь) Мозг, гиппокамп, черная субстанция, сетчатая часть	[103]
<b>Серотонин</b>	МУВ, модифицированное Nafion	FSCV	-	-	(Мышь) Мозг, гиппокамп	[71]
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Ag <sub>2</sub> S/AgNP/ CFE	Потенциометрия	0,8 мкМ	2,5–160 мкМ	(Крыса) Мозг, гиппокамп	[105]

### 3.3. Определение активных форм кислорода

#### 3.3.1 Виды активных форм кислорода и антиоксидантная защита

АФК представляют собой ключевые продукты метаболизма клеток [110, 111]. При низких и умеренных концентрациях АФК участвуют в физиологических клеточных процессах, однако при повышенных концентрациях они могут вызывать окислительное повреждение белков и ДНК, а также перекисное окисление липидов. Увеличение уровня АФК и последующий дисбаланс между АФК и антиоксидантами характеризуется как окислительный стресс. Продолжительное воздействие окислительного стресса способствует развитию различных патологических состояний, включая неврологические расстройства, нейродегенеративные заболевания.

Большая часть внутриклеточных АФК образуется в митохондриях. АФК образуются из молекулярного кислорода в результате нормального клеточного метаболизма. Молекулы, имеющие один или несколько непарных электронов, называются свободными радикалами. При обмене непарными электронами два свободных радикала образуют стабильные формы. Основными АФК, которые имеют физиологическое значение, являются супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ) [112].

Пероксид водорода признана основной АФК в окислительно-восстановительной регуляции биологической активности. Подобно ионам кальция, пероксид водорода является универсальной сигнальной молекулой [113–115]. Пероксид водорода является наиболее стабильной формой по сравнению с остальными АФК, которые зачастую являются радикалами. Например, время жизни супероксид-радикала составляет  $10^{-6}$  с, а время жизни гидроксильного радикала составляет  $\sim 10^{-9}$  с (Табл. 4).

Пероксид водорода, подобно ионам кальция, поддерживается на относительно низком уровне в нормально функционирующих эукариотических клетках (около 1-100 нМ) [116]. Концентрация пероксида водорода строго

контролируется в живой системе: образование пероксида стимулируется метаболическими сигналами или различными агентами (факторы роста, хемокины или физические стрессоры), тогда как его удаление достигается с помощью эффективных восстанавливающих систем и ферментов.

Общая клеточная концентрация супероксид радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) поддерживается на уровне около  $10^{-11}$  М, что намного ниже, чем у пероксида водорода, на уровне  $10^{-8}$  М [117]. Данная концентрация является приблизительной, поскольку локальная внутриклеточная концентрация любых АФК динамически изменяется в зависимости от активности генерирующих систем.

Табл. 4. Описание наиболее распространенных АФК, присутствующих в организме [118]

Вид	Формула	Время жизни	Краткое описание
Супероксид радикал	$O_2^{\cdot-}$	$10^{-6}$ с	Избирательно реактивен. Может восстанавливать переходные металлы ( $Fe^{3+}$ , $Cu^{2+}$ ), скорость реакции зависит от иона металла-лиганда. Может повредить определенные ферменты, содержащие кластеры Fe-S.
Гидроксильный радикал	$\cdot OH$	$10^{-9}$ с	Неизбирательно химически активный; реагирует со скоростью, близкой к контролируемой диффузии
Пероксид водорода	$H_2O_2$	Стабилен	Медленно реагирует с большинством тиолов, но быстрее с некоторыми аминокислотными остатками, например цистеином. Реагирует с некоторыми ионами переходных металлов с образованием $\cdot OH$ . Основные биологические реакции связаны с гемом, тиолами и ферментами, пероксидазой.
Синглетный кислород	$^1O_2$	$10^{-6}$ с	Может образовываться в результате реакций фотосенсибилизации, в которых такие молекулы, как порфирины, рибофлавин,

			билирубин и хлорофилл, поглощают свет и передают эту энергию в основное состояние кислорода, а также в результате химических реакций пероксильных радикалов и HOCl, среди других.
<b>Пероксинитрит</b>	$\text{ONOO}^-$	$10^{-3}$ с	Прямые реакции с тиолами и центрами переходных металлов, реагирует с $\text{CO}_2$ с образованием нитрозопероксикарбоната. Пероксинитрит сам по себе может окислять несколько биомолекул или при разложении пероксинитритовой кислоты может переходить в $\bullet\text{OH}$ .
<b>Радикал диоксида азота</b>	$\text{NO}_2^-$	-	Образуется из пероксинитрита, в результате окисления нитрита. Быстро окисляет аскорбат и тиолы. Подвергается реакциям присоединения с радикалами, производными тирозина, триптофана, липидов и оснований ДНК (например, гуанина) с образованием нитрованных продуктов (например, 3-нитротирозина, нитротриптофана, нитролипидов и нитрованных оснований ДНК).

Считается, что пероксид водорода свободно проникает через мембрану клетки [119]. Хотя недавние исследования указывают на то, что некоторые мембраны довольно плохо проницаемы для пероксида водорода [120, 121]. Таким образом, транспорт пероксида водорода может регулироваться и что эта регуляция представляет собой основной фактор в определении клеточной концентрации пероксида водорода. Различия в проницаемости могут быть объяснены либо изменениями в составе липидов мембран, либо мембранными транспортными белками, облегчающими диффузию, либо комбинацией того и другого. Пероксид водорода также продуцируется ксантинооксидазой, НАДФН-оксидазой. В последовательности реакций, называемых реакциями Хабера –

Вейсса и Фентона,  $\text{H}_2\text{O}_2$  может распадаться на  $\bullet\text{OH}$  и  $\text{OH}^-$  в присутствии таких ионов металлов, как  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^{2+}$ .

Супероксид-радикал образуется при добавлении 1 электрона к молекулярному кислороду. Этот процесс опосредован либо НАДФН-оксидазой, либо ксантинооксидазой или электрон-транспортной цепью. Основным местом производства супероксид-радикала является митохондрия. Обычно электроны переносятся через электрон-транспортную цепь для восстановления кислорода до воды, но примерно от 1 до 3% всех электронов теряется в системе, и таким образом образуются супероксидные радикалы [122]. НАДФН-оксидаза обнаружена в полиморфно-ядерных лейкоцитах, моноцитах и макрофагах. После фагоцитоза эти клетки производят большое количество супероксид радикалов, что лежит в основе бактерицидной активности [123].

Супероксид-радикал, помимо своих прямых реакций, может также взаимодействовать с пероксидом водорода с последующим образованием гидроксильных радикалов. Гидроксильные радикалы способны повреждать белки, липиды, а также углеводы и ДНК, в некоторых случаях вызывая последующее перекисное окисление липидов. Пероксильные радикалы ( $\text{ROO}\bullet$ ) могут инициировать цепные реакции перекисного окисления липидов. Гидропероксиды липидов являются нестабильными и склонными к разложению во вторичные продукты (такие как 4-гидрокси-2,3-ноненаль и малоновый диальдегид). Процесс перекисного окисления липидов приводит к нарушению целостности клеточных мембран и изменению структур мембранных компонентов. Длительное воздействие АФК может привести к значительному повреждению клеточных структур, что, в свою очередь, может вызвать соматические мутации (Рис. 7).

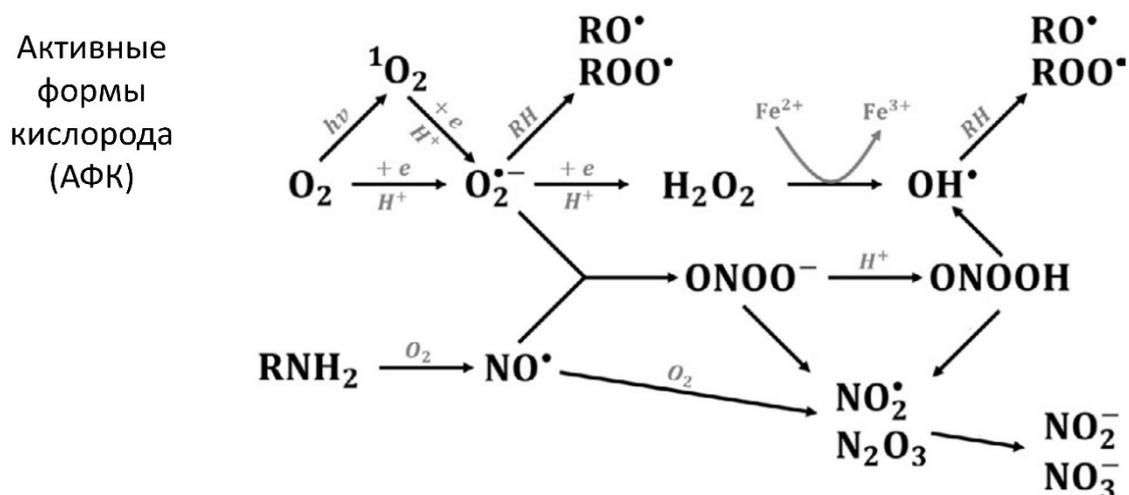


Рис. 7. Схема образования АФК в организме

Для защиты от АФК организм имеет ферментативную систему антиоксидантов, включающих супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу, каталазу и неферментативные низкомолекулярные антиоксиданты такие как, глутатион, витамины С, D и E [124].

Как один из самых важных антиоксидантных ферментов, СОД играет решающую роль в дисмутации супероксид радикала кислорода. Были идентифицированы и охарактеризованы три типа СОД: цитозольная СОД (Cu / Zn СОД или СОД1), митохондриальная СОД (MnСОД или СОД2), а также внеклеточная СОД (FeСОД или СОД3) (Рис. 8) [125].

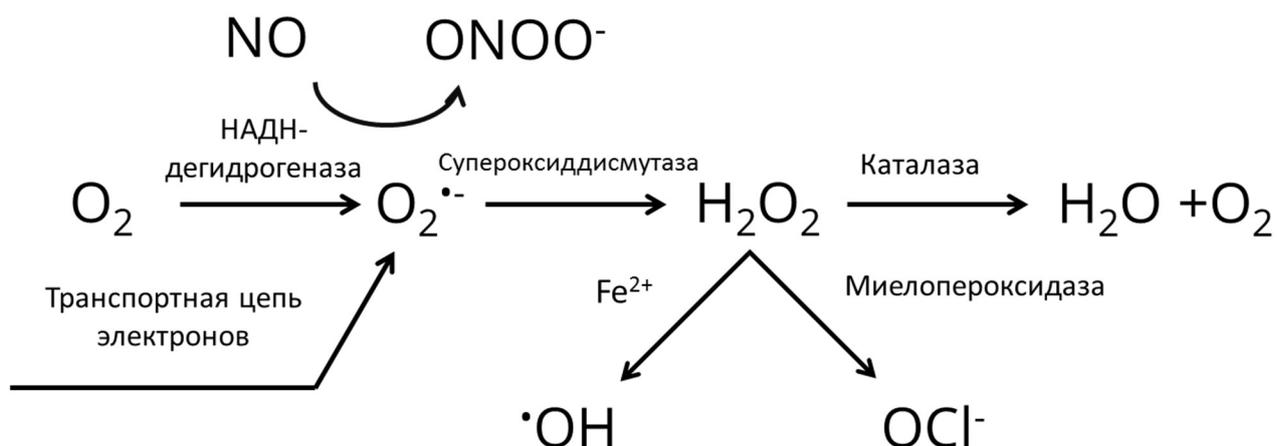


Рис. 8. Схема антиоксидантной системы в организме

Каталаза - гемсодержащий фермент, который катализирует разложение образующегося в процессе биологического окисления пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. По большей части каталаза локализована в пероксисомах, при этом может быть обнаружена в цитоплазме и митохондриях. Каталаза представляет собой тетрамер из четырех полипептидных цепей, каждая из которых состоит из 500 аминокислот (250 кДа) (Рис. 9).

Глутатионпероксидаза — это общее название семейства ферментов, которые катализируют восстановление  $\text{H}_2\text{O}_2$  или органических гидроперекисей до воды или в качестве доноров электронов используется глутатион ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$ ). Затем глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион, и реакция повторяется вновь. Глутатионпероксидаза также является тетрамером в своем составе имеет атом селена. В клетках она присутствует в цитозоле и матриксе митохондрий (Рис. 9).

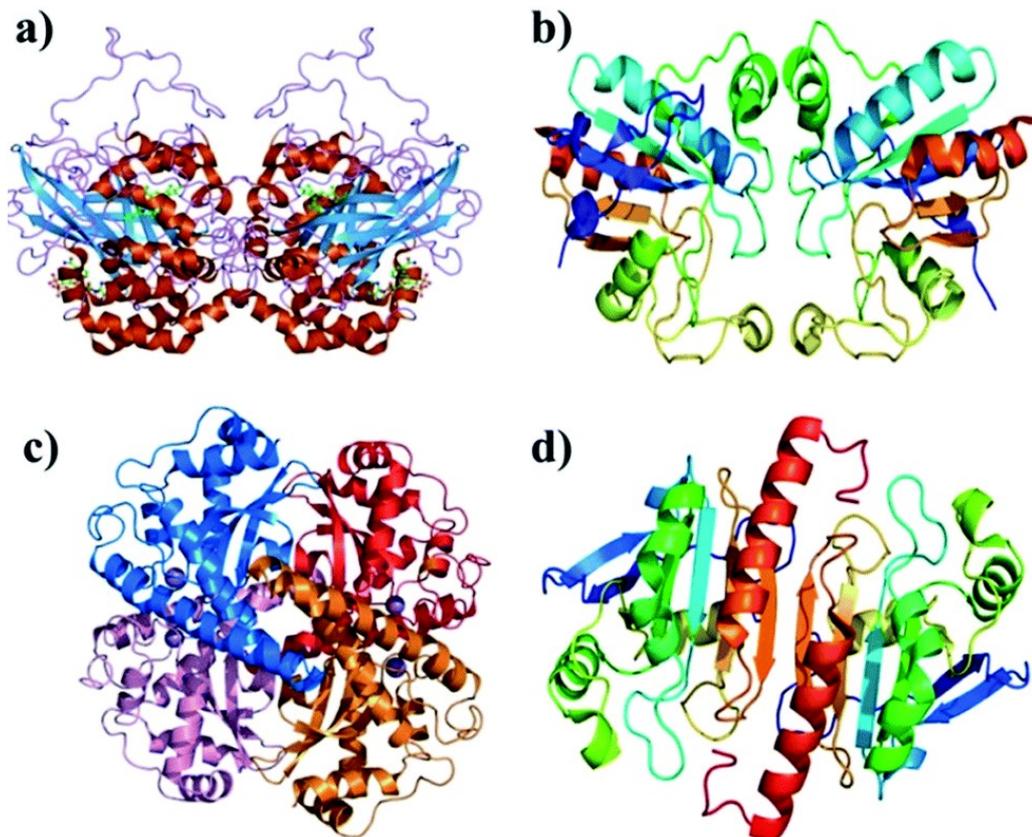


Рис. 9. Пространственная структура антиоксидантных ферментов (А) Каталаза, (В) Глутатионпероксидаза, (С) СОД1, (D) Пероксиредоксин 1.

Таким образом, определение и количественная оценка АФК представляет собой сложную задачу, связанную с несколькими ключевыми характеристиками этих молекул: малым временем жизни, низкой физиологической концентрацией и высокой реакционной способностью [126].

### 3.3.2 Обзор методов для определения АФК

В простых системах  $O_2^{\cdot-}$  может быть измерен по реакции ингибирования СОД при реакции восстановления цитохрома с [127]. Образование  $O_2^{\cdot-}$  также можно оценить с помощью спинового захвата с помощью электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), преимущество которого заключается в прямом обнаружении данного аналита [128]. Как хорошо известно, метод ЭПР является дорогостоящим и не подходит для рутинного анализа. Хемилюминесцентные зонды на основе люминола и люцигенина широко используются для обнаружения  $O_2^{\cdot-}$ . Однако интерпретировать такие данные довольно сложно, поскольку данные зонды генерируют радикалы, которые сами продуцируют  $O_2^{\cdot-}$  [129].

Измерение концентрации  $H_2O_2$  представляет собой важный этап в многих биохимических исследованиях. Один из таких методов основан на использовании субстратов, способных окисляться пероксидазой хрена в присутствии пероксида водорода, и среди них выделяется Amplex Red (Рис. 10) [130]. В ходе данной реакции образуется резорурфин, который можно определять спектрофотометрически. Однако спектр может влиять присутствие других субстратов, таких как аскорбат натрия, N-ацетилцистеин и  $O_2^{\cdot-}$ .

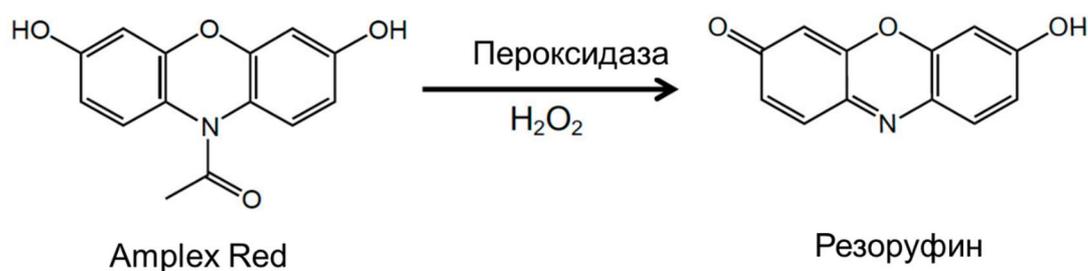


Рис. 10. Схема реакции окисления Amplex Red, используемой для определения пероксида водорода

Для обнаружения  $\text{H}_2\text{O}_2$  внутри клеток часто используются флуоресцентные зонды на основе фенилбороната [131], которые обладают более высокой селективностью в обнаружении  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Однако данные зонды могут не обладать достаточной чувствительностью для обнаружения малых или локализованных изменений в уровнях  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Так как  $\text{H}_2\text{O}_2$  обычно присутствует в более высоких концентрациях, чем другие АФК, такие зонды могут быть селективными для его обнаружения при условии правильного контроля [132, 133]. В здоровых клетках концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  находится в диапазоне от 1 до 100 нМ в физиологических условиях и может достигать 100 мкМ в условиях окислительного стресса [134].

Для оценки общего содержания АФК в клетках часто используются низкомолекулярные флуоресцентные зонды на основе 2,7'-дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH) (Рис. 11), обычно вводимые в форме диацетата, которые легко проникают в клетки. DCFH окисляется до флуоресцентного продукта 2,7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) различными видами АФК, и поэтому он не специфичен для каких-либо конкретных АФК [135]. Кроме того, окисление DCFH и флуоресценция DCF чувствительны к локальным уровням  $\text{O}_2$  и pH, а выход флуоресценции может быть нелинейным с повышенными уровнями АФК [136–138].

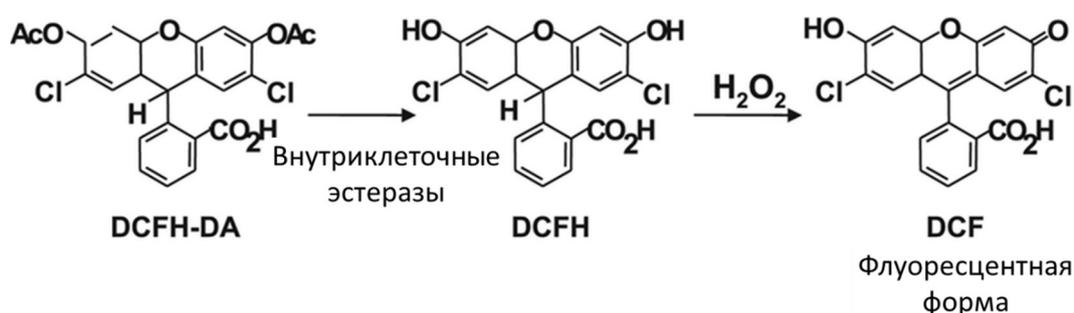


Рис. 11. Схема реакции окисления DCFH-DA, используемой для определения пероксида водорода в клетках

Несмотря на преимущества флуоресцентных зондов существует ряд ограничений в их использовании. Во-первых, флуоресцентные зонды склонны к

обесцвечиванию при проведении длительных экспериментов. Во-вторых, взаимодействие зондов с клеточными компонентами может привести к фоновому флуоресцентному сигналу (автофлуоресценция), что затрудняет точное измерение концентрации аналитов. Также следует учитывать, что некоторые зонды могут обладать токсичностью для клеток, что ограничивает их применение в длительных экспериментах. Стоит отметить, что при проведении экспериментов с тканями и животными моделями проникновение света ограничено.

Одними из перспективных флуоресцентных зондов являются генетически кодируемые флуоресцентные белки-сенсоры, которые обладают дитиольным переключателем, изменяющим общую флуоресценцию в зависимости от формы [43, 139–141]. Мутант флуоресцентного белка (GFP), чувствительного к окислению (HyPer7), связанный с окислительно-чувствительным белком, таким как OxyR (серия HyPer), или с пероксидазой, такой как Orp1 или TSA2 (зонды на основе roGFP2), обеспечивают высокую чувствительность и специфичность к  $\text{H}_2\text{O}_2$  [142].

Данный тип зондов может быть использован для измерений внутри живых клеток в режиме реального времени. Зонды являются ратиометрическими, поскольку используют длины волн возбуждения как для окисленных, так и для восстановленных форм, и они не зависят от уровня экспрессии белкового зонда. В большинстве экспериментов зонды  $\text{H}_2\text{O}_2$  экспрессируются в виде свободных белков, которые распределяются внутри клетки. Тем не менее, учитывая неопределенность в отношении расстояний диффузии внутриклеточного  $\text{H}_2\text{O}_2$ , по-прежнему неясно, какое разрешение необходимо для понимания субклеточного распределения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Поэтому важным подходом является иммобилизация зондов к белковым комплексам или местам контакта с органеллами.

Пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) образуется в результате взаимодействия пероксида водорода с нитрит-ионом и способен окислять ДНК и белки. Также продуктами окисления пероксинитрита могут быть такие активные формы как,

карбонатный радикал-анион ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) и диоксид азота ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ). Пероксинитрит способен окислять флуоресцентные красители на основе бора почти в миллион раз быстрее, чем  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и при определенных условиях данные красители могут быть использованы для оценки продукции  $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$  [143].

$\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$  и некоторые производные от них хлорамины и бромамины вступают в реакцию с большинством обычных флуоресцентных зондов, используемых для обнаружения АФК, включая DCFH и люминол. Однако многие из этих зондов также являются субстратами пероксидаз, которые генерируют  $\text{HOCl}$  или  $\text{HOBr}$ , что затрудняет их использование. Ранее был разработан генетически кодируемый зонд для определения активных форм галогенов, позволяющий проводить динамический мониторинг этих форм как в культуре клеток, так и *in vivo* [144].

Измерение АФК в организме живого организма *in vivo* представляет собой нелегкую задачу. Существующие методы, основанные на ЭПР, хоть и были разработаны, но пока не нашли широкого применения. Это обусловлено сложностью интеграции этих методов для проведения измерений в режиме реального времени.

Примечательно, что в исследованиях на животных используются генетически кодируемые биосенсоры, способные реагировать на окислительно-восстановительные процессы. Однако с развитием более чувствительных методов исследования, таких как ПЭТ, стало возможным получать изображения по распределению АФК внутри живого организма. Дигидрометидин, меченный  $^{18}\text{F}$  в пара-положении бензольного кольца, был разработан в качестве индикатора для ПЭТ для неинвазивной визуализации АФК. Это соединение легко проникает через гематоэнцефалический барьер и окисляется АФК, а продукт окисления накапливается внутриклеточно. Таким образом, по сигналу от накопленного окисленного дигидрометидина можно оценить содержание АФК внутри клеток. Но этот подход все еще находится на начальной стадии развития и требует дополнительных исследований.

Интересно отметить, что для оценки изменений уровня  $\text{H}_2\text{O}_2$  в митохондриях клеток и тканей был разработан краситель MitoV, которое специфически накапливается в митохондриях и превращает  $\text{H}_2\text{O}_2$  в MitoP. После этого соотношение между MitoP и MitoV может быть определено с помощью масс-спектрометрии [145].

В последние годы электрохимические методы для определения АФК привлекли большое внимание из-за своих преимуществ, таких как относительная простота измерений, обнаружение в сложных системах в реальном времени, высокая чувствительность и селективность, быстрый отклик [146], небольшой размер [147] и возможность обнаружения *in vivo* [148].

### 3.3.3 Последние достижения в области электрохимического обнаружения активных форм кислорода *in vitro/in vivo*

В данном разделе приводятся основные электрохимические подходы, которые были применены для обнаружения различных видов АФК в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Недавно был разработан электрохимический сенсор, способный обнаруживать супероксид радикалы *in vitro* [149]. Сенсор представлял собой углеродный электрод, покрытый полимерным комплексом порфирина с ионом железа(III) (5,10,15,20-тетра-(3-тиенил)порфирин), связанный с 1-метилимидазолом в качестве аксиального лиганда ( $[\text{Fe}(\text{im})_2(\text{tpp})]\text{Br}$ ), который имитирует цитохром с. Аксиальная координация имидазольного лиганда с железо-порфириновым центром повышает его селективность в отношении супероксид радикала, препятствуя нежелательной координации с пероксидом водорода. В дальнейшем данный тип сенсора использовали для обнаружения супероксид радикалов в человеческой крови и в правом предсердии крыс, которым вводили липополисахарид ЛПС. Спустя 45 минут после введения ЛПС сигнал от супероксид радикала начал увеличиваться и продолжал увеличиваться до 6 ч. Таким образом, через 6 ч уровень тока был в 5 раз выше, чем в контрольной группе, что свидетельствовало об активной выработке супероксид-радикалов [149].

Концентрацию супероксид радикалов также измеряли в мозге крыс с болезнью Альцгеймера. Микросенсор представлял собой МУВ, функционализированный полимерным материалом, наночастицами берлинской лазури и УНТ. В качестве чувствительного элемента в разработанном сенсоре выступала СОД. Однако данный метод вызывал повреждение тканей во время введения микроэлектрода, что делало его неприменимым для клинических целей [150]. В недавних исследованиях большое внимание уделяли измерению активных форм азота, которые в настоящее время принято относить к АФК. В частности, было проведено измерение распределения оксида азота (NO) в кишечнике эмбрионов рыбок данио (*Danio rerio*), подвергнутых воздействию ресвератрола и розувастатина. Для этой цели были использованы МУВ, что обеспечило возможность количественного мониторинга в различных сегментах кишечника. Было показано, что в среднем сегменте кишечника уровень NO почти в 4 раза больше, чем в переднем и заднем сегментах (Рис. 12). В исследовании было показано, что концентрация NO в кишечнике снижалась на 87% при воздействии ресвератрола и розувастатина [151].

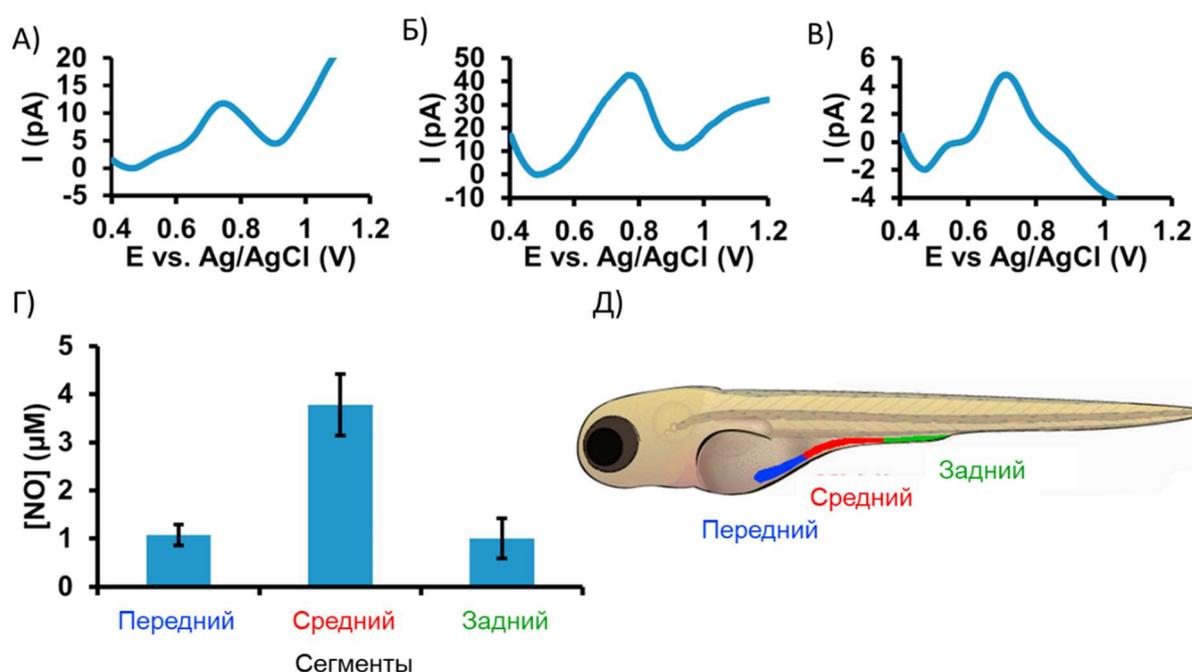


Рис. 12. *In vivo* ДИВА, измеренные с помощью микроэлектрода, введенного в кишку 5-дневных эмбрионов рыбок данио в: переднем (А), среднем (Б) и заднем (В) сегментах. Концентрации NO, измеренные *in vivo* в кишечнике эмбрионов (Г). Схематическое изображение трех участков кишечника, куда был имплантирован датчик (Д) [151].

Аналогичные исследования проведены и в области мозга крыс, где с помощью МУВ, покрытого порфирином и фторированным ксерогелем, удалось измерить концентрацию NO. Разработанные микросенсоры оказались более селективными к NO по сравнению с аналогичными микроэлектродами, модифицированными полимером Nafion. С их помощью удалось зафиксировать высвобождение NO в теменной коре головного мозга крыс в ответ на локальную микроинъекцию глутаматергического агониста N-метил-D-аспартата. Высвобождение NO, вызванное микроинъекцией, достигало своего пика при концентрации 1,1 мкМ и продолжалось в течение более 20 минут [152].

Для более точного мониторинга химических процессов в организме был разработан электрохимический биосенсор, который позволил измерять содержание ONOO<sup>-</sup> в различных областях мозга крыс после церебральной ишемии. Он основан на новой органической молекуле (4-(S-(6-меркаптогексил)бензотиоат-6-ил)-7-(диэтиламино)-2-(4-(пиперазинил диферроформамид-1-ил)фенил)хроменилий) НЕМФ, которая имеет специфическую группу для распознавания ONOO<sup>-</sup> и электроактивную группу ферроцена. Данный биосенсор обладал высокой селективностью и линейным диапазоном (20,0 нМ – 2,0 мкМ) для ONOO<sup>-</sup>, а также невероятно низким пределом обнаружения ( $12,1 \pm 0,8$  нМ). В сочетании с высоким пространственным разрешением и биосовместимостью, данный биосенсор успешно был использован для обнаружения ONOO<sup>-</sup> в различных областях мозга крыс [153].

Применяя инновационный подход, исследователи в качестве чувствительного элемента использовали изолированные атомы меди на нитриде углерода. Восстановление пероксида водорода по сравнению с окислением кислорода протекает преимущественно, когда изолированные атомы меди, закрепленные на нитриде углерода, используются в качестве одноатомного электрокатализатора. Микросенсор на основе МУВ диаметром 7 мкм, модифицированный Cu<sub>1</sub>/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/УНТ был разработан для дальнейших *in vivo* измерений. Восстановление пероксида водорода на микросенсоре происходило

при более положительном потенциале, чем восстановление кислорода. Кроме того, линейный диапазон работы сенсора составил от 5 до 20 мкМ. Селективность сенсора была изучена в растворах, содержащих дофамин, серотонин, норадреналин, кислород. Данные микросенсоры были успешно интегрированы в мозг морской свинки, в котором регистрировали изменение величины тока на локальное введение пероксида водорода. Микроинфузия 100 мкМ раствора пероксида водорода в кору головного мозга приводила к быстрому увеличению тока в системе, в то время как при инфузии искусственной СМЖ изменений не наблюдалось [154].

Однако на пути к применению электрохимических сенсоров стоит проблема загрязнения поверхности электродов белками при измерении. Это влияет на чувствительность, стабильность и воспроизводимость сенсоров, ограничивая их практическое использование как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Недавние исследования привели к разработке электрохимического сенсора, в котором нанопористая мембрана из кремнезема препятствует загрязнению поверхности, а наноструктуры платины внутри нанопор являются чувствительным элементом системы. Мембрана была выращена на поверхности ИТО и МУВ с использованием метода Штобера и самосборки [155]. Наноструктуры Pt были электроосаждены в нанопоры мембраны. Было показано, что микросенсор способен стабильно работать в мозге крысы до 90 мин. Точную концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  в мозге крысы было трудно определить, поэтому регистрировали изменения тока при инфузии раствора пероксида водорода в мозг. В ткань головного мозга вводили 1 мкл 0,5 мМ пероксида водорода в течение 20 с каждые 30 мин и одновременно записывали амперометрические кривые. Микросенсор продемонстрировал быстрый отклик на введение  $\text{H}_2\text{O}_2$ , причем время отклика и ток отклика были стабильными до 90 мин. Напротив, при использовании сенсора без мембраны длительность измерения снижалась до 30 минут.

Продвижения в области электрохимических сенсоров способствуют разработке новых методов и материалов, которые повышают их селективность и

чувствительность. Одним из таких методов является электроосаждение 1,3-фенилендиамин на углеродное волокно. Этот процесс способствует улучшению селективности сенсоров. Полимерные мембраны, полученные таким образом, широко применяются как покрытия как в образцах для микродиализа [156], так и в электрохимических сенсорах [157].

С помощью немодифицированного микроэлектрода было обнаружено быстрое увеличение концентрации дофамина в результате везикулярного выброса в дополнение к слабому сигналу, который предположительно был связан с  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Небольшое увеличение  $\text{H}_2\text{O}_2$  регистрировалось в ответ на стимуляцию с помощью модифицированного сенсора, но сигнал от дофамина не наблюдался (поскольку он эффективно элиминировался мембраной).

Еще в качестве примера для мониторинга пероксида водорода был использован аналогичный подход, однако в качестве мембраны выступал полидофамин. Микросенсор был изготовлен на основе МУВ, на которое последовательно осаждали УНТ и наночастицы берлинской лазури с последующим покрытием мембраной из полидофамина. Мембрана обеспечивала высокую стабильность как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*. Микроэлектрод являлся селективным для измерения  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vivo*, практически без помех со стороны  $\text{O}_2$  и других электрохимически активных веществ. Наряду с большим линейным диапазоном (1-140 мкМ, предел обнаружения 0,4 мкМ), высокой биосовместимостью и стабильностью по отношению к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , микросенсор позволял отслеживать изменения концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vivo*. Однако при наличии такого количества преимуществ, разработанный микроэлектрод был инвазивным, его размер составлял 5-7 мкм в диаметре. При экзогенном введении 100 мкМ раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  наблюдалось быстрое увеличение тока. Напротив, при введении искусственной СМЖ не наблюдали никаких изменений тока [158].

Следует признать, что несмотря на значительные успехи в разработке чувствительных сенсоров, предназначенных для определения АФК, все еще существуют проблемы, требующие решения. Проблемы, связанные с чувствительностью, остаются важными, и их решение необходимо перед тем,

как эти электрохимические технологии смогут выйти на коммерческий рынок и быть успешно применены в клинической практике. Для широкого практического внедрения имеют решающее значение такие аспекты, как безопасность, доступность, высокая эффективность и воспроизводимость. Процессы производства следует оптимизировать, чтобы обеспечить безопасное и контролируемое промышленное производство, обеспечивающее постоянство результатов от сенсора к сенсору. Кроме того, сенсоры могут быть усовершенствованы для улучшения скорости и воспроизводимости обнаружения аналитов, а также для продления их срока службы (Табл. 5).

Табл. 5. Последние достижения в области обнаружении АФК *in vivo*

Аналит	Структура сенсора	Метод обнаружения	Предел обнаружения	Линейный диапазон	<i>In vivo</i> модель	Ссылка
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	МУВ, модифицированный комплексом порфирина-железо	Амперометрия	-	2-5 мкМ	(Крыса) Правое предсердие	[149]
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	МУВ, модифицированный полимерным материалом, НЧ берлинской лазури, УНТ и СОД	Хроноамперометрия	-	1–228 мкМ	(Крыса) Мозг	[150]
NO	МУВ, модифицированный порфиринами и Nafion	ДИВА	0,34 мкМ	0,5-10 мкМ	Эмбрионы рыбок данио	[151]
NO	МУВ, модифицированное никелевым порфирином и фторированным ксерогелем	ДИВА	12,1 ± 3,4 нМ	-	(Крыса) Мозг	[152]
NOO <sup>-</sup>	МУВ, модифицированное НЕМФ	ДИВА	12,1 ± 0,8 нМ	20,0 нМ – 2,0 мкМ	(Крыса) Мозг	[153]

$H_2O_2$	МУВ, модифицированный $Cu_1/C_3N_4$	ЦВ	-	5-20 мкМ	(Морская свинка) Мозг	[159]
$H_2O_2$	МУВ, модифицированный мембранной из кремнезема с последующим осаждением Pt внутри нанопор	Хроноампером етрия	-	0,01-5 мМ	(Крыса) Мозг	[155]
$H_2O_2$	МУВ, модифицированное 1,3- фенилендиамином	FSCV	-	-	(Крыса) Мозг	[160]
$H_2O_2$	Дисковый электрод на основе МУВ в середине кольцевого микроэлектрода, модифицированног о берлинской лазури и PEDOT.	Амперометрия	0,4 мкМ	1-29 мкМ	(Крыса) Мозг	[161]
$H_2O_2$	МУВ, модифицированный УНТ, НЧ берлинской лазури и мембраной из полидофамина	Хроноампером етрия	0,4 мкМ	1-140 мкМ	Крыса (Мозг)	[158]

### 3.4. Определение концентрации растворенного кислорода в живых системах

#### 3.4.1 Обзор методов определения растворенного кислорода

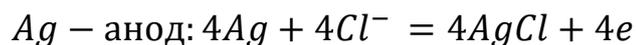
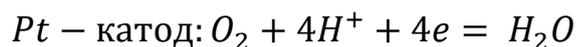
Основная функция кислорода – участие в качестве окислителя в окислительно-восстановительных реакциях в организме. Трудно переоценить значение мозговых процессов, зависящих от достаточного насыщения мозга кислородом.

Традиционное количественное определение концентрации кислорода основано на отборе проб и анализе химическими (йодометрическое титрование), физическими (манометрический) или инструментальными (газовая хроматография) методами. Однако в настоящее время важную роль играют непрерывный мониторинг водных ресурсов, малоинвазивные измерения, *in vivo* измерения, что постепенно приводит к разработке новых платформ и методов обнаружения [162, 163].

Электрохимические сенсоры, оптоволоконные датчики и биосенсоры стали незаменимыми во многих лабораторных и промышленных приложениях. Более сложные инструментальные подходы, такие как ЭПР, функциональная МРТ, ПЭТ, пульсоксиметрия также активно используются для определения кислорода в биологических экспериментах.

Рассмотрим и сравним наиболее используемые методы для измерения кислорода в условиях *in vivo*.

Очень мощным инструментом для определения концентрации кислорода являются электрохимические методы. Первым электродом, чувствительным к кислороду был электрод Кларка, представляющий из себя платиновый электрод, покрытый полупроницаемой мембраной, которая предотвращает контакт с мешающими аналитами и водой, но обеспечивает диффузию  $O_2$  к рабочей части электрода [164]. Схематическое изображение электрода Кларка показано на Рис. 13. В качестве анода выступает ХСЭ. В случае использования КСl в качестве электролита протекают следующие реакции:



Для получения линейного отклика электрода на концентрацию  $O_2$ , система работает в диапазоне диффузионно-ограниченного электрического тока. Обычно измерения осуществляются при потенциалах около  $-0,7$  В отн. ХСЭ.

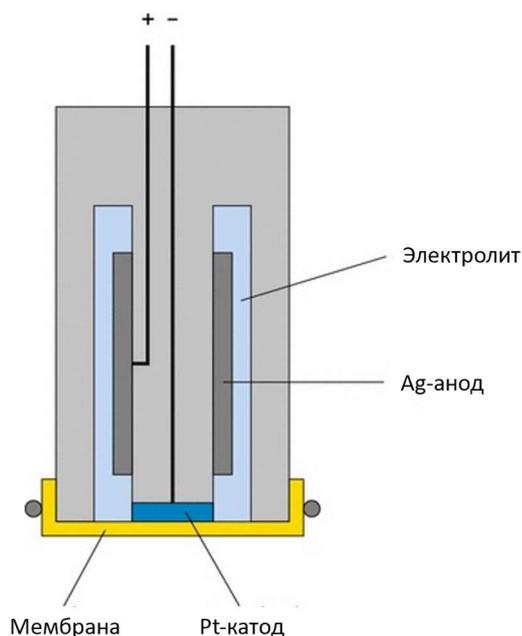


Рис. 13. Принципиальная схема строения электрода Кларка

Углеродные пастовые электроды работают аналогичным образом, но такие сенсоры не имеют внешней мембраны, требующей диффузии  $O_2$  через нее. На поверхности угольной пасты электрохимическое протекает двухстадийное восстановление кислорода, сначала до пероксида водорода затем до воды.

Углеродные пастовые электроды потребляют кислород в процессе восстановления в месте измерения, как и электроды типа Кларка, но они менее чувствительны к температуре в месте измерения [165].

На сегодняшний момент большинство оптических сенсоров для определения кислорода основаны на принципе тушения флуоресценции. Данные сенсоры представляют собой зонды, с помощью которых возможно определять концентрацию растворенного кислорода путем определения степени тушения флуоресценции флуорофора на конце зонда после его взаимодействия с молекулами растворенного кислорода. Когда флуоресцентное вещество

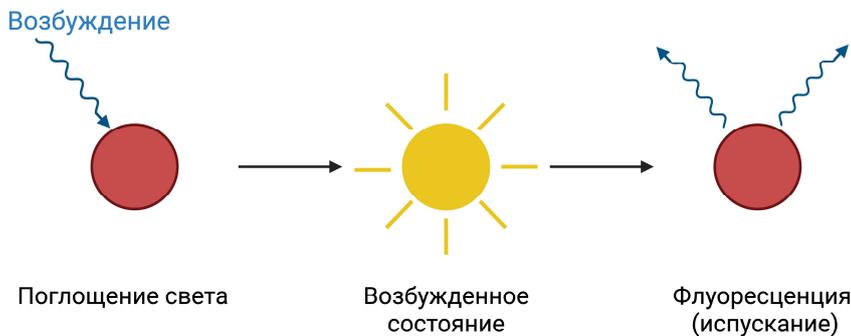
поглощает видимый или ультрафиолетовый свет определенной длины волны, происходит переход флуорофора в возбужденное состояние. Вследствие столкновений молекул кислорода с флуорофором происходит передача части энергии молекуле кислорода, что позволяет определить содержание молекул кислорода в водных пробах по интенсивности флуоресценции или времени жизни флуоресценции (Рис. 14).

Тушение флуоресценции определяется уравнением Штерна-Фольмера (1):

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [O_2] = 1 + k_Q \tau_0 [O_2] \quad (1)$$

где  $\tau_0$  и  $\tau$  — время жизни возбужденного состояния в отсутствие и в присутствии кислорода соответственно;  $I_0$  и  $I$  — интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии кислорода соответственно;  $K_{SV}$  — константа Штерна-Фольмера, равная произведению времени жизни возбужденного состояния в отсутствие кислорода и константы скорости гашения  $k_Q$ , которая, в свою очередь, зависит от условий окружающей среды (включая температуру), а также от коэффициента диффузии кислорода.

#### Процесс флуоресценции (без кислорода)



#### Тушение флуоресценции в присутствии кислорода

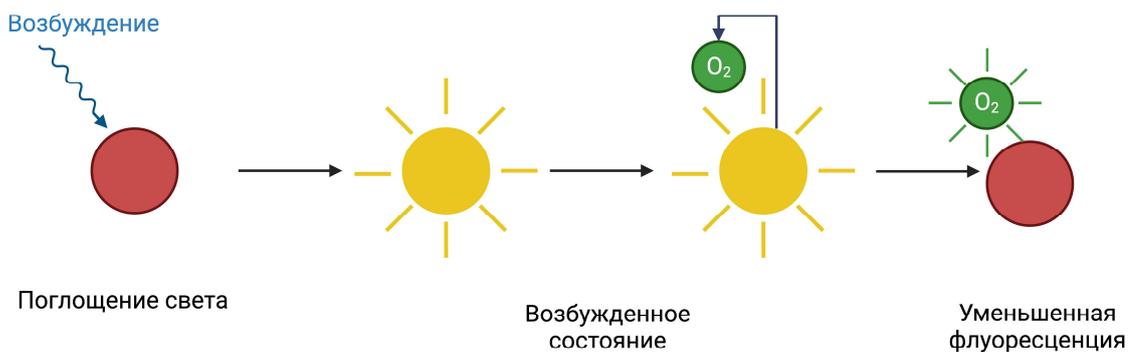


Рис. 14. Схема, демонстрирующая тушение флуоресценции молекулами кислорода

Помимо оптических датчиков, выполненных в виде зондов, большое распространение получили методы на основе флуоресцентных красителей. Основной принцип определения кислорода схож с рассмотренными ранее оптическими датчиками. Единственное, что флуорофор инкубируют непосредственно с клетками и измеряют интенсивность и время жизни флуоресценции. Ограниченная прозрачность тканей является еще одной проблемой, с которой сталкиваются доступные методы визуализации кислорода [166].

Традиционные методы оптической микроскопии, которые используют линейные (однофотонные) процессы поглощения для генерации контраста, ограничены использованием вблизи поверхности ткани (менее 100 мкм) для получения изображений с высоким разрешением, поскольку на больших глубинах многократное рассеяние света размывает изображение. Доступная глубина (500-800 мкм) в настоящее время ограничена  $z$ -разрешением двухфотонной микроскопии, а хирургическая операция подопытного животного может привести к искажению результатов [167–169].

Среди флуоресцентных зондов флуоресцентные белки представляют собой наиболее часто используемый инструмент для нескольких генетически кодируемых биосенсоров. Самым известным флуоресцентным белком является зеленый флуоресцентный белок (GFP).

Широко используемые биосенсоры основаны на промоторных последовательностях, индуцируемых гипоксией фактора  $1\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ), и/или дегронах, связанных с флуоресцентным белком. Хотя эти биосенсоры более удобны, они являются непрямые. С помощью данных биосенсоров измеряют скорость протекания биохимической реакции, на которую влияет концентрация кислорода. Непосредственно содержание кислорода в системе они не измеряют [170].

Все флуоресцентные белки синтезируются в виде нефлуоресцентных предшественников. Флуорофор развивается в процессе созревания, который включает циклизацию определенной области основной цепи белка в гетероцикл,

занимающую от минут до часов. Накопление флуорофоров и флуоресценция обычно не зависят от физиологических изменений внутриклеточной среды. Ранее показано, что важны два фактора: температура и концентрация молекулярного кислорода. Температура влияет на скорость процесса созревания, который, как известно, включает одну или несколько кислородзависимых реакций окисления в случае созревания GFP/RFP. Очищенные флуоресцентные белки GFP/RFP не способны созреть в дезоксигенированных буферах, а также в сильно гипоксических клетках *in vivo* [171].

В отличие от GFP-подобных флуоресцентных белков, флавиномононуклеотид-связывающие флуоресцентные белки не нуждаются в молекулярном кислороде и способны флуоресцировать в гипоксических условиях. Внутриклеточный датчик кислорода FluBO на основе фёрстеровской резонансной передачи энергии (FRET) был создан в *E.coli* путем слияния флавиномононуклеотид-связывающего флуоресцентного белка и YFP. YPF не может созреть в условиях дефицита кислорода, что приводит к заметным изменениям в соотношении флуоресценции флавиномононуклеотид-связывающего флуоресцентного белка и YFP [172]. Однако необратимость и высокая скорость созревания ограничивают использование этого биосенсора для клеток с очень высокой скоростью деления, где зрелый зонд постоянно разбавляется ростом клеток, что приводит к низким уровням зрелого флуоресцентного белка.

Таким образом, при сравнении четырех различных подходов наблюдаются различные достоинства и недостатки каждого (Табл. 6). Электрохимические сенсоры демонстрируют лучшее временное разрешение (менее одной секунды) и высокую глубину проникновения в ткани, что делает их полезными для измерений *in vivo*. Однако, они подвержены дрейфу и загрязнению поверхности электрода, что может влиять на точность измерений. Оптические зонды, обладая меньшей глубиной проникновения и средней пространственной разрешающей способностью, могут повредить ткани за счет размера зонда, но обладают широким диапазоном измерений pH и минимальным дрейфом при градуировке.

Табл. 6. Сравнение методов определения растворенного кислорода

	Электрохимические сенсоры	Оптические зонды (волокно)	Низкомолекулярные флуоресцентные красители	Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры
Временное разрешение	< 1 с	Секунды	Секунды	Секунды
Пространственное разрешение	От 250 нм	> 50 мкм	Высокое	Высокое
Степень инвазивности измерений	+/-	+/-	-	-
Глубина проникновения	Высокая	Средняя	Низкая	Низкая
Основные преимущества	- Однозначные измерения $pO_2$ в большинстве условий	- Минимальный градуировочный дрейф - Широкий диапазон pH	- Локализация на мелких сосудах или на более крупных участках тканей. - Неинвазивный метод	- Локализация на мелких сосудах или на более крупных участках тканей. - Неинвазивный метод
Недостатки	- Градуировочный дрейф - Загрязнение поверхности электрода	- Сильное повреждение тканей - Обесцвечивание	- Глубина проникновения для измерения глубоких тканей	- Глубина проникновения для измерения глубоких тканей. - Необходимо создание и введение генетической конструкции внутрь клетки/живого организма
Биологические модели	Клетки, сфероиды, Крыса, мышь	Клетки, сфероиды	Клетки	Клетки, <i>Danio rerio</i> , <i>Drosophila</i>

Низкомолекулярные флуоресцентные красители и генетически кодируемые флуоресцентные красители имеют высокую пространственную разрешающую способность, но ограничены по глубине проникновения, так как работают преимущественно на мелких сосудах или поверхностных участках тканей. Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры требуют создания и введения генетической конструкции в клетки или живой организм, что может усложнять их применение.

Таким образом, каждый метод имеет свои сильные и слабые стороны: электрохимические сенсоры полезны при необходимости быстрого и глубокого проникновения, например, в опухолевую ткань, оптические зонды подходят для измерений в условиях широкого диапазона pH, а флуоресцентные красители лучше всего подходят для неинвазивных исследований, но ограничены в глубине проникновения.

### 3.4.2 Последние достижения в области электрохимического обнаружения молекулярного кислорода *in vitro/in vivo*

В данном подразделе рассмотрим более подробно электрохимические подходы обнаружения растворенного кислорода. Самые последние исследования в основном были направлены на разработку новых и улучшение имеющихся электрохимических сенсоров для измерений *in vivo* в головном мозге, а также на изучение глубоких взаимосвязей между концентрацией кислорода и процессами при ишемии, передвижении животного и при анестезии.

МУВ активно используются при измерении концентрации растворенного кислорода в живых системах, однако для повышения селективности и чувствительности МУВ модифицируют с помощью полимерных материалов, мембран и т.п. Например, МУВ были функционализированы нанопористой мембраной из диоксида кремния, которая эффективно защищала поверхность от загрязнений, например, белками, и, в то же время, сохраняла проницаемость для O<sub>2</sub> [173]. При нанесении мембраны соотношение сигнал/шум улучшилось, также повысилась стабильность электрода при длительном его использовании. Способность к загрязнению (выраженная как относительная текущая стабильность в БСА) модифицированного электрода составляла 85% от исходного значения через 60 минут по сравнению с 55% от исходного значения для немодифицированного МУВ через 30 минут.

Функционализированный нанокompозитами на основе металл/азот/углерод (M/N/C (M=Co или Fe) МУВ применялся для электрохимического мониторинга кислорода *in vitro* [174]. Модификацию поверхности МУВ нанокompозитами, которые были получены пиролизом

цеолитного имидазолатного каркаса, осуществляли методом электрофоретического осаждения. Стабильность измерений была подтверждена в присутствии аскорбиновой кислоты, дофамина, серотонина. По итогу с помощью сенсора был измерен базальный уровень  $O_2$  в гиппокампе крысы, который составил  $30 \pm 10$  мкМ ( $n = 3$ ).

Интересное использование микроэлектрода Кларка для измерения церебральной оксигенации описано в работе [175]. В качестве объекта измерения были выбраны бодрствующие мыши. С помощью электрохимических и оптических методов авторы измеряли содержание кислорода в коре головного мозга мышей во время их передвижения. Исследование показало, что активное передвижение приводит к существенному увеличению концентрации кислорода в головном мозге, особенно в тех областях, которые активно участвуют в движении, а также в лобной коре и обонятельной луковице.

За последние несколько лет в области измерения концентрации кислорода *in vivo*, отмечены существенные успехи. В качестве основных трендов можно выделить миниатюризацию сенсоров и модификацию их поверхности материалами, препятствующими загрязнению.

### **3.5. Основные проблемы обнаружения аналитов в биологических системах**

Для локального мониторинга *in vivo* перспективными подходами являются электрохимические методы с применением нано- и микроэлектродов на базе углеродных волокон или стеклянных нано-, и микрокапилляров. Несмотря на давнее использование сенсоров на основе МУВ, сенсоры на базе стеклянных капилляров находятся только в начальной стадии разработки.

Современные технологии позволяют создавать нано- и микроэлектроды на основе стеклянных капилляров, что открывает перспективы для разработки новых сенсоров. Стеклянные нанокapилляры с отверстиями в диапазоне от десятков до сотен нанометров, называемые нанопипетками, уже активно используются [176–180]. В качестве преимущества их использования выступает простота изготовления, небольшие размеры рабочей части и геометрия в виде

иглы. Данные преимущества делают их подходящим инструментом для различных методов сканирующей зондовой микроскопии, включая сканирующую ионно-проводящую микроскопию (СИПМ) и сканирующую электрохимическую микроскопию (СЭХМ) [181–188]. Электрохимические сенсоры на основе нано-, микропипеток хорошо зарекомендовали себя при проведении клеточных экспериментов [189–191].

При разработке сенсоров существует много важных параметров и наиболее важными являются предел обнаружения и чувствительность, которые должны быть достаточными для оценки уровня концентрации рассматриваемых аналитов. Кроме того, селективность должна быть достаточно высокой при наличии электрохимически активных мешающих аналитов в реальном образце особенно в случае *in vivo* измерений.

При проведении электрохимических измерений в биологической среде основная цель состоит в отслеживании концентрации аналитов и проведение мониторинга во времени для понимания процессов, протекающих в живом организме. Для достижения данной цели необходимо убедиться, что во время измерений используются соответствующие средства контроля, а именно исследованы все факторы, вносящие вклад в измерение. Если все проблемы обнаружения будут решены, то возможно будет отслеживать небольшие изменения в концентрации исследуемых аналитов, что, в свою очередь, расширит понимание биологических процессов и позволит выяснить их изменение в случае заболеваний [55].

Когда электрохимическое измерение связано с биологической средой (единичные клетки, ткани, органы, живой организм в целом) требования к точности измерения резко возрастают, поскольку измерительная среда имеет сложный и изменчивый состав.

Существуют три основных фактора, которые могут повлиять на проводимые измерения (Рис. 15). Во-первых, электрод и измерительные устройства, погрешность измерения которых возможно контролировать при измерениях. Важно стремиться максимально уменьшить погрешности

измерения и повысить чувствительность электрода для успешного осуществления биоаналитического мониторинга. Вторым важным, фактором является биологическая среда, состав которой сложно контролировать в процессе изменения. Третьим фактором являются экспериментальные внешние параметры, которые могут влиять как на состав биологической среды, так и на электрод. По сути, это условия, которые были созданы для проведения биоаналитических измерений, и часто они представляют собой физиологические условия [55].

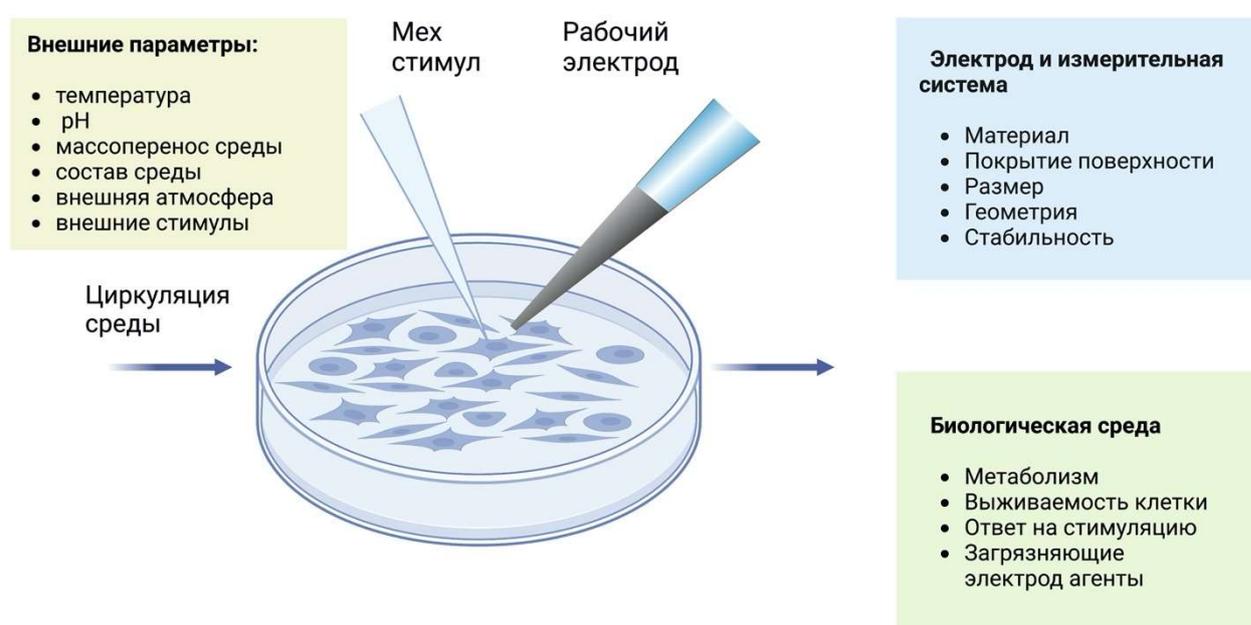


Рис. 15. Факторы, влияющие на электрохимические измерения в биологической среде. На рисунке представлены 3 группы факторов, которые могут оказывать существенное влияние на проведение биоаналитических измерений

Материал электрода играет важную роль в обеспечении селективности, что особенно важно при работе с электрохимически активными веществами, которые часто присутствуют в биологических средах, например, аскорбиновой кислотой или ее метаболитами [192]. Некоторые материалы обладают специфичностью к определенному роду анализам [193]. В целом, можно отметить, что модификация поверхности электрода может дать значительные преимущества при проведении измерений. Это может быть химическое изменение поверхности или нанесение специальных пленок, которые не

позволяют связываться с поверхностью белкам (т.н. antifouling effect). Также на поверхность электрода может быть нанесена газопроницаемая мембрана, которая не пропускает крупные биомолекулы и обеспечивает специфичность определения только газообразных веществ [194].

При проведении измерений в биологической среде полученный электрохимический сигнал обычно преобразуется в концентрацию. Тем не менее, для точного измерения концентрации необходимо, чтобы условия проведения градуировки соответствовали условиям биологической среды. Построение градуировочных зависимостей для измерений *in vitro* проводится в той же среде, что и клетки или ткани. Для измерений *in vivo* часто используют физиологический буфер. Однако добиться совпадения условий биологической среды для градуировки и измерений может быть трудно. В некоторых случаях возможно провести градуировку в биологической среде, что обеспечит наиболее реалистичное отражение точной концентрации [64, 195].

Важность размера и геометрии электрода для проведения электрохимических измерений неоспорима. Данные параметры важны не только для достижения максимальной чувствительности электрода, но и для обеспечения оптимального взаимодействия рабочей части электрода с биологической средой. Особое внимание уделяют форме электрода, которая должна обеспечивать взаимодействие с биологической средой, а размер может быть изменен в зависимости от конкретных условий [55].

Для лучшего понимания высвобождения аналитов из единичной клетки обычно используют электрод с рабочей поверхностью того же диаметра, что и сама клетка. При этом для достижения хорошего пространственного разрешения необходимо, чтобы диаметр электрода был меньше диаметра клетки. При уменьшении диаметра электрода улучшается пространственное понимание компартментов клетки. При измерениях *in vivo* выбор электрода является ключевым фактором не только для обеспечения пространственного разрешения, но и для минимизации повреждения клеток и тканей.

Биологическая среда, как правило, является агрессивной для электрода, и динамично изменяющейся во времени. Одним из важнейших факторов является стабильность электрода. Стабильность электрода обычно снижается с момента начала измерений. Это происходит вследствие присутствующих в биологической среде белков или возникающих в результате электрохимической реакции продуктов, которые образуют пленку, которая имеет высокую адгезию к поверхности электрода. Данная пленка блокирует поверхность электрода и снижает массоперенос аналита к поверхности электрода, что приводит к более медленной кинетике переноса электронов и к снижению сигнала во времени из-за уменьшения доступной поверхности электрода. Для любого измерения, проводимого в биологической среде, стабильность электрода является существенной и важной частью при разработке сенсора [196, 197].

Пленка, образующаяся на поверхности, может обладать электропроводящими свойствами, поэтому при заданном напряжении возникает сторонний отклик электрода. Данный тип пленочной мембраны можно идентифицировать по наличию дополнительных окислительно-восстановительных пиков при вольтамперометрическом определении, которые не будут идентичными для анодного и катодного откликов аналита. Такой тип загрязнения поверхности электрода может оказывать существенное влияние на измерения и, следовательно, может снизить точность измерения [198].

Для FSCV, когда протекает большой емкостной ток, очень небольшие изменения химических и физических свойств электродов или даже колебания ионного состава биологической среды могут вызвать так называемый «дрейф». Такие изменения могут вызвать либо увеличение, либо уменьшение тока с течением времени, что, в свою очередь, может сказаться на точности проведения эксперимента. Существует много типов дрейфа электрода, наиболее распространенным из которых является дрейф, связанный с изменением физических или химических свойств поверхности электрода во время измерений. Эта форма дрейфа часто возникает при превышении потенциала 1 В относительно ХСЭ.

Сам электрод и подключение к потенциостату или иному измерительному оборудованию могут выступать в качестве источника шума. Зачастую основным источником шума являются электрические помехи от сети (50 Гц), который можно устранить соответствующим заземлением всего оборудования или программным способом. Наиболее эффективным способом устранения электромагнитных помех является использование камеры Фарадея, которая представляет собой клетку, изготовленную из тонкого проводящего материала, и защищает от внешних электрических полей. Другой источник шума может быть связан с процессами изготовления электрода. При плохой герметизации между стеклянным капилляром и углеродным микроэлектродом жидкость может просачиваться в капилляр, увеличивая фоновый ток и приводя к дрейфу.

Другим ключевым фактором, который может привести к дрейфу и изменению поведения рабочего электрода, являются характеристики электрода сравнения, которым обычно является хлорсеребряный электрод сравнения. Влияние данного фактора может быть очень важно при измерениях *in vivo*, когда электрод сравнения постоянно имплантируется в ткани. Во всех биологических измерениях электрод сравнения также может быть загрязнен, что может привести к смещению стандартного потенциала. Сдвиг, представляющий собой дрейф напряжения, может повлиять на идентификацию измеряемых аналитов, поскольку они будут смещать окислительно-восстановительный потенциал в ходе биологического измерения.

Частота дискретизации важна при изучении быстрых процессов, поскольку при слишком низкой частоте дискретизации можно пропустить измеренное событие. Поэтому перед измерением важно понять какое временное разрешение потребуется для проведения обнаружения. Например, если исследование заключается в измерении везикулярного высвобождения нейротрансмиттеров из одной клетки, т. е. процесса, происходящего в миллисекундном временном интервале, частота дискретизации должна быть достаточно высокой для получения надлежащего временного разрешения.

### 3.6. Электрохимия на микро и наномасштабе

Микро-, наноэлектроды оказали огромное влияние на электрохимию, как фундаментальную, так и прикладную. Нано-, микроэлектроды представляют собой небольшие электроды, размер которых по крайней мере в одном измерении достаточно мал, чтобы его свойства, зависели от размера. На практике критический размер обычно находится в диапазоне от 0,1 до 50 мкм. В дополнении к аналитическому применению микроэлектроды используются в качестве зондов для СЭХМ [186, 187].

В литературе обычно встречаются микроэлектроды различной геометрии, и основные типы представлены на Рис. 16. Самый простой тип микроэлектрода - это микросфера. Как видно из Рис. 16, микросферические электроды уникальны тем, что все точки на их поверхности полностью эквивалентны, и, следовательно, скорость диффузии не зависит от положения на поверхности. На практике очень трудно изготовить сферы желаемых размеров, и в любом случае идеальная симметрия будет нарушаться из-за необходимости наличия контакта со сферой. На практике чаще используются другие геометрические формы электродов, в частности, микродисковые электроды, которые более просты в изготовлении [199, 200].

Микродисковые электроды используются примерно в 50% всех исследований. Другие распространённые формы включают цилиндры (20%) и массивы (20%), а оставшиеся 10% составляют ленты, кольца и реже встречающиеся сферы, полусферы и более сложные конструкции [199]. Наиболее часто применяемые материалы для подобного рода электродов – это платина, углеродные волокна и золото, хотя также используются ртуть, иридий, никель, серебро. Микродисковые электроды также преобладают поскольку их рабочую поверхность можно механически полировать. Электроды в виде дисков, цилиндров и лент обычно изготавливаются путём герметизации тонкой проволоки или фольги в непроводящем корпусе, например, стеклянном.

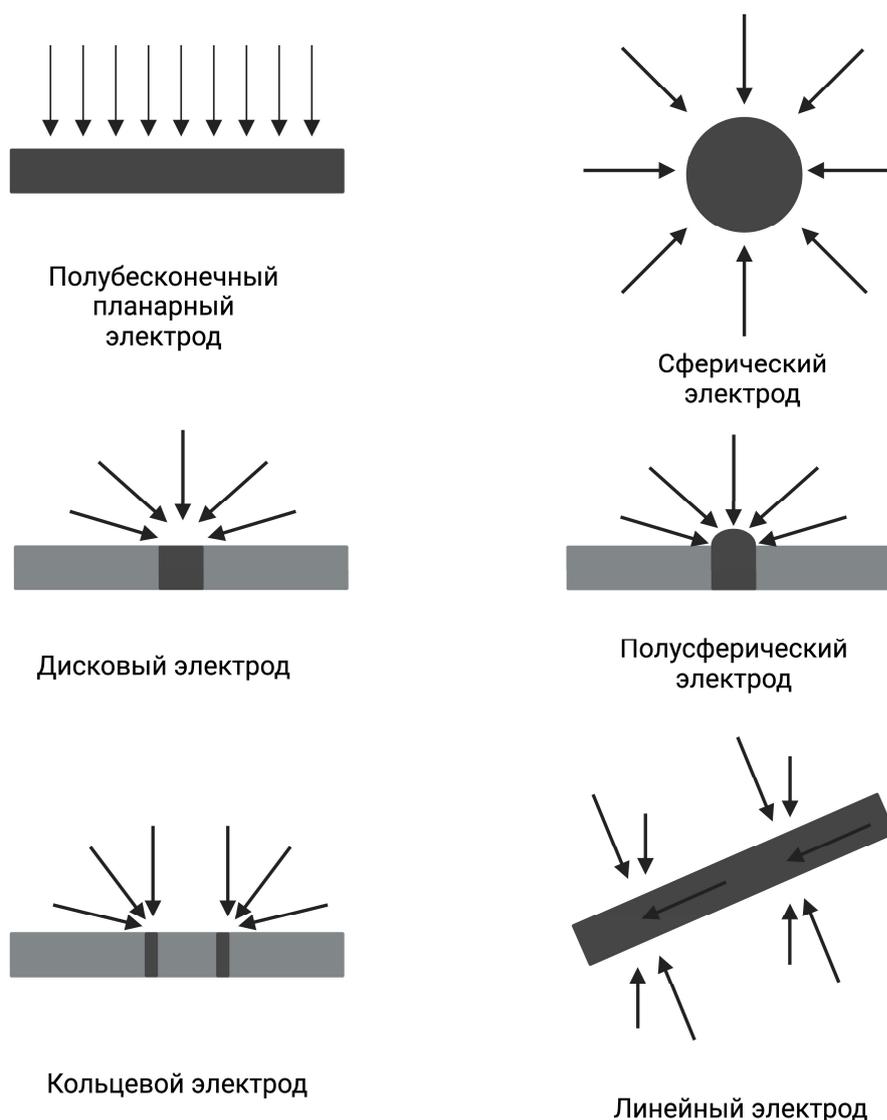


Рис. 16 - Иллюстрация различных типов микроэлектродов и их диффузионных полей (Адаптировано из [200])

Микроэлектроды характеризуются рядом типичных свойств, включая малые токи, стационарные отклики и короткое время реакции. Токи, регистрируемые на микроэлектродах, обычно варьируются от пикоампер до наноампер, что на несколько порядков меньше, чем на традиционных макроэлектродах с радиусом в несколько миллиметров.

Ранее электрохимические измерения были ограничены использованием водных растворов с высокой ионной силой, для снижения омического падения потенциала в растворе между рабочим электродом и электродом сравнения.

Малые токи на микроэлектродах часто полностью устраняют омическое падение потенциала. Поэтому с помощью микроэлектродов стало возможно проводить амперометрические эксперименты в неполярных растворителях, сверхкритических жидкостях.

За счет малых размеров микроэлектрода увеличивается массоперенос в виду сферической/полусферической диффузии. Большая часть как практических, так и теоретических исследований по ЦВ была проведена с использованием электродов дискового типа макроскопических размеров. Для таких электродов транспорт вещества к их поверхности осуществляется преимущественно за счет планарной (плоской) диффузии. Однако при уменьшении радиуса дискового электрода до размеров микроэлектрода толщина диффузионного слоя становится соизмеримой с диаметром самого электрода и диффузионный слой приобретает выпуклую форму. Такой нелинейный процесс диффузии в литературе часто описывается как «радиальная диффузия» [201]. Уменьшение размеров электрода ведет к возрастанию массы потока вещества и, соответственно, его плотности. Фактически, скорость массопереноса к микроэлектроду сопоставима со скоростью на макроэлектроде, вращающемся со скоростью в несколько тысяч оборотов в минуту. В результате поток электрохимически активных частиц к электроду значительно выше, чем при плоской диффузии, характерной для макроэлектродов.

Эффективный перенос массы позволяет наблюдать стационарные отклики в ЦВ. Когда радиальная диффузия становится преобладающим процессом, вольтамперограмма принимает S-образную форму и перестает зависеть от скорости развертки потенциала. S-образные ЦВ, получаемые в таких экспериментах, аналогичны полярограммам, полученным с использованием ртутных капающих или вращающихся дисковых электродов, но наблюдаются в неподвижных условиях.

Еще одной уникальной особенностью микроэлектродов является их способность быстро реагировать на изменения приложенного потенциала. Стационарное состояние достигается очень быстро, часто от микросекунд до

миллисекунд. Поскольку емкостной ток пропорционален площади электрода, то его влияние можно уменьшить, уменьшая размер микроэлектрода. В сравнении с макроэлектродами емкостной ток микроэлектродов минимален, поэтому скорость развертки потенциала может быть довольно высокой. Измерения с помощью микроэлектродов можно производить на очень малых объемах раствора, например, на объеме биологической клетки.

В одних из первых работ по изготовлению микросенсоров очень тонкую металлическую проволоку запечатывали в стеклянный капилляр или эпоксидную смолу с последующим разрезанием перпендикулярно оси проволоки и полировкой поверхности полученного диска в сечении [202, 203]. Хотя микродисковый электрод находится в полусферическом диффузионном поле, следует признать, что невозможно получить однородный поток электрохимически активных частиц (и, следовательно, плотность тока) по поверхности диска. Когда размер диска уменьшается до нескольких микрон, уже через несколько секунд после приложения потенциала к электроду ток приобретает стационарное значение.

В общем, небольшие площади поверхности микроэлектродов определяют малую величину токов, которые должны быть измерены и записаны. В то время как с современными усилителями в сочетании с разумной экспериментальной техникой, например с использованием клетки Фарадея, это не представляет особых проблем.

### **3.6.1 Нанозлектроды. Типы нанозлектродов**

Нанозлектрод - это такой электрохимический интерфейс, размер которого по крайней мере в одном измерении существенно меньше 1 мкм [24]. Большой прогресс в области разработки нанозлектродов наблюдался именно в последнее время, поскольку появилось большое количество недорогих способов изготовления данных электродов [24, 204–207]. Нанозлектроды представляют особый интерес, поскольку имеют вытянутую иглоподобную форму и обладают наноразмерной электрохимической поверхностью, что является обязательным

условием для многих приложений, например, для их использования в сканирующей зондовой микроскопии [208], а также для электрохимического анализа в микролитровых объемах жидкости и для проведения внутриклеточных исследований [24].

В сфере разработки наноэлектродов по-прежнему пользуется огромной популярностью метод лазерного вытягивания, обеспечивающий быстрое изготовление металлических дисковых наноэлектродов. Основным принципом заключается в использовании лазерного пуллера, который нагревает, растягивает и разрывает металлическую проволоку, заранее вставленную внутрь стеклянного или кварцевого капилляра (Рис. 17). В результате получаются два симметричных наноэлектрода на основе нанокapилляров с металлической проволокой внутри, которая сужается к концу вплоть до десятков нанометров. После этого конец наноэлектрода может быть протравлен или механически отполирован для увеличения площади поверхности или для выравнивания поверхности проволоки на конце наноэлектрода. Например, таким способом ранее были изготовлены наноэлектроды из платины, серебра и золота [209–213].

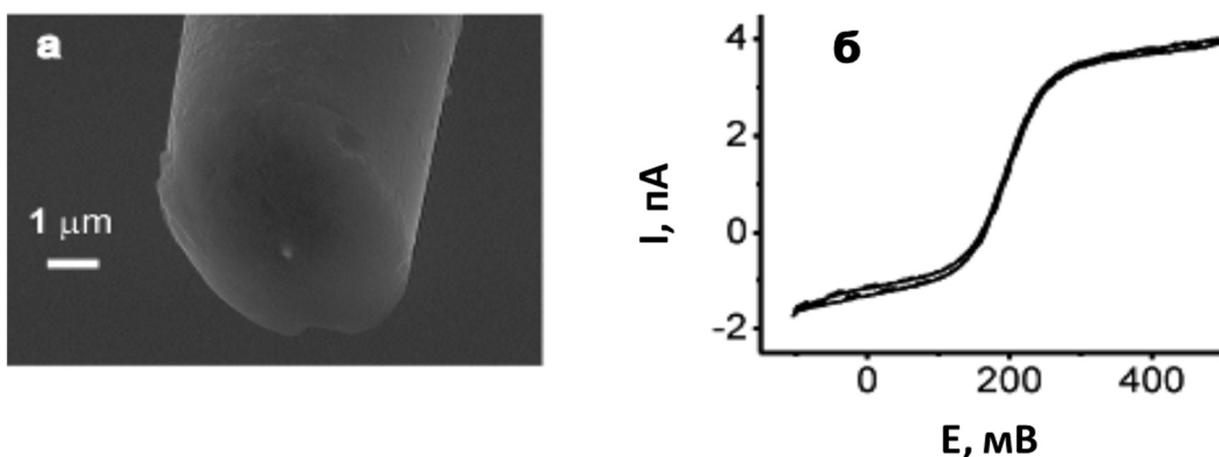


Рис. 17. Характеризация полированного дискового Pt микроэлектрода (а) РЭМ-изображение дискового Pt микроэлектрода. (б) ЦВ дискового микроэлектрода Pt 32 нм в 1 мМ растворе FcMeOH. [213]

Кроме того, наноэлектроды из других металлов, также могут быть получены путем осаждения металла на изготовленный платиновый электрод [214]. Однако наноэлектроды, изготовленные путем лазерного вытягивания

необходимо полировать. Для обеспечения более воспроизводимой полировки был предложен метод запечатывания сверхострого кончика нанокапилляра внутри более крупного стеклянного капилляра. Такой подход привел к успешному изготовлению дисковых наноэлектродов из золота с радиусом всего 5 нм и дисковых наноэлектродов из платины с радиусом до 1 нм [215].

Одним из перспективных методов для полировки конца наноэлектрода является использование фокусированного ионного пучка (ФИП) для формирования ровной поверхности [216].

Существует несколько распространенных методов разработки углеродных наноэлектродов. Наиболее распространенным способом является заполнение конца нанопипетки углеродом путем осаждения его из газовой фазы. Такие электроды обладают наноразмерной дисковой поверхностью на своем конце, которую можно модифицировать различными способами. Группа исследователей под руководством Бау разработала метод создания углеродных наноэлектродов, используя интегрированный протокол изготовления, основанный на химическом осаждении углерода из газовой фазы [217]. Сначала кварцевые капилляры заполняли нитратом железа, который выступал в качестве катализатора при дальнейшем осаждении углерода, капилляры сушили на воздухе, а затем вытягивали с помощью лазерного пуллера. Углерод наносили на каталитическую поверхность путем пиролитического осаждения из смеси метана/ аргона при температуре выше 800°C, затем часть стеклянного конца нанокапилляра протравливали. Варьируя условия напыления, внешний диаметр углеродного наноэлектрода варьировался в диапазоне от 10 до 100 нм с разной длиной. Данные углеродные наноэлектроды можно использовать для исследований на уровне единичных клеток. Также сообщалось о влиянии изменения условий изготовления на структуру стенок и химию поверхности углеродных наноэлектродов [218]. Если проводить осаждение углерода в течение более продолжительного времени, то конец нанокапилляра можно заполнить полностью и получить дисковый углеродный электрод. Данный подход позволяет получить углеродные наноэлектроды с диаметром от 50 до 400

нм. Нанoeлектроды данного типа были успешно использованы для обнаружения высвобождения дофамина у личинок дрозофилы [219].

Существует альтернативный способ производства углеродных нанoeлектродов, основанный на пиролитическом разложении углеводородов без необходимости использования катализаторов. Суть метода заключается в закреплении кончика нанокапилляра внутри другого капилляра, с последующим заполнением нанокапилляра смесью пропан-бутановой смеси. После этого метан подвергается пиролизу при высокой температуре, приводя к осаждению углерода как на внутренней, так и на внешней поверхности нанокапилляра. Данный подход обеспечивает возможность регулирования диаметра отверстия кварцевого нанокапилляра и толщины углеродного слоя. Таким образом, были созданы дисковые углеродные нанoeлектроды с радиусами от 5 до 200 нм [220]. В результате такого процесса, при различной длительности осаждения, можно получать углеродные нанoeлектроды с разными толщинами слоя, включая закрытые углеродные каналы с полостью нанометрового размера на конце. Этот тип нанoeлектрода можно использовать в качестве наносэмплера [221] и наносенсора для аналитических задач [222].

УНТ привлекают большое внимание благодаря своим уникальным структурным и электрическим свойствам. ОУНТ могут использоваться в качестве нанoeлектрода для электрохимии. Для этого обычно ОУНТ выращивают методом газофазного осаждения на подложке [223]. Нанoeлектроды на основе одной УНТ также могут быть изготовлены путем прикрепления одной многостенной углеродной нанотрубки (МУНТ) к вольфрамовому зонду или углеродному волокну

Недавно группа Гогоци разработала эндоскоп на основе УНТ для внутриклеточного зондирования [224]. В своем исследовании МУНТ помещали на кончик стеклянной пипетки с использованием проточного метода. Внутренняя часть стеклянной пипетки покрыта проводящей эпоксидной смолой, а внешняя — изоляционным. Данные эндоскопы на основе УНТ могут проникать через мембрану клетки без значительного нарушения клеточной структуры

благодаря своим небольшим размерам и высокой механической прочности, и могут быть использованы для проведения наноинъекций.

Таким образом, нанозлектроды на основе углеродных материалов выступают в качестве платформы для разработки сенсоров. Углеродную поверхность легко модифицировать металлами (Cu, Ag, Au, Pt), причем аморфный углерод обладает электропроводящими свойствами, что можно использовать для подвода контактов к электроду.

### **3.7. Электрохимические методы для проведения измерений**

#### **3.7.1 Характеризация нанозлектродов электрохимическими методами**

Вольтамперограмму, зарегистрированную при изменении потенциала сначала в прямом, а затем в обратном направлении, называют циклической. На ней, как правило, фиксируются два пика – катодный и анодный. ЦВ широко используются в электрохимии для характеристики электродов. FcMeOH активно используют в качестве медиатора электронного транспорта, поскольку не адсорбируется на поверхности рабочего электрода в процессе окисления и скорость процесса контролируется исключительно массопереносом.

Типичная электрохимическая реакция включает перенос заряда между электродом и веществом в растворе. Весь процесс включает ряд этапов, включая перенос электронов на поверхности электрода и массоперенос в растворе. Скорость переноса электронов зависит от напряжения электрода через экспоненциальную зависимость. Таким образом, ток также увеличивается экспоненциально за счет увеличения потенциала электрода. Увеличение тока ограничивается массопереносом как реагента, так и продукта реакции.

Если рассматривать случай макроэлектрода, то по мере изменения потенциала на поверхности электрода снижается локальная концентрация частиц, и скорость переноса электрона становится намного больше, чем скорость диффузии аналита к электроду. Пример обратимого восстановления ферроцена ( $\text{Fc}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Fc}$ ) показан на Рис. 18.

Когда изменение потенциала находится в диапазоне от А до D,  $\text{Fc}^+$  восстанавливается до  $\text{Fc}$  на поверхности электрода, что приводит к уменьшению содержания  $\text{Fc}^+$  вблизи электрода. При катодном токе (С) лимитирующим процессом является диффузия дополнительных  $\text{Fc}^+$  из объема раствора к поверхности электрода. По мере продолжения увеличения потенциала слой с уменьшенной концентрацией  $\text{Fc}^+$  на поверхности электрода (диффузионный слой) продолжает расти, замедляя массоперенос дальнейшего количества  $\text{Fc}^+$  к поверхности электрода и, следовательно, уменьшается измеряемый ток (С → D). Когда потенциал изменяется в обратную сторону (D → G) концентрация  $\text{Fc}^+$  на поверхности электрода уменьшается, но концентрация  $\text{Fc}$  увеличивается.  $\text{Fc}$  на поверхности окисляется обратно в  $\text{Fc}^+$ .

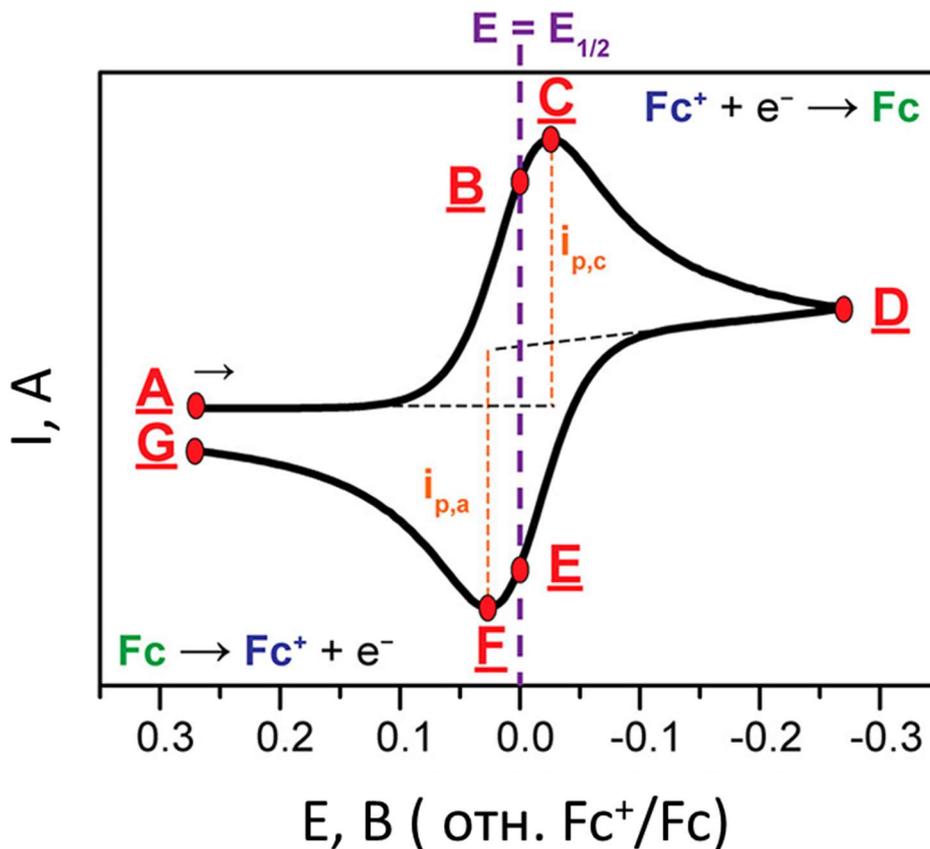


Рис. 18. Вольтамперограмма обратимого восстановления 1 мМ раствора  $\text{Fc}^+$  до  $\text{Fc}$  при скорости развертки потенциала  $100 \text{ мВ с}^{-1}$  на макроэлектроре [225]

Уравнение Нернста описывает отношение между потенциалом электрода к относительной активности окисленных (Ox) и восстановленных форм (Red) при равновесии:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}}$$

где  $E^0$  – стандартный электродный потенциал,  $R$  – газовая постоянная,  $T$  – температура,  $n$  – число электронов, участвующих в окислительно-восстановительной реакции,  $F$  – постоянная Фарадея.

Используя уравнения Нернста, к примеру выше и заменяя стандартный электродный потенциал  $E^0$  на формальный электродный потенциал  $E^{0'}$ , число электронов участвующих в окислительно-восстановительной реакции  $n = 1$ , получаем следующее уравнение.

$$E = E^{0'} + 0,059 * \log \frac{[Fc^+]}{[Fc]}$$

Формальный потенциал определяется точкой, в которой поверхностные концентрации  $Fc^+$  и  $Fc$  равны. Это также может быть измерено как средний потенциал точек С и F [226].

При проведении экспериментов с использованием ЦВ с ультрамикро и наноэлектродами наблюдается сигмоидальный отклик по сравнению с электродами макромасштаба, где видна характерная форма ЦВ в форме пика (Рис. 19).

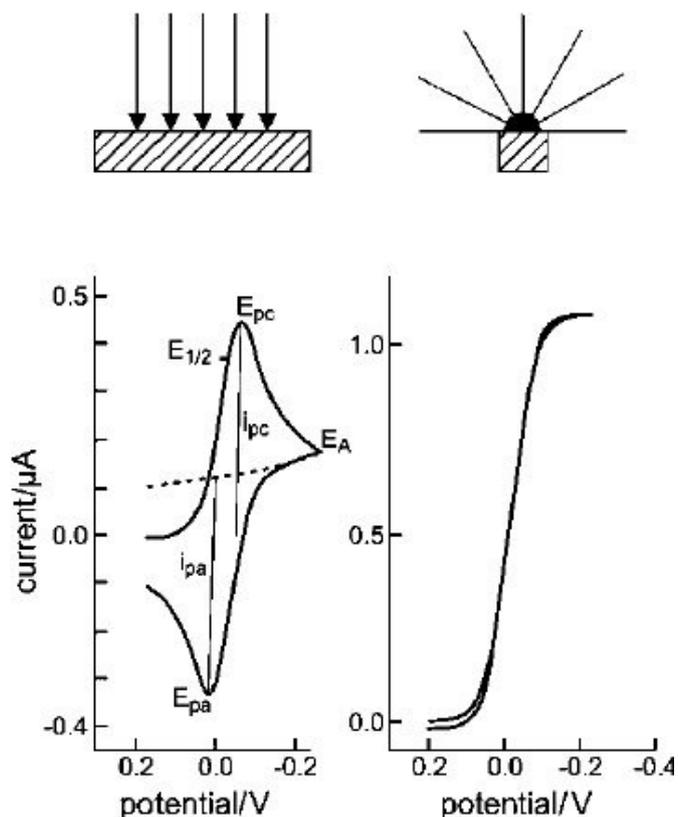


Рис. 19. Сравнение ЦВ для макро(слева) и микроэлектродов (справа) [227]

Диффузионный слой на макроэлектроде, где концентрация анализируемого вещества ниже, чем в объеме раствора, обычно плоский (за исключением краев электрода) и равномерно распределен по поверхности макроэлектродов. Толщина слоя составляет малую долю радиуса электрода. В этой ситуации говорят о линейной диффузии анализируемого вещества к поверхности электрода. На поверхности микроэлектрода за один и тот же интервал времени толщина диффузионного слоя может превышать радиус электрода, и, в результате диффузия к поверхности электрода сферическая (радиальная). В таком слое перенос анализируемого вещества к поверхности электрода происходит значительно быстрее, а плотность тока на поверхности электрода намного больше.

### 3.8. Заключение к литературному обзору

В настоящее время в биотехнологии микро и наноэлектроды представляют собой актуальную область исследований. Наноэлектроды демонстрируют уникальные свойства, которые позволяют осуществлять высокочувствительное и малоинвазивное обнаружение различных химических аналитов (дофамин, кислород, АФК и т. д.) в сложных биологических средах, в т.ч. в живых организмах. В данном литературном обзоре были рассмотрены основные аспекты использования наноэлектродов для мониторинга химических процессов внутри живых систем.

Подход с использованием микро и наноразмерных сенсоров позволяет в реальном времени изучать динамику уровней клеточных метаболитов, что дает исследователям уникальную возможность получить огромное количество информации о биохимических процессах.

Тем не менее, несмотря на обширные преимущества, электрохимические методы обладают определенными ограничениями. Необходимость миниатюризации может привести к сложностям в изготовлении и манипулировании такими электродами. Кроме того, сложности в стабильной и долгосрочной работе в биологических средах могут повлиять на надежность и воспроизводимость результатов. Помимо этого, интерпретация полученных данных требует тщательного анализа, учета влияния окружающих факторов.

В итоге, несмотря на вызовы и ограничения, использование наноэлектродов как инструмента для обнаружения химических аналитов в биологических системах предоставляет уникальную возможность для изучения механизмов заболеваний и разработки новых лекарственных препаратов.

## 4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 4.1. Материалы

В работе использовали:

Для изготовления наноэлектродов в качестве заготовок использовали:

- Капилляры, выполненные из кварцевого стекла, с внутренним диаметром 0,6 или 0,9 мм, внешний диаметр капилляра 1,2 мм, длина 7,5 см (Sutter, США)

В работы были использованы следующие растворы:

- Фосфатный буфер (0,01М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,137 М  $\text{NaCl}$ ; 0,0027 М  $\text{KCl}$ ), рН 7,4 (ПанЭко, Россия) – буфер для проведения биологических экспериментов;
- Раствор Хэнкса ( 135 мМ  $\text{NaCl}$ ; 5 мМ  $\text{KCl}$ ; 0,01 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5 мМ  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ; 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4 мМ  $\text{MgSO}_4$ ; 0,4 мМ  $\text{NaHCO}_3$ ), рН 7,4 (ПанЭко, Россия) – буфер для проведения биологических экспериментов;
- 0,1 М  $\text{KCl}$  (Химмед, Россия) – фоновый электролит;

В работе были использованы следующие кислоты и основания:

- 0,1 М  $\text{NaOH}$  в 0,01 М раствора  $\text{KCl}$  – раствор травления углеродной поверхности;
- 0,1 М  $\text{HCl}$  (Химмед, Россия);
- 0,1 М  $\text{HClO}_4$  (Merck, США) – компонент раствора для осаждения пероксида водорода;
- 2 мМ раствор  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  (Aldrich, США) – раствор для осаждения платины на поверхность наноэлектродов;

Для изготовления и подготовки наноэлектродов были использованы:

- Пропан-бутановая смесь (Castolin, Франция);
- Кислород (объемная доля аргона 99,95%) (PRO Кислород, Россия);
- Аргон (объемная доля аргона 99,993%) (НИИ КМ, Россия);
- Газовая горелка (Castolin, Франция);

- 1 мМ свежеприготовленного раствора FcMeOH (Aldrich, США) в фосфатном буфере;
- Ряд свежеприготовленных растворов цис-диамминдихлороплатина(II) (цисплатина) в воде (Sigma-Aldrich, 479306) с различной концентрацией;
- Ряд свежеприготовленных растворов пероксида водорода с различной концентрацией (от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М), разбавленных в фосфатно-солевом буфере были использованы для градуировки изготовленных платиновых наноэлектродов;
- Раствор глюкозооксидазы в фосфатном буферном растворе (5 мг/мл) (Sigma, США);
- 0,01%-ный раствор полилизина (Sigma, США)
- Дофамина гидрохлорид, серотонин (Sigma, США)

В работе для работы с клетками и сфероидами были использованы следующие материалы и реагенты:

- культуры клеток НЕК 293 (Клетки эмбриональной почки человека), РС3 (аденокарцинома предстательной железы без экспрессии ПСМА), 22Rv1 (аденокарцинома предстательной железы с экспрессией ПСМА), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), MCF-7 (аденокарциномы протоков молочной железы человека);
- среду DMEM/F12 для культивирования клеток (Gibco, США),
- ДМСО (Химмед, Россия)
- 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид (МТТ-реагент) (Thermo Fisher Scientific, США);
- флуоресцентный зонд CellROX Deep Red (Thermo Fisher Scientific, США);
- флуоресцентный зонд DCFDA (Thermo Fisher Scientific, США);
- краситель для ядер Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, США);

- агароза (BioReagent, для молекулярной биологии) для формирования сфероидов;
- 35 мм пластиковые чашки Петри (Corning, США);
- 96-луночные планшеты (Corning, США);

В работе с нейтрофилами были использованы:

- Физиологический раствор (0,137 М NaCl и 0,0027 М KCl, pH 7,35);
- ФИКОЛЛ-400 (Serva) и тразограф (Unique Pharmaceutical Labs);
- Пропидиум иодид (Thermo Fisher Scientific, США);

## 4.2. Оборудование

### 4.2.1 Изготовление нанокапилляров с использованием лазерного пуллера

Для изготовления нанокапиллярных электродов использовали кварцевые заготовки длиной 75 мм с внутренним и внешним диаметром 0,9 мм и 1,2 мм соответственно. Данные заготовки вытягивали на лазерном пуллере (Sutter, США), в результате чего получали два нанокапилляра с диаметром отверстия порядка 60–500 нм.

CO<sub>2</sub>-лазер выступал в качестве нагревательного элемента для плавления стекла (борсиликатного или кварцевого) и дальнейшего получения нано (микро) капилляров с острым концом с одной стороны. Пуллер представляет собой устройство с микропроцессорным управлением, которое позволяет осуществлять контроль при вытягивании кварцевых заготовок. В ходе изготовления возможно варьировать 5 параметров, которые можно регулировать при изготовлении нанокапилляров.

1. HEAT определяет выходную мощность лазера (количество энергии, подаваемой на стекло).
2. FILAMENT (FIL) определяет фокусировку лазерного луча, размер нагреваемой области.
3. VELOCITY (VEL) указывает на скорость, при которой должна быть перемещена планка до того, как будет выполнено жесткое натяжение.

4. PULL параметр контролирует силу вытягивания. Как правило, чем выше PULL, тем меньше диаметр конца пипетки и тем длиннее конус пипетки.
5. Параметр DELAY контролирует время между выключением HEAT и включением тяги PULL. Чем выше значение DEL, тем холоднее будет стекло при выполнении PULL. Таким образом, увеличение DELAY приводит к уменьшению длины конуса и увеличению диаметра конца.

Общий принцип работы заключается в том, что кварцевую заготовку, представляющую собой стеклянную трубку длиной 75 мм, полую внутри, фиксируют в держателях лазерного пуллера, закрепляя с помощью винтового механизма. Далее производят подбор параметров вытягивания, регулируя температуру лазера (мощность нагрева), фокусировку лазера, приложенную силу и скорость движения механизма, растягивающего закрепленный капилляр в противоположные стороны.

После нажатия кнопки Pull, включается лазер, происходит нагревание участка стеклянного капилляра и с помощью механизма осуществляется дальнейшее движение двух держателей, растягивающих закрепленный капилляр, в противоположные стороны. Таким образом, получают 2 одинаковых нанокапилляра.

#### 4.2.2 Электрохимическое оборудование

В экспериментах была использована электрохимическая установка, позволяющая измерять сверхмалые токи порядка 1 пА. Данная установка собрана на базе инвертированного оптического микроскопа Nikon Ti-U (Nikon, Япония), которая состоит из следующих элементов (Рис. 20):

- АЦП-ЦАП преобразователь Axon Digidata 1550B (Molecular Devices, США);

Система сбора данных Axon Digidata 1550 представляет собой АЦП/ЦАП и имеет высокое разрешение по амплитуде и является АЦП с низким уровнем шума. С помощью данного устройства происходит оцифровка и дальнейшая передача сигнала на ПК.

- Patch-clamp усилитель тока Axon MultiClamp 700B (Molecular Devices, США);

MultiClamp 700B - это многофункциональный усилитель, обеспечивающий фиксацию тока или потенциала, контроль которого осуществляется непосредственно с помощью компьютера. Усилитель MultiClamp 700B поддерживает до двух первичных предусилительных головок CV-7B. Каждая предусилительная головка CV-7B содержит преобразователь тока в напряжение для режима фиксации напряжения. MultiClamp 700B является аналоговым прибором ввода / вывода. На передней панели имеет несколько BNC входов/выходов необходимых для связи с интерфейсом АЦП, осциллографом или другим записывающим устройством.

- Инвертированный оптический микроскоп Nikon Ti-U (Nikon, Япония);

Инвертированный оптический микроскоп выступает в качестве базы для проведения клеточных экспериментов. Оптический микроскоп Nikon был использован с различными функциональными возможностями, предназначенный для получения оптических изображений биологических образцов и проведения позиционирования нанозлектрода на выбранный объект для последующего проведения внутриклеточных измерений. Микроскоп оборудован объективами с увеличениями 10x, 40x и 100x, камерой, которая обеспечивает передачу данных в режиме реального времени на компьютер, позволяя получать изображения биологических образцов с высоким разрешением. Особенностью этого микроскопа является наличие управляемой системы освещения для флуоресцентной микроскопии CoolLed pE-300. Эта система обеспечивает широкий спектр освещения, охватывающий полосы возбуждения обычных флуорофоров, таких как DAPI, CFP, Aqua, FITC, TRITC, TxRed, Cy5 и других.

- Микроманипулятор PatchStar (Scientifica, США);

Scientifica PatchStar — это моторизованный манипулятор для проведения электрофизиологических исследований с высокой стабильностью положения рабочей головы. Разрешение на уровне 20 нм обеспечивает абсолютную точность в позиционировании.

- Компьютер с установленной программой pCLAMP 9 и с установленным программным обеспечением для управления и обработки данных;
- Стол для подавления посторонних вибрация (SuperTech, Венгрия).

Все потенциалы, за исключением экспериментов, для которых условия эксперимента приведены в тексте, указаны относительно хлорсеребряного электрода сравнения  $\text{Ag}|\text{AgCl}|1\text{M KCl}$ .

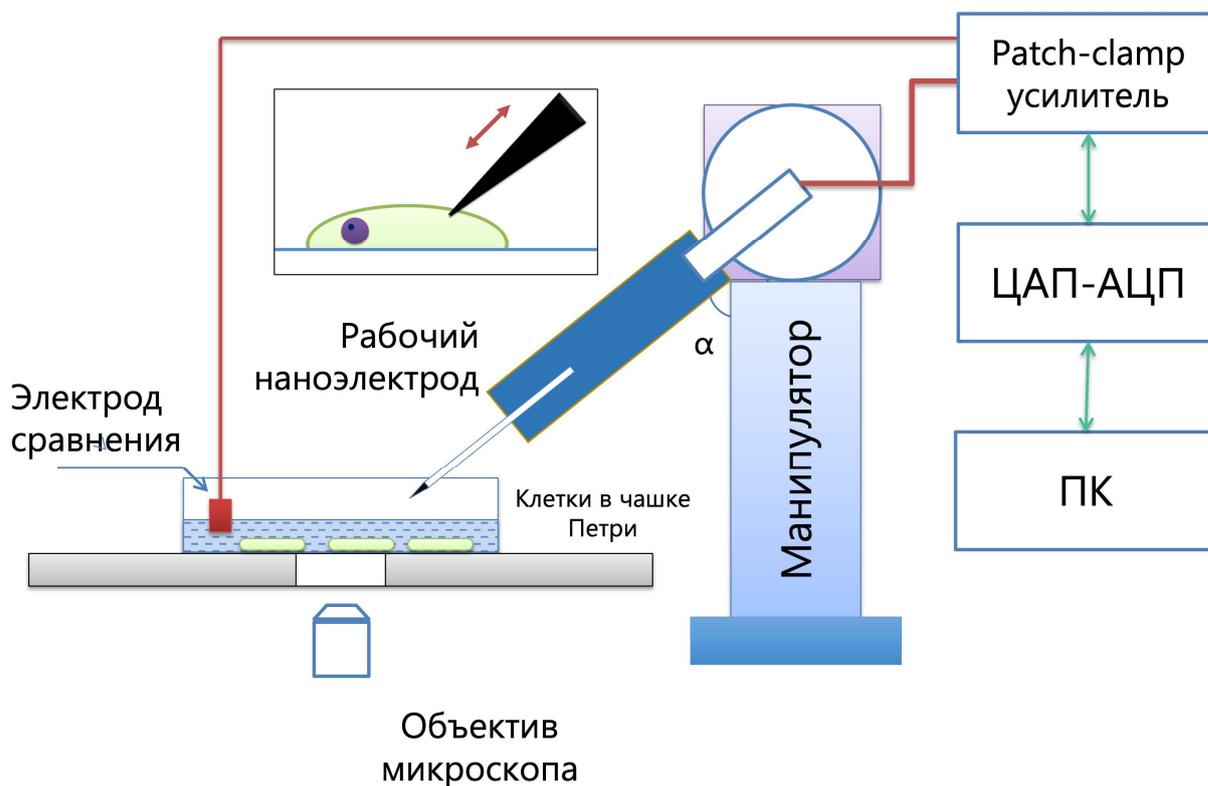


Рис. 20. Схема электрохимической установки для проведения экспериментов, включающей в себя манипулятор, усилитель тока, ЦАП-АЦП, ПК, оптический микроскоп. Показано проведение клеточного эксперимента.

#### 4.2.3 Растровая электронная микроскопия

Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) (JSM-6610LV, JEOL, Япония) использовали для определения физического размера кончика

нанозлектрода. Используемые параметры и режимы: ускоряющее напряжение - 30 кВ, диаметр 9 мм, увеличение от 220 до 37000 крат.

#### **4.2.4 Спектроскопия комбинационного рассеяния**

Съемку спектров осуществляли на рамановском конфокальном микроскопе Thermo DXR (США), который оснащён 2 полупроводниковыми лазерами с длиной волны 532 и 780 нм и максимальной мощностью 10 мВт и 24 мВт соответственно, фокусное расстояние 250 мм, размер пятна лазера 1 - 300 мкм.

### **4.3. Методы:**

#### **4.3.1 Изготовление углеродных нанозлектродов**

Для изготовления углеродных электродов использовали кварцевые заготовки с внутренним и внешним диаметром 0,9 мм и 1,2 мм соответственно. Данные заготовки вытягивали на лазерном пуллере (Sutter, США), в результате чего получали два нанокпилляра с диаметром отверстия порядка 60-500 нм (Рис. 21А).

Внутри изготовленных нанокпилляров осаждали пиролитический углерод посредством термического разложения пропан-бутановой смеси в бескислородной среде. Нанокпилляр заполняли пропан-бутановой смесью через резиновую трубку, плотно прилегающую к широкому концу кварцевого нанокпилляра под давлением 0,2 кПа. Затем острый конец нанокпилляра вводился в аналогичную кварцевую заготовку соответствующего размера. Через эту заготовку производилась подача ламинарного потока аргона под давлением 0,2 кПа. Далее, поступательным движением от острого конца нанокпилляра, производилась термическая обработка с использованием газовой горелки на расстоянии 1 см в течение 15 секунд.

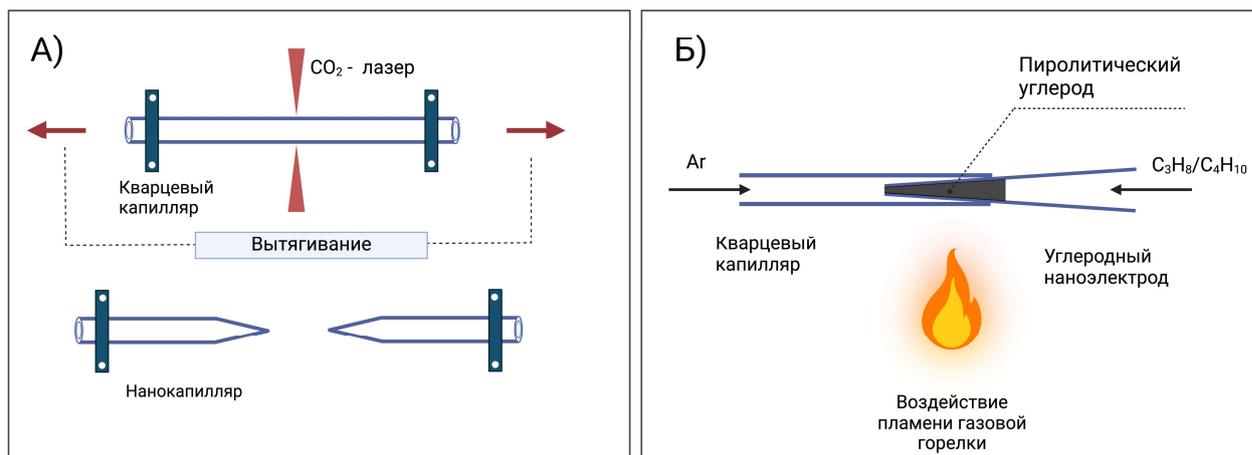


Рис. 21. Принципиальные схемы изготовления кварцевых капилляров и углеродных нанoeлектродов. А) Схема изготовления кварцевых нанокapилляров с помощью лазерного пуллера. Продемонстрирован процесс вытягивания капилляра при нагревании CO<sub>2</sub>-лазером. Б) Схема изготовления углеродных нанoeлектродов методом пиролитического осаждения углерода внутрь кварцевых нанокapилляров.

#### 4.3.2 Апробация работы нанокapиллярного углеродного сенсора и построение градуировочных графиков по дофамину

Концентрацию дофамина в растворе определяли методом FSCV с последующей градуировкой нанокapиллярного сенсора. Для этого готовили свежеприготовленные стандартные растворы дофамина с концентрациями (0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10 мкМ). Записывали FSCV с линейной разверткой потенциала: удерживаемый потенциал -0,4 В, раз в 100 мс потенциал увеличивался в течение 4,25 мс до 1,3 В, затем уменьшался в течение 4,25 мс до -0,4 В. Скорость развертки составила 306 В/с. После записи 100 вольтамперограмм в каждом приготовленном растворе FSCV, вольтамперограммы обрабатывали, вычитали емкостной ток из ЦВ и рассчитывали высоту пика окисления дофамина с помощью программного обеспечения Origin 2021, строили градуировочный график – зависимость величины высоты пика в измеренном растворе от концентрации раствора.

#### 4.3.3 Методика травления нанокapиллярного углеродного сенсора

С целью увеличения чувствительности и уменьшения предела обнаружения углеродные нанокapиллярные электроды предварительно были протравлены в 8,3%-ном растворе плавиковой кислоты. Для этого углеродный

капилляр закрепляли в держателе микроманипулятора и опускали его конец в раствор плавиковой кислоты. В качестве варьируемого параметра было выбрано время травления: выбирали фиксированный интервал времени травления, после чего электрод был электрохимически охарактеризован в 1 мМ растворе FcMeOH. Дополнительное травление углеродных наноэлектродов в плавиковой кислоте было необходимо для увеличения площади поверхности наноэлектрода и повышения их чувствительности по отношению к дофамину.

#### 4.3.4 Изготовление платинового нанокapиллярного электрода

Для изготовления платинового нанокapиллярного электрода в качестве основы использовали углеродный нанокapиллярный электрод. Электрохимический метод был использован для создания полостей в углеродных наноэлектродах с последующим осаждением платины [228–230]. В водном растворе, содержащем 0,1 мМ NaOH и 10 мМ KCl, осуществляли электрохимическое травление поверхности углеродного электрода. Наноэлектрод и электрод сравнения погружали в вышеуказанный раствор. На электрод подавали линейную развертку симметричной V-образной формы с амплитудой 1.5 - 2 В (10-50 циклов). Скорость развертки составила 400 мВ/с. Возрастание амплитуды тока с каждым последующим циклом свидетельствовало об увеличении тока, протекающего через наноэлектрод, и, соответственно, увеличению площади поверхности углерода в кончике кварцевой трубки.

Далее на протравленный электрод производили осаждение платины в режиме ЦВ от 0 до -0,8 В (скорость развертки 200 мВ/с) в 2 мМ растворе  $H_2PtCl_6$ . Количество циклов осаждения варьировали в зависимости от начального диаметра диска углеродного наноэлектрода. Основным критерием успешности осаждения платины на кончик углеродного наноэлектрода считалось увеличение предельного диффузионного тока электрода.

#### 4.3.5 Апробация работы и градуировка платинового нанокapиллярного электрода по пероксиду водорода

Концентрацию АФК, а именно пероксида водорода, оценивали при потенциале +800 мВ отн. ХСЭ. При данных условиях протекает реакция окисления пероксида водорода, которая катализируется платиной. Поскольку супероксид радикал довольно быстро ( $10^{-6}$  с) превращается в растворе в пероксид водорода, то суммарная концентрация пероксида водорода определяет общий уровень окислительных процессов, протекающих в клетке.

Перед измерениями в биологических системах каждый платиновый электрод градуировали с использованием ряда стандартных растворов  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-7}$ ;  $5 \cdot 10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $5 \cdot 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  М), строили градуировочный график.

#### 4.3.6 Характеризация углеродных и платиновых нанoeлектродов с использованием электрохимических методов

Основным способом для характеристики нанoeлектродов была ЦВ в двухэлектродной ячейке. Электрод, подключенный к системе, и ХСЭ помещали в 1 мМ раствор ферроцен метанола, записывали ЦВ с линейной разверткой от -800 мВ до 800 мВ со скоростью развертки 400 мВ/с. ЦВ были обработаны и определен предельный диффузионный ток ( $I_{ss}$ ) для каждого изготовленного электрода. Данный параметр определяли как разницу значений тока между плато значений тока при потенциалах от 400 мВ до 700 мВ и значениями тока при 0 мВ. На Рис. 22 показан способ определения предельного диффузионного тока ( $I_{ss}$ ).

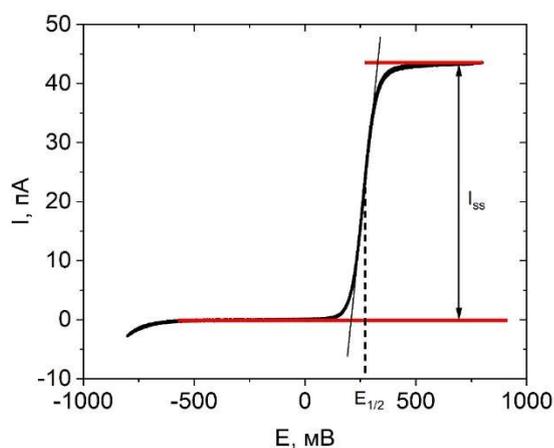


Рис. 22. ЦВ микроэлектрода в 1 мМ FcMeOH. Скорость развертки потенциала 400 мВ/с.

#### **4.3.7 Характеризация нанозлектродов с использованием сканирующей электронной микроскопии**

Для оценки физических размеров углеродных/платиновых нанозлектродов использовали растровый электронный микроскоп JSM-6610LV (Jeol). Используемые параметры и режимы: высота столика с образцами 37 мм, рабочее расстояние 40 мм, ускоряющее напряжение — от 10 до 30 кВ, увеличение от X50 до X45000. Съемку образцов осуществляли с регистрацией вторичных (топографический контраст) и обратно отраженных электронов (композиционный контраст). На внутреннюю поверхность бортика крупного держателя образцов (32 x 10 мм) была наклеена полоса двустороннего углеродного скотча, к которой впоследствии прикрепляли нанозлектроды в вертикальном положении. Во избежание накопления отрицательного заряда в приповерхностной области во внутрь каждого электрода была вставлена медная проволока (контактирующая с углеродом), второй конец которой крепился к поверхности держателя образцов проводящим скотчем.

#### **4.3.8 Характеризация нанозлектродов с использованием спектроскопии КР**

Спектры КР были сняты с углеродных микроэлектродов. Углеродные микроэлектроды фиксировали горизонтально на покровном стекле, при этом лазер тщательно фокусировался на конце наконечника, откуда были получены спектры КР. Спектры были получены с накоплением 100 с максимальной выходной мощностью лазера 20 мВт.

#### **4.3.9 Подготовка полимерных наночастиц супероксиддисмутазы**

Исходные растворы СОД1, протамина и PGlu-PEG (по 5 мг/мл каждого) были приготовлены в PBS, pH 7,4, содержащей 0,137 М NaCl. Исходные растворы глутарового альдегида (0,5%) и NaBH<sub>4</sub> (1 мг/мл) были приготовлены в воде непосредственно перед экспериментами. Все растворы добавляли друг к другу по каплям при перемешивании. Сначала раствор протамина добавляли к раствору СОД1 для достижения конечного соотношения зарядов СОД1/поликатион 1:2 ионогенных групп, и полученный раствор инкубировали

при комнатной температуре в течение 30 мин при перемешивании. Соотношение зарядов рассчитывали, как отношение концентрации групп  $\text{NH}_2$  протамина, протонированного при pH 7,4, к концентрации групп  $\text{COOH}$  остатков глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты фермента (оценивалось с помощью программного обеспечения Protein Calculator v.3.3, Scripps Research Institute, США). Затем к раствору комплекса СОД1/протамин добавляли раствор PGlu-PEG при конечном соотношении зарядов поликатион/полианион 1:1, и реакционная смесь инкубировали в течение 30 мин при 4 °С без перемешивания. Затем добавляли раствор глутарового альдегида для достижения конечного молярного соотношения сшивающего агента к аминок группам протамина 4,4:1. Полученную смесь затем инкубировали в течение ночи при 4 °С, образованные связи основания Шиффа восстанавливали  $\text{NaBH}_4$ . Для удаления побочных продуктов и избытка непрореагировавших реагентов реакционную смесь разбавляли в 4 раза PBS или 10 мМ HEPES и центрифугировали на 100 кДа фильтрах Amicon при  $800 \times g$ , 4 °С. Процедуру повторяли дважды. Очищенные образцы доводили до удельной активности SOD1 13 500 U (по пирогаллолу) на мл, хранили при 4 °С и использовали в экспериментах на животных.

#### **4.3.10 Подготовка клеточных культур к проведению экспериментов.**

Для проведения клеточных экспериментов использовали ряд клеточных линий 22 RV1, PC-3, MCF-7, HepG2, HEK 293. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 50 мг/мл пенициллина, 0,05 мг/мл стрептомицина (Gibco) и GlutaMAX (Gibco). В инкубаторе поддерживалась температура 37°C и газовая атмосфера с 5%  $\text{CO}_2$ .

#### **4.3.11 Методика изготовления сфероидов**

В качестве методики культивирования сфероидов был использован метод культивирования на неадгезивной поверхности. Для создания неадгезивной поверхности использовали агарозу. Для этого 1,5%-ный водный раствор агарозы нагревали на водяной бане при температуре 96°C в течение 15 минут для растворения агарозы и стерилизации раствора. Расплавленную агарозу быстро

переносили на предварительно нагретые 96-луночные планшеты по 50-100 мкл, после чего оставляли планшеты остывать при комнатной температуре в течение 15 минут. В результате в лунках формировался агарозный гель U-образной формы, который предотвращал адгезию клеток ко дну планшета и способствовал их агрегации в центре. Далее в зависимости от эксперимента суспензию клеток добавляли в каждую лунку. Количество клеток на лунку зависело от эксперимента и варьировалось от 4000 до 16000. После формирования сфероидов на третий день сфероиды переносили в чашку Петри в количестве 10 шт и оставляли на 12 ч для обеспечения наилучшей адгезии с поверхностью чашки Петри для проведения дальнейших электрохимических измерений.

#### **4.3.12 Определение уровня АФК с помощью флуоресцентного зонда CellROX Red**

Оценку внутриклеточных АФК проводили с использованием коммерчески доступного флуоресцентного зонда CellROX Deep Red (ThermoScientific, США). Клетки рака предстательной железы PC-3 в количестве  $5 \times 10^3$  высевали в 96-луночные планшеты (Corning, США) и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки инкубировали с 2,5 мкМ CellROX Deep Red в среде DMEM/F12 в течение 30 мин и трижды промывали в растворе PBS (pH 7,4). После чего к клеткам добавляли по 100 мкл соответствующих рабочих растворов тестируемых соединений в среде и планшеты инкубировали в темноте в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 60 мин. Использовали концентрацию IC<sub>50</sub> для каждого тестируемого соединения. Ядра клеток дополнительно окрашивали красителем Hoechst 33258 (50 мкМ) в течение 15 мин. Оптические изображения и данные интенсивности флуоресценции CellROX Deep Red ( $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{исп}} = 644/665$  нм) клеток были получены с использованием программного обеспечения InCell Analyzer 6000 и In Cell Analyzer Workstation v.3.7.3 (GE Healthcare, США). Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ.

#### **4.3.13 Подготовка нейтрофилов к проведению эксперимента**

Нейтрофилы получали из гепаринизированной (50 Ед/мл) венозной крови здоровых доноров, полученной из «Нижегородского областного центра крови

имени Н.Я. Климовой». Исследование одобрено Комиссией по Биоэтике ННГУ имени Н.И. Лобачевского (созданной 11.11.16 г., приказ о создании №497-ОД), протокол № 9 от 17.07.17 г. Кровь была разведена забуференным физиологическим раствором, содержащим 0,137 М NaCl и 0,0027 М KCl, pH 7,35 (200 г, 3 мин) в соотношении 1:1. Разделение проводили на двойном градиенте фиколла-тразографа ( $\rho = 1,077$  г/мл,  $\rho = 1.110$  г/мл, 200 г, 40 мин) и дважды отмывали раствором PBS (200 г, 3 мин). Жизнеспособность клеток перед началом экспериментов оценивали по окрашиванию ядер клеток пропидиумом иодидом, она находилась на уровне 98-99%. Нейтрофилы использовали в конечной концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл.

#### **4.3.14 Получение культуры бактерий *S. aureus* 2879 М и *E. coli* 321**

Штаммы *S. aureus* 2879 М и *E. coli* 321 выращивали (37 °С, 24 ч) на агаре на основе гидролизата рыбной муки. Бактерии смывали стерильным раствором PBS, трижды отмывали при центрифугировании (1800 г, 10 мин), взвешивали в PBS и доводили оптическую плотность до 0,75 ( $\lambda = 670$  нм), что соответствовало  $1 \times 10^9$  кл/мл.

#### **4.3.15 Проведение электрохимических внутриклеточных измерений**

Для проведения внутриклеточных измерений чашку Петри с адгезированными к ее поверхности клетками устанавливали на предметный столик инвертированного оптического микроскопа. Наноэлектрод устанавливали в держатель, который был в дальнейшем соединен с системой для измерения и закреплялся в микроманипуляторе. Основная задача заключалась в перемещении наноэлектрода к поверхности чашки Петри, где были адгезированы клетки, с помощью микроманипулятора. Далее после успешного позиционирования наноэлектрода осуществляли выбор клетки с помощью оптического микроскопа и более точное позиционирование наноэлектрода с последующим протыканием мембраны клетки. Электрод осторожно подводили под углом 50° к клетке с шагом 2 мкм, чтобы избежать резкого движения и допустить повреждение кончика электрода. Процесс проникновения в клетку

контролировали с помощью оптического микроскопа и измерительной электрохимической системы. Процесс контролировали при постоянном потенциале +800 мВ отн. ХСЭ, измеряя протекающий ток в системе. Основным критерием успешного проникновения в клетку являлось резкое увеличение тока на амперограмме.

#### **4.3.16 Проведение электрохимических измерений в сфероидах**

Для проведения измерений внутри сфероидов чашку Петри с адгезированными к ее поверхности сфероидами устанавливали на предметный столик инвертированного оптического микроскопа. Наноэлектрод устанавливали в держатель, который был соединен с системой для измерения, и закреплялся в держателе микроманипулятора. Основная задача заключалась в перемещении наноэлектрода с помощью микроманипулятора к поверхности чашки Петри, в область с адгезированными сфероидами. Далее после успешного позиционирования наноэлектрода осуществляли выбор сфероида и более точное позиционирование наноэлектрода с последующим входом в сфероид. Процесс проникновения в сфероид контролировали с помощью оптического микроскопа и ПО микроманипулятора. Измерения внутри сфероида проводили с шагом 10 мкм. С помощью электрода достигали центра сфероида и выходили обратно. Протокол электрохимических измерений зависел от типа используемого наноэлектрода и типа определяемого аналита.

#### **4.3.17 Проведение электрохимических измерений внутри нейтрофилов**

Измерения внутриклеточной продукции АФК нейтрофилами проводили при постоянном потенциале +800 мВ отн. Ag/AgCl. Для этого в стерильную чашку Петри вносили суспензию нейтрофилов (2 мл, конечная концентрация  $1 \times 10^9$  кл/мл) и инкубировали для достижения спонтанной адгезии (37°C, 20 мин). После этого к одному из адгезированных нейтрофилов подводили наноэлектрод и вводили его внутрь клетки. Затем в чашку Петри добавляли по 200 мкл суспензии бактерий, конечная концентрация которых составляла  $5 \cdot 10^8$  кл/мл и наблюдали за изменением тока. Эксперимент повторяли 3–4 раза.

Записанные хроноамперограммы далее обрабатывали и рассчитывали площадь под кривой каждого пика, которая соответствовала заряду и измерялась в кулонах. Чем больше площадь под кривой, тем больший заряд протекал в системе, и тем больше молекул АФК вырабатывалось и находилось внутри нейтрофила. Таким образом, чтобы сравнить действие двух видов бактерий, рассчитывали средний заряд окисления.

#### **4.3.18 Подготовка животных моделей для проведения эксперимента по оценке АФК и цисплатина *in vivo***

Для экспериментов использовали самок мышей BALB / с в возрасте 6-8 недель (масса 22-25 г), полученных из Андреевского питомника (Андреевка, Россия). Опухоли 4Т1 или ЕМТ6 были созданы путем подкожной инъекции (правый задний бок)  $1 \times 10^6$  клеток (клеточная линия 4Т1/ЕМТ6). Для того, чтобы обеспечить доступ нанозэлектрода к максимальной площади поверхности опухоли, клетки для дальнейшего развития опухоли вводили на расстоянии 0,7-1 см латеральнее срединной линии (линии позвоночника) и 2,5-3,5 см краниально от основания хвоста животного. Когда опухоль достигла примерно  $40 \text{ мм}^2$  (через 10 дней после имплантации клеток), мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 50 мг/кг золетила и 5 мг/кг ксилазина. Данная доза обеспечивала наркотизирование животного на протяжении 60 минут. Поддерживающая доза составляла 10% от исходной; ее введение каждые 30–60 минут позволяло проводить эксперимент на протяжении 3-4 ч.

Далее животное укладывали животом вниз на столик, после чего в хвостовую вену животного вводили катетер, через который осуществляли инъекции дополнительной смеси золетила с ксилазином в течение эксперимента, а также введение исследуемых веществ. Конечности животного фиксировали на поверхности столика при помощи пластыря. Хирургическое вмешательство начинали после того, как, животное перешло в глубокий наркоз. Перед проведением операции поверхность кожи обрабатывали минеральным маслом, которое уменьшало вероятность попадания шерсти на инструменты. Проведена обработка зоны хирургического вмешательства путем протирания марлей,

смоченной 70% спиртом. Разрез проводили при помощи ножниц и пинцета вдоль линии позвоночника от основания хвоста вверх на 3-5 см. Кожный лоскут с опухолью осторожно отделяли от подлежащих тканей, растягивали и фиксировали в двух местах на подставке (чашке Петри) с помощью шовного материала с атравматической иглой. Затем соединительная ткань капсулы опухоли удалялась без разрушения и повреждения сосудистой сети. Опухоль промывали раствором PBS (pH 7,4). Затем мышь помещали на стол микроскопа. Электрод сравнения помещался в складки кожи для обеспечения контакта с жидкостями организма.

После этого мышь помещали на предметный столик. С помощью микроманипулятора сенсор был перемещен в непосредственную близость к предварительно открытой опухоли, а электрод сравнения был закреплен в складках кожи для обеспечения замыкания электрической цепи. Во время эксперимента предметный столик был накрыт камерой Фарадея для экранирования внешних электромагнитных полей. Микроманипулятор был переведен в режим подведения, что позволяло ему двигаться под заданным углом (40-51°) по двум осям одновременно. С помощью LinLab2 (ПО, позволяющее управлять микроманипулятором с компьютера) наноэлектрод с шагом 50 мкм вводили в опухоль на глубину вплоть до 3000 мкм.

Для получения достоверных результатов проводили от трех технических повторов для каждой мыши. Полученные данные были обработаны в соответствии с определяемым аналитом и были усреднены для всех технических повторов.

#### **4.3.19 Подготовка животных моделей для проведения эксперимента по оценке содержания кислорода *in vivo***

В экспериментах использовали самцов беспородных белых крыс (250–350 г). Самцы крыс породы Wistar были получены из ФГБУ «Федеральный научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» (г. Москва, Россия). Все экспериментальные процедуры с участием животных проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в

научных целях, принятой 22 сентября 2010 г., и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199 от 01.04.2016 г.). Крысы содержались при температуре 22 °С с использованием цикла 12-часовой световой день/12-часовая ночь, кормили *ad libitum* обычным кормом для грызунов и водой. Животных анестезировали золептилом 50 мг/кг, ксилазином 5 мг/кг. По окончании экспериментов животных усыпляли передозировкой пентобарбитала натрия.

Эксперименты с моделью глиомы С6 были одобрены Этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Модель внутрочерепной глиомы у крыс моделировали, как описано ранее [201]. Вкратце, крыс Wistar (возраст 8-10 недель, самцы) анестезировали смесью золептила и ксилазина, а клетки глиомы С6 ( $4 \cdot 10^5$  клеток) имплантировали в правое полосатое тело с помощью стереотаксического устройства (Narishige, Токио, Япония).

Для мониторинга молекулярного кислорода голова каждой крысы была зафиксирована в стереотаксической рамке. Крыс анестезировали с помощью золептил/ксилазина. В левой части теменной кости было просверлено трепанационное отверстие размером 1 мм × 1 мм. Твердая мозговая оболочка была удалена. Краниотомия непрерывно заливалась физиологическим раствором. Под операционным микроскопом микроманипулятор использовался для позиционирования наноэлектрода диаметром 1 мм. Крысу в стереотаксисе помещали на столик микроскопа. Электрод сравнения помещали в складки кожи, чтобы обеспечить контакт с жидкостями организма. Наноэлектрод подводили к выбранной области мозга с помощью микроманипулятора, вводили в опухоль и регистрировали вольтамперограммы на различной глубине внутри мозга с шагом 100 мкм.

#### **4.3.20 Статистическая обработка**

Для обработки полученных ЦВ и амперограмм, а также визуализации результатов использовали программное обеспечение Origin 2021. Данные на

столбчатых диаграммах представлены как средние значения с указанием стандартной ошибки среднего. Для определения статистической значимости применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Предел обнаружения был рассчитан как  $C_{\text{мин}} = 3s_{\text{фон}}/S$ , где  $s_{\text{фон}}$  - стандартное отклонение аналитического сигнала фона,  $S$  – коэффициент чувствительности ( угол наклона градуировочного графика).

## 5 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 5.1. Изготовление и характеристика углеродных нанокapиллярных электродов<sup>2</sup>

На первом этапе изготавливали углеродные нанокapиллярные наноэлектроды. Процедура изготовления углеродных наноэлектродов включала в себя: изготовление нанокapилляров из кварцевых заготовок (внешний диаметр 1,2 мм, внутренний диаметр 0,6 мм) 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  $\sim 1200$  °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 нанокapилляра и его острый конец, осаждаясь внутри нанокapилляра. Таким образом, на кончике нанокapилляра образовалась дисковая поверхность. Данная процедура изготовления оказалась очень быстрым и простым способом создания углеродных наноэлектродов. Для этого необходимы недорогие материалы (пропан-бутановая смесь, аргон и кварцевые заготовки) и оборудование (газовая горелка). Процент успешно рабочих наноэлектродов был высок и составил более 90% от общего количества изготовленных

---

<sup>2</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 1) 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%) doi: 10.1021/acs.analchem.0c01256; 2) 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%) doi: 10.3390/nano12213736; 3) 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%) doi: 10.1186/s12951-022-01688-z

нанoelectродов. Основными критериями успешно изготовленных нанoelectродов были: наличие контакта при замыкании цепи в растворе и отсутствие повреждений кончика нанoelectрода, которые возможно было зафиксировать визуально. Общее время изготовления одного функционального электрода составляло в среднем 2 минуты.

Природа осажденного материала внутри заготовок была охарактеризована с помощью спектроскопии КР. Из-за сложности анализа нанометровых площадей образца спектры были получены не от кончика нанометрового диска электрода, а от материала, осевшего на внутренних стенках капилляров. В спектре КР наблюдались отчетливые D ( $1360\text{ см}^{-1}$ ) и G ( $1580\text{ см}^{-1}$ ) полосы. Относительно высокое соотношение интенсивностей полос D и G соответствует, что полученный углеродный материал представляет собой неупорядоченную структуру (Рис. 23).

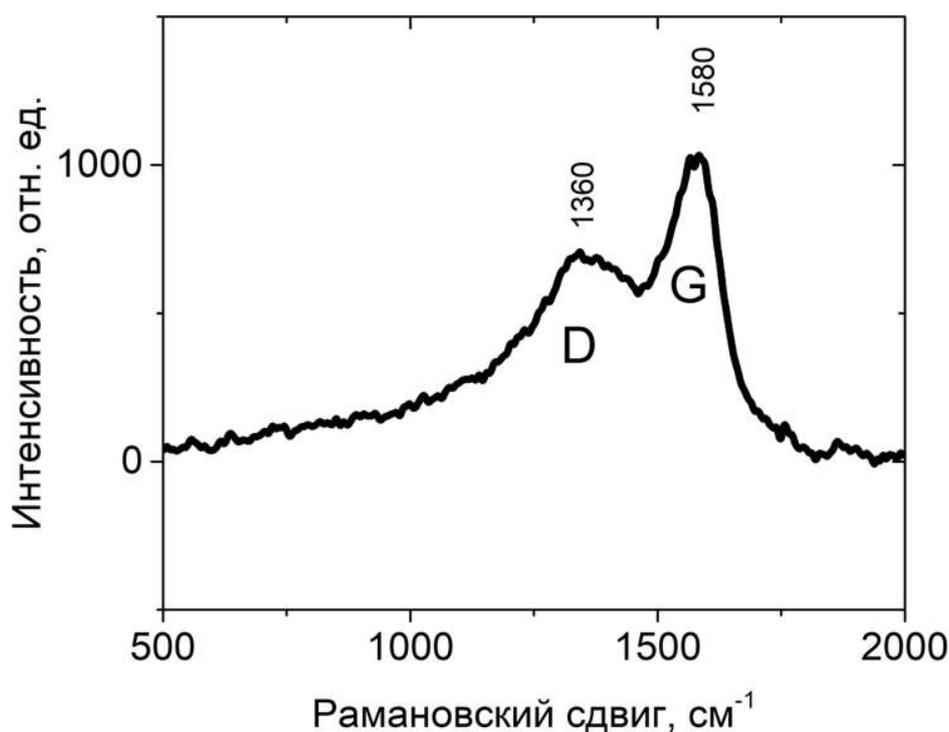


Рис. 23. Спектр КР пиролитического углерода, осажденного внутрь нанокапилляров

Оценка диаметра диска электрохимической углеродной поверхности осуществлялась с помощью электрохимических методов (ЦВ в 1 мМ растворе  $\text{FcMeOH}$ ) путем определения предельного диффузионного тока ( $I_{ss}$ ), а также с

использованием РЭМ (Рис. 24А). Размер диска углеродного нанoeлектрода зависел исключительно от диаметра конца кварцевого нанокapилляра, который возможно варьировать в широких пределах (20-800 нм), изменяя параметры вытягивания основы для нанoeлектродов, кварцевых нанокapилляров, в лазерном пуллере в соответствии с инструкцией производителя.

С помощью ЦВ была проведена быстрая оценка размера диска нанoeлектрода на основе предположений о его дисковой геометрии (Рис. 24 Б,В). ЦВ углеродных нанoeлектродов в 1 мМ растворе FcMeOH, имели S-образный вид, характерный для электродов, которые обладают наноразмерной электрохимически активной поверхностью. Были определены 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. 24 Б).

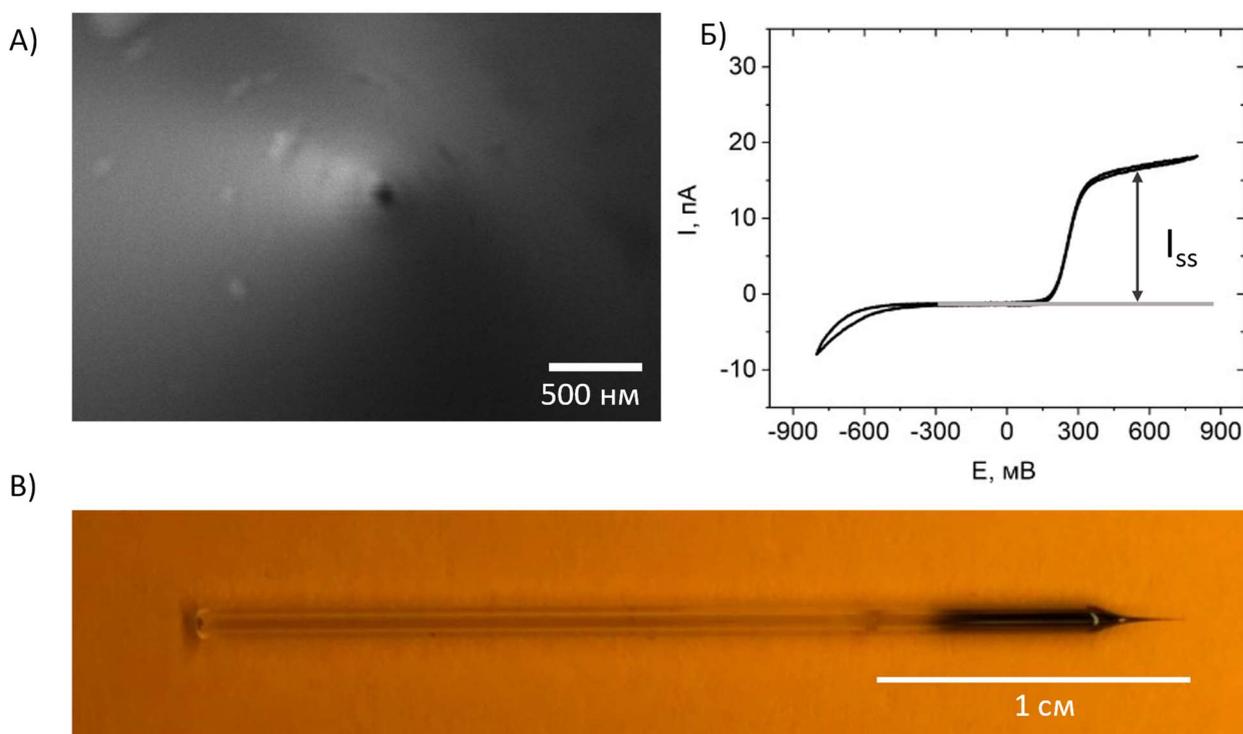


Рис. 24. Характеризация углеродного нанoeлектрода. (А) РЭМ-изображение конца нанoeлектрода, приведено изображение с торца; (Б) ЦВ этого же нанoeлектрода в 1 мМ FcMeOH в диапазоне от -800 до +800 мВ отн. ХСЭ (400 мВ/с). Стрелкой показана высота плато на ЦВ, обозначен предельный диффузионный ток; (В) Внешний вид изготовленного углеродного нанoeлектрода.

С помощью формулы (2) был определен диаметр и площадь диска (электрохимически активной поверхности) и проведено сопоставление размеров, полученных с использованием РЭМ [200].

$$i_{ss} = 4.64cDFr \quad (2)$$

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 диска электрода.

На Рис. 25 приведены ЦВ, записанные с помощью углеродных нанoeлектродов, имеющих различный диаметр дисковой поверхности нанoeлектрода (от 8 до 255 нм).

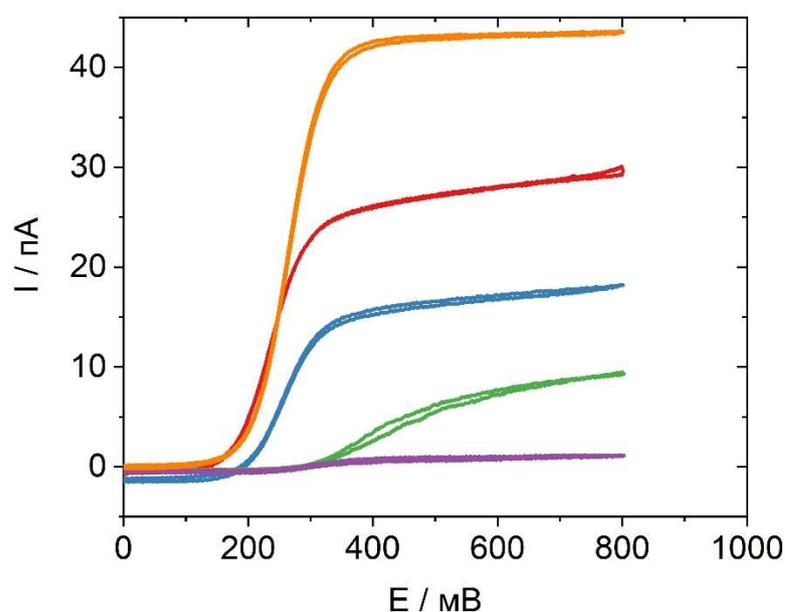


Рис. 25. ЦВ углеродных нанoeлектродов с различным диаметром диска (8; 97; 121; 133; 255 нм), рассчитанные по формуле (2). ЦВ записаны в 1 мМ растворе FcMeOH. Скорость развертки потенциала 400 мВ/с, диапазон от -800 мВ до +800 мВ

Наблюдалась корреляция при сравнении электрохимически оценённых радиусов электродов с размерами электродов, наблюдаемыми на РЭМ изображениях (Табл. 7). Кроме того, изображения РЭМ показывали заостренную форму электродов, окруженных лишь тонким слоем изолирующего кварцевого стекла, что подтверждало допущения, сделанные для определения размера в соответствии с формулой (2).

Табл. 7. Характеристики изготовленных углеродных наноэлектродов

№	$I_{ss}$ , пА*	R, нм*	Площадь диска, нм <sup>2</sup>	R, нм (изм. РЭМ)
1	1,5	4,4	61	-
2	16,6	48,7	7451	51
3	20,6	60,5	11499	62
4	39,7	116,6	42712	118
5	43,5	127,8	51311	134

\*- значения получены из ЦВ

\*\* - значения получены с использованием формулы (2)

Углеродные наноэлектроды, у которых предельный диффузионный ток лежал в диапазоне  $10 \leq I_{ss} \leq 25$  пА, были наиболее пригодными для проведения дальнейших экспериментов. Наноэлектроды с радиусом менее 30 нм ( $I_{ss} < 10$  пА) были малоинвазивны и не приводили к существенным повреждениям единичных клеток. Однако площадь их электрохимической поверхности ( $< 2800$  нм<sup>2</sup>) была мала, поэтому в дальнейшем такие наноэлектроды после модификации платиной, во-первых, имели недостаточную чувствительность и высокий предел обнаружения ( $> 5$  мкМ по пероксиду водорода), во-вторых, электрохимическое осаждение платины на поверхность электрода было затруднено.

В целом, изготовленные наноэлектроды выступали в качестве рабочих наноэлектродов для определения нейротрансмиттеров, а также использовались для дальнейшего модифицирования их поверхности платиной с целью увеличения площади поверхности и повышения активности электрохимической поверхности для обнаружения пероксида водорода, комплексов Pt(II) и молекулярного кислорода.

Однако при изготовлении углеродных наноэлектродов не всегда при заполнении пиролизическим углеродом образуется плоская дисковая углеродная поверхность на конце нанокapилляра. При осаждении углерода возможны два случая: во-первых, избыточное образование углеродной фазы снаружи отверстия нанокapилляра, во-вторых, из-за недостатка пропан-бутановой смеси возможно

образование полости внутри нанокapилляра, заполненного углеродом (Рис. 26). Для того, чтобы определить степень заполнения конца нанокapилляра углеродом использовали методы ЦВ и РЭМ. При избыточном осаждении углерода происходит увеличение площади поверхности нанoeлектрода, размер электрохимически активной части кратно увеличивается за счет чего массоперенос к поверхности нанoeлектрода снижается, поэтому ЦВ приобретает форму отличную от ЦВ дискового нанoeлектрода. На ЦВ появляются пики, соответствующие окислению/восстановлению  $\text{FcMeOH}$ , которые характерны для макроэлектродов. Появление данных пиков свидетельствовало об изменении геометрии электрода, следовательно диффузии к поверхности (Рис. 26Б, Д,З). При недостаточном осаждении углерода площадь поверхности также увеличивается и появляются характерные пики, соответствующие окислению и восстановлению  $\text{FcMeOH}$ , в виду снижения ограничения массопереноса внутрь полостей (Рис. 26 В, Е, И).

Дополнительно проводили оптимизацию условий осаждения углерода с целью минимизации образования полостей и избыточного осаждения. Для этого варьировали давление аргона и пропан-бутановой смеси, чтобы достичь равномерного осаждения на конце нанокapилляра. Важным условием для получения дисковых углеродных нанoeлектродов было одинаковое давление пропан-бутановой смеси и аргона ( $P = 0,1$  кПа). При уменьшении давления аргона происходило окисление пропан-бутановой смеси под воздействием кислорода воздуха, что сказывается на образовании полости.

Количество осаждённого углерода зависело от продолжительности нагрева. Однако перегрев, вызванный слишком долгим нагревом, приводил к закупорке отверстия пипетки и уменьшению эффективной поверхности углерода. Было установлено, что при малых токах на ЦВ в  $\text{FcMeOH}$  время нагрева кончика пипетки оказалось избыточным.

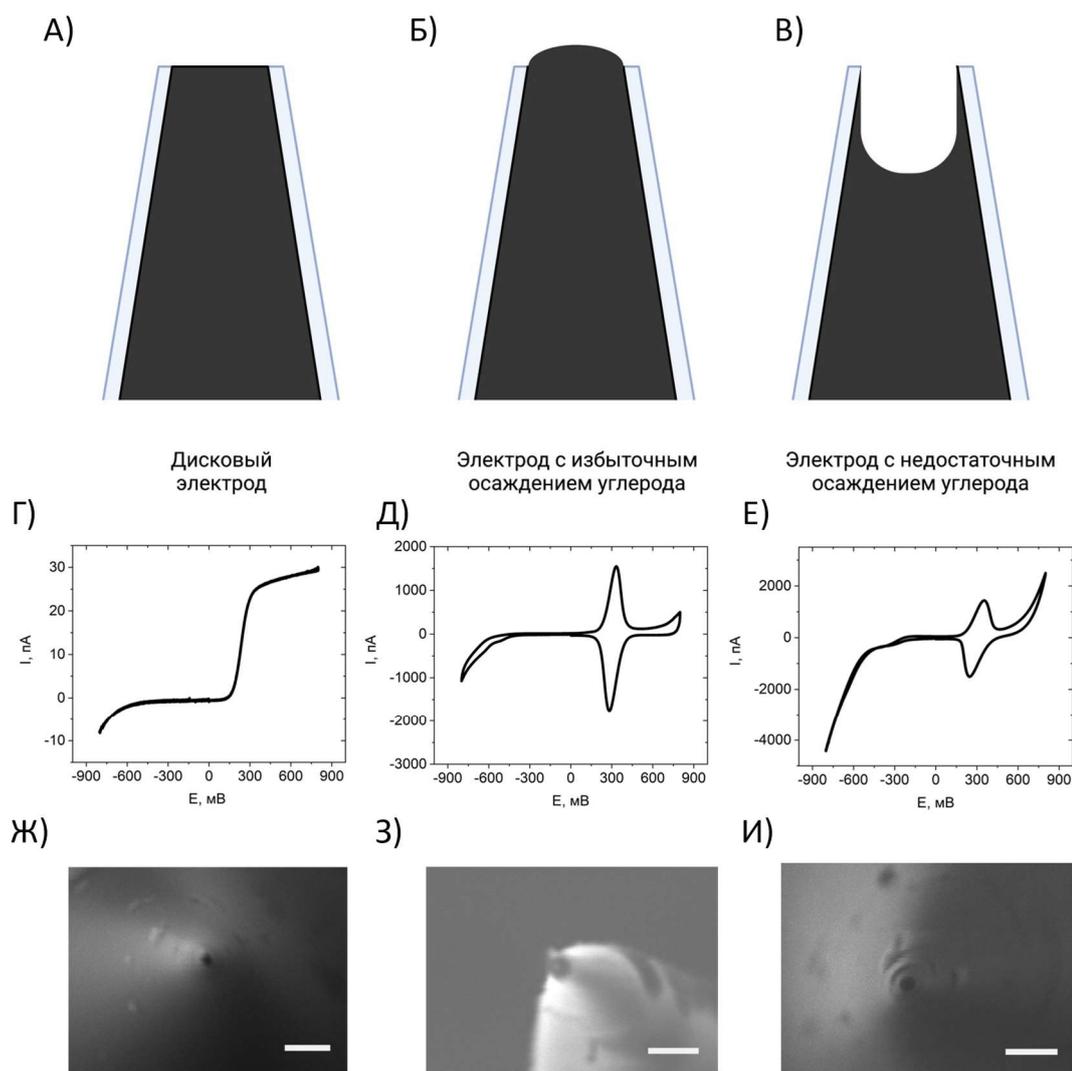


Рис. 26. Различные типы нанoeлектродов. Схематическое изображение изготавливаемых нанoeлектродов (А,Б,В). ЦВ дискового нанoeлектрода (Г), ЦВ нанoeлектрода с избыточным осаждением углерода (Д), ЦВ нанoeлектрода с недостаточным осаждением углерода(Е), РЭМ изображения дискового нанoeлектрода (Ж), нанoeлектрода с избыточным осаждением углерода (З), нанoeлектрода с недостаточным осаждением углерода (И). Масштабная шкала 500 нм. Рабочий раствор 1 мМ FcMeOH. Скорость развертки 400 мВ/с.

Для проведения дальнейших исследований нами были отобраны исключительно дисковые электроды, диаметр которых составлял от 50 до 300 нм. Использование электродов с большими полостями не позволяет контролировать дальнейший процесс электрохимического осаждения платины, а также ввиду ограниченного массопереноса иногда невозможно добиться осаждения платины в углеродные полости. Использование нанoeлектродов с избыточным количеством углерода на кончике нанoeлектрода не всегда возможно из-за длительного процесса травления.

## 5.2. Разработка метода для определения дофамина с использованием углеродных нанoeлектронов

Для определения дофамина в растворе был подобран протокол ЦВ со следующими параметрами:  $-0,4$  В в течение  $100$  мс, далее потенциал увеличили до  $+1,3$  В со скоростью  $400$  В/с, после чего уменьшали до  $-0,4$  В с такой же скоростью (Рис. 27). Диапазон напряжений можно объяснить тем, что верхний потенциал ограничен примерно  $1,5$  В, поскольку выше этого потенциала происходит окисление воды, и измерения при потенциале  $1,3$  В позволяют избежать окисления воды и нестабильности электрода при более высоких потенциалах. Развертка потенциала обычно начинается при  $-0,4$  В. Использование данного потенциала обусловлено адсорбцией дофамина на поверхность нанoeлектрода, поскольку при отрицательном потенциале поверхность нанoeлектрода адсорбирует больше дофамина, который при физиологическом рН заряжен положительно [69].

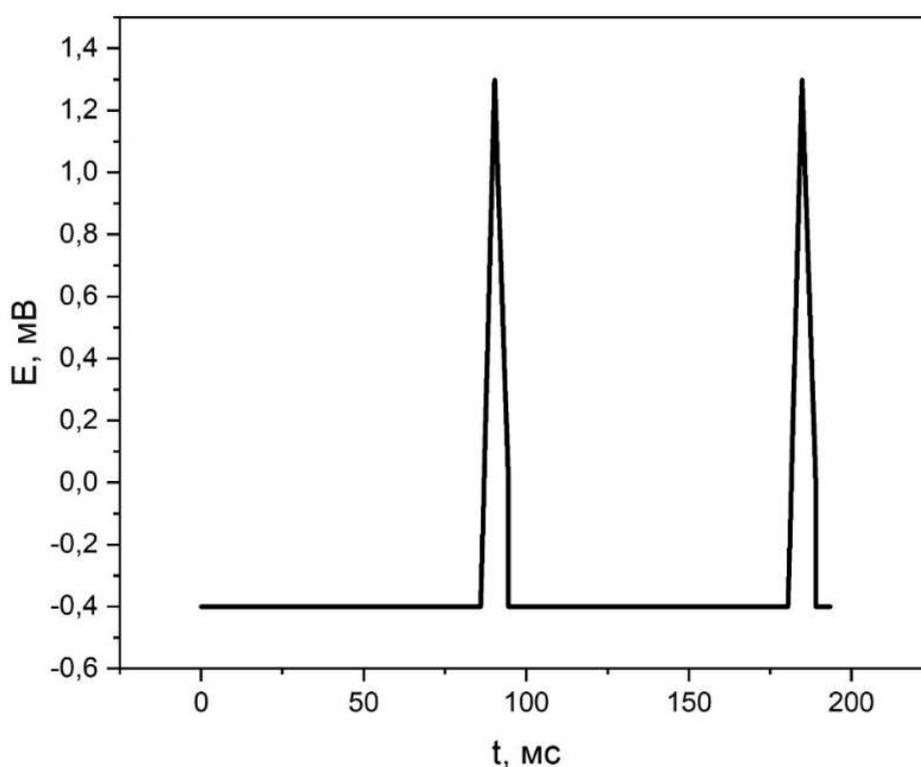


Рис. 27. Развертка потенциала, используемая для определения дофамина

Дофамин окисляется с образованием дофамин-о-хинона, который может восстанавливаться на электроде обратно до дофамина (Рис. 28).

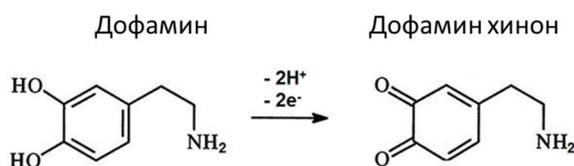


Рис. 28. Электрохимическое окисление дофамина на поверхности углерода

Обнаружение дофамина проводили с использованием метода FSCV. Для определения высоты пика окисления дофамина проводили вычитание емкостного тока из общей ЦВ. На Рис. 29 А, Б показаны ЦВ до и после вычета емкостного тока. Поскольку электроды очень малы, то протекают небольшие емкостные токи, порядка 10 нА, а не сотни наноампер, как в случае макроэлектродов. ЦВ имеют пики окисления и восстановления, что указывает на гораздо лучшую обратимость, чем у традиционных МУВ.  $\Delta E_p$  для дофамина составило 0,6 В (Рис. 29). В методе FSCV при высоких скоростях развертки на электроде возникают большие емкостные токи, поскольку величина емкостного тока пропорциональна скорости развертки потенциала. В стандартной ЦВ фоновые емкостные токи обычно меньше фарадеевских токов. Емкостные токи возникают из-за перегруппировки ионов вокруг электрода при приложении потенциала, поэтому зарядка, как и разрядка ДЭС, пропорциональна площади поверхности электрода.

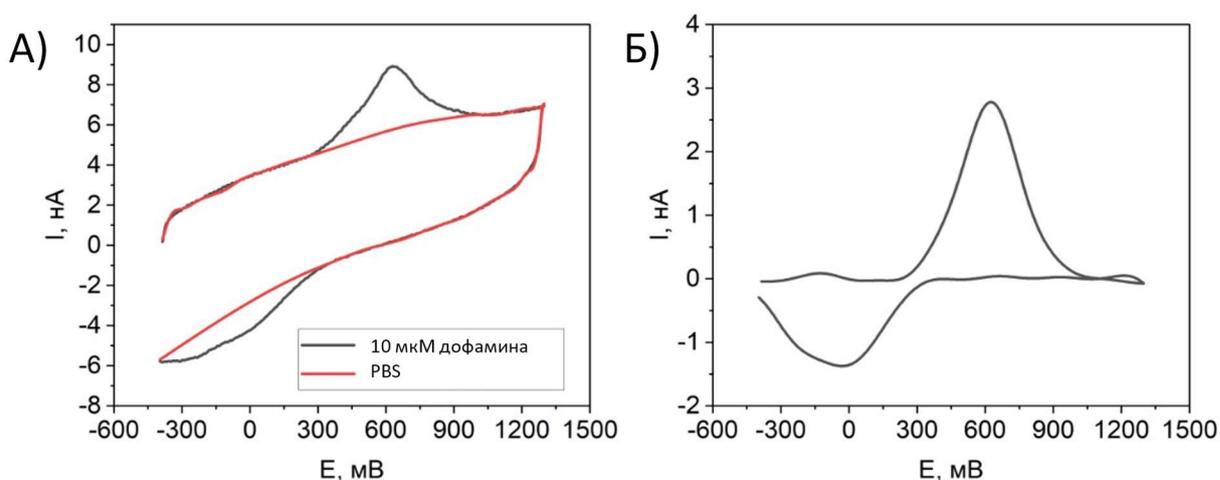


Рис. 29. FSCV дофамина в фосфатном буферном растворе. А) FSCV, на которой емкостной ток отмечен красным цветом, черным отмечена FSCV (10 мкМ дофамина) Б) FSCV с вычитанием емкостного тока для 10 мкМ дофамина. Диапазон потенциала -0,4 до 1,3 В со скоростью развертки 400 В/с.

Также был построен градуировочный график и определен предел обнаружения дофамина для нанoeлектрода с использованием вышеописанного протокола, было показано, что предел обнаружения дофамина составил  $1,4 \pm 0,3$  мкМ ( $N = 3$ ) для данного типа нанoeлектрода, что недостаточно для большинства биоаналитических задач *in vitro/in vivo* (Рис. 30).

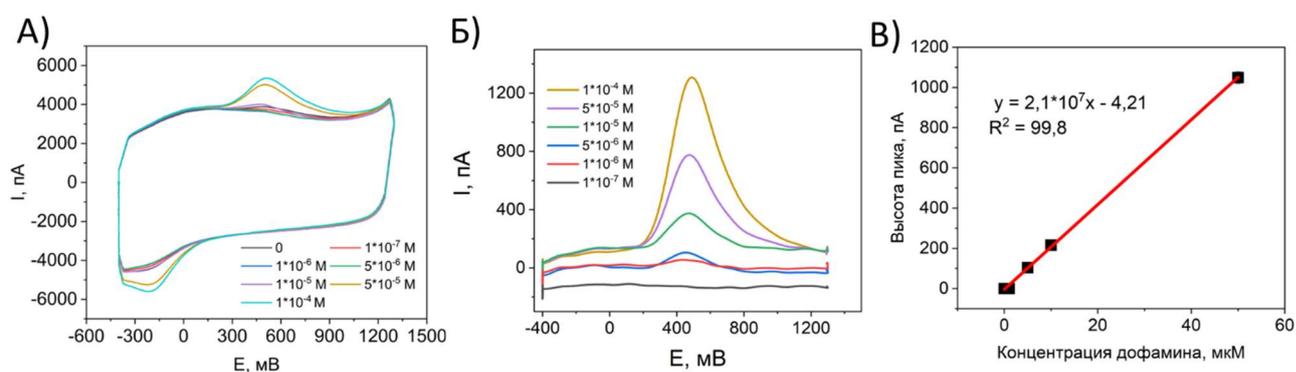


Рис. 30. Обнаружение дофамина с использованием углеродных нанoeлектродов без травления. (А) ЦВ в растворах дофамина с различной концентрацией ( $1 \cdot 10^{-7}$ ;  $1 \cdot 10^{-6}$ ;  $5 \cdot 10^{-6}$ ;  $1 \cdot 10^{-5}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $1 \cdot 10^{-4}$  М). Скорость развертки 400 В/с. (Б) ЦВ после вычитания емкостного тока (В) Градуировочный график по дофамину, полученный с помощью углеродного нанoeлектрода без травления

Для того, чтобы увеличить чувствительность и уменьшить предел обнаружения углеродные сенсоры предварительно были протравлены в 8,3%-ном растворе плавиковой кислоты.

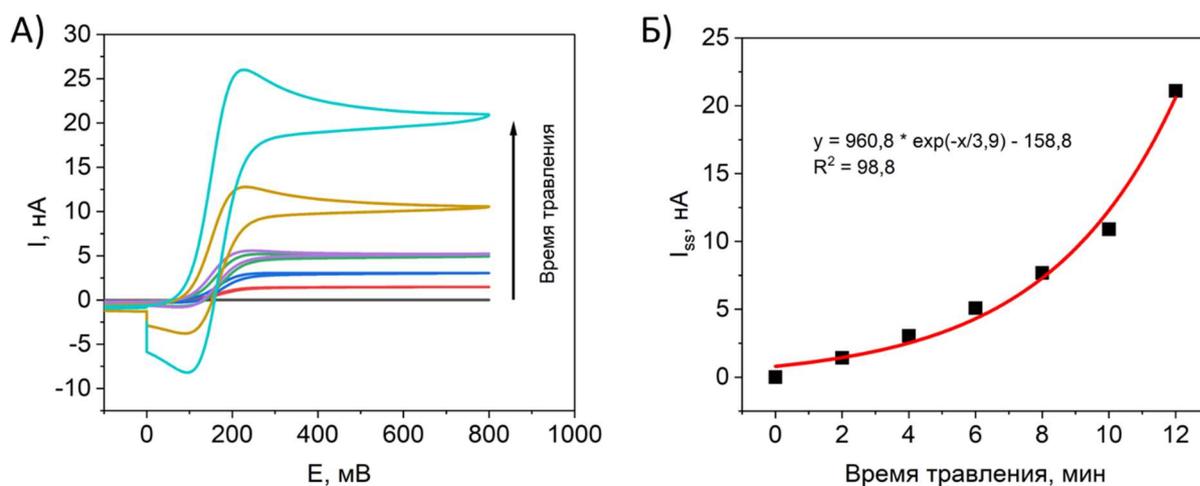


Рис. 31. Травление углеродных нанoeлектродов в плавиковой кислоте. (А) ЦВ углеродных нанoeлектродов в 1 мМ растворе FcMeOH после 0,2,4,6,8,10,12 мин травления в 8,3%-ной плавиковой кислоте. (Б) Зависимость предельного диффузионного тока от времени травления нанoeлектрода в плавиковой кислоте.

При увеличении времени травления предельный диффузионный ток в 1 мМ FcMeOH увеличивался (Рис. 31А). Если изначально предельный диффузионный ток составлял 10 пА, то через 10 мин травления в HF он уже составил более чем 10 нА, что свидетельствует об успешном процессе травления (Рис. 31Б). Для подтверждения успешности травления нанoeлектрода, было получено РЭМ-изображение углеродного нанoeлектрода после травления (Рис. 32). Более контрастные области на кончике нанокapилляра свидетельствовали об успешности процесса травления стенок и увеличения площади поверхности нанoeлектрода.

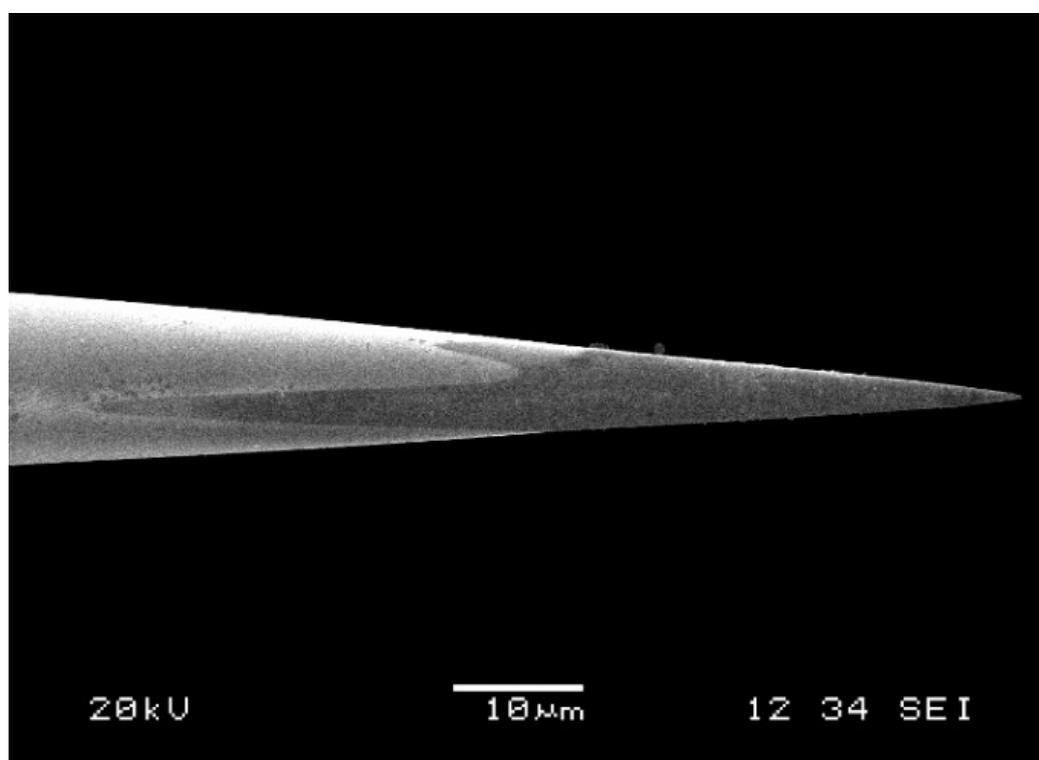


Рис. 32. РЭМ-изображение углеродного нанoeлектрода, протравленного в 8,3%-ной плавиковой кислоте в течение 10 минут.

Градуировочный график для протравленного углеродного нанoeлектрода был построен с использованием растворов гидрохлорида дофамина с концентрациями от  $10^{-8}$  до  $10^{-6}$  М (Рис. 33 А, Б).

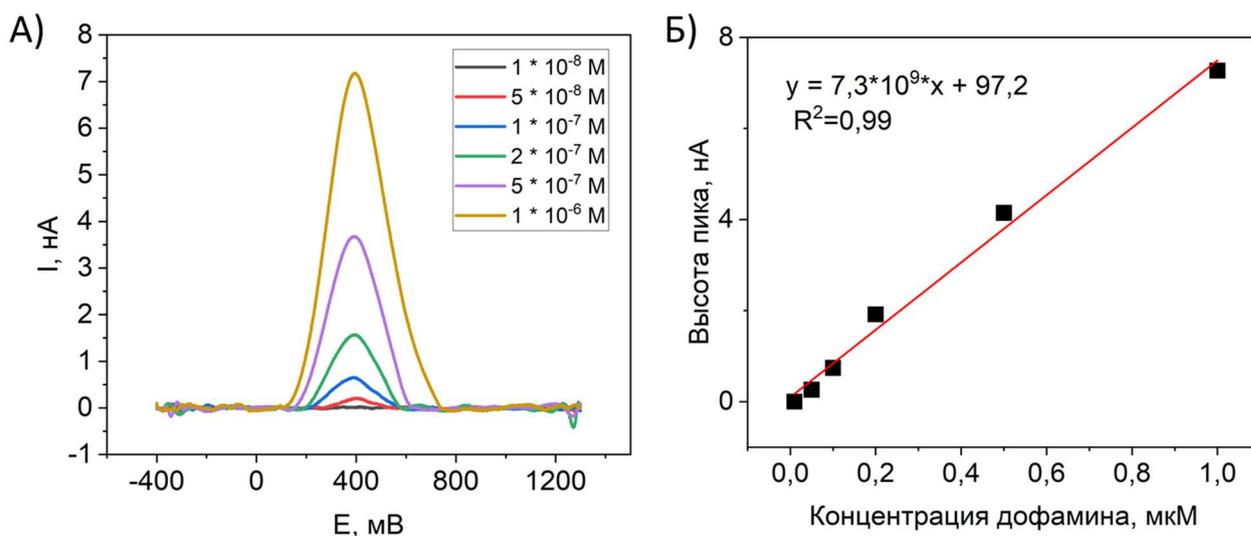


Рис. 33. Определение дофамина с использованием углеродного нанозэлектрода после травления. (А) ЦВ и (Б) Градуировочный график протравленного углеродного нанозэлектрода в растворах гидрохлорид дофамина с различной концентрацией (от  $10^{-8}$  до  $10^{-6}$  М).

Предел обнаружения дофамина составил  $12 \pm 5$  нМ ( $N = 3$ ), что делает этот нанозэлектрод перспективным инструментом для биоаналитических исследований, таких как определение концентрации дофамина в биологических образцах.

Аналитические характеристики изготовленного сенсора были получены и представлены в Табл. 8.

Табл. 8. Сравнение аналитических характеристик изготовленных сенсоров для обнаружения дофамина

	Углеродный нанозэлектрод	Углеродный нанозэлектрод после травления
Предельный диффузионный ток в 1 мМ растворе FcMeOH, пА	10	12000
Предел обнаружения, мкМ	$1,4 \pm 0,3$	$0,012 \pm 0,005$
Чувствительность, пА/мкМ	21	7300
Линейный диапазон, М	$2 \times 10^{-6} - 10^{-4}$	$4 \times 10^{-8} - 10^{-4}$

Таким образом, использование протравленного нанозэлектрода в сочетании с FSCV позволило достичь высокой чувствительности и низкого предела обнаружения дофамина на уровне 12 нМ, что открывает новые перспективы для применения данного нанозэлектрода в области биотехнологии, медицины и иных биоаналитических приложений.

### 5.3. Процесс окисления углеродной поверхности

Одна из основных проблем при создании наноэлектродов 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 электродам было предложено создание нанополости в углеродном слое перед нанесением платины. Электрохимическое травление углеродных наноэлектродов было выполнено методом ЦВ в диапазоне от 0 до 1,9 В отн. ХСЭ в 0,1 М растворе NaOH и 10 mM KCl. (Рис. 34). При высоких значениях потенциала ( $>1,5$  В) в водном растворе происходит окисление воды и хлорид ионов, что приводит к образованию оксидов углерода ( $\text{CO}_x$ ), молекулярного хлора, кислорода, пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и т. д. В результате этого происходит деградация углеродного слоя с последующим образованием полостей [231].

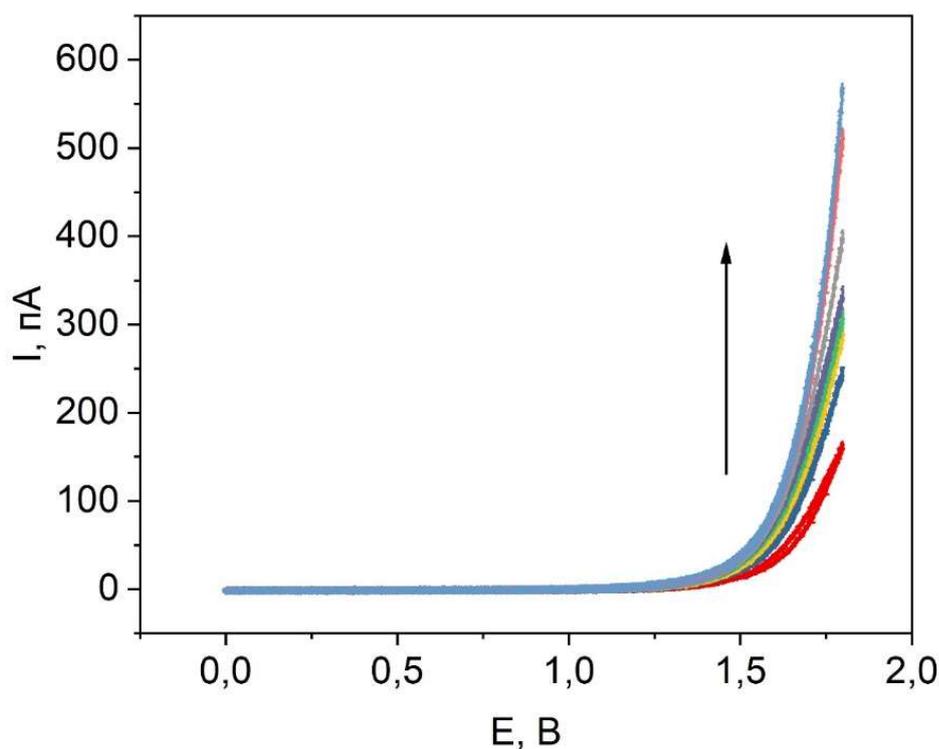


Рис. 34. ЦВ, демонстрирующая процесс травления поверхности углерод, от 0 до 1,9 В отн. ХСЭ. Скорость развертки 200 мВ/с. Травление осуществляли в 0,1 М растворе NaOH с добавлением 10 mM KCl.

При потенциалах 1,2 В наблюдается небольшое увеличение тока, которое можно в основном отнести к окислению углерода. Выше 1,5 В обнаруживается значительное увеличение тока из-за анодного окисления воды и продолжающегося окисления углерода (Рис. 34).

Значения тока, наблюдаемые на Рис. 34, не выходят на стационарное плато, как это наблюдалось в присутствии  $\text{FcMeOH}$ . Это связано с тем, что ограничение диффузии не наблюдается, поскольку вода является растворителем и, следовательно, присутствует в большом количестве вокруг электрода.

ЦВ в растворе  $\text{FcMeOH}$  на электроде до травления демонстрирует нормальный стационарный режим с предельным диффузионным током.

Формирование полости было подтверждено РЭМ изображениями электродов до и после электрохимического травления. 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. (Рис. 35 А, Б). Однако после проведения процедуры травления углеродной поверхности наноэлектродов на ЦВ видны почти симметричные пики окисления и восстановления  $\text{FcMeOH}$  с небольшим разделением пиков ( $\sim 20$  мВ), что указывало на образование нанополостей внутри углеродного наноэлектрода (Рис. 35 В).

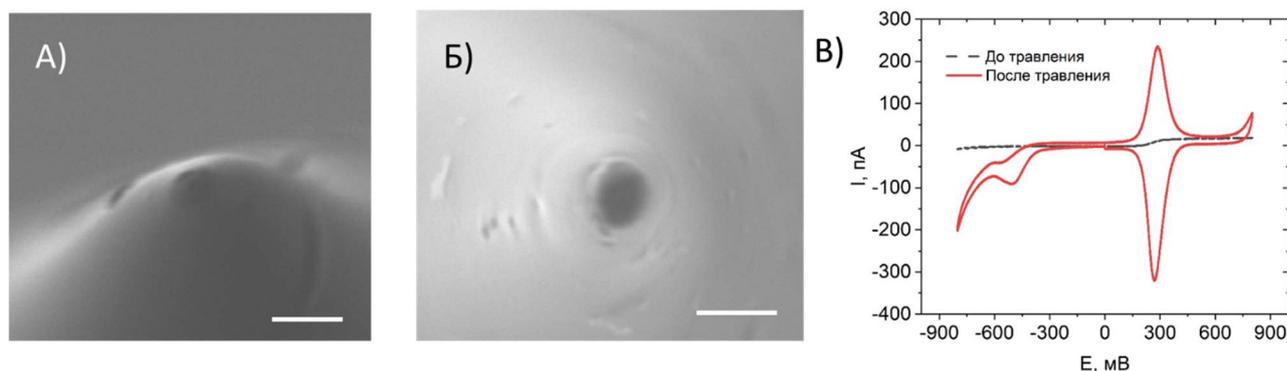


Рис. 35. Травление углеродной поверхности наноэлектрода. РЭМ изображение конца наноэлектрода до (А) и после (Б) травления. (В) ЦВ до и после травления получены в 1 мМ растворе  $\text{FcMeOH}$ . Скорость развертки 400 мВ/с.

Поскольку процесс травления от цикла к циклу является неравномерным, то контроль данного процесса осуществлялся путем получения ЦВ нанoeлектрода в растворе  $\text{FcMeOH}$  до и после травления. Стоит отметить, что в случае травления углеродных нанoeлектродов изначально различного размера, необходимо проводить процесс с постоянным контролем. Как правило, для успешного травления необходимо от 10 до 40 циклов. На Рис. 36 показан процесс травления для трех различных по диаметру углеродных нанoeлектродов, имеющий предельный диффузионный ток (0,7; 7,5; 23 пА). Как видно из Рис. 36 после травления наблюдается появление пиков, что свидетельствует об изменении геометрии нанoeлектрода (образование полостей).

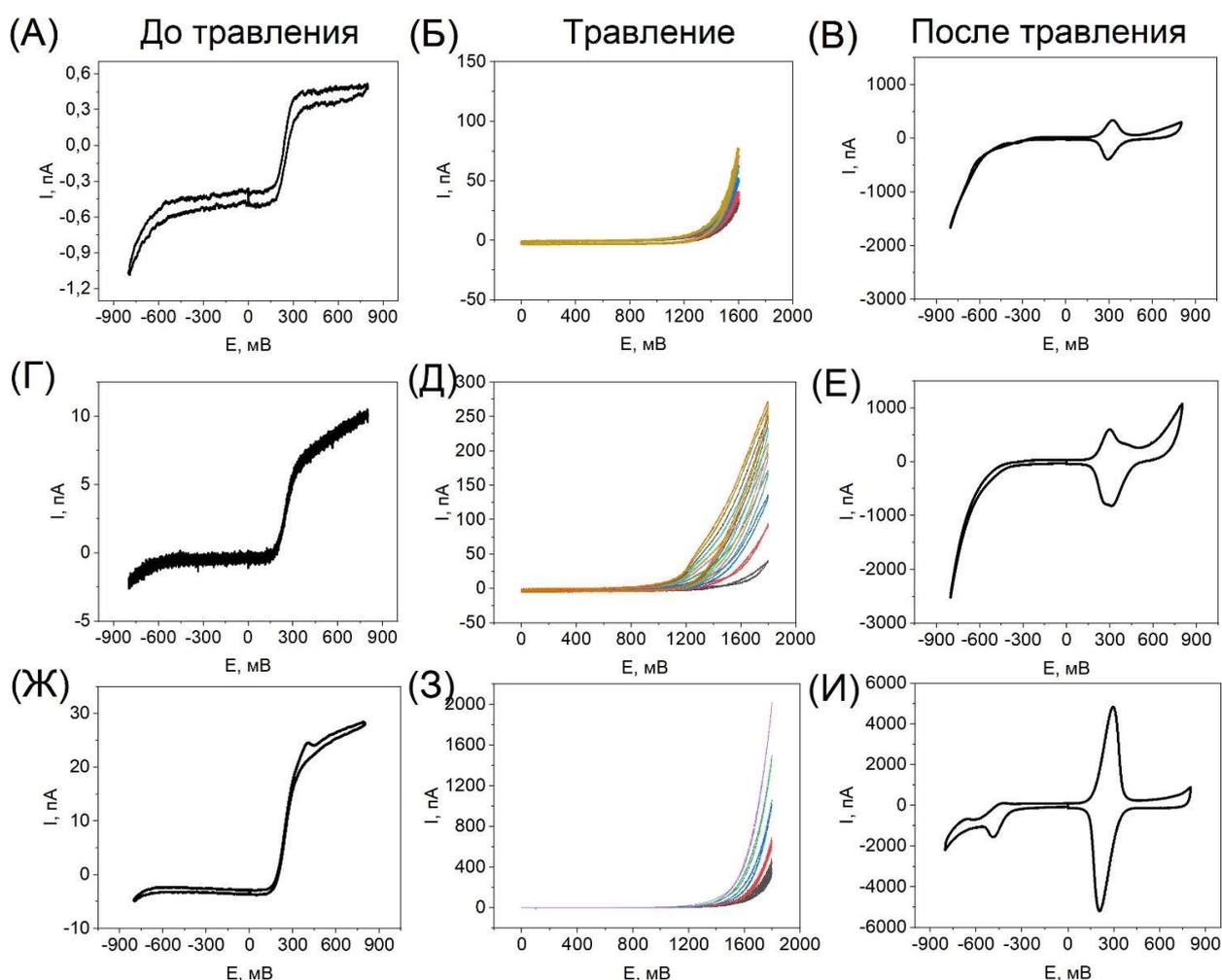
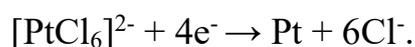


Рис. 36. Травление углеродных нанoeлектродов в 0,1 М растворе  $\text{NaOH}$  с добавлением 10 мМ  $\text{KCl}$ . ЦВ в 1 мМ растворе  $\text{FcMeOH}$  нанoeлектродов до травления с  $I_{ss} = 0,7$  пА (А); 7,5 пА (Г); 23 пА (Ж). Процесс травления нанoeлектродов, показаны ЦВ травления для нанoeлектродов (Б, Д, З) с  $I_{ss}$  0,7; 7,5; 23 пА соответственно. ЦВ в 1 мМ растворе  $\text{FcMeOH}$  нанoeлектродов до травления с  $I_{ss} = 0,7$  пА (В); 7,5 пА (Е); 23 пА (И).

Таким образом, было показано, что с помощью электрохимического травления методом ЦВ возможно осуществлять травление углеродной поверхности в углеродных нанoeлектродах с различным диаметром, что позволяет формировать нанополости с целью улучшения адгезии осаждаемых металлов, таких как платина, на углеродную основу.

#### 5.4. Разработка методики изготовления платинизированных нанoeлектродов для определения АФК

Платина часто используется в качестве материала для электродов, поскольку платина является довольно химически инертной [232]. Для изготовления платинизированных нанoeлектродов, электрохимическое осаждение Pt проводили из 2 мМ раствора гексахлорплатиновой кислоты  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  в 0,01 М растворе  $\text{HClO}_4$ . Поскольку восстановление  $\text{Pt}^{4+}$  до  $\text{Pt}^0$  является четырехэлектронным процессом, восстановление Pt на углеродной поверхности осуществляли в режиме ЦВ при потенциалах от 0 до – 800 мВ отн. Ag/AgCl.



При осаждении платины на углеродную поверхность важно добиться оптимального ее количества. При осаждении избыточного количества размер рабочей части нанoeлектрода может значительно увеличиться, что приведет к повышению инвазивности и нестабильности нанoeлектрода.

В некотором смысле углеродные нанoeлектроды выступают в качестве идеального субстрата для электроосаждения, поскольку уменьшение электрохимически активной площади уменьшает количество возможных центров зародышеобразования.

В процессе электрохимического осаждения количество осажденной платины зависит от количества циклов ЦВ. С каждым циклом обычно наблюдали увеличение значений тока, поскольку чем больше платины осаждалось на углеродную поверхность, тем площадь для следующего цикла осаждения платины была больше, и, следовательно, ток возрастал. Использование ЦВ для осаждения является одним из самых распространенных способов осаждения металлов из раствора. Преимущество данного метода заключается в получении очевидного отклика, связанного с увеличением тока на ЦВ, что свидетельствует об успешности процесса осаждения платины. Одним очевидным недостатком этого метода является резкое и значительное увеличение тока в процессе ЦВ, что обычно приводит к осаждению большего количества Pt, чем требуется.

При осаждении Pt на дисковые электроды для достижения стабильности важно добиться оптимального количества осаждения Pt. Оптимальное количество Pt является таким, когда наблюдается полусферическая геометрия. То есть в случае, если предельный диффузионный ток на углеродном дисковом электроде увеличивается в 1,57 раз при осаждении, то это свидетельствует об полусферической геометрии нанoeлектрода. В случае если  $i_{ss}$  увеличивается в более 1.57 раз, то происходит значительное увеличение площади поверхности, что приводит к большему объему осажденной фазы.

Успешное осаждение Pt на углеродную поверхность было подтверждено методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Табл. 9).

Табл. 9. Элементный состав конца нанoeлектрода без учета содержания углерода

Элемент	Тип линии	Условная концентрация	Отношение k	Вес%	Сигма вес%
O	К-серия	6,48	0,02179	65,75	0,36
Si	К-серия	2,81	0,02230	32,91	0,31
Pt	М-серия	0,07	0,00072	1,33	0,33
Всего:				100,00	

### 5.5. Характеризация платинизированных нанoeлектродов

Углеродные электроды с платиновым покрытием не являются селективными к одной конкретной АФК, будучи чувствительными не только к кислороду и пероксиду водорода, но также к супероксиду, пероксинитриту и оксиду азота. В качестве одного из стабильных аналитов нами была выбрана наиболее стабильная форма АФК – пероксид водорода. Каждый используемый в дальнейших экспериментах изготовленный нанoeлектрод был градуирован в стандартных растворах  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  М) амперометрически при постоянном потенциале +800 мВ относительно ХСЭ. Для проведения градуировки нанoeлектрода использовали ряд растворов пероксида водорода с известной концентрацией ( $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $5 \cdot 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $5 \cdot 10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  М). При увеличении количества осажденной платины увеличивался наклон градуировочного графика (чувствительность) за счет увеличения площади поверхности (Рис. 37).

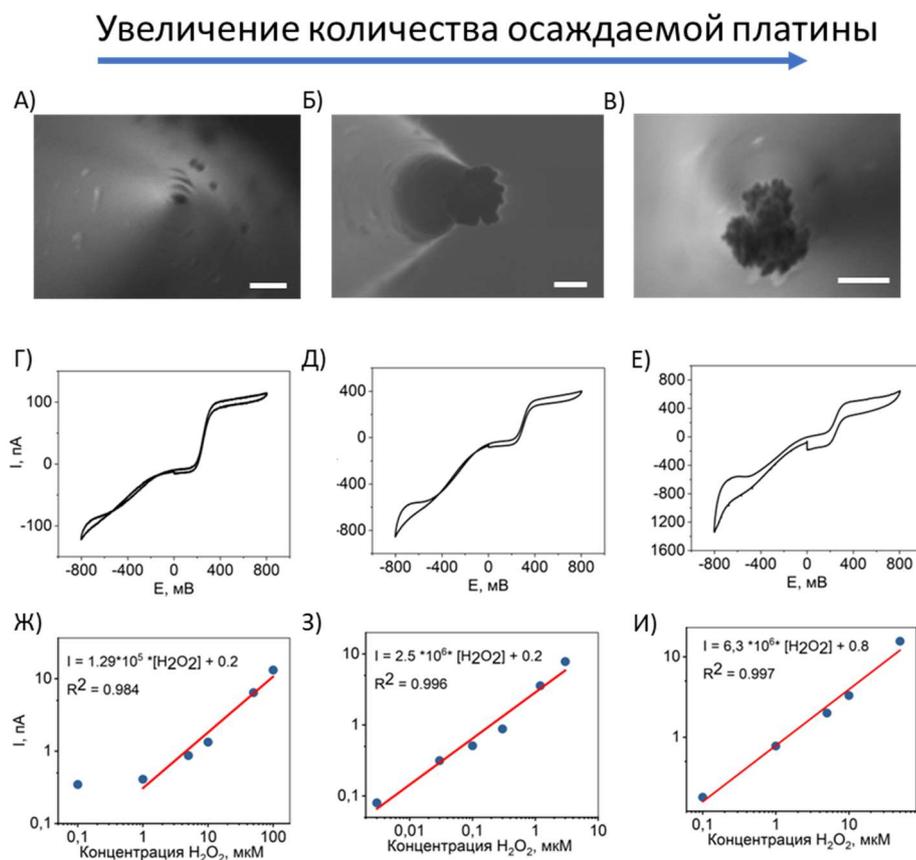


Рис. 37. Влияние степени осаждения платины на чувствительность нанoeлектродов. РЭМ изображения концов нанoeлектродов с различной степенью осаждения платины размером 250 нм (А), 800 нм (Б), 2 мкм (В). ЦВ в 1 мМ растворе  $\text{FcMeOH}$  для каждого нанoeлектрода с

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 нанoeлектродов размером 250±30 нм (Ж), 800±60 нм (З), 2,0±0,2 мкм (И).

Нанoeлектрод с  $I_{ss} \sim 100$  пА (Рис. 37 А,Г,Ж) был чувствителен по отношению к пероксиду водорода, однако его чувствительность была меньше, чем в случае нанoeлектрода с  $I_{ss} \sim 400$  пА (Рис. 37 Б,Д,З). Однако было показано, что нанoeлектрод с  $I_{ss} > 500$  пА обладал высокой чувствительностью по сравнению с другими нанoeлектродами, при этом не подходил для проведения малоинвазивных исследований, поскольку его физический размер превышал 1 мкм, что ограничивало проведение внутриклеточных измерений (Рис. 37 В,Е,И).

Аналитические характеристики платиновых нанoeлектродов с различным диаметром и степенью осаждения платины приведены в Табл. 10.

Табл. 10. Сравнение аналитических характеристик платиновых нанoeлектродов с различным размером электрохимически активной поверхности

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

<sup>1</sup> Предел обнаружения определялся как  $C_{min} = 3S_0/S$

<sup>2</sup> Точность степень близости результата измерений к истинному значению измеряемой величины.

<sup>3</sup> Инвазивность метода оценивалась при проникновении электродом в клетку с последующей оценкой жизнеспособности клетки трипановым синим.

Таким образом, при увеличении количества осажденной платины на поверхность нанoeлектрода предел обнаружения уменьшался, а чувствительность возрастала. Однако нанoeлектроды с большим количеством осажденной платины (> 2 мкм) не подходили для проведения измерений внутри клеток и сфероидов.

## 5.6. Электрохимическое определение АФК с помощью платинизированных нанозлектродов внутри единичных живых клеток

### 5.6.1 Внутриклеточное определение АФК под действием известных противоопухолевых препаратов<sup>3</sup>

Известно, что почти во всех злокачественных новообразованиях присутствуют АФК в повышенных концентрациях, что способствует развитию и прогрессированию опухоли. Однако опухолевые клетки также экспрессируют антиоксидантные белки в повышенной концентрации. Для нормального функционирования опухолевых клеток необходим баланс во внутриклеточном уровне АФК. Кроме того, большое значение играет тип генерируемых АФК, место его образования и локальная концентрация [233]. В связи с этим необходим чувствительный метод, который позволил бы исследовать уровень АФК в конкретной точке опухоли в живом организме.

На первом этапе были проведены эксперименты на двух раковых клеточных линиях 22Rv1 и PC3 (карцинома предстательной железы). Перед измерением внутриклеточной концентрации АФК клетки PC-3 и 22Rv1 инкубировали в течение 1 ч в среде при 37°C, в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> с противоопухолевыми препаратами в концентрации, составляющей IC<sub>50</sub> для каждой клеточной линии. В качестве тестируемых противоопухолевых препаратов были выбраны следующие известные препараты: доксорубицин, доцетаксел, цисплатин и абиратерон (Табл. 11).

---

<sup>3</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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%) doi: 10.1021/acs.analchem.0c01256.

Табл. 11. Концентрация лекарств и их механизм действия, используемых в эксперименте.

ЛС	IC <sub>50</sub> [мкМ]		Механизм действия	Источник
	PC3	22RV1		
Доксорубицин	1,09	0,029	Стабилизация комплексов ДНК-топоизомеразы II, интеркаляция ДНК и образование свободных радикалов	[234]
Цисплатин	562,82	26,1	Цисплатин связывается внутри и между цепями ДНК, тем самым ингибируя синтез белка.	[234]
Доцетаксел	0,081	0,003	Доцетаксел представляет собой полусинтетический таксан, который связывается с β-тубулиновым компонентом клеточных микротрубочек и, таким образом, вызывает цитотоксическую и апоптозную гибель клеток в фазе G2-M клеточного цикла.	[234]
Абиратерона ацетат	5,94	22,72	Абиратерон является селективным ингибитором 17-альфа-гидроксилазы/C17,20-лиазы (CYP17), фермента, вырабатываемого яичками, надпочечниками, а также клетками рака предстательной железы.	[235]

Выбор данных препаратов был связан с их способностью оказывать влияние на образование АФК в раковых клетках. В качестве положительного контроля был выбран пероксид водорода с концентрацией 100 мкМ. Внеклеточный уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> индуцировал увеличение внутриклеточного уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что было обнаружено на уровне единичных клеток с помощью нанозэлектрода. Данный эксперимент был необходим для апробации разработанного сенсора, чувствительного к АФК.

Перед экспериментом чашку Петри с прикрепленными к поверхности клетками трижды промывали от клеточной среды с использованием буферного раствора Хэнкса. Нанозлектрод был подведен к выбранной клетке с помощью манипулятора, причем процесс подведения нанозэлектрода контролировали в

оптический микроскоп (Рис. 38). Были отобраны хорошо прикрепленные клетки к поверхности чашки (Рис. 39А).



Рис. 38. Позиционирование нанозэлектрода над клеткой на значительном расстоянии (А), непосредственно у поверхности клетки (Б); внутри клетки(В)

Измерения проводили при постоянном потенциале +800 мВ отн. ХСЭ. После проникновения нанозэлектрода в клетку наблюдали увеличение тока, которое затем экспоненциально уменьшалось с течением времени (Рис. 39Б).

При достижении постоянного тока электрод извлекали из клетки. Затем была рассчитана разница между текущими значениями в клетке и в буферном растворе. Выбор данного потенциала, при котором проводили внутриклеточные измерения, обоснован тем, что при данном потенциале окисляются все наиболее стабильные формы АФК ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{ONOO}^-$ ). Таким образом, осуществляется измерение всех наиболее стабильных генерируемых АФК в системе [26].

Увеличение фарадеевского тока, наблюдаемое во время проникновения в клетку, обусловлено, по крайней мере частично, механическим возмущением, вызванным проколом клеточной мембраны. Такое поведение наблюдалось ранее, несмотря на использование более крупных электрохимических зондов [236]. В целях валидации методики был использован положительный контроль ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) для индуцирования окислительного клеточного стресса.

Во время проведения измерений наблюдали с помощью оптического микроскопа, как электрод слегка деформирует клеточную мембрану. Однако при такой манипуляции разрушения клетки не происходит, и клетка продолжает функционировать, что было подтверждено тестом на жизнеспособность с помощью трипанового синего. Показано, что после инкубации клеток с

трипановым синим, не происходит окрашивания клетки, что свидетельствует об ее целостности, поскольку краситель не попадает внутрь клетки (Рис. 39 В, Г, Д).

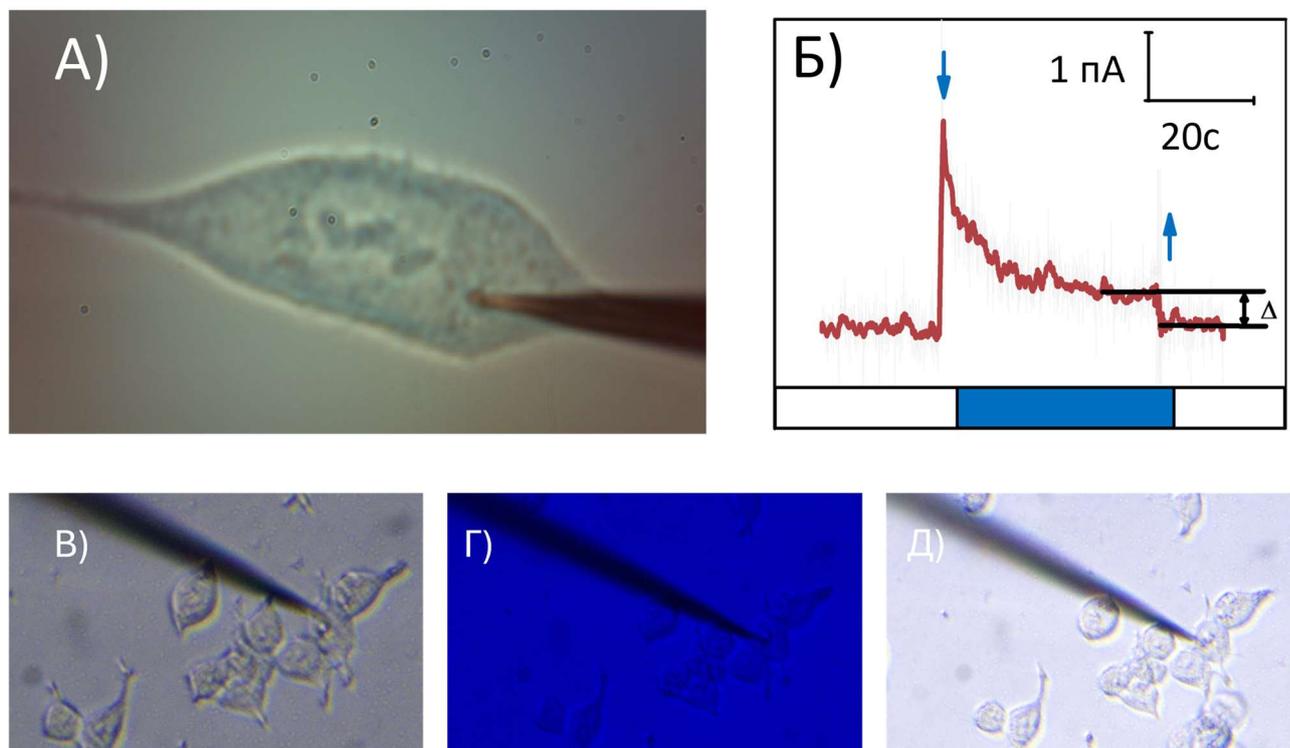


Рис. 39. Процесс внутриклеточного измерения АФК. (А) Микрофотография клетки РС3 с введенным в нее нанозлектродом (Б) Амперограмма, полученная при осуществлении измерения внутри клетки. Стрелками показано проникновение внутрь клетки и извлечение нанозлектрода из клетки. Разница между значениями показана значком «дельта». Измерения проведены при постоянном потенциале +800 мВ отн. ХСЭ. Микрофотографии, сделанные в оптический микроскоп, клеток с нанозлектродом до (В), в процессе (Г) и после(Д) инкубации с 0,4%-ным раствором трипанового синего.

При инкубации раковых клеток с тестируемыми ЛС значения тока в клетках было различным, следовательно наблюдалась вариативность в концентрации АФК (Рис. 40А).

Уровень тока внутри клетки под влиянием доксорубицина намного выше, чем в контрольной клетке, что указывало на влияние доксорубицина на клетки с последующей внутриклеточной продукцией АФК (Рис. 40А). Уровни АФК в клетках, инкубированных с доксорубицином, цисплатином и доцетакселом, значительно выше, чем в контрольных клетках РС3 и 22Rv1 и клетках, инкубированных с абиратероном (Рис. 40Б, В).

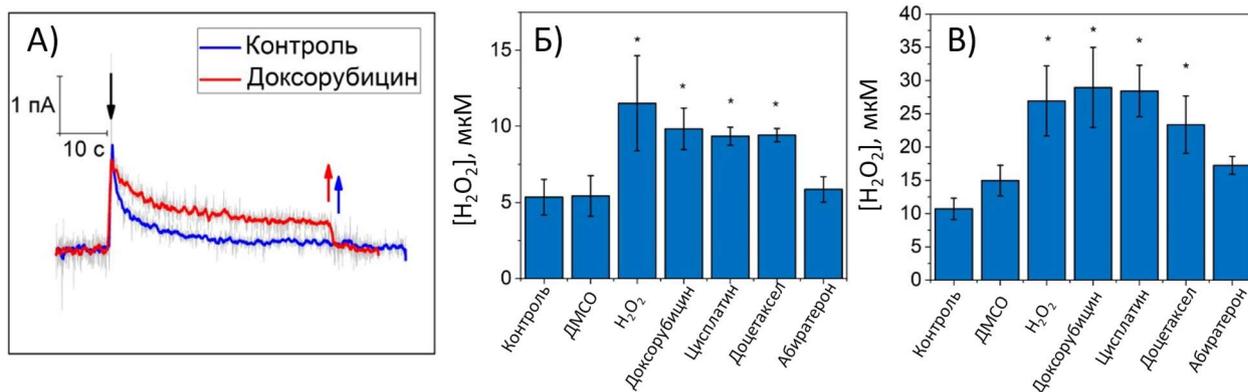


Рис. 40. Результаты измерения АФК внутри клеток под воздействием противоопухолевых препаратов. (А) Амперограммы, полученные внутри контрольной клетки и клетки, инкубированной с доксорубицином. Измерения проведены при постоянном потенциале +800 мВ отн. ХСЭ. Сравнение уровня АФК внутри клеток РС-3 (Б) и 22RV1 (В) под влиянием различных противоопухолевых препаратов. Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$ стандартная ошибка среднего; \* -  $p < 0,05$  (ANOVA).

Ранее было продемонстрировано, что продукцию АФК может модулировать цитотоксическое действие таксанов в раковых клетках [237–239]. Например, лечение доцетакселом вызывает всплеск уровня АФК, продуцируемых НАДФН-оксидазой [240]. Также цисплатин индуцирует выработку АФК и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> посредством активации НАДФН-оксидазы в клеточных линиях рака предстательной железы человека [241]. Абиратерона ацетат (Zytiga, Janssen Biotech) - новый ингибитор цитохрома P450 (CYP) 17, который подавляет выработку андрогенов в организме. Образование АФК под влиянием абиратерона не наблюдалось в ходе экспериментов.

Чтобы оценить состояние нанозэлектрода после внутриклеточных исследований, были проведены обязательные измерения ЦВ в 1 мМ растворе FcMeOH до и после проникновения в клетки.

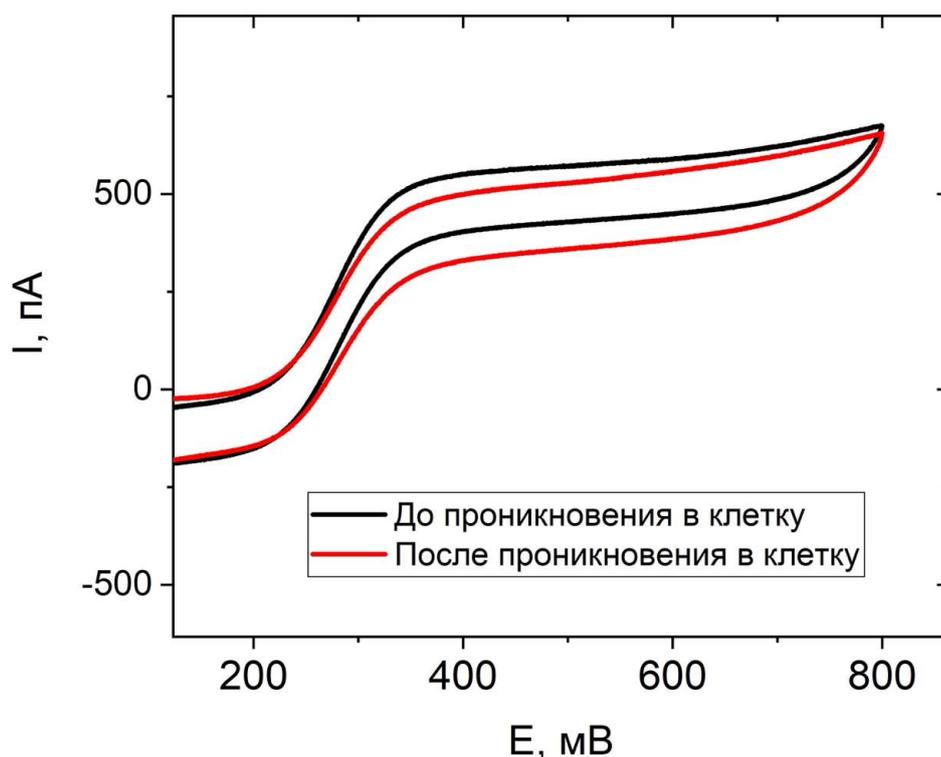


Рис. 41. ЦВ наноэлектрода, полученные в 1 мМ растворе FcMeOH до и после проникновения наноэлектродом в клетку.

Форма ЦВ в растворе 1 мМ FcMeOH не изменялась после проникновения в наноэлектродом в клетку, что свидетельствует об отсутствии изменений поверхности и стабильности наноэлектрода (Рис. 41). В дальнейшем при проведении исследований на *in vitro/in vivo* биологических системах всегда измеряли ЦВ до и после экспериментов.

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 [242].

## 5.6.2 Определение АФК под воздействием перспективных синтезированных противораковых препаратов

### 5.6.2.1 Внутриклеточное определение АФК под воздействием перспективных металлоорганических соединений<sup>4</sup>

После апробации работы сенсора внутри клеток под воздействием известных противораковых препаратов были проведены исследования с использованием новых синтезированных противораковых препаратов, которые были предоставлены научными группами кафедры органической химии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством д.х.н., проф. Белоглазкиной Е.К., к.х.н. Красновской О.О., к.х.н. Мачулкина Э.А. и к.х.н. Ямансарова Э.Ю.

На первом этапе были исследованы металлоорганические комплексные соединения меди, которые являются одними из наиболее перспективных типов противоопухолевых препаратов, и их механизм действия основан на выработке большого количества АФК, которые влияют на последующую гибель опухолевых клеток. Причем комплексные соединения  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cu}^+$  менее токсичны и являются более дешевыми альтернативами комплексам платины [243, 244].

Окислительно-восстановительные свойства ионов меди, их способность к внутриклеточному восстановлению, их избирательное накопление в зонах гипоксии и их стабильность в кровотоке демонстрирует, что медьсодержащие терапевтические средства могут быть использованы не только в терапевтических целях, но и в качестве диагностических и тераностических средств [245]. Внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы определяют

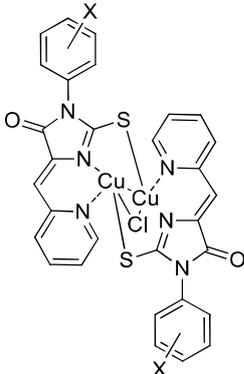
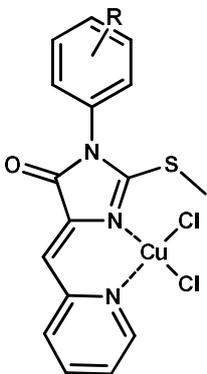
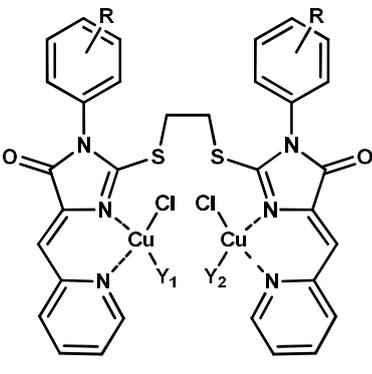
---

<sup>4</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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%) doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01196

жизнеспособность клеток, где нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза может повлиять на гибель клеток [246].

С помощью разработанного нанoeлектрода, чувствительного к АФК, мы протестировали представителей трех типов медьсодержащих координационных соединений на клеточной линии MCF-7 (аденокарциномы протоков молочной железы человека) (Табл. 12).

Табл. 12. Исследуемые комплексные соединения меди трех типов

Тип 1		Тип 2		Тип 3			
							
№	X	№	X	№	X	Y1	Y2
2k	3-F	30k	4-F	52k	4-OMe		
8k	4-Cl	36k	2-Br, 4-F	53k	4-OEt		
11k	4-OMe	41k	4-OEt	61k	3-Br		
16k	4-NO <sub>2</sub>	44k	2-tBu	65k	2-Br, 4-F	Cl	-
				71k	4-Br		
				72k	4-Cl		

Выбор клеточной линии для эксперимента был обусловлен активным применением медьсодержащих координационных соединений при лечении опухоли молочной железы [247]. Также для обнаружения АФК в опухолевых клетках MCF-7 помимо электрохимического метода был использован флуоресцентный метод на основе коммерчески доступного красителя, чувствительного к пероксиду водорода, Cell ROX Deep Red ( $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{исп}} = 644/665$  нм). Основная идея заключалась в валидации и сравнении электрохимического и флуоресцентного метода с сопоставлением полученных результатов (Рис. 42).

Сравнение результатов определения уровня АФК в опухолевых клетках MCF-7, измеренных двумя различными методами, представлено на Рис. 42.



Рис. 42. Результаты измерений уровня АФК внутри клеток MCF-7 электрохимическим и флуоресцентным методами. При проведении измерений проведено нормирование полученных значений на уровень контрольных клеток.

Результаты, полученные электрохимическим методом, в целом, соответствуют измерениям, полученным с помощью флуоресцентного метода. Однако основным преимуществом электрохимического метода является возможность определять АФК количественно внутри клеток, что довольно сложно сделать флуоресцентным методом (Рис. 42).

Как видно из полученных данных, структурно даже сходные координационные соединения способны по-разному генерировать АФК. В координационных соединениях типа 1 веществом, которое способствовало активной выработке АФК, было соединение 16к.

Способность координационных соединений 2-го типа генерировать АФК внутри клетки также неоднородна внутри группы. Очевидно, что структура лиганда определяет способность координационных соединений генерировать АФК. Скорее всего, чем сложнее происходит восстановление координационного

соединения внутри клетки с образованием комплекса одновалентной меди, тем хуже его способность генерировать АФК.

Было обнаружено, что координационные соединения 3-го типа (61k и 72k) наиболее активно вырабатывают АФК.

Как ранее было показано, различия в структуре лиганда влияют на окислительно-восстановительный потенциал  $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$ , что, по-видимому, влияет на способность координационных соединений генерировать АФК внутри клетки. Присутствие меди в обеих степенях окисления  $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$  (соединения третьей группы) в одном координационном соединении способствует наиболее активному образованию АФК внутри клетки. Координационные соединения, содержащие ионы  $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$ , можно считать окислительно-восстановительным буфером, который поддерживает постоянное равновесие между окисленной и восстановленной формами ионов меди.

Результаты, полученные двумя методами обнаружения АФК, хорошо коррелируют между собой, и разница в полученных данных может быть объяснена разной чувствительностью флуоресцентного красителя и нанoeлектрода.

#### 5.6.2.2 Внутриклеточное определение АФК под воздействием таргетных соединений<sup>5</sup>

На следующем этапе нами было изучено действие ряда таргетных препаратов, которые представляли собой конъюгаты противоопухолевого

---

<sup>5</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 1) 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., Tafenko 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%) doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01196; 2) 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., Zamyatin 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%) doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01157; 3) Petrov R.A. et al. New

соединения и вектора, специфичного либо к асиалогликопротеиновым рецепторам (ASGP-R) на поверхности клеток либо к рецепторам простат-специфичного мембранного антигена (ПСМА) (Рис. 43).

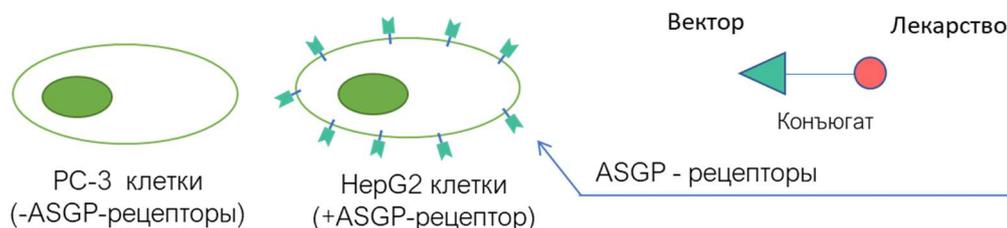


Рис. 43. Схематическое изображение взаимодействия вектора, включенного в таргетное соединение, с лигандами на поверхности клеток

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.

Взаимодействие ASGP-R с GalNAc используется для доставки лекарственных веществ и генов в печень [248], что является основой для разработки таргетных препаратов, которые могут быть доставлены непосредственно в клетки печени.

Были исследованы 4 производных конъюгата GalNAc и доцетаксела, отличающихся различной длиной линкера, связывающего доцетаксел и GalNAc. (Рис. 44). Эксперименты были проведены на двух клеточных линиях, экспрессирующих ASGP-R рецепторы (HepG2 - гепатоцеллюлярная карцинома

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%) doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00980 4) 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%) doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00042

человека) и не экспрессирующие данный вид рецепторов (PC-3 -аденокарцинома предстательной железы человека).

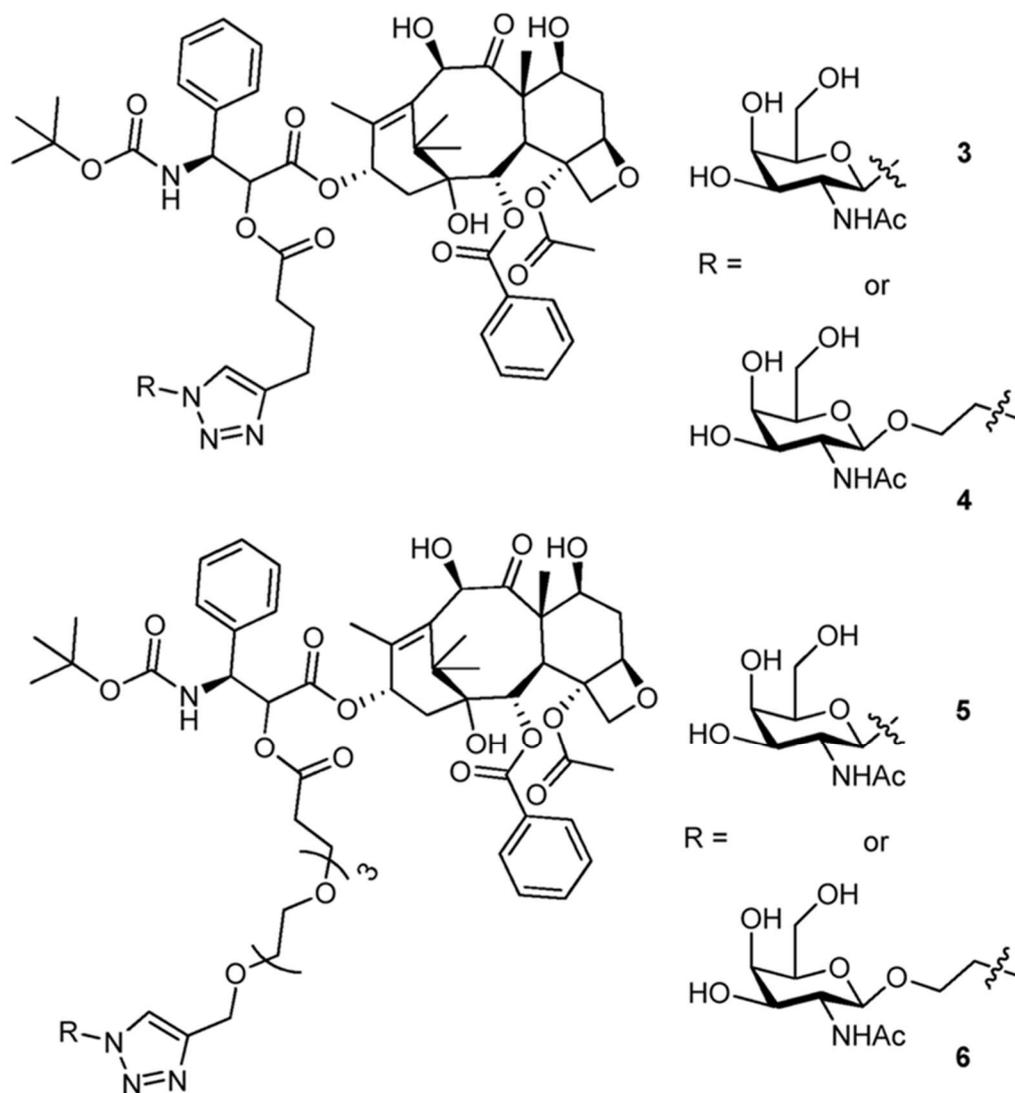


Рис. 44. Исследуемые конъюгаты на основе доцетаксела и GalNAc

После инкубации конъюгатов и доцетаксела с клетками PC3 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 PC-3 затруднено (Рис. 45А).

После инкубации соединений с клетками HepG2 (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. 45Б), что свидетельствовало об его улучшенном проникновении.

Для оценки рецептор-опосредованного эндоцитоза осуществляли ингибирование ASGP-R путем инкубации с избыточным количеством GalNAc (100 мкМ). При добавлении соединения 6 к клеткам HepG2 с использованием нанoeлектродов было показано, что существенное снижение уровня АФК было в более чем 1,6 раза после ингибирования рецепторов (Рис. 45В, Г). Эксперименты с меченым Су5 соединением 6 показали схожие результаты. После ингибирования ASGP-R вещество существенно хуже проникало внутрь клеток HepG2 (Рис. 45Д, Е). Таким образом, было установлено, что конъюгат 6 проникает внутрь клеток посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

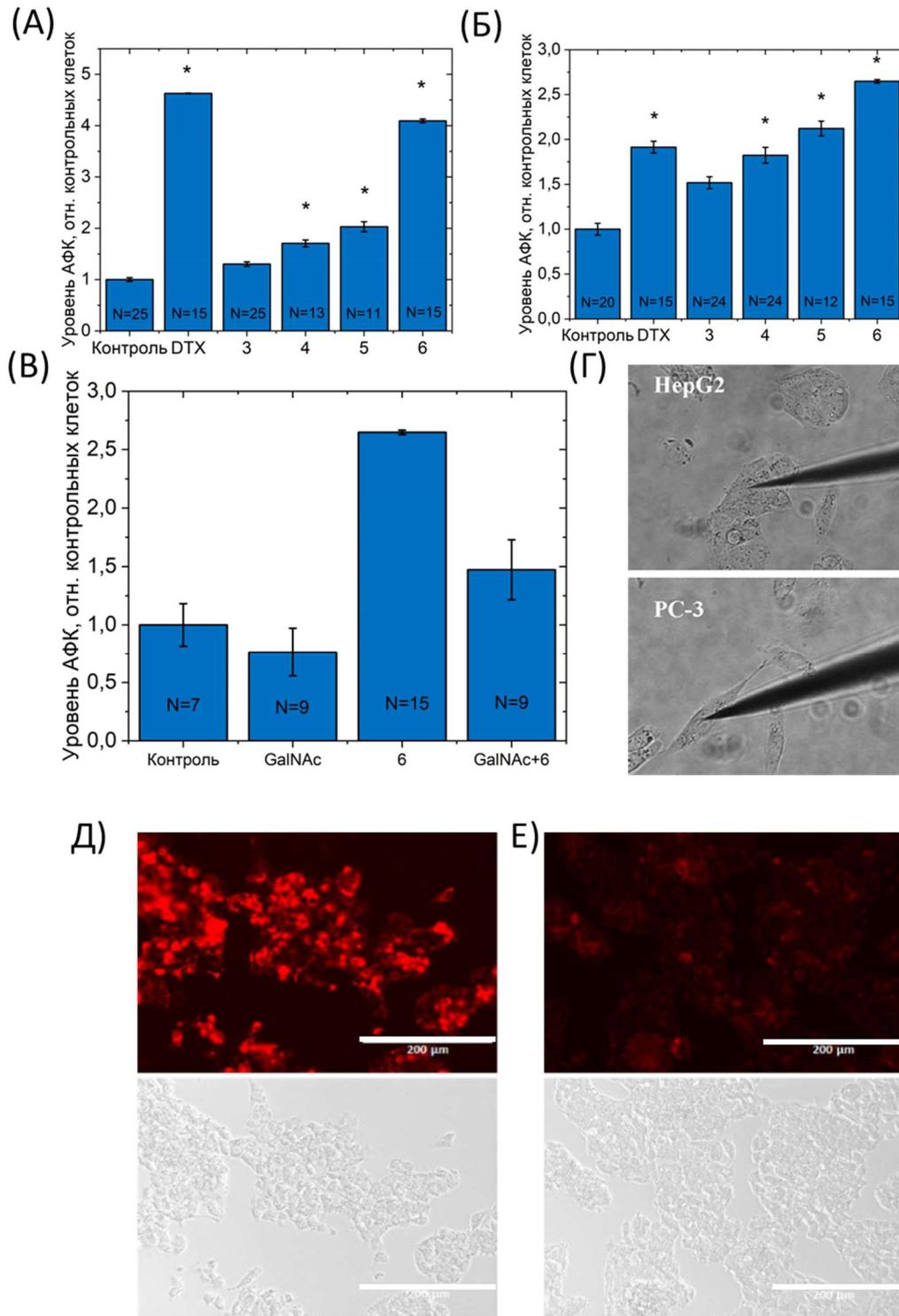


Рис. 45. Измерение уровня АФК в единичных живых клетках HepG2 при ингибировании ASGP-R под воздействием соединения 6. Измерения АФК внутри клеток: PC-3 (А), HepG2 (Б) и HepG2 в присутствии 100 мкМ GalNAc (В), обработанных конъюгатами 3-6 или доцетаксела (DTX) в течение 1 часа. (Г) Микрофотографии клеток PC3 и HepG2. Флуоресцентные (вверху) и светлопольные (внизу) изображения клеток HepG2, обработанных соединением 6, меченных Cy5 (Д) и в присутствии 10 мМ GalNAc(Е). Масштабный отрезок 200 мкм. Количество измеренных клеток в эксперименте показано на графике: \* -  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ) в сравнении с контролем

На следующем этапе в качестве препаратов, специфичных к ПСМА-рецепторам, были выбраны конъюгаты с действующим веществом на основе монометилауристатина Е (ММАЕ) и доцетаксела. Данные конъюгаты состояли из части, специфичной к ПСМА рецепторам и непосредственно действующего вещества (Рис. 46). Для того, чтобы оценить, насколько препарат эффективно проникает и воздействует на клетки, в качестве клеточных линий (аденокарцинома предстательной железы) были выбраны культуры, которые экспрессируют ПСМА-рецепторы на поверхности (22Rv1), либо не экспрессируют (PC3).

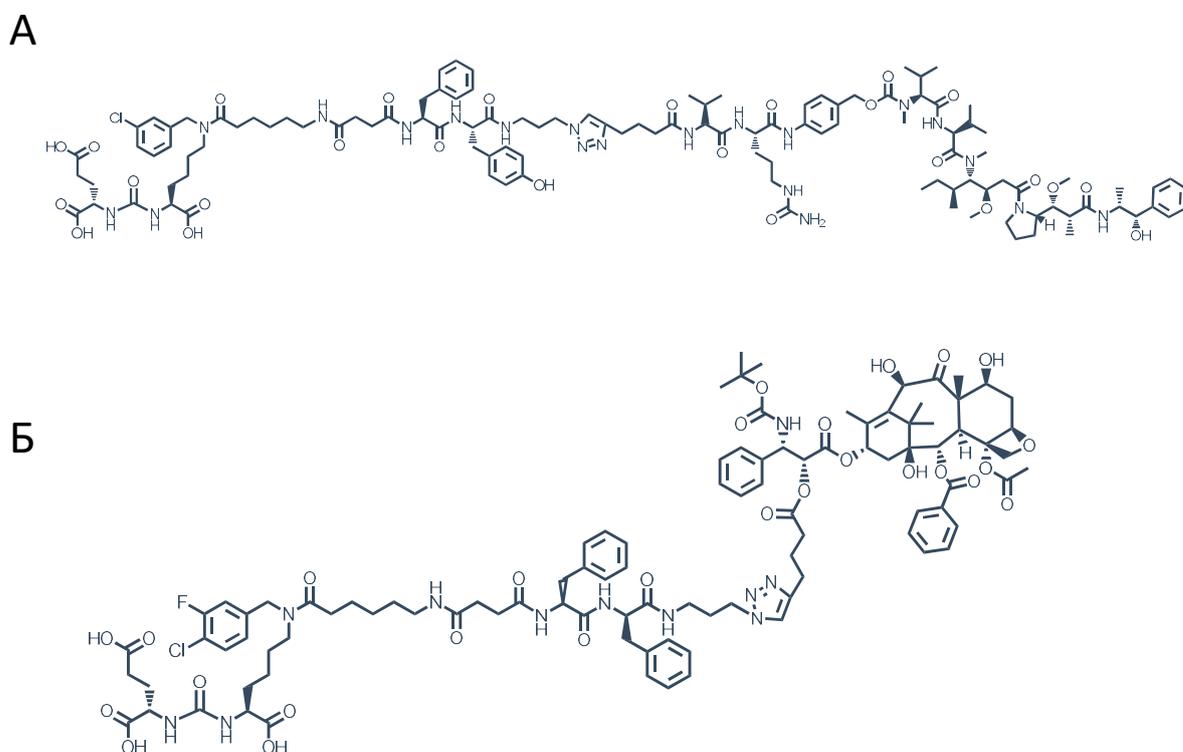


Рис. 46. Структурные формулы конъюгатов, специфичных к ПСМА-рецепторам на основе (А) ММАЕ и (Б) доцетаксела.

На первом этапе было изучено влияние доцетаксела и его конъюгата на внутриклеточную продукцию АФК. Многие исследования продемонстрировали важность образования АФК в качестве механизма исследования при обработке опухолевых клеток таксанами [249]. Клетки были проинкубированы в течение 1 ч при 37°C с этими препаратами, чтобы соединения успешно смогли проникнуть

в одиночные раковые клетки. После инкубации клеточной линии РС3 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 РС3(Рис. 47А).

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. 47Б).

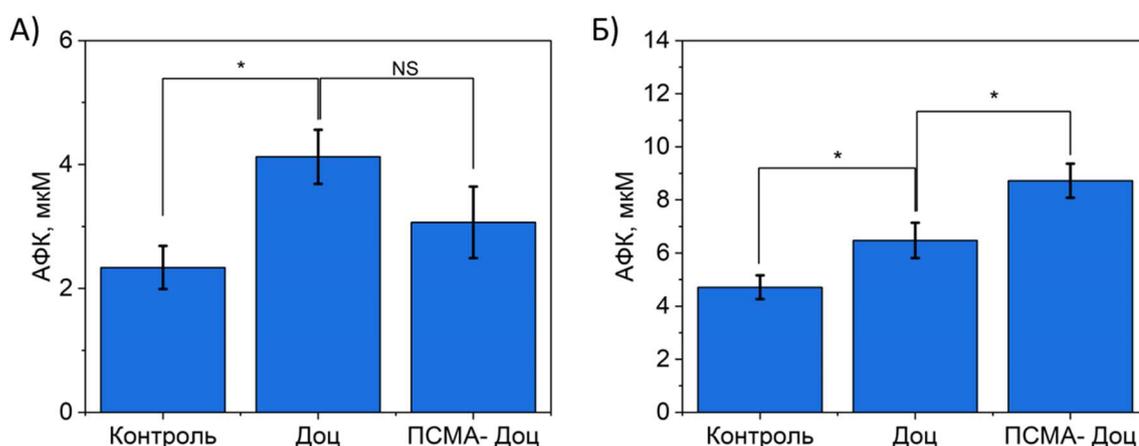


Рис. 47. Влияние конъюгата ПСМА-Доц на генерацию АФК в клеточных линиях рака предстательной железы РС3 и 22Rv1. Сравнение уровня АФК внутри клеток РС3 (А) и 22Rv1 (Б) под влиянием доцетаксела и ПСМА-доцетаксела. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* -  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ).

В течение часа значительное повышение уровня АФК наблюдалось в случае добавление ММАЕ и ПСМА- ММАЕ. Стоит отметить, что уровень АФК при действии ПСМА-ММАЕ превышал эффект самого ММАЕ и был в два раза

выше значений для контрольной клеточной линии без действия препаратов, что свидетельствует о наибольшей эффективности этого вещества для ПСМА-положительной клеточной линии (Рис. 48А). Эксперименты на клеточной линии 22Rv1 также продемонстрировали эффективность ММАЕ и ПСМА-ММАЕ. Уровень АФК при воздействии ПСМА-ММАЕ, увеличился почти в 3 раза по сравнению с контролем. Таким образом, ММАЕ и ПСМА-ММАЕ эффективно вызывали окислительный стресс в обеих клеточных линиях и тем самым эффективно индуцировали гибель клеток (Рис. 48Б).

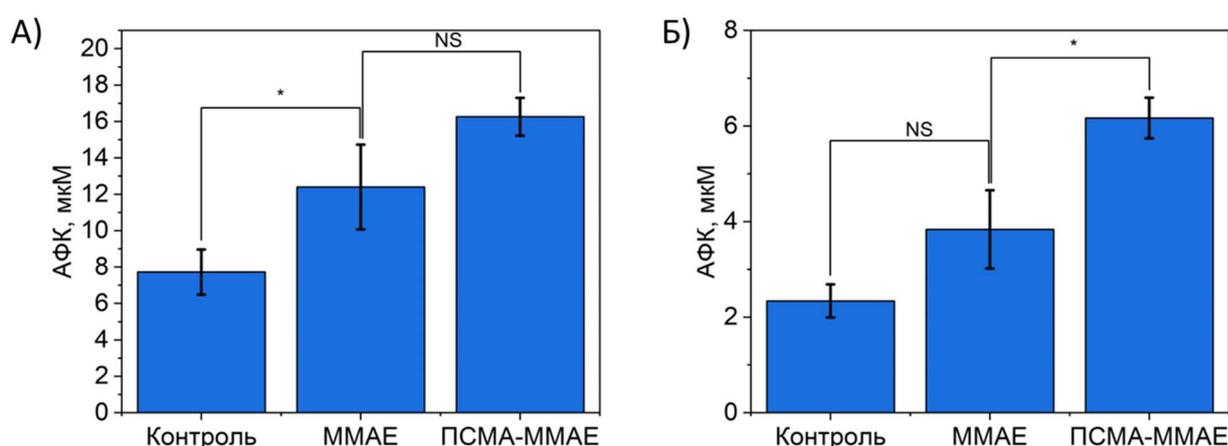


Рис. 48. Влияние конъюгата ПСМА-ММАЕ на генерацию АФК в клеточных линиях рака предстательной железы PC3 и 22Rv1. Сравнение уровня АФК внутри клеток PC3 ( А ) и 22Rv1( Б ) под влиянием ММАЕ и ПСМА-ММАЕ. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \*:  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ).

Таким образом, на таргетных препаратах было продемонстрировано, что данные препараты способны проникать внутрь клеток при наличии соответствующих рецепторов гораздо эффективнее своих предшественников. Результаты измерений АФК и проникновения перспективных опухолевых соединений в клетки были подтверждены с использованием флуоресцентных и иных методов. Данные представлены в опубликованных статьях[250].

### 5.7. Определение АФК внутри единичных нейтрофилов под воздействием *E. coli* и *S. aureus*<sup>6</sup>

Данное исследование было выполнено совместно с проф. Плесковой С.Н. и коллегами из Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского.

Изучение АФК в нейтрофилах является важным аспектом для понимания механизмов иммунной системы и роли нейтрофилов в защите организма от инфекций. Нейтрофилы играют ключевую роль в иммунной системе, участвуя в фагоцитозе. Изучение АФК в нейтрофилах важно по нескольким причинам: во-первых, нейтрофилы вырабатывают АФК для уничтожения бактерий и других патогенов. Особенно значимо исследование АФК при бактериальных инфекциях, чтобы понять, как нейтрофилы противостоят микроорганизмам и защищают организм. Во-вторых, нейтрофилы являются ключевыми участниками воспалительных процессов. АФК участвуют в регулировании иммунного ответа, активации других клеток иммунной системы и контроле воспаления (Рис. 49).

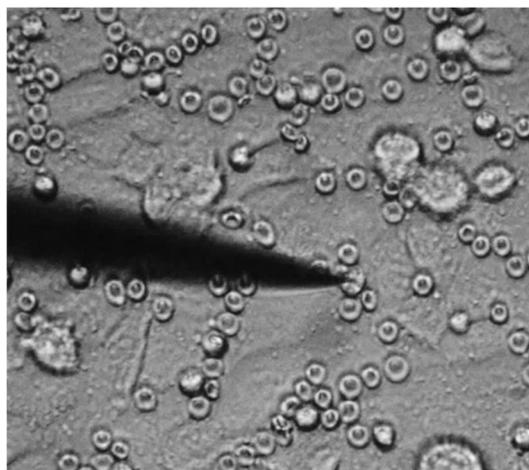


Рис. 49. Микрофотография нейтрофилов с подведенным к одному из них нанозлектродом.

---

<sup>6</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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%) doi: 10.3390/biomedicines11051361

Одним из важных подходов для изучения АФК являются электрохимические методы, с помощью которых возможно оценивать продукцию АФК внутри единичной клетки в процессе ее активации. Чрезвычайно важно оценивать не только суммарную способность образовывать АФК всей популяцией нейтрофилов, но и разрабатывать методы, которые позволили бы оценить способность формировать АФК отдельными единичными клетками с высоким временным разрешением.

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-продуцирующей способности нейтрофилов было проведено с помощью платинового нанoeлектрода, с помощью которого проникали внутрь нейтрофилов, адгезированных на дне чашки Петри (Рис. 50А). При столкновении фаголизосом внутри нейтрофила, заполненных АФК, с рабочей электрохимически активной поверхностью происходило окисление АФК. На данном принципе основана электрохимическая цитометрия с внутриклеточным воздействием на везикулы (IVIEC) [251]. Данный процесс сопровождался увеличением тока на электроде (спайк) (Рис. 50Б). Измерения проводили кулонометрически, площадь под каждым спайком представляла собой полное окисление АФК в каждой фаголизосоме (Рис. 50В).

Окисление АФК, выбрасываемых из отдельных везикул, приводит к увеличению тока на электроде. Таким образом, измерения проводили кулонометрически, и площадь под амперограммой представляла собой полное окисление АФК в каждой везикуле (Рис. 50Б, В).

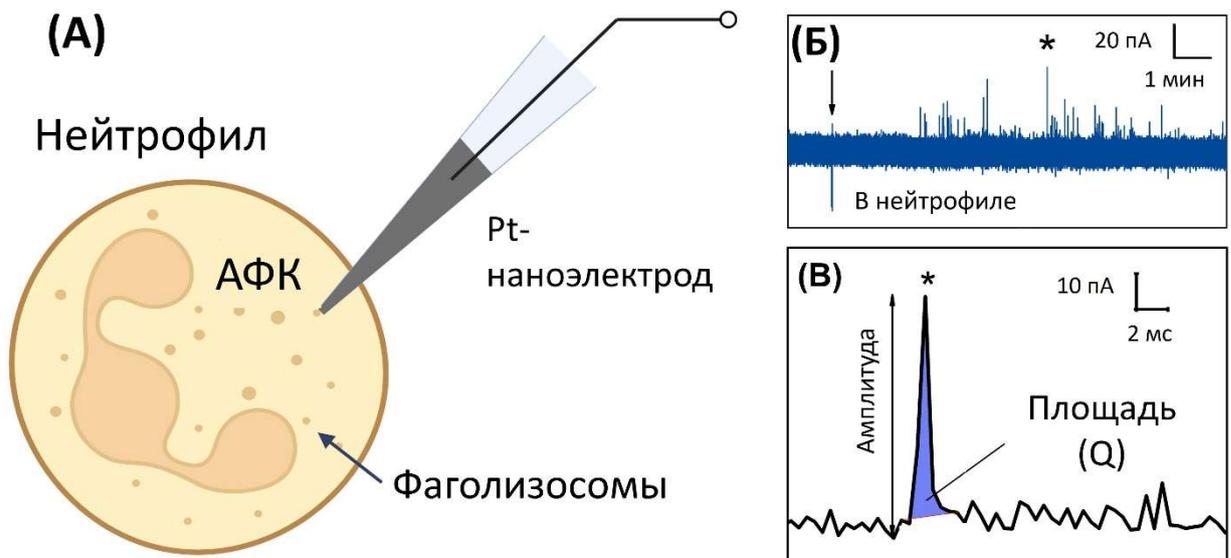


Рис. 50. Принцип электрохимического определения АФК внутри нейтрофилов с использованием Pt наноэлектрода. А) Схема эксперимента, демонстрирующая внутриклеточное измерение Б) Хроноамперограмма, записанная внутри нейтрофила В) Увеличенный спайк отмеченный на хроноамперограмме

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. 51А, 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. 51А, Б).

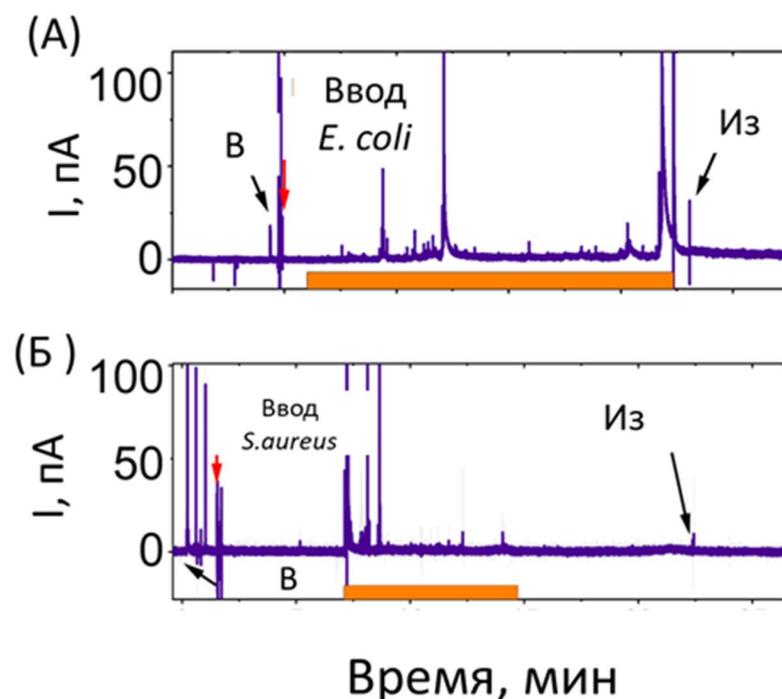


Рис. 51. Амперограммы, измеренные в единичном нейтрофиле, при потенциале +800 мВ отн. ХСЭ при воздействии *E. coli* (А) и *S. aureus* (Б). МОИ 50, измерения проводились в режиме реального времени, оранжевым выделены участки амперограммы с наиболее ярко выраженной генерацией АФК.

Для количественной оценки генерации АФК определяли площадь и амплитуду каждого спайка. На Рис. 52 А, Б 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 после активации *S. aureus* был значительно выше, чем уровень АФК после активации клеток *E. coli*.

В целом, уровень АФК в нейтрофилах после активации *S. aureus* был значительно выше, чем уровень АФК после активации клеток *E. coli*. Согласно работе фагоцитоз неопсонизированных *S. aureus* наблюдается через 7 мин после ко-инкубации нейтрофилов с бактериями, а через 15 мин фагоцитарный индекс достигал 70%.

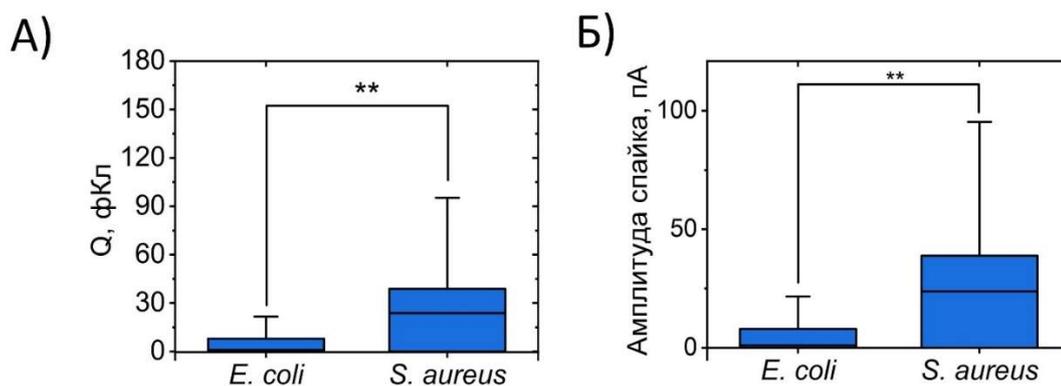


Рис. 52. Сравнение выработки АФК внутри нейтрофилов под действием двух разных культур. а) средняя площадь под кривой спайка, показанная как заряд, прошедший при окислении фаголизосомы. б) средняя амплитуда спайков. Количество спайков для *E. coli* (N = 166), *S. aureus* (N=392)\*\* -  $p < 0,001$  (ANOVA)

Таким образом, с помощью разработанного метода были изучены быстрые процессы с временным разрешением  $\sim 0,5$  мс, что позволило измерить заряд и амплитуду возникающих спайков, характеризующих фаголизосомы, которые образуются после воздействия бактерий на единичные живые нейтрофилы.

### 5.8. Измерение концентрации пероксида водорода в глазных жидкостях кроликов *ex vivo*<sup>7</sup>

В рамках разработки наноэлектрода, чувствительного к АФК, нами было определено содержание пероксида водорода в биологических жидкостях, а именно в слезной и внутриглазной жидкости кроликов. Основная идея эксперимента заключалась в проверке антиоксидантных свойств ранее разработанных СОД1 и полимерных частиц на основе СОД1 (НаноСОД1), которые эффективны для лечения воспалительных процессов в глазу. Следует отметить, что СОД1 катализирует дисмутацию супероксидного радикала на молекулярный кислород и пероксид водорода. Таким образом, после инстилляции нативной СОД1 и частиц на основе СОД1 уровень пероксида водорода в слезах животных повышался, достигая максимума через 30 мин (Рис. 53А).

Данные представлены для каждого кролика для 5 интервалов времени: до закапывания (контроль) и спустя 10, 30, 60 и 120 мин после последнего закапывания. Наблюдали некоторую вариативность в пределах одной временной группы ввиду индивидуальных особенностей каждого подопытного кролика. Для всех животных было характерно уменьшение уровня  $H_2O_2$  с увеличением интервала времени, прошедшего после закапывания наночастиц. Для визуализации динамики во времени среди подопытных животных для каждого кролика были рассчитаны разностные значения уровня  $H_2O_2$  для образцов слезной жидкости из глаза, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали буфер. Полученные данные были усреднены и

---

<sup>7</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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., Eremeev 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%) doi: 10.3390/biomedicines9040396

представлены для 5 кроликов в виде средних значений со стандартными ошибками.

Кроме того, определяли уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  в слезной и внутриглазной жидкости как показатель функционирования в этих жидкостях наночастиц СОД. Таким образом, после инстилляции Нано-СОД1 уровень пероксида водорода в слезах животных повышался, достигая максимума через 30 мин (Рис. 53А). По-видимому, это было связано с достаточно эффективной сорбцией Нано-СОД1 на поверхности глаза, что приводит к увеличению концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  через 30 мин. Однако к 1 ч концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  возвращалась к фоновому уровню, что, скорее всего, было связано с тем, что НаноСОД1 был смыт слезой.

В отличие от слезы заметное повышение уровня пероксида водорода во внутриглазной жидкости наблюдалось только через 30 мин после закапывания Нано-СОД1. Очевидно, для проникновения НаноСОД1 в переднюю камеру глаза требуется некоторое время. В то время как уровни СОД1 оставались постоянными в течение часа после закапывания препарата (Рис. 53), уровень пероксида водорода во внутриглазной жидкости непрерывно повышался в течение 2 ч. Можно предположить, что этот факт свидетельствует о продолжающемся функционировании НаноСОД1 в передней камере глаза.

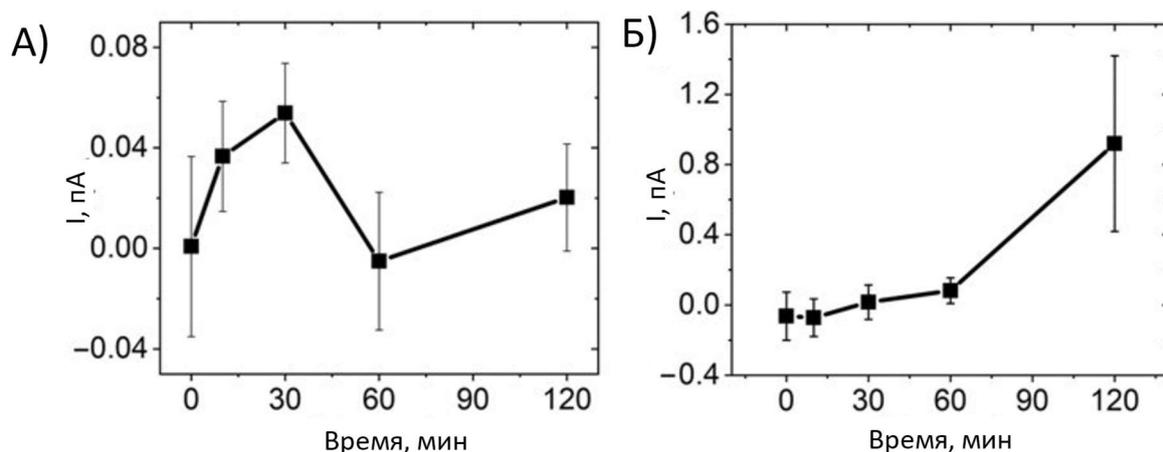


Рис. 53. Динамика уровня  $I \sim \text{H}_2\text{O}_2$  в слезах и внутриглазной жидкости кроликов после однократной инстилляцией Нано-СОД1. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего для 5 кроликов. Сила тока пропорциональна концентрации пероксида водорода. Динамику  $\text{H}_2\text{O}_2$  рассчитывали как разницу между левым (опытным) и

правым (контрольным) глазами каждого животного в слезной ( А ) и внутриглазной жидкости ( Б ).

Таким образом, с помощью разработанного нанозэлектрода удалось эффективно определить уровень пероксида водорода в биологических жидкостях кроликов, таких как слезная и внутриглазная жидкость. Проведенный эксперимент подтвердил антиоксидантные свойства наночастиц на основе СОД1, продемонстрировав временное увеличение концентрации  $H_2O_2$  после инстилляций Нано-СОД1, что свидетельствует о его активной работе в глазных тканях. Наблюдаемое повышение уровня пероксида водорода и его постепенное снижение указывает на динамику взаимодействия наночастиц с поверхностью глаза и их проникновение в переднюю камеру, что открывает перспективы для дальнейшего использования Нано-СОД1 в лечении воспалительных заболеваний глаз.

### 5.9. *In vivo* определение АФК внутри опухоли мыши под воздействием доксорубина<sup>8</sup>

Одной из задач было исследование уровня АФК внутри опухоли мыши *in vivo*. Мыши с имплантированными опухолями 4Т1 были предоставлены к.х.н. Абакумовым М.А. и к.б.н. Гараниной А.С.

Для валидации метода на *in vivo* модели опухоли 4Т1 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

---

<sup>8</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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%) doi: 10.1021/acs.analchem.0c01256

контрольных животных, которым был введен фосфатный буферный раствор (Рис. 54А).

Исследование на мышах с опухолями требовали, во-первых, точного позиционирования электродов с помощью микроманипулятора, во-вторых, настройки системы с целью минимизации помех электрических сигналов при дыхании и произвольных движений мыши. Таким образом, мышь была тщательно закреплена на подложке перед проведением экспериментов. Более подробная информация представлена в Материалах и методах.

После подготовки мыши к измерениям электрод подвели к опухоли с помощью манипулятора и под углом 45 градусов вводили в опухоль с шагом 200 мкм. Затем внутри опухоли на глубине 1500 мкм были измерены ЦВ (от -800 до +800 мВ отн. Ag/AgCl, скорость развертки 400 мВ/с) (Рис. 54А).

В группе мышей, которым был введен липосомальный доксорубицин, значения тока значительно увеличивались на глубине 1000-1500 мкм (Рис. 54Б).

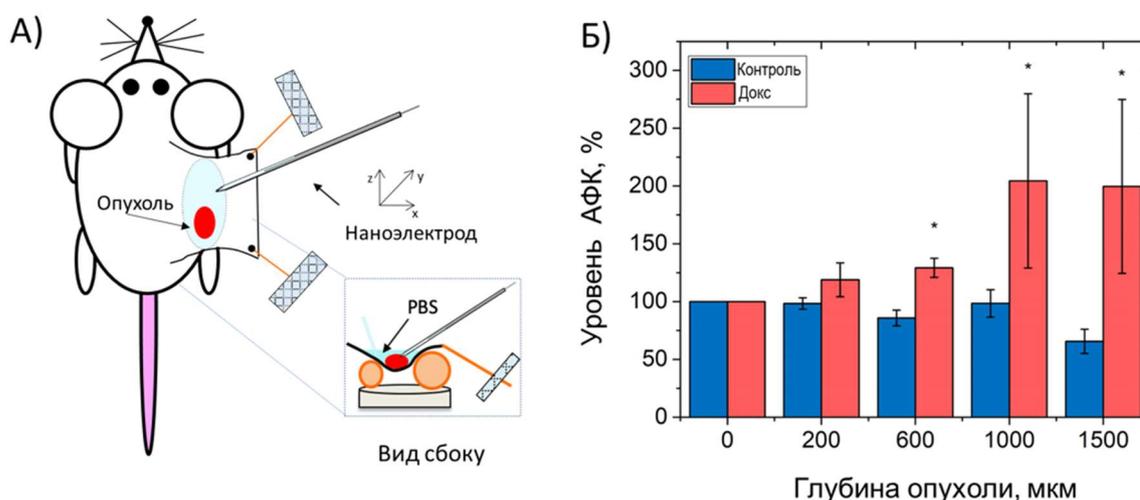


Рис. 54. Измерения АФК внутри опухоли мыши *in vivo*. (А) Схема измерения АФК *in vivo* (Б) Профиль АФК в опухоли мыши 4Т1. Измерение проводилось с использованием ЦВ от -800 мВ до +800 мВ отн. ХСЭ. Вводимая доза липосомального доксорубицина составляла 2 мг/кг. Измерения проводились через 24 часа после введения препарата. Дальнейшие измеренные значения нормировали к фоновому уровню в контрольной группе. Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка,  $n = 3$ , \* -  $p < 0,05$  (ANOVA).

Стоит отметить, что доксорубицин 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. 55).

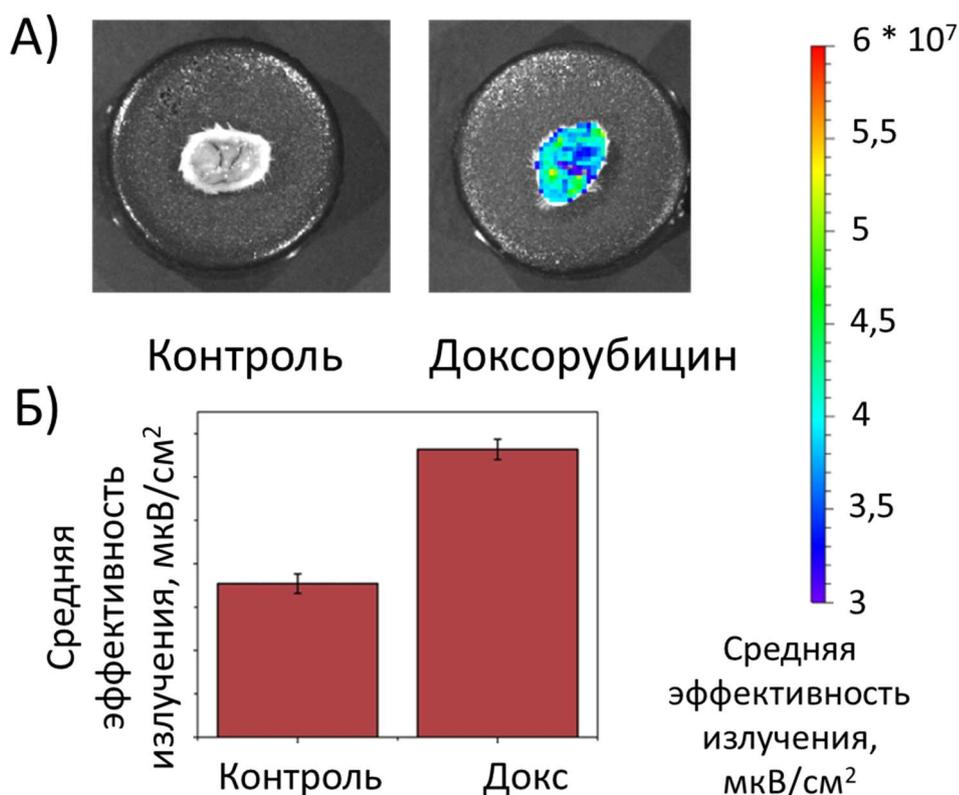


Рис. 55. Результаты измерений с помощью IVIS. (А) Изображения IVIS опухоли мышей *ex vivo*. (Б) Оценка средней эффективности излучения доксорубина, накопленного внутри опухоли у мыши, получавшей доксорубин, в сравнении с контрольной мышью.

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

### 5.10. Определение соединений, содержащих Pt(II), внутри биологических моделей *in vitro/in vivo*<sup>9</sup>

Для определения комплексов Pt(II) с помощью платинового нанозэлектрода 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 анализа - комплекса Pt(II) был использован *цис*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (цисплатин). На ЦВ, записанной в 0,5 мМ растворе цисплатина с помощью изготовленного углеродного нанозэлектрода не наблюдалось четкого пика окисления  $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$ , в отличие от платинового нанозэлектрода, который был чувствителен по отношению к цисплатину. При записи ЦВ с использованием платинового нанозэлектрода 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  $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$  (Рис. 56).

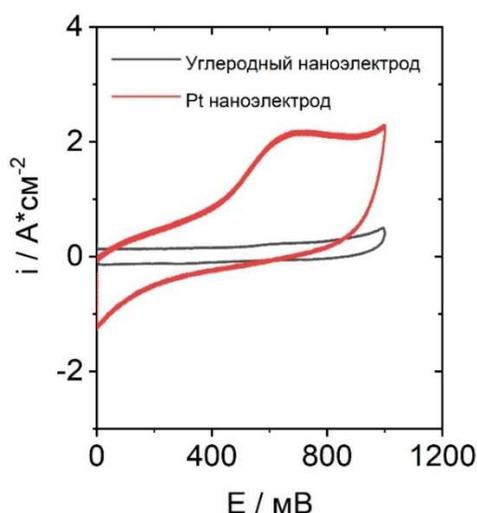


Рис. 56. ЦВ, записанные в 0,5 мМ растворе цисплатина с помощью углеродного и платинового нанозэлектрода. Скорость развертки 400 мВ/с.

<sup>9</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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

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. 57).

Предел обнаружения для платинового нанoeлектрода составил 1 мкМ, линейный диапазон составил от 5-500 мкМ. При увеличении количества осажденной платины можно снизить предел обнаружения, однако при осаждении большего количества платины происходит увеличение размера нанoeлектрода. Большое количество осажденной на поверхности нанoeлектрода платины может повредить клетку, что в целом, влияет на ее целостность.

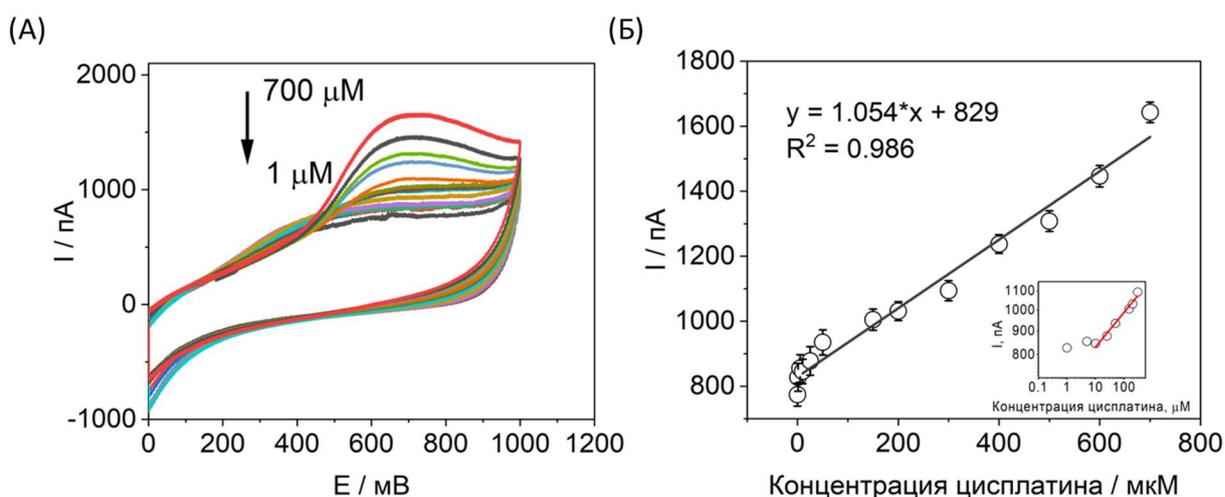


Рис. 57. Определение цисплатина в растворах с различной концентрацией цисплатина (А) ЦВ, записанные в растворах с концентрацией цисплатина от 1 до 700 мкМ. Диапазон -500 – 950 мВ, скорость развертки 400 мВ/с (Б) Градуировочный график по отношению к цисплатину.

При увеличении скорости развертки потенциала ( $150\text{--}1500\text{ мВ с}^{-1}$ ) увеличивалась высота пика и происходил сдвиг потенциала, что свидетельствовало о необратимости электродного процесса. Линейная зависимость между высотой пика и квадратным корнем из скорости развертки указывает на то, что окисление цисплатина является диффузионным процессом.

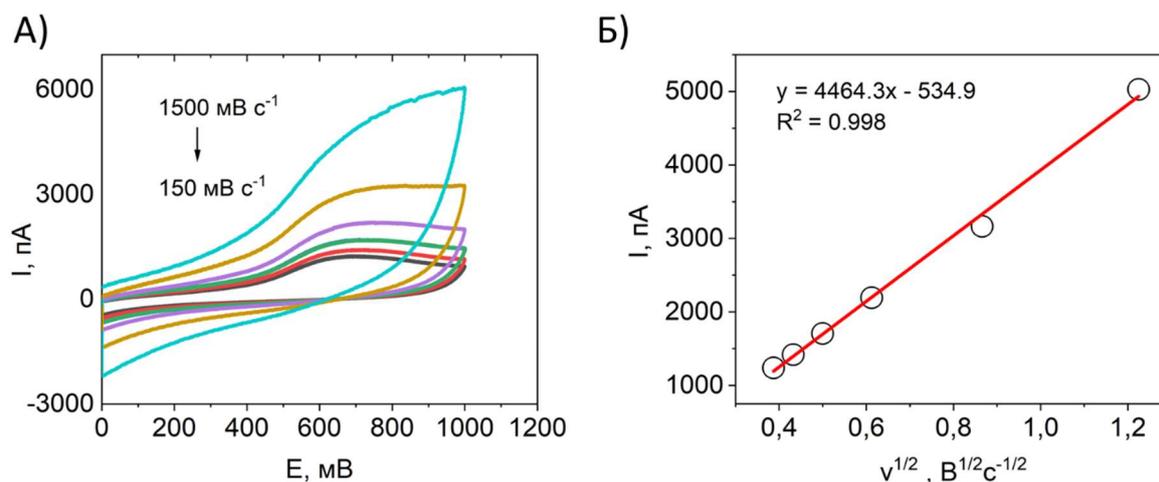


Рис. 58. Влияние скорости развертки потенциала на ЦВ(А) ЦВ, измеренные с различной скоростью, в присутствии 0,5 мМ цисплатина в растворе PBS (рН 7,4), в диапазоне 150–1500 мВ  $s^{-1}$  (Б) График зависимости  $I_p$  от  $v^{1/2}$

Известно, что значения рН различаются как в клетках, так и в опухолях [252]. Поэтому предварительно ЦВ были записаны в растворе цисплатина при рН 2,9–10, поскольку пик окисления  $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$  смещается при различных рН. [253]. Было показано, что при снижении рН максимальное значения пика окисления  $Pt^{II}/Pt^{IV}$  смещалось в положительную сторону, показывая, что окисление цисплатина является рН-зависимым процессом (Рис. 59А). В диапазоне рН 6,5–7,5 пик  $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$  был смещен, но высота анодного окислительного пика изменилась незначительно и не влияла на результаты (Рис. 59Б).

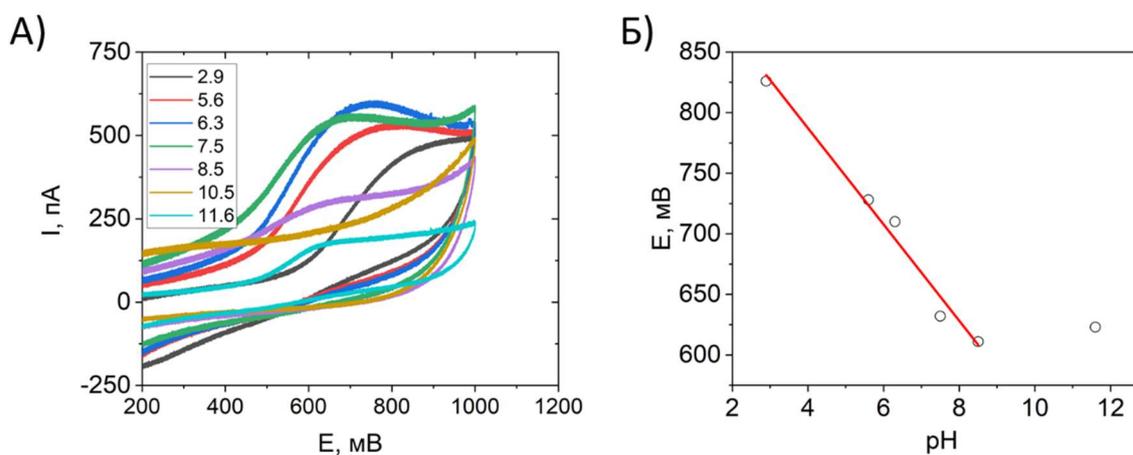


Рис. 59. Влияние рН на ЦВ в растворе цисплатина (А) ЦВ в 0,5 мМ растворе цисплатина. Скорость развертки 400 мВ/с. (Б) Зависимость положения пика от значений рН

Перед проведением *in vitro/in vivo* экспериментов была произведена оценка влияния ДНК и БСА на форму пика ЦВ. Поскольку цисплатин взаимодействует с ДНК, а белки, присутствующие в организме способны адсорбироваться на поверхности нанoeлектрода, что может сказаться на отклике нанoeлектрода, то исследование влияния данных биомолекул крайне важно. Было показано, что данные биомолекулы существенно не влияют на проведение *in vitro/in vivo* электрохимических измерений (Рис. 60).

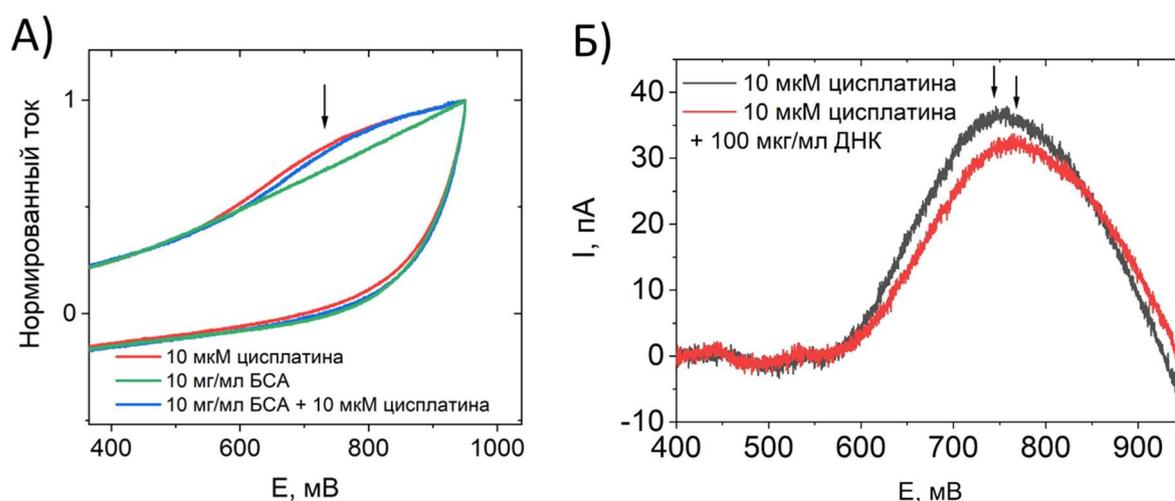


Рис. 60. Влияние бычьего сывороточного альбумина (БСА) в физиологической концентрации 10 мг/мл (А) и ДНК (100 мкг/мл) (Б) на ЦВ

В случае БСА высота пика не изменилась. При добавлении и последующей инкубации с ДНК высота пика уменьшилась на 5-6%. Однако поскольку процесс измерения осуществляется зачастую в цитоплазме, то взаимодействие с ДНК крайне маловероятный процесс.

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 (Рис. 61А,Б). 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. 61В). Наклон зависимости тока при +800 мВ от

концентрации добавленного пероксида водорода был одинаковым в растворах цисплатина при различных концентрациях (Рис. 61Г). Исходная линия (показана черным цветом) соответствовала ЦВ в 10 мкМ растворе пероксида водорода (Рис. 61Г). Было показано, что с увеличением концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  фоновый ток в диапазоне 200–800 мВ увеличивался, но высота анодного окислительного пика  $\text{Pt}^{\text{II}}/\text{Pt}^{\text{IV}}$  не изменялась (Рис. 61Д). Следовательно, содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  не влияло на обнаружение  $\text{Pt}(\text{II})$  в образцах.

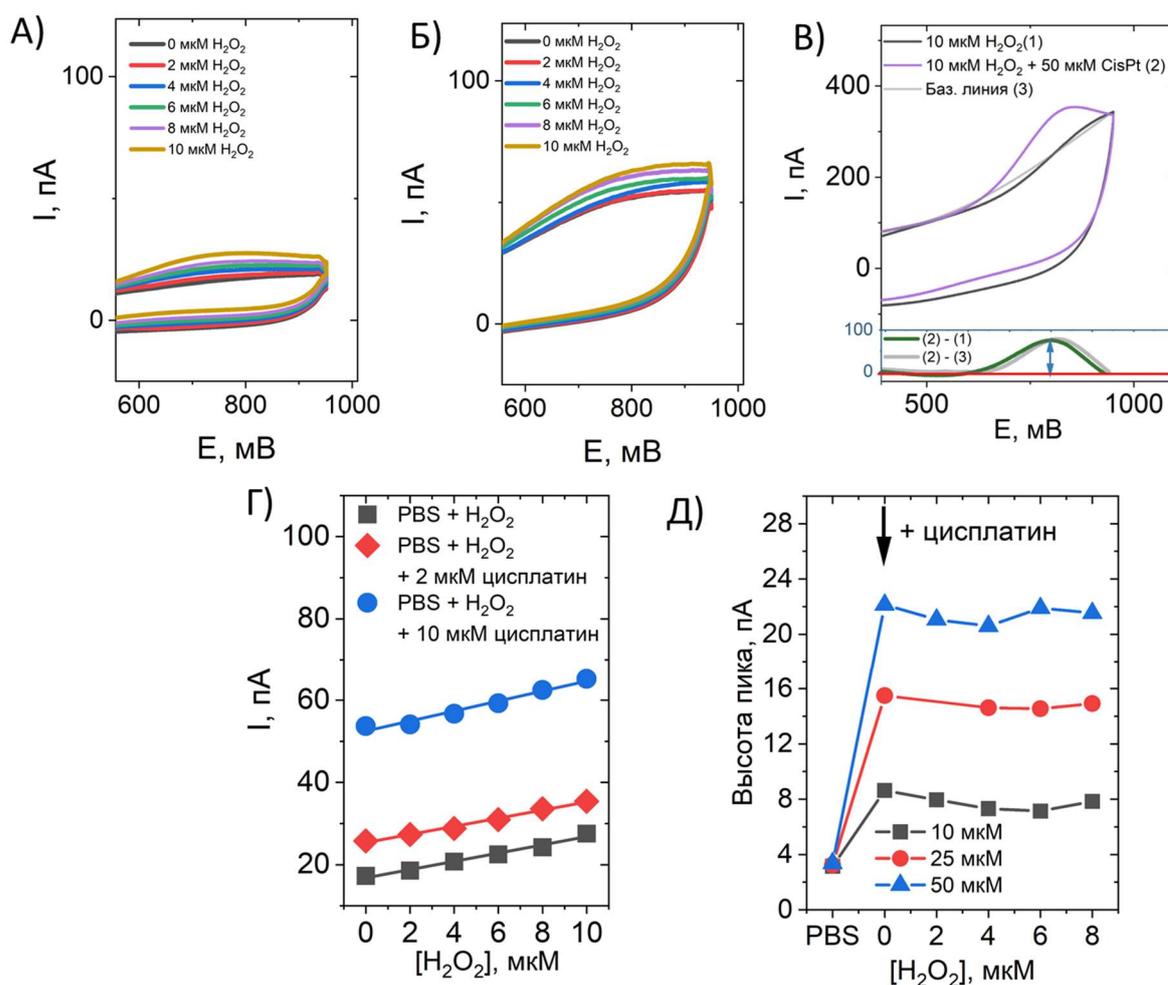


Рис. 61. Оценка влияния физиологических концентраций пероксида водорода на определение цисплатина в растворе. (А) ЦВ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в PBS в различных концентрациях (0-10 мкМ) (Б) ЦВ в растворе 10 мкМ цисплатина при различной концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0-10 мкМ) (В) ЦВ в 10 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 10 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 50 мкМ цисплатин. (В) ЦВ в 10 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 10 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 50 мкМ цисплатин. Диапазон -500 – 950 мВ, скорость развертки потенциала 400 мВ/с (Г) 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 (Д) Зависимость высоты анодного пика окисления цисплатина от концентрации пероксида водорода. Все измерения проводили в растворе PBS (рН 7,4). Скорость развертки потенциала 250 мВ  $\text{c}^{-1}$ .

### 5.10.1 Определение комплексов Pt(II) на примере цисплатина внутри единичных клеток и сфероидов

Для сравнения внутриклеточной концентрации цисплатина, накопленного в клеточной линии MCF-7 (рак молочной железы человека), клетки были проинкубированы со 100 мкМ цисплатина (Рис. 62А,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 опухоли 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.

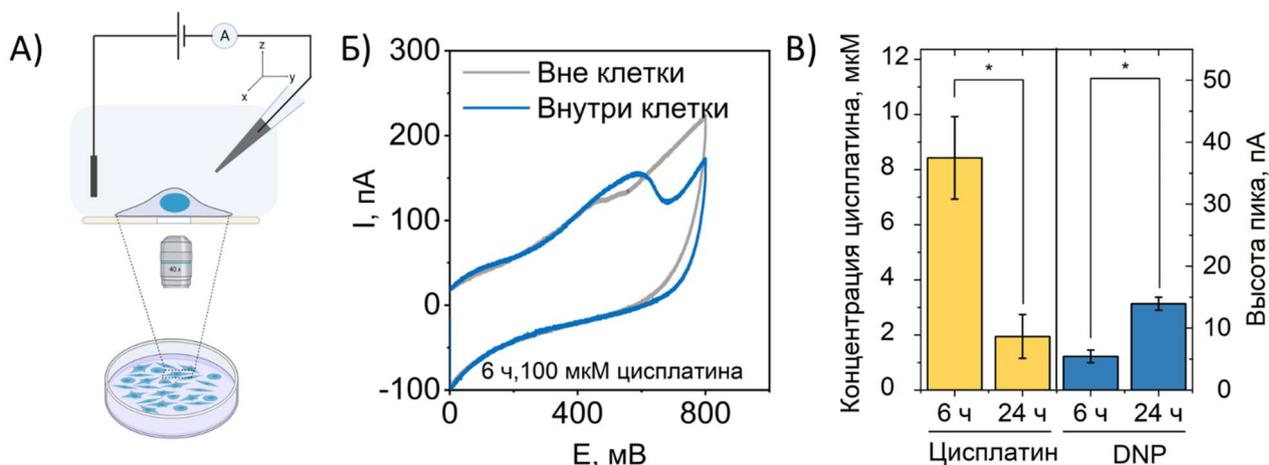


Рис. 62. Внутриклеточное определение цисплатина. (А) Схема определения цисплатина внутри клеток MCF-7. (Б) ЦВ внутри и снаружи клетки, инкубированной в 100 мкМ растворе цисплатина в течение 6 ч. Диапазон -500 – 800 мВ, скорость развертки потенциала 400 мВ/с (В) Накопление цисплатина и DNP в клетках MCF-7 через 6 и 24 ч.

После инкубации в течение 6 часов с цисплатином его внутриклеточное содержание составило около 8 мкМ (Рис. 62В)., после 24 ч инкубации концентрация цисплатина в клетках снижалась до 2 мкМ (Рис. 62В). 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).

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 сфероида MCF-7 после инкубации 6 часов с 100 мкМ цисплатина и DNP был использован нанозлектрод, вводимый в сфероид с шагом в 5 мкм. Полученные вольтамперограммы (Рис. 63А) 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. 63Б).

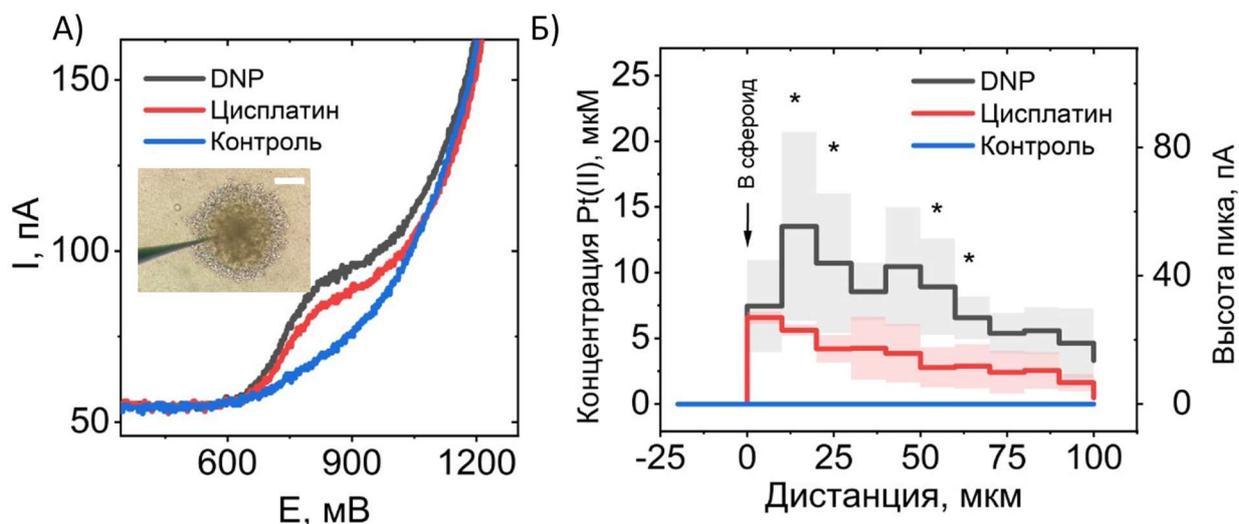


Рис. 63. Определение цисплатина внутри сфероида (А) ЦВ, полученные внутри сфероида, под воздействием цисплатина и DNP (Б) Профили накопления DNP и цисплатина внутри сфероидов. Масштабная шкала 100 мкм.

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 сфероидах, однако LA-ICP-MS не дает полную информацию о накоплении цисплатина на различных глубинах.

#### 5.10.2 *In vivo* определение соединений, содержащих Pt(II), внутри опухоли мыши

После успешной валидации методики на опухолевых сфероидах были проведены измерения *in vivo*, используя модель мышинной карциномы молочной железы ЕМТ6. 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 глубинах вплоть до 800 мкм с шагом 100 мкм (Рис. 64А).

Особо выделялся пик анодного окисления  $E_{pa}(Pt^{II}/Pt^{IV})$  в опухолях мышей, которым был внутривенно введен цисплатин. Замечено, что этот пик имел вариабельность на разных глубинах, свидетельствующую об изменении концентрации Pt (II) внутри опухоли. Важно подчеркнуть, что стабильность нанозэлектрода и его электрохимические характеристики сохранялись после проведения *in vivo* измерений. В опухолях, подвергнутых воздействию DNP, наблюдалась более высокая глубина проникновения в сравнении с цисплатином (Рис. 64Б). Это согласуется с предыдущими результатами, подтверждающими более эффективное накопление DNP в отдельных клетках и сфероидах по сравнению с цисплатином, как описано выше.

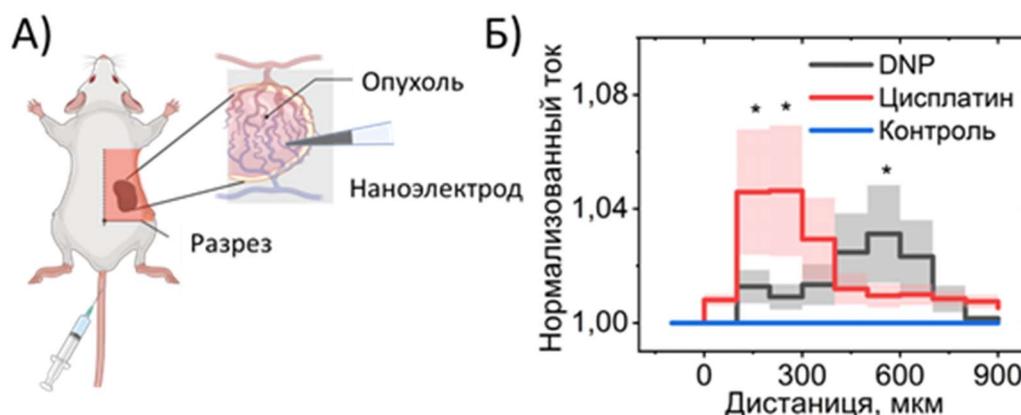


Рис. 64. Определение цисплатина внутри опухоли *in vivo* (А) Схема эксперимента (Б) Профиль накопления цисплатина и DNP внутри опухоли. Доза цисплатина и DNP 2 мг/кг. Время инкубации 24 часа.

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 сфероидах и внутри опухоли мыши.

### 5.10.3 Одновременное определение АФК и комплексных соединений Pt(II)<sup>10</sup>

Результаты в рамках данного раздела получены совместно с сотрудниками кафедры органической химии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н. Красновской О.О. и к.х.н. Спектором Д.В. Фотоактивируемые пролекарства представляют собой инновационные соединения, представляющие собой конъюгаты препаратов Pt(II) с фотосенсибилизатором, который можно возбуждать видимым или ближним ИК-светом. Возбуждение фотосенсибилизатора сопровождается переносом электрона к центру комплекса Pt(IV) с последующим восстановлением пролекарств и высвобождением

<sup>10</sup> При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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%) doi: 10.1021/acsami.3c01771

комплекса Pt(II). Кроме того, конъюгация комплексов Pt (II) с фотосенсибилизатором, способным генерировать АФК, позволяет объединить фотодинамическую терапию (ФДТ) и химиотерапию в одном лекарстве. В рамках работы было использовано пролекарство Pt(IV) (рибоплатин) на основе цисплатина и тетраацетилрибофлавина (TARF) в аксиальном положении, предоставленное научной группой к.х.н. Красновской О.О. Ранее было показано, что при возбуждении рибоплатина происходит переход в триплетное возбужденное состояние с последующим образованием синглетного кислорода и высвобождением цисплатина [254].

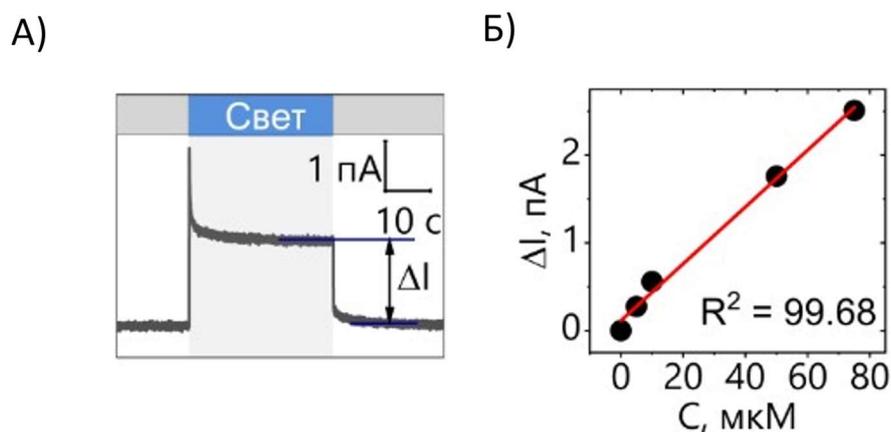


Рис. 65. Измерения АФК в растворах рибоплатина в режиме постоянного потенциала. (А) Хроноамперограмма в 10 мкМ растворе рибоплатина при воздействии света (Б) Градуировочный график в растворах рибоплатина (2-80 мкМ)

Для оценки ФДТ-способности рибоплатина был измерен уровень пероксида водорода в 10 мкМ растворе рибоплатина при облучении синим светом. При воздействии света наблюдали увеличение тока в системе, причем при выключении света ток возвращался к прежним значениям (Рис. 65 А). Была построена градуировочная зависимость, растворы рибоплатина (2–80 мкМ) были облучены светодиодной лампой для флуоресцентной микроскопии ( $\lambda_{\text{возб}} = 450$  нм) с последующей записью хроноамперограммы при постоянном потенциале +800 мВ отн. ХСЭ. Количество обнаруженного  $\text{H}_2\text{O}_2$  линейно зависело от концентрации рибоплатина (Рис. 65 Б).

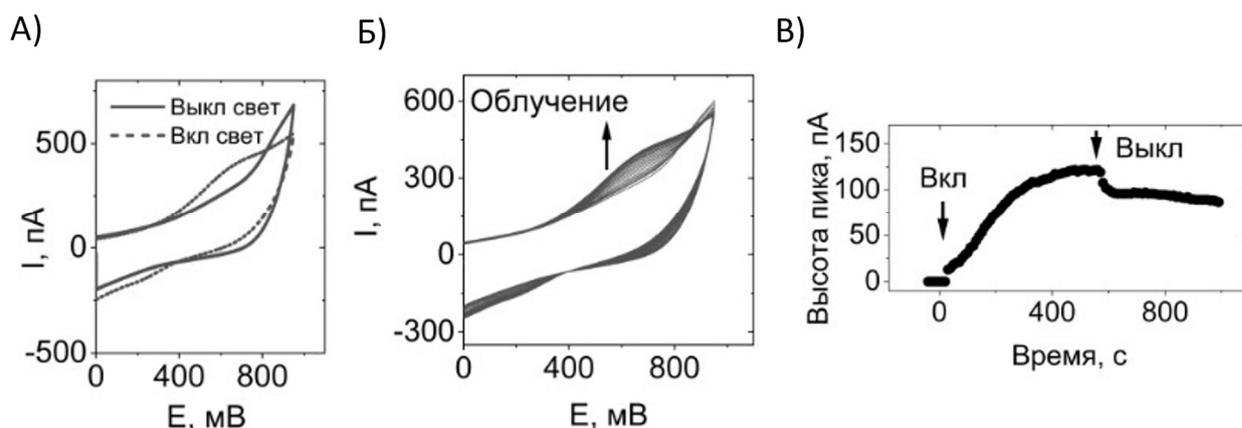


Рис. 66. ЦВ в растворе рибоплатина под воздействием света. (А) ЦВ в растворе рибоплатина до и после воздействия облучения (Б) ЦВ в растворе рибоплатина при облучении светом в течение 10 мин (В) Зависимость высоты пика окисления Pt(II) от времени освещения раствора.

Была исследована способность рибоплатина высвобождать цисплатин в растворах под воздействием света. Для обнаружения высвобожденного цисплатина раствор рибоплатина (PBS, 25 мкМ) непрерывно облучали ( $\lambda_{\text{возб}} = 450$  нм) и записывали ЦВ в течение 10 мин. Наблюдалось заметное изменение вольтамперограмм раствора рибоплатина до и после облучения светом (Рис. 66А). Постепенное увеличение пика при +600 мВ при облучении, очевидно, связано с высвобождением форм Pt(II) из рибоплатина (Рис. 66Б,В). Высвобождение цисплатина под воздействием света было подтверждено методом ВЭЖХ[254].

Сфероиды MCF-7 были выбраны в качестве модели опухоли из-за ее повышенной устойчивости как к ФДТ, так и к химиотерапии. Сводная схема электрохимических измерений внутри сфероидов с использованием платинового нанозэлектрода показана на Рис. 67А. Для внутрисфероидного обнаружения и количественного определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  измерения проводили при постоянном напряжении +800 мВ отн. ХСЭ. Была измерена разница между силой тока при включении и выключении света на разной глубине сфероидов, инкубированных с рибоплатином в концентрации 100 мкМ (Рис. 67Б). Облучение синим светом приводило к возрастанию значений тока.

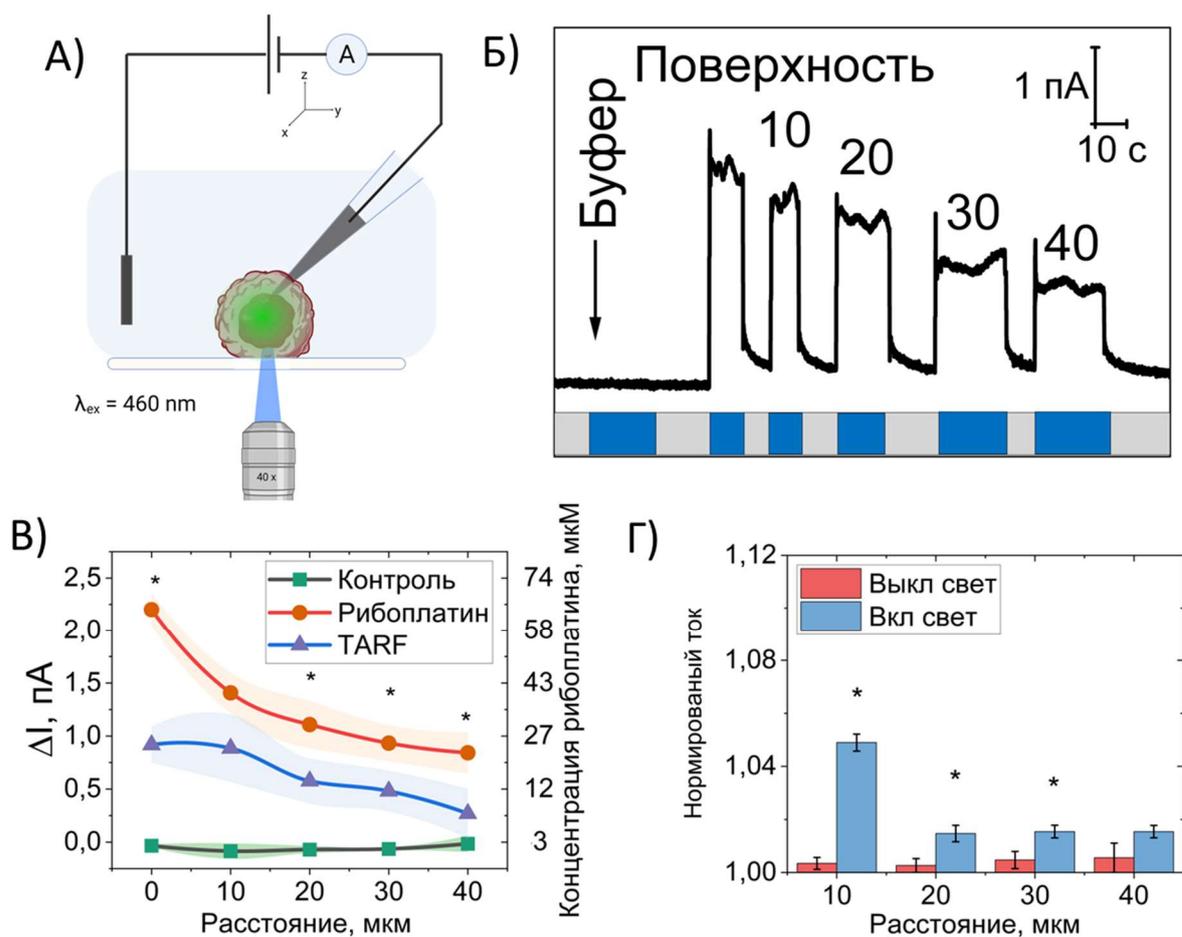


Рис. 67. Измерения АФК и цисплатина внутри сфероидов под воздействием света. (А) Схема проведения эксперимента на сфероиде (Б) Хроноамперограмма, записанная внутри сфероиде на глубине от 0 до 40 мкм. Синим цветом показано включение света (В) Измерение АФК внутри сфероидов под воздействием света на накопленные рибоплатин и TARF (Г) Измерение комплексов Pt(II) внутри сфероидов под воздействием света

Выключение света приводило к возвращению уровня тока к исходному уровню так же, как мы ранее наблюдали в облученном растворе рибоплатина. Обобщенные данные о накоплении АФК, обнаруженных на разной глубине сфероидов при облучении, показаны на Рис. 67В. В сфероиде, предварительно инкубированных с рибоплатином, количество АФК было выше, чем в сфероиде, предварительно инкубированных с TARF, что доказывало способность рибоплатина лучше накапливаться в клетках.

Для электрохимического обнаружения светоиндуцированного высвобождения цисплатина ЦВ внутри сфероидов, предварительно инкубированных с лекарственным средством, записывали в диапазоне  $-500$  до  $800$  мВ. Отчетливого пика окисления цисплатина не наблюдали в необлученных сфероиде. Облучение синим светом вызывало увеличение величины тока при

600–650 мВ, что свидетельствовало о высвобождении цисплатина из пролекарства и его успешном обнаружении (Рис. 67Г).

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 сфероидах и внутри опухоли мышцы.

## 5.11. Разработка методики электрохимического определения концентрации молекулярного кислорода с помощью платинового нанoeлектрода

### 5.11.1 Определение концентрации молекулярного кислорода в растворе

Ранее изготовленный платиновый нанoeлектрод 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. 68).

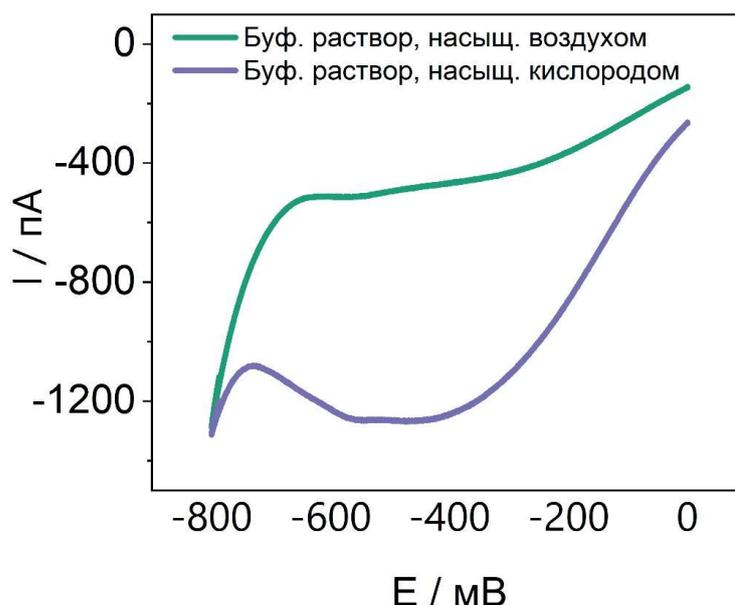


Рис. 68. ЦВ, записанные в 0,1 М фосфатном растворе при рН 7,4 в насыщенном воздухом (21 %) (зеленая линия) и насыщенном кислородом (синяя линия)

Для увеличения временного разрешения определения концентрации кислорода в системе были проведены измерения в режиме амперометрии при постоянном потенциале (-650 мВ относительно ХСЭ). Аликвоты раствора, насыщенного кислородом, добавляли к деоксигенированному раствору фосфатного буфера, который готовили непосредственно перед экспериментом,

барботируя аргон в течение 1 часа. Оценку быстродействия сенсора осуществляли в специально изготовленной камере, позволяющей практически мгновенно менять раствор в системе. Схема камеры представлена на Рис. 69А.

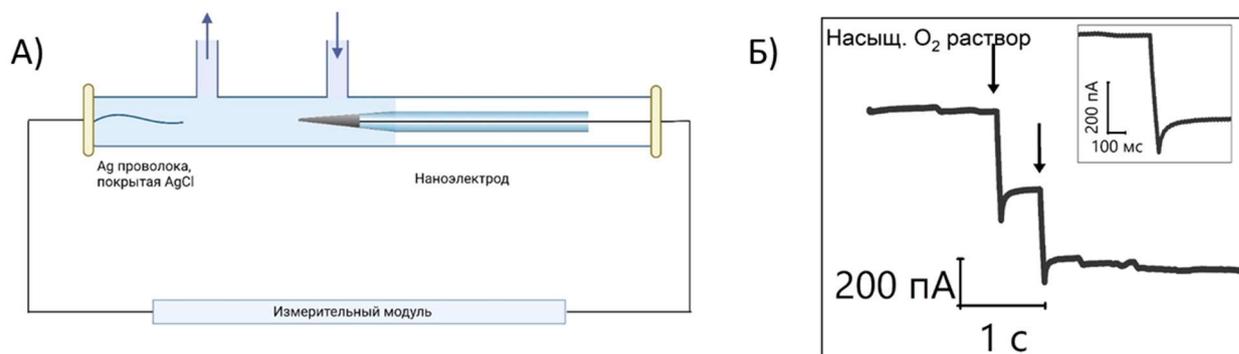


Рис. 69. (А) Схема ячейки для проведения электрохимических измерений в малом объеме (Б) Амперограмма, полученная при постоянном потенциале  $-650$  мВ. Стрелками указано добавление буферного раствора, насыщенного кислородом, к деоксигенированному буферному раствору.

Оказалось, что скорость отклика сенсора составила  $\sim 100$  мс (Рис. 69Б). В целом электрохимические методы обеспечивают хорошее временное разрешение, которое составляет  $< 1$  с, оптические и флуоресцентные методы позволяют достичь временного разрешения 2 с.

Увеличение скорости развертки потенциала (от  $200$  до  $6400$  мВ  $\text{с}^{-1}$ ) увеличивало величину плато по модулю, что свидетельствовало о необратимости электродного процесса (Рис. 70А). Линейная зависимость между значения тока плато и квадратным корнем из скорости развертки потенциала указывало на то, что процесс контролируется массопереносом (Рис. 70Б).

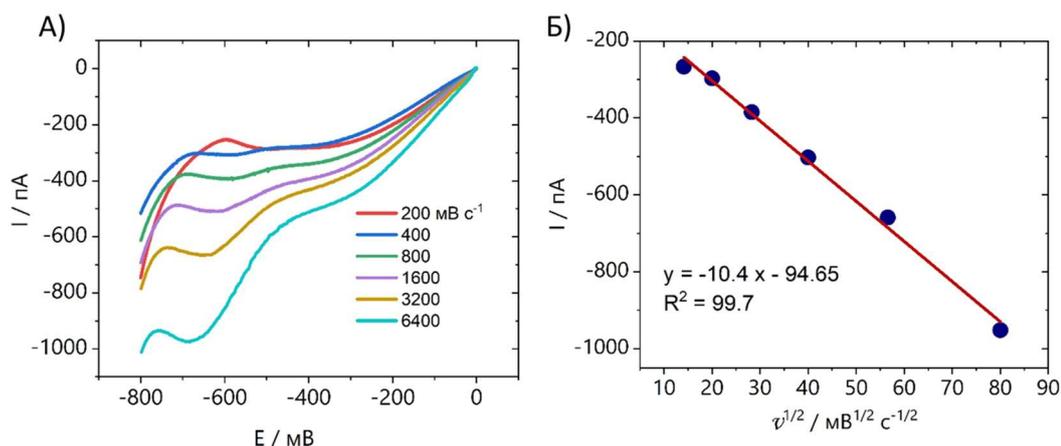


Рис. 70. Влияние скорости развертки потенциала на ЦВ (А) ЦВ в насыщенном воздухом растворе PBS (рН 7,4) в диапазоне 200–6400 мВ с<sup>-1</sup>; (В) График зависимости  $I_p$  от  $v_{1/2}$

Для обеспечения надежности предлагаемого метода обнаружения кислорода в живой системе была проведена градуировка платинового нанoeлектрода в растворах с различной концентрацией кислорода (0; 16; 28,6; 37,6; 44,4; 50; 60; 66,6; 71 %).

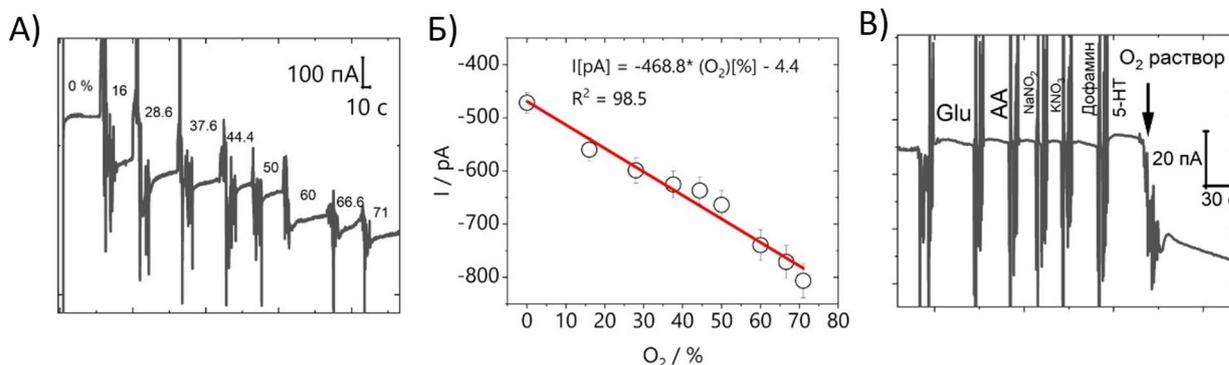


Рис. 71. Чувствительность и селективность платинового нанoeлектрода по отношению к кислороду. А) Амперограмма, полученная в фосфатном буферном растворе с различной концентрацией кислорода Б) Градуировочный график, полученный в растворах с концентрацией кислорода 0; 16; 28,6; 37,6; 44,4; 50; 60; 66,6; 71 %. В) Ответ нанoeлектрода по отношению к глутамату натрия (Glu), аскорбиновой кислоте (AA), нитриту натрия ( $\text{NaNO}_2$ ), нитрату калия, дофамину, серотонину (5-НТ) и молекулярному кислороду. Эксперимент осуществлен в амперометрическом режиме.

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. 71В). 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.

Основным фактором, способным исказить результаты анализа по определению кислорода, является потребление кислорода в системе, что приводит к заниженным концентрациям в системе. Нами было проанализировано потребление кислорода разработанным нанoeлектродом, которое связано с протекающей электрохимической реакцией восстановления кислорода ( $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ ), и скорость этой реакции пропорциональна току, проходящему через электрод. Для электрохимической реакции на нанoeлектроде ток ограничивается диффузией кислорода к поверхности электрода, и это выражается через предельный диффузионный ток, который для изготовленных нанoeлектродов варьируется в диапазоне от -400 до -1000 пА. Тогда скорость потребления кислорода для 4-ех электронного процесса восстановления кислорода рассчитывается по закону Фарадея и находится в диапазоне  $(1-2,5) \cdot 10^{-15}$  моль/с. Таким образом, потребление кислорода данным сенсором настолько мало, что не вносит вклад в измерения.

#### **5.11.2 Определение концентрации кислорода внутри опухолевых сфероидов**

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 сфероиды, состоящие из ~4000, ~8000 и ~16000 клеток. Затем с помощью микроманипулятора внутри сфероида под углом 50° осторожно вводили нанoeлектрод и записывали ЦВ (от -800 до +800 мВ отн. Ag/AgCl, 400 мВ/с).

Ранее было показано, что внешняя концентрация кислорода вблизи сфероида зависела от радиуса сфероида [255–258]. Поэтому в рамках данных исследований измерения концентрации молекулярного кислорода осуществляли как внутри, так и снаружи сфероида. ЦВ начинали записывать в буферном растворе на расстоянии 2000 мкм от поверхности сфероида, далее с шагом 100 мкм подводили наноэлектрод к поверхности сфероида (Рис. 72А). 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 наноэлектродом 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 объяснялась различной скоростью потребления кислорода (Рис. 72Б).

Скорость потребления кислорода (OCR) сфероидом была рассчитана по формуле (3) [256]:

$$\text{OCR} = 4\pi r_s D \Delta C \quad (3)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии кислорода,  $\Delta C$  — разница между объемной концентрацией и поверхностной концентрацией кислорода ( $\Delta C = C^* - C_s$ ).  $\Delta C$  определяли электрохимически с использованием  $C^* = 2,10 \times 10^{-7}$  моль  $\text{см}^{-3}$ . OCR рассчитывали, используя  $D = 2,10 \times 10^{-5}$   $\text{см}^2 \text{с}^{-1}$

Различная концентрация кислорода на поверхности сфероидов разного диаметра объяснялась различной скоростью потребления кислорода (Рис. 72Б). Скорость потребления кислорода сфероидом, состоящим из 16000 клеток, составила 710 фмоль/с, что согласуется с предыдущими исследованиями [256]. 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. 72В).

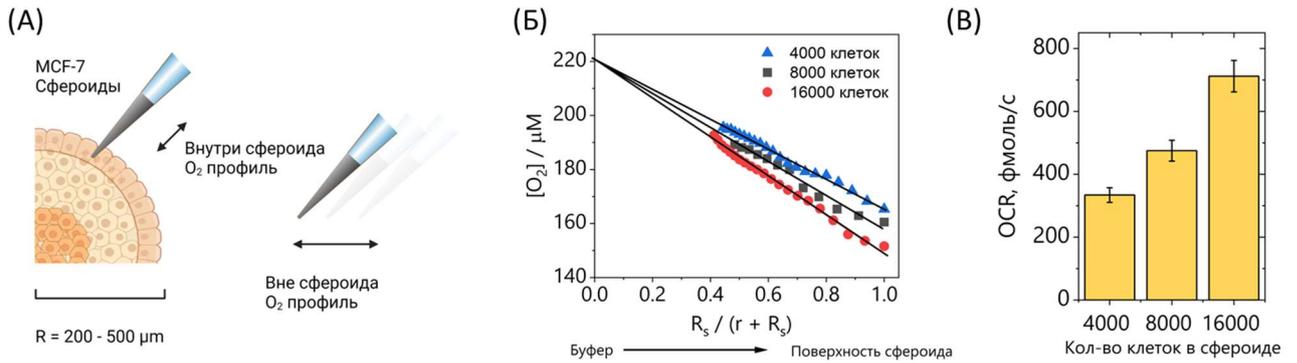


Рис. 72. Приповерхностное измерение концентрации кислорода у сфероида (А) Схема проведения эксперимента (Б) Кислородный профиль, измеренный вне сфероида (В) Скорость потребления кислорода сфероидами, содержащими разное количество клеток ( 4000, 8000, 16000 клеток)

Известно, что внутри сфероидов наблюдается снижение концентрации кислорода из-за ограничений транспорта кислорода [259]. Действительно, было обнаружено, что концентрация кислорода уменьшалась к центру сфероида (Рис. 73А). Гипоксия в сфероидах, состоящих из большого количества клеток, была наиболее выражена, а снижение концентрации кислорода наблюдалось при продвижении вглубь сфероида и начиналось значительно раньше (Рис. 73Б).

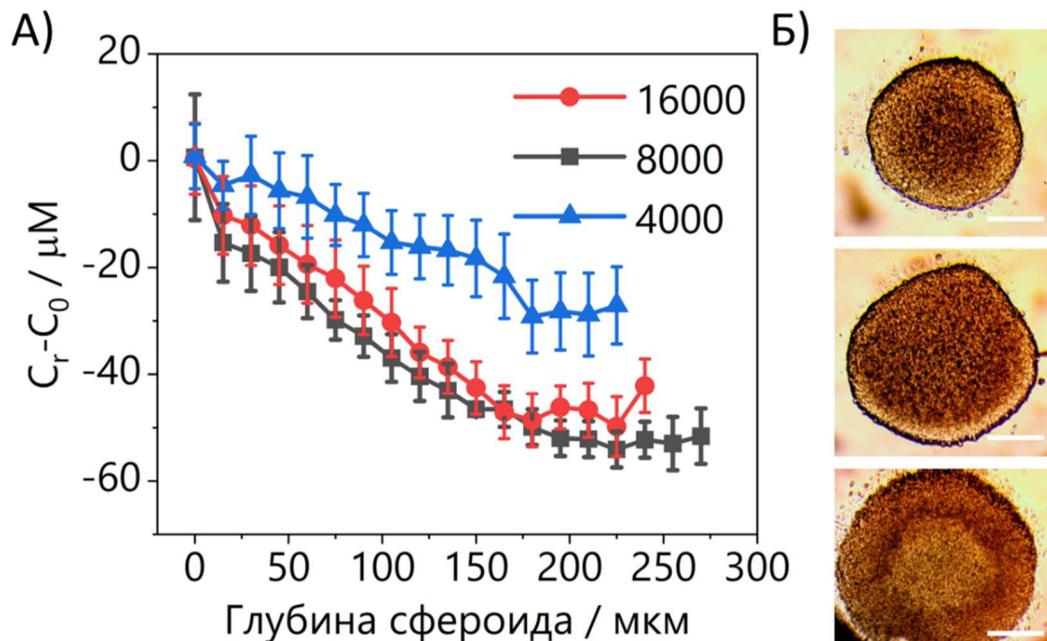


Рис. 73. Измерения кислорода внутри сфероидов различного размера (А) Кислородный профиль внутри сфероидов МСF-7 ( $n = 3$ , для каждого условия культивирования). Условия культивирования: 4000, 8000, 16000 клеток на сфероид. (Б) Микрофотографии сфероидов разного диаметра, используемых в эксперименте. Масштабный отрезок 100  $\mu\text{m}$ .

В случае резкого уменьшения отклика наноэлектрода при проведении *in vitro/in vivo* экспериментов наноэлектрод меняли на новый. При этом осуществляли дополнительный контроль электрохимически активной поверхности сенсора, измеряли ЦВ в растворе до и после проникновения в сфероид. В случае расхождения ЦВ проводили повторные измерения в сфероиде.

Таким образом, с помощью разработанного метода удалось определить концентрацию молекулярного кислорода в приповерхностных и внутренних слоях на разных глубинах сфероидов диаметром 400-1000 мкм. Преимущества разработанного наноэлектрода заключаются в его высокой чувствительности, позволяющей регистрировать малейшие колебания уровня кислорода в микроокружении сфероидов, а также в минимальном влиянии на физиологические процессы исследуемых объектов. Благодаря его размерам и высокой пространственной разрешающей способности стало возможным проводить измерения на различных глубинах, что значительно повышает точность и достоверность результатов при исследовании 3D моделей опухоли – сфероидов.

### **5.11.3 Определение концентрации кислорода в здоровой ткани мозга крысы и в глиобластоме, имплантированной крысе**

Для апробации работы сенсора *in vivo*, были проведены измерения в верхних слоях коры головного мозга крысы (Рис. 74А). 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 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.

Глиобластома относилась к опухолям с высокой степенью гипоксии [260]. Отмечено, что содержание кислорода статистически значимо меньше по сравнению со здоровой тканью, а при перемещении внутрь опухоли наблюдалось снижение содержания кислорода. Поскольку опухоль

глиобластомы С6 плохо васкуляризирована, картина снижения содержания кислорода более четкая по сравнению со здоровой тканью головного мозга [261].

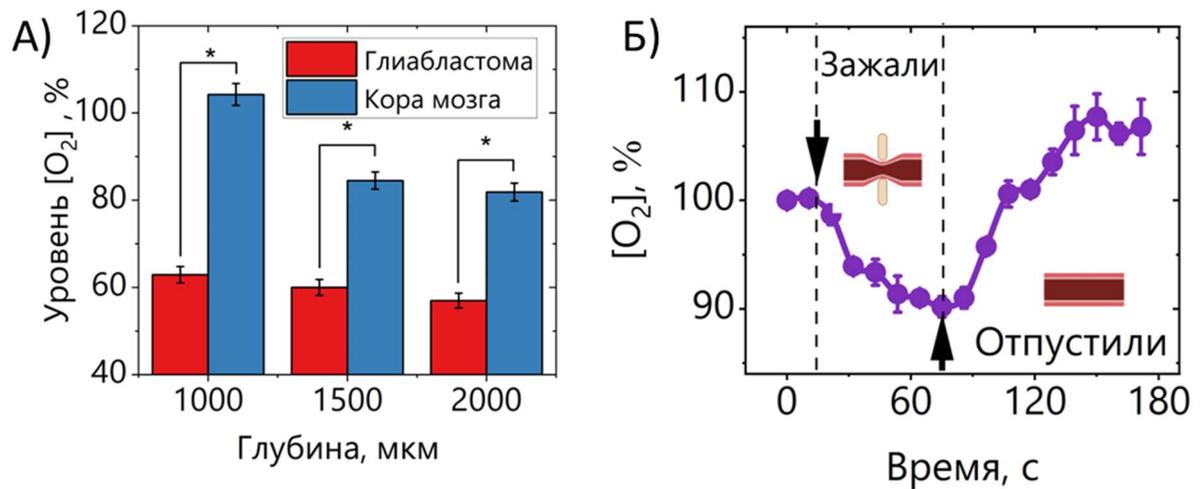


Рис. 74. Определение концентрации кислорода в имплантированной глиобластоме С6 и здоровой ткани головного мозга крысы (А) Относительный уровень кислорода в коре головного мозга крысы (N=3) на глубинах 1000, 1500, 2000 мкм. \* -  $p < 0,05$  (ANOVA) (Б) Моделирование процесса церебральной ишемии. На графике продемонстрировано изменение уровня кислорода в коре головного мозга в режиме реального времени (N=3).

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. 74Б).

Таким образом, на *in vivo* модели была продемонстрирована работа кислородного сенсора, показаны отличия в содержании кислорода в опухоли С6 и здоровой ткани мозга крысы. Успешная работа сенсора подтверждена при моделировании процесса церебральной ишемии.

## 6 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 нанокапиллярные сенсоры, пригодные для проведения внутриклеточных биоаналитических измерений. Показана возможность проведения измерений дофамина в диапазоне 40 нМ-10 мкМ с пределом обнаружения  $12 \pm 5$  нМ с помощью разработанных нанокапиллярных сенсоров.

2) На базе углеродных нанокапиллярных сенсоров разработан малоинвазивный платиновый наноэлектрод 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 PC3, 22Rv1, MCF-7 и опухолевых сфероидов MCF-7, а также в имплантированной мыши 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 мышы 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 наноэлектрода. Показана возможность работы наноэлектрода в физиологических условиях *in vivo*. Обнаружена зависимость скорости потребления кислорода от размера сфероида. На модели церебральной ишемии у крыс продемонстрирована работоспособность разработанного наноэлектрода *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 EMT-6 мыши *in vivo*.

## 7 БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научным руководителям д.х.н., проф. Клячко Наталье Львовне, к.ф.-м.н. Ерофееву Александр Сергеевичу за совместный многолетний труд, наставничество, ценные рекомендации и всестороннюю помощь.

Автор благодарит д.б.н., проф. Корчева Юрия Евгеньевича за неоценимую помощь и ценные комментарии в обсуждении экспериментов и написании статей.

Автор благодарит внутреннего рецензента д.х.н., проф. Курочкина Илью Николаевича за внимательное прочтение работы и ценные замечания.

Автор благодарит к.б.н. Акасова Р.А., к.б.н. Алову А.В., к.х.н. Красновскую О.О., д.б.н., проф. С.Н. Плескову, к.б.н. Гаранину А.С., к.б.н. Абакумову Т.О., к.х.н. Абакумова М.А., к.х.н. Алексашкина А.Д., к.х.н. Оленина А.В., д.х.н., проф. Белоглазкину Е.К, к.х.н. Мачулкина А.Э., к.х.н. Спектора Д.В., к.х.н. Ямансарова Э.Ю., д.б.н., проф. Чеснокову Н.Б., Безнос О.А. за совместную плодотворную научную работу.

Автор выражает благодарность сотрудникам, студентам и аспирантам научно-исследовательской лаборатории биофизики НИТУ МИСИС, особенно Тимошенко Р. В., к.ф.-м.н. Горелкину П.В., Колмогорову В. С., Яковлеву А.П. за совместную плодотворную научную работу, за помощь в обсуждении экспериментов, за предложения по улучшению научной составляющей работы.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам кафедры химической энзимологии, особенно к.х.н., в.н.с. Кост Ольге Алексеевне, д.х.н. проф. Еремееву Николаю Леонидовичу за плодотворное обсуждение научной работы, статей и ценные комментарии.

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории химический дизайн бионаноматериалов, особенно к.х.н. Веселову М.М., к.х.н. Усвалиеву А.Д., к.х.н. Лопухову А.В. за помощь в обсуждении работы, а также за дружелюбную атмосферу в лаборатории.

Автор благодарит весь коллектив кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за внимательное отношение к научному труду.

Автор сердечно благодарен своим родным и близким за постоянную моральную поддержку на всех этапах выполнения и написания научной работы.

## 8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sardesai, N. P. Platinum-doped ceria based biosensor for in vitro and in vivo monitoring of lactate during hypoxia / N. P. Sardesai, M. Ganesana, A. Karimi, J. C. Leiter, S. Andreescu // *Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 87. – № 5. – P. 2996-3003.
2. Chatard, C. Minimally Invasive Microelectrode Biosensors Based on Platinized Carbon Fibers for in Vivo Brain Monitoring / C. Chatard, A. Sabac, L. Moreno-Velasquez, A. Meiller, S. Marinesco // *ACS Central Science*. – 2018. – Vol. 4. – № 12. – P. 1751-1760.
3. Iverson, N. M. In vivo biosensing via tissue-localizable near-infrared-fluorescent single-walled carbon nanotubes / N. M. Iverson, P. W. Barone, M. Shandell, L. J. Trudel, S. Sen, F. Sen, V. Ivanov, E. Atolia, E. Farias, T. P. McNicholas, N. Reuel, N. M. A. Parry, G. N. Wogan, M. S. Strano // *Nature Nanotechnology*. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. 873-880.
4. Wolfbeis, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging / O. S. Wolfbeis // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44. – № 14. – P. 4743-4768.
5. Li, X. Quantum dots based molecular beacons for in vitro and in vivo detection of MMP-2 on tumor / X. Li, D. Deng, J. Xue, L. Qu, S. Achilefu, Y. Gu // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 61. – P. 512-518.
6. Rao, J. Fluorescence imaging in vivo: recent advances / J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi, H. Yao // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2007. – Vol. 18. – № 1. – P. 17-25.
7. Xu, C. In Vivo Electrochemical Sensors for Neurochemicals: Recent Update / C. Xu, F. Wu, P. Yu, L. Mao // *ACS Sensors*. – 2019. – Vol. 4. – № 12. – P. 3102-3118.
8. Xiao, T. In Vivo Analysis with Electrochemical Sensors and Biosensors / T. Xiao, F. Wu, J. Hao, M. Zhang, P. Yu, L. Mao // *Analytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 89. – № 1. – P. 300-313.
9. Yang, T. A review of ratiometric electrochemical sensors: From design schemes to future prospects / T. Yang, R. Yu, Y. Yan, H. Zeng, S. Luo, N. Liu, A. Morrin, X. Luo, W. Li // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 274. – P. 501-516.

10. Vadgama, P. Monitoring with In Vivo Electrochemical Sensors: Navigating the Complexities of Blood and Tissue Reactivity / P. Vadgama // *Sensors*. – 2020. – Vol. 20. – № 11. – P. 3149.
11. Liu, Y. Implantable Electrochemical Sensors for Brain Research / Y. Liu, Z. Liu, Y. Zhou, Y. Tian // *JACS Au*. – 2023. – Vol. 3. – № 6. – P. 1572-1582.
12. Lama, R. D. Ultrafast Detection and Quantification of Brain Signaling Molecules with Carbon Fiber Microelectrodes / R. D. Lama, K. Charlson, A. Anantharam, P. Hashemi // *Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 84. – № 19. – P. 8096-8101.
13. Alivisatos, A. P. Nanotools for Neuroscience and Brain Activity Mapping / A. P. Alivisatos, A. M. Andrews, E. S. Boyden, M. Chun, G. M. Church, K. Deisseroth, J. P. Donoghue, S. E. Fraser, J. Lippincott-Schwartz, L. L. Looger, S. Masmanidis, P. L. McEuen, A. V. Nurmikko, H. Park, D. S. Peterka, C. Reid, M. L. Roukes, A. Scherer, M. Schnitzer [et al.] // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7. – № 3. – P. 1850-1866.
14. Li, Y. T. Nanoelectrode for amperometric monitoring of individual vesicular exocytosis inside single synapses / Y. T. Li, S. H. Zhang, L. Wang, R. R. Xiao, W. Liu, X. W. Zhang, Z. Zhou, C. Amatore, W. H. Huang // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2014. – Vol. 53. – № 46. – P. 12456-12460.
15. Bucher, E. S. Electrochemical Analysis of Neurotransmitters / E. S. Bucher, R. M. Wightman // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 8. – № 1. – P. 239-261.
16. Chatterjee, S. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease / S. Chatterjee // *Oxidative Stress and Biomaterials*. – 2016. – P. 35-58.
17. Reuter, S. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? / S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 49. – № 11. – P. 1603-1616.
18. Gandhi, S. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration / S. Gandhi, A. Y. Abramov // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-11.
19. Srivastava, S. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders / S. Srivastava, D. Singh, S. Patel, M. R.

Singh // International journal of biological macromolecules. – 2017. – Vol. 101. – P. 502-517.

20. Srinivas, U. S. ROS and the DNA damage response in cancer / U. S. Srinivas, B. W. Q. Tan, B. A. Vellayappan, A. D. Jeyasekharan // Redox Biology. – 2019. – Vol. 25. – P. 101084.

21. Lugrin, J. The role of oxidative stress during inflammatory processes / J. Lugrin, N. Rosenblatt-Velin, R. Parapanov, L. Liaudet // Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 395. – № 2. – P. 203-230.

22. Hu, K. Electrochemical Measurements of Reactive Oxygen and Nitrogen Species inside Single Phagolysosomes of Living Macrophages / K. Hu, Y. Li, S. A. Rotenberg, C. Amatore, M. V. Mirkin // Journal of the American Chemical Society. – 2019. – Vol. 141. – № 11. – P. 4564-4568.

23. Li, Y. Highly Sensitive Platinum-Black Coated Platinum Electrodes for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Nitrite in Microchannel / Y. Li, C. Sella, F. Lemaître, M. GuilleCollignon, L. Thouin, C. Amatore // Electroanalysis. – 2013. – Vol. 25. – № 4. – P. 895-902.

24. Clausmeyer, J. Nanoelectrodes: Applications in electrocatalysis, single-cell analysis and high-resolution electrochemical imaging / J. Clausmeyer, W. Schuhmann. – Text : electronic // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – Vol. 79. – P. 46-59. – URL: (date accessed: 28.09.2019).

25. Calas-Blanchard, C. Electrochemical Sensor and Biosensor Strategies for ROS/RNS Detection in Biological Systems / C. Calas-Blanchard, G. Catanante, T. Noguer // Electroanalysis. – 2014. – Vol. 26. – № 6. – P. 1277-1286.

26. Amatore, C. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization / C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, K. Coffi, J. Drapier, H. Ghandour, Y. Tong // ChemBioChem. – 2006. – Vol. 7. – № 4. – P. 653-661.

27. Qian, L. Nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors for the detection of pharmaceutical compounds / L. Qian, S. Durairaj, S. Prins, A. Chen // Biosensors and Bioelectronics. – 2021. – Vol. 175. – P. 112836.

28. Ogata, G. A microsensing system for the in vivo real-time detection of local drug kinetics / G. Ogata, Y. Ishii, K. Asai, Y. Sano, F. Nin, T. Yoshida, T. Higuchi, S.

Sawamura, T. Ota, K. Hori, K. Maeda, S. Komune, K. Doi, M. Takai, I. Findlay, H. Kusuhara, Y. Einaga, H. Hibino // *Nature Biomedical Engineering*. – 2017. – Vol. 1. – № 8. – P. 654-666.

29. Hanawa, A. In Vivo Real-Time Simultaneous Examination of Drug Kinetics at Two Separate Locations Using Boron-Doped Diamond Microelectrodes / A. Hanawa, G. Ogata, S. Sawamura, K. Asai, S. Kanzaki, H. Hibino, Y. Einaga // *Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 92. – № 20. – P. 13742-13749.

30. Vaneev, A. N. Nano- and Microsensors for In Vivo Real-Time Electrochemical Analysis: Present and Future Perspectives / A. N. Vaneev, R. V. Timoshenko, P. V. Gorelkin, N. L. Klyachko, Y. E. Korchev, A. S. Erofeev // *Nanomaterials*. – 2022. – Vol. 12. – № 21. – P. 3736.

31. Si, B. Recent Advances in the Detection of Neurotransmitters / B. Si, E. Song // *Chemosensors*. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 1.

32. Perry, M. Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters / M. Perry, Q. Li, R. T. Kennedy // *Analytica Chimica Acta*. – 2009. – Vol. 653. – № 1. – P. 1-22.

33. Finnema, S. J. Application of cross-species PET imaging to assess neurotransmitter release in brain / S. J. Finnema, M. Scheinin, M. Shahid, J. Lehto, E. Borroni, B. Bang-Andersen, J. Sallinen, E. Wong, L. Farde, C. Halldin, S. Grimwood // *Psychopharmacology*. – 2015. – Vol. 232. – № 21-22. – P. 4129-4157.

34. Cunha-Bang, S. da. Measuring endogenous changes in serotonergic neurotransmission with [<sup>11</sup>C]Cimbi-36 positron emission tomography in humans / S. da Cunha-Bang, A. Ettrup, B. Mc Mahon, A. P. Skibsted, M. Schain, S. Lehel, A. Dyssegaard, L. M. Jørgensen, K. Møller, N. Gillings, C. Svarer, G. M. Knudsen // *Translational Psychiatry*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 134.

35. Ceccarini, J. Methods for Quantifying Neurotransmitter Dynamics in the Living Brain With PET Imaging / J. Ceccarini, H. Liu, K. Van Laere, E. D. Morris, C. Y. Sander // *Frontiers in Physiology*. – 2020. – Vol. 11.

36. Tuominen, L. Mapping neurotransmitter networks with PET: An example on serotonin and opioid systems / L. Tuominen, L. Nummenmaa, L. Keltikangas-Järvinen, O. Raitakari, J. Hietala // *Human Brain Mapping*. – 2014. – Vol. 35. – № 5. – P. 1875-1884.

37. Soares, D. P. Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications / D. P. Soares, M. Law // *Clinical Radiology*. – 2009. – Vol. 64. – № 1. – P. 12-21.
38. Semenova, N. A. Perspectives of Magnetic Resonance Spectroscopy as the Method of Diagnostics in Neuropathology / N. A. Semenova, T. A. Akhadov, S. L. Sitnikov, S. D. Varfolomeev // *MEDICAL VISUALIZATION*. – 2009. – Vol. 2. – P. 73-81.
39. Меньщиков, П. Е. Определение уровней N-ацетил аспартата, аспартата и глутамата в локальных структурах головного мозга человека методом J-редактирования спектров протонного магнитного резонанса *in vivo* / П. Е. Меньщиков, Н. А. Семенова, А. В. Манжурцев, Т. А. Ахадов, С. Д. Варфоломеев // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2018. – № 4. – P. 655-662.
40. Tognarelli, J. M. Magnetic Resonance Spectroscopy: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians / J. M. Tognarelli, M. Dawood, M. I. F. Shariff, V. P. B. Grover, M. M. E. Crossey, I. J. Cox, S. D. Taylor-Robinson, M. J. W. McPhail // *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. – 2015. – Vol. 5. – № 4. – P. 320-328.
41. Zhu, H. Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles / H. Zhu, J. Fan, J. Du, X. Peng // *Accounts of Chemical Research*. – 2016. – Vol. 49. – № 10. – P. 2115-2126.
42. Lu, X. Enhancing hydrophilicity of photoacoustic probes for effective ratiometric imaging of hydrogen peroxide / X. Lu, M. Zhao, P. Chen, Q. Fan, W. Wang, W. Huang // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2018. – Vol. 6. – № 27. – P. 4531-4538.
43. Wang, H. Lighting up the brain: genetically encoded fluorescent sensors for imaging neurotransmitters and neuromodulators / H. Wang, M. Jing, Y. Li // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2018. – Vol. 50. – P. 171-178.
44. Gaffield, M. A. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes / M. A. Gaffield, W. J. Betz // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – № 6. – P. 2916-2921.
45. Zhang, Q. Quantum dots provide an optical signal specific to full collapse fusion of synaptic vesicles / Q. Zhang, Y.-Q. Cao, R. W. Tsien // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104. – № 45. – P. 17843-17848.

46. Li, Z. Synaptic vesicle recycling studied in transgenic mice expressing synaptotHluorin / Z. Li, J. Burrone, W. J. Tyler, K. N. Hartman, D. F. Albeanu, V. N. Murthy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – № 17. – P. 6131-6136.
47. Li, Y. pHTomato, a red, genetically encoded indicator that enables multiplex interrogation of synaptic activity / Y. Li, R. W. Tsien // *Nature Neuroscience*. – 2012. – Vol. 15. – № 7. – P. 1047-1053.
48. König, M. Microdialysis and its use in behavioural studies: Focus on acetylcholine / M. König, A. Thinnies, J. Klein // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2018. – Vol. 300. – P. 206-215.
49. Varner, E. L. Enhancing Continuous Online Microdialysis Using Dexamethasone: Measurement of Dynamic Neurometabolic Changes during Spreading Depolarization / E. L. Varner, C. L. Leong, A. Jaquins-Gerstl, K. M. Nesbitt, M. G. Boutelle, A. C. Michael // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2017. – Vol. 8. – № 8. – P. 1779-1788.
50. Shannon, R. J. Cerebral microdialysis in clinical studies of drugs: pharmacokinetic applications / R. J. Shannon, K. L. H. Carpenter, M. R. Guilfoyle, A. Helmy, P. J. Hutchinson // *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. – 2013. – Vol. 40. – № 3. – P. 343-358.
51. Zandy, S. L. GABA Uptake Inhibition Reduces In Vivo Extraction Fraction in the Ventral Tegmental Area of Long Evans Rats Measured by Quantitative Microdialysis Under Transient Conditions / S. L. Zandy, R. A. Gonzales // *Neurochemical Research*. – 2018. – Vol. 43. – № 2. – P. 306-315.
52. Schultz, K. N. Time-resolved microdialysis for in vivo neurochemical measurements and other applications. Vol. 1 / K. N. Schultz, R. T. Kennedy. – 2008.
53. Placzek, M. S. PET Neurochemical Imaging Modes / M. S. Placzek, W. Zhao, H.-Y. Wey, T. M. Morin, J. M. Hooker // *Seminars in Nuclear Medicine*. – 2016. – Vol. 46. – № 1. – P. 20-27.
54. Puthongkham, P. Recent advances in fast-scan cyclic voltammetry / P. Puthongkham, B. J. Venton // *The Analyst*. – 2020. – Vol. 145. – № 4. – P. 1087-1102.
55. Bhavik A. Patel. *Electrochemistry for Bioanalysis* / Bhavik A. Patel. – Elsevier, 2021. – 330 p.

56. Richter, E. M. Amperometric Detection for Bioanalysis / E. M. Richter, R. A. A. Munoz // Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry / eds. L. T. Kubota [et al.]. – Cham : Springer International Publishing, 2022. – P. 253-264.

57. Mosharov, E. V. Analysis of exocytotic events recorded by amperometry / E. V. Mosharov, D. Sulzer // Nature Methods. – 2005. – Vol. 2. – № 9. – P. 651-658.

58. Travis, E. R. SPATIO-TEMPORAL RESOLUTION OF EXOCYTOSIS FROM INDIVIDUAL CELLS / E. R. Travis, R. M. Wightman // Annual Review of Biophysics. – 1998. – Vol. 27. – № Volume 27, 1998. – P. 77-103.

59. Liu, X. Recent development in amperometric measurements of vesicular exocytosis / X. Liu, Y. Tong, P.-P. Fang // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – Vol. 113. – P. 13-24.

60. McCarty, G. S. Neurotransmitter Readily Escapes Detection at the Opposing Microelectrode Surface in Typical Amperometric Measurements of Exocytosis at Single Cells / G. S. McCarty, L. E. Dunaway, J. D. Denison, L. A. Sombers // Analytical Chemistry. – 2022. – Vol. 94. – № 27. – P. 9548-9556.

61. Petrovic, J. Real-Time Monitoring of Chemical Transmission in Slices of the Murine Adrenal Gland / J. Petrovic, P. L. Walsh, K. T. Thornley, C. E. Miller, R. M. Wightman // Endocrinology. – 2010. – Vol. 151. – № 4. – P. 1773-1783.

62. Manning, B. M. Carbon-Fiber Microelectrode Amperometry Reveals Sickle-Cell-Induced Inflammation and Chronic Morphine Effects on Single Mast Cells / B. M. Manning, R. P. Hebbel, K. Gupta, C. L. Haynes // ACS Chemical Biology. – 2012. – Vol. 7. – № 3. – P. 543-551.

63. Borisovska, M. Distinct Modes of Dopamine and GABA Release in a Dual Transmitter Neuron / M. Borisovska, A. L. Bensen, G. Chong, G. L. Westbrook // The Journal of Neuroscience. – 2013. – Vol. 33. – № 5. – P. 1790-1796.

64. Rodeberg, N. T. Hitchhiker's Guide to Voltammetry: Acute and Chronic Electrodes for in Vivo Fast-Scan Cyclic Voltammetry / N. T. Rodeberg, S. G. Sandberg, J. A. Johnson, P. E. M. Phillips, R. M. Wightman // ACS Chemical Neuroscience. – 2017. – Vol. 8. – № 2. – P. 221-234.

65. Roberts, J. G. Specific Oxygen-Containing Functional Groups on the Carbon Surface Underlie an Enhanced Sensitivity to Dopamine at Electrochemically Pretreated Carbon Fiber Microelectrodes / J. G. Roberts, B. P. Moody, G. S. McCarty, L. A. Sombers // Langmuir. – 2010. – Vol. 26. – № 11. – P. 9116-9122.

66. Walton, L. R. Simultaneous fMRI and fast-scan cyclic voltammetry bridges evoked oxygen and neurotransmitter dynamics across spatiotemporal scales / L. R. Walton, M. Verber, S.-H. Lee, T.-H. H. Chao, R. M. Wightman, Y.-Y. I. Shih // *NeuroImage*. – 2021. – Vol. 244. – P. 118634.

67. Park, J. In vivo comparison of norepinephrine and dopamine release in rat brain by simultaneous measurements with fast-scan cyclic voltammetry / J. Park, P. Takmakov, R. M. Wightman // *Journal of Neurochemistry*. – 2011. – Vol. 119. – № 5. – P. 932-944.

68. Venton, B. J. Correlation of local changes in extracellular oxygen and pH that accompany dopaminergic terminal activity in the rat caudate-putamen / B. J. Venton, D. J. Michael, R. M. Wightman // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – Vol. 84. – № 2. – P. 373-381.

69. Venton, B. J. Fundamentals of fast-scan cyclic voltammetry for dopamine detection / B. J. Venton, Q. Cao // *Analyst*. – 2020. – Vol. 145. – № 4. – P. 1158-1168.

70. Smith, S. K. Carbon-Fiber Microbiosensor for Monitoring Rapid Lactate Fluctuations in Brain Tissue Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry / S. K. Smith, S. P. Gosrani, C. A. Lee, G. S. McCarty, L. A. Sombers // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90. – № 21. – P. 12994-12999.

71. Saylor, R. A. In vivo hippocampal serotonin dynamics in male and female mice: Determining effects of acute escitalopram using fast scan cyclic voltammetry / R. A. Saylor, M. Hersey, A. West, A. M. Buchanan, S. N. Berger, H. F. Nijhout, M. C. Reed, J. Best, P. Hashemi // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – № APR. – P. 1-13.

72. Berke, J. D. What does dopamine mean? / J. D. Berke // *Nature Neuroscience*. – 2018. – Vol. 21. – № 6. – P. 787-793.

73. Atcherley, C. W. Fast-Scan Controlled-Adsorption Voltammetry for the Quantification of Absolute Concentrations and Adsorption Dynamics / C. W. Atcherley, N. D. Laude, K. L. Parent, M. L. Heien // *Langmuir*. – 2013. – Vol. 29. – № 48. – P. 14885-14892.

74. Taylor, I. M. Direct in Vivo Electrochemical Detection of Resting Dopamine Using Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/Carbon Nanotube Functionalized Microelectrodes / I. M. Taylor, N. A. Patel, N. C. Freedman, E. Castagnola, X. T. Cui // *Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 91. – № 20. – P. 12917-12927.

75. Abdalla, A. In Vivo Ambient Serotonin Measurements at Carbon-Fiber Microelectrodes / A. Abdalla, C. W. Atcherley, P. Pathirathna, S. Samaranayake, B. Qiang, E. Peña, S. L. Morgan, M. L. Heien, P. Hashemi // *Analytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 89. – № 18. – P. 9703-9711.

76. Atcherley, C. W. The coaction of tonic and phasic dopamine dynamics / C. W. Atcherley, K. M. Wood, K. L. Parent, P. Hashemi, M. L. Heien // *Chemical Communications*. – 2015. – Vol. 51. – № 12. – P. 2235-2238.

77. Tan, C. Recent Advances in In Vivo Neurochemical Monitoring / C. Tan, E. M. Robbins, B. Wu, X. T. Cui // *Micromachines*. – 2021. – Vol. 12. – № 2. – P. 208.

78. Rand, E. A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid / E. Rand, A. Periyakaruppan, Z. Tanaka, D. A. Zhang, M. P. Marsh, R. J. Andrews, K. H. Lee, B. Chen, M. Meyyappan, J. E. Koehne // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – Vol. 42. – P. 434-438.

79. Zhu, M. Simultaneous in vivo voltammetric determination of dopamine and 5-Hydroxytryptamine in the mouse brain / M. Zhu, C. Zeng, J. Ye, Y. Sun // *Applied Surface Science*. – 2018. – Vol. 455. – P. 646-652.

80. Njagi, J. Electrochemical Quantification of Serotonin in the Live Embryonic Zebrafish Intestine / J. Njagi, M. Ball, M. Best, K. N. Wallace, S. Andreescu // *Analytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 82. – № 5. – P. 1822-1830.

81. Tan, C. Detection of neurochemicals with enhanced sensitivity and selectivity via hybrid multiwall carbon nanotube-ultrananocrystalline diamond microelectrodes / C. Tan, G. Dutta, H. Yin, S. Siddiqui, P. U. Arumugam // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 258. – P. 193-203.

82. Oh, Y. Tracking tonic dopamine levels in vivo using multiple cyclic square wave voltammetry / Y. Oh, M. L. Heien, C. Park, Y. M. Kang, J. Kim, S. L. Boschen, H. Shin, H. U. Cho, C. D. Blaha, K. E. Bennet, H. K. Lee, S. J. Jung, I. Y. Kim, K. H. Lee, D. P. Jang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 121. – P. 174-182.

83. Park, C. Fast Cyclic Square-Wave Voltammetry To Enhance Neurotransmitter Selectivity and Sensitivity / C. Park, Y. Oh, H. Shin, J. Kim, Y. Kang, J. Sim, H. U. Cho, H. K. Lee, S. J. Jung, C. D. Blaha, K. E. Bennet, M. L. Heien, K. H. Lee, I. Y. Kim, D. P. Jang // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90. – № 22. – P. 13348-13355.

84. Kissinger, P. T. Voltammetry in brain tissue - a new neurophysiological measurement / P. T. Kissinger, J. B. Hart, R. N. Adams // *Brain Research*. – 1973. – Vol. 55. – № 1. – P. 209-213.

85. Li, C.-L. Microelectrode studies of the electrical activity of the cerebral cortex in the cat\* / C.-L. Li, H. Jasper // *The Journal of Physiology*. – 1953. – Vol. 121. – № 1. – P. 117-140.

86. Cheng, H. Recent advances on in vivo analysis of ascorbic acid in brain functions / H. Cheng, L. Li, M. Zhang, Y. Jiang, P. Yu, F. Ma, L. Mao // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 109. – P. 247-259.

87. Yang, C. Carbon Nanomaterials for Neuroanalytical Chemistry / C. Yang, B. J. Venton // *Nanocarbons for Electroanalysis*. – 2017. – P. 55-83.

88. Wu, F. Analytical and Quantitative in Vivo Monitoring of Brain Neurochemistry by Electrochemical and Imaging Approaches / F. Wu, P. Yu, L. Mao // *ACS Omega*. – 2018. – Vol. 3. – № 10. – P. 13267-13274.

89. Zestos, A. G. Carbon Nanoelectrodes for the Electrochemical Detection of Neurotransmitters / A. G. Zestos // *International Journal of Electrochemistry*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-19.

90. Rong, G. In Vivo Biosensing: Progress and Perspectives / G. Rong, S. R. Corrie, H. A. Clark // *ACS Sensors*. – 2017. – Vol. 2. – № 3. – P. 327-338.

91. Ribeiro, J. A. Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters: A review / J. A. Ribeiro, P. M. V. Fernandes, C. M. Pereira, F. Silva // *Talanta*. – 2016. – Vol. 160. – P. 653-679.

92. Borroto-escuela, D. O. Receptor and Ion Channel Detection in the Brain. Vol. 110 / D. O. Borroto-escuela, B. Hagman, M. Woolfenden, [et al.]. – 2016. – 109-124 p.

93. Ding, S. Development of Glass-sealed Gold Nanoelectrodes for in vivo Detection of Dopamine in Rat Brain / S. Ding, Y. Liu, C. Ma, J. Zhang, A. Zhu, G. Shi // *Electroanalysis*. – 2018. – Vol. 30. – № 6. – P. 1041-1046.

94. Shin, M. Electrochemical Measurements of Acetylcholine-Stimulated Dopamine Release in Adult *Drosophila melanogaster* Brains / M. Shin, B. J. Venton // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90. – № 17. – P. 10318-10325.

95. Yang, C. Cavity Carbon-Nanopipette Electrodes for Dopamine Detection / C. Yang, K. Hu, D. Wang, Y. Zubi, S. T. Lee, P. Puthongkham, M. V. Mirkin, B. J. Venton // *Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 91. – № 7. – P. 4618-4624.
96. Kennedy, R. T. Emerging trends in in vivo neurochemical monitoring by microdialysis / R. T. Kennedy // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2013. – Vol. 17. – № 5. – P. 860-867.
97. ZHANG, S. In Vivo Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Dopamine / S. ZHANG, T. T. FENG, L. ZHANG, M. N. ZHANG // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 47. – № 10. – P. 1664-1670.
98. Huffman, M. L. Carbon-fiber microelectrodes for in vivo applications / M. L. Huffman, B. J. Venton // *Analyst*. – 2009. – Vol. 134. – № 1. – P. 18-24.
99. Feng, T. Low-Fouling Nanoporous Conductive Polymer-Coated Microelectrode for In Vivo Monitoring of Dopamine in the Rat Brain / T. Feng, W. Ji, Q. Tang, H. Wei, S. Zhang, J. Mao, Y. Zhang, L. Mao, M. Zhang // *Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 91. – № 16. – P. 10786-10791.
100. Wei, H. Natural Leukocyte Membrane-Masked Microelectrodes with an Enhanced Antifouling Ability and Biocompatibility for In Vivo Electrochemical Sensing / H. Wei, F. Wu, L. Li, X. Yang, C. Xu, P. Yu, F. Ma, L. Mao // *Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 92. – № 16. – P. 11374-11379.
101. Yang, C. 3D-Printed Carbon Electrodes for Neurotransmitter Detection / C. Yang, Q. Cao, P. Puthongkham, S. T. Lee, M. Ganesana, N. V. Lavrik, B. J. Venton // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2018. – Vol. 57. – № 43. – P. 14255-14259.
102. Matt, S. M. Where Is Dopamine and how do Immune Cells See it?: Dopamine-Mediated Immune Cell Function in Health and Disease. Vol. 15 / S. M. Matt, P. J. Gaskill // *J Neuroimmune Pharmacol*. – 2020. – Vol. 15. – №1. – P. 114-164
103. Abdalla, A. Fast serotonin voltammetry as a versatile tool for mapping dynamic tissue architecture: I. Responses at carbon fibers describe local tissue physiology / A. Abdalla, A. West, Y. Jin, R. A. Saylor, B. Qiang, E. Peña, D. J. Linden, H. F. Nijhout, M. C. Reed, J. Best, P. Hashemi // *Journal of Neurochemistry*. – 2020. – Vol. 153. – № 1. – P. 33-50.

104. Panthi, S. Hydrogen sulfide, nitric oxide, and neurodegenerative disorders / S. Panthi, S. Manandhar, K. Gautam // *Translational Neurodegeneration*. – 2018. – Vol. 7. – № 1. – P. 3.

105. Zhang, L. Ag<sub>2</sub>S/Ag Nanoparticle Microelectrodes for In Vivo Potentiometric Measurement of Hydrogen Sulfide Dynamics in the Rat Brain / L. Zhang, T. Xu, W. Ji, X. Wang, S. Cheng, S. Zhang, Y. Zhang, M. Zhang // *Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 93. – № 18. – P. 7063-7070.

106. Puthongkham, P. Machine learning and chemometrics for electrochemical sensors: moving forward to the future of analytical chemistry / P. Puthongkham, S. Wirojsaengthong, A. Suea-Ngam // *The Analyst*. – 2021. – Vol. 146. – № 21. – P. 6351-6364.

107. Xue, Y. Deep Learning for Voltammetric Sensing in a Living Animal Brain / Y. Xue, W. Ji, Y. Jiang, P. Yu, L. Mao // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2021. – Vol. 60. – № 44. – P. 23777-23783.

108. Wang, L. Flexible dopamine-sensing fiber based on potentiometric method for long-term detection in vivo / L. Wang, J. Chen, J. Wang, H. Li, C. Chen, J. Feng, Y. Guo, H. Yu, X. Sun, H. Peng // *Science China Chemistry*. – 2021. – Vol. 64. – № 10. – P. 1763-1769.

109. Hou, H. A Generalizable and Noncovalent Strategy for Interfacing Aptamers with a Microelectrode for the Selective Sensing of Neurotransmitters In Vivo / H. Hou, Y. Jin, H. Wei, W. Ji, Y. Xue, J. Hu, M. Zhang, Y. Jiang, L. Mao // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2020. – Vol. 59. – № 43. – P. 18996-19000.

110. Geraskevich, A. v. Electrochemical Sensors for the Detection of Reactive Oxygen Species in Biological Systems: A Critical Review / A. v. Geraskevich, A. N. Solomonenko, E. v. Dorozhko, E. I. Korotkova, J. Barek // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2022. – P. 1-33.

111. Munteanu, R.-E. E. 2D materials in electrochemical sensors for in vitro or in vivo use / R.-E. E. Munteanu, P. S. Moreno, M. Bramini, S. Gáspár // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 413. – № 3. – P. 701-725.

112. Ďuračková, Z. Some Current Insights into Oxidative Stress / Z. Ďuračková // *Physiological Research*. – 2010. – Vol. 59. – № 4. – P. 459-469.

113. Winterbourn, C. C. Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide / C. C. Winterbourn // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2018. – Vol. 29. – № 6. – P. 541-551.
114. Reczek, C. R. ROS-dependent signal transduction / C. R. Reczek, N. S. Chandel // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2015. – Vol. 33. – P. 8-13.
115. Sies, H. Role of Metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation / H. Sies // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 13. – P. 8735-8741.
116. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D. P. Jones // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2020. – Vol. 21. – № 7. – P. 363-383.
117. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiological Reviews*. – 1979. – Vol. 59. – № 3. – P. 527-605.
118. Sies, H. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology / H. Sies, V. V. Belousov, N. S. Chandel, M. J. Davies, D. P. Jones, G. E. Mann, M. P. Murphy, M. Yamamoto, C. Winterbourn // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 23. – № 7. – P. 499-515.
119. Bienert, G. P. Membrane transport of hydrogen peroxide / G. P. Bienert, J. K. Schjoerring, T. P. Jahn // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2006. – Vol. 1758. – № 8. – P. 994-1003.
120. Seaver, L. C. Hydrogen Peroxide Fluxes and Compartmentalization inside Growing *Escherichia coli* / L. C. Seaver, J. A. Imlay // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – Vol. 183. – № 24. – P. 7182-7189.
121. Makino, N. A metabolic model describing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination by mammalian cells including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data / N. Makino, K. Sasaki, K. Hashida, Y. Sakakura // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2004. – Vol. 1673. – № 3. – P. 149-159.
122. Fridovich, I. Superoxide radical: an endogenous toxicant / I. Fridovich // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 1983. – Vol. 23. – № 1. – P. 239-257.

123. Dupré-Crochet, S. ROS production in phagocytes: why, when, and where? / S. Dupré-Crochet, M. Erard, O. Nüße // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2013. – Vol. 94. – № 4. – P. 657-670.

124. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants / H. Sies // *Experimental Physiology*. – 1997. – Vol. 82. – № 2. – P. 291-295.

125. Valdivia, A. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update / A. Valdivia, S. Perez-Alvarez, J. D. Aroca-Aguilar, I. Ikuta, J. Jordan // *Journal of physiology and biochemistry*. – 2009. – Vol. 65. – № 2. – P. 195-208.

126. Deng, Z. Recent advances in electrochemical analysis of hydrogen peroxide towards in vivo detection / Z. Deng, L. Zhao, H. Zhou, X. Xu, W. Zheng // *Process Biochemistry*. – 2022. – Vol. 115. – P. 57-69.

127. Nauseef, W. M. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases / W. M. Nauseef // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2014. – Vol. 1840. – № 2. – P. 757-767.

128. Scheinok, S. Comparison of different methods for measuring the superoxide radical by EPR spectroscopy in buffer, cell lysates and cells / S. Scheinok, P. Leveque, P. Sonveaux, B. Driesschaert, B. Gallez // *Free Radical Research*. – 2018. – Vol. 52. – № 10. – P. 1182-1196.

129. Faulkner, K. Luminol and lucigenin as detectors for  $O_2\dot{s}^-$  / K. Faulkner, I. Fridovich // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1993. – Vol. 15. – № 4. – P. 447-451.

130. Kettle, A. J. Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils / A. J. Kettle, A. C. Carr, C. C. Winterbourn // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1994. – Vol. 17. – № 2. – P. 161-164.

131. Lippert, A. R. Boronate Oxidation as a Bioorthogonal Reaction Approach for Studying the Chemistry of Hydrogen Peroxide in Living Systems / A. R. Lippert, G. C. Van de Bittner, C. J. Chang // *Accounts of Chemical Research*. – 2011. – Vol. 44. – № 9. – P. 793-804.

132. Gatin-Fraudet, B. Evaluation of borinic acids as new, fast hydrogen peroxide-responsive triggers / B. Gatin-Fraudet, R. Ottenwelter, T. Le Saux, S. Norsikian, M. Pucher, T. Lombès, A. Baron, P. Durand, G. Doisneau, Y. Bourdreux, B. I. Iorga, M. Erard, L. Jullien, D. Guianvarc'h, D. Urban, B. Vauzeilles //

Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2021. – Vol. 118. – № 50. – P. e2107503118

133. Winterbourn, C. C. Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide / C. C. Winterbourn // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2018. – Vol. 29. – № 6. – P. 541-551.

134. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress / H. Sies // *Redox Biology*. – 2017. – Vol. 11. – P. 613-619.

135. Forman, H. J. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology / H. J. Forman, O. Augusto, R. Brigelius-Flohe, P. A. Dennery, B. Kalyanaraman, H. Ischiropoulos, G. E. Mann, R. Radi, L. J. Roberts, J. Vina, K. J. A. Davies // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 78. – P. 233-235.

136. Kowaltowski, A. J. Strategies to detect mitochondrial oxidants / A. J. Kowaltowski // *Redox Biology*. – 2019. – Vol. 21. – P. 101065.

137. Brandes, R. P. Redox Regulation Beyond ROS / R. P. Brandes, F. Rezende, K. Schröder // *Circulation Research*. – 2018. – Vol. 123. – № 3. – P. 326-328.

138. Kalyanaraman, B. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations / B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K. J. A. Davies, P. A. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts, H. Ischiropoulos // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 52. – № 1. – P. 1-6.

139. Bilan, D. S. *In Vivo* Imaging of Hydrogen Peroxide with HyPer Probes / D. S. Bilan, V. V. Belousov // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2018. – Vol. 29. – № 6. – P. 569-584.

140. Morgan, B. Real-time monitoring of basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels with peroxiredoxin-based probes / B. Morgan, K. Van Laer, T. N. E. Owusu, D. Ezeriņa, D. Pastor-Flores, P. S. Amponsah, A. Tursch, T. P. Dick // *Nature Chemical Biology*. – 2016. – Vol. 12. – № 6. – P. 437-443.

141. Hao, Z. Genetically encoded fluorescent sensors for measuring transition and heavy metals in biological systems / Z. Hao, R. Zhu, P. R. Chen // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 43. – P. 87-96.

142. Pak, V. V. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function / V. V. Pak, D. Ezeriņa, O. G. Lyublinskaya, B. Pedre, P. A. Tyurin-Kuzmin, N. M. Mishina, M. Thauvin, D. Young, K. Wahni, S. A. Martínez Gache, A. D. Demidovich, Y. G. Ermakova, Y. D. Maslova, A. G. Shokhina, E. Eroglu, D. S. Bilan, I. Bogeski, T. Michel, S. Vríz [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2020. – Vol. 31. – № 3. – P. 642-653.

143. Ferrer-Sueta, G. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration / G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo, S. Bartesaghi, S. Carballal, N. Romero, B. Alvarez, R. Radi // *Chemical Reviews*. – 2018. – Vol. 118. – № 3. – P. 1338-1408.

144. Kostyuk, A. I. Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives / A. I. Kostyuk, M.-A. Tossounian, A. S. Panova, M. Thauvin, R. I. Raevskii, D. Ezeriņa, K. Wahni, I. Van Molle, A. D. Sergeeva, D. Vertommen, A. Yu. Gorokhovatsky, M. S. Baranov, S. Vríz, J. Messens, D. S. Bilan, V. V. Belousov // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 171.

145. Cairns, A. G. Insights on Targeting Small Molecules to the Mitochondrial Matrix and the Preparation of MitoB and MitoP as Exomarkers of Mitochondrial Hydrogen Peroxide / A. G. Cairns, S. J. McQuaker, M. P. Murphy, R. C. Hartley. – 2021. – P. 87-117.

146. Guo, J. Clinical identification of diabetic ketosis/diabetic ketoacidosis acid by electrochemical dual channel test strip with medical smartphone / J. Guo, X. Huang, X. Ma // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 275. – P. 446-450.

147. Dou, B. Trimetallic Hybrid Nanoflower-Decorated MoS<sub>2</sub> Nanosheet Sensor for Direct in Situ Monitoring of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Secreted from Live Cancer Cells / B. Dou, J. Yang, R. Yuan, Y. Xiang // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90. – № 9. – P. 5945-5950.

148. Zhang, Y. A multi-component Cu<sub>2</sub>O@FePO<sub>4</sub> core–cage structure to jointly promote fast electron transfer toward the highly sensitive *in situ* detection of nitric oxide / Y. Zhang, S.-Y. Lu, Z. Shi, Z. L. Zhao, Q. Liu, J.-C. Gao, T. Liang, Z. Zou, C. M. Li // *Nanoscale*. – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 4471-4477.

149. Fujita, M. In vivo real-time measurement of superoxide anion radical with a novel electrochemical sensor / M. Fujita, R. Tsuruta, S. Kasaoka, K. Fujimoto, R.

Tanaka, Y. Oda, M. Nanba, M. Igarashi, M. Yuasa, T. Yoshikawa, T. Maekawa // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 47. – № 7. – P. 1039-1048.

150. Peng, Q. In vivo monitoring of superoxide anion from Alzheimer's rat brains with functionalized ionic liquid polymer decorated microsensor / Q. Peng, X. Yan, X. Shi, S. Ou, H. Gu, X. Yin, G. Shi, Y. Yu // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2019. – Vol. 144. – № August. – P. 111665.

151. Dumitrescu, E. Real time electrochemical investigation of the release, distribution and modulation of nitric oxide in the intestine of individual zebrafish embryos / E. Dumitrescu, K. N. Wallace, S. Andreescu // *Nitric Oxide*. – 2018. – Vol. 74. – P. 32-38.

152. Meiller, A. Electrochemical Nitric Oxide Microsensors Based on a Fluorinated Xerogel Screening Layer for in Vivo Brain Monitoring / A. Meiller, E. Sequeira, S. Marinesco // *Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 92. – № 2. – P. 1804-1810.

153. Liu, F. Real-time monitoring of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) in the rat brain by developing a ratiometric electrochemical biosensor / F. Liu, H. Dong, Y. Tian // *The Analyst*. – 2019. – Vol. 144. – № 6. – P. 2150-2157.

154. Gao, X. A single-atom Cu–N<sub>2</sub> catalyst eliminates oxygen interference for electrochemical sensing of hydrogen peroxide in a living animal brain / X. Gao, W. Ma, J. Mao, C.-T. He, W. Ji, Z. Chen, W. Chen, W. Wu, P. Yu, L. Mao // *Chemical Science*. – 2021. – Vol. 12. – № 45. – P. 15045-15053.

155. Li, X. Platinized Silica Nanoporous Membrane Electrodes for Low-Fouling Hydrogen Peroxide Detection / X. Li, L. Zhou, J. Ding, L. Sun, B. Su // *ChemElectroChem*. – 2020. – Vol. 7. – № 9. – P. 2081-2086.

156. Zhu, W. A new microdialysis-electrochemical device for in vivo simultaneous determination of acetylcholine and choline in rat brain treated with N-methyl-(R)-salsolinol / W. Zhu, Y. An, J. Zheng, L. Tang, W. Zhang, L. Jin, L. Jiang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. – Vol. 24. – № 12. – P. 3594-3599.

157. Lowry, J. P. Characterization of Glucose Oxidase-Modified Poly(phenylenediamine)-Coated Electrodes in vitro and in vivo: Homogeneous Interference by Ascorbic Acid in Hydrogen Peroxide Detection / J. P. Lowry, Karl. McAteer, S. S. el Atrash, Adrienne. Duff, R. D. O'Neill // *Analytical Chemistry*. – 1994. – Vol. 66. – № 10. – P. 1754-1761.

158. Li, R. In Vivo Monitoring of  $H_2O_2$  with Polydopamine and Prussian Blue-coated Microelectrode / R. Li, X. Liu, W. Qiu, M. Zhang // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88. – № 15. – P. 7769-7776.

159. Gao, X. A single-atom Cu–N<sub>2</sub> catalyst eliminates oxygen interference for electrochemical sensing of hydrogen peroxide in a living animal brain / X. Gao, W. Ma, J. Mao, C.-T. He, W. Ji, Z. Chen, W. Chen, W. Wu, P. Yu, L. Mao // *Chemical Science*. – 2021. – Vol. 12. – № 45. – P. 15045-15053.

160. Wilson, L. R. Selective and Mechanically Robust Sensors for Electrochemical Measurements of Real-Time Hydrogen Peroxide Dynamics in Vivo / L. R. Wilson, S. Panda, A. C. Schmidt, L. A. Sombers // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90. – № 1. – P. 888-895.

161. ZHANG, S. In Vivo Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Dopamine / S. ZHANG, T. T. FENG, L. ZHANG, M. N. ZHANG // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 47. – № 10. – P. 1664-1670.

162. Grist, S. M. Oxygen Measurement in Microdevices / S. M. Grist, K. L. Bennewith, K. C. Cheung // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2022. – Vol. 15. – № 1. – P. 221-246.

163. Wei, Y. Review of Dissolved Oxygen Detection Technology: From Laboratory Analysis to Online Intelligent Detection / Y. Wei, Y. Jiao, D. An, D. Li, W. Li, Q. Wei // *Sensors*. – 2019. – Vol. 19. – № 18. – P. 3995.

164. Clark, L. C. Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography / L. C. Clark, R. Wolf, D. Granger, Z. Taylor // *Journal of Applied Physiology*. – 1953. – Vol. 6. – № 3. – P. 189-193.

165. Lowry, J. P. Characterization of carbon paste electrodes in vitro for simultaneous amperometric measurement of changes in oxygen and ascorbic acid concentrations in vivo / J. P. Lowry, M. G. Boutelle, R. D. O'Neill, M. Fillenz // *The Analyst*. – 1996. – Vol. 121. – № 6. – P. 761.

166. Kellner, K. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor / K. Kellner, G. Liebsch, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, T. Blunk, M. B. Schulz, A. Göpferich // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2002. – Vol. 80. – № 1. – P. 73-83.

167. Papagiakoumou, E. Scanless two-photon excitation with temporal focusing / E. Papagiakoumou, E. Ronzitti, V. Emiliani // *Nature Methods*. – 2020. – Vol. 17. – № 6. – P. 571-581.

168. Zong, W. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice / W. Zong, R. Wu, M. Li, Y. Hu, Y. Li, J. Li, H. Rong, H. Wu, Y. Xu, Y. Lu, H. Jia, M. Fan, Z. Zhou, Y. Zhang, A. Wang, L. Chen, H. Cheng // *Nature Methods*. – 2017. – Vol. 14. – № 7. – P. 713-719.

169. Helmchen, F. Deep tissue two-photon microscopy / F. Helmchen, W. Denk // *Nature Methods*. – 2005. – Vol. 2. – № 12. – P. 932-940.

170. Webb, J. D. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing / J. D. Webb, M. L. Coleman, C. W. Pugh // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2009. – Vol. 66. – № 22. – P. 3539-3554.

171. Newman, R. H. Genetically Encodable Fluorescent Biosensors for Tracking Signaling Dynamics in Living Cells / R. H. Newman, M. D. Fosbrink, J. Zhang // *Chemical Reviews*. – 2011. – Vol. 111. – № 5. – P. 3614-3666.

172. Potzkei, J. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor / J. Potzkei, M. Kunze, T. Drepper, T. Gensch, K.-E. Jaeger, J. Büchs // *BMC Biology*. – 2012. – Vol. 10. – № 1. – P. 28.

173. Zhou, L. In Vivo Monitoring of Oxygen in Rat Brain by Carbon Fiber Microelectrode Modified with Antifouling Nanoporous Membrane / L. Zhou, H. Hou, H. Wei, L. Yao, L. Sun, P. Yu, B. Su, L. Mao // *Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 91. – № 5. – P. 3645-3651.

174. Cao, Y. Electrophoretically Sheathed Carbon Fiber Microelectrodes with Metal/Nitrogen/Carbon Electrocatalyst for Electrochemical Monitoring of Oxygen in Vivo / Y. Cao, W. Ma, W. Ji, P. Yu, F. Wu, H. Wu, L. Mao // *ACS Applied Bio Materials*. – 2019. – Vol. 2. – № 3. – P. 1376-1383.

175. Zhang, Q. Cerebral oxygenation during locomotion is modulated by respiration / Q. Zhang, M. Roche, K. W. Gheres, E. Chaigneau, R. T. Kedarasetti, W. D. Haselden, S. Charpak, P. J. Drew // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 5515.

176. Wang, Z. Nanopipettes: a potential tool for DNA detection / Z. Wang, Y. Liu, L. Yu, Y. Li, G. Qian, S. Chang // *The Analyst*. – 2019. – Vol. 144. – № 17. – P. 5037-5047.

177. Perry, D. Characterization of Nanopipettes / D. Perry, D. Momotenko, R. A. Lazenby, M. Kang, P. R. Unwin // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88. – № 10. – P. 5523-5530.

178. Morris, C. A. Applications of nanopipettes in the analytical sciences / C. A. Morris, A. K. Friedman, L. A. Baker // *The Analyst*. – 2010. – Vol. 135. – № 9. – P. 2190.

179. Yu, R. J. Confined Nanopipette Sensing: From Single Molecules, Single Nanoparticles, to Single Cells / R. J. Yu, Y. L. Ying, R. Gao, Y. T. Long // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2019. – Vol. 58. – № 12. – P. 3706-3714.

180. Chang, M. Review—Recent Advances in Nanosensors Built with Pre-Pulled Glass Nanopipettes and Their Applications in Chemical and Biological Sensing / M. Chang, G. Morgan, F. Bedier, A. Chieng, P. Gomez, S. Raminani, Y. Wang // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2020. – Vol. 167. – № 3. – P. 037533.

181. Li, C. High resolution imaging using scanning ion conductance microscopy with improved distance feedback control / C. Li, N. Johnson, V. Ostanin, A. Shevchuk, L. Ying, Y. Korchev, D. Klenerman // *Progress in Natural Science*. – 2008. – Vol. 18. – № 6. – P. 671-677.

182. Shevchuk, A. I. Imaging proteins in membranes of living cells by high-resolution scanning ion conductance microscopy / A. I. Shevchuk, G. I. Frolenkov, D. Sánchez, P. S. James, N. Freedman, M. J. Lab, R. Jones, D. Klenerman, Y. E. Korchev // *Angewandte Chemie*. – 2006. – Vol. 118. – № 14. – P. 2270-2274.

183. Novak, P. Imaging single nanoparticle interactions with human lung cells using fast ion conductance microscopy / P. Novak, A. Shevchuk, P. Ruenaroengsak, M. Miragoli, A. J. Thorley, D. Klenerman, M. J. Lab, T. D. Tetley, J. Gorelik, Y. E. Korchev // *Nano letters*. – 2014. – Vol. 14. – № 3. – P. 1202-1207.

184. Novak, P. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy / P. Novak, C. Li, A. I. Shevchuk, R. Stepanyan, M. Caldwell, S. Hughes, T. G. Smart, J. Gorelik, V. P. Ostanin, M. J. Lab, G. W. J. Moss, G. I. Frolenkov, D. Klenerman, Y. E. Korchev // *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6. – № 4. – P. 279-281.

185. Sánchez, D. Noncontact Measurement of the Local Mechanical Properties of Living Cells Using Pressure Applied via a Pipette / D. Sánchez, N. Johnson, C. Li, P. Novak, J. Rheinlaender, Y. Zhang, U. Anand, P. Anand, J. Gorelik, G. I. Frolenkov,

C. Benham, M. Lab, V. P. Ostanin, T. E. Schäffer, D. Klenerman, Y. E. Korchev // *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 95. – № 6. – P. 3017-3027.

186. Amemiya, S. Scanning Electrochemical Microscopy / S. Amemiya, A. J. Bard, F.-R. F. Fan, M. V. Mirkin, P. R. Unwin // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 1. – № 1. – P. 95-131.

187. Zoski, C. G. Review—Advances in Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) / C. G. Zoski // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2016. – Vol. 163. – № 4. – P. H3088-H3100.

188. Ventosa, E. Scanning electrochemical microscopy of Li-ion batteries / E. Ventosa, W. Schuhmann. – Text : electronic // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – Vol. 17. – № 43. – P. 28441-28450. – URL: (date accessed: 12.03.2019).

189. Schrlau, M. G. Cell electrophysiology with carbon nanopipettes / M. G. Schrlau, N. J. Dun, H. H. Bau // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 3. – № 3. – P. 563-568.

190. Nguyen, T. D. Nanostars on Nanopipette Tips: A Raman Probe for Quantifying Oxygen Levels in Hypoxic Single Cells and Tumours / T. D. Nguyen, M. S. Song, N. H. Ly, S. Y. Lee, S. W. Joo // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2019. – Vol. 58. – № 9. – P. 2710-2714.

191. Bulbul, G. Nanopipettes as Monitoring Probes for the Single Living Cell: State of the Art and Future Directions in Molecular Biology / G. Bulbul, G. Chaves, J. Olivier, R. Ozel, N. Pourmand // *Cells*. – 2018. – Vol. 7. – № 6. – P. 55.

192. Wang, S. In Vivo Electrochemical Biosensors: Recent Advances in Molecular Design, Electrode Materials, and Electrochemical Devices / S. Wang, Y. Liu, A. Zhu, Y. Tian // *Analytical Chemistry*. – 2023. – Vol. 95. – № 1. – P. 388-406.

193. Kangmenna, A. Carbon-based electrode materials for sensor application: a review / A. Kangmenna, R. B. Forkuo, E. S. Agorku // *Sensing Technology*. – 2024. – Vol. 2. – № 1. – P. 2350174.

194. Lin, P.-H. Antifouling strategies in advanced electrochemical sensors and biosensors / P.-H. Lin, B.-R. Li // *The Analyst*. – 2020. – Vol. 145. – № 4. – P. 1110-1120.

195. Logman, M. J. Quantitation of in vivo measurements with carbon fiber microelectrodes / M. J. Logman, E. A. Budygin, R. R. Gainetdinov, R. M. Wightman // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2000. – Vol. 95. – № 2. – P. 95-102.

196. Wrona, M. Z. Oxidation chemistry of 5-hydroxytryptamine. 1. Mechanism and products formed at micromolar concentrations / M. Z. Wrona, G. Dryhurst // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1987. – Vol. 52. – № 13. – P. 2817-2825.

197. Patel, A. N. Investigation of film formation properties during electrochemical oxidation of serotonin (5-HT) at polycrystalline boron doped diamond / A. N. Patel, P. R. Unwin, J. V. Macpherson // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2013. – Vol. 15. – № 41. – P. 18085.

198. Jiang, C. Antifouling Strategies for Selective in Vitro and in Vivo Sensing / C. Jiang, G. Wang, R. Hein, N. Liu, X. Luo, J. J. Davis // *Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 120. – № 8. – P. 3852-3889.

199. Forster, R. J. Microelectrodes: new dimensions in electrochemistry / R. J. Forster // *Chemical Society Reviews*. – 1994. – Vol. 23. – № 4. – P. 289.

200. Denuault, G. Microelectrodes: theory and applications / G. Denuault // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1991. – Vol. 315. – № 1-2. – P. 320-321.

201. Shein, S. A. VEGF- and VEGFR2-Targeted Liposomes for Cisplatin Delivery to Glioma Cells / S. A. Shein, I. I. Kuznetsov, T. O. Abakumova, P. S. Chelushkin, P. A. Melnikov, A. A. Korchagina, D. A. Bychkov, I. F. Seregina, M. A. Bolshov, A. V. Kabanov, V. P. Chekhonin, N. V. Nukolova // *Molecular Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 13. – № 11. – P. 3712-3723.

202. Penner, R. M. Fabrication and Use of Nanometer-Sized Electrodes in Electrochemistry / R. M. Penner, M. J. Heben, T. L. Longin, N. S. Lewis // *Science*. – 1990. – Vol. 250. – № 4984. – P. 1118-1121.

203. Wolbarsht, M. L. Glass Insulated Platinum Microelectrode / M. L. Wolbarsht, E. F. MacNichol, H. G. Wagner // *Science*. – 1960. – Vol. 132. – № 3436. – P. 1309-1310.

204. Arrigan, D. W. M. Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications / D. W. M. Arrigan // *The Analyst*. – 2004. – Vol. 129. – № 12. – P. 1157.

205. Murray, R. W. Nanoelectrochemistry: metal nanoparticles, nanoelectrodes, and nanopores / R. W. Murray // *Chemical reviews*. – 2008. – Vol. 108. – № 7. – P. 2688-2720.

206. Cox, J. T. Nanoelectrodes: Recent Advances and New Directions / J. T. Cox, B. Zhang // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 253-272.

207. Karyakin, A. A. Prussian Blue Based Nanoelectrode Arrays for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection / A. A. Karyakin, E. A. Puganova, I. A. Budashov, I. N. Kurochkin, E. E. Karyakina, V. A. Levchenko, V. N. Matveyenko, S. D. Varfolomeyev. – Text : electronic // *Analytical Chemistry*. – 2004. – Vol. 76. – № 2. – P. 474-478.

208. Zhang, J. Recent advances of scanning electrochemical microscopy and scanning ion conductance microscopy for single-cell analysis / J. Zhang, T. Zhu, J. Lang, W. Fu, F. Li. – Text : electronic // *Current Opinion in Electrochemistry*. – 2020. – Vol. 22. – P. 178-185.

209. Mezour, M. A. Fabrication and Characterization of Laser Pulled Platinum Microelectrodes with Controlled Geometry / M. A. Mezour, M. Morin, J. Mauzeroll // *Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 83. – № 6. – P. 2378-2382.

210. Velmurugan, J. Scanning Electrochemical Microscopy with Gold Nanotips: The Effect of Electrode Material on Electron Transfer Rates / J. Velmurugan, P. Sun, M. V. Mirkin // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2009. – Vol. 113. – № 1. – P. 459-464.

211. Zhang, B. Bench-Top Method for Fabricating Glass-Sealed Nanodisk Electrodes, Glass Nanopore Electrodes, and Glass Nanopore Membranes of Controlled Size / B. Zhang, J. Galusha, P. G. Shiozawa, G. Wang, A. J. Bergren, R. M. Jones, R. J. White, E. N. Ervin, C. C. Cauley, H. S. White // *Analytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 79. – № 13. – P. 4778-4787.

212. Katemann, B. B. Fabrication and Characterization of Needle-Type / B. B. Katemann, W. Schuhmann // *Electroanalysis*. – 2002. – Vol. 14. – № 1. – P. 22-28.

213. Shao, Y. Nanometer-Sized Electrochemical Sensors / Y. Shao, M. V. Mirkin, G. Fish, S. Kokotov, D. Palanker, A. Lewis // *Analytical Chemistry*. – 1997. – Vol. 69. – № 8. – P. 1627-1634.

214. Velmurugan, J. Fabrication of nanoelectrodes and metal clusters by electrodeposition / J. Velmurugan, M. V. Mirkin // *ChemPhysChem*. – 2010. – Vol. 11. – № 13. – P. 3011-3017.

215. Li, Y. Preparation and Electrochemical Response of 1–3 nm Pt Disk Electrodes / Y. Li, D. Bergman, B. Zhang // *Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 81. – № 13. – P. 5496-5502.
216. Chen, R. Focused-Ion-Beam-Milled Carbon Nanoelectrodes for Scanning Electrochemical Microscopy / R. Chen, K. Hu, Y. Yu, M. V. Mirkin, S. Amemiya // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2016. – Vol. 163. – № 4. – P. H3032-H3037.
217. Schrlau, M. G. Carbon nanopipettes for cell probes and intracellular injection / M. G. Schrlau, E. M. Falls, B. L. Ziober, H. H. Bau // *Nanotechnology*. – 2008. – Vol. 19. – № 1. – P. 015101.
218. Vitol, E. A. Effects of Deposition Conditions on the Structure and Chemical Properties of Carbon Nanopipettes / E. A. Vitol, M. G. Schrlau, S. Bhattacharyya, P. Ducheyne, H. H. Bau, G. Friedman, Y. Gogotsi // *Chemical Vapor Deposition*. – 2009. – Vol. 15. – № 7-9. – P. 204-208.
219. Rees, H. R. Carbon Nanopipette Electrodes for Dopamine Detection in *Drosophila* / H. R. Rees, S. E. Anderson, E. Privman, H. H. Bau, B. J. Venton // *Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 87. – № 7. – P. 3849-3855.
220. Actis, P. Electrochemical Nanoprobes for Single-Cell Analysis / P. Actis, S. Tokar, J. Clausmeyer, B. Babakinejad, S. Mikhaleva, R. Cornut, Y. Takahashi, A. López Córdoba, P. Novak, A. I. Shevchuck, J. A. Dougan, S. G. Kazarian, P. V. Gorelkin, A. S. Erofeev, I. V. Yaminsky, P. R. Unwin, W. Schuhmann, D. Klenerman, D. A. Rusakov [et al.] // *ACS Nano*. – 2014. – Vol. 8. – № 1. – P. 875-884.
221. Mashtalir, O. Carbon Pipette-Based Electrochemical Nanosampler / O. Mashtalir, Y. Gogotsi, Y. Yu, G. Friedman, J.-M. Noël, M. V. Mirkin, Y. Gao // *Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 86. – № 7. – P. 3365-3372.
222. Hu, K. Platinized carbon nanoelectrodes as potentiometric and amperometric SECM probes / K. Hu, Y. Gao, Y. Wang, Y. Yu, X. Zhao, S. A. Rotenberg, E. Gökmese, M. V. Mirkin, G. Friedman, Y. Gogotsi // *Journal of Solid State Electrochemistry*. – 2013. – Vol. 17. – № 12. – P. 2971-2977.
223. Heller, I. Electrochemistry at Single-Walled Carbon Nanotubes: The Role of Band Structure and Quantum Capacitance / I. Heller, J. Kong, K. A. Williams, C. Dekker, S. G. Lemay // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128. – № 22. – P. 7353-7359.

224. Singhal, R. Multifunctional carbon-nanotube cellular endoscopes / R. Singhal, Z. Orynbayeva, R. V. Kalyana Sundaram, J. J. Niu, S. Bhattacharyya, E. A. Vitol, M. G. Schrlau, E. S. Papazoglou, G. Friedman, Y. Gogotsi // *Nature Nanotechnology*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. 57-64.
225. Elgrishi, N. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry / N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, J. L. Dempsey // *Journal of Chemical Education*. – 2018. – Vol. 95. – № 2. – P. 197-206.
226. Wightman, R. M. Microvoltammetric electrodes / R. M. Wightman // *Analytical Chemistry*. – 1981. – Vol. 53. – № 9. – P. 1125A-1134A.
227. Guth, U. Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review / U. Guth, W. Vonau, J. Zosel // *Measurement Science and Technology*. – 2009. – Vol. 20. – № 4. – P. 042002.
228. Clausmeyer, J. Nanosensors for the detection of hydrogen peroxide / J. Clausmeyer, P. Actis, A. L. Córdoba, Y. Korchev, W. Schuhmann // *Electrochemistry Communications*. – 2014. – Vol. 40. – P. 28-30.
229. Actis, P. Electrochemical nanoprobables for single-cell analysis / P. Actis, S. Tokar, J. Clausmeyer, B. Babakinejad, S. Mikhaleva, R. Cornut, Y. Takahashi, A. López Córdoba, P. Novak, A. I. Shevchuck // *Acs Nano*. – 2014. – Vol. 8. – № 1. – P. 875-884.
230. Erofeev, A. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles / A. Erofeev, P. Gorelkin, A. Garanina, A. Alova, M. Efremova, N. Vorobyeva, C. Edwards, Y. Korchev, A. Majouga // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 7462.
231. Li, Y. Chemical nature of electrochemical activation of carbon electrodes / Y. Li, J. Zhou, J. Song, X. Liang, Z. Zhang, D. Men, D. Wang, X. E. Zhang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2019. – Vol. 144. – № 44. – P. 111534.
232. Yasin, H. M. Studies of the electrodeposition of platinum metal from a hexachloroplatinic acid bath / H. M. Yasin, G. Denuault, D. Pletcher // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 633. – № 2. – P. 327-332.
233. Kumari, S. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival / S. Kumari, A. K. Badana, M. M. G, S. G, R. Malla // *Biomarker Insights*. – 2018. – Vol. 13. – P. 117727191875539.

234. Mathew J. Garnett. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer. – URL: <https://www.cancerrxgene.org> (date accessed: 16.10.2024). – Text : electronic.

235. Shi, Y.-K. Synthesis and biological evaluation of new steroidal pyridines as potential anti-prostate cancer agents / Y.-K. Shi, B. Wang, X.-L. Shi, Y.-D. Zhao, B. Yu, H.-M. Liu // *European journal of medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 145. – P. 11-22.

236. Wang, Y. Nanoelectrodes for determination of reactive oxygen and nitrogen species inside murine macrophages / Y. Wang, J.-M. Noël, J. Velmurugan, W. Nogala, M. V. Mirkin, C. Lu, M. G. Collignon, F. Lemaître, C. Amatore, J.-M. Noel, J. Velmurugan, W. Nogala, M. V. Mirkin, C. Lu, M. Guille Collignon, F. Lemaître, C. Amatore // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 29. – P. 11534-11539.

237. Mizumachi, T. Increased mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells / T. Mizumachi, S. Suzuki, A. Naito, J. Carcel-Trullols, T. T. Evans, P. M. Spring, N. Oridate, Y. Furuta, S. Fukuda, M. Higuchi // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27. – № 6. – P. 831-838.

238. Trachootham, D. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? / D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2009. – Vol. 8. – № 7. – P. 579-591.

239. Sharifi, N. Commentary: Antioxidants for Cancer: New Tricks for an Old Dog? / N. Sharifi // *The Oncologist*. – 2009. – Vol. 14. – № 3. – P. 213-215.

240. Cao, D. Amplification loop cascade for increasing caspase activity induced by docetaxel / D. Cao, B. Qiao, Z. Ge, Y. Yuan // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2005. – Vol. 96. – № 4. – P. 810-820.

241. Marullo, R. Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions / R. Marullo, E. Werner, N. Degtyareva, B. Moore, G. Altavilla, S. S. Ramalingam, P. W. Doetsch // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. 1-15.

242. Vaneev, A. N. In Vitro and In Vivo Electrochemical Measurement of Reactive Oxygen Species After Treatment with Anticancer Drugs / A. N. Vaneev, P. V. Gorelkin, A. S. Garanina, H. V. Lopatukhina, S. S. Vodopyanov, A. V. Alova, O. O. Ryabaya, R. A. Akasov, Y. Zhang, P. Novak, S. V. Salikhov, M. A. Abakumov, Y.

Takahashi, C. R. W. Edwards, N. L. Klyachko, A. G. Majouga, Y. E. Korchev, A. S. Erofeev // *Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 92. – № 12. – P. 8010-8014.

243. Abdel-Mohsen, M. A. Oncostatic treatment effect of triple negative breast cancer cell line with copper (I)-nicotinate complex / M. A. Abdel-Mohsen, E. A. Toson, M. A. Helal // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2019. – Vol. 120. – № 3. – P. 4278-4290.

244. Chen, W. Disulfiram Copper Nanoparticles Prepared with a Stabilized Metal Ion Ligand Complex Method for Treating Drug-Resistant Prostate Cancers / W. Chen, W. Yang, P. Chen, Y. Huang, F. Li // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2018. – Vol. 10. – № 48. – P. 41118-41128.

245. Krasnovskaya, O. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents / O. Krasnovskaya, A. Naumov, D. Guk, P. Gorelkin, A. Erofeev, E. Beloglazkina, A. Majouga // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 11. – P. 3965.

246. Trachootham, D. Redox Regulation of Cell Survival / D. Trachootham, W. Lu, M. A. Ogasawara, N. R.-D. Valle, P. Huang // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2008. – Vol. 10. – № 8. – P. 1343-1374.

247. Krasnovskaya, O. O. Novel Copper-Containing Cytotoxic Agents Based on 2-Thioxoimidazolones / O. O. Krasnovskaya, D. A. Guk, A. E. Naumov, V. N. Nikitina, A. S. Semkina, K. Y. Vlasova, V. Pokrovsky, O. O. Ryabaya, S. S. Karshieva, D. A. Skvortsov, I. V. Zhirkina, R. R. Shafikov, P. V. Gorelkin, A. N. Vaneev, A. S. Erofeev, D. M. Mazur, V. A. Tafeenko, V. I. Pergushov, M. Y. Melnikov [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 63. – № 21. – P. 13031-13063.

248. Yamansarov, E. Yu. Discovery of Bivalent GalNAc-Conjugated Betulin as a Potent ASGPR-Directed Agent against Hepatocellular Carcinoma / E. Yu. Yamansarov, E. V. Lopatukhina, S. A. Evteev, D. A. Skvortsov, A. V. Lopukhov, S. V. Kovalev, A. N. Vaneev, D. O. Shkil', R. A. Akasov, A. N. Lobov, V. A. Naumenko, E. N. Pavlova, O. O. Ryabaya, O. Yu. Burenina, Y. A. Ivanenkov, N. L. Klyachko, A. S. Erofeev, P. V. Gorelkin, E. K. Beloglazkina [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2021. – Vol. 32. – № 4. – P. 763-781.

249. Jiang, H. Electrochemical Monitoring of Paclitaxel-Induced ROS Release from Mitochondria inside Single Cells / H. Jiang, X. W. Zhang, Q. L. Liao, W. T. Wu, Y. L. Liu, W. H. Huang // *Small*. – 2019. – P. 1901787.

250. Machulkin, A. E. Synthesis, Characterization, and Preclinical Evaluation of a Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Monomethyl Auristatin E Conjugate / A. E. Machulkin, A. A. Uspenskaya, N. U. Zyk, E. A. Nimenko, A. P. Ber, S. A. Petrov, V. I. Polshakov, R. R. Shafikov, D. A. Skvortsov, E. A. Plotnikova, A. A. Pankratov, G. B. Smirnova, Y. A. Borisova, V. S. Pokrovsky, V. S. Kolmogorov, A. N. Vaneev, A. D. Khudyakov, O. E. Chepikova, S. Kovalev [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 64. – № 23. – P. 17123-17145.

251. Zhang, X. Nanoelectrochemical analysis inside a single living cell / X. Zhang, A. Hatamie, A. G. Ewing. – Text: electronic // *Current Opinion in Electrochemistry*. – 2020. – Vol. 22. – P. 94-101.

252. Helmlinger, G. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation / G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian, R. K. Jain // *Nature Medicine*. – 1997. – Vol. 3. – № 2. – P. 177-182.

253. Berners-Price, S. J. The Chemistry of Cisplatin in Aqueous Solution / S. J. Berners-Price, T. G. Appleton // *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy* / eds. L. R. Kelland, N. P. Farrell. – Totowa, NJ : Humana Press, 2000. – P. 3-35.

254. Krasnovskaya, O. O. Photoinduced Reduction of Novel Dual-Action Riboplatin Pt(IV) Prodrug / O. O. Krasnovskaya, R. A. Akasov, D. V. Spector, K. G. Pavlov, A. A. Bubley, V. A. Kuzmin, A. A. Kostyukov, E. V. Khaydukov, E. V. Lopatukhina, A. S. Semkina, K. Yu. Vlasova, S. A. Sypalov, A. S. Erofeev, P. V. Gorelkin, A. N. Vaneev, V. N. Nikitina, D. A. Skvortsov, D. A. Ipatova, D. M. Mazur [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2023. – Vol. 15. – № 10. – P. 12882-12894.

255. Grimes, D. R. A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids / D. R. Grimes, C. Kelly, K. Bloch, M. Partridge // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2014. – Vol. 11. – № 92. – P. 20131124.

256. Mukomoto, R. Oxygen consumption rate of tumour spheroids during necrotic-like core formation / R. Mukomoto, Y. Nashimoto, T. Terai, T. Imaizumi, K. Hiramoto, K. Ino, R. Yokokawa, T. Miura, H. Shiku // *The Analyst*. – 2020. – Vol. 145. – № 19. – P. 6342-6348.

257. Mueller-Klieser, W. F. Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids. / W. F. Mueller-Klieser, R. M. Sutherland // *Cancer research*. – 1982. – Vol. 42. – № 1. – P. 237-42.

258. Mueller-Klieser, W. F. Oxygen tensions in multicell spheroids of two cell lines / W. F. Mueller-Klieser, R. M. Sutherland // *British Journal of Cancer*. – 1982. – Vol. 45. – № 2. – P. 256-264.

259. Murphy, K. C. Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids / K. C. Murphy, B. P. Hung, S. Browne-Bourne, D. Zhou, J. Yeung, D. C. Genetos, J. K. Leach // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2017. – Vol. 14. – № 127. – P. 20160851.

260. Jawhari, S. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone ‘ménage-à-trois’ / S. Jawhari, M.-H. Ratinaud, M. Verdier // *Cell Death & Disease*. – 2016. – Vol. 7. – № 10. – P. e2434-e2434.

261. Evans, S. M. Hypoxia Is Important in the Biology and Aggression of Human Glial Brain Tumors / S. M. Evans, K. D. Judy, I. Dunphy, W. T. Jenkins, W.-T. Hwang, P. T. Nelson, R. A. Lustig, K. Jenkins, D. P. Magarelli, S. M. Hahn, R. A. Collins, M. S. Grady, C. J. Koch // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10. – № 24. – P. 8177-8184.