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

На правах рукописи

Ерофеев Александр Сергеевич

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

1.5.2 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

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

Москва, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ 6
ВВЕДЕНИЕ 8
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 21
1.1 Использование нанокапилляров для современных биомедицинских приложений 21
1.2 Определение АФК и АФА (активных форм азота) 34
1.3 Методы количественного определения ионов меди в биологических системах 39
1.4 Применение нано- и микроэлектродов в биологических системах in vivo 55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 73
2.1 Изготовление дисковых углеродных электродов на основе нанокапилляров 73
2.2 Изготовление нанокапиллярного сенсора для детекции медьсодержащих препаратов 77
2.3 Материалы и химические реактивы 78
2.4 Использованное оборудование 79
2.5 Подготовка клеточных культур к эксперименту 80
2.6 Используемые лабораторные животные 82
2.7 Статистический анализ 83
2.8 Вспомогательные методы исследования 83
2.8.1 Анализ MTS 83
2.8.2 Определение АФК с H2DCFDA 83
2.8.3 Определение АФК с использованием CellROX Red 84
2.8.4 Выявление апоптоза/некроза 84
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 85
3.1 Разработка системы для локального исследования биофизических процессов у единичных клеток на основе нанокапиллярных дисковых электродов (математическая оценка возможностей системы) 85
3.2. 3D-pH-картирование с нанометровым пространственным разрешением 94
3.2.1 3D pH картирование поверхности клеток и коррелятивные измерения с топографией клеток с помощью разработанного pH-чувствительного сенсора на основе нанокапилляра 94

3.2.2 Исследования профиля распределения pH внутри опухоли in vivo. Использование pH-чувствительного наносенсора для оценки влияния степени кислотности опухоли на накопление магнитных наночастиц 107

3.3 Локальное определение АФК и молекулярного кислорода на уровне единичных клеток, тканей и животных с помощью нанокапиллярных электрохимических сенсоров на основе платинизированного углерода..... 112

3.3.1 Способ изготовления дисковых углеродных наноэлектродов на основе нанокапилляров с последующей платинизацией. Валидация электродов для измерения АФК на клетках меланомы и меланоцитах..... 112

3.3.2 Углеродные наноэлектроды с повышенной адгезией платины..... 121

3.3.2.1 Способ изготовления и характеризация углеродных наноэлектродов с повышенной адгезией платины 121

3.3.2.2 Сравнительное исследование токсичности магнитных наночастиц на клетках..... 125

3.3.2.3 Исследование генерации АФК под действием коммерческих противоопухолевых препаратов In Vitro и In Vivo..... 133

3.3.2.4 Исследование эффективности новых таргетных препаратов с помощью наноэлектродов с повышенной адгезией платины..... 139

3.3.3 Исследование генерации АФК в режиме реального времени в единичных клетках под действием внешних факторов:..... 146

3.3.3.1 Исследование эффективности образования АФК при ФДТ за счет облучения флавинмононуклеотида в клетках меланомы..... 146

3.3.3.2 Исследования активации генерации АФК нейтрофилами человека при воздействии бактерий 150

3.3.3.3 Изменения уровня АФК/АФА в эндотелиальных клетках при экспериментальной бактеремии 155

3.3.4 Локальное измерение градиентов молекулярного кислорода в биологических системах 158

3.3.4.1 Исследования распределения внеклеточного молекулярного кислорода при механическом стимуле клеточной стенки водоросли Chara corallina 160

3.3.4.3 Исследование распределения молекулярного кислорода внутри тканей и мозга на животных моделях in vivo..... 163

3.4 Исследование распределения платиносодержащих соединений в биосистемах методом электрохимической локальной детекции с помощью платиновых наноэлектродов..... 167

3.4.1 Разработка метода электрохимической локальной детекции комплексов Pt(II) с помощью платиновых наноэлектродов 167

3.4.2 Определение комплексов Pt(II) внутри единичных клеток и сфероидов 172

3.4.3 Детекция Pt(II)-содержащих веществ внутри опухоли мыши in vivo прижизненно 174

3.4.4 Электрохимическое определение нового пролекарства Pt(IV) с аксиальным лигандом метронидазола в условиях гипоксии 175

3.4.5 Пролекарства Pt(IV) с нестероидными противовоспалительными препаратами в аксиальной позиции 179

3.4.6 Комбинированная детекция АФК и цисплатина в результате активации Рибоплатина 184

3.5 Исследование коррелятивной генерации АФК и распределения медьсодержащих соединений внутри единичных клеток и тканей животных с помощью модифицированных золотых наноэлектродов 186

3.5.1 Исследование эффективности генерации АФК в клетках и 3D-сфероидах металлокомплексами меди 187

3.5.2 Исследование распределения медьсодержащих соединений в биологических системах методом локальной электрохимической детекции с использованием модифицированных золотых наноэлектродов 193

3.5.2.1 Разработка модифицированных золотых наноэлектродов для селективной количественной детекции меди 193

3.5.2.2 Аналитические характеристики модифицированных золотых наноэлектродов для селективной количественной детекции меди 197

3.5.2.3 Количественное определение ионов Cu^{2+} внутри единичных опухолевых клеток, 3D-сфероидов и in vivo моделях 199

3.5.2.4 Количественное определение концентрации ионов Cu^{2+} в модели трансгенной мышиной APP/PS1 in vivo с БА 202

3.5.3 Коррелятивные измерения уровня АФК и ионов меди в модельных системах болезни Альцгеймера 203

3.5.3.1 Таргетированные внутриклеточные измерения активных форм кислорода (АФК) в клетках с агрегатами амилоидов Aβ42 204

3.5.3.2 Разработка in vivo скрининговых систем для лечения болезни Альцгеймера. Локальный мониторинг АФК и ионов меди в различных отделах мозга живых мышей под действием препаратов 207

3.5.3.2.1 Электрохимические измерения уровня АФК и содержания меди в различных полушариях мозга мышей 5xFAD 208

3.5.3.2.2 Электрохимические измерения в мозге мышей 5xFAD разного возраста 209

3.5.3.2.3 Влияние клиохинола на содержание меди в мозге мышей 5xFAD 211

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 214
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 217
Приложение А – Акты внедрения и договоры на оказание научно-технических услуг 250

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

EOGO - электрохимически окисленный оксид графена

FIB - фокусированный ионный пучок

FRET - фёрстеровская резонансная передача энергии

GalNAc - галактозамин

GFP - зеленый флуоресцентный белок

GOx - глюкозоксидаза

TARF - тетраацетилрибофлавин

ITO - смешанный оксид индия-олова

IVIS - *in vivo* система визуализации

MMAE - монометилауристатин Е

MFB - медиальный переднемозговой пучок

NAc - область прилежащего ядра

PBS - 0.01 М фосфатный буферный раствор с добавлением 137 мМ NaCl

PEDOT - поли(3,4-этилендиокситиофен)

PLL - поли-L-лизин

pH_i - внутриклеточный pH

RFP - красный флуоресцентный белок

YFP - желтый флуоресцентный белок

АФА - активные формы азота

АФК - активные формы кислорода

БСА - бычий сывороточный альбумин

БСЦВ - циклическая вольтамперометрия с высокой скоростью развертки потенциала

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК - гамма-аминомасляная кислота

ДИВА - дифференциально-импульсная вольтамперометрия

ДМСО - диметилсульфоксид

ДЭС - двойной электрический слой

КР - комбинационное рассеяние

ЛПС - липополисахарид

ЛС - лекарственное средство

МРС - магнитно-резонансная спектрометрия

МРТ - магнитно-резонансная томография

МУВ - микроэлектрод из углеродного волокна

НЧ - наночастицы

НЧС - наночастицы серебра

ОУНТ - одностенные углеродные нанотрубки

ПАН - полианилин

ПЛЛ - полилизин

ПСМА - простат-специфичный мембранный антиген

ПТК-ПА - смесь полианилина и политаниновой кислоты

ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография

РЭМ - растровая электронная микроскопия

СМЖ - спиномозговая жидкость

УНТ - углеродные нанотрубки

ФДТ - фотодинамическая терапия

ХСЭ - хлорсеребрянный электрод

ЦВ - циклическая вольтамперометрия

ЦНС - центральная нервная система

ЭПР - электронный парамагнитный резонанс

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

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

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

Для выживания клетки необходимо поддержание относительно стабильной нейтральной внутриклеточной и внеклеточной среды. Экстраклеточный ацидоз часто возникает при активации анаэробного гликолиза в условиях опухолевого роста и воспаления. Кислая внеклеточная среда может, например, способствовать метастазированию опухолей и регулировать воспалительные реакции [1]. Для опухолевых клеток свойственен повышенный уровень активных форм кислорода (АФК) по сравнению со здоровыми клетками из-за изменения метаболизма и нарушения внутренних регуляций окислительно-восстановительных реакций. В

свою очередь, опухолевым тканям свойственна ярко выраженная область гипоксии [2].

При нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, в отделах мозга наблюдается окислительное повреждение. Клетки мозга могут быть особенно чувствительны к окислительному повреждению при окислительном стрессе из-за очень высокого потребления мозгом кислорода (20% от общего потребления организмом). Помимо окислительного стресса одним из ключевых факторов генезиса болезни Альцгеймера является локальное повышение ионов Zn и Cu [3], что делает их определение важной научно-практической задачей.

Степень разработанности

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

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

все еще сложно разработать легко производимые нанозонды, которые были бы способны определить наличие и измерить активные формы кислорода в клетках или исследовать клеточные микроструктуры, не причиняя особых повреждений или не изменяя клеточную активность вследствие размеров зонда.

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

В работе продемонстрирована возможность использования сенсоров на основе нанокапилляров для определения кинетики формирования внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), градиента кислорода и профиля локальных значений pH, детекция изменений концентрации ионов меди и платины в единичных клетках и тканях. В ходе данной работы был разработан универсальный подход определения биофизических параметров клетки, позволяющий с использованием нанокапиллярных сенсоров проводить дифференцирование клеток и структур в норме и при патологии.

Важно, что стандартизация изменений исследованных биофизических параметров клеток с помощью разработанных новых подходов будет использована для повышения эффективности диагностики и разработки терапевтических и диагностических препаратов при воздействии внутри организма в норме и при патологиии в зависимости от внутренних градиентов гипоксии и окисленных областей тканей.

Цели и задачи работы

Цель данной работы заключается в разработке методов локального исследования биофизических процессов на единичных клетках и биологических моделях *in vivo* с помощью нанокапиллярных сенсоров для выявления физико-

химических параметров, которые можно использовать для объективной диагностики функционального состояния клеток и тканей организма, формирования принципиально новых подходов для определения эффективности инновационных препаратов.

Поставленная цель требует выполнения следующих логически связанных задач:

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

2) Разработка и валидация основанного на нанокапиллярном сенсоре метода для 3D pH-картирования с нанометровым пространственным разрешением для живых *in vitro* и *in vivo* систем.

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

4) Разработка метода количественной локальной электрохимической детекции платиносодержащих противоопухолевых препаратов с помощью дисковых наноэлектродов с пределом обнаружения 1 мкМ. Проведение сравнительного анализ накопления и распределения цисплатина и его современных

аналогов в единичных клетках, 3D-сфероидах и опухолях мыши in vivo прижизненно.

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

Научная новизна

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

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

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

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

Практическая и теоретическая значимость работы

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

1) «Методика картирования поверхности электрохимически активного материала»;

2) «Методика обнаружения биологических аналитов внутри живых организмов».

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

1. «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Договор на НИР №81-23-ЕП/Н-240-2-2023-2026 от «24» августа 2023;

2. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Договор на НИР №1539-223-2023 от «30» октября 2023;

3. ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, Договор на НИР №439/223/439 от «19» сентября 2023.

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

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

Практическую значимость подтверждает акт внедрения и применения компаниями:

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

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

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

для исследования токсичности противогрибковых препаратов представлен в приложении А.

Методология и методы исследования

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

Положения, выносимые на защиту

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

2) Разработан метод для 3D-картирования pH с нанометровым пространственным разрешением для живых *in vitro* и *in vivo* систем на основе нанокапилляра с цвиттер-ионной мембраной, основанный на явлении выпрямления тока. pH-чувствительный сенсор обладает следующими характеристиками: пространственное разрешение не более 50 нм, скорость отклика не более 2 мс, точность измерения не более 0,01 pH. 3D-pH-внеклеточное картирование

меланомы A375M выявило неоднородный pH-градиент по сравнению со здоровыми меланоцитами. Было получен профиль градиента pH внутри опухоли 4T1 мыши *in vivo* прижизненно.

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

4) Разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции платиносодержащих препаратов с помощью дисковых наноэлектродов с пределом обнаружения 1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения цисплатина и его современных аналогов в единичных клетках, 3D-сфероидах и опухолях мыши. На примере 3D-сфероидов (MCF-7) доказана возможность локального определения зон с повышенной и пониженной гипоксией концентрации кислорода. Выявлена прямая корреляция между распределением метронидазол-содержащей производной цисплатина и градиентом области гипоксии 3D-сфероида. Обнаружено одновременное высвобождение цисплатина и генерация АФК за счет фотоактивации пролекарства Pt(IV) (Рибоплатина) внутри опухолевых сфероидов.

5) Разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции медьсодержащих препаратов с помощью золотых модифицированных наноэлектродов с пределом обнаружения 0,1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления, распределения и эффективности генерации АФК инновационных препаратов меди (I, II) в единичных клетках, 3D сфероидах и опухолях мыши. Выявлено распределение АФК и ионов меди в разных отделах и полушариях мозга в нормальном состоянии мыши и при модели БА. На примере

клиохинола продемонстрирована возможность осуществления мониторинга эффективности терапии БА на моделях мышей in vivo прижизненно.

Личный вклад автора

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

Степень достоверности

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

Апробация результатов

Результаты работы были апробированы на международных и всероссийских научных конгрессах, конференциях и открытых школах: The 43th FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018), Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues (Ираклион, Греция, 2018); 1-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2019» (Москва, Россия, 2019); Bio AFM 2019 (Мюнстер, Германия, 2019); ISPM 2019 (Левин-ла-нев, Бельгия, 2019), The 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019); 10th International conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» (Ираклион, Греция, 2019); 12th International Conference «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (Санкт-Петербург, Россия, 2019); Joint 12th EBSA European Biophysics Congress / 10th IUPAP International Conference on Biological Physics (ICBP) (Мадрид, Испания, 2019); 2-я Международная школа-конференция

«Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2020» (Москва, Россия, 2020); XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021» (Москва, Россия, 2021); European Biophysics Conference 2021 (EBSA 2021) (Вена, Австрия, 2021); 3-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2021» (Москва, Россия, 2021); Microscopy and Microanalysis 2021 (онлайн, США, 2021); 4-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2022» (Москва, Россия, 2022), Bio AFM 2022 (Оказаки, Япония, 2022); IEEE 3M-Nano 2024 (Жонгшан, Китай, 2024), MUM OIP Workshop Series 2024 (Куала Лумпур, Малайзия, 2024).

Публикации

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

Структура и объем работы

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

Благодарности

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

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

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

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

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Использование нанокапилляров для современных биомедицинских приложений

Впервые микрокапилляры для исследования функционирования ионных каналов с использованием метода локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп) были использованы группой учёных под руководством Неера и Сакмана в 1970-х годах, за что впоследствии авторы были удостоены Нобелевской премии. Данный метод отличается высокой чувствительностью к ионным токам. Пэтч-кламп стал одним из ключевых инструментов в исследовании мембранных белков и ионных каналов, предоставляя возможность детально изучать их функциональные характеристики и взаимодействия в живых клетках. Метод позволяет ученым исследовать как макроскопические, так и микроскопические электрические свойства клеточной мембраны, что открывает новые перспективы для изучения физиологии клеток и разработки новых терапевтических подходов к лечению заболеваний. Суть классического метода пэтч-кламп представлена в виде схемы на рисунке 1.1.1.

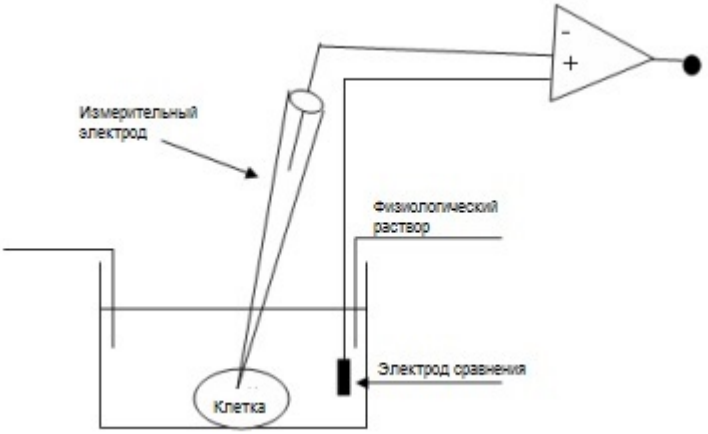


Рисунок 1.1.1 - Классический метод пэтч-кламп в схематическом представлении

Одно из отверстий капилляра имеет значительно большие размеры, что облегчает выполнение различных манипуляций, таких как подключение электродов, введение веществ и установка в держатели для прецизионных манипуляторов. Эта особенность конструкции упрощает считывание сигналов с нанокапилляров без необходимости применения сложных технологий. В то же

время, противоположный конец нанокапилляра значительно меньше, он в 100-1000 раз уступает по размерам клетке, что позволяет ему менее инвазивно проходить через мембрану. Это преимущество используется на протяжении длительного времени для исследования трансмембранного транспорта ионов и измерения мембранного потенциала. Это открывает возможности для глубокого понимания клеточных процессов.

Основываясь на том, что нанокапилляры способны проводить высокоточные измерения ионных токов, Пол Хансма разработал первый в мире сканирующий ионно-проводящий микроскоп (СИПМ) [4]. Хотя изобретение было представлено в 1989 году, его реальное применение стало возможным лишь после адаптации через почти 20 лет группой ученых под руководством Ю.Е. Корчева. Сканирующая ионная проводящая микроскопия является методом сканирующей зондовой микроскопии, который эффективно применяется для исследования живых клеток с нанометровым разрешением. Разрешающая способность методики зависит от внутреннего радиуса капилляра. Перемещение нанокапилляра осуществляется с высокой точностью благодаря пьезоманипуляторам. В качестве зонда используется стеклянный нанокапилляр, который сканирует поверхность образца, а система обратной связи работает по принципу уменьшения ионного тока при приближении нанокапилляра к поверхности. Такой подход минимизирует физический контакт с объектом, например, клеточной мембраной (рисунок 1.1.2).

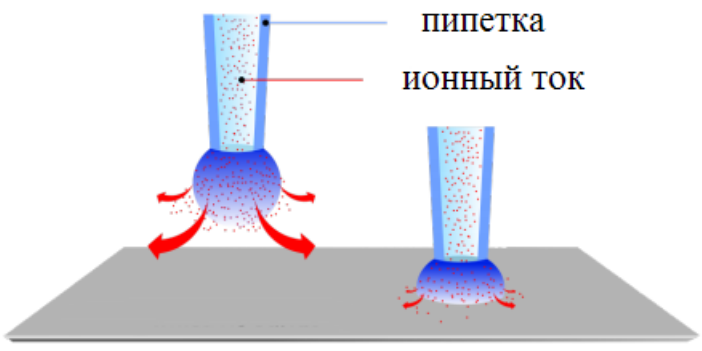


Рисунок 1.1.2 - Снижение ионного тока при приближении нанокапилляра к исследуемой поверхности

На ранних этапах разработки СИПМ работал на основе постоянного тока, схоже с принципами туннельной микроскопии: система обратной связи поддерживала фиксированное расстояние между капилляром и образцом, при этом

нанокапилляр перемещался по поверхности объекта построчно. Главный недостаток данного метода заключался в том, что нанокапилляр мог повреждаться при контакте с неровностями на поверхности, что ограничивало его применение в основном плоскими образцами.

Разработка Павла Новака режима «хоппинг» для сканирующего ионно-проводящего микроскопа значительно расширила возможности этой технологии и сделала её более подходящей для изучения сложных трехмерных структур. Этот метод позволяет избежать повреждения нанокапилляра, обеспечивая стабильное расстояние от поверхности, что особенно важно при работе с образцами с шероховатыми или сложными топологиями. Благодаря этому инновационному подходу, СИПМ может быть использован для детального изучения биологических образцов, таких как нейроны и микровили клеток, что открывает новые горизонты в области нанотехнологий и биомедицинских исследований [5] (рисунок 1.1.3).

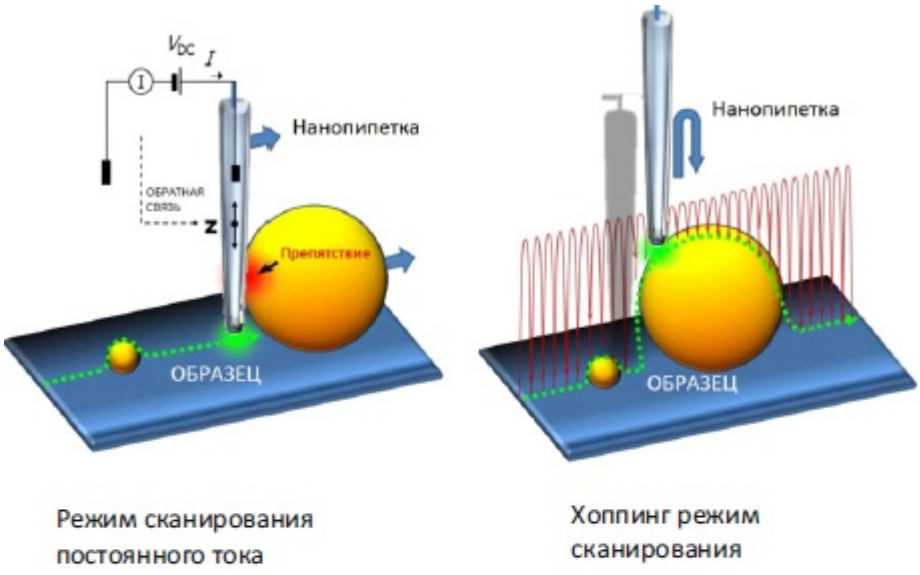


Рисунок 1.1.3 - Принцип функционирования «Хоппинг» режима сканирования

Группа Ушики [6] провела сравнительный анализ двух методов - сканирующей ионно-проводящей микроскопии и атомно-силовой микроскопии – для исследования коллагеновых фибрилл. Результаты показали значительные различия в измерениях высоты и ширины фибрилл между двумя методами, что было связано с особенностями форм-фактора кантилевера в АСМ. Эти исследования продемонстрировали, что СИПМ позволяет более четко

визуализировать форму коллагеновых фибрилл, даже при наличии значительно большего внутреннего радиуса нанокапилляра по сравнению с зондом АСМ.

Система интеграции сканирующего ионно-проводящиего микроскопа с классическими установками пэтч-клампа значительно улучшает как эффективность, так и точность исследований. Павел Новак продемонстрировал использование комбинированной ионно-проводящей и конфокальной микроскопии, что позволило исследовать динамику процессов, таких как клатрин-зависимый эндоцитоз латексных наночастиц, что является важным для понимания механизмов, протекающих в клетках [7] (рисунок 1.1.4). Ранее была продемонстрирована автоматизация метода пэтч-клампа с использованием технологии СИПМ [8] (рисунок 1.1.5). Такой подход также открывает новые горизонты в изучении молекулярных взаимодействий в клеточных системах.

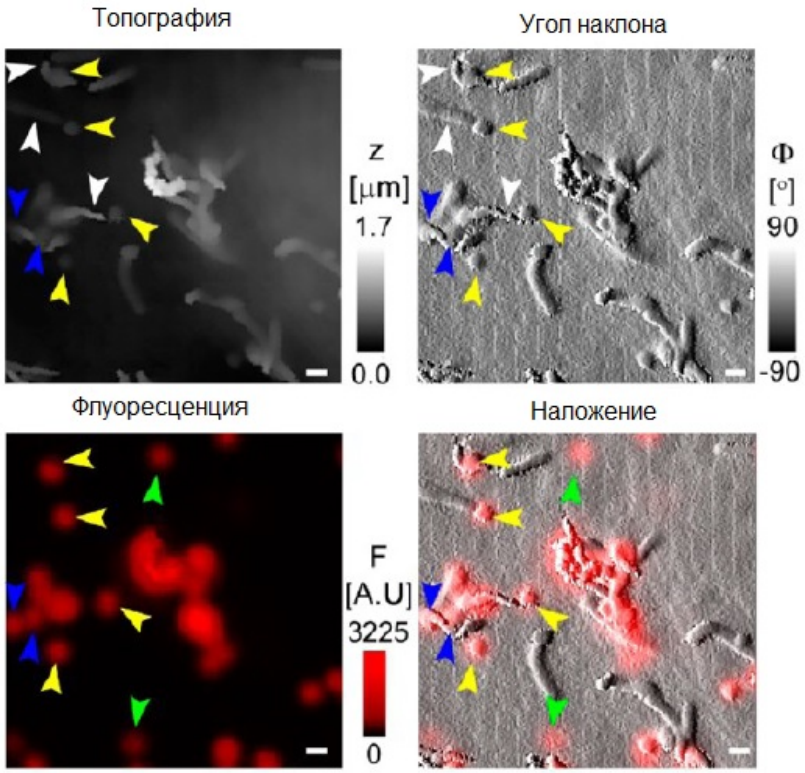


Рисунок 1.1.4 - Визуализация процессов, связанных с проникновением наночастиц через клеточную мембрану, с использованием методов комбинированной ионно-проводящей и конфокальной микроскопии (оригинальные изображения предоставлены с разрешения авторов)

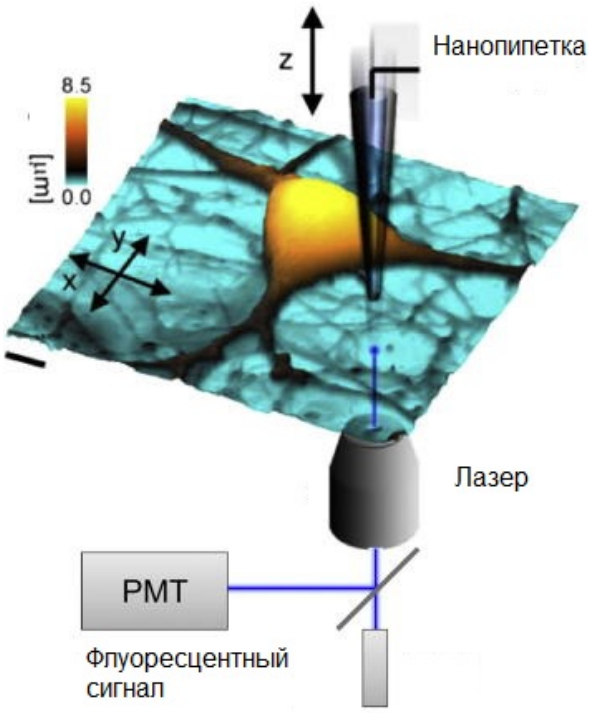


Рисунок 1.1.5 - Схема выполнения автоматизированного пэтч-клампа с использованием технологии СИПМ

В 2016 году доктор Андрей Шевчук разработал усовершенствованный метод ионно-проводящей микроскопии, который позволяет сканировать образец под углом от 0° до 90° [9]. У этой технологии есть ряд преимуществ. Во-первых, она делает возможным выращивать клетки на непрозрачных подложках. Во-вторых, позволяет визуализировать клетки с подробными изображениями малых органелл и тканей при совмещении с дифференциальной интерференционно-контрастной и фазово-контрастной микроскопией. В-третьих, делает возможным сканирование ранее недоступных для зонда участков клеток. В-четвертых, дает возможность измерения угла контакта между клеткой и подложкой.

С использованием углового сканирования стало возможным визуализировать топографию боковых участков ранее недоступных на краю сомы живого первичного гиппокампального нейрона. Кларк с коллегами показал, что смешанная ионно-проводящая микроскопия может быть использована для определения локальной жёсткости субклеточных структур [10]. В их исследовании проводилось картирование механических свойств нейрональных клеток и фибробластов с пространственным разрешением 100 нм. Результаты свидетельствуют, что

деформация приповерхностных 0,66-0,09 мкм стенок нейронов выявила значительно более мягкие слои, чем это демонстрировали предыдущие методы.

Современные методы СИПМ, наряду с их интеграцией с флуоресцентной микроскопией и пэтч-клампом, представляют собой одни из наиболее многообещающих подходов для изучения живых клеток. Эти технологии обеспечивают возможность детально определить топографию клеток в физиологически сходных условиях и исследовать реакцию клеток на внешние воздействия с высоким пространственным разрешением.

Другим методом зондовой микроскопии, использующим нанокапилляры, является сканирующая электрохимическая микроскопия (СЭХМ), которая позволяет исследовать электрохимическую активность поверхности материалов на микроскопическом уровне. Множество химических реакций происходит на границе раздела фаз, таких как коррозия (металл/воздух или металл/жидкость), окислительно-восстановительные процессы в электохимических элементах батарей, фотосинтез в клеточной мембране, растворение веществ и прочее. СЭХМ предоставляет возможность детально изучать траектории и скорость этих реакций с высоким пространственным разрешением.

Система обратной связи сканирующего электрохимического микроскопа представляет собой сложный механизм, позволяющий контролировать измерения и улучшать качество получаемых данных. В этой системе используются электроды и редокс-активные частицы для взаимодействия с образцом, что дает возможность добиться высокой точности в спектроскопических и топографических анализах. При приближении зонда, в качестве которого используется электрод, расположенный внутри микро- или нанокапилляра, к образцу происходит изменение величины тока, что свидетельствует о взаимодействии между зондом и редокс-активными частицами в растворе. Это взаимодействие предоставляет информацию о химическом составе и локальных электрохимических свойствах поверхности образца. Таким образом, СЭХМ является мощным инструментом для изучения электрохимических процессов на уровне отдельных молекул и изучает свойства материалов с высоким пространственным разрешением.

На рисунке 1.1.6 изображена система, в которой исследуемый образец помещен в раствор, содержащий редокс-активные частицы в форме «R». В раствор погружается зонд, на него подается напряжение, которое вызывает окисление частиц «R» до «O» на острие зонда. В случае, когда зонд находится на значительном расстоянии от образца, ток определяется лишь диффузией частиц «R» (рисунок 1.1.6 A). Когда зонд приближается к образцу (рисунок 1.1.6 B), система активирует процессы окислительно-восстановительных реакций, что приводит к значительному изменению тока и генерирует положительную обратную связь. В случае использования диэлектрических образцов система может реагировать иначе, демонстрируя отрицательную обратную связь (рисунок 1.1.6 C), что также важно учитывать при исследовании свойств различных покрытий и материалов.

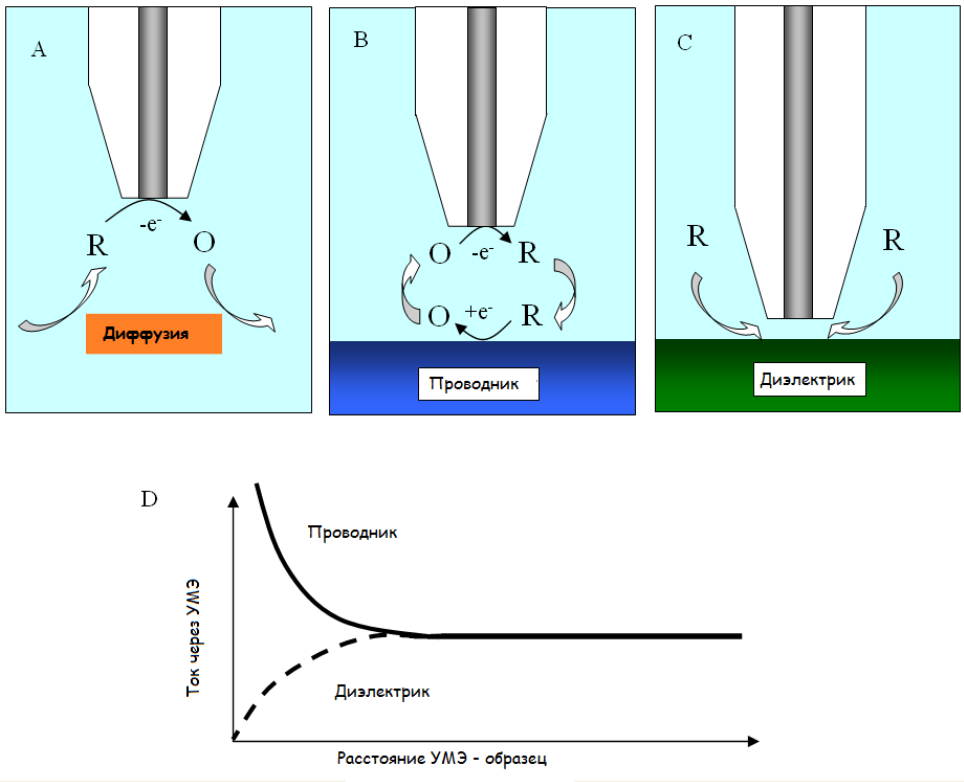


Рисунок 1.1.6 – Визуализация системы обратной связи СЭХМ

Группа учёных под руководством Комстока [11] разработала интегрированный зонд, который представляет собой значительный шаг вперед в области микроскопии, комбинируя возможности сканирующей электронной микроскопии (СЭХМ) и сканирующей ионной микроскопии (СИПМ). Это позволяет получать более детальные и полезные данные о материалах и

биологических образцах, что может привести к важным открытиям в исследованиях в области биологии и электрохимии. Данная система продемонстрировала возможность сканирования с пространственным разрешением до 100 нм. Это интеграционное решение позволяет одновременно изучать как топографические, так и электрохимические характеристики, что открывает новые перспективы для использования СИПМ в биологии и электрохимии.

Группа учёных под руководством Бейкера [12] провела исследования вольт-амперных характеристик модифицированных имидазолином нанокапилляров, а также показала, что можно определять последовательности нуклеотидов ДНК, анализируя изменения уровня выпрямления тока в нанокапиллярах, которые были модифицированы полиамидоаминовыми дендримерами и одноцепочечными последовательностями ДНК. Эти исследования открывают новые перспективы в области сенсорных технологий и молекулярной биологии. Методология, основанная на измерении вольт-амперных характеристик и степени выпрямления тока, может быть использована для разработки более чувствительных и специфичных детекторов, что может оказать влияние на диагностику и лечение заболеваний.

Группа учёных под руководством Умехары [13] показала, что электростатические взаимодействия полимеров с капиллярными поверхностями, а также биотин-стрептавидиновые и антиген-антительный взаимодействия на конце нанокапилляра оказывают влияние на ионный ток, проходящий через капилляр. Для разработки бесконтактного сенсора на основе нанокапилляра использовалась двухступенчатая модификация. Вначале на поверхность капилляра адсорбировался положительно заряженный поли-L-лизин через электростатические взаимодействия, затем антитела ковалентно связывались с полимером через аминогруппы поли-L-лизина с применением карбодиимидов. Связывание белка IL-10 оказывало влияние на ионный ток благодаря уменьшению эффективного диаметра нанокапилляра. Но в отличие от сильно заряженных полиэлектролитов, связывание белков почти не сказывалось на степени выпрямления тока.

Метод, разработанный группой ученых под руоводством Витола [14], представляет собой инновационный подход к изучению внутриклеточных процессов, позволяющий получать Раман-спектры, которые отражают химический состав органелл в живых клетках в режиме реального времени. Использование золотых наночастиц для усиления сигнала и нанокапилляров для целенаправленного анализа позволяет достигать высокой пространственной разрешающей способности.

Разработка группой ученых под руководством Вилозни [15] сенсора для ионов кальция, основанного на модификации внутренней поверхности нанокапилляра кальций-связывающим белком кальмодулином, представляет собой важный шаг в области сенсорной технологии. Ступенчатое изменение ионного тока, наблюдаемое при связывании кальция, свидетельствует о высокой чувствительности данного сенсора. Стабильность и обратимость связывания в нейтральном буфере дополняют его преимущества, а определенная константа связывания (6,3 ± 0,8 × 10–5 М) подтверждает согласованность с известными данными о кальмодулине (рисунок 1.1.7).

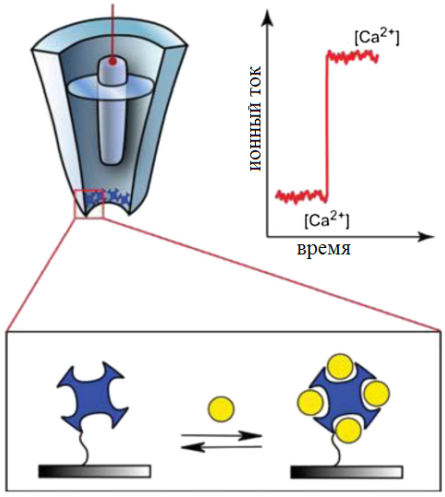


Рисунок 1.1.7 – Схема обратимого связывания ионов кальция (жёлтые сферы) к белку кальмодулину (синяя фигура), взаимодействие которых приводит к изменению поверхностного заряда на кончике нанокапилляра, которое вызывает изменение ионного тока

Принципы изменения ионного тока в нанопорах, таких как нанокапилляры, действительно открывают новые возможности для электрохимического мониторинга различных процессов, включая осаждение солей. Когда происходит

осаждение, как в случае фосфата цинка, это приводит к изменению проводимости нанокапилляра, что можно использовать для детекции критических изменений концентрации солей или других ионов в растворе (рисунок 1.1.8) [16]. Эти изменения ионного тока являются индикатором протекающего химического процесса, что позволяет проводить анализ в реальном времени.

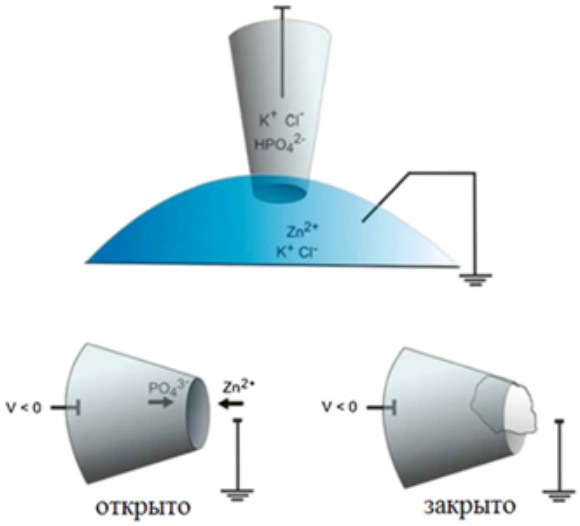


Рисунок 1.1.8 - Измерение ионного тока через кварцевый нанокапилляр

Принцип снижения ионного тока в нанокапиллярах может быть использован для разработки сенсорных устройств, которые обеспечивают постоянный мониторинг веществ в водной среде. Такие устройства могут существенно повысить эффективность экологического контроля и гарантировать безопасность водных ресурсов. Кроме того, они способны быстро реагировать на изменения концентрации различных ионов, что делает их весьма полезными в разных сферах, включая экологию и здравоохранение.

Группа профессора Корчева разработала новый тип сенсора, использующего двухканальный нанокапилляр с полевым транзистором на его конце (рисунок 1.1.9). Углеродные каналы нанокапилляра позволяют осуществить электрохимическое осаждение проводящего полимера – полипиррола, чья проводимость изменяется в зависимости от уровня pH. Этот полимер можно модифицировать селективными веществами, такими как гексокиназа, превращая электрод на основе двухканального капилляра в сенсор, чувствительный к молекулам АТФ, который функционирует по принципу полевого транзистора [17].

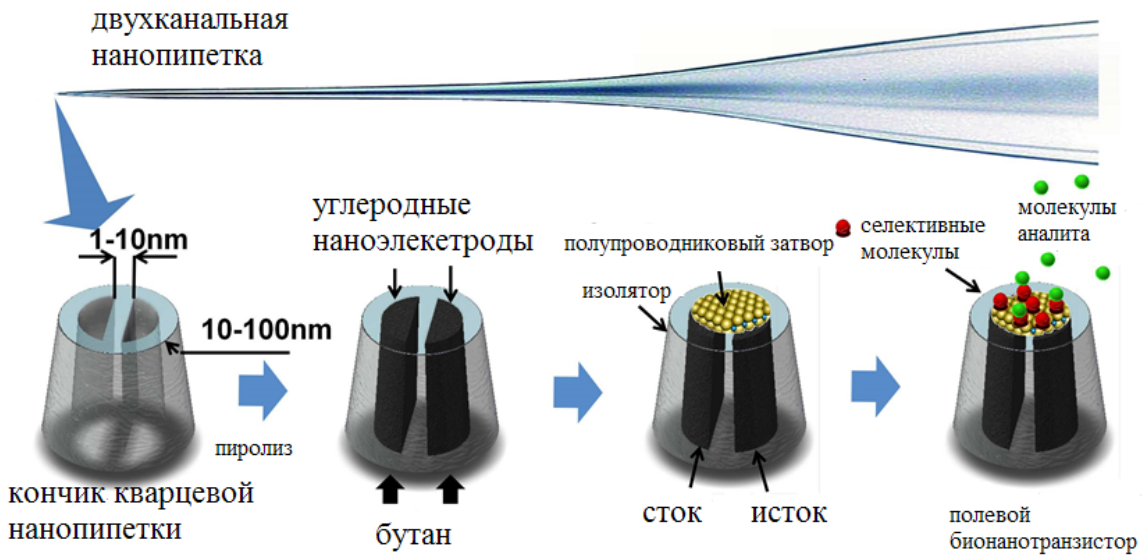


Рисунок 1.1.9 – Схематическое изображение полевого нанотранзистора на основе Ѳ-образного нанокапилляра, где два изолированных углеродных электрода выполняют функции стока и истока

Группа ученых под руководством Такахаши [18] применила двухканальные нанокапилляры, заполненные углеродом, в электрохимическом сканировании, что открыло новые горизонты для изучения нейротрансмиттеров на клеточном уровне, позволяя получить как картографическую информацию, так и данные о динамике экзоцитоза. Однако использование ион-селективных электродов с полимерными мембранами ограничено из-за их размеров, что делает их менее эффективными для внутриклеточных измерений.

Ранее была показана возможность создания ион-селективной мембраны в нанокапилляре [19]. Этот подход был применен для измерения локальных концентраций ионов в различных типах живых клеток. Так были определены локальные концентрации ионов калия и натрия в клетках HeLa [20], васкулярных миоцитах крысы и нейронах эмбриональных стволовых клеток. Внутри и снаружи единичных живых клеток была обнаружена относительная разница концентраций ионов калия и натрия, составившая около 100 мМ.

Группа ученых под руководством Сингхала [21] разработала многофункциональный «эндоскоп», который представляет собой нанокапилляр с интегрированной нанотрубкой. Этот «эндоскоп» позволяет сканировать внутриклеточное содержимое с разрешением до 100 нм и предоставляет доступ к

органеллам, не повреждая клетки. Исследователи продемонстрировали возможность введения в органеллы аттолитровых объемов жидкости, например, растворы магнитных наночастиц, лекарственных препаратов, флуоресцентных красителей.

С изобретением метода пэтч-клампа микро- и нанокапилляры широко используются для внутриклеточного введения веществ. Нанокапилляры представляют собой многообещающий инструмент для высокоточной доставки веществ в клетку и разработки новейших методов литографии, благодаря чему их применение в научных и промышленных областях продолжает увеличиваться. Этот подход позволяет доставлять молекулы, такие как ДНК, РНК или фармакологические препараты, непосредственно в цитоплазму клеток, что значительно увеличивает эффективность лечения и исследования клеточных механизмов. Применение нанокапилляров не ограничивается только научной сферой; они также находят использование в разработке новых методов диагностики и терапии в медицине, а также в биотехнологии. Так, например, электрофоретический перенос заряженных объектов [22] позволяет управлять подачей веществ с высокой точностью, что открывает новые горизонты для нанообработки и материаловедения. С применением организационных процессов, таких как литография по заданному шаблону или электрохимическое осаждение, можно создавать сложные структуры на наноуровне, что может привести к новым прорывам в технологии и медицине.

Учеными Ю и Сурьяванши разработан метод электрохимического осаждения меди и платины, который позволил создавать медные и платиновые нанопровода с диаметром 150 нм и длиной 30 мкм [23].

Группа ученых под руководством Ласлау [6] обнаружила возможность создания аналогичным способом 2D- и 3D-полимерных нанопроводов. Как было упомянуто ранее, нанокапилляры возможно использовать не только для нанесения металлов, но и для инъекции биомолекул, таких как ДНК и белки.

Как уже упомяналось, нанокапилляры могут использоваться не только для металлосложения, но и для инъекции биомолекул, таких как ДНК и белки. С помощью капилляров возможно вводить очень небольшие объемы веществ - около

одного аттолитра [24], что примерно в 1000 раз меньше, чем предоставляет большинство коммерческих инъекционных систем.

Интеграция нанокапилляров со сканирующей ионной микроскопией, действительно, открывает новые перспективы в изучении молекулярных механизмов и стимуляции клеточных процессов [25] [26]. Использование различных методов подачи реагентов, таких как электрофорез и электроосмос, позволяет контролировать поток и, соответственно, концентрацию молекул, что особенно важно для точной манипуляции в системах, состоящих из живых клеток. Влияние расстояния между кончиком капилляра и образцом на распределение молекул также подчеркивает необходимость тщательной настройки экспериментов для достижения желаемых результатов.

Группа ученых под руководством Брукбауэра [27] продемонстрировала инновационные методы локальной доставки молекул с использованием нанокапилляров, что открывает новые возможности для исследования клеточных функций и разработки терапевтических подходов [28]. Использование контроля потенциала для доставки флуоресцентных молекул к плазматической мембране позволяет контролировать доставку отдельных молекул к поверхности клеток, а метод быстрой и количественной доставки через нанокапилляры расширяет наши возможности в области нейробиологии и фармакологии. Это способствует более глубокому пониманию механизмов работы ионных каналов и рецепторов, что крайне важно для разработки новых лекарств и методов лечения.

Разработка устройства, сочетающего принципы сканирующей ионной микроскопии и доставку веществ с помощью двухканального нанокапилляра, группой ученых под руководством Сегера является значительным шагом вперед в области клеточной инъекции, снижая уровень инвазивности и улучшая точность доставки веществ [29]. Использование принципов СИПМ для обнаружения клеточных поверхностей в сочетании с двухканальными нанокапиллярами позволяет минимизировать повреждения клеток, что открывает новые возможности для исследования клеточных процессов и разработки терапий. Контроль за процессом инъекции через изменения флуоресценции добавляет дополнительный уровень качества и безопасности процедуры.

Таблица 1.1.1 представляет сводные данные о применении нанокапилляров для локальной подачи металлов и биологических объектов.

Таблица 1.1.1 - Контролируемое потенциалом нанесение/доставка объектов с использованием нанокапилляров

Применение	Доставка материала	Размер или количество доставляемого материала
Нанесение металла	Au	212 нм ширина, 30 нм высота
	Pt	150 нм диаметр
	Cu	200 нм диаметр
	Ag	Линия шириной 80 нм
Клеточная инъекция	ДНК/белок	<100 фемтол
Инъекции в эмбриональную клетку	Олигонуклеотид	30 фемтол
Структурирование поверхности	Антитело/антиген	300 нм
	ДНК	830 нм
Доставка	ДНК	150 молекул
Биохимическая активация	Na+/OH-	1-30 мкл

Мультикомпонентная инъекционная система на основе нанокапилляров, совмещённая с СИПМ, представляет собой перспективную технологию для введения различных молекул в отдельные клетки. Единственным ограничением является количество каналов, доступных в капилляре.

Нанокапилляры действительно представляют собой многообещающий инструмент для детального изучения клеток и тканей, обеспечивая высокую разрешающую способность и множество функциональных приложений [30][31]. Их использование в сочетании с технологией СИМП открывает новые горизонты в микроскопии и молекулярной биологии, позволяя исследователям точно изучать не только поверхность клеток, но и их внутренние структуры на наноуровне. Такие возможности могут значительно продвинуть науку, например, в области диагностики заболеваний или разработки новых терапий.

1.2 Определение АФК и АФА (активных форм азота)

АФК являются важными продуктами клеточного метаболизма [32,33]. Они участвуют в физиологических клеточных процессах при низких и умеренных концентрациях, но при повышенных концентрациях могут вызывать

окислительное повреждение белков и ДНК, перекисное окисление липидов. Увеличение концентрации АФК и сопутствующий дисбаланс между АФК и антиоксидантами определяется как окислительный стресс. Длительное воздействие окислительного стресса может приводить к различным патологиям, включая неврологические расстройства и нейродегенеративные заболевания.

Большинство активных форм кислорода внутри клетки образуется в митохондриальной цепи переноса электронов. Они возникают из молекулярного кислорода в процессе нормального метаболизма клеток. К главным АФК, имеющим физиологическое значение, относятся супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (•OH) и перекись водорода (H_2O_2) [34].

Кроме того, пероксид водорода продуцируется ксантиноксидазой и НАДФН-оксидазой. В реакциях, известных как реакции Хабера – Вейсса и Фентона, H_2O_2 может расщепляться до •OH и OH^- при наличии металлов, таких как Fe^{2+} или Cu^{2+}.

Определение и количественное измерение активных форм кислорода (АФК) является сложной задачей, что обусловлено рядом характеристик этих молекул: короткое время жизни, низкая физиологическая концентрация и высокая реакционная способность [35].

Супероксидный анион-радикал (O2•−) может измеряться через реакцию ингибирования супероксиддисмутазой (СОД) восстановления цитохрома С [36]. Также образование O2•− можно оценить методом спинового захвата с использованием электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), который обладает преимуществом прямого обнаружения аналита [37]. Однако метод ЭПР известен своей дороговизной и не подходит для повседневного анализа. Хемилюминесцентные зонды на основе люминола и люцигенина широко применяются для обнаружения O2•−, но интерпретация таких данных затруднительна, так как эти зонды сами генерируют радикалы, продуцирующие [38].

Измерение концентрации H_2O_2 является важным этапом в многочисленных биохимических исследованиях. Один из используемых методов основан на субстратах, которые могут окисляться пероксидазой хрена в присутствии пероксида водорода, особое внимание уделяется Amplex Red (рисунок 1.2.3) [39].

В результате образуется резоруфин, который можно определить с помощью спектрофотометрии. Однако на сигнал могут влиять такие вещества, как аскорбат натрия, N-ацетилцистеин и $O_2^{\bullet-}$.

Флуоресцентные зонды на основе фенилбороната часто применяются для обнаружения H_2O_2 внутри клеток, благодаря их высокой селективности [40]. Однако их чувствительность может быть недостаточной для выявления малых или локализованных изменений уровня H_2O_2. Поскольку H_2O_2 обычно присутствует в более высоких концентрациях по сравнению с другими активными формами кислорода, такие зонды могут быть эффективны, если соблюдать правильные условия [41,42]. В здоровых клетках концентрация H_2O_2 варьируется в диапазоне от 1 до 100 нМ в физиологических условиях и может достигать 100 мкМ при окислительном стрессе [43].

Чтобы оценить общее содержание активных форм кислорода (АФК) в клетках, часто применяют низкомолекулярные флуоресцентные зонды на основе 2,7'-дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH), которые обычно вводятся в форму диацетата и легко проникают в клетки. DCFH окисляется до флуоресцентного вещества, известного как 2,7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) [44]. Окисление DCFH и флуоресценция DCF зависят от локального уровня O_2 и pH, а интенсивность флуоресценции может не быть линейной при увеличении содержания АФК [45–47].

Одним из перспективных направлений в разработке флуоресцентных зондов являются генетически кодируемые флуоресцентные белки-сенсоры. Они оснащены дитиольным переключателем, который изменяет уровень флуоресценции в зависимости от изоформ [48–51]. Мутант зеленого флуоресцентного белка (GFP), чувствительного к окислению, известный как HyPer7, демонстрирует высокую специфичность и чувствительность к H_2O_2 [52]. Такие зонды могут использоваться для измерений внутри живых клеток в режиме реального времени. В большинстве исследований зонды H_2O_2 экспрессируются в виде свободных белков, распределяющихся по клетке. Однако данный тип сенсоров неприменим для генетически немодифицированных клеток.

В результате взаимодействия пероксида водорода с нитрит-ионом образуется пероксинитрит ($ONOO^-$), способный окислять ДНК и белки. Кроме того, при окислении пероксинитрита могут образовываться такие активные формы как, карбонатный радикал-анион ($CO_3^{\bullet-}$) и диоксид азота ($NO_2^{\bullet}$). Пероксинитрит окисляет флуоресцентные красители на основе бора почти в миллион раз быстрее, чем H_2O_2, а также при определенных условиях данные красители могут использоваться для оценки продукции $ONOO^-$/ONOOH [53] .

В последние годы электрохимические методы для определения АФК получили значительное внимание благодаря своим преимуществам, таким как относительная простота измерений, возможность обнаружения в сложных системах в реальном времени, высокая чувствительность и селективность, быстрый отклик [54], минимальный размер [55], и возможность использования *in vivo*.

Несмотря на значительные достижения в разработке чувствительных сенсоров для определения активных форм кислорода (АФК) и реактивных форм азота (АФА), остаются нерешенные проблемы. Проблемы с чувствительностью представляют собой значительное препятствие, которое необходимо преодолеть, прежде чем эти электрохимические технологии смогут выйти на коммерческий рынок и применяться в клинической практике. Для их широкого практического использования критически важны такие аспекты, как безопасность, доступность, высокая эффективность, скорость анализа и воспроизводимость. Производственные процессы должны быть оптимизированы для обеспечения безопасного и контролируемого промышленного производства, которое гарантирует постоянство результатов между сенсорами. Кроме того, усовершенствование сесоров позволит улучшить скорость и воспроизводимость обнаружения аналитов, а также будет способствовать продлению их срока службы.

Кислород играет ключевую роль в регулировании синтеза АТФ и энергетических процессов в клетках мозга. При избыточном количестве кислорода происходит перекисное окисление липидов, что нарушает межклеточные взаимодействия нейронов и функцию мозга. Этот процесс особенно значим в

миелине, поскольку такие нарушения могут привести к дезорганизации нейрональных сетей.

Традиционные методы количественного определения концентрации кислорода базируются на отборе проб и их анализе с помощью химических (йодометрическое титрование), физических (манометрический) или инструментальных методов (газовая хроматография). Однако в настоящее время значительно возрастает важность таких направлений, как непрерывный мониторинг водных ресурсов, малоинвазивные и *in vivo* измерения, что ведет к разработке новых платформ и методов обнаружения.

Электрохимические сенсоры, биосенсоры, оптоволоконные датчики стали важными инструментами в лабораторных и промышленных приложениях. Более сложные методы, такие как ЭПР, функциональная МРТ, ПЭТ и пульсоксиметрия, также находят широкое применение для измерения уровня кислорода в биологических экспериментах.

Электрохимические методы являются крайне эффективным инструментом для определения концентрации кислорода. Первое устройство такого рода, чувствительное к кислороду, было представлено в виде электрода Кларка. Этот электрод состоит из платинового электрода, покрытого полупроницаемой мембраной, которая предотвращает контакт с мешающими аналитами и водой, обеспечивая при этом диффузию кислорода к рабочей части электрода. Анодным элементом здесь служит хлорсеребряный электрод (ХСЭ). При использовании KCl в качестве электролита протекают следующие реакции:

$$Pt - \text{катод: } O_2 + 4H^+ + 4e = H_2O$$

$$Ag - \text{анод: } 4Ag + 4Cl^- = 4AgCl + 4e$$

Для получения линейного отклика электрода на концентрацию O_2, система функционирует в режиме диффузионно-ограниченного электрического тока. Измерения обычно осуществляются при потенциалах около -0,7 В.

Углеродные пастовые электроды функционируют схожим образом, но в них отсутствует внешняя мембрана, которая ограничивает диффузию кислорода. На поверхности угольной пасты происходит двухстадийное восстановление кислорода: сначала до пероксида водорода, а затем до воды.

Как и электроды типа Кларка, углеродные пастовые электроды потребляют кислород в процессе восстановления на месте измерения, но они менее восприимчивы к температурным изменениям в этой области.

1.3 Методы количественного определения ионов меди в биологических системах

Медь является одним из ключевых микроэлементов в организме человека. После железа и цинка, она занимает третье место по распространенности [56]. В организме взрослого человека из всего содержания меди (что составляет от 75 до 100 мг [57]) на скелет и костный мозг приходится около 46 мг, на скелетные мышцы - около 26 мг, на печень – 10 мг, на мозг – 8,8 мг, а на кровь – 6 мг. [58][59][60]. Ионы меди играют важную роль в функционировании множества ферментов, таких как: лизилоксидаза, церулоплазмин, супероксиддисмутаза и цитохром с-оксидаз и других, принимают участие в синтезе меланина, миелина, тироксина и гемоглобина[61][62][63]. В биологических системах ионы меди могут выполнять как антиоксидантные, так и прооксидантные функции, в зависимости от их окислительного состояния [64][65].

В организме человека медь может находиться в двух формах - Cu^{+} (восстановленная форма) и Cu^{2+} (окисленная форма), образуя различные комплексы с органическими и неорганическими лигандами [66][67].

При нарушении регуляции меди, ионы меди могут взаимодействовать с АФК, включая пероксид водорода (H_2O_2) и супероксидный радикал (O_2•-), что приводит к нежелательным окислительно-восстановительным процессам в организме. Впервые эти процессы описали Габер и Вейсс [68], показав, что ионы переходных металлов, в том числе ионы меди, могут катализировать превращение перекиси водорода и супероксид-анионов (формула 1).

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{3+} / Fe^{2+} \text{или } Cu^{+}} O_2 + OH^{*} + OH^{-} \qquad (1)$$

В ходе такой реакции образуются высокореактивные гидроксильные радикалы, котрые могут переходить в другие виды АФК [76][77]. Уравнение Габера-Вейсса демонстрирует зависимость между метаболизмом АФК и металлов, включая медь, которая может существовать в различных степенях окисления.

АФК, во всех биологических системах, нейтрализуются антиоксидантными системами, но при нарушении этого баланса, увеличивается скорость образования АФК и снижается эффективность антиоксидантных механизмов, что приводит к развитию окислительного стресса [71]. Увеличение концентрации меди и окислительный стресс являются характерными признаками ряда злокачественных новообразований. Доказано, что медь участвует в процессах канцерогенеза. Она активирует различные ангиогенные факторы, такие как эндотелиальный фактор роста и фактор некроза опухоли, тем самым стимулируя пролиферацию и миграцию клеток эндотелия, приводя к образованию новых кровеносных сосудов и росту опухоли [67]. Более того, было доказано, что высокий уровень меди напрямую связан с прогрессированием рака [72].

Окислительный стресс, вызванный избыточным образованием АФК, в свою очередь, может способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний. Например, при болезни Альцгеймера медь накапливается в амилоидных бляшках. Это приводит к снижению активности цитохром с-оксидазы и супероксиддисмутазы, и, как следствие, повреждению нейронов и ослаблению метаболических и защитных процессов [73].

Помимо этого, к причинам нарушения функционирования некоторых ферментов относится нарушение регуляции меди, поскольку она является кофактором для ряда ферментов. Примером такого заболевания является болезнь Вильсона, при которой мутации в гене ATP7B нарушают работу Вильсон-АТФазы, что нарушает выведение меди с желчью и приводит к ее накоплению в печени. Избыток меди накапливается в мозге, почках и других органах, вызывая серьезные нарушения, такие как печеночная недостаточность, гемолиз и почечная дисфункция [74][75][83][3][77][78][79][80]. Другим примером является болезнь Менкеса, связанная с мутацией гена ATP7A, которая нарушает транспорт ионов меди [81][82].

Для понимания механизмов возникновения заболеваний, таких как болезни Вильсона и Менкеса, а также для контроля уровня меди в биологических системах необходимо создавать чувствительные и избирательные методы обнаружения ионов меди.

В настоящее время, противоопухолевые препараты на основе меди показали свою перспективность в терапии онкологических заболеваний [83][84][85]. Эффективными подходами являются фототермическая индукция апоптоза опухолевых клеток через повышенное образование АФК, которая вызывает разрушение ДНК и белков в опухолевых клетках [86], а также иммунотерапия с применением соединений меди [87][88][89].

Кроме противоопухолевых препаратов, на основе наночастиц меди, были разработаны противомикробные средства [90][91], которые уже доказали свою эффективность [92], хотя исследования в этой области еще продолжаются [93][94]. Одним из основных этапов разработки таких противомикробных препаратов является изучение распределения меди в клетках и тканях, поэтому способы быстрого и селективного определения ионов меди в биологических системах, могут ускорить проведение доклинических испытаний лекарственных средств на основе меди. Все это открывает перспективы для более глубокого изучения фармакокинетики новых лекарственных препаратов, механизмов их действия и оценки их эффективности.

Координационные соединения, содержащие медь, привлекают значительное внимание благодаря окислительно-восстановительным свойствам и биологической роли ионов меди, которые обеспечивают разнообразные пути биологической активности [95][96]. Фармакологические характеристики этих металлокомплексов могут быть изменены путем модификации лигандов и донорных атомов. Медные координационные соединения демонстрируют высокую эффективность как противоопухолевые агенты, представляя собой более доступную и безопасную альтернативу традиционной химиотерапии на основе платины. Помимо этого, они проявляют антимикробную, противотуберкулезную, противомалярийную, противогрибковую и противовоспалительную активность. Меченные 64Cu координационные комплексы рассматриваются как перспективные инструменты для ПЭТ-визуализации, используемой в диагностике различных злокачественных новообразований, включая рак головы и шеи, а также для визуализации β-амилоида (Aβ), маркера болезни Альцгеймера.

Для определения ионов металлов существует большое количество различных методов: атомно-абсорбционная спектроскопия (AAS), атомно-абсорбционная спектрометрия с пламенной ионизацией (FAAS) [97][98][99], атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией в графитовой печи (GF-AAS) [100][101], масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) [102][103][104], атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES) [105], рентгеновский флуоресцентный анализ, основанный на возбуждении протонами (PIXE) [106]. Хотя некоторые из вышеперечиленных методов позволяют определить ионы меди в отдельных клетках с очень низкими пределами обнаружения (до 0,20–0,40 фемтограмм) [107], они имеют недостатки: невозможность проведения измерений в живых системах, сложность пробоподготовки, отсутствие данных в реальном времени, высокая стоимость и сложность использования приборов.

Альтернативой для FAAS и ICP-MS является рентгеновская флуоресценция с полным отражением (TXRF) [108][109] и рентгеновская флуоресцентная микроскопия (XFM) с использованием синхротронного источника (Advanced Photon Source, Аргоннская национальная лаборатория, США) [110]. Используя эти методы, измеряли распределение меди в ооците без изменения его морфологии, с минимальной пробоподготовкой, так как ооциты иммобилизировали на подложке из нитрида кремния, нагретой до 37°C, с минимальным количеством питательной среды.

Еще одним методом для изучения живых клеток [111], детекции патогенов [112] и биомолекул [113] стала спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (SERS). Она основана на изменении спектра комбинационного рассеяния при взаимодействии органических лигандов, иммобилизированных на поверхности золотых наночастиц, с ионами меди [114][115].

В настоящий момент развиваются возможности для разработки различных сенсоров за счет широкого распространения производства кантилеверов. Вследствие адсорбции молекул аналита на поверхности микрокантилевера, меняется поверхностное натяжение и микрокантилевер изгибается. В измерении этого изгиба лежит в принцип работы кантилеверов [116]. Поскольку сами по себе

такие системы не обладают химической селективностью, для ее достижения используются различные химические или биологические агенты, иммобилизованные на поверхности микрокантилеверов [117][118]. Адаптированные таким образом кантилеверы могут применяться в качестве платформ для сенсоров [119][120][121].

При комбинации измерений изгиба кантилевера с вольтамперометрическими измерениями [122], микрокантилевер действует как рабочий электрод. Когда на его поверхности происходит электрохимическая реакция (восстановление или окисление меди), появляется поверхностное напряжение, что приводит к изгибу кантилевера. Такой подход объединяет высокую чувствительность кантилевера с химической селективностью, обеспечиваемой вольтамперометрией.

Для селективного определения Cu^{2+} в водных растворах был изготовлен модифицированный монослоем L-цистеина микрокантилевер (рисунок 1.3.1) [123].

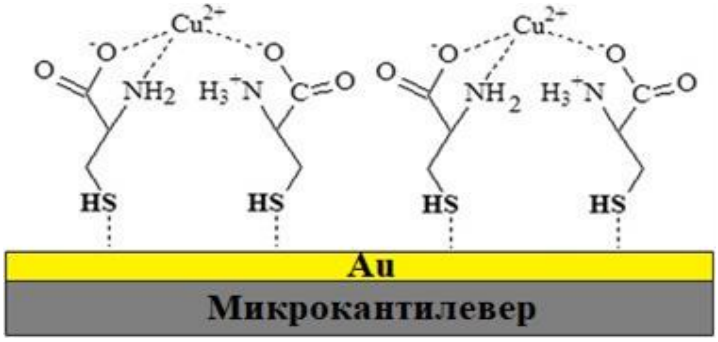


Рисунок 1.3.1 – Схематическая демонстрация молекулярной структуры самоорганизующегося монослоя L-цистеина на золотой поверхности микрокантилевера и его комплексообразование с Cu^{2+}

При использовании этой технологии в жидкостной ячейке была получена возможность обнаружения ионов Cu^{2+} при концентрации 10^{-10} моль/л, помимо этого, сенсоры продемонстрировали высокую избирательность в присутствии катионов Ni^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+} и т.д. При модификации микрокантилевера моноклональным антителом (mAb6A9) было достигнуто обнаружение комплексов Cu^{2+} с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в водной среде при концентрациях до $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Таким образом, микрокантилеверные системы демонстрируют свои широкие возможности, но ограничиваются невозможностью многоразового использования [124].

Электролитически-управляемые полевые транзисторы (EGOFET), также известные как жидкостные транзисторы, являются достаточно перспективными типами транзисторов для определения ионов меди. Он представляет собой тонкопленочный транзистор, в котором электролит служит проводящим материалом между затвором и полупроводником [125][126][127]. В противовес оптическим устройствам, такие транзисторы работают при очень низких напряжениях и не содержат хрупких компонентов.

Для детекции ионов меди в водных образцах был изготовлен модифицированный транзистор [128]. Схематическое изображение модифицированного электролитически-управляемого полевого транзистора показано на рисунке 1.3.2. Его затвор был модифицирован пептидом (глицил–глицил–гистидин), который образует комплекс с Cu^{2+}. Комплексообразование Cu^{2+} вызывает положительный сдвиг порогового напряжения транзистора, что позволяет регистрировать наличие меди с пределом обнаружения 10^{-12} моль/л. Недостатками этого метода являются большая площадь поверхности и дрейф тока во время измерений.

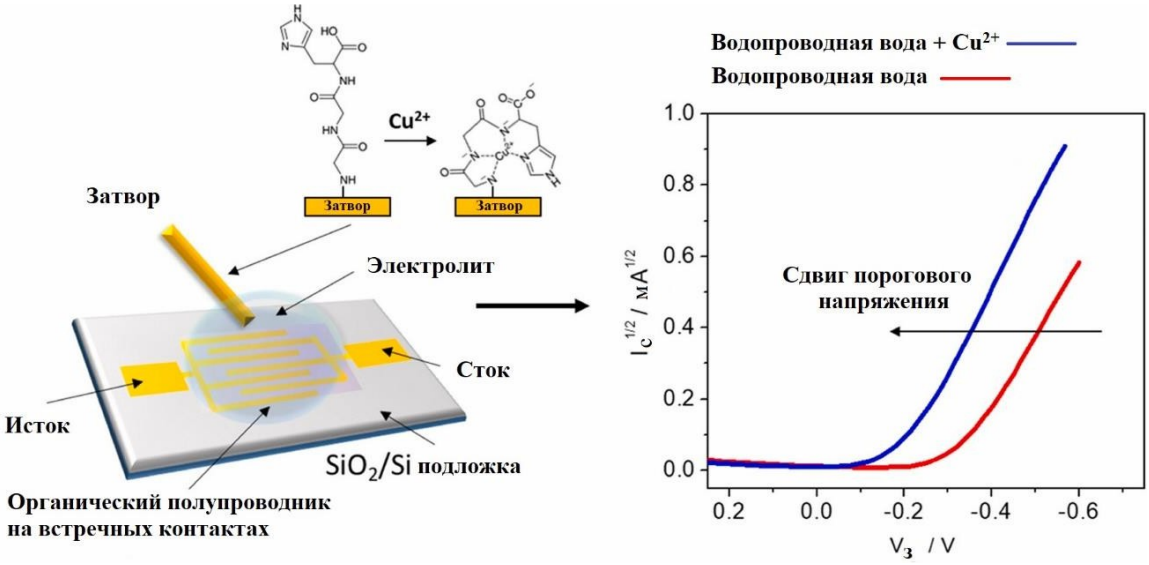


Рисунок 1.3.2 – Схематическое представление модифицированного электролитически-управляемого полевого транзистора

Создание таких транзисторов является относительно свежим направлением в науке, первое исследование на эту тему опубликовано относительно недавно [129]. С развитием технологии нанолитографии есть вероятность, что в будущем реализация сенсоров перейдет в наномасштаб, а разработка новых способов их

модификации повысит чувствительность и селективность для обнаружения ионов меди и других аналитических целей.

В последние годы наблюдается значительный прогресс в разработке хемосенсоров, основанный на различных подходах, включая использование квантовых точек [130], перенос заряда [131] и других технологий. Хемосенсоры делятся на три основные группы: хромогенные, флуоресцентные и фотопереключаемые. В основе работы хромогенных или колориметрических хемосенсоров – изменение спектра раствора при селективном взаимодействии с целевым веществом, что накладывает определенные ограничения на их применение [132]. Современные исследования показали возможность сенсора на основе нанолистов оксида молибдена определять наномолярные концентрации ионов меди (предел обнаружения $0{,}8 \cdot 10^{-9}$ моль/л) в сыворотке крови и волосах человека [133]. Принцип заключается в восстановлении Mo(VI) до Mo(V). Дело в том, что в отсутствие Cu^{2+} аскорбиновая кислота не может эффективно восстанавливать Mo(VI), соответственно, при наличии Cu^{2+} происходит реакция с аскорбиновой кислотой и образуются нанолисты MoO_{3-x}, которые вызывают локальный плазмонный резонанс за счет своих «кислородных вакансий» и, как следствие, увеличение поглощения. Сенсоры на основе оксида молибдена в отличие от сенсоров на основе наночастиц благородных металлов, стабильнее и дешевле [134][135].

Флуоресцентные сенсоры позволяют проводить молекулярную визуализацию и в реальном времени исследовать процессы накопления, переноса и токсичности металлов в клетках и организмах [136][137][138]. Этим сенсорам присущи: простота эксплуатации, высокая селективность и низкая стоимость, низкая растворимость в воде, угасание флуоресценции при связывании с Cu^{2+}, медленный отклик и короткий срок эксплуатации [139]. Флуоресцентные сенсоры бывают: генетически кодируемые (флуоресцентные белки) [140] и синтетические флуоресцентные сенсоры [141]. Генетически кодируемые сенсоры используются в качестве прижизненных маркеров с низкой клеточной токсичностью, но сложны в получении и неэффективны при динамическом изменении концентраций металлов

[142]. Синтетические флуоресцентные сенсоры в основном являются синтетическими пептидами [143], нанокластерами [144] и другими соединениями.

Фотопереключаемые хемосенсоры меняют свои свойства под действием электромагнитного излучения. Например, азометины на основе тиофена используются для визуализации ионов меди в микромолярных концентрациях в клеточных линиях HepG2, BV2, A549, MH-S и HeLa (рисунок 1.3.3) [145].

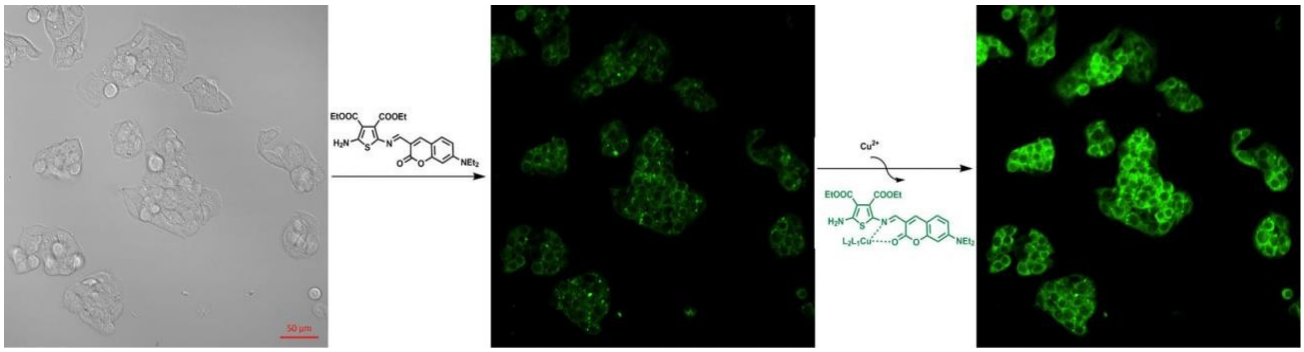


Рисунок 1.3.3 – Пример визуализации ионов меди с применением азометинового фотопереключаемого сенсора на основе тиофена в клетках HepG2

Исследователями продемонстрирован пример работы сенсора на основе 5-диэтиламино-2-[(2-гидрокси-бензилиден)гидразонометил]фенола на клеточной линии A549. При селективном количественном определении ионов Cu^{2+} было установлено, что предел обнаружения ионов Cu^{2+} составляет ~ 10^{-7} моль/л. А также, комплекс был использован для обнаружения фосфат-ионов в микромолярных концентрациях, благодаря связыванию Cu^{2+} с фосфат-ионами, что приводит к восстановлению флуоресценции (рисунок 1.3.4).

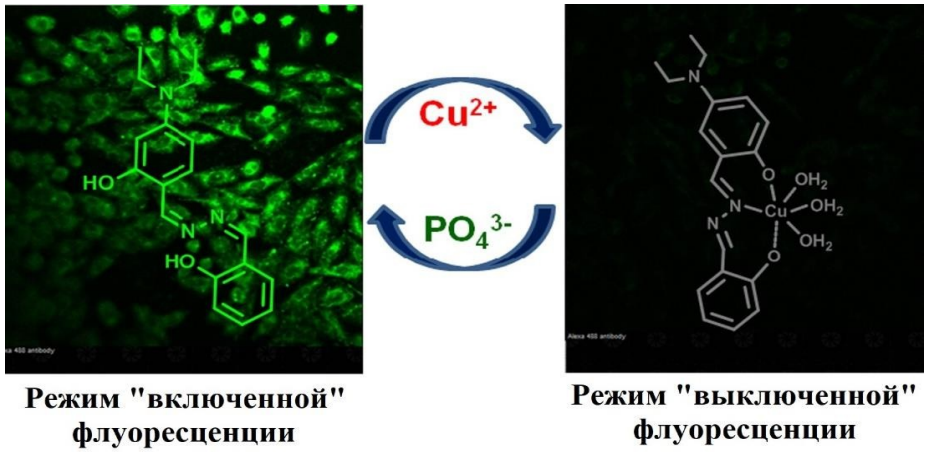


Рисунок 1.3.4 – Схематичное представление сенсора на основе азина для определения ионов Cu^{2+} и его комплекса с медью для выявления фосфатов в физиологических условиях [146].

При формировании комплекса удалось устранить излучение, вызванное агрегацией, а также добиться высокой флуоресценции и в органической и в водной среде. Также было минимизировано влияние ионов других металлов на процесс определения Cu^{2+} [146]. Изображенный на рисунке 1.3.5 флуоресцентный сенсор фотопереключаемого типа на основе азина был разработан для быстрого и селективного обнаружения Cu^{2+} в растворах и биологических системах [147].

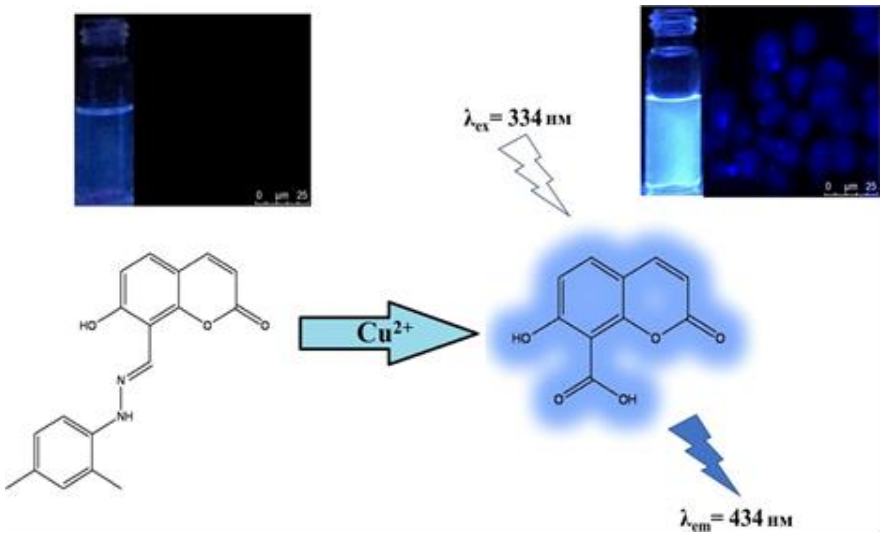


Рисунок 1.3.5 – Схематичное представление фотопереключаемого сенсора на основе азина

Показано, что в присутствии ионов Cu^{2+} на длине волны 425 нм наблюдается излучение, которое вызвано Cu^{2+}-индуцированным окислением имина с образованием карбоксилат-аниона. Предел обнаружения этого сенсора составляет 10^{-9} моль/л, а эффективность подтверждена на нескольких клеточных линиях: RAW 264.7, HeLa и HT-29.

Для визуализации и количественного определения ионов Cu^{2+} и Cd^{2+} в растворах и биологических системах был изготовлен фотопереключаемый сенсор на основе пептида (Gly-Cys-NH2), модифицированного дансилхлоридом. Механизм связывания флуорофора с ионами показан на рисунке 1.3.6.

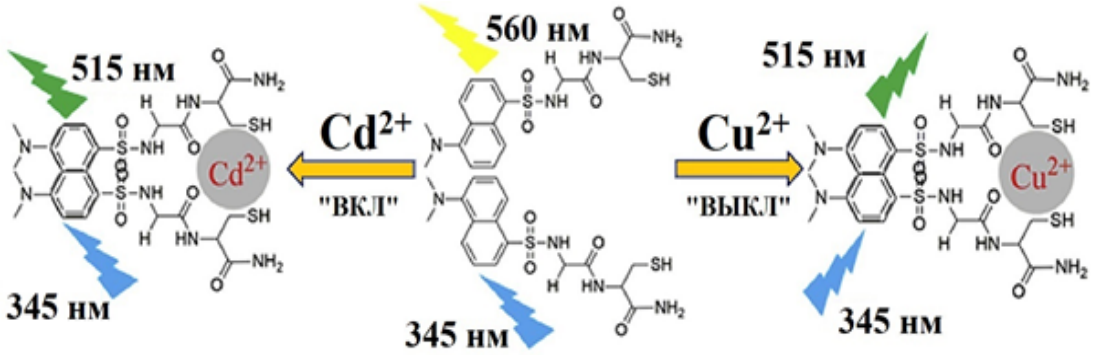


Рисунок 1.3.6 – Механизм связывания флуорофора с ионами Cu^{2+} / Cd^{2+}

Предел обнаружения для Cu^{2+} составил $26{,}3 \cdot 10^{-9}$ моль/л. Среди преимуществ сенсора можно выделить его высокую чувствительность, широкий рабочий диапазон pH (7–12), высокую проницаемость через клеточные мембраны и низкую клеточную токсичность.

Фотопереключаемые и флуоресцентные хемосенсоры зарекомендовали себя как эффективные инструменты для визуализации и изучения процессов, связанных с ионами меди в живых системах. Однако их использование ограничено из-за отсутствия комплексного решения по устранению всех недостатков.

Вольтамперометрия является одним из самых распространенных электрохимических методов для анализа ионов металлов в растворах и биологических системах [148][149][150]. Ключевое преимущество этого метода – это возможность изменения режимов развертки потенциала в зависимости от задачи. Так, для измерений в реальном времени чаще применяют вольтамперометрию с высокой скоростью развертки, а для определения малых концентраций аналита используют дифференциальную импульсную вольтамперометрию (ДИВ) или квадратно-волновую вольтамперометрию. Поэтому комбинация различных вольтамперометрических методик становится все более популярной [151].

На рисунке 1.3.7 продемонстрирована схема работы сенсорной системы для обнаружения Cu^{2+} в мозге крысы.

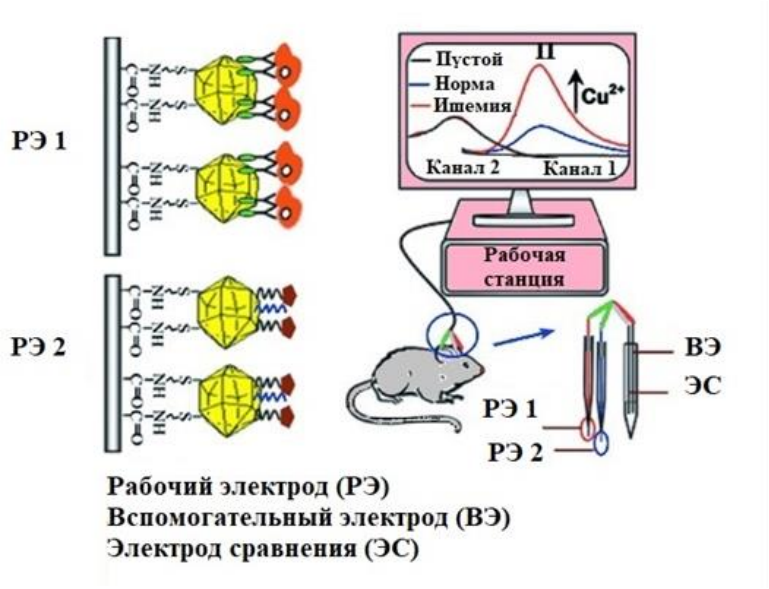


Рисунок 1.3.7 – Стадии изготовления стеклоуглеродных электродов, модифицированных E2Zn2SOD [152].

Система состоит из высокоселективного и чувствительного сенсора с использованием циклической вольтамперометрии и ДИВ. Электроды диаметром 10 мкм из стеклоуглеродного волокна были модифицированы супероксиддисмутазой E2Zn2SOD, где медь была заменена на другой элемент. Высокая специфичность E2Zn2SOD к Cu^{2+} обеспечила высокую точность результатов (с пределом обнаружения до $3 \cdot 10^{-9}$ моль/л и рабочим диапазоном от $0{,}01 \cdot 10^{-6}$ до $35 \cdot 10^{-6}$ моль/л).

В результате измерений показано, что концентрация ионов Cu^{2+} в мозге крысы до и после церебральной ишемии составляет приблизительно $2 \cdot 10^{-6}$ и $9 \cdot 10^{-6}$ моль/л соответственно. Настоящим исследованием была разработана методика создания сенсоров и установлен надежный подход для мониторинга *in vivo*.

С использованием метода ДИВ, также был разработан сенсор для определения ионов Cu^{2+}, способный работать в режиме реального времени [153]. Селективность сенсора достигалась иммобилизацией разветвленного полиэтиленимина на предварительно функционализированной поверхности стеклоуглеродного электрода. Этапы функционализации включали обработку поверхности цистеином, золотыми наночастицами и 3-меркаптопропионовой кислотой (рисунок 1.3.8).



Рисунок 1.3.8 – Стадии многослойной функционализации поверхности стеклоуглеродного электрода для определения ионов меди [153].

Следующий многообещающий электрохимический метод для обнаружения ионов меди в биологических системах - потенциометрия с ионоселективными электродами, демонстрирующая простоту, точность, экономичность и быстроту анализа. Например, сенсоры на основе угольно-пастовых электродов позволили достичь количественного определения ионов Cu^{2+} в воде и в биологических жидкостях, таких как моча пациентов с болезнью Вильсона. Их отклик на ионы меди был достаточно быстрым (около 6 секунд), а рабочий диапазон охватывал концентрации от 10^{-6} до 10^{-2} моль/л. К тому же, эти сенсоры обладают рядом технологических преимуществ: простота в изготовлении, высокая селективность и возможность массового производства с минимальными затратами, хотя есть и недостатки, например, относительно низкая чувствительность метода.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что электрохимические методы, включая потенциометрию и вольтамперометрию, обладают значительным потенциалом для выявления ионов меди, благодаря их хорошей чувствительности, простоте использования. низкой стоимости производства сенсоров и высокому соотношению сигнал/шум. Однако важной проблемой остается размер электродов и инвазивность сенсоров. Многие из существующих электродов не обладают необходимыми конструктивными особенностями для малоинвазивного использования в живых организмах. Это ограничивает их применение, особенно при анализе биологических жидкостей и тканей в реальном времени.

Сенсоры на основе нанопор и нанокапилляров представляют собой устройства для высокочувствительного обнаружения аналитов в режиме реального времени с чувствительностью, достигающей уровня отдельных молекул, что делает

их перспективными для применения в биологических системах [14][154][155][156][157]. Для достижения высокой специфичности к определенным мишеням, таким как ионы металлов [158][159][160], ДНК [161], аминокислоты [162], белки [163], а также органические молекулы [164], разработаны два основных подхода.

Первый подход заключается в фиксировании сенсором изменения ионного тока в результате связывания анализируемого вещества с лигандами, иммобилизованными на внутренней поверхности нанопор или нанокапилляров [165][166][167]. Второй подход основывается на специфическом взаимодействии молекулы-мишени с сенсором без необходимости связывания на внутренней поверхности нанокапилляра [168]. Оба метода обеспечивают высокую чувствительность и специфичность, тем самым делая такие сенсоры эффективными для работы с различными биологическими системами.

В основу создания селективного сенсора для определения ионов меди использовался механизм транслокации полигистидина (используемого в качестве хелатирующего агента меди) через нанопору α-гемолизина [169]. В отсутствие ионов Cu^{2+} процесс транслокации имеет постоянные параметры: время пребывания полигистидина внутри нанопоры и степень ее блокировки, что видно на рисунке 1.3.9 А. При добавлении ионов меди (рисунок 1.3.9 Б) наблюдаются изменения в этих параметрах, связанные с образованием комплекса полигистидина с ионами Cu^{2+}.

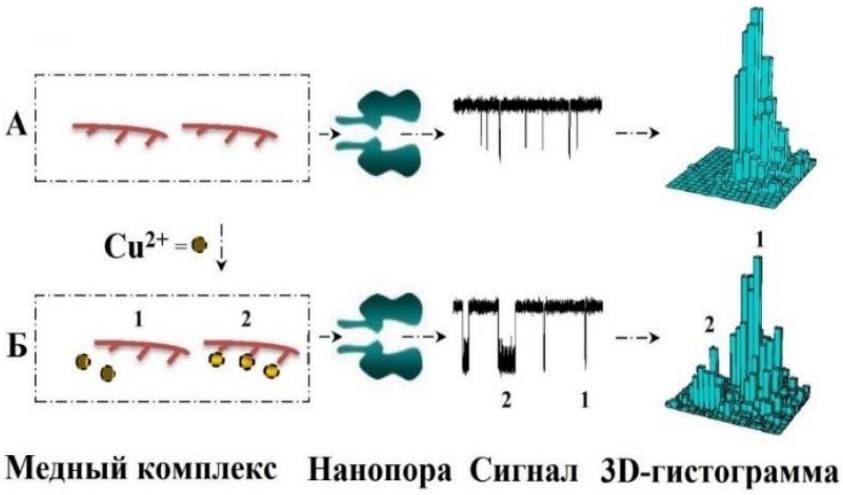


Рисунок 1.3.9 – Схематическая иллюстрация процесса детекции Cu^{2+} с помощью белковой нанопоры [169]: А – в отсутствии Cu^{2+}, Б – в присутствии Cu^{2+}.

После добавления Cu^{2+} ионы взаимодействуют с молекулами медь-хелатирующего агента с образованием медного комплекса, который, в свою очередь, взаимодействует с белковой нанопорой при транслокации и приводит к значительным отличиям в специфических сигналах, что позволяет легко распознавать медные комплексы (рисунок 1.3.9 Б) и обнаруживать следовые количества ионов меди с пределом обнаружения $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

На основе нанокапилляров из кварца с неиммобилизованной полиглутаминовой кислотой был разработан сенсор (рисунок 1.3.10) [170], селективность обнаружения ионов меди в растворе которого составила до $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ моль/л).

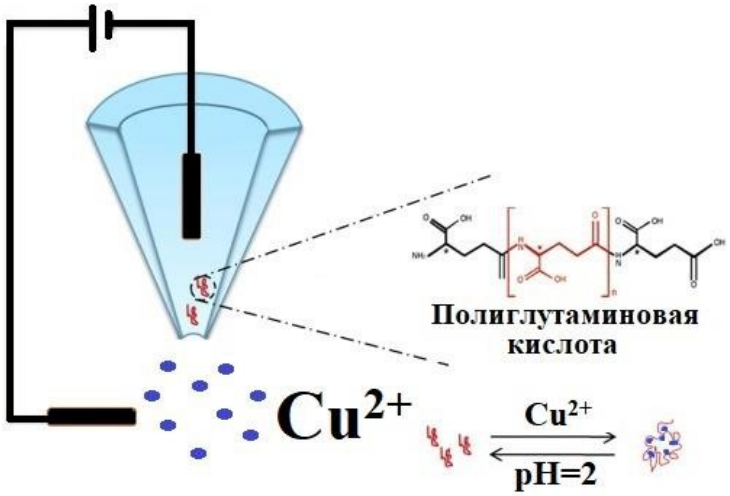


Рисунок 1.3.10 – Схематическая иллюстрация сенсора на базе нанокапилляра с полиглутаминовой кислотой, используемой без иммобилизации, для детекции ионов меди

Принцип действия этого сенсора основан на значительном снижении ионного тока, проходящего через нанокапилляр. Датчик демонстрирует высокую специфичность обнаружения ионов меди благодаря высокому сродству полиглутаминовой кислоты к Cu^{2+}.

Было также изучено обратимое связывание Cu^{2+} на поверхности нанокапилляров, модифицированных хитозаном и полиакриловой кислотой в водных растворах (рисунок 1.3.11) [165].

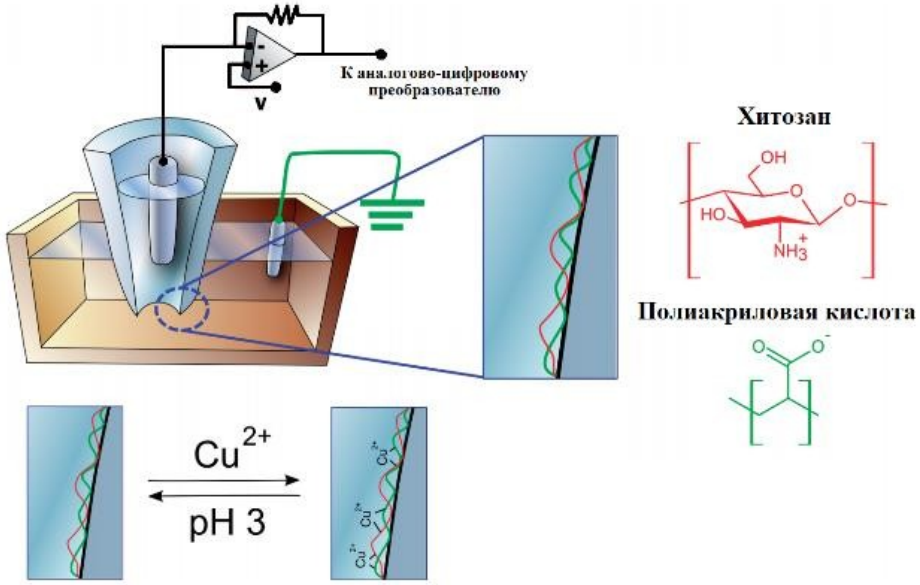


Рисунок 1.3.11 – Схематическое изображение электролитической ячейки и процесса обратимого связывания ионов меди на модифицированном хитозаном и полиакриловой кислотой нанокапилляре [163]

В недостатках такого сенсора можно обозначить низкую чувствительность (предел обнаружения составил 10^{-6} М) и узкий рабочий диапазон измеряемых концентраций ($4 \cdot 10^{-6} – 10^{-4}$ моль/л).

Примером специфического взаимодействия молекулы-мишени и сенсора без связывания внутри нанокапилляра является изобретение, в котором на стеклянный нанокапилляр, заполненный углеродом, методом электрохимического осажденения нанесено золото, впоследствии модифицированное лигандом на основе трипептида (глицил-L-гистидил-L-лизин-SH) для селективного связывания Cu^{2+} (электрохимический сенсор). При проведении сравнительного анализа концентрационных кривых, полученных смодифицированным сенсором и сенсором без лиганда, было установлено, что дополнительная стадия модификации значительно повышает чувствительность, а предел обнаружения сенсорной системы с лигандом составил $3 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Применение описываемых сенсоров было продемонстрировано на клеточной линии MCF-7 *in vitro.* Особенностью экспериментов *in vitro* является нестандартный способ подачи потенциала, позволяющий детектировать электрохимический переход меди из Cu^{+} в Cu^{2+} без восстановления металлической меди на рабочей поверхности сенсора.

В заключение приведены результаты сравнительного анализа методов количественного определения ионов меди (таблица 1.3.1).

Таблица 1.3.1 – Сравнительный анализ способов количественного определения ионов меди

Способы количественного определения $[Cu^{+}]$, $[Cu^{2+}]$	C_{min}*, моль/л	Применение				Литература
		Раствор	*in vitro*	*in vivo*	Измерения в реальном времени	
Сенсоры на основе транзисторов	10^{-12}	+	-	-	-	[128]
Спектроскопические и спектрометрические методы анализа (AAS, FAAS, GF-AAS, ICP-MS, ICP-AES, PIXE, TXRF, SXFM, SERS)	10^{-11}	+	+	-	-	[97] [100] [101] [102] [103] [104] [105] [107] [108] [109] [114] [115]
Сенсоры на основе микрокантилеверов	10^{-10}	+	-	-	-	[122] [123] [124]
Колориметрические хемосенсоры	~ 10^{-9}	+ (б.ж.)**	-	-	-	[133]
Флуоресцентные хемосенсоры	10^{-9}	+ (б.ж.)	+	+	-	[143] [144]
Электрохимические сенсоры	~ 10^{-9}	+	+	+	+	[152] [153] [171]
Фотопереключаемые хемосенсоры	$8 \cdot 10^{-9}$	+	+	+	-	[145] [146] [172]
Сенсоры на основе нанопор	~ 10^{-8}	+	-	-	-	[169]
Сенсоры на нанокапилляров	~ 10^{-8}	+	+	-	+	[156] [168] [170]

* Максимальный предел обнаружения ионов меди.

** Биологические жидкости.

1.4 Применение нано- и микроэлектродов в биологических системах *in vivo*

В последние годы возрастающая потребность в чувствительных аналитических и диагностических инструментах для идентификации различных веществ способствовала значительному прогрессу в биомедицинских исследованиях. Современные аналитические методы, основанные на углеродных материалах [173–175], наночастицах [176], квантовых точках [177–179] и флуоресцентных красителях [180], обеспечивают высокую чувствительность, минимальную инвазивность и позволяют проводить измерения в реальном времени в живых системах.

Исследования *in vivo* способствуют быстрому развитию здравоохранения и открытию новых подходов, которые будут способствовать переходу к персонализированной медицине. Мониторинг состояния здоровья с помощью датчиков, имплантированных в организм, позволит измерять широкий спектр параметров, а также изучать фармакокинетику лекарственных средств [181,182].

Электрохимические сенсоры являются одними из наиболее перспективных и эффективных методов для обнаружения аналитов в реальном времени с высоким пространственным и временным разрешением [183]. Такие датчики позволяют исследовать физиологические процессы на клеточном, тканевом и органном уровнях, а также оценивать состояние здоровья и выявлять заболевания [184].

Электрохимические методы должны соответствовать ряду ключевых критериев: чувствительность, селективность, временное разрешение и размер электрода [32,33]. Важно идентифицировать вещества в следовых концентрациях в биологических системах с изменяющимися уровнями. Высокое временное разрешение критично, а минимальные размеры электрода позволяют проводить измерения с минимальными повреждениями тканей. Наиболее распространенные биоаналиты включают нейромедиаторы [185], аскорбат [186], активные формы кислорода и азота (АФК/RNS) [187], кислород [188], различные ионы металлов [189] и другие (рисунок 1.4.1).

Сегодня ведется множество исследований, направленных на обнаружение нейромедиаторов *in vivo* [190–196]. Изучение биологических молекул,

участвующих в процессах мозга, является важной задачей для понимания нормальной мозговой активности и патофизиологии нейродегенеративных и психоневрологических заболеваний. Аномальные уровни нейромедиаторов часто свидетельствуют о сбоях в работе центральной нервной системы (ЦНС). Поэтому для изучения этих процессов необходимы высокочувствительные и малоинвазивные методы, способные обнаруживать нейромедиаторы *in vivo* и проводить измерения в конкретных участках мозга.

Фундаментальные исследования [197] нейротрансмиссии, направленные на понимание клеточной сигнализации и взаимодействий между клетками, вызывают значительный интерес. Микроэлектроды могут быть особенно полезны для изучения высвобождения сигнальных молекул на уровне отдельных клеток, что требует сверхчувствительных методик, способных работать в микромасштабе [198,199].

Однако при изучении ЦНС возникают значительные проблемы, связанные с электрохимическим анализом: во-первых, необходимо обеспечить стабильность электродов при длительных измерениях; во-вторых, требуется высокая селективность для определения различных нейромедиаторов; в-третьих, поверхность электродов должна быть защищена от адсорбции белков; и, в-четвертых, необходима высокая чувствительность для обнаружения крайне низких концентраций токсичных веществ [200]. Поэтому разработка новых подходов к созданию электродов помогает преодолеть многие из этих трудностей.

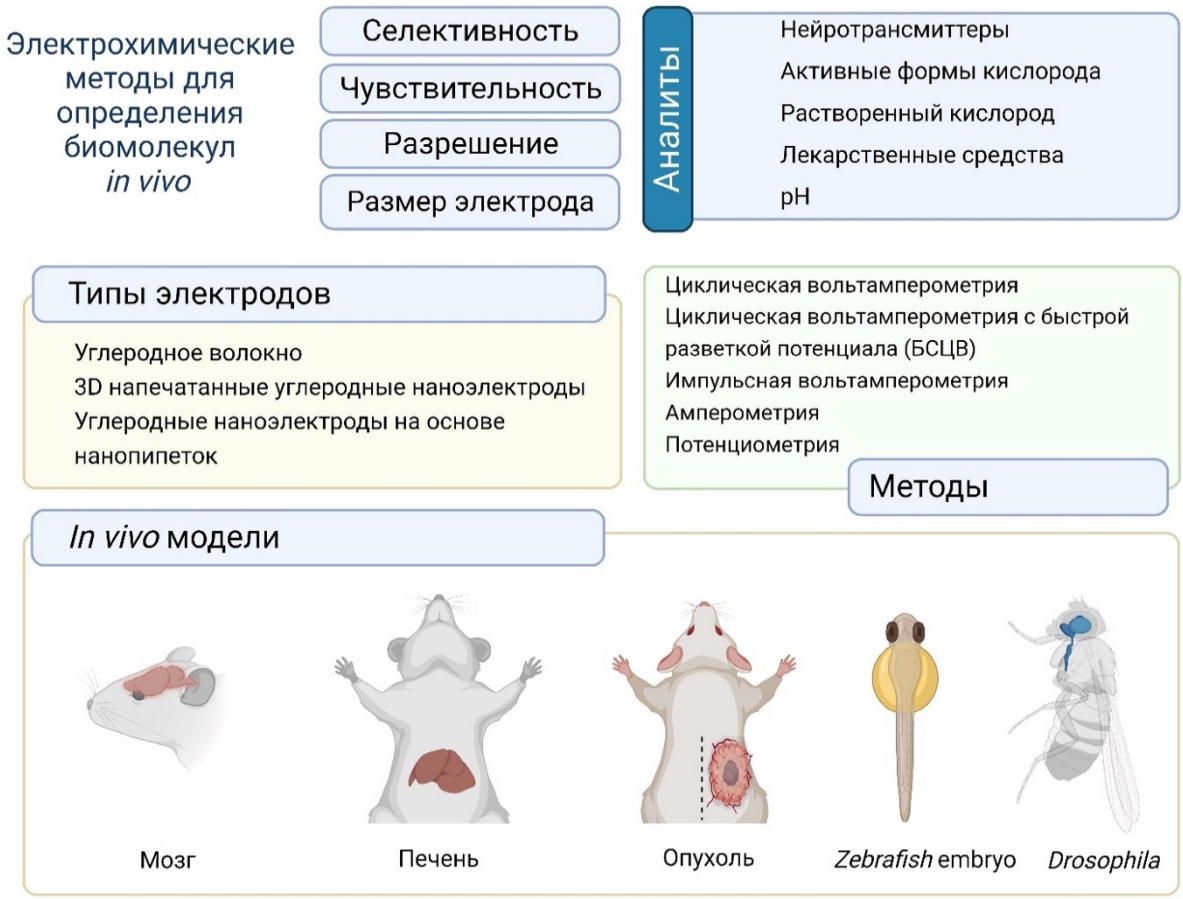


Рисунок 1.4.1 - Краткое описание типа анализируемых веществ, типа электродов, методов обнаружения и моделей электрохимического обнаружения *in vivo*

Другой важной областью биологии является изучение окислительного стресса. Окислительный стресс связан со старением [201], канцерогенезом [202], нейродегенеративными расстройствами [203] и рядом других состояний, связанных со здоровьем [204]. Хотя кислород является важным компонентом для живых организмов, биохимические реакции с участием кислорода могут привести к образованию АФК/RNS, что может оказать негативное воздействие на организм. Существует множество работ, посвященных изучению АФК/RNS на клеточном уровне [205–211]. В большинстве случаев методы обнаружения отдельных АФК были протестированы и успешно использовались для обнаружения небольших количеств АФК в режиме реального времени. Следует отметить, что АФК/RNS, как маркер апоптоза, могут быть вовлечены в механизм действия противоопухолевых цитотоксических средств на опухолевые клетки. Поэтому перспективно исследование опухоли *in vivo* для определения эффективности противоопухолевых препаратов [212].

Исследования фармакокинетики лекарственных средств *in vivo* в режиме реального времени необходимы для отслеживания кинетики лекарственных средств и оценки их эффективности, поскольку такие электрохимические методы могут ускорить разработку эффективных методов лечения. Недавно противоэпилептический препарат ламотриджин, противоопухолевый реагент доксорубицин и метилкобаламин были исследованы в мозге крыс *in vivo* с использованием электрохимических методов [191,192].

Одним из перспективных подходов для локальных измерений некоторых анализируемых веществ *in vivo* является электрохимический метод с использованием нано-, микроэлектродов на основе углеродных волокон (CF) или стеклянных нанокапилляров. В то время как сенсоры на основе CF используются уже давно, сенсоры на основе стеклянных нанокапилляров только начинают разрабатываться. Новая технология изготовления нано- и микроэлектродов на основе стеклянных капилляров открывает широкие возможности для разработки сенсоров. Нанокапилляр обладает рядом важных преимуществ, включая простоту изготовления, небольшой размер и игольчатую геометрию. Это делает его подходящим зондом для сканирующей зондовой микроскопии, включая сканирующу ионно-проводящую микроскопию (SICM) [5][213,214] и сканирующую электрохимическую микроскопию (SECM) [215,216].

Аскорбат играет важную роль в различных физиологических процессах. Он известен как антиоксидант и нейромодулятор дофаминергической и глутаматергической нейротрансмиссии, а также как кофактор ферментов, участвующих в физиологических и патологических процессах [186]. Аскорбат влияет на такие биологические процессы, как синтез коллагена, метаболизм аминокислот, заживление ран, выработка гормонов коры надпочечников, ферментативное амидирование нейропептидов, а также устранение свободных радикалов и синглетного кислорода [217]. Концентрация аскорбата в нейронах достигает 10 ммоль/л, что указывает на его ключевую роль в функционировании нейронов [218]. Снижение уровня аскорбата при ишемии или других повреждениях повышает уязвимость клеток к окислительному стрессу.

В одном из недавних исследований углеродные волоконные электроды (CFE) были модифицированы одностенными углеродными нанотрубками (OУНТ) с использованием электрофоретического осаждения для измерения содержания аскорбата *in vivo*. Ключевая особенность метода заключалась в измерении базального уровня аскорбата и мониторинге его концентрации в течение 9 минут после введения каиновой кислоты в гиппокамп для индукции эпилепсии [219].

Эти электроды использовались для изучения уровня аскорбата в головном мозге крыс при распространении распространяющаяся деполяризация. Было показано, что выброс аскорбата тесно связан с распространяющейся деполяризацией, и при его индукции наблюдалось значительное повышение концентрации аскорбата. Это исследование подчеркивает потенциал электрохимических систем *in vivo* для понимания нейрохимических веществ, участвующих в различных патологических процессах, связанных с мозгом [220].

В другом исследовании [221] авторы продемонстрировали ратиометрическое определение аскорбата *in vivo* с использованием CFE, модифицированного карбонильными группами на графене и поли(2,3-дигидротиено-1,4-диоксин) для предотвращения биологического обрастания. Авторы дополнительно удалили эпоксидные группы, чтобы улучшить окисление аскорбата при -52 мВ и повысить чувствительность, что было подтверждено электрохимическими исследованиями и расчетами по теории функционала плотности. Результаты показали снижение уровня аскорбата до 217 ± 8 мкм в гиппокампе и 220 ± 13 мкм в коре головного мозга (по сравнению с контрольными показателями в гиппокампе (257 ± 13 мм) и коре головного мозга (в среднем 256 ± 9 мм)). Однако уровни аскорбата в полосатом теле мышей с болезнью Паркинсона не показали статистически значимых отличий по сравнению с нормальными мышами, и его концентрация, по расчетам, составила 250 ± 16 ммоль/л.

Исследование [222] также демонстрирует интеграцию микроэлектрода из активированного углеродного волокна (CFME) в платформу вольтамперометрического зондирования на основе глубокого обучения для обнаружения нескольких аналитов, включая классические нейромедиаторы и аскорбат.

Активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) являются известными продуктами метаболизма. Недавно был проведен обзор методов обнаружения АФК/АФА в биологических моделях [32,33]. В относительно низких концентрациях они выполняют важные функции в регуляции множества физиологических процессов. Однако избыточное производство АФК/АФА связано с патогенезом различных нарушений, включая сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, а также рак.

Обнаружение и количественная оценка АФК и АФА представляют собой сложную задачу из-за их характеристик: короткого времени жизни, низкой физиологической концентрации и высокой реактивности [35]. Чувствительность и селективность методов имеют ключевое значение. Электрохимическое обнаружение и мониторинг АФК/АФА - быстро развивающаяся область, которая активно исследуется в научных публикациях.

Недавно Думитреску и его коллеги впервые измерили распределение оксида азота (NO) в кишечнике живых эмбрионов рыбок Данио рерио (*Danio rerio*), получавших ресвератрол и розувастатин. С помощью углеродных волоконных электродов (CFEs) были проведены измерения, позволившие проводить количественный мониторинг NO в реальном времени в различных сегментах кишечника (рисунок 1.4.2). В присутствии ресвератрола и розувастатина концентрация NO в кишечнике снизилась на 87%. Эти результаты показали наличие микромолярных концентраций NO в желудочно-кишечном тракте эмбрионов *Danio rerio* и продемонстрировали эффективность CF-микроэлектродов для количественного измерения высвобождения NO на уровне отдельных органов у отдельных эмбрионов [223].

В частности, последовательности, богатые гуанином, способны образовывать особую структуру ДНК, известную как G-квадруплекс, которая может координироваться с порфириноподобными биокатализаторами, образуя G4-порфирин. Полученный гибрид ДНК-G4/порфирина представляет собой эффективный электрокаталитический катализатор NO. Изготовленный микросенсор обладает высокой чувствительностью (предел обнаружения 13,5 мкМ), широким диапазоном обнаружения (100 мкМ– 5 мМ) и хорошей

селективностью, что позволяет точно и непосредственно контролировать выделение NO клетками и тканями. Исследования показали характер высвобождения NO различными раковыми клеточными линиями и его динамику в микроокружении опухоли *in vivo* [224].

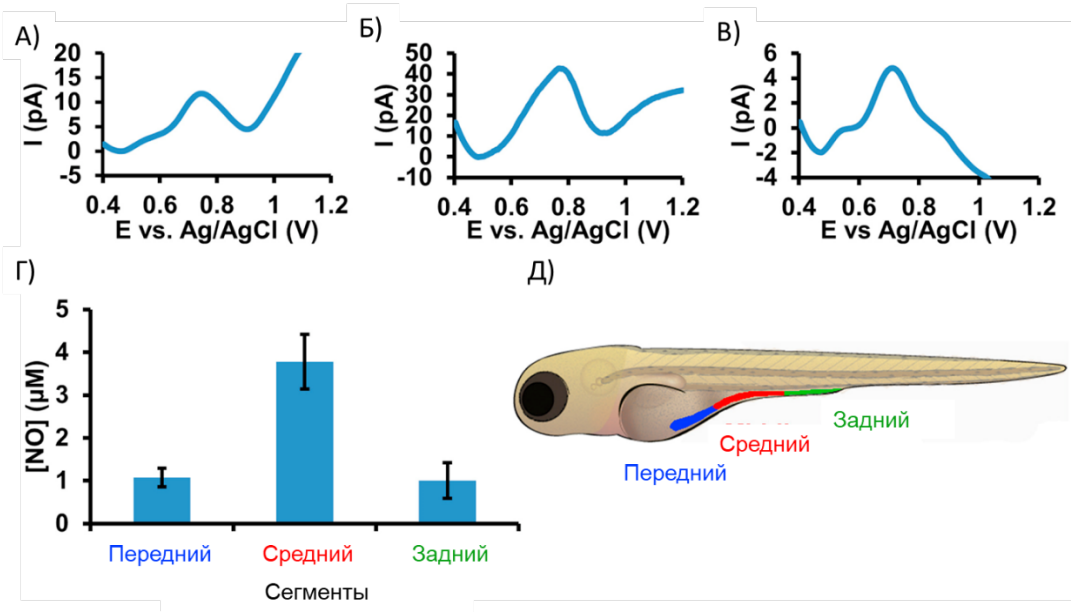


Рисунок 1.4.2 – *In vivo* ДИВА, измеренные с помощью микроэлектрода, введенного в кишку 5-дневных эмбрионов рыбок данио в: переднем (А), среднем (Б) и заднем (В) сегментах. Концентрации NO, измеренные *in vivo* в кишечнике эмбрионов (Г). Схематическое изображение трех участков кишечника, куда был имплантирован датчик (Д) [223]

Оксид азота (NO) также был обнаружен в живом мозге крысы с использованием микроэлектродов из углеродного волокна, покрытых порфирином никеля и фторированным ксерогелем. Эти микросенсоры оказались устойчивыми к взаимодействию с окислительно-восстановительными молекулами и показали превосходство над аналогичными микроэлектродами с экранирующим слоем из Nafion. *In vivo*, в теменной коре головного мозга крысы, эти электроды могли обнаруживать NO, высвобождаемый мозгом при локальной микроинъекции глутаматергического агониста N-метил-D-аспартата (NMDA). Высвобождение NO, вызванное NMDA, достигало максимума на уровне 1,1 мкМ и продолжалось более 20 минут [223].

Электрохимическое восстановление пероксида водорода (HPRR) признано эффективным методом обнаружения пероксида водорода. Используя Cu1/C3N4 в качестве одноатомного электрокатализатора меди, были разработаны

микросенсоры, которые избирательно реагируют на пероксид водорода, но не проявляют отклик на O2 или другие электроактивные нейрохимические вещества. При имплантации в мозг живой крысы эти микросенсоры демонстрируют отличные характеристики для *in vivo* измерений, что позволяет точно оценивать динамику пероксида водорода в реальном времени [224].

Был разработан селективный и точный электрохимический биосенсор с высоким пространственным и временным разрешением для мониторинга уровня $ONOO^-$ в различных областях мозга крыс в режиме реального времени после глобальной ишемии головного мозга. В его основе лежит новая органическая молекула, 4-(S-(6-меркаптогексил)бензотиоат-6-ил)-7-(диэтиламино)-2-(4-(пиперазинилдиферроформамид-1-ил)фенил)хроменилий (HEMF), обладающая специфической узнаваемой группой по отношению к $ONOO^-$ и электроактивной группой (ферроцен). Эта молекула была разработана и синтезирована для высокоселективного определения $ONOO^-$ и продемонстрировала хорошую линейность в диапазоне концентраций от 20,0 нМ до 2,0 мкМ, с пределом обнаружения всего 12,1 ± 0,8 нМ. В сочетании с уникальными свойствами углеродных волоконных электродов (CFE), такими как высокое пространственное разрешение (10 мкм) и хорошая биосовместимость, разработанный ратиометрический электрохимический биосенсор с высоким временным разрешением успешно применялся для обнаружения $ONOO^-$ в трех областях мозга крыс после ишемии [225].

Загрязнение поверхности электрода является одной из ключевых проблем, ограничивающих практическое применение датчиков в сложных условиях in vitro и *in vivo*, так как оно значительно снижает чувствительность, стабильность, срок службы и воспроизводимость электрохимических датчиков. Однако в настоящее время эта проблема активно решается. Недавно был разработан электрохимический датчик H_2O_2 с нанопористой кремнеземной мембраной в качестве антиобрастающего слоя и платиновыми наноструктурами внутри нанопор, выполняющими роль катализатора для повышения чувствительности к H_2O_2. Для демонстрации антиобрастающих свойств электрод был имплантирован в мозг крысы, где он успешно функционировал в течение 1,5 часов [224].

Был разработан CF-сенсор, модифицированный 1,3-фенилендиамином [226]. Электроосаждение этого полимера создает мембрану, которая устраняет крупные молекулярные помехи, которые могут ошибочно восприниматься как H_2O_2. Эта мембрана широко применяется в качестве покрытия как в микродиализных образцах [227], так и в электрохимических датчиках [228]. С использованием немодифицированного микроэлектрода без покрытия было обнаружено быстрое увеличение концентрации дофамина (DA) вследствие выброса везикул, а также слабый сигнал, предположительно связанный с H_2O_2. При стимуляции с помощью модифицированного датчика было зафиксировано небольшое повышение уровня H_2O_2, но сигнал DA отсутствовал, так как мембрана эффективно блокировала его.

Таблица 1.4.1 - Обнаружение различных видов АФК/АФА *in vivo*

Сенсорная структура	Метод	Предел обнаружения	Линейный диапазон концентраций	Животное/ Область	Ссылка
NO	CF, модифицированный NiTSPc и Nafion	DPV	0,34 μM	0,5-10 μM	Эмбрионы рыбок Данио рерио
NO	CF, модифицированный ДНК-G4/порфирином	DNPV	13,5 пМ	100 пМ–5 μM	(Мышь) Опухоль
NO	CF, модифицированный никелевым порфирином и фторированным ксерогелем	DNPV	12,1 ± 3,4 нМ	-	(Крыса) Мозг
NOO^-	CF, модифицированный HEMF	-	12,1 ± 0,8 нМ	20,0 нМ - 2,0 мкМ	(Крыса) Мозг
H2O2	CF, модифицированный 1,3-фенилендиамином	FSCV	-	-	(Крыса) Мозг
H2O2	Наноэлектрод на основе платинизированного нанокапилляра	Амперометрия	-	0,1-100 μM	(Мышь) Опухоль
H2O2	CF дисковый электрод в центре кольцевого микродискового электрода, модифицированного PB и PEDOT	Амперометрия	0,4 μM	1-29 μM	(Крыса) Мозг

Мониторинг динамических изменений pH является ключевым для понимания физиологических процессов, так как нарушения кислотно-щелочного баланса тесно связаны с развитием и прогрессированием различных заболеваний, таких как муковисцидоз [229], ишемия [230], психические расстройства [231], заболевания желудочно-кишечного тракта [232] и рак. Опухолевое микроокружение особенно чувствительно к изменениям pH [233]. Внутри- и

внеклеточные значения pH в опухолях играют важную роль в развитии и лечении рака. Считалось, что как внеклеточный (pHe), так и внутриклеточный pH в опухолевых клетках ниже, чем в нормальных. Однако последние исследования показали, что внутриклеточный pH (pHi) в раковых клетках может быть нейтральным или даже слабощелочным по сравнению с клетками нормальных тканей.

В настоящее время для измерения pHi и pHe в клетках применяются такие методы, как pH-чувствительная спектроскопия ядерного магнитного резонанса [234], позитронно-эмиссионная томография [235], радиотрейсеры, магнитно-резонансная томография [236], оптическая томография [237] и различные типы электрохимических датчиков.

Недавно были разработаны потенциометрические датчики на основе MoS_2 и полианилина (PAN), которые позволяют надежно и избирательно отслеживать динамику изменений pH *in vivo* [238]. В этих датчиках полианилин используется как активный pH-чувствительный материал, а MoS_2 - благодаря своей большой площади поверхности, хорошей биосовместимости и выдающимся электрохимическим свойствам. Микроигла для измерения pH была создана путем послойной сборки MoS_2 и PAN. Для регулирования pH *in vivo* в мозг крыс вводили NaH_2PO_4 и Na_2CO_3, что приводило к изменению pH спинномозговой жидкости.

Разработан аналогичный тип электрохимического датчика на основе поли(меламиновых) пленок для ратиометрического мониторинга pH в мозге мышей с подострой болезнью Паркинсона. Поли(меламиновые) пленки получены методом электрополимеризации в меламинсодержащем растворе, который служит в качестве селективной мембраны для определения pH, проходя через $2H^+/2e^-$ процесс. Одновременно электрохимически окисленный оксид графена (EOGO) генерировал встроенный корректирующий сигнал, что помогало компенсировать влияние окружающей среды на функционирование отделов мозга. Разность потенциалов между пиками, генерируемыми EOGO и поли(меламином), постепенно уменьшалась с увеличением pH от 4,0 до 9,0, что является основой для работы этого электрохимического ратиометрического микросенсора [239].

Недавно был разработан микрометрический датчик для определения pH внутри мозга крысы с хорошим временным и пространственным разрешением [240]. Полимеры на основе полиимидазола впервые были нанесены на внутреннюю стенку микрокапилляров с помощью радикальной полимеризации. Ассоциация и диссоциация протонов имидазола при изменении pH приводят к увеличению или уменьшению плотности поверхностного заряда, что, в свою очередь, влияет на ионный ток, позволяя анализировать pH.

Датчик показал хорошую линейность и обратимость в диапазоне pH от 5,8 до 8,0 со средним временем отклика около нескольких миллисекунд. Он был имплантирован в кору головного мозга для мониторинга изменений pH при нарушении кислотно-щелочного баланса, вызванного вдыханием чистого CO_2. Вдыхание чистого CO_2 быстро снижает уровень pH примерно на $0,10 \pm 0,05$.

Процессы в мозге, зависящие от правильного кислородного насыщения, имеют критическое значение, поэтому многие современные исследования сосредоточены на разработке новых или усовершенствованных электрохимических датчиков для измерения кислорода в мозге *in vivo* и изучении его влияния на различные физиологические процессы.

В одном из первых исследований изучались свойства немодифицированного CFME-электрода, функционализированного нанопористой мембраной из кремнезема, которая эффективно защищает поверхность электрода от биологического обрастания, оставаясь проницаемой для кислорода. Синтезированная мембрана была нанесена методом электросборки. Авторы работы исследовали структуру и морфологию мембраны, подтвердив ее проницаемость для O_2. Нанесенная мембрана улучшила соотношение сигнал/шум и повысила стабильность электрода при длительном использовании. Способность к предотвращению биологического обрастания (измеренная как относительная стабильность тока в бычьем сывороточном альбумине) составила 85% от исходного значения через 60 минут для модифицированного электрода по сравнению с 55% для немодифицированного CFME через 30 минут.

Исследование демонстрирует использование функционализированных CFME нанокомпозитов металл/азот/углерод (M/N/C, где M = Co или Fe) для

мониторинга кислорода *in vivo* [241]. Основная цель заключалась в использовании функционализирующих материалов, отличных от платины, которые характеризуются высокой стабильностью и устойчивостью к загрязнению поверхности в сложных физиологических условиях. Нанокомпозиты M/N/C получались путем пиролиза цеолитового имидазолатного каркаса, а их модификация на поверхности CFME проводилась методом электрофоретического осаждения (рисунок 1.4.3A). Стабильность измерений подтверждена в присутствии различных электроактивных химических соединений и белков, загрязняющих поверхность. Чувствительность электрода составила 0,0012 мкА*мкм$^{-1}$. В заключительной части работы проводились измерения *in vivo*, показавшие базальный уровень O_2 в гиппокампе крысы на уровне 30 ± 10 мкм (n = 3).

Электрод типа Clark использовался для измерения оксигенации мозга в исследовании [242]. Особенность работы заключалась в том, что измерения проводились у бодрствующих мышей с фиксированной головой (рисунок 1.4.3 B). Содержание кислорода в коре головного мозга мышей измеряли во время локомоции с помощью полярографии, спектроскопии и двухфотонной фосфоресценции кислородных датчиков. Было обнаружено, что локомоция значительно и глобально увеличивает насыщение кислородом, особенно в областях, связанных с движением, а также в лобной коре и обонятельной луковице. Повышение насыщения кислородом сохраняется даже при блокировании нервной активности и функциональной гиперемии, происходит как в тканях, так и в питающих мозг артериях, и тесно коррелирует с частотой дыхания и фазой дыхательного цикла.

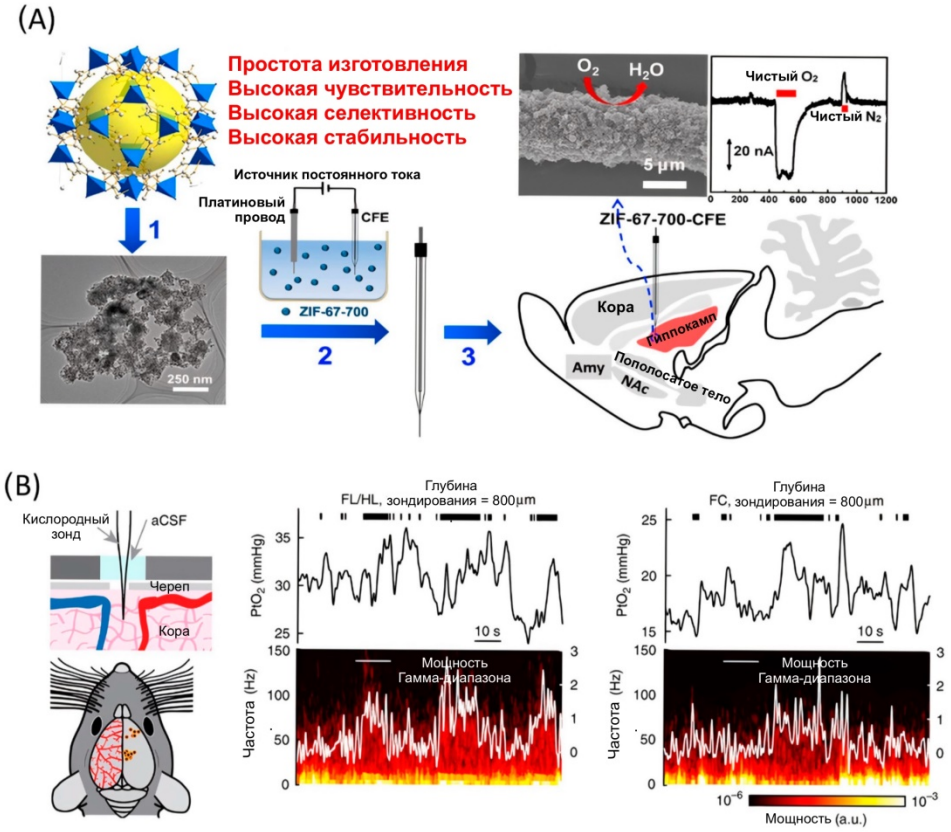


Рисунок 1.4.3 - A) Применение катализаторов Co/N/C для мониторинга кислорода *in vivo*. 1) Катализаторы Co/N/C были получены путем пиролиза ZIF-67 при температуре 700°C. 2) Датчик был изготовлен путем электрофоретического нанесения катализатора на микроэлектрод из углеродного волокна. 3) Готовый датчик использовался для мониторинга содержания кислорода (O_2) *in vivo* [241]. Авторское право 2019 года Американского химического общества. B) Слева - экспериментальная установка и места измерений. В центре - типичные сигналы, демонстрирующие реакцию парциального давления кислорода (PO_2) на локомоцию на глубине 800 мкм под поверхностью мозга в областях, представляющих соматосенсорную кору передних/задних конечностей (FL/HL) и лобную кору (FC). Вверху черными галочками отмечены бинаризованные события локомоции; в центре - реакция PO_2 на локомоцию; внизу - спектрограмма потенциала локального поля (LFP) [242].

Несмотря на ограниченное количество исследований по определению содержания кислорода *in vivo* за последние четыре года, можно выделить несколько ключевых моментов. Были проведены обширные эксперименты по оценке воздействия внешних факторов на разработанные датчики, и большинство тестов проводится до реальных измерений *in vivo*. Во время измерений *in vivo* электроды часто подвергаются значительным внешним воздействиям, изменяющим их характеристики. Например, это хорошо показано в исследовании,

где калибровочные кривые O_2, полученные до и после имплантации в мозг крысы на протяжении двух часов, продемонстрировали заметные изменения [241].

Обнаружение ионов металлов *in vivo* является важной задачей, связанной как с загрязнением окружающей среды, так и с нарушениями баланса металлов в живых организмах, которые встречаются все чаще [243,244]. Ратиометрическое измерение представляет собой ключевой метод для определения ионов металлов *in vivo*. Ратиометрические электрохимические датчики регистрируют два электрических сигнала из области измерения, а количественное определение основано на соотношении этих сигналов, что значительно повышает точность измерений [245].

За последние несколько лет было опубликовано несколько исследований, посвященных ратиометрическим датчикам для *in vivo* измерений [153][246][247].

В одном из первых исследований продемонстрированы изменения pH и проведено сравнение концентраций ионов меди у нормальных крыс и крыс с болезнью Альцгеймера (AD) [248]. Для изготовления электродов использовали стеклоуглерод (GC), функционализированный производными на основе N,N-бис(2-[2-(этилтио)этил]) (NS4s) для специфического распознавания Cu+. В качестве селективного модификатора датчика pH использовали 9,10-антрахинон, а в качестве внутреннего стандарта - 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты).

Концентрация ионов меди составила 2,35 ± 0,22 мкм в полосатом теле, 2,08 ± 0,20 мкм в гиппокампе и 1,75 ± 0,13 мкм в коре головного мозга. Уровни Cu+ увеличились примерно в 1,8 раза в модели мыши с AD, что согласуется с данными другого исследования [249]. Однако в этом исследовании не рассматривалась возможность измерений в реальном времени или многоразового использования датчиков.

Дальнейшее развитие сенсоров для определения ионов меди *in vivo* представлено в исследовании, где был разработан ратиометрический датчик для определения Cu2+ в реальном времени с возможностью повторного использования электродов [153]. Рабочий электрод был функционализирован разветвленным полиэтиленимином для связывания Cu^{2+}, а вспомогательный электрод

модифицирован 6-(ферроценил)гексантиолом, который служил внутренним стандартом для процесса регенерации. Гу и соавт. (2019) измерили концентрацию собственного Cu^{2+} в мозге крысы до (~1,7 мкм) и после (~5 мкм) глобальной ишемии головного мозга.

Ионы других металлов также играют важную роль в нейродегенеративных заболеваниях. Zhang и соавторы представили электрохимический датчик на основе поверхности связи Au−C≡C для реального времени картирования и точного количественного определения Fe^{2+} в мозге живых мышей с болезнью Альцгеймера (AD) [250]. В основе датчика использовался углеродный микроэлектрод (CF), на который осаждали золото. Поверхность детекторного электрода была функционализирована молекулой 2,5-фурандикарбоновой кислоты (FDCA), специфически реагирующей с Fe2+. Функционализация золота проводилась тремя методами, и результаты показали, что поверхность Au-C≡C обладает наилучшей стабильностью и электрохимическими характеристиками.

Концентрация Fe^{2+}, измеренная в мозге контрольных мышей, составила 1,18 ± 0,13 мкм в гиппокампе, 1,09 ± 0,09 мкм в коре головного мозга и 1,30 ± 0,15 мкм в полосатом теле. У мышей с AD концентрация Fe^{2+} в этих отделах мозга была увеличена в среднем на 108,6 ± 4,8%. Авторы также исследовали связь между Fe^{2+} и кальциевыми каналами, что продемонстрировало стратегию разработки стабильных и чувствительных сенсоров на основе Au-C≡C и механизм поглощения Fe^{2+} нейронами.

Сенсор, представленный Чжао и соавторами, позволял одновременно определять глутамат и ионы кальция в мозге крысы [249]. Микроэлектрод двойного назначения включал Pt-микроэлектрод, использующий фермент глюкозооксидазу NP для измерения глутамата, и углеродный волоконный микроэлектрод (CFME), модифицированный Ca^{2+}-селективным коктейлем (ETH1001, ПВХ, o-NPOE, THF). Изменения концентраций глутамата и кальция определялись у крыс во время распространения депрессии (РД) (5,0–7,1 мкм для глутамата и 620-730 мкм для Ca^{2+}) и при ишемии (19,2–26,6 мкм для глутамата и 840-960 мкм для Ca^{2+}). Датчик продемонстрировал тесную связь между уровнями Ca^{2+} и глутамата в условиях РД

и ишемических процессов, подчеркивая важность разработанной сенсорной системы.

CFME, модифицированные частицами золота, подвергались электроосаждению и оборачивались микрополосками из оксида графена, где открытые частицы золота служили активными центрами для модификации молекул распознавания [251]. Оксид графена использовался в качестве покрытия, предотвращающего биологическое обрастание. Для специфического распознавания ионов Ca^{2+} в мозге применялись три вида органических молекул, состоящих из двух основных частей: групп распознавания для селективного определения Ca^{2+} и концевых групп для самостоятельной сборки на электродах. Проведенные тесты на биообрастание, обратимость и специфичность позволили разработать датчик с линейным диапазоном измерений от 10,0 мкм до 31,6 мм и пределом обнаружения (LOD) 5,91±0,33 мкм. Стабильный электрод может быть интегрирован в микрочип для одновременного мониторинга концентрации Ca^{2+} в различных областях мозга у одной и той же мыши.

Разработка и совершенствование электрохимических методов для количественного определения ионов металлов *in vivo* представляют важный шаг в понимании процессов в организме. Полученные с помощью этих датчиков данные позволяют глубже изучить прогрессирование рака, болезни Альцгеймера, Вильсона, Менкеса, а также процессы глобальной ишемии, часто сопутствующие нейродегенеративным заболеваниям. В будущем ожидается появление менее инвазивных электрохимических датчиков благодаря уменьшению размеров электродов с микрометров до нанометров и возможности одновременного обнаружения нескольких ионов в режиме реального времени.

Электрохимические сенсоры обладают множеством преимуществ:

1) они не требуют длительной подготовки образцов;

2) электрический сигнал при определенном потенциале обладает высокой избирательностью, что позволяет одновременно определять несколько веществ;

3) сенсоры могут использоваться для анализа в различных живых системах и биологических жидкостях, таких как пот, сыворотка, моча, и культуральная среда;

4) они позволяют проводить измерения внутри тканей *in vivo*.

Анализ тенденций в разработке электродов, основанных на результатах исследований последних четырех лет, свидетельствует несколько направлений. Во-первых, активно используются противообрастающие покрытия или модификаторы поверхности, которые повышают каталитическую активность и минимизируют загрязнение электродов. Во-вторых, разрабатываются мультимодальные подходы, объединяющие данные о различных физиологических процессах. В-третьих, наблюдается увеличение количества исследований на свободно передвигающихся или сознательных мышах и крысах, что способствует моделированию более естественных условий.

Несмотря на стремительное развитие, применение электрохимических методов для анализа нейромедиаторов сталкивается с рядом ограничений. Во-первых, необходимо учитывать электрическую активность анализируемого вещества и возможные изменения сигнала, вызванные загрязнением электрода. Во-вторых, из-за ограниченного пространственного разрешения и размеров электродов можно измерить лишь усредненные внеклеточные сигналы определенных типов клеток. Для преодоления этих ограничений используются подходящие материалы электродов, такие как кремний, керамика и полимерные подложки, а также модификации поверхности, повышающие чувствительность и улучшающие перенос электронов.

Дрейф сигнала является распространенной проблемой при непрерывном получении данных. Решением может стать разработка технологий онлайн или локальной калибровки, обеспечивающих надежность мониторинга. Точные измерения достигаются за счет модификации поверхности микроэлектродов высокоселективными лигандами, что повышает избирательность и точность анализа. Существенные усилия направлены на улучшение стратегий модификации и стабильности электродов для длительного использования. Метод беспотенциального детектирования также позволяет сочетать электрофизиологическую регистрацию с электрохимическими измерениями, что делает его перспективным для анализа нейромедиаторов в будущем.

Обнаружение различных анализируемых веществ в организме представляет собой сложную задачу, так как необходимо определять их в низких концентрациях.

Основные направления для улучшения сенсоров включают повышение селективности, чувствительности и точности. Для достижения высокой селективности разработаны чувствительные элементы, такие как аптамеры, ферменты и ионоизбирательные мембраны, которые позволяют точно идентифицировать биоаналиты. Одновременно, модификация сенсоров с использованием наноматериалов (например, металлические наночастицы, углеродные нанотрубки, графен) способствует повышению их чувствительности.

Долгосрочный мониторинг становится возможным благодаря созданию имплантируемых и беспроводных датчиков. Такие сенсоры должны быть устойчивыми к изменениям температуры и внешней среды, не вызывать воспалительных реакций и не доставлять животным дискомфорт, который может повлиять на результаты измерений.

Современные материалы вносят значительный вклад в развитие электрохимических микросенсоров для *in vivo* измерений. Благодаря новым разработкам улучшается перенос электронов, увеличивается гидрофильность и изменяется структура пористости поверхности, что значительно повышает чувствительность, селективность и устойчивость к загрязнению.

Очевидно, что дальнейшее развитие новых материалов и методов функционализации позволит эффективно обнаруживать большее количество биоаналитов *in vivo* с высокой точностью. Появление мягких и разлагаемых материалов откроет новые возможности для долгосрочного мониторинга биомолекул. Такие усовершенствованные микросенсоры помогут глубже понять физиологические и патологические процессы в организме.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Изготовление дисковых углеродных электродов на основе нанокапилляров

Данный раздел диссртации посвящен изготовлению дисковых углеродных электродов на основе нанокапилляров. Основное внимание было сосредоточено на выборе оптимальной программы для изготовления кварцевых нанокапилляров с требуемыми геометрическими параметрами. Важными характеристиками являются радиус отверстия на остром конце нанокапилляра (r) и длина сужающегося конуса (L) (рисунок 2.1.1).

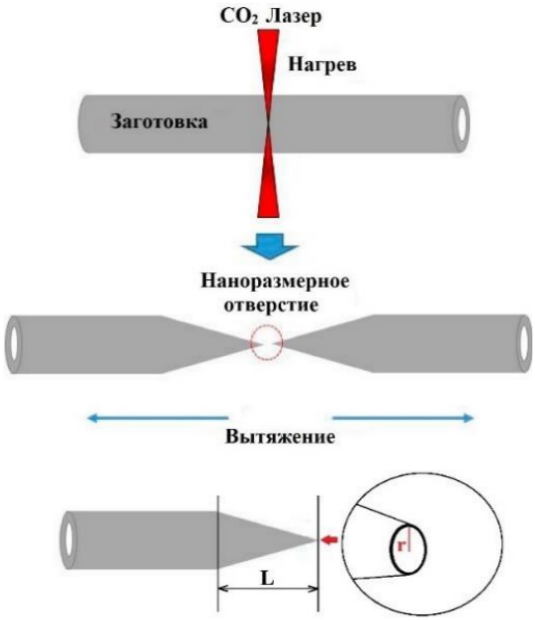


Рисунок 2.1.1 – Схема процесса вытягивания нанокапилляров и основные геометрические параметры образца

Выделено пять ключевых параметров, оказывающих влияние на процесс вытягивания: 1) «Нагрев» - параметр, который регулирует мощность лазера, а значит, и количество энергии, подаваемое для нагрева заготовки; более высокие значения соответствуют большей мощности. 2) «Область» - параметр, который управляет шириной нагреваемой зоны. 3) «Вязкость» - параметр, определяющий консистенцию нагретого стекла; при этом более высокие значения указывают на меньшую вязкость. 4) «Задержка» - параметр, который устанавливает временной промежуток между первым и вторым этапами. 5) «Вытягивание» - параметр, который контролирует силу, применяемую для вытягивания концов заготовки;

более высокие значения указывают на большую силу. Во всех экспериментах, описанных в данной работе, эти параметры были внимательно отрегулированы в соответствии с необходимыми требованиями. Программа была откалибрована для получения нанокапилляров с радиусом отверстия от 50 до 150 нм. Основной регулировке подвергался параметр «нагрев» с шагом в 10 условных единиц.

Радиус нанокапилляра можно определить, измеряя ионный ток, проходящий через его отверстие, фиксируя предельный диффузионный ток в углеродном нанокапилляре или с помощью растровой электронной микроскопии. Для вычисления радиуса отверстия нанокапилляра на основе измерения ионного тока применяется следующая формула (1):

$$r = \frac{1}{\sigma * Ri * \tan(\alpha)}, \quad (2.1.1)$$

где σ – проводимость раствора электролита;

R_i – сопротивление цепи;

α – половинный угол конуса пипетки (α = 3°).

Процесс заполнения нанокапилляров пиролитическим углеродом схематично показан на рисунке 2.1.2.

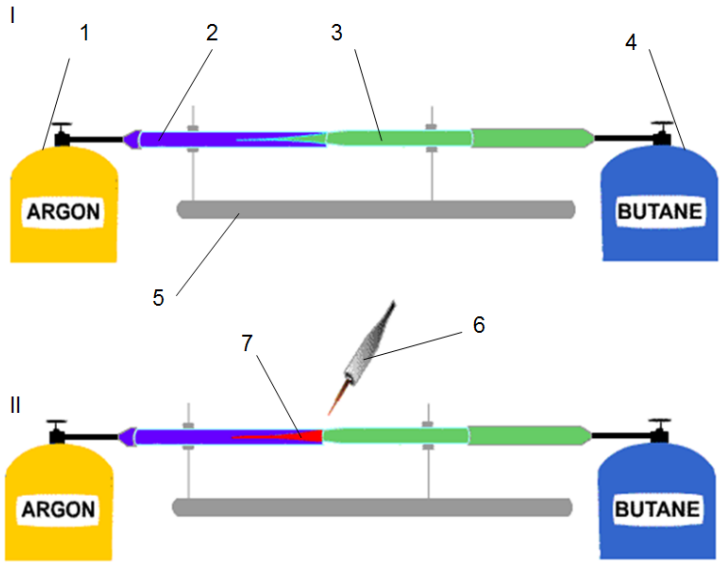


Рисунок 2.1.2 - Система для изготовления углеродных наноэлектродов. I - нанокапилляр, заполненный пропанобутановой смесью под давлением и коаксиально соединённый с трубкой, по которой подается поток аргона; II - нагрев, в результате которого происходит разложение пропанобутановой смеси до углерода, заполняющего нанокапилляр.
1 - баллон с аргоном; 2 - трубка, которая обеспечивает равномерную подачу аргона к нанокапилляру; 3 - нанокапилляр; 4 - баллон с пропанобутановой смесью; 5 - штатив 6 - газовая горелка.

Следует отметить, что для изготовления наноэлектродов необходимо применять кварцевое стекло с высокой температурой плавления. Для характреизации состава электродов применялось КР (рисунок 2.1.3).

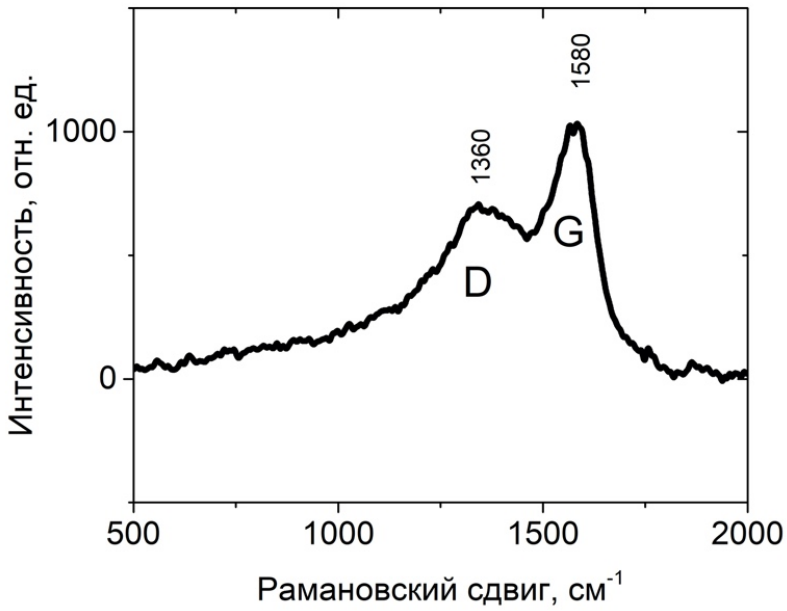


Рисунок 2.1.3 - Спектр КР пиролитического углерода, осажденного внутрь нанокапилляров

В спектре КР наблюдались отчетливые полосы D (1360 $см^{-1}$) и G (1580 $см^{-1}$). Относительно высокое соотношение интенсивностей этих полос указывает на то, что полученный углеродный материал обладает неупорядоченной структурой (рисунок 2.1.3) [252].

Все наноэлектроды после заполнения углеродом были охарактеризованы с использованием электрохимического метода в 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе (ПБС) и в 1 мМ растворе ферроценметанола (FcCH2OH), который служил медиатором для электронного транспорта. В ходе этих экспериментов Fc позволяет исследовать характеристики электрода и оценивать площадь его электрохимически активной поверхности. Благодаря быстрой передаче электронов через медиатор, окислительно-восстановительная реакция ограничивается исключительно диффузией к кончику электрода. В случае плоского дискового электрода медиатор свободно диффундирует к активной области электрода в объемном растворе. Для наноэлектродов характерно достижения предельного диффузионного тока.

Циклическая вольтамперограмма, которая измерена в 1 ммоль/л растворе ферроцена (Fc) в диапазоне от -800 до +800 мВ относительно Ag/AgCl (при

скорости развертки 400 мВ/с), позволяет точно оценить размер наноэлектрода. Радиус электрода рассчитывается из величины предельного диффузионного тока $r = \frac{I_{ss}}{4.64nFC_0D}$.

На рисунке 2.1.4 представлены экспериментальные данные измеренных предельных диффузионных токов и расчетные радиусы электродов (рисунок 2.1.4).

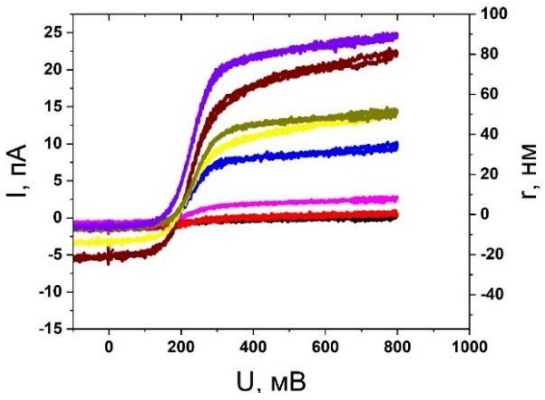


Рисунок 2.1.4 – Экспериментальные данные, измеренных предельных диффузионных токов и расчетные радиусы электродов.

Для экспериментальной оценки размеров дисковых углеродных электродов была выполнена их характеризация с применением СЭМ (рисунок 2.1.5).

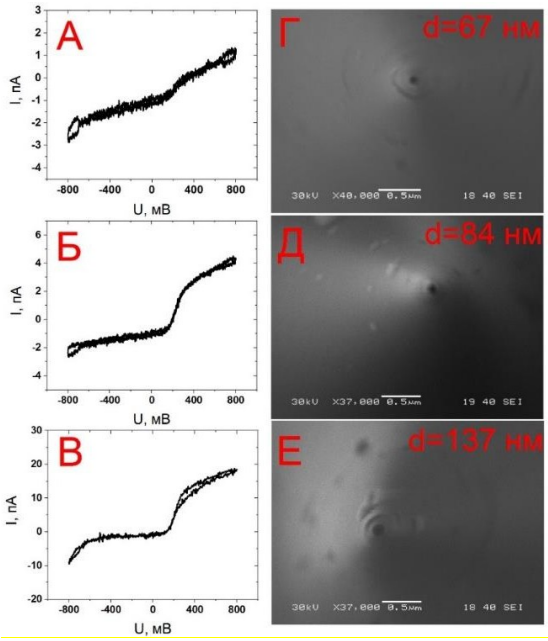


Рисунок 2.1.5 –Циклические вольтамперограммы, полученные в 1 мМ растворе Fc (А, Б, В), а также соответствующие им РЭМ-изображения наноэлектродов (Г, Д, Е)

Экспериментально определенные размеры с помощью СЭМ хорошо коррелируют с теретическими размерами.

2.2 Изготовление нанокапиллярного сенсора для детекции медьсодержащих препаратов

Схематический процесс изготовления показан на рисунке 2.2.1. Кварцевые заготовки для вытягивания нанокапилляров очищались от возможных органических загрязнений в свежеприготовленном растворе «пираньи» (смесь 98% H_2SO_4 и 30% H_2O_2 в соотношении 3:1 по объему). После очистки заготовки тщательно промывали дистиллированной водой и сушили при температуре 60 °C в сушильном шкафу в течение 2 часов. Процесс вытягивания нанокапилляров проводился на лазерном пуллере (модель P-2000, Sutter Instruments Co., США) по программе с параметрами: «нагрев» = 625, «филамент» = 3, «скорость» = 25, «задержка» = 145, «вытягивание» = 210.

Далее на следующем этапе нанокапилляр модифицировался пиролитическим углеродом. Пропан-бутановая смесь подавалась под давлением около 20 кПа через широкий конец капилляра, в то время как его узкий конец находился внутри невытянутой кварцевой заготовки с подачей ламинарного потока аргона (0,2 л/мин). Процесс пиролиза осуществлялся при температуре пламени газовой горелки 900–1400 °C, нагревая кончик нанокапилляра в течение 15 секунд.

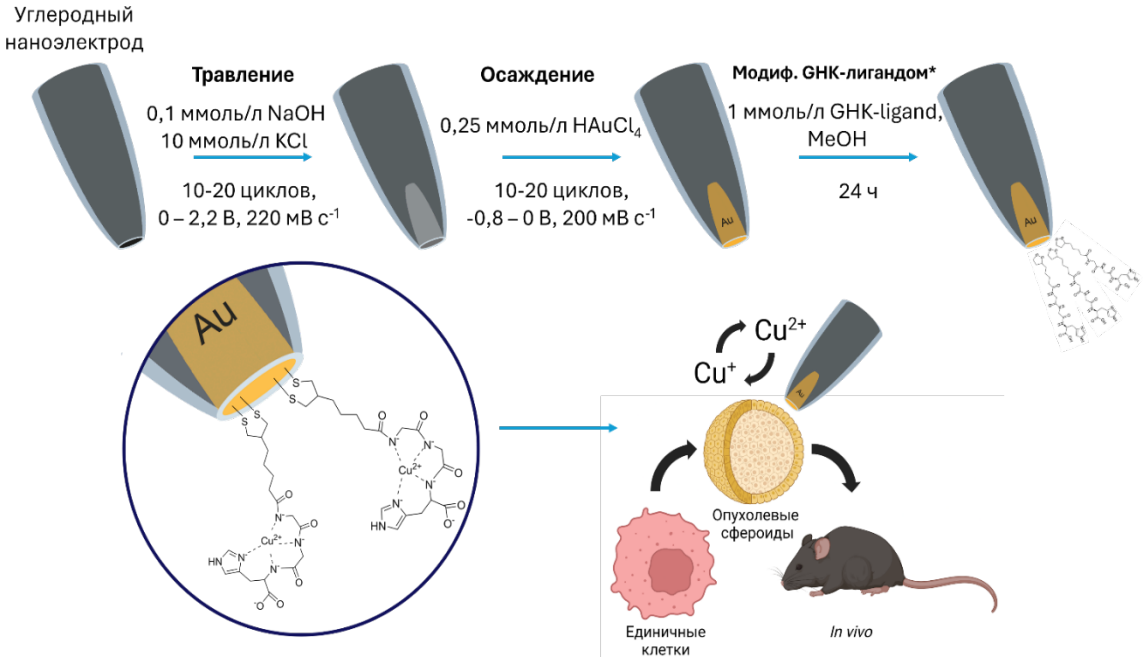


Рисунок 2.2.1 – Процесс создания нанокапиллярного сенсора и предполагаемый механизм обнаружения ионов Cu^{2+} *in vitro*/*in vivo*. *GHK-лиганд представляет собой конъюгат трипептида Gly-His-Lys (GHK) и липоевой кислоты [253]

Вкратце, процесс модификации углеродного электрода включает электрохимическое травление углеродной поверхности для создания полостей, с последующим осаждением золота. Электрохимическое травление углеродных наноэлектродов проводилось в растворе 0,1 моль/л KOH и 10 ммоль/л KCl (10–20 циклов, диапазон потенциалов от 0 до 2,2 В, скорость сканирования 220 мВ/с относительно Ag/AgCl (3 моль/л KCl)) для формирования полостей. Затем в полости осаждали золото из раствора 0,25 ммоль/л $HAuCl_4$ в течение 10–20 циклов (от -0,8 до 0 В, 200 мВ/с относительно Ag/AgCl (3 моль/л KCl)).

Модификация GHK-лигандом проводилась погружением кончика углеродного наноэлектрода, модифицированного золотом, на 16 часов в 1 мМ раствор GHK-лиганда в метаноле. После завершения модификации сенсор промывали чистым метанолом для удаления непрореагировавших молекул GHK-лиганда, адсорбированных на поверхности.

Калибровку сенсора проводили в растворе HBSS, регистрируя циклические вольтамперограммы (от 0 до +650 мВ относительно Ag/AgCl (3 моль/л KCl), скорость сканирования 13 В/с). Контрольные измерения проводились в условиях отсутствия ионов Cu^{2+}. Затем, поочередно добавляя аликвоты раствора с ионами Cu^{2+}, повышали их концентрацию в пределах от 10^{-8} до 10^{-5} моль/л. После достижения максимальной концентрации (10^{-5} моль/л) раствор заменялся на контрольный HBSS (без Cu^{2+}) для проверки корректности работы сенсора. Данные обрабатывали в программе Origin 2021 (OriginLab, Массачусетс, США), где строилась градуировочная зависимость высоты пика окисления Cu^{+} от концентрации Cu^{2+}.

2.3 Материалы и химические реактивы

Все использованные химические реагенты имели категорию чистоты «ч.д.а.», а водные растворы готовились на сверхчистой воде с удельным сопротивлением не менее 18 МОм·см. Тригидрат хлорида золота(III), хлорид меди(II), NaOH, ферроценметанол (FcMeOH), метиленхлорид, хлороформ, ацетонитрил, метанол, ацетат Gly-His-Lys, NHS-эфир липоевой кислоты и пиридин были приобретены у компаний Sigma-Aldrich (США), Merck (Германия),

BroadPharm (США), ChimMed (Россия) и других. 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбокси(полиэтиленгликоль)-2000]карбоновая кислота (DSPE-PEG(2000)-COO) и холестерин (Chol) были получены от Avanti Polar Lipids (США). Колонки для гель-фильтрации NAP-10 Sephadex G-25 закупались у компании GE HealthCare (США). Для экструзии использовались поликарбонатные мембраны с размером пор 200 и 400 нм производства Whatman (Великобритания). Диализ липосом проводился с использованием диализных мешков с отсечкой 100 кДа. Среды, сыворотки и антибиотики приобретались у ThermoFisher Scientific (США). Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) и агарозу получали от компании «ПанЭко» (Россия). Фосфатно-солевой буфер (PBS, 10 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl и 137 мМ NaCl, pH 7,4) готовился путем растворения таблеток («Sigma-Aldrich», США) в 200 мл деионизированной воды Milli-Q (Millipore Corporation, США). Золетил закупался у компании «Virbac» (Франция), ксилазин — у компании «БиоВета» (Россия). Заготовки из кварцевого стекла QF120-60-7.5 для вытягивания нанокапилляров приобретались у Sutter Instruments Co. (США). Тетрагидрат хлорида железа(II), хлорид железа(III), Pluronic F127, раствор гидроксида аммония (28,0–30,0%), соляная кислота (36%), стандарт железа для ПМС (TraceCERT, 1000 мг/л железа в азотной кислоте) приобретались у компании Sigma-Aldrich. Вся вода для экспериментов была деионизирована (18,2 МОм·см−1, система Millipore Milli-Q Academic). Все емкости очищались горячим раствором царской водки и промывались деионизированной водой перед синтезом.

2.4 Использованное оборудование

Оборудование, необходимое для выполнения электрохимических измерений: персональный компьютер, преобразователя АЦП-ЦАП Axon Digidata 1550B (Axon Instruments, США), патч-кламп усилителя MultiClamp 700B (Axon Instruments, США), микроманипулятора PatchStar (Scientifica, Великобритания), моторизованный инвертированный флуоресцентный микроскоп A16.1098 (Opto-edu, Китай). В качестве электрода сравнения был использован Ag/AgCl (3 моль/л KCl) электрод. Все измерения проводились при комнатной температуре. Разность

потенциалов между сенсором и электродом сравнения регистрировали с помощью программного пакета pClamp 11 (Molecular Devices, США) и обрабатывали с помощью программного обеспечения OriginPro 2021 (OriginLab, Массачусетс, США).

При проведении внутриопухолевых *in vivo* измерений моторизованный инвертированный флуоресцентный микроскоп изымался и вместо него фиксировался пенопластовый предметный столик с закрепленным объектом измерения. При проведении внутримозговых измерений моторизованный инвертированный флуоресцентный микроскоп был заменен на стереотаксис 71000-M Automated Stereotaxic Instrument (RWD, Китай)

Для определения физических размеров наноэлектродов/сенсоров, а также их элементного состава был использован сканирующий электронный микроскоп JSM-6610LV (JEOL, Япония), оборудованный энергодисперсионным анализатором (EDX). При фотографировании образцов использовались следующие параметры: ускоряющее напряжение 30 кВ, фокусное расстояние 9 мм и увеличение от ×220 до ×37000. Съемка проводилась в режиме вторичных электронов для топографического контраста, а также в режиме обратно отраженных электронов (для композиционного контраста). Регистрация рентгеновских лучей осуществлялась с области, охватывающей кончик нанопипетки. Образцы фиксировались на двустороннем проводящем углеродном скотче вертикально на внутренней боковой поверхности большого держателя размером 32 × 10 мм. Для предотвращения накопления избыточного отрицательного заряда в каждый образец вставлялась медная проволока, один конец которой контактировал с углеродом, а другой закреплялся на поверхности держателя образца с помощью проводящего скотча.

2.5 Подготовка клеточных культур к эксперименту

Клеточную линию аденокарциномы предстательной железы человека LNCaP (ATCC CRL-1740) выращивали в среде RPMI-1640 (Gibco), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma), 2 мМ L-глутамина (Gibco), антибиотиками (0,1 ед/мл пенициллина и 0,1 мкг/мл стрептомицина) (Gibco) и витаминным

раствором RPMI (Sigma). Клетки эмбриональной почки человека HEK293 (ATCC CRL-11268G-1) культивировались в среде DMEM (Gibco) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и тех же антибиотиков. Для клеток поддерживали температуру 37°C в увлажненном инкубаторе с концентрацией CO_2 5%.

Клеточные линии 22 RV1, PC-3, MCF-7, HepG2 и B16 (ATCC, США) выращивали в культуральной среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 50 ед/мл пенициллина, 0,05 мг/мл стрептомицина (Gibco, США) и 1× GlutaMAX (Gibco, США). Все клеточные культуры проверялись на отсутствие микоплазмы. Клетки культивировались при температуре 37°C в инкубаторе (Sanyo, Япония) с 5% CO_2.

Клетки нейробластомы SH-SY5Y (ATCC, США) культивировали согласно стандартному протоколу в модифицированной среде Дульбекко (DMEM/F-12, Gibco, США) с добавлением 1% L-глутамина и 15 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES, Fisher), а также 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и 1% пенициллина-стрептомицина (Research Product International, США). Для десорбции клеток от культуральной поверхности применяли TrypLE (0,25%, Fisher), а обновление среды проводили каждые 3-4 дня. Клетки SH-SY5Y (3×10^5) сеяли в чашки Петри (диаметр 35 мм) и на следующий день обрабатывали одним из амилоидных пептидов: Aβ42, FAM-Aβ42, pS8-Aβ42 или isoD7-Aβ42. Пептиды растворяли в ДМСО и разводили в культуральной среде без сыворотки, обеспечивая их конечную концентрацию в 10 мкМ, с инкубацией в течение 4 часов. Контрольные клетки обрабатывали ДМСО в той же концентрации, но без пептидов; контрольные измерения проводились в начале и в конце эксперимента. Перед визуализацией клетки трижды промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса для удаления остатков культуральной среды и FAM-меченого Aβ42. Для конфокальной визуализации мембран клеток использовали липидный краситель Vibrant DiD (Thermofisher, США) в концентрации 1 мкМ.

Нейтрофилы выделяли из венозной крови доноров с использованием метода градиентной центрифугирования и градиента фиколл-тразографа. Концентрация клеток составляла 1×10^6 кл/мл, при этом их жизнеспособность оценивали с

использованием пропидия йодида и она составляла 98–99%.

Формирование опухолевых сфероидов MCF-7 проводили с помощью метода наложения жидкости на агарозные пластины, как было описано в предыдущих исследованиях. Для этого 1,5% масс. агарозы в PBS (pH 7,4) разогревали на водяной бане 15 минут. Далее в стерильных условиях добавляли по 50 мкл расплавленной агарозы в каждую лунку 96-луночного плоскодонного планшета. После этого планшеты с агарозой охлаждались до комнатной температуры в течение 15 минут. В лунки, покрытые агарозой, высевались клетки (по 10 000 клеток на лунку) в 100 мкл культуральной среды на каждую лунку, инкубировали при температуре 37°C и 5% CO_2 на протяжении 72 часов для образования сфероидов.

Штаммы S. aureus и E. coli культивировали на агаре, после чего бактерии промывали PBS и доводили до оптической плотности, соответствующей концентрации 1×10^9 клеток/мл.

Для экспериментов использовались клетки Chara corallina длиной 4-6 см и диаметром около 0,9 мм. Минимум за сутки до начала экспериментов клетки помещали в раствор искусственной прудовой воды, содержащий 0,1 мМ KCl, 1,0 мМ NaCl и 0,1 мМ $CaCl_2$. С помощью $NaHCO_3$ значение pH раствора регулировали до уровня 7,0–7,2. Изолированную клетку горизонтально помещали в прозрачной камере из плексигласа или стекловолокна, которая установлена на столе инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 25-CFL (Carl Zeiss, Йена, Германия). В камеру добавляли 40 мл искусственной прудовой воды, а освещение клетки осуществлялось верхним источником света микроскопа через синий светофильтр SZS-22 (λ <580 нм).

2.6 Используемые лабораторные животные

Все животные, участвовавшие в электрохимических анализах, содержались в стандартных условиях вивария SPF (цикл свет/темнота 12 часов, температура 22 ± 1°C, влажность 50%). Питание и вода предоставлялись в свободном доступе. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с европейскими и российскими рекомендациями по проведению опытов на животных и были

одобрены локальной комиссией по этике ФГБНУ «Н.Н. Блохина» (протокол О4П29.09.2021).

Для экспериментов с привитыми опухолями использовались самки мышей BALB/c и C57Bl/6, EMT6. Опухоли вводили подкожно в область спины, и их рост контролировали до достижения площади 40 мм². После введения анестезии производили фиксацию животного, разрез и установку наноэлектрода для проведения измерений. Для изучения отделов мозга применяли трансгенные мышиные модели болезни Альцгеймера APP / PS1 и 5XFAT.

2.7 Статистический анализ

Все данные *in vitro* и *in vivo* были получены в трех независимых биологических повторностях. Для статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). На всех графиках представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего (SEM). Тесты проводились с допущением нормальности распределения, а уровень статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

2.8 Вспомогательные методы исследования

2.8.1 Анализ MTS

Клетки высевали в концентрации 10 000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты. Через сутки добавляли растворы стабилизированных и непокрытых MNP Pluronic F127 в дистиллированной воде (конечные концентрации магнетита указаны на гистограмме рис. 7). В качестве контролей использовали дистиллированную воду (20%) и ДМСО (25%). Клетки инкубировали с MNP в течение 3 и 24 часов, после чего промывали PBS и добавляли реагент MTS. Через 4 часа инкубации измеряли поглощение при 490 нм на спектрометре Thermo Scientific Multiskan GO.

2.8.2 Определение АФК с H2DCFDA

Клетки высевали на покровные стекла (100 000 клеток/мл) в 24-луночные чашки и инкубировали при 37°C в условиях 5%-ного CO_2. Через сутки добавляли

образцы и оставляли на 3 или 24 часа. Для окрашивания использовали раствор H2DCFDA (2 мкм) в течение 30 минут. Клетки промывали HBSS и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS (Life Technologies). Расчет интенсивности флуоресценции (40–60 клеток для каждой концентрации) и обработка изображений проводились с использованием ImageJ.

2.8.3 Определение АФК с использованием CellROX Red

АФК в цитоплазме оценивались с использованием зонда CellROX Deep Red. Клетки PC-3 инкубировались с 2,5 мкМ CellROX Deep Red в течение 30 минут, затем промывались PBS и окрашивались красителем Hoechst 33258 для окрашивания ядер. Полученные флуоресцентные изображения анализировались с использованием программы ImageJ.

2.8.4 Выявление апоптоза/некроза

Клетки высевали в 96-луночные планшеты (10 000 клеток/лунка). Через сутки добавляли растворы Magn-Plu и Magn NPs в концентрациях 8,56 мкг/мл и 16 мкг/мл на 3 или 24 часа. Клетки окрашивали с помощью набора для определения апоптоза/некроза (abcam), промывали HBSS и анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS. Подсчитывали клетки (не менее 1000) и выражали процентное содержание инфицированных клеток относительно контрольных образцов (контрольная группа принималась за 0%).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главе приведены основные результаты исследования, объединенные в 5 разделов. В данной главе описывается разработка и применение методов локального исследования биофизических процессов на единичных клетках и биологических моделях *in vivo* с помощью нанокапиллярных сенсоров для выявления физико-химических параметров, которые можно использовать для объективной диагностики функционального состояния клеток и тканей организма, формирования принципиально новых подходов для определения эффективности инновационных препаратов.

3.1 Разработка системы для локального исследования биофизических процессов у единичных клеток на основе нанокапиллярных дисковых электродов (математическая оценка возможностей системы)

Для проведения измерений на единичных клетках была разработана уникальная научная установка. Схематическое изображение установки представлено на рисунке 3.1.1. Ключевым измерительным элементом системы является нанокапиллярный сенсор. В качестве сенсоров будут рассмотрены дисковые наноэлектроды и нанокапилляры, заполненные смесью полимера с белком, работающие на основе явления выпрямления тока. Применение таких типов сенсоров будет продемонстрировано в разделе 3.2 для локального измерения pH. Данные наносенсоры могут быть использованы как в разработанной установке, представленной на рисунке 3.1.1, так и в составе СИПМ. Подробная схема использования с СИПМ будет описана в разделе 3.2.

Наноэлектроды представляют собой кварцевые нанокапилляры, заполненные углеродом, острие которых может быть модифицировано платиной или золотом. Известно, что платиновые макро- и микроэлектроды могут быть использованы для элетрохимической детекции молекулярного кислорода и АФК. Также платиновые и золотые электроды могут быть использованы для электрохимической детекции ионов металлов. Методы изготовления таких электродов и их применение для исслдеования живых систем будут подробно представлены в разделах 3.3-3.5. В данном разделе будет дана математическая

оценка аналитических характеристик таких электродов в составе разработанной уникальной установки.

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

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

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

В) Patch-clamp усилитель Axon MultiClamp 700B (Molecular Devices, США) - многофункциональный усилитель, созданный изначально для локальной фиксации потенциала для клеток, который может работать как в режиме постоянного тока, так и потенциала. Он поддерживает до двух выносных голов для предусиления тока, которые имеют несколько вариаций обратной связи, что позволяет измерять ток в широком пределе от микро до долей пикоампер. Усилитель имеет ряд встроенных фильтров для подавления шумов, особенно высокочастотных. Одним из важных преимуществ данного усилителя является автоматическая компенсация паразитных RC цепочек, в том числе от наноэлектрода, которые могут лимитировать скорость проведения измерений, ограниченную временем релаксации и побочными емкостными токами.

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

Д) Оптический микроскоп необходим для контролируемой навигации наноэлектрода. На схеме установки на рисунке 3.1.1 представлен инвертированный оптический микроскоп, но также возможно использовать и прямой оптический микроскоп, в зависимости от текущих экспериментальных задач. Можно применять оптические микроскопы различных марок. Нами в экспериментах использовались такие микроскопы как Nikon Ti-U, Olympus IX 73, Микромед. В некоторых экспериментах целесообразно использовать флуоресцентный микроскоп, например, в разделе 3.5 будут выбираться для анализа клетки содержащие амилоидные красители.

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

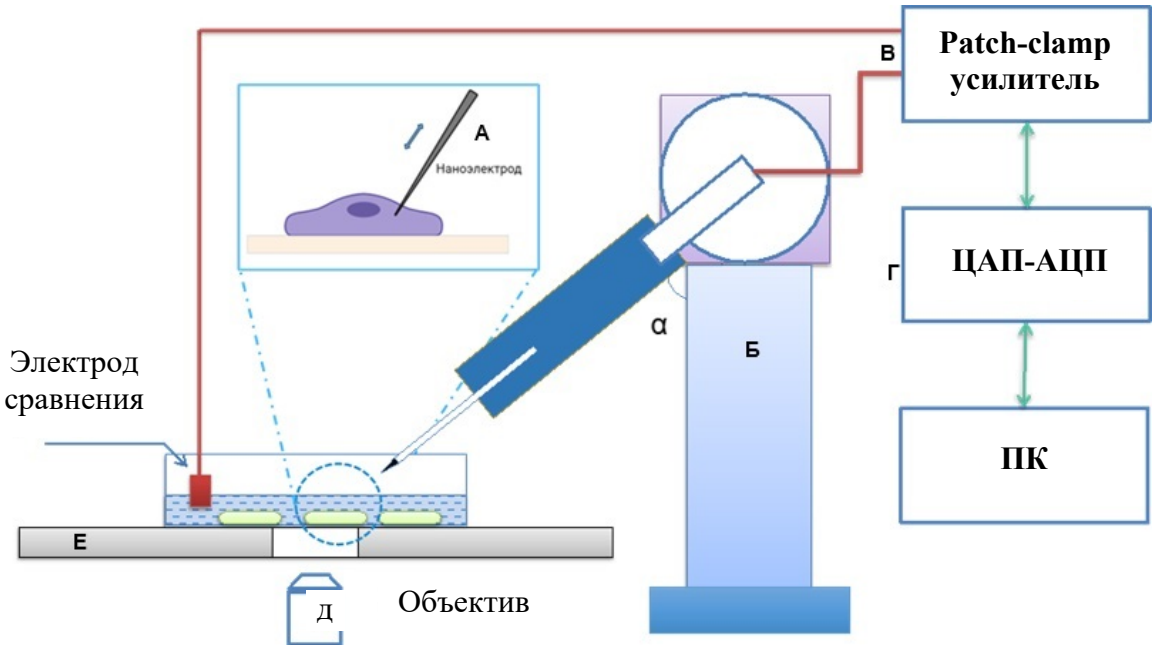


Рисунок 3.1.1 - Система для локального исследования биофизических процессов единичных клеток на основе нанокапиллярных дисковых электродов

У поверхности любого электрода, помещенного в раствор электролита, возникает специфическая межфазная область - двойной электрический слой (ДЭС). Фактически он представляет две заряженные обкладки - конденсатор. На рисунке 3.1.2 представлена эквивалентная схема рабочего электрода с ДЭС при измерениях, в которой конденсатор C_d соответствует дифференциальной емкости двойного электрического слоя. Таким образом, в электрической цепи будет протекать емкостный ток, не связанный с восстановлением или окислением вещества, так как первоначально должен зарядиться конденсатор двойного слоя для достижения необходимого потенциала рабочего электрода.

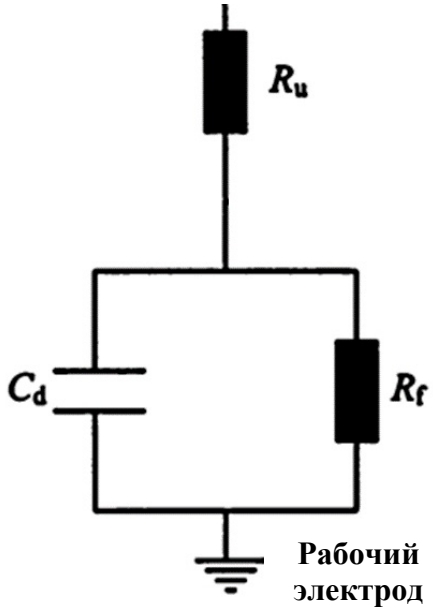


Рисунок 3.1.2 – Эквивалентная схема электрохимической ячейки: C_d - дифференциальная емкость ДЭС; R_f - сопротивление фарадеевскому току у поверхности электрода [165]

Ступенчатый скачок потенциала создает экспоненциально убывающий емкостной ток со временем релаксации $\tau = R_f C_d$ (рисунок 3.1.3) [254].

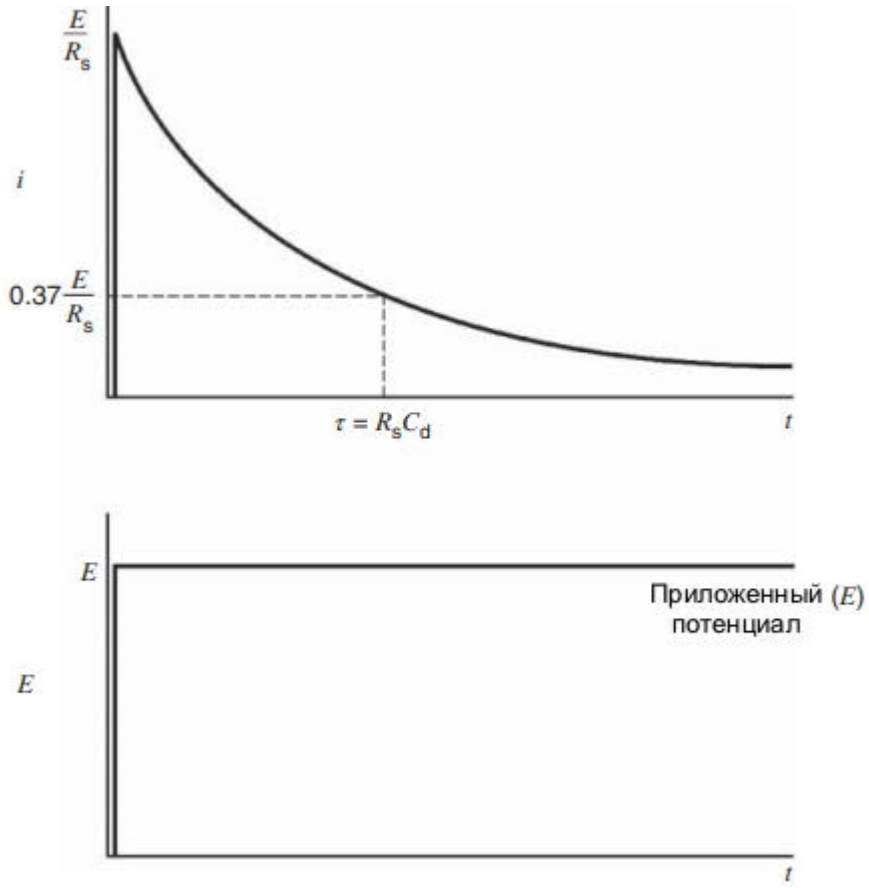


Рисунок 3.1.3 - Переходный процесс зависимости тока от напряжения при ступенчатом скачке напряжения

Ток падает до 37% от своего первоначального значения при t = τ и до 5% от своего первоначального значения при t = 3τ. Например, если R_s = 1 Ом и C_d = 20 мкФ, то τ = 20 мкс, а перезарядка ДЭС на 95% происходит за 60 мкс.

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

Емкость для такого электрода определяется следующей формулой:

$$C_d = \pi r^2 C_d^0, \quad (3.1.1)$$

где C_d - дифференциальная емкость двойного электрического слоя;

r – радиус электрода;

C_d^0 - межфазная емкость на единицу площади.

Рассмотрим рабочий электрод в форме диска, у которого межфазная емкость на единицу площади, C_d^0, находится в типичном диапазоне 10-50 мкФ/см^2. Тогда C_d при радиусе r , равном 1 мм, C_d составляет 0,3-1,5 мкФ, но при r = 1 мкм C_d на 6

порядков меньше, всего 0,3-1,5 пФ. Нескомпенсированное сопротивление также зависит от размера электрода и определяется формулой:

$$R_f = \frac{1}{4\pi\kappa r}, \quad (3.1.2)$$

где R_f – сопротивление фарадеевскому току у поверхности электрода;

κ - проводимость электролита;

r – радиус электрода.

Время релаксации будет определяться следующим образом:

$$C_d R_f = \frac{r C_d^0}{4\kappa}, \quad (3.1.3)$$

κ - проводимость электролита [255].

Несмотря на то, что R_f увеличивается обратно пропорционально уменьшению r, C_d увеличивается пропорционально квадрату радиуса, следовательно, время релаксации увеличивается прямо пропорцианально r. Это важный результат, указывающий на то, что электроды меньшего размера могут обеспечить доступ к более коротким временным интервалам. При r = 1 мм время релаксации составляет около 30 мкс, а время проведения эксперимента, включая время регистрации данных, будет составлять порядка 1 мс. Этот вывод согласуется с общим мнением о том, что эксперименты с электродами обычного (миллиметрового) размера должны проводиться в миллисекундной временной области или дольше [254].

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

На рисунке 3.1.4 для сравнения приведены характерные особенности протекания процессов в условиях стационарного состояния, при скачке потенциала и в условиях циклической вольтамперометрии.

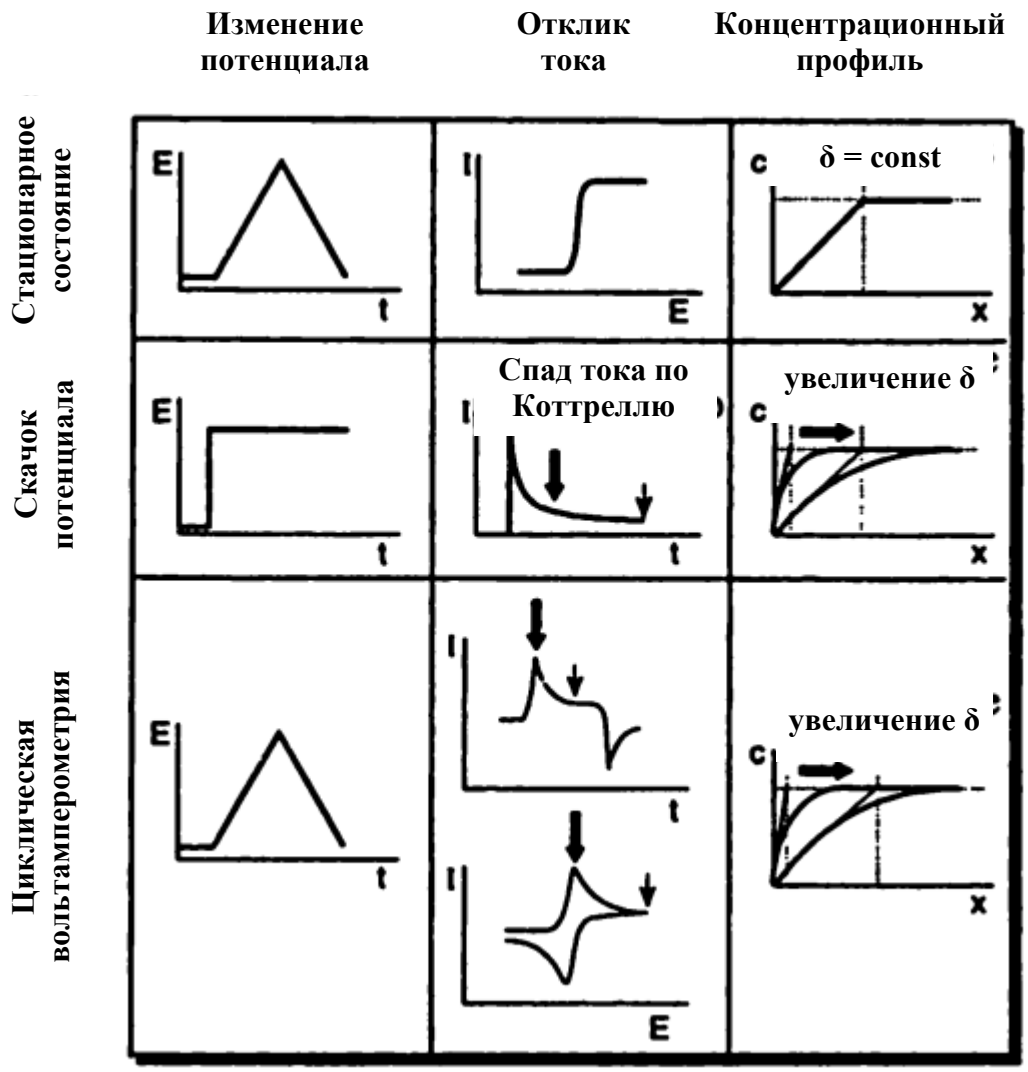


Рисунок 3.1.4 - Зависимости изменения потенциала, отклика тока и концентрационные профили в условиях стационарного состояния, хроноамперометрии и ЦВ [165]

В стационарных условиях ВАХ имеет S-образную форму. Для стационарного процесса толщина диффузионного слоя δ не зависит от времени и остается постоянной. При хроноамперометрических измерениях граница диффузионного слоя непрерывно смещается в фазу раствора после скачка потенциала. При ЦВ в начальный момент диффузионный слой также смещается в фазу раствора, а затем его увеличение происходит при изменении концентрационного градиента. Таким образом, δ при пиковом знечении тока для обратимого процесса равна приблизительно:

$$\delta_{пик} = \text{const}\sqrt{RTD/nFv}, \qquad (3.1.4)$$

где const = $0{,}446^{-1}$,

R = 8,314 Дж*К$^{-1}$ • моль$^{-1}$ (газовая постоянная);

T -температура (К);

D - коэффициент диффузии (м^2/с);

n - число переносимых электронов, приходящихся на одну молекулу;

F =96485 Кл/моль;

v - скорость сканирования потенциала (В/с).

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

$$t_{ss} = 81\frac{d^2}{D}, \qquad (3.1.5)$$

где d - диаметр дискового электрода [256].

Таким образом, для дисковых платиновых и золотых электродов на основе кварцевых накокапилляров с размером 100 нм время выхода на стационарное состояние, т.е. достижение предельного диффузионного тока, составляет не более 1 мс. В свою очередь, выход на стационарное состояние для макроэлектродов размером больше 100 мкм, которые больше распространены в текущих аналитических электрохимических методах, может достигать нескольких минут и более.

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

Ранее было получено соотношение [254], которое устанавливает переход от стационарного состояния к циклической вольтамперометрии:

$$v \ll \frac{RTD}{NFr^2}, \qquad (3.1.6)$$

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

В случае использования режима циклической вольтамперометрии с зависимостью от скорости развертки потенциала не используются законы для предельного диффузионного тока. Теоретическое выражение для тока пика обратимой ЦВ описывается в виде функции скорости сканирования потенциала и называется уравнением Рэндлса-Шевчика [165]. Согласно этому уравнению, зависимость величины пикового тока I_p от скорости развертки потенциала пропорциональна $v^{\frac{1}{2}}$, что указывает на процесс, контролируемый диффузией:

$$\mathrm{Ip} = 0{,}4463 * \mathrm{nFAc}\sqrt{\frac{nFvD}{RT}}, \qquad (3.1.7)$$

где A - площадь поверхности электрода;

c - объемная концентрация аналита.

Диагностические критерии и характеристики ЦВ для обратимого переноса электрона, формулируютмся как $E_{обр}$: $I_{p.a} / I_{p.c} = 1$, ΔEp при 298 К не зависят от скорости сканирования v, I_p пропорционален $v^{\frac{1}{2}}$.

Известно, то в системе ток состоит из двух компонент: I_f - фарадеевского и Ic - емкостного тока [254][257]. Причем $I_f \sim Cv^{\frac{1}{2}}$, а $Ic \sim Cv$, что означает, что емкостной ток растет быстрее со скоростью развертки потенциала при циклической вольтамперометрии. Для достоверного определения пикового тока и

соответствующей концентрации аналита необходимо вычитать базовую линию, обусловленную емкостным током при высоких скоростях. Так как емкостной ток зависит от нескомпенсированной емкости системы, которая пропорциональна квадрату радиуса электрода, то в случае использования наноразмерных электродов вклад от емкостного тока будет в миллиард раз меньше по сравнению с микро- и макроэлеткродами, что значительно упрощает измерения при больших скоростях и расширяет аналитические возможности системы.

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

3.2. 3D-pH-картирование с нанометровым пространственным разрешением

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

3.2.1 3D pH картирование поверхности клеток и коррелятивные измерения с топографией клеток с помощью разработанного pH-чувствительного сенсора на основе нанокапилляра

Измерение ионного тока через нанокапилляр можно использовать для создания чувствительных сенсоров. Сопротивление нанокапилляра (рисунок 3.2.1.1) можно описать с помощью следующего уравнения [258] описывается формулой:

$$R = \frac{\rho l}{\pi r_s^2} + \frac{\rho \cot(\theta/2)}{\pi}\left(\frac{1}{r_t} - \frac{1}{r_s}\right), \qquad (3.2.1.1)$$

где ρ - удельное сопротивление;

l - длина цилиндрической части капилляра;

r_s - радиус цилиндрической части капилляра;

r_t - радиус отверстия острия;

Θ - угол конуса.

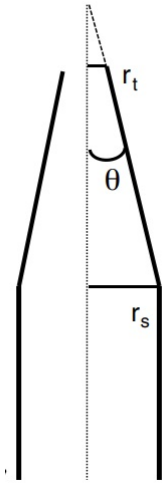


Рисунок 3.2.1.1 - Схематическое изображение капилляра.

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

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

$$R \cong \frac{\rho \cot(\theta/2)}{\pi r_t} \qquad (3.2.1.2)$$

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

Электрохимические свойства нанокапилляров значительно отличаются от характеристик традиционных микрокапилляров. Например, стеклянные нанокапилляры при подаче симметричного напряжения демонстрируют асимметричный выходной ток - эффект выпрямления тока [259]. Это явление объясняется образованием двойного электрического диффузного слоя (ДЭС) на внутренней поверхности капилляра. Когда толщина этого слоя становится

сравнимой с диаметром нанокапилляра, электростатическое взаимодействие между ионными поверхностными зарядами начинает влиять на свойства ионного тока. На рисунке 3.2.1.2 показано выпрямление тока для нанокапилляров с разными поверхностными зарядами. Было установлено, что на выпрямление тока влияют концентрация электролита, уровень pH и приложенное напряжение [260].

Выпрямление тока можно регулировать с помощью функциональных слоев, физически адсорбированных или ковалентно связанных с внутренней поверхностью нанокапилляров. Например, поли-L-лизин, содержащий положительно заряженные аминогруппы, может адсорбироваться на отрицательно заряженной поверхности нанокапилляров за счет силильных групп. После протонирования аминогруппы вызывают инверсию эффекта выпрямления тока (рисунок 3.2.1.2). Похожие результаты наблюдались при использовании нанокапилляров, модифицированных катионными дендримерами [261], а также при изучении связывания белков с нанокапиллярами, модифицированными ПЭГ [262].

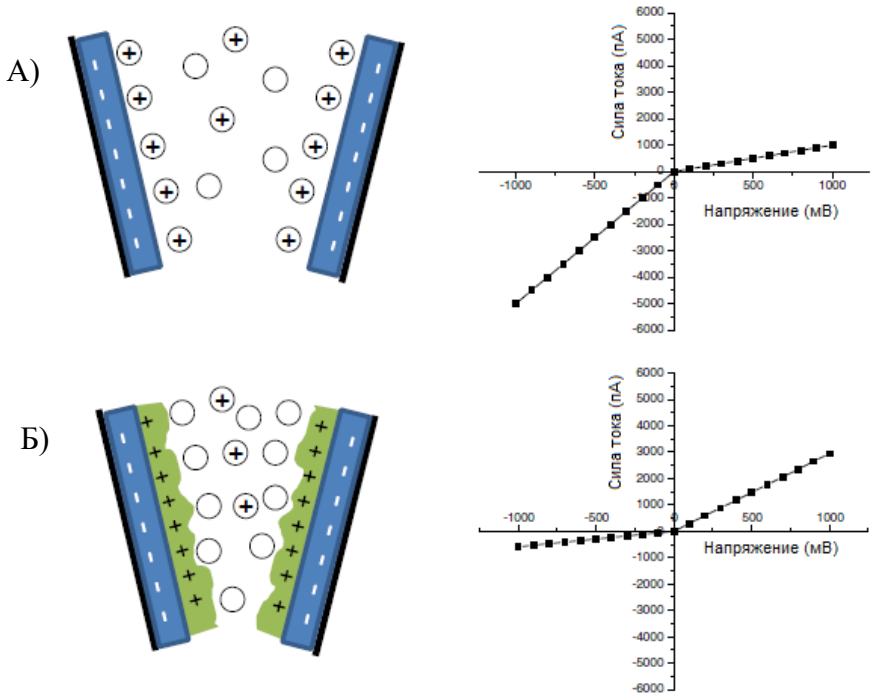


Рисунок 3.2.1.2 - Схематическое изображение устройства ДЭС на кончике нанокапилляра и соответствующие графики вольтамперных характеристик: А) без покрытия; Б) с покрытием поли-L-лизином.

Степень выпрямления или коэффициент выпрямления (r) (формула 3.2.1.3) рассчитывается как отношение абсолютных значений тока при положительных I_+ и отрицательных напряжениях (I_-):

$$r = \left|\frac{I_-}{I_+}\right| \quad (3.2.1.3)$$

Коэффициент выпрямления используется для оценки изменений электрических свойств нанокапилляра во время формирования функционализированного слоя на его острие. Непокрытые стеклянные поверхности нанокапилляра (например, кварцевые или боросиликатные) вызывают отрицательное выпрямление тока ($r > 1$). Функционализация поверхности кварцевого нанокапилляра положительно заряженными полиэлектролитами, такими как поли-L-лизин, приводит к инверсии выпрямления тока ($r < 1$).

Таким образом, любая заряженная молекула, адсорбированная на острие нанокапилляра, будет изменять поверхностную плотность зарядов и удельное сопротивление, а процесс связывания аналитов со специфическими молекулами, сорбированными на поверхности нанокапилляра, можно контролировать, анализируя изменения коэффициента выпрямления тока во времени.

На основе данного явления выпрямления тока в данном разделе будет продемонстрирована возможность создания высокочувствительного, быстрого и наноразмерного pH-сенсора. Для нормальной жизнедеятельности клетки необходимо поддержание относительно стабильной нейтральной внутриклеточной и внеклеточной среды. Экстраклеточный ацидоз часто возникает при активации анаэробного гликолиза в условиях опухолевого роста и воспаления [1]. Кислая внеклеточная среда может, например, способствовать метастазированию опухолей и регулировать воспалительные реакции. Поэтому точное измерение локального внеклеточного pH (pHe) имеет ключевое значение для понимания биофизики клетки, а также его влияния на диагностику и терапию онкологических патологий [263][264]. Оценка локального pHe также важна для определения степени инвазии опухоли и иммунного ответа [1][265]. Карта pHe с высоким разрешением может помочь лучше понять взаимосвязь между распределением pH, морфологией и функцией клеток. Однако картирование пространственного распределения pHe в клеточной микросреде представляет собой сложную задачу из-за высокой

подвижности внеклеточных протонов [266][267]. Поэтому существует необходимость в разработке метода для эффективного и чувствительного мониторинга изменений pHe с высоким с высоким пространственным разрешением на уровне отдельных клеток [268].

В настоящее время наиболее распространенные pH-зонды основаны на традиционных микроэлектродах, которые имеют большие размеры и медленное время отклика [269]. Флуоресцентные pH-зонды также могут использоваться для измерений во внеклеточной среде, но их применение ограничено из-за высокого уровня фонового сигнала и быстрого выцветания [270]. Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) также применяются для измерения pH [271], однако эти методы характеризуются низким пространственным разрешением, а их зависимость от распределения зондов в ткани усложняет количественную оценку pHe [272]. Для решения части этих проблем недавно разработаны полевые транзисторы на основе полипиррола, расположенные на кончике нанопипетки, которые можно точно позиционировать и использовать для детектирования изменений pH в водной среде [17][273]. Однако данные зонды имели медленное время отклика, что значительно ограничивало возможность динамического картирования отдельных клеток в режиме реального времени [17]. Одним из перспективных подходов к преодолению этих ограничений является использование функциональных цвиттер-ионных наномембран с высокой проводимостью и электроактивностью [274][275]. Нами впервые был разработан наноразмерный pH-чувствительный наносенсор, основанный на самосборке гидрогеля полил-L-лизина/глюкозооксидазы (PLL/GOx), с дальнейшей сшивкой аминогрупп в парах глутарового альдегида (рисунок 3.2.1.3 а) [276]. Положительно заряженные четвертичные амины PLL и отрицательно заряженные карбоксильные остатки GOx способствуют самосборке цвиттер-ионных мембран, что обеспечивает повышенную чувствительность к ионам H^+. Кроме того, такие наномембраны позволяют ионному току проходить через их матрицу, что может использоваться для управления в режиме обратной связи при комбинировании с методами визуализации живых клеток, такими как сканирующая ионно-проводящая микроскопия (СИПМ). Это обеспечивает возможность получения 3D-

изображений живых клеток с высоким разрешением [5]. Более того, данный подход позволяет использовать двухканальные СИПМ-pH нанозонды, которые объединяют преимущества сканирования с обратной связью СИПМ с высокой чувствительностью pH-детекции, что позволяет одновременно получать топографические и pHe 3D-карты отдельных живых клеток в режиме реального времени.

Схема процесса самосборки цвитер-ионной мембраны на острие стеклянного нанокапилляра представлена на рисунке 3.2.1.3 b.

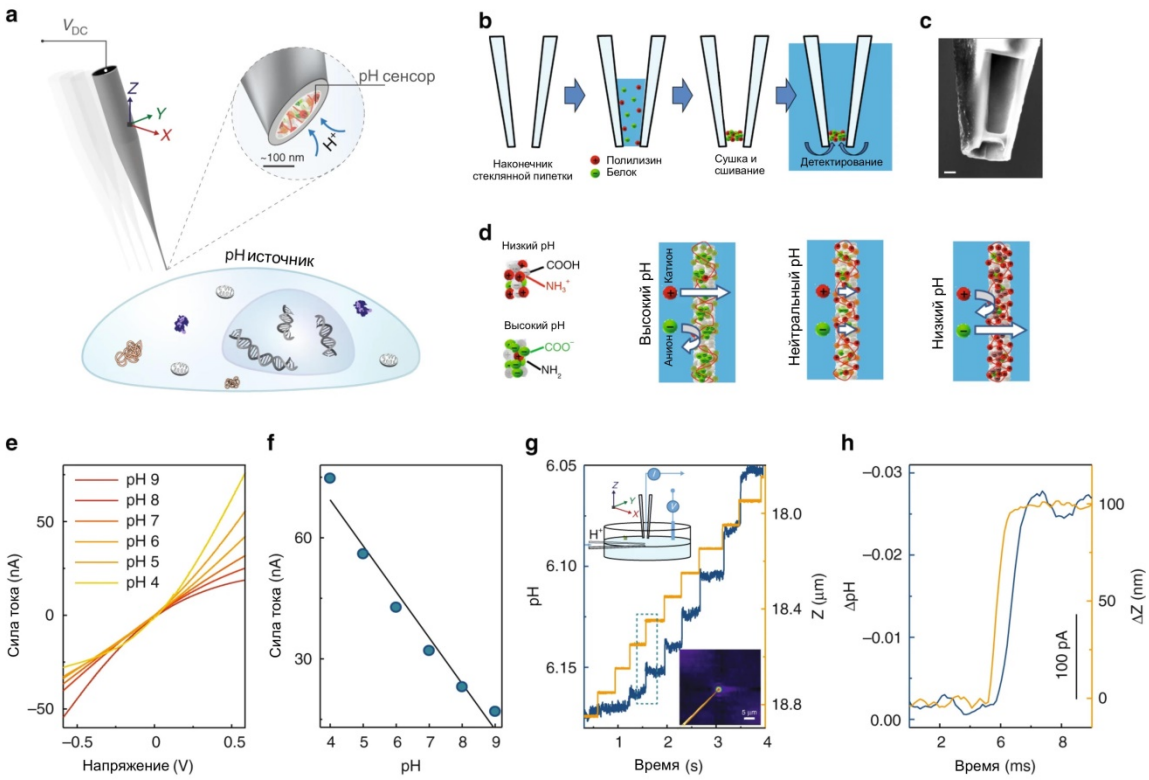


Рисунок 3.2.1.3 – Изготовление и характеризация pH сенсора: a) Схематическое изображение, демонстрирующее динамическое картирование внеклеточного pH в трех измерениях с высоким пространственным разрешением; b) схема изготовления pH сенсора; c) изображение кончика pH-сенсора, сделанное с помощью сканирующей электронной микроскопии (шкала 500 нм); d) принцип работы сенсора: наномембрана проявляет избирательную проницаемость для анионов при низком pH и катионов при высоком pH; e) вольтамперная характеристика при различных значениях pH; f) график зависимости тока от pH при 0,6 В, показывающий хорошую линейную зависимость в диапазоне pH от 4 до 9 ($R^2 = 0,96$, $p < 0,001$, корреляция по Пирсону); g) нанокапилляр использовалася как высоколокализованный источник H^+ для тестирования способности pH-зонда к картированию. Измерение pH в реальном времени позволило оценить время отклика и чувствительность зонда. Зонд перемещался к источнику H^+ по оси z с использованием быстрого пьезоманипулятора; h) увеличенный график из пунктирной рамки, показанной на изображении g, демонстрирующий чувствительность и разрешение pH-сенсора.

Глутаровый альдегид ввиду наличия двух крабонильных групп позволяет вводить как свободные альдегидные группы в матрицу мембраны, так и связывает свободные аминогруппы PLL (рисунок 3.2.1.3 b-d) [277]. В результате образуется стабильная наномембрана на острие нанокапилляра, наличие которой приводит к выпрямлению ионного тока из-за присутствия положительно заряженных четвертичных аминов PLL и отрицательно заряженные карбоксильные остатков. Соотношение положительных и отрицательных зарядов определяется локальным pH раствора (рисунок 3.2.1.3 e).

Структурные свойства мембраны играют ключевую роль в оптимизации pH-чувствительности сенсора. Для визуализации кончика нанокапилляра использовалась сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком (FIB-SEM) с функцией «срез и просмотр». Прямая визуализация срезов стала возможна благодаря прочной сшивке PLL/GOx наномембран. Поперечное изображение показало, что PLL/GOx наномембрана, образовавшаяся на кончике нанокапилляра, имеет толщину около 200 нм (рисунок 3.2.1.3 c).

Цвитер-ионные свойства мембраны можно использовать для контроля общего поверхностного заряда наномембраны, что предотвращает кулоновское отталкивание и позволяет ионам H^+ свободно и быстро переноситься от раствора к чувствительной зоне на конце нанокапилляра [278]. Оптимальные условия можно достичь, используя соотношение ~0,4 мг/мл GOx к 0,01% PLL, что обеспечивает оптимизированное выпрямление ионного тока, как видно из I–V характеристики нанозонда (рисунок 3.2.1.4). При этих условиях наномембрана демонстрирует избирательную проницаемость для анионов при низком pH и катионов при высоком pH. Удобная для количественных измерений линейная зависимость ($R^2 = 0,99,\ p < 0,001$) наблюдалась в диапазоне pH от 5 до 8 (рисунок 3.2.1.3 и рисунок 3.2.1.4).

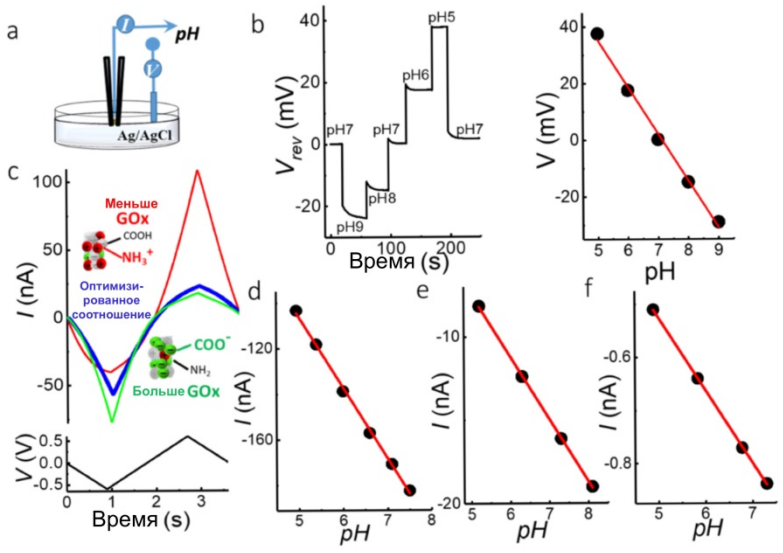


Рисунок 3.2.1.4 – a) Схема работы pH-сенсора относительно ХСЭ. b) Измерение потенциала (Vrev) при различных значениях pH от 5 до 9 в режиме фиксации постоянного нулевого тока, демонстрирующая линейную зависимость отклика на изменение pH. c) Поверхностный заряд наномембраны можно оптимально настроить путем регулирования соотношения GOx к PLL (это можно проверить путем мониторинга выпрямления ионного тока, вызванного зарядом мембраны нанозонда, при изменении напряжения от −0,6 до 0,6 В). Для капилляров с различным внутренним диаметром ~2,5 мкм (d), ~1 мкм (e) ~100 нм (f) наблюдалась линейная зависимость тока от pH при прикладываемом напряжении -0,6 В.

Данный диапазон pH соответствует физиологическим требованиям, предъявляемым к живым клеткам. Свойства этих наномембранных сенсоров (например, поверхностный заряд, динамический диапазон и чувствительность к pH) могут быть дополнительно точно настроены за счет контроля соотношения GOx к PLL, как показано на рисунке 3.2.1.4 c. GOx был выбран благодаря легкодоступности, низкой стоимости, хорошей термической и pH-стабильности, длительному сроку хранения и высокой операционной стабильности. Универсальность подхода продемонстрирована на примере других заряженных белков/ферментов, таких как гексокиназа и бычий сывороточный альбумин.

С помощью этих зондов ионная селективность достигается аналогично другим нанопоровым сенсорам, где отверстие чувствительного канала имеет размер, сопоставимый с радиусом Дебая (нанометровый диапазон в физиологическом растворе) [273][279]. Ионная селективность оценивалась измерением равновесного потенциала (рисунок 3.2.1.4 b), который составил 15-20

мВ на единицу pH и продемонстрировал отличную линейную зависимость от изменения pH. Высокая ионная селективность позволила использовать нанозонд в потенциометрическом режиме, аналогично обычным pH-сенсорам.

Изменения в выпрямлении ионного тока можно наблюдать на ВАХ при различных значениях pH. Линейная зависимость может использоваться не только в качестве индикатора pH, а также в качестве сигнала обратной связи при контроле расстояния между зондом и образцом [5]. Поскольку пространственное разрешение СИПМ тесно связано с размерами зонда, миниатюризация нанозонда имеет решающее значение для максимизации пространственного разрешения. В сочетании с СИПМ, нанозонд способен проводить бесконтактное сканирование поверхности и позиционироваться в нужных областях над клеткой или любым другим источником высвобождения H^+. Для всесторонней оценки возможностей сенсора мы создали искусственный градиент H^+ (рисунок 3.2.1.5), подаваемых через нанокапилляр, управляемый напряжением [267][28]. Полученный градиент H^+ можно регулировать, изменяя расстояние до нанокапилляра, подающего H^+ (рисунок 3.2.1.3 g). Для иллюстрации пространственного разрешения провели картирование pH в плоскости X–Y с помощью капиллярного pH сенсора с внутренним диаметром (~100 нм) (рисунок 3.2.1.3 g, рисунок 3.2.1.5 a). Для сравнения также было выполнено картирование более широкого градиента pH, созданного с помощью изменения управляющего напряжения на нанокапилляре, подающим H^+ (рисунок 3.2.1.5 b).

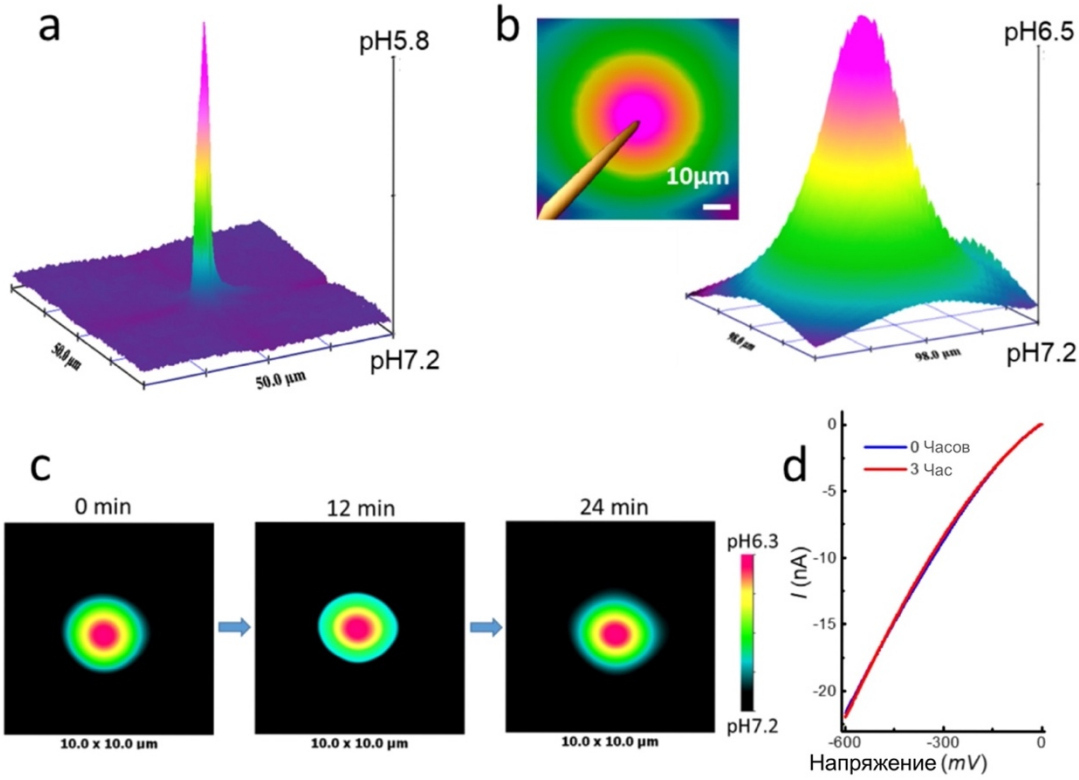


Рисунок 3.2.1.5 - 2D-картирование pH-градиента в плоскости XY с использованием pH-сенсора: a) pH-картирование градиента, созданного нанокапилляром, подающим H^+; b) Картирование более широкого градиента pH; c) картирование pH, подтверждающее высокую стабильность во времени при использовании одного и того же зонда; d) измерения I–V в начале эксперимента и спустя 3 часа, демонстрирующие практически идентичный отклик тока.

Для оценки времени отклика и чувствительности сенсора был использован быстрый пьезоманипулятор, способный быстро изменять положение сенсора (рисунок 3.2.1.3 g). Время отклика составило около 2 мс при чувствительности лучше, чем 0,01 pH-единицы и пространственном разрешении выше 50 нм (рисунок 3.2.1.3 f).

Величина pH-градиента зависит от активности клеток, внеклеточного буфера и диффузии H^+ [280][281]. В небуферном растворе высокий коэффициент диффузии позволяет протону распространяться на расстояние более 100 мкм, в то время как в физиологическом буферном растворе это расстояние сокращается до 10 нм [281]. По мере увеличения концентрации буфера диффузия протонов сильно ограничивается и локализуется.

В СИПМ расстояние между зондом и образцом контролируется уменьшением ионного тока, протекающего через острие стеклянного

нанокапилляра по мере его приближения к поверхности образца. При картировании pHe нормальных меланоцитов не наблюдалось заметных pH-градиентов вокруг клеток (рисунок 3.2.1.6 a-c), что хорошо согласуется с природой данной культуры.

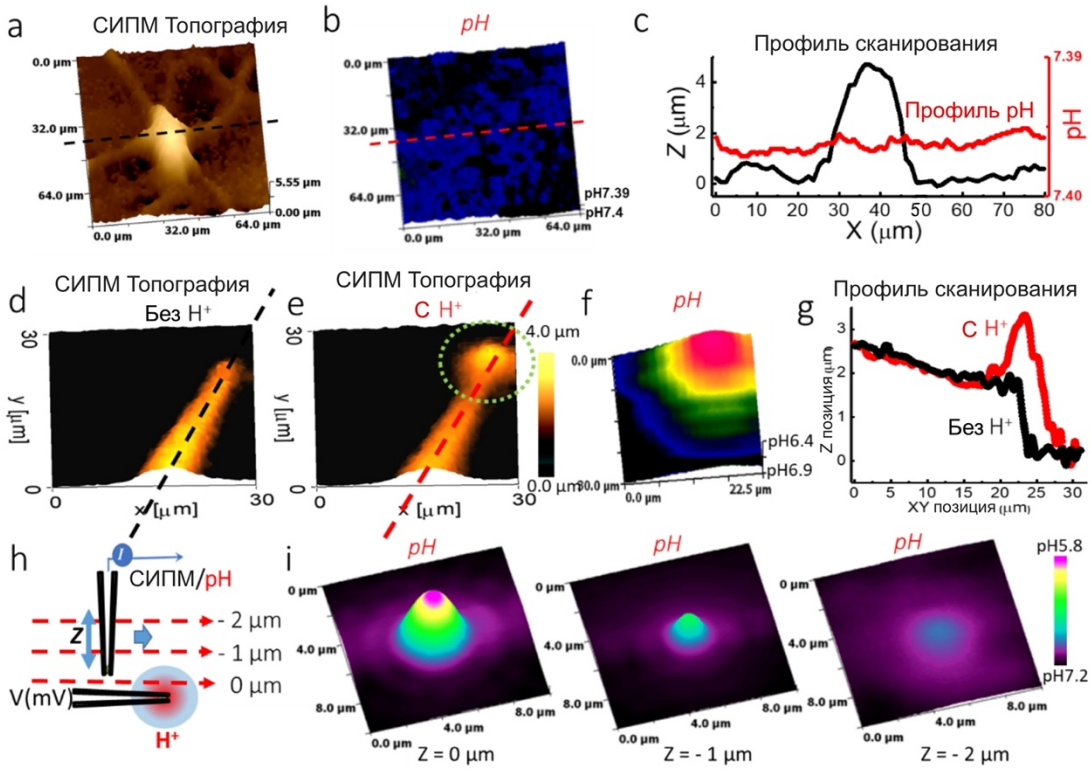


Рисунок 3.2.1.6 – a) 3D-топографическое изображение живого меланоцита с низким уровнем буферирования, полученное методом СИПМ; b) параллельное 3D-картирование pH того же меланоцита не выявило заметных pH-градиентов; (c) профиль топографического сканирования и картирования pH вдоль пунктирной линии, отмеченной на a) и b); d) pH-чувствительный нанозонд с обратной связью СИПМ для топографической визуализации стеклянного нанокапилляра без подачи H^+; e) pH-чувствительный нанозонд с обратной связью СИПМ для топографического сканирования того же нанокапилляра с подачей H^+ (при подаче H^+ возник артефакт в форме шарика - выделен пунктирным кругом); f) карты градиента H^+ вблизи кончика стеклянного нанокапилляра с подачей H^+; g) профили сканирования вдоль пунктирной линии, отмеченной на топографических изображениях СИПМ: d) черная линия и e) красная линия; h) схематическое изображение работы нанозонда для 2D-картирования pH на контролируемой высоте Z с использованием режима сканирования СИПМ на постоянной высоте; i) картирование pH нанозондом на различных Z-позициях относительно нанокапилляра, подающего H^+.

СИПМ использует ионный ток как сигнал обратной связи для сканирования, который при использовании pH-сенсора чувствителен не только к падению тока на расстоянии примерно одного радиуса капилляра между поверхностью зонда и

клеткой, но и к изменениям внеклеточного pH. Это может вызывать артефакты в форме «шариков» над кончиком нанокапилляра, подающего H^+ (обведено пунктирным кругом на рисунке 3.2.1.6 d-g). Данное искажение можно частично минимизировать с помощью режима сканирования СИПМ на постоянной высоте (рисунок 3.2.1.6 h, i), однако наиболее предпочтительным способом преодоления данного ограничения является использование двухканальных зондов, этот подход был предложен нами впервые.

Для для этой цели был изготовлен нанозонд с двумя каналами. На рисунке 3.2.1.7 показана схема изготовления и работы двухканального СИПМ-pH нанозонда. Он состоит из немодифицированного открытого канала (СИПМ-канал) для контроля обратной связи СИПМ и канала с pH-чувствительной PLL/GOx мембраной (pH-канал), что позволяет одновременно и независимо проводить как измерение pH, так и топографическое сканирование СИПМ.

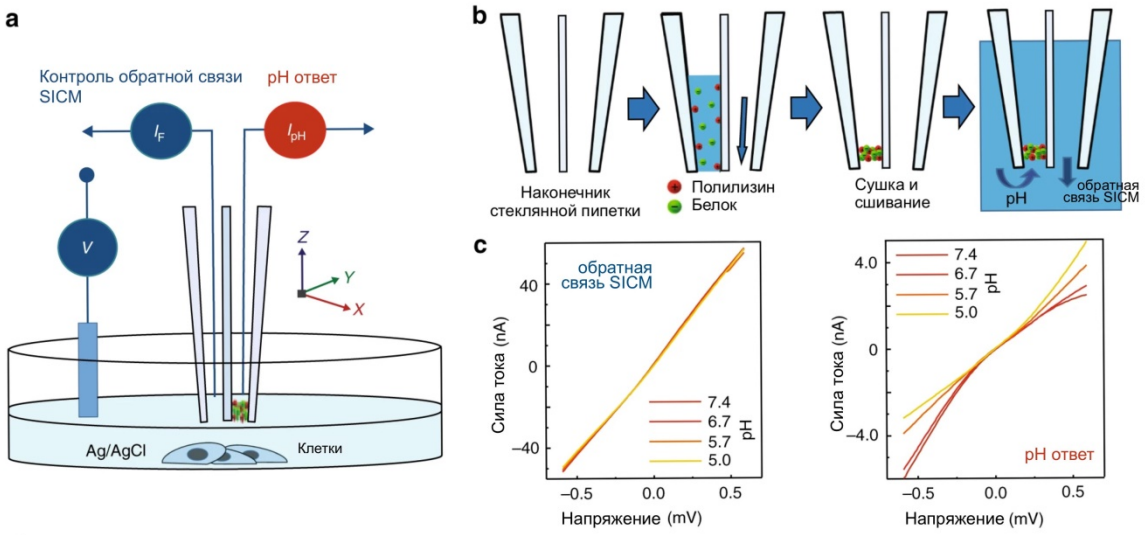


Рисунок 3.2.1.7 - Независимое сканирование с обратной связью СИПМ и одновременное 3D-картирование pHe живых клеток: a) схема работы двухканального нанозонда для одновременного получения изображений СИПМ и измерения pH; b) pH-чувствительная наномембрана формируется внутри одного канала (pH-канал) двухканального кварцевого нанокапилляра, в то время как второй канал (канал для получения изображений СИПМ) остается открытым благодаря подаче обратного давления во время изготовления; c) ионные токи, протекающие в двух раздельных каналах двойного нанокапилляра, имеют разные I–V характеристики при различных pH.

Ионные токи, протекающие в независимых каналах нанокапилляра, продемонстрировали разные I–V отклики при изменении pH (рисунок 3.2.1.7 c). Подобно одноканальному зонду, динамический диапазон, линейность и чувствительность оставались схожими для pH-детектирования.

Валидация разработанного двухканального зонда использовалась для прижизненного картирования pHe клеток меланомы A375M (рисунок 3.2.1.8). Меланома является одной из самых агрессивных и гетерогенных онкологических патологий кожи, проявляющих разнообразие клеточных субпопуляций и характеризующихся внеклеточным ацидозом [282]. Были одновременно получены топографические изображения СИПМ келток меланомы A375M с высоким пространственным разрешением, представленные на рисунке 3.2.1.8, и 3D-карты pHe тех же клеток меланомы.

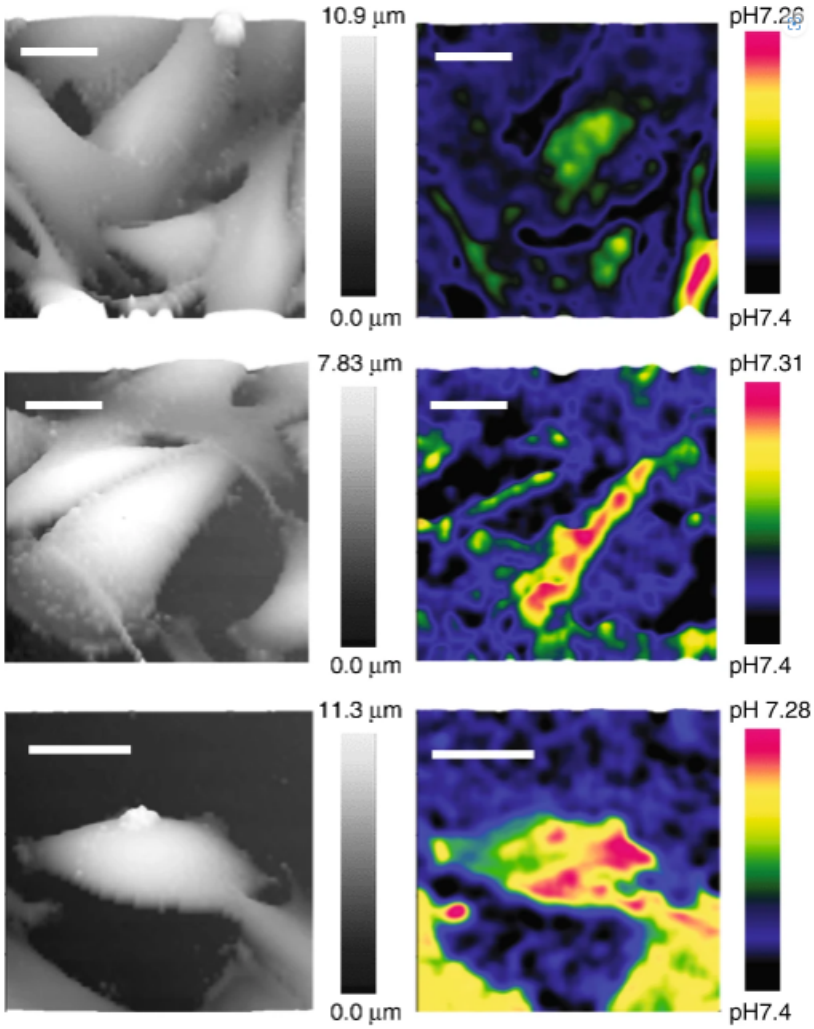


Рисунок 3.2.1.8 - Одновременное 3D-картирование топографии (левая колонка) и pHe (правая колонка) трех различных групп живых клеток меланомы A375M с высоким пространственным разрешением. Масштабные линейки соответствуют 20 мкм.

Как и ожидалось, картирование pHe с высоким разрешением показало неоднородное распределение распределение градиента на поверхности, что согласуется с гетерогенной природой данной культуры. В отличие от этого, картирование pHe нормальных меланоцитов не выявило заметных pHe градиентов (рисунок 3.2.1.6 a-c).

Очевидно, что кислотность играет ключевую роль в прогрессии опухолевого роста, инвазивности и устойчивости к терапии [1] [283]. Мониторинг изменений pHe клеток может предоставить важную информацию для понимания гетерогенности опухолей во время патологических процессов, таких как эпителиально-мезенхимальный переход [283]. Однако высокий коэффициент диффузии и неоднородное распределение внеклеточных протонов усложняют мониторинг pHe в реальном времени [284][285]. Таким образом, на основе наномембран, состоящим из разноименно заряженных биополимеров нами впервые были разработаны и созданы pH-чувствительные нанозонды. Данный универсальный подход позволил достичь высокого пространтсвенного разрешения pHe картирования поверхности клеток (50 нм), быстрого времени отклика (около 2мс) и высокой чувствительности (0,01 pH).

Комбинирование данного подхода с методом СИПМ с использованием двухканальных зондов позволяет одновременно исследовать топологии pH культур клеток, что делает разработанный метод универсальным для диагностики онклогических патологий, прогнозирования и оценки эффективности терапии, направленной на снижение кислотности pHe [286].

3.2.2 Исследования профиля распределения pH внутри опухоли *in vivo*. Использование pH-чувствительного наносенсора для оценки влияния степени кислотности опухоли на накопление магнитных наночастиц

Ацидоз внеклеточного матрикса характерен для многих солидных опухолей, широко используется для физиологически обусловленной доставки контрастных агентов, лекарств и наночастиц в опухоль. Однако pH микроокружения опухоли варьируется как внутри одной опухоли, так и между различными опухолями. В данном исследовании с помощью разработанных pH-сенсоров оценивали влияние

этих вариаций на pH-активируемую доставку магнитных наночастиц (МНЧ), модифицированных, pH чувствительным пептидом (pHLIP). Нами продемонстрировано, что pHLIP-конъюгированные МНЧ взаимодействовали с 2D культурами и 3D сфероидами клеток 4T1 более эффективно при pH 6,4, чем при pH 7,2 [287]. Эффективность накопления pHLIP-конъюгированных МНЧ в опухолях 4T1 после внутривенного введения, отслеживаемая *in vivo* с помощью магнитно-резонансной томографии, показала значительные вариации. Анализ профилей pH опухолей, записанных с использованием разработанного pH-сенсора, выявил явную корреляцию между измеренным в опухоли pH и количеством накопленных МНЧ.

Синтез наночастиц осуществляла группа Першиной. Магнитные наночастицы (Fe_3O_4) диаметром около 9 нм были получены методом соосаждения [288][289][290][291]. Наночастицы были покрыты тонким слоем SiO_2 (рисунок 3.2.2.1), после чего APS ковалентно связывался с поверхностью частиц, образуя МНЧ-APS. Для улучшения коллоидной стабильности полученных МНЧ использовали гетеробифункциональный ПЭГ, на заключительной стадии МНЧ модифицировали pHLIP [292].

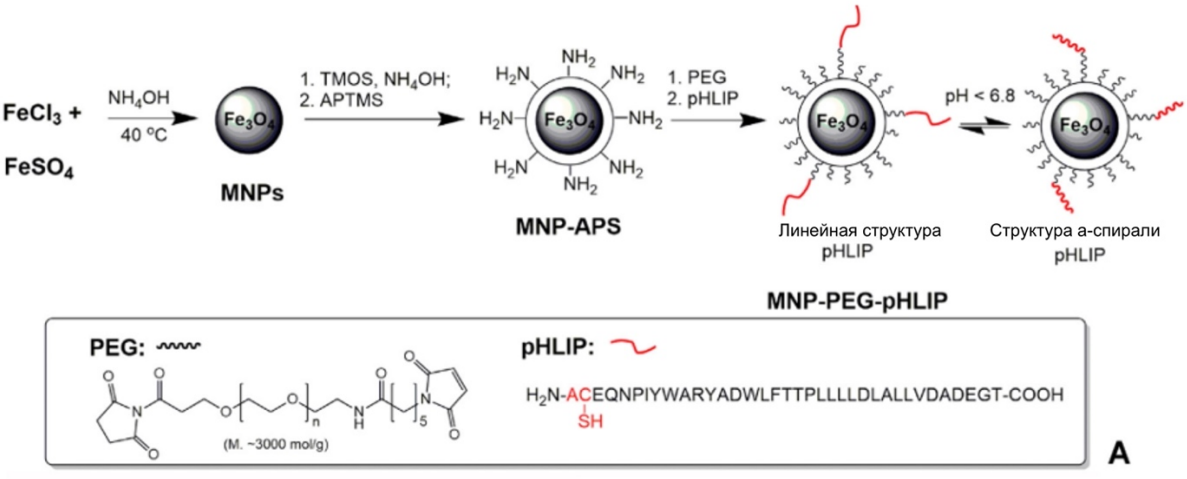


Рисунок 3.2.2.1 - Синтез и характеристика MNP-PEG-pHLIP. (А) Схема синтеза MNP-PEG-pHLIP.

Методом МРТ было показано, что накопление MNP, конъюгированных с pHLIP, в опухоли 4T1 зависит от pH профиля опухоли (рисунок 3.2.2.2 А-Б). MNP-PEG-pHLIP проявляются в виде темных областей на T2*-взвешенных изображениях опухоли 4T1, полученных в различные периоды после

внутривенного введения наночастиц, что подтверждает их доставку в опухоль (рисунок 3.2.2.2 C).

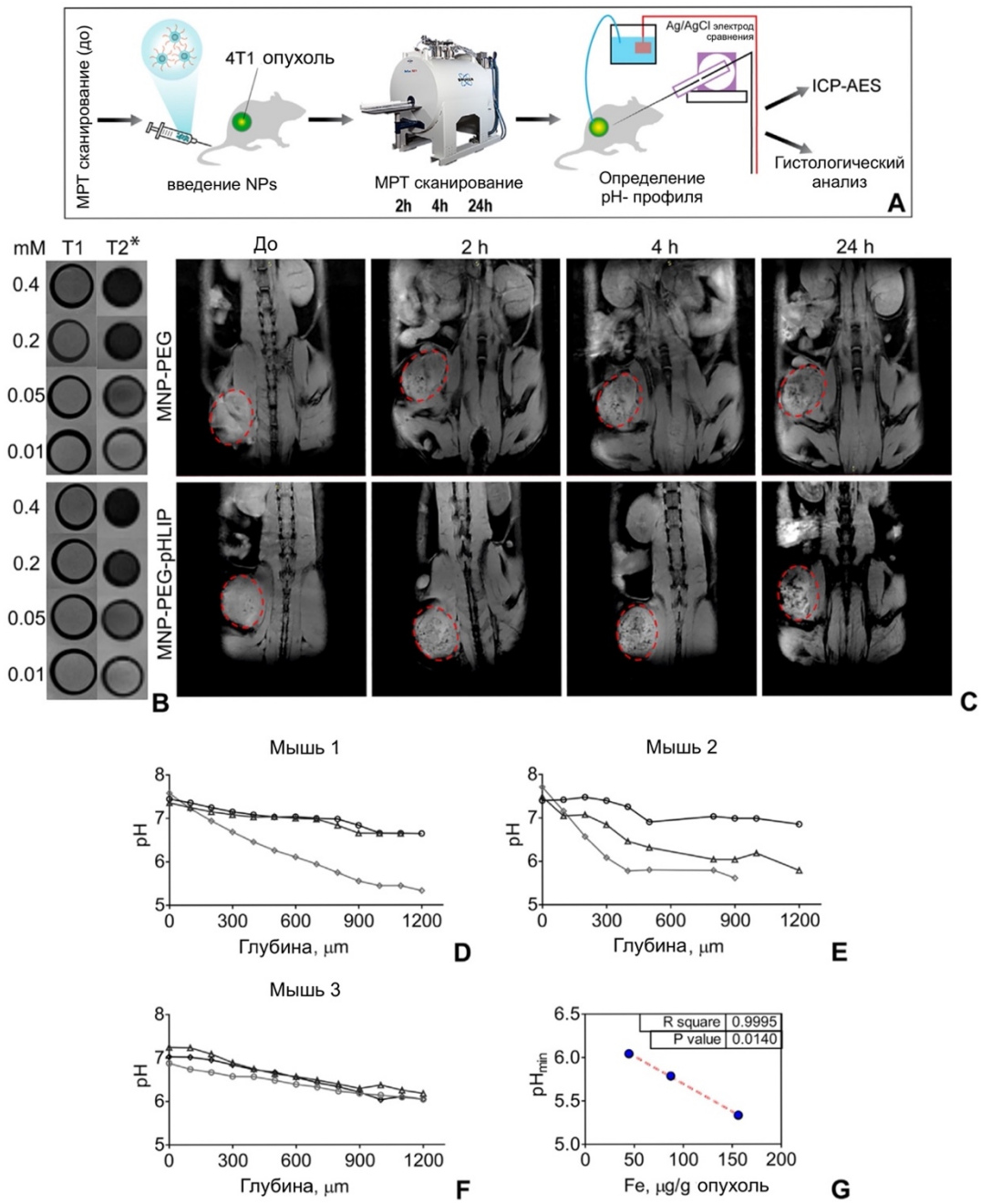


Рисунок 3.2.2.2 - МРТ-изображения и pH-профили опухолей 4T1, сформированных в задней области бедра мышей BALB/c. (A) Схема рабочего процесса *in vivo* эксперимента. (B) T1- и T2*-взвешенные МРТ-изображения MNP-PEG и MNP-PEG-pHLIP, диспергированных в воде при различных концентрациях (0,01-0,40 мМ). (C) T2*-взвешенные МРТ-изображения опухоли 4T1 (до и через 2, 4 и 24 часа после введения MNP-PEG и MNP-PEG-pHLIP), полученные на ClinScan 7 T (Bruker Biospin). (D-F) pH-профили опухолей 4T1 (24 часа после введения MNP-PEG-pHLIP), записанные с использованием разработанного pH сенсора (n = 3 на мышь). (G) Самое низкое значение pH, измеренное на глубине 1200 мкм в опухолях 4T1 (24 часа после введения MNP-PEG-pHLIP), в зависимости от концентрации Fe в ткани опухоли.

Уменьшение интенсивности сигнала на T2*-взвешенных МРТ-изображениях наблюдалось через 4 часа после введения MNP-PEG-pHLIP и сохранялось в течение 24 часов, что указывает на удержание MNP-PEG-pHLIP в опухоли в этот период. Для сравнения, MNP-PEG продемонстрировали заметное снижение интенсивности сигнала на T2*-взвешенных МРТ-изображениях через 4 часа после введения, тогда как через 24 часа интенсивность сигнала в опухолевой ткани увеличилось, что указывает на вымывание MNP-PEG.

pH профили опухолей 4T1 были исследованы с помощью разработанного одноканального pH-сенсора. Экспериментальное исполнение прижизненного исследования pH в опухоли потребовало разработки нового подхода работы с лабораторными животными. Перед измерениями мышам (n = 3) вводили внутрибрюшинно смесь золетила и ксилазина (50 и 5 мг/кг соответственно), для поддержания анестезии в ходе экспериментов использовали внутривенный катетер. Для доступа pH-сенсора к опухоли был сделан разрез вдоль позвоночника животного, начиная с ~0,5 см от основания хвоста до верхнего изгиба позвоночника (рисунок 3.2.2.3 В). Опухоль была аккуратно отделена от подлежащих тканей, на спине мыши был сформирован кожный карман, который заполнили PBS. pH-профиль определяли в опухолях мышей, которым вводили MNP-PEG-pHLIP, после последнего МРТ-сканирования. pH измеряли в обоих направлениях движения pH-сенсора: «внутрь опухоли» и «из опухоли» в трех участках опухоли (рисунок 3.2.2.3).

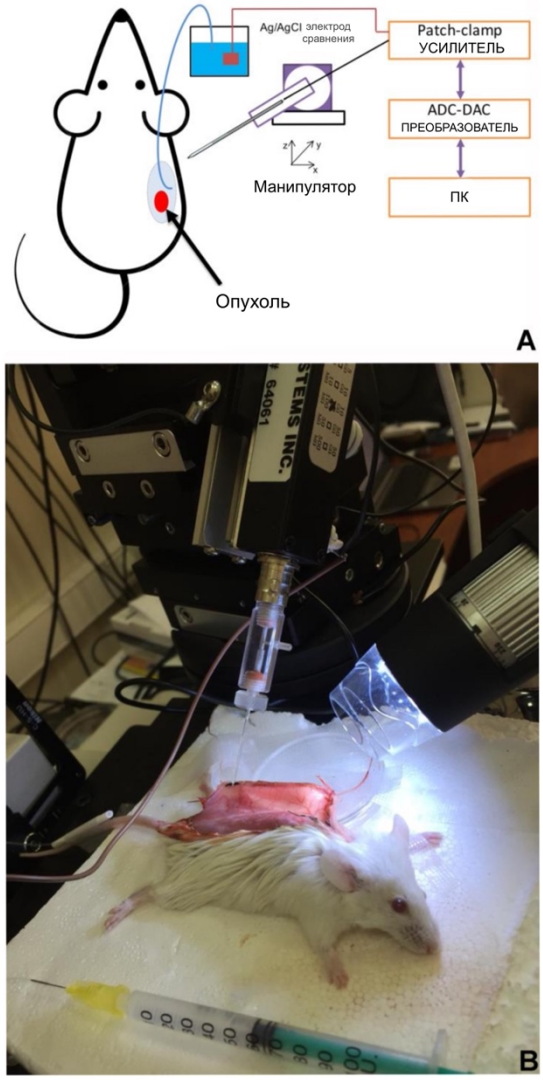


Рисунок 3.2.2.3 - A) Схема оборудования для профилирования pH опухоли. B) Изображение процедуры профилирования pH

В целом, два pH-профиля в разных направлениях («внутрь» и «из опухоли») были близки, и их различия находились в пределах погрешности метода. Из-за риска загрязнения внешним буфером во время измерений «из опухоли», для анализа были выбраны данные «внутрь опухоли». Мы обнаружили, что самое низкое значение pH в опухолях, измеренное на глубине 1200 мкм, коррелировало с концентрацией железа в тканях опухоли (рисунок 3.2.2.2).

Результаты *in vivo* ясно показывают, что эффективность доставки MNP, конъюгированных с pHLIP, в опухоль зависит от распределения pH внутри нее. Известно, что уровень pH может различаться между различными участками одной опухоли, а также между опухолями одного и того же типа. В опухолях 4T1 мы зарегистрировали падение pH до 5,3-5,6, что соответствует самым низким

значениям pH, измеренным в опухоли среди различных типов рака [293]. Таким образом, разработанный pH-сенсор позволят достоверно подтвердить эффективность доставки pH-чувствительных диагностических и терапевтических препаратов на животных моделях.

Разработан метод для 3D картирования pH с нанометровым пространственным разрешением для живых *in vitro* и *in vivo* систем без применения меток на основе нанокапилляра с цвиттер-ионной мембраной, основанный на явлении выпрямления тока. pH-чувствительный сенсор обладает следующими характеристиками: пространственного разрешения до 50 нм, скорость отклика не более 2 мс, чувствительность не менее 0,01 pH. Пространственное разрешение 3D-картирования pHe клеток меланомы A375M показало неоднородный pH-градиент. Было получен профиль градиента pH внутри опухоли 4T1 живой мыши, зарегистрировано падение pH до 5,3-5,6.

3.3 Локальное определение АФК и молекулярного кислорода на уровне единичных клеток, тканей и животных с помощью нанокапиллярных электрохимических сенсоров на основе платинизированного углерода

3.3.1 Способ изготовления дисковых углеродных наноэлектродов на основе нанокапилляров с последующей платинизацией. Валидация электродов для измерения АФК на клетках меланомы и меланоцитах

АФК играют важную физиологическую роль, участвуя в многочисленных сигнальных путях, регулирующих клеточный метаболизм, пролиферацию и механизмы защиты, как в норме, так и при воздействии различных патогенных факторов. К АФК относятся супероксид-анион радикал, перекись водорода, гидроксильный радикал, окись азота и другие. Для безопасного использования АФК в качестве сигнальных молекул клетки обладают антиоксидантной защитой, контролирующей их уровень. Однако в случае нарушения гомеостаза избыточное количество АФК приводит к состоянию оксидативного стресса (рисунок 3.3.1).

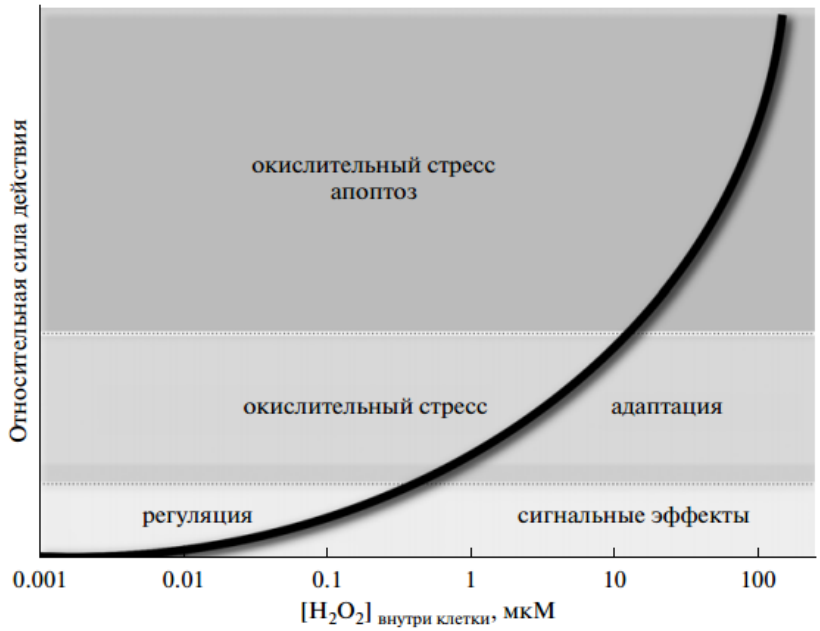


Рисунок 3.3.1.1 - Концентрационная шкала внутриклеточных эффектов H_2O_2.

Физиологические концентрации АФК находятся в диапазоне от 1 нМ до 0,1-0,5 μM. При концентрациях 1-10 μM H_2O_2 вызывает остановку клеточного деления, которое обычно восстанавливается и может даже ускоряться при успешной адаптации к окислительному стрессу. Однако при высоких концентрациях АФК (≥10 μM) окислительный стресс преобладает, адаптация не происходит, и клетка вступает в апоптоз. Эти пороговые значения относительны и зависят от типа клетки, условий культивирования и неоднородного распределения H_2O_2 в клетке, что делает концепцию средней внутриклеточной концентрации H_2O_2 менее применимой.

Исследования показывают, что нарушение баланса АФК является одной из ключевых причин старения и приводит к развитию таких патологий, как онкологические, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания. Также сообщалось об увеличении уровня АФК при болевом шоке. Несколько исследований продемонстрировали, что антиоксидатны свободных радикалов могут выступать как эффективные анальгетики, справляясь с болью и воспалением.

Вовлеченность АФК в широкий спектр физиологических процессов сделала их внутриклеточное измерение важной задачей. Однако точное измерение АФК затруднено из-за их короткого времени жизни и высокой реакционной активности. Оценочное количество АФК, производимых клеткой при окислительном стрессе

крайне мало и составляет 10^{-16}-10^{-13} моль на одну клетку. Более того, пространственное распределение АФК в клетке критично для её нормального функционирования, поэтому их поведение необходимо изучать в живых системах. Производство АФК может быть локализованно в отдельных частях и компартментах клетки, что подчеркивает еще большую важность настоящего исследования.

Идеальный метод детекции АФК должен обладать высокой чувствительностью и скоростью для обнаружения низких концентраций за короткий промежуток времени. Также требуется высокая селективность для точного определения вклада различных АФК в клеточные процессы.

Любая молекула, способная вступать в окислительно-восстановительные реакции (например, кислород и АФК), может быть обнаружена с помощью электрохимических сенсоров через изменение тока, напряжения или сопротивления, вызванное реакциями с переносом электронов. Микро- и наноэлектроды зарекомендовали себя как мощные инструменты для исследования уровня АФК в биологических системах. Их высокая чувствительность, короткое время отклика и возможность миниатюризации делают их идеальными для изучения распределения аналитов на уровне отдельных клеток с высоким пространственным разрешением.

Многие исследования электрохимической активности сенсоров были посвящены моделированию дисковых электродов, так как они наиболее практичны по сравнению с другими формами [294]. Наибольшая сложность в описании дискового электрода заключается в том, что диффузия происходит в двух направлениях: вдоль оси симметрии и перпендикулярно поверхности электрода. В оригинальной работе Сайто (1968) была предложена формула для предельного диффузионного тока дискового электрода [295] (рисунок 3.3.1.2).

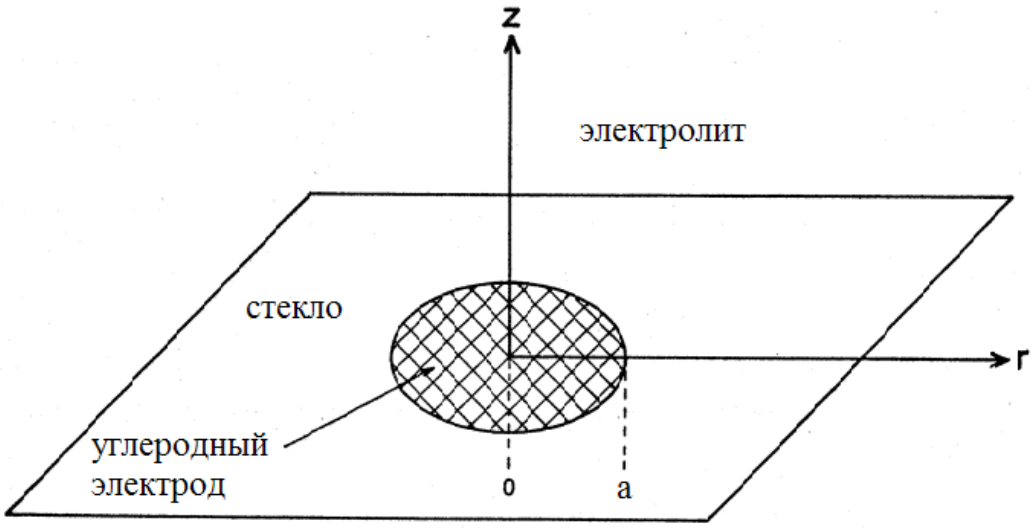


Рисунок 3.3.1.2 – Схематическое изображение дискового углеродного электрода со стеклянными стенками.

На рисунке представлена схема дискового электрода, где Or - расстояние в радиальном направлении от оси, а Oz - нормаль к поверхности электрода. В двумерном случае диффузия описывается уравнением 3.3.1.1:

$$\frac{\partial^2 \mathrm{C}}{\partial \mathrm{r}^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial \mathrm{C}}{\partial \mathrm{r}} + \frac{\partial^2 \mathrm{C}}{\partial \mathrm{z}^2} = \frac{\partial C}{\partial t}, \qquad (3.3.1.1)$$

где C - концентрация медиатора.

В стационарном случае $\frac{\partial C}{\partial t} = 0$.

В случае диаметра электрода 2a, граничные условия (I-IV) будут иметь следующий вид:

1I. для $z = 0$ и $r \leq a; C = 0$

II. для $z = 0$ и $r \leq a; C = 0$

III. при любом r и $z = \infty$; $\mathrm{C} = \mathrm{C}_0$

IV. при любом z и $r = \infty$; $\mathrm{C} = \mathrm{C}_0$

Если представить концентрацию C в виде произведения двух функций, зависящих от r и z, то есть F(r) и G(z), и принять $G(z) = e^{-mz}$, то это приведет нас к дифференциальному уравнению Бесселя:

$$\frac{\partial^2 F(r)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial F(r)}{\partial r} + m^2 F(r) = 0 \qquad (3.3.1.2)$$

Тогда решение может быть записано в следующем виде:

$$\mathrm{C}_0 - C = \frac{2\mathrm{C}_0}{\pi} \int_0^\infty f(m) e^{-mz} J_0(mr) dm, \qquad (3.3.1.3)$$

где $f(m)$ - функция, определенная граничными условиями.

Если принять $f(m) = \frac{\sin(ma)}{m}$, это выражение будет удовлетворять граничным условиям, так как

$$C_0 \int_0^\infty \frac{\sin(ma)}{m} J_0(mr)dm = 0 \text{ для } r \leq a \quad (3.3.1.4)$$

и

$$\left(\frac{\partial C}{\partial z}\right)_{z=0} = C_0 \int_0^\infty \sin(ma)\, J_0(mr)dm = 0 \text{ для } r > a \quad (3.3.1.5)$$

тогда итоговое решение примет следующий вид:

$$C_0 - C = \frac{2C_0}{\pi} \int_0^\infty \frac{\sin(ma)}{m} J_0(mr)e^{-mz}dm \quad (3.3.1.6)$$

Используя таблицу функций Бесселя, данное уравнение можно преобразовать к безынтегральной форме:

$$C_0 - C = \frac{2C_0}{\pi} tan^{-1} \frac{a}{\sqrt{\frac{1}{2}\{(r^2+z^2-a^2)+\sqrt{(r^2+z^2-a^2)+4z^2a^2}\}}} \quad (3.3.1.7)$$

Градиент концентрации у поверхности электрода можно вычислить, взяв производную от уравнения (3.3.1.3):

$$\left(\frac{\partial C}{\partial z}\right)_{z=0} = -\frac{2C_0}{\pi} \int_0^\infty \sin(ma)\, J_0(mr)dm \quad (3.3.1.8)$$

Уравнение (3.3.1.8) можно также преобразовать следующим образом:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial z}\right)_{z=0} = \frac{2C_0}{\pi} \cdot \frac{1}{\sqrt{a^2-r^2}} \quad (3.3.1.9)$$

Тогда количество вещества, которое проходит через площадь электрода, будет равным:

$$Q = 4DC_0 \int_0^a \frac{r}{\sqrt{a^2-r^2}} dr = 4aDC_0 \quad (3.3.1.10)$$

В итоге выражение для стационарного тока будет иметь следующий вид:

$$I_{ss} = 4naFDC_0, \quad (3.3.1.11)$$

где n – это число электронов в ходе реакции на электроде;

I_{ss} – предельный диффузионный ток;

F – число Фарадея;

D – коэффициент диффузии медиатора;

C_0 – концентрация медиатора;

a – радиус электрохимически активной поверхности.

Уравнение (3.3.1.11) было выведено с предположением о бесконечной изолирующей плоскости, поэтому оно хорошо описывает результаты для электродов с большим значением коэффициента R_g (>10), который определяется как отношение общего радиуса электрода к радиусу электрохимически активной поверхности. Однако последующие экспериментальные данные и численное моделирование показали, что величина стационарного тока может увеличиваться до 40% по сравнению с теоретическим значением при малых коэффициентах R_g [296]. Такое отклонение возникает из-за дополнительной диффузии медиатора за пределами плоскости электрода. С помощью численного моделирования были получены новые коэффициенты для уравнения, заменяющие исходный коэффициент «4».

Таким образом были найдены следующие значения: 4,06 ($R_g = 10$), 4,43 ($R_g = 2$), 4,64 ($R_g = 1{,}5$), 5,14 ($R_g = 1{,}1$) [297]. Результаты, которые были получены, хорошо согласовались с экспериментальными данными. Кроме того, относительно недавно было выведено наиболее точное уравнение, описывающее зависимость тока на электроде от времени (для $T \geq 0{,}4$), для которого является (формула 3.3.1.12) [298]:

$$I = 1 + \frac{\pi}{4}(8\pi^{-\frac{5}{2}}T^{-\frac{1}{2}} + 8{,}9542 \times 10^{-3}T^{-\frac{3}{2}} - 2{,}5664 \times 10^{-4}T^{-\frac{5}{2}} - 2{,}2312 \times 10^{-4}T^{-\frac{7}{2}} + 2{,}7628 \times 10^{-5}T^{-\frac{9}{2}}), \quad (3.3.1.12)$$

где $T = \frac{Dt}{a^2}$.

Доказательство того, что изготовленный наноэлектрод имеет дискообразную форму с $R_g = 1{,}5$, можно провести электрохимическим методом, без необходимости использования электронной микроскопии. Для этого выполняются вольтамперометрические измерения тока по мере приближения наноэлектрода к поверхности с известными свойствами. Полученные «кривые подвода» нормализуются по I_{ss}, измеренному в объеме раствора. В качестве медиатора используется ферроцен-метанол, который является стандартным медиатором в электрохимии. Во время окисления ион железа быстро отдает электрон, переходя из состояния Fe^{2+} в Fe^{3+}, что позволяет измерениям не ограничиваться скоростью реакции медиатора.

Экспериментальные данные сопоставляются с теоретическими расчетами, выполненными для электродов с известной геометрией (рисунок 3.3.1.3). Конкретно для дискообразного электрода с R_g = 1,5, теоретическая «кривая подвода» выглядит следующим образом [294]:

$$Ni_{\text{П}} = \frac{[\frac{2,08}{R_g^{0,358}}\left(L-\frac{0,145}{R_g}\right)+1,585]}{[\frac{2,08}{R_g^{0,358}}(L+0,0023R_g)+1,57+\frac{LnR_g}{L}+\frac{2}{\pi R_g}Ln(1+\frac{\pi R_g}{2L})]}, \quad (3.3.1.13)$$

где $Ni_{\text{П}}$ - нормализованный ток;

L - это нормализованное расстояние от наноэлектрода до подложки (соотношение расстояния между наноэлектродом и подложкой к радиусу электрохимически активной поверхности, состоящей из углерода).



Рисунок 3.3.1.3 - Экспериментальная «кривая подвода» к диэлектрической полистироловой подложке (черная линия) и теоретическая кривая для дискообразного электрода с R_g = 1,5. L - безразмерная длина. Медиатор - 10 мМ FcMeOH в фосфатном буфере (PBS)

Результаты показывают, что по мере приближения наноэлектрода к поверхности ток снижается, что связано с физическим ограничением диффузии подложкой. Хорошая корреляция экспериментальных данных с теоретическими расчётами позволяет использовать уравнение (3.3.1.14):

$$a = \frac{I_{ss}}{4.64nF\mathrm{C_0}D} \quad (3.3.1.14)$$

Для создания нанокапиллярных сенсоров на основе углерода была разработан способ изготовления воспроизводимых углеродных наноэлектродов на основе кварцевых нанокапилляров с заданными размерами и функциональными покрытиями. Протокол производства наноэлектродов с требуемыми размерами включает следующие этапы: 1) вытягивание кварцевых нанокапилляров с использованием лазерного пуллера; 2) заполнение пиролитическим углеродом методом термической декомпозиции смеси бутана и пропана. Полный процесс изготовления одного наноэлектрода занимает в среднем меньше минуты. Радиус наноэлектрода можно точно контролировать, изменяя параметры вытягивания в процессе производства нанокапилляров. Установка для лазерного вытягивания позволяет регулировать пять параметров (нагрев, филамент, скорость, задержка и сила отрыва), которые настраиваются для получения нанокапилляров с нужной формой и размером. Подробное описание изготовления углеродных дисковых электродов приведено в главе 2 Материалы и методы.

Для того чтобы углеродные электроды стали чувствительными к кислороду и АФК, их необходимо функционализировать платиновым покрытием. Платина выступает катализатором для реакций восстановления кислорода и пероксида водорода (3.3.1.15-3.3.1.16), в результате чего происходит изменение тока в цепи, что и используется в качестве полезного сигнала.

При этом на катоде протекают следующие реакции:

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^- \quad (3.3.1.15)$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{+2H^+ + 2e^-} 2H_2O \quad (3.3.1.16)$$

В качестве второго электрода используется электрод, изготовленный из хлорсеребряной проволоки.

На аноде протекает следующая реакция:

$$4Ag + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 4e^- \quad (3.3.1.17)$$

Одним из наиболее эффективных методов изготовления сенсоров для внутриклеточных измерений является электрохимическое осаждение металла из раствора. В 2014 году мы впервые продемонстрировали возможность определения АФК с помощью платиновых наноэлектродов (рисунок 3.3.1.4) [252].

Электрохимическое осаждение платины осуществлялось из раствора хлороплатиновой кислоты H_2PtCl_6.

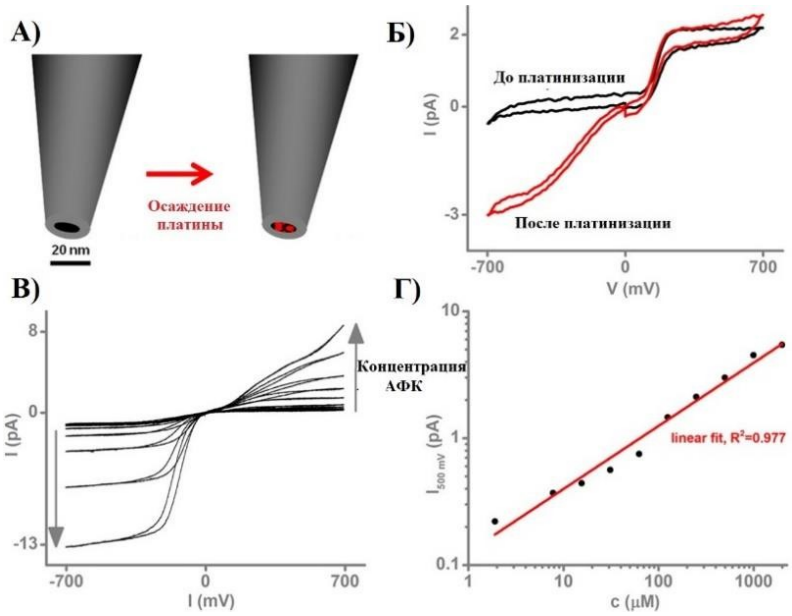


Рисунок 3.3.1.4 –А) схематическое изображение модификации платиной углеродной поверхности наносенсора; Б) ВАХ в 1 мМ ферроцен метанола наноэлектрода до (черная кривая) и после (красная кривая) осаждения платины; В) ВАХ платинового наноэлектрода при разных концентрациях АФК; Г) калибровочная зависимость тока от концентрации пероксида водорода [252]

Радиус электрода был определен из значений предельного диффузионного тока, измеренных до и после осаждения платины.

Мы применили данный тип наноэлектродов для внутриклеточных измерений в культивируемых клетках меланомы (рисунок 3.3.1.5) [252]. Меланома - агрессивная форма рака кожи, которая вызывает значительные структурные изменения меланосом, органелл, содержащих светопоглощающие пигменты, ответственные за удаление свободных радикалов. Однако в клетках меланомы меланосомы, вместо защиты клеток от окислительного стресса, сами продуцируют свободные радикалы [299]. На рисунке 3.3.1.5 показано, что при проникновении наноэлектрода в клетки меланомы анодный ток резко увеличивается, а затем стабилизируется на уровне, превышающем уровень, измеренный в клеточной среде (рисунок 3.3.1.5). Электрод способен выдерживать многократные проникновения, при этом значение анодного тока остается стабильным даже после многократных введений и извлечений. Интересно отметить, что при первом проникновении наблюдается значительный всплеск тока, тогда как при последующих введениях

его величина либо снижается, либо отсутствует вовсе. Это может указывать на связь между первоначальным скачком тока и механическим повреждением клетки во время введения наноэлектрода. Эти результаты демонстрируют потенциал функциональных наноэлектродов для изучения эндогенных процессов в клетках меланомы и могут способствовать исследованию окислительного стресса при данном типе опухолей.

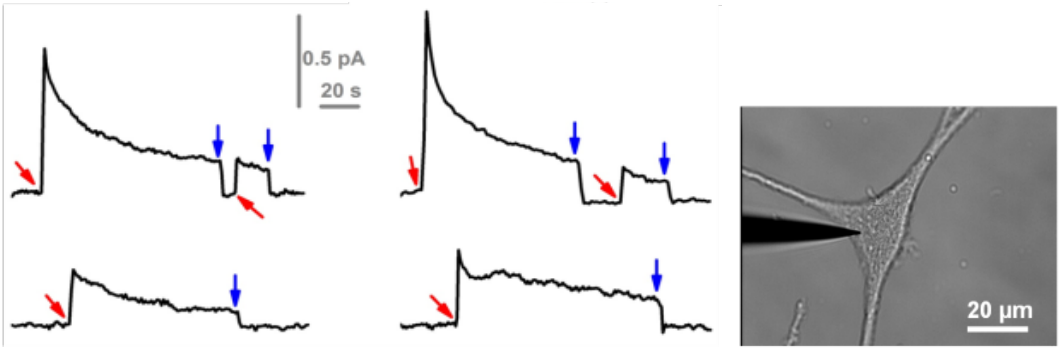


Рисунок 3.3.1.5 - Внутриклеточные измерения в клетках меланомы: фотография наноэлектрода, проникающего в клетку меланомы (вид сверху). Графики тока при потенциале +850 мВ внутри и снаружи клетки меланомы в культуре. Красные стрелки указывают момент ввода, синие - момент вывода электрода [252].

Стоит отметить, что не у всех электродов наблюдалась хорошая адгезия платины на углероде при достаточной каталитической активности, вследствие чего не всегда получилось выполнить эксперимент с использованием одного электрода. В дальнейшем разделе будут представлены решения, которые позволяют преодолеть эти технические трудности.

3.3.2 Углеродные наноэлектроды с повышенной адгезией платины

3.3.2.1 Способ изготовления и характеризация углеродных наноэлектродов с повышенной адгезией платины

Углерод является относительно инертным материалом, и для определения активных компонентов требуется дальнейшая функционализация. Электроосажденный слой платины усиливает электрокаталитическую активность за счет значительного снижения избыточного потенциала, возникающего при восстановлении кислорода и окислении/восстановлении перекиси водорода. Платинизация углеродных электродов ранее использовалась для измерения

внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) в клетках меланомы [252]. Однако такие платинированные электроды характеризуются низкой адгезией платины, что делает их непригодными для экспериментов с множественными циклами измерений. Для улучшения адгезии платины на углеродной основе применялся способ создания нанополостей на поверхности электрода, что способствовало более прочному закреплению платины [157].

Мы использовали электрохимический метод для создания полостей в углеродных наноэлектродах [207]. Изготовление платинированных наноэлектродов включало два этапа: травление в щелочном растворе и последующую платинизацию. Все этапы тщательно контролировались с помощью электрохимических измерений (рисунок 3.3.2.1.1).

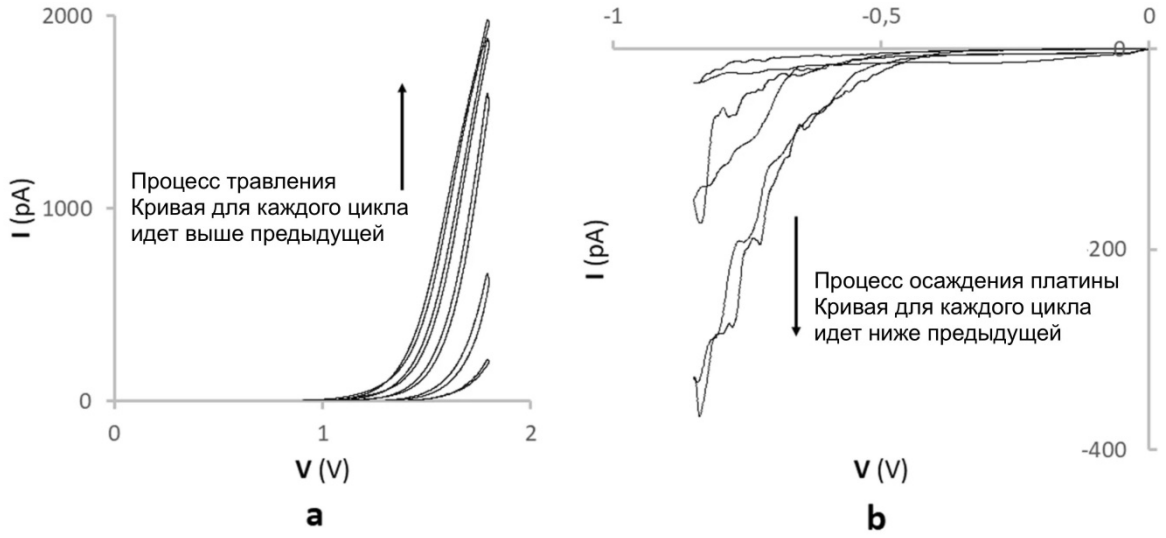


Рисунок 3.3.2.1.1 – Вольтамперные характеристики: (a) Вольтамперные характеристики, полученные при травлении углеродного наноэлектрода в 0,1 М растворе NaOH и 10 мм растворе KCl в течение 40 циклов по 10 секунд каждый, для создания полости на поверхности наноэлектрода. Каждая следующая кривая расположена выше предыдущей, что указывает на постепенное изменение структуры электрода в процессе травления. (b) Вольтамперная характеристика, полученная при осаждении платины, осуществленное изменением потенциала от 0 до -800 мВ относительно Ag/AgCl в растворе, содержащем 2 мм PtCl. Этот процесс демонстрирует успешное покрытие наноэлектрода платиной [157]

На первом этапе углеродный наноэлектрод травили в 0,1 М растворе NaOH и 10 мМ растворе KCl в течение 40 циклов по 10 секунд каждый для создания нанополостей на его поверхности (рисунок 3.3.2.1.1). На втором этапе осаждение платины проводилось с изменением потенциала от 0 до -800 мВ относительно Ag/AgCl в растворе, содержащем 2 мМ H_2PtCl_4. Полученные циклические

вольтамперограммы для исходного углеродного электрода, электрода с нанополостями и с нанесенным платиновым покрытием (рисунок 3.3.2.1.2) подтвердили успешность модификации.

Согласно циклическим вольтамперограммам наноэлектрода в FcMe, внешняя поверхность углерода после травления немного уменьшилась (рисунок 3.3.2.1.2). Из-за сложности получения изображений наноэлектродов размером менее 100 нм с использованием СЭМ, для определения их размеров требуется использование альтернативных методов, основанных на электрохимических измерениях.

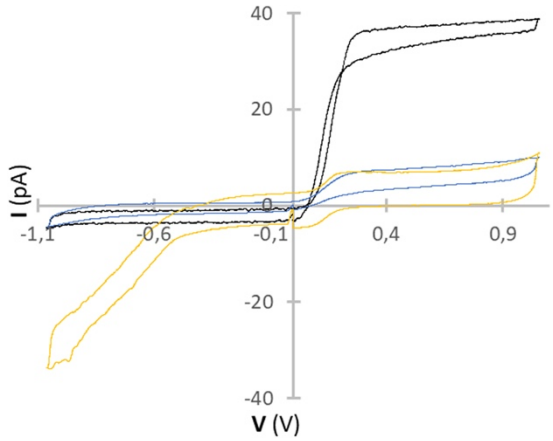
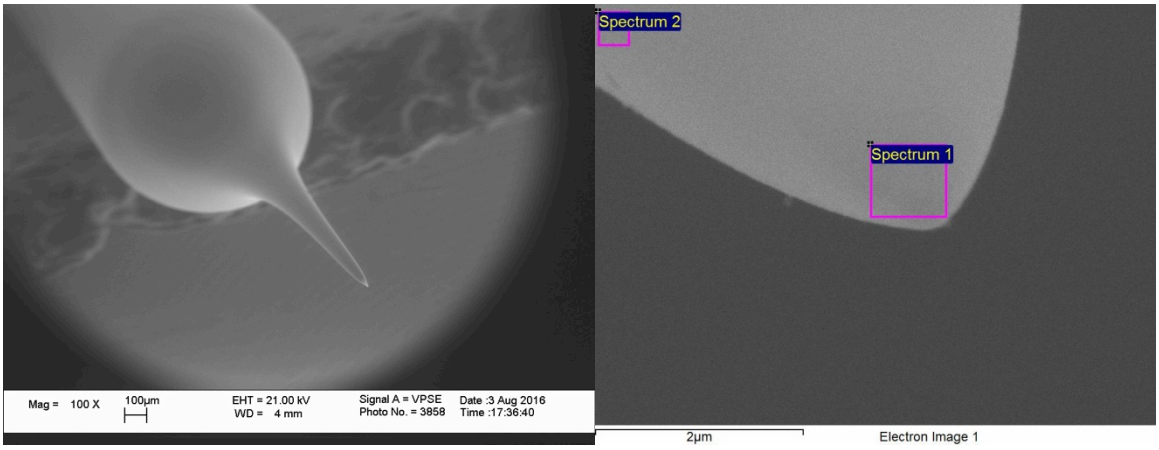


Рисунок 3.3.2.1.2 - Электрохимическая характеристика наноэлектродов по сравнению с Ag/AgCl. Циклические вольтамперограммы в 1 мМ ферроцен-метаноле в PBS для наноэлектрода: черная кривая - исходный углеродный дисковый электрод; синяя кривая - электрод после травления в растворе NaOH; желтая кривая - платинированный электрод [157]

По значению предельного диффузионного тока была проведена оценка размеров наноэлектродов, размер острия которых составляет менее 100 нм. Платинированный наноэлектрод продемонстрировал повышенную каталитическую активность в реакции восстановления кислорода. Осаждение платины лишь незначительно увеличило эффективную геометрическую поверхность наноэлектрода (что подтверждается вольтамперограммой для окисления 1 мМ ферроцен-метанола), однако значительно повысило его каталитическую активность по отношению к восстановлению кислорода (рисунок 3.3.2.1.2).

Для исследования размерных характеристик наноэлектродов проводились микроскпоические измерения острия с использованием СЭМ с анализом EDX на всех этапах: до и после платинизации (рисунок 3.3.2.1.3). Размер электрода не

изменялся на каждом этапе, а платина была обнаружена только на последнем этапе после платинизации.



a b

Спектр	C	Al	Si	Pt	O	Total
Спектр 1	24,90	3,65	0,58	0,53	70,34	100,00
Спектр 2	24,39	3,98	1,46		70,17	100,00

Рисунок 3.3.2.1.3 – СЭМ-изображения платинированного электрода (a - 100x, b - 50000x). На изображении b показаны зоны анализа EDX. Платина была обнаружена только в зоне 1, на кончике электрода. Элементный анализ представлен в таблице [157]

Для количественной оценки активных форм кислорода и демонстрации зависимости тока от концентрации на платиновом электроде провели калибровку анодного тока по H_2O_2 (рисунок 3.3.2.1.4).

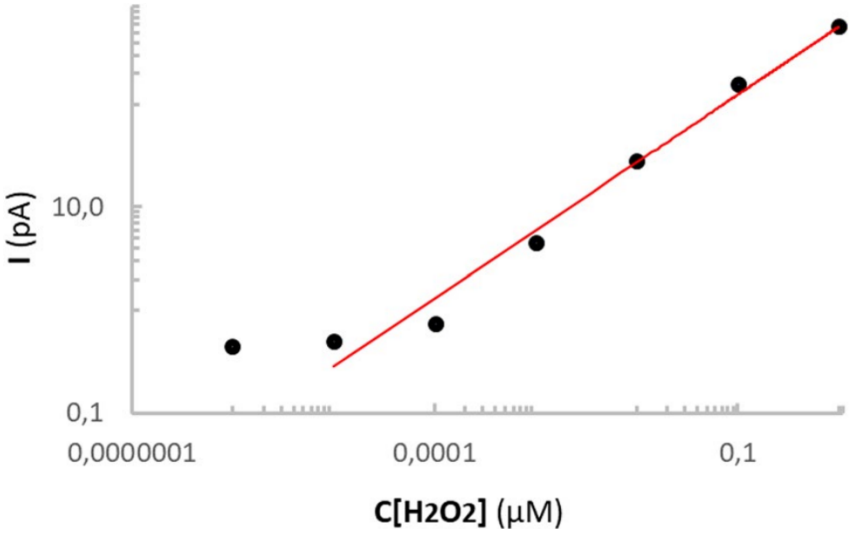


Рисунок 3.3.2.1.4 – График зависимости фарадеевского тока, проходящего через платиновый наноэлектрод, от пероксида водорода (+800 мВ относительно ХЭС)

Были выполнены хроноамперометрические измерения при потенциале +800 мВ в растворе PBS до и после добавления пероксида водорода. Линейная зависимость тока от концентрации была обнаружена в диапазоне от 0,1мкМ до 1 мМ H_2O_2. Предел обнаружения системы не превышает 0,1 мкМ.

Таким образом, мы продемонстрировали возможность изготовления чувствительных платинированных электродов с улучшенной адгезией платины, скрытой внутри вытравленных полостей. Все этапы могут быть легко проконтролированы с помощью электрохимических измерений. Следует отметить, что платинированный электрод может измерять все типы АФК, такие как супероксидный радикал, гидроксильный радикал и перекись водорода при +800 мВ относительно Ag/AgCl [300].

3.3.2.2 Сравнительное исследование токсичности магнитных наночастиц на клетках

Эффективность предложенного метода детекции АФК была продемонстрирована на примере исследования их генерации магнитными наночастицами на основе оксида железа. Ранее было установлено, что инкубация клеток с наночастицами оксида железа (НЧ) приводит к образованию внутриклеточных АФК [301][302]. В нашем исследовании мы использовали наночастицы оксида железа (Fe_3O_4) диаметром 10 нм (Magn) в качестве модели для оценки токсичности НЧ [303]. Для стабилизации НЧ был выбран Pluronic F127, так как было показано, что он повышает биосовместимость НЧ Magn, предотвращая агрегацию, адсорбцию белков [304]. Мы предположили, что покрытие Magn с помощью Pluronic F127 (Magn-Plu) создаст менее токсичную модель НЧ, которая должна вызывать более низкий уровень АФК. Для синтеза НЧ Magn и Magn-Plu использовали метод соосаждения, который является простым и универсальным, позволяя добавлять полимерные стабилизаторы в процессе формирования НЧ. Размер, форма и состав Magn и Magn-Plu были подтверждены методами рентгеновской дифракции (XRD), динамического светорассеяния (DLS) и просвечивающей электронной микроскопии (TEM) [157].

Мы провели сравнительное исследование цитотоксичности НЧ Magn и Magn-Plu путем измерения внутриклеточных АФК с использованием наноэлектродов с улучшенной адгезией платины. Внутриклеточные измерения АФК были выполнены на клеточных линиях HEK293 и LNCaP до и после воздействия НЧ оксида железа размером 10 нм. Схема измерений приведена на рисунке 3.3.2.2.1, использовалась конфигурация с оптическим микроскопом прямого света. Угол наклона микроманипулятора можно регулировать от 0 до 90 градусов относительно горизонтальной плоскости, что позволяет проникать в клетки под объективами с высоким увеличением и коротким рабочим расстоянием. Платинированный наноэлектрод может быть точно введен в отдельную клетку на чашке Петри для мониторинга АФК.

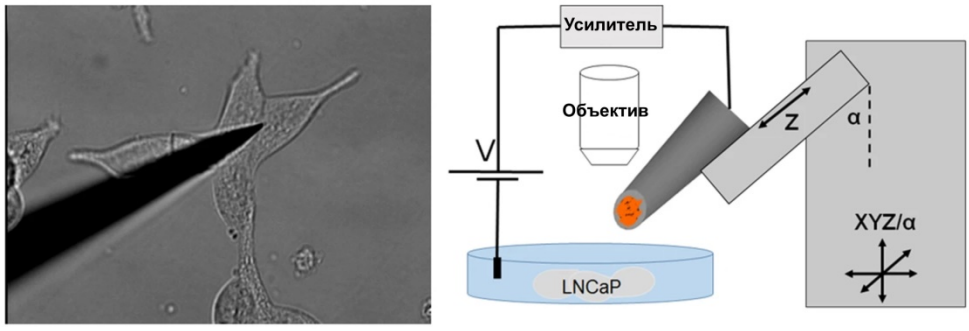


Рисунок 3.3.2.2.1- Внутриклеточные измерения АФК. (a) Фотомикроснимок внутриклеточного измерения активных форм кислорода (АФК) в клетках LNCaP с использованием наноэлектрода. (b) Схематическая диаграмма, демонстрирующая систему внутриклеточных измерений

Во время проникновения в отдельные клетки HEK293 и LNCaP (рисунки 3.3.2.2.2 и 3.3.2.2.3) стабильно получали аналогичные хроноамперометрические профили тока с приложенным потенциалом наноэлектрода +800 мВ относительно Ag/AgCl. Значения токов при измерении метаболитов одной клетки обычно очень малы, и регистрация тока Фарадея, вызванного активными формами кислорода от одной клетки, является сложной задачей [252]. Электрохимический сигнал измеряли с помощью пэт-кламп усилителя, фильтруя его с использованием низкочастотного фильтра на 1000 Гц. В экспериментах мы использовали Axon Digidata 1322 A с частотой дискретизации 500 кГц. В процессе проникновения мы

предположили, что могут возникнуть переходные эффекты, поэтому старались минимизировать фильтрацию и усреднение во время записи. На рисунке 3.3.2.2.3 представлены кривые с усреднением по 100 точкам и без него. Анодный ток быстро увеличивался, затем происходило относительно медленное выравнивание, а после извлечения нанозонда из клетки происходил быстрый возврат к исходному уровню (рисунки 3.3.2.2.2 и 3.3.2.2.3). Проникновение в 5 разных клеток тем же наноэлектродом демонстрировало воспроизводимый внутриклеточный анодный ток. Каталитическая активность платинового электрода между измерениями проверялась, сравнением формы циклических вольтамперограмм в буферном растворе HBSS.

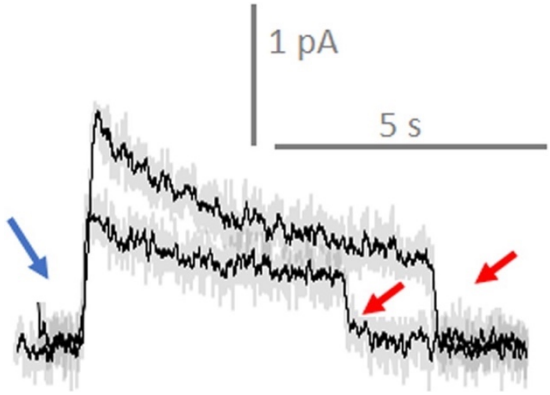


Рисунок 3.3.2.2.2 - Внутриклеточные измерения АФК в отдельных клетках HEK293. Представлены характерные кривые тока наноэлектрода, поляризованного на +800 мВ относительно Ag/AgCl. Красные и синие стрелки указывают, соответственно, моменты проникновения и извлечения. Верхний график - измерения АФК в клетках, инкубированных с Magn NP в течение 3 часов в растворе HBSS, нижний график - измерения АФК в чистых клетках после 3 часов в растворе HBSS. Серые кривые - исходные записи, черные кривые - записи с усреднением по 100 точкам

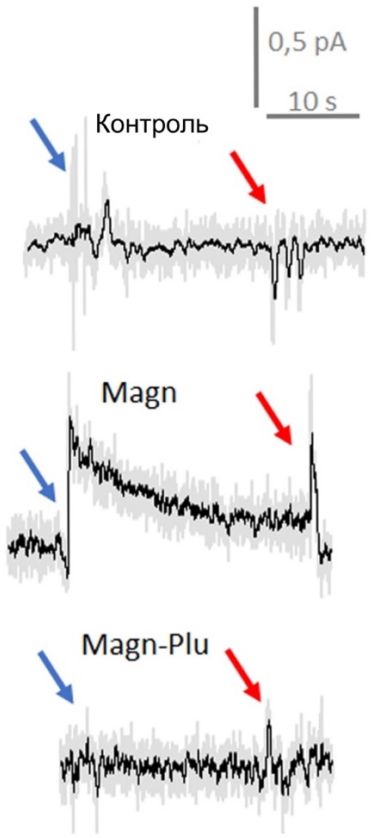


Рисунок 3.3.2.2.3- Внутриклеточные измерения активных форм кислорода (АФК) в отдельных клетках LNCaP. Представлены характерные кривые тока наноэлектрода, поляризованного на +800 мВ относительно Ag/AgCl, внутри и снаружи клеток LNCaP. Красные и синие стрелки указывают, соответственно, моменты проникновения и извлечения. Контроль - внутриклеточные измерения АФК в чистых клетках после 3 часов инкубации в HBSS; Magn - измерения АФК в клетках, инкубированных с Magn NP в течение 3 часов; Magn-Plu - измерения АФК в клетках, инкубированных с Magn-Plu NP в течение 3 часов. Серые кривые - исходные записи, черные кривые - записи с усреднением по 100 точкам

Сравнительные измерения проводились до и после инкубирования клеток HEK293 с Magn в течение 3 часов. Наличие наночастиц Magn значительно увеличило генерацию АФК внутри клетки (рисунок 3.3.2.2.2). Как показано на рисунке 3.3.2.2.2 уровень внутриклеточных АФК составил 0,2 мкМ H_2O_2 до и 0,5 мкМ H_2O_2 после воздействия наночастиц Magn.

Аналогичные измерения были проведены на клетках LNCaP, которые без наночастиц Magn не продуцируют измеряемый уровень АФК (рисунок 3.3.2.2.3 - Контроль). Наличие наночастиц Magn значительно увеличило генерацию АФК внутри клеток (рисунок 3.3.2.2.3 - Magn). Покрытие наночастиц Magn биосовместимым Плуроником F127 уменьшило внутриклеточный уровень АФК до

исходного уровня в HBSS. Наночастицы Magn-Plu не вызвали заметного повышения внутриклеточных АФК в клетках LNCaP после 3-часового воздействия при концентрации 8,56 мкг/мл. Как показано на рисунке 3.3.2.2.3, уровень АФК в клетках LNCaP после воздействия Magn был оценен как 0,1 мкМ H_2O_2. Анализ уровня АФК занимал в среднем менее 30 минут для в одной клеточной линии с использованием одного электрода.

Сравнительное исследование цитотоксичности наночастиц Magn и Magn-Plu проводилось с использованием стандартного метода MTS-тест. Данные показали, что инкубация клеток с наночастицами Magn и Magn-Plu в течение 3 часов не привела к снижению жизнеспособности клеток (рисунок 3.3.2.2.4a). Существенная разница в цитотоксических эффектах наночастиц Magn-Plu и Magn была выявлена после 24-часового воздействия. Наночастицы Magn вызвали гибель 30% клеток ($P < 0,01$) (рисунок 3.3.2.2.4 b).

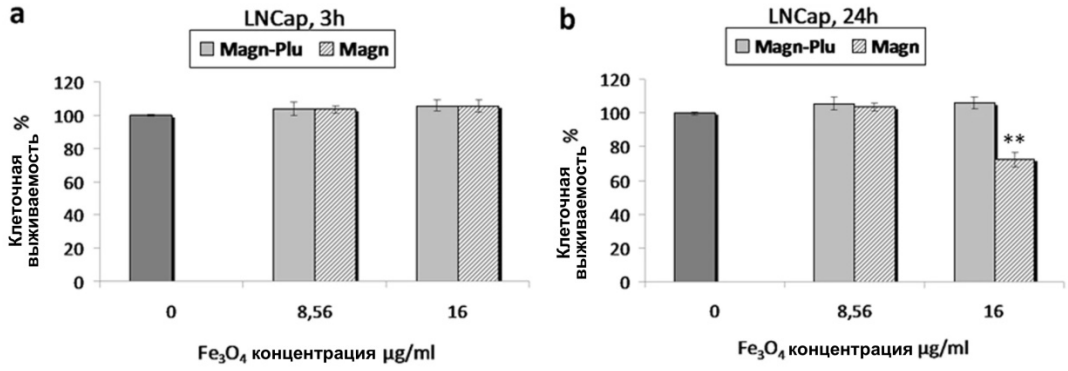


Рисунок 3.3.2.2.4 - Гистограммы жизнеспособности клеток LNCaP после инкубации с двумя типами суперпарамагнитных наночастиц оксида железа в течение 3 часов (a) и 24 часов (b). MTS-тест. Результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение (SD). **P < 0,01 (однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA) по сравнению с контрольными клетками

Более чувствительным лабораторным методом изучения цитотоксичности, связанной с АФК является окрашивания клеток 2′,7′-дихлорфлуоресцеиндиацетатом (H2DCFDA). Этот метод был использован для оценки влияния наночастиц на жизнеспособность клеток. Анализ образцов, полученных при инкубации клеток LNCaP с 8,56 мкг/мл Magn и Magn-Plu в течение 3 часов, а также контрольных образцов клеток, культивированных без наночастиц, выявил единичные клетки, положительно окрашенные H2DCFDA (рисунок

3.3.2.2.5 a-f). Флуоресцентное диффузное окрашивание плоских клеток H2DCFDA было обнаружено только в клетках, инкубированных с наночастицами Magn при концентрации 16 мкг/мл (рисунок 3.3.2.2.5 g, h). Воздействие наночастиц Magn-Plu на клетки в течение 24 часов при концентрациях 8,56 и 16 мкг/мл привело к увеличению количества округлых клеток, окрашенных H2DCFDA (рисунок 3.3.2.2.5 i, j). Однако это увеличение было незначительным. В то же время инкубация клеток с наночастицами Magn вызвала значительное усиление генерации АФК (рисунок 3.3.2.2.5 k, l).

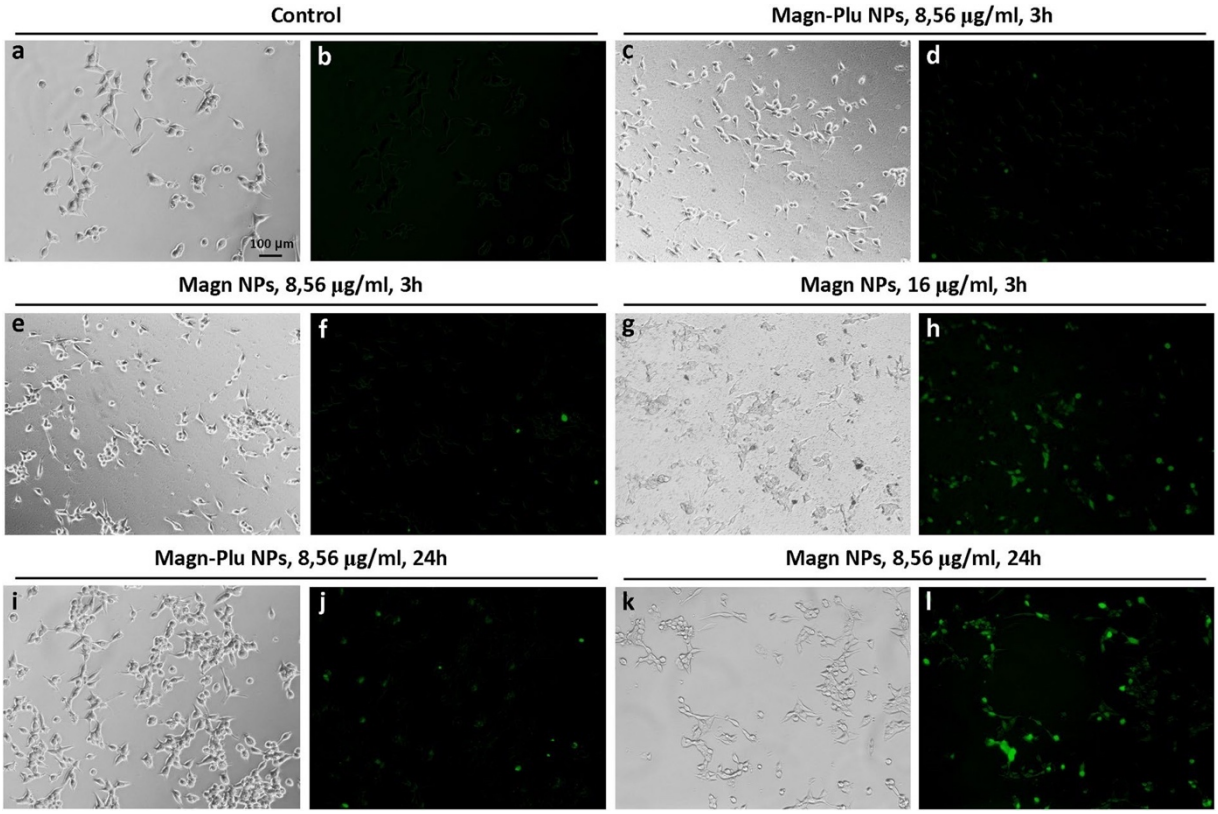


Рисунок 3.3.2.2.5 - Внутрижизненное окрашивание клеток LNCaP с помощью H2DCFDA после инкубации с наночастицами Magn-Plu и Magn в течение 3 и 24 часов. (a, c, e, g, i, k) - фазово-контрастная микроскопия; (b, d, f, h, j, l) - флуоресцентная микроскопия.

На основе полученных изображений были рассчитаны гистограммы интенсивности флуоресценции красителя H2DCFDA в клетках LNCaP после инкубации с наночастицами Magn-Plu и Magn при различных концентрациях и временах. Уровень АФК в контрольных клетках был принят за нулевой. Эти результаты показывают, что содержание АФК в клетках, инкубированных с Magn и Magn-Plu при концентрации 8,56 мкг/мл в течение 3 часов, не может быть

обнаружено этим флуоресцентным методом. Сигналы значительно увеличивались при концентрации наночастиц 16 мкг/мл ($P < 0.01$) (рисунок 3.3.2.2.6). Уровень АФК в клетках, культивированных с Magn-Plu и Magn в течение 24 часов, в среднем был выше, чем после 3 часов инкубации. Следует отметить, что все методы показали более активное образование АФК при воздействии наночастиц Magn, чем Magn-Plu, при инкубации с клетками LNCaP.

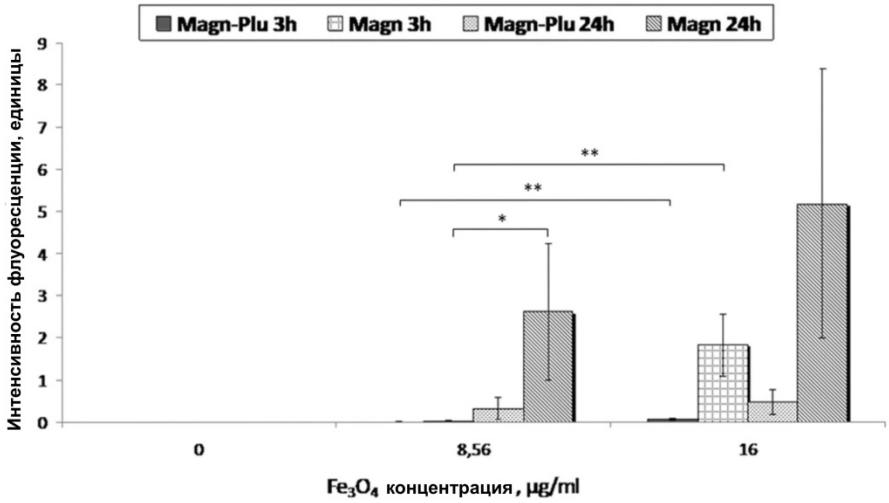


Рисунок 3.3.2.2.6 - Гистограмма интенсивности флуоресценции H2DCFDA в клетках LNCaP после инкубации с наночастицами Magn-Plu и Magn в течение 3 и 24 часов. Результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение (SD). **P < 0.01, *P < 0.05 (односторонний дисперсионный анализ ANOVA)

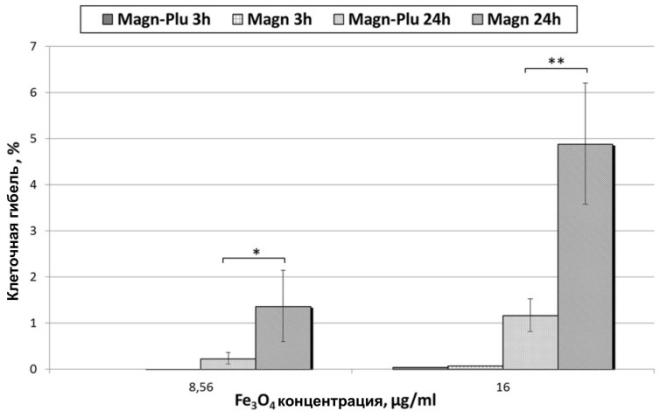


Рисунок 3.3.2.2.7 - Гистограмма процента апоптотических клеток в популяции клеток LNCaP после инкубации с Magn-Plu и Magn NPs в течение 3 и 24 часов. Результаты представлены как средние значения ± SD.

Наконец, было проведено стандартное флуоресцентное внутриклеточное окрашивание клеток с помощью набора обнаружения клеток в стадии апоптоза/некроза. Результаты показали, что обе концентрации (8,56 и 16 мкг/мл) Magn и Magn-Plu НЧ не увеличили процент мертвых клеток после 3 часов совместной инкубации по сравнению с образцами, инкубированными с водой (рисунок 3.3.2.2.7). Лишь после 24 часов воздействия НЧ наблюдалось значительное увеличение числа мертвых клеток в популяции. Следует отметить, что НЧ Magn оказались более токсичными, чем Magn-Plu НЧ.

Поскольку известно, что избыток АФК вызывает апоптоз [305][306], на основе результатов MTS-теста, H2DCFDA и окрашивания на апоптоз/некроз можно сделать вывод, что только НЧ Magn при концентрации 16 мкг/мл, инкубированные с клетками в течение 24 часов, вызвали значительное увеличение АФК, достаточное для индукции клеточной гибели. Тем не менее, даже небольшой рост уровня АФК может привести к повреждению внутриклеточных органелл и ДНК, что в дальнейшем вызовет апоптоз. Таким образом, способность выявлять даже незначительные увеличения уровней АФК в клетках может оказаться полезной для прогнозирования цитотоксического эффекта НЧ.

Сравнивая предложенный в данной работе подход со стандартными методами определения АФК следует отметить, что MTS-тест оказался недостаточно чувствительным, флуоресцентные методы не достигали предела обнаружения, который был выявлен с помощью нашего нового метода. Следует отметить, что флуоресцентный метод требовал также дополнительные стадии пробоподготовки, что делает подобные исследования цитотоксичности более длительными и сложными.

Таким образом, был разработан новый инструмент измерения АФК в отдельных клетках, показана возможность использования данного метода для изучения токсичности наночастиц на основе оксида железа. Метод является простым и экономически эффективным, что делает технологию перспективной для биомедицинского применения.

3.3.2.3 Исследование генерации АФК под действием коммерческих противоопухолевых препаратов *In Vitro* и *In Vivo*

Повышенный уровень АФК я вляется характерной чертой большинства опухолевых клеток. В то же время для поддерживания баланса внутриклеточного уровня АФК опухолевые клетки экспрессируют антиоксидантные белки. Тип и место генерации АФК, а также их локальная концентрация играют ключевую роль в развитии опухоли [307]. Ранее нами было показано, что для опреления уровня АФК *in vitro* существуют, хоть и не совершенные, методы и подходы. Однако, наибольший интерес с точки зрения дальнейшего практического применения представляет высокоточное определение генерации АФК в опухоли *in vivo*. До настоящего исследования такие работы считались неосуществимыми. Следовательно, требуется высокочувствительный метод, позволяющий измерять уровень АФК в конкретных областях опухоли *in vivo*.

Разработаный метод был валидирован на модели рака предстательной железы. В ходе проведения экспериментов были использованы две линии опухолевых клеток 22Rv1 и PC3 (карцинома предстательной железы). Перед измерением внутриклеточной концентрации АФК клетки PC-3 и 22RV1 инкубировали в течение 1 часа в среде при 37°C и 5% CO_2 с противоопухолевыми препаратами в концентрациях, соответствующих IC_{50} для каждой клеточной линии. В качестве тестируемых противоопухолевых средств были выбраны следующие препараты: доксорубицин, доцетаксел, цисплатин и абиратерон (таблица 3.3.2.3.1).

Таблица 3.3.2.3.1- Концентрация применяемых в эксперименте препаратов и их механизмы действия [308]

ЛС	IC_{50} [мкМ]		Механизм действия	Источник
	PC3	22RV1		
Доксорубицин	1,09	0,029	Стабилизирует комплексы ДНК с топоизомеразой II, интеркалирует в структуру ДНК и способствует образованию свободных радикалов.	[212]
Цисплатин	562,82	26,1	Цисплатин образует ковалентные связи как внутри, так и между цепями ДНК, что приводит к ингибированию синтеза белка и нарушению процесса репликации ДНК.	[212]

Доцетаксел	0,081	0,003	Доцетаксел является полусинтетическим таксаном, который связывается с β-тубулиновым компонентом микротрубочек клеток, что приводит к цитотоксическим эффектам и апоптозу клеток на этапе G2-M клеточного цикла.	[212]
Абиратерона ацетат	5,94	22,72	Абиратерон действует как селективный ингибитор 17-альфа-гидроксилазы/C17,20-лиазы (CYP17) - фермента, который синтезируется в яичках, надпочечниках и клетках рака предстательной железы.	[309]

Все препараты, за исключением Абиратерона, способствуют образованию АФК в опухолевых клетках. В качестве положительного контроля использовали пероксид водорода в концентрации 100 мкМ. Внеклеточное введение H_2O_2 вызвало повышение его внутриклеточного уровня, что было зафиксировано на уровне отдельных клеток с помощью наноэлектрода. Этот эксперимент проводился для валидации скрининга препаратов, механизм действия которых напрямую или опсредовано связан с генерацией АФК [308].

Измерения проводились хроноамперометрически при потенциале +0,8 мВ относительно ХСЭ. После проникновения наноэлектрода в клетку наблюдалось увеличение тока, которое затем снижалось со временем (рисунок 3.3.2.3.1). Для валидации метода использовали положительный контроль с H_2O_2 для индукции окислительного клеточного стресса. В ходе измерений наблюдали за процессом через оптический микроскоп и видели, как электрод слегка деформирует клеточную мембрану. Однако при этом клетка не разрушалась и продолжала функционировать, что было подтверждено окраской клеток трипановым синим.

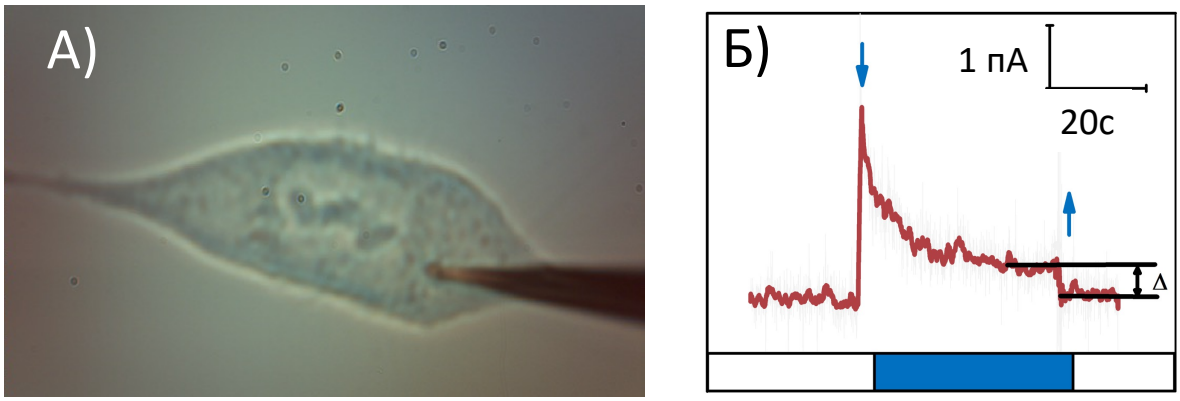
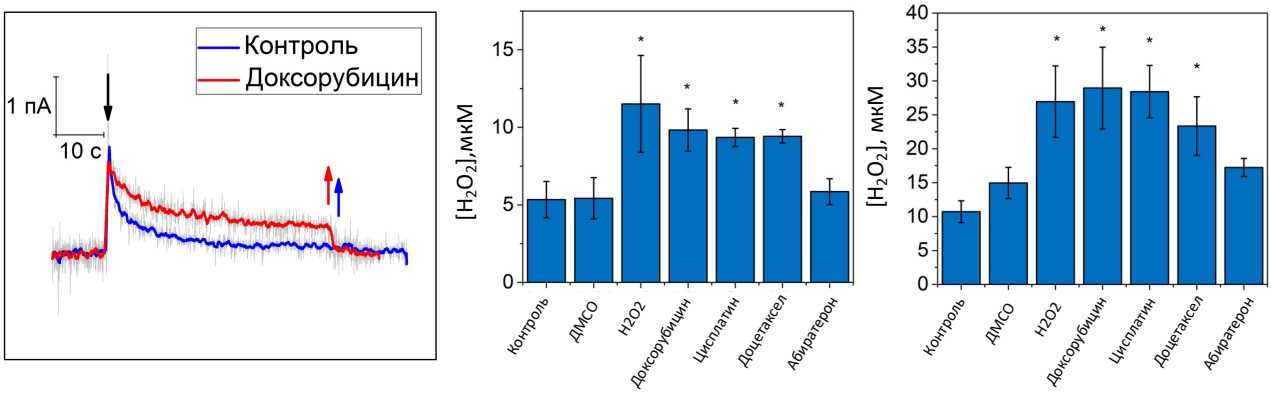


Рисунок 3.3.2.3.1 - Процесс измерения АФК внутри клетки. (А) Микрофотография клетки PC3 с введенным наноэлектродом. (Б) Амперограмма, полученная при измерении внутри клетки. Стрелками указаны моменты проникновения наноэлектрода внутрь клетки и его извлечение. Разница между значениями обозначена символом «дельта». Измерения проводились при постоянном потенциале +800 мВ относительно хлорсеребряного электрода (ХСЭ) [308]

При инкубации раковых клеток с тестируемыми лекарственными средствами наблюдались различные значения тока внутри клеток, что указывает на вариативность концентрации АФК (рисунок 3.3.2.3.2).



А Б В

Рисунок 3.3.2.3.2 - Результаты измерения АФК в клетках под воздействием противоопухолевых препаратов. (А) Амперограммы, полученные внутри контрольной клетки и клетки, инкубированной с доксорубицином. Измерения проведены при постоянном потенциале +800 мВ относительно ХСЭ. Сравнение уровня АФК/АФА в клетках PC-3 (Б) и 22RV1 (В) под воздействием различных противоопухолевых препаратов. Результаты представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего; * - $p < 0,05$ (ANOVA) [308]

На рисунке 3.3.2.3.2 А показано, что уровень тока внутри клетки под воздействием доксорубицина значительно выше, чем в контрольной клетке, что указывает на влияние препарата на клетки и последующую внутриклеточную

продукцию АФК. Аналогичные исследования были проведены с другими противоопухолевыми препаратами. Результаты показали, что уровни АФК в клетках, инкубированных с доксорубицином, цисплатином и доцетакселом, были значительно выше, чем в контрольных клетках PC3 и 22Rv1 (рисунок 3.3.2.3.3). Ранее было показано, что продукция АФК может усиливать цитотоксическое действие таксанов в клетках [301][310–312]. Терапия доцетакселом вызывает увеличение уровня АФК, продуцируемых НАДФН-оксидазой [313]. Цисплатин также индуцирует выработку АФК и H_2O_2 через активацию НАДФН-оксидазы в клетках рака предстательной железы [314]. Абиратерона ацетат (Zytiga, Janssen Biotech), являющийся новым ингибитором цитохрома P450 (CYP) 17, подавляет синтез андрогенов, но не вызывает образование АФК.

Эти результаты демонстрируют, что разработанный метод позволяет определять генерацию АФК клетками под воздействием противоопухолевых препаратов. Преимуществом этого метода является короткое время инкубации с препаратом, что важно при скрининге большого количества лекарственных средств. Помимо использования относительно низких концентраций препарата, высокая чувствительность метода позволяет обнаруживать более низкие концентрации АФК по сравнению с другими методами. Так стандартным методом флуоресцентного анализа с использованием зонда CellROX Deep Red не удалось зарегистрировать образования АФК при добавление противоопухолевых препаратов (рисунок 3.3.2.3.3). Это еще раз подтверждает относительно низкую чувствительность флуоресцентных зондов и перспективность разрабатываемых подходов [314][315][316].

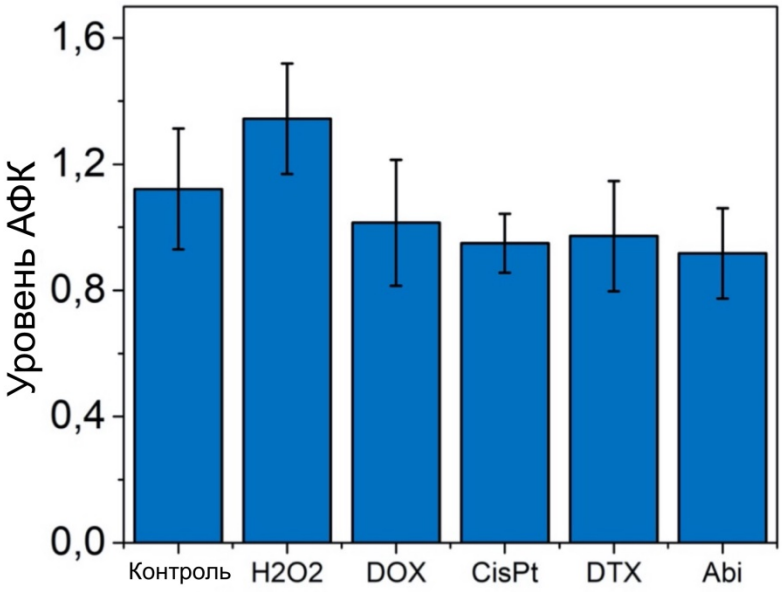


Рисунок 3.3.2.3.3 - Гистограмма интенсивности флуоресценции CellROX в клетках PC-3 после инкубации с перекисью водорода, доксорубицином, цисплатином, доцетакселом и абиратерона ацетатом. Данные обработаны с помощью программы ImageJ. Результаты представлены как средние значения ± стандартная ошибка [308]

Наиболее важными с практической точки зрения являются исследования уровня АФК внутри опухоли мыши *in vivo*. Мыши с имплантированными опухолями 4T1 были предоставлены к.х.н. Абакумовым М.А. и к.б.н. Гараниной А.С. Основная идея эксперимента заключалась в валидации метода *in vivo* на модели опухоли. Для этого был выбран известный противоопухолевый препарат - доксорубицин, вызывающий окислительный стресс, что ранее было продемонстрировано на клетках PC-3 и 22Rv1. Липосомальный доксорубицин вводили внутривенно группе мышей (n=3), и через 24 часа оценивали уровень АФК внутри опухоли на глубинах 200, 600, 1500 и 2000 мкм, сравнивая результаты с группой контрольных животных, которым вводили буферный раствор PBS.

Для экспериментов на мышах с опухолями требовалась точная настройка микроманипулятора для позиционирования электродов, а также оптимизация системы для минимизации помех электрических сигналов, вызванных дыханием и движениями мыши. После подготовки мыши электрод подводили к опухоли под углом 45 градусов и вводили в неё с шагом 200 мкм. На глубине 1500 мкм были измерены циклические вольтамперограммы (ЦВ) (от -800 до +800 мВ отн. Ag/AgCl,

скорость развертки 400 мВ/с) (рисунок 3.3.2.3.4). В контрольной группе мышей при проникновении в опухоль на глубину наблюдалось небольшое снижение тока, что связано с гипоксией при потенциале +800 мВ (отн. Ag/AgCl). В группе мышей, получивших доксорубицин, значения тока значительно увеличивались на глубине 1000-1500 мкм. Поскольку опухоль является неоднородной, проникновение доксорубицина варьируется по её частям. Было показано, что анодный ток существенно увеличился в опухолях мышей, которым вводили доксорубицин, что свидетельствует о повышении уровня АФК (рисунок 3.3.2.3.4).

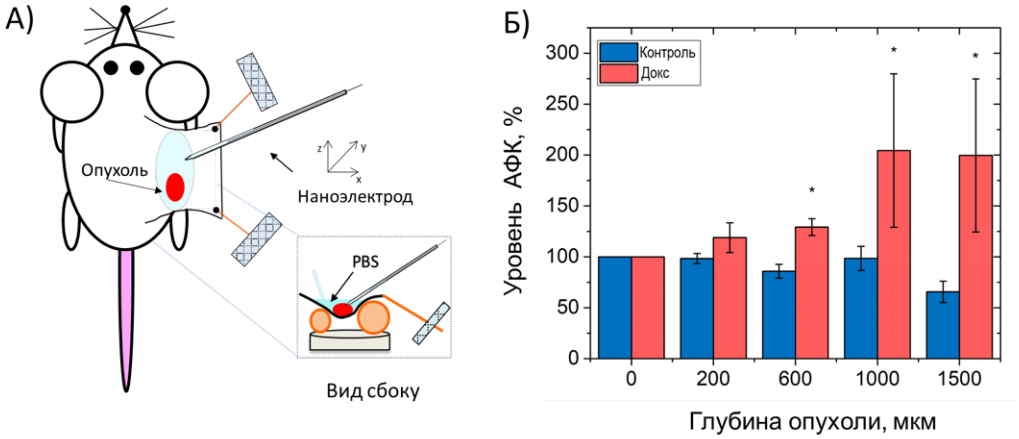


Рисунок 3.3.2.3.4 - *In vivo* измерения АФК внутри опухоли мыши. (А) Схема проведения эксперимента. (Б) Профиль АФК внутри опухолей мыши. Представлены данные по двум группам мышей: контрольная группа и группа мышей, получавших липосомальный доксорубицин в дозе 2 мг/кг [308]

После проведения электрохимических измерений опухоли у мышей удаляли и исследовали накопление доксорубицина с использованием флуоресцентной системы визуализации IVIS ex vivo. Результаты показали, что флуоресценция доксорубицина была значительно выше по сравнению с автофлуоресценцией контрольных опухолей, что подтверждает накопление доксорубицина в опухолях мышей, получавших липосомальный доксорубицин (рисунок 3.3.2.3.5).

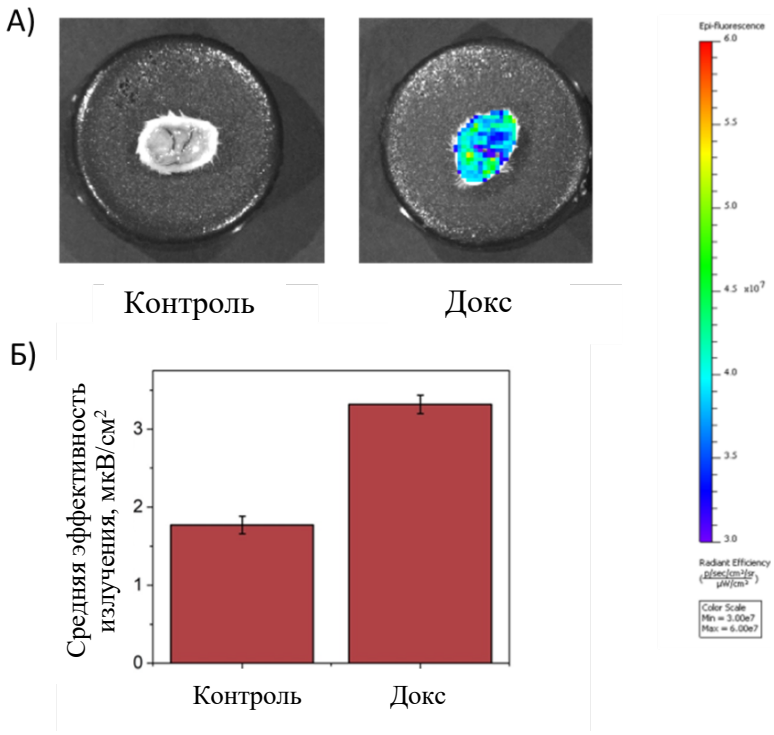


Рисунок 3.3.2.3.5 – (А) IVIS-изображения опухолей мышей ex vivo. (Б) График средней эффективности излучения опухолей, визуализированных ex vivo, у мышей, получавших доксорубицин, и у контрольных животных [308]

Таким образом, было показано, что внутривенное введение доксорубицина приводит к увеличению уровня АФК внутри опухоли почти в два раза на глубине 1000 и 1500 мкм. С помощью флуоресцентной системы также продемонстрировано, что доксорубицин действительно накапливается в опухоли мышей через 24 часа после введения.

Показано, что разработанный подход можно использовать для прижизненного измерения уровня АФК у мышей с имплантированными опухолями. Предложенный метод может быть использован для оценки эффективности противоопухолевой терапии, исследования доставки и накоплений химиотерапевтических средств, а также изучения механизмов действия препаратов, воздействующих на пути, связанные с АФК.

3.3.2.4 Исследование эффективности новых таргетных препаратов с помощью наноэлектродов с повышенной адгезией платины

На следующем этапе, для демонстрации универсальности предложенного метода определения АФК, был протестирован ряд таргетных препаратов, представляющих собой конъюгаты векторов, специфичных к рецепторам на

поверхности клеток, таким как рецептор простат-специфичного мембранного антигена (ПСМА) и асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R) [317][318][319][320][321].

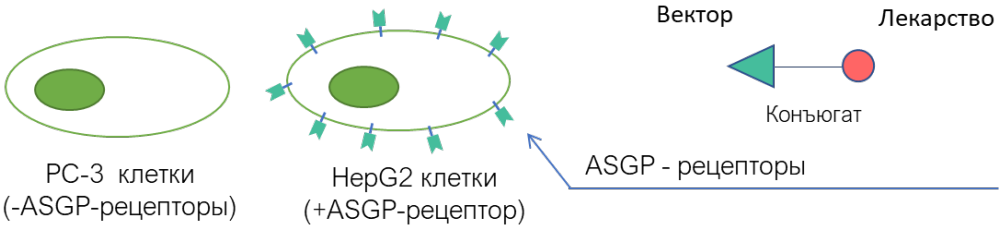


Рисунок 3.3.2.4.1 - Схематическое изображение взаимодействия вектора, включенного в таргетное соединение, с лигандами на поверхности клеток [317]

ASGP-R и галактозамин (GalNAc) взаимодействуют и играют ключевую роль в регуляции метаболизма гликопротеинов и липопротеинов в организме. ASGP-R содержит специфические связывающие участки, распознающие GalNAc, что приводит к образованию комплекса между рецептором и гликопротеином с последующим переносом внутрь клетки.

Этот процесс связывания и внутриклеточного транспорта является важной частью цикла гликопротеинов и липопротеинов в печени. Гепатоциты используют этот механизм для захвата гликопротеинов из кровотока, включая определенные плазменные белки, с их последующей переработкой, что является важной функцией системы очистки организма.

Кроме того, взаимодействие ASGP-R с GalNAc используется для целевой доставки лекарств и генов в печень, что является основой для разработки таргетных препаратов, способных напрямую доставляться в клетки печени. Это повышает точность и эффективность лечения различных заболеваний, особенно связанных с печенью.

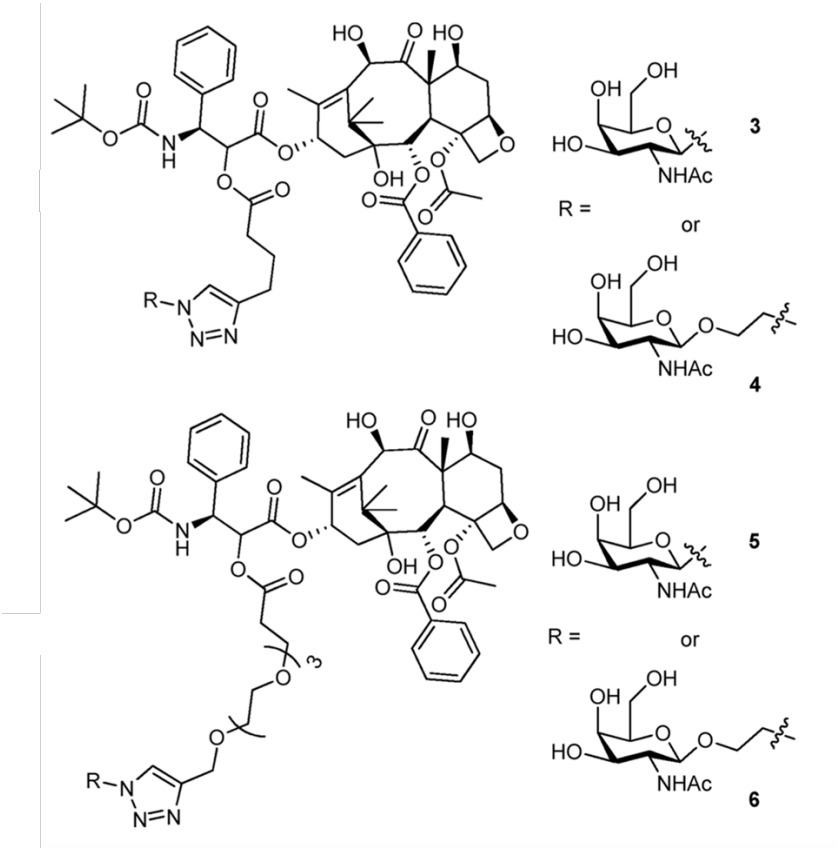


Рисунок 3.3.2.4.2 - Конъюгаты, специфичные к рецептору ASGP-R, на основе доцетаксела [317]

Были исследованы соединения, специфичные к рецептору ASGP-R, на основе доцетаксела. Изучено влияние четырёх конъюгатов доцетаксела с вектором GalNAc, отличающихся длиной углеродной цепи между доцетакселем и GalNAc (рисунок 3.3.2.4.2). Эксперименты проводились на двух клеточных линиях: HEPG2, экспрессирующих рецепторы ASGP-R, и PC3, не содержащих этих рецепторов. В качестве контрольного соединения использовался непосредственно доцетаксел [317].

После инкубации конъюгатов и доцетаксела с клетками PC3 наблюдалось повышение уровня АФК, за исключением образца с конъюгатом 3. Однако общий уровень АФК не превышал значения, зафиксированного в клетках под воздействием доцетаксела. Это позволяет предположить, что проникновение конъюгатов 3-6 в клетки PC-3 аналогично проникновению доцетаксела (рисунок 3.3.2.4.3 А).

При инкубации конъюгатов с клетками HepG2 (ASGP-R+) также было зарегистрировано значительное увеличение уровня АФК по сравнению с

контрольными клетками более чем в 1,5 раза. При сравнении с уровнем АФК в клетках, инкубированных с доцетакселем, конъюгат 6 вызвал значительное увеличение уровня АФК на 55% (рисунок 3.3.2.4.3 Б), что свидетельствует о его улучшенном проникновении внутрь клетки.

Для оценки рецепторно-опосредованного эндоцитоза проводили ингибирование ASGP-R, инкубируя клетки с избыточным количеством GalNAc (100 мкМ). При добавлении соединения 6 уровень АФК уменьшился более чем в 1,6 раза по сравнению с экспериментом без ингибирования ASGP-R. Это указывает на то, что конъюгат 6 проникает в клетку благодаря механизму рецепторно-опосредованного эндоцитоза (рисунок 3.3.2.4.3 В).

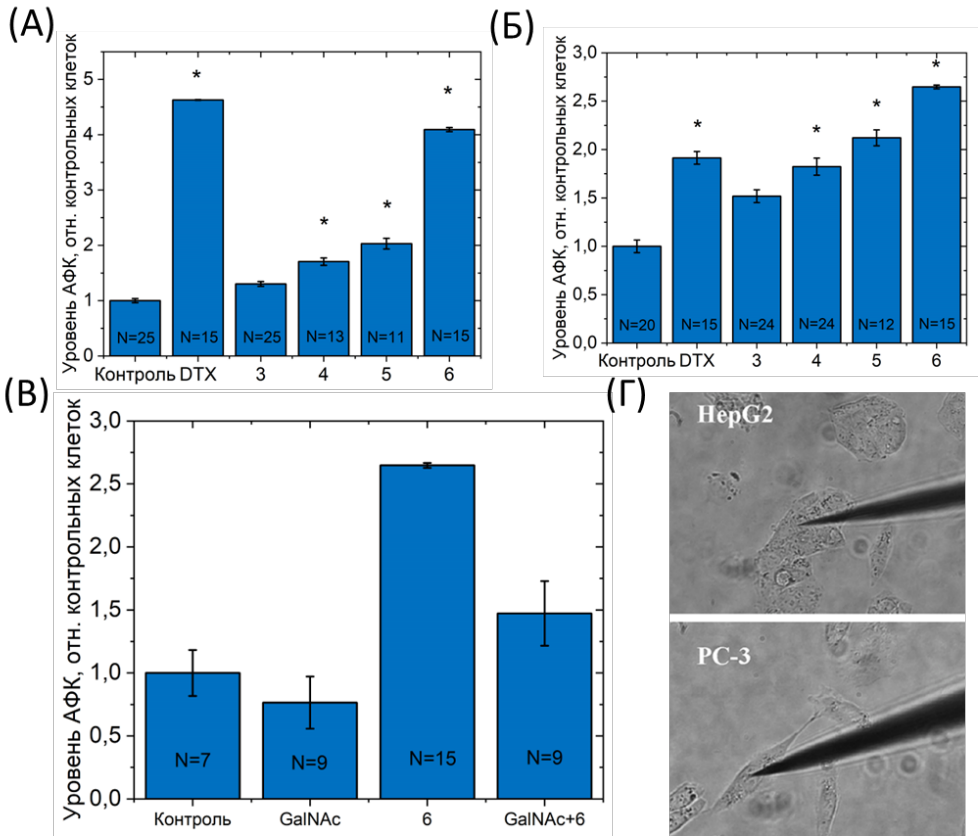


Рисунок 3.3.2.4.3 - Измерения уровня АФК внутри клеток: PC-3 (А), HepG2 (Б) и HepG2 в присутствии 100 мкМ GalNAc (В), обработанных конъюгатами 3–6 или доцетакселем (DTX) в течение 1 часа. Количество измеренных клеток указано на графике: * - $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ) по сравнению с контролем [317]

С помощью разработанных сенсоров, чувствительных к АФК, удалось подтвердить эффективность новых низкомолекулярных конъюгатов бетулина и N-ацетил-D-галактозамина в качестве агентов, воздействующих на гепатоциты, а

также их потенциал в качестве терапевтических средств против гепатоцеллюлярной карциномы (рисунок 3.3.2.4.4) [321].

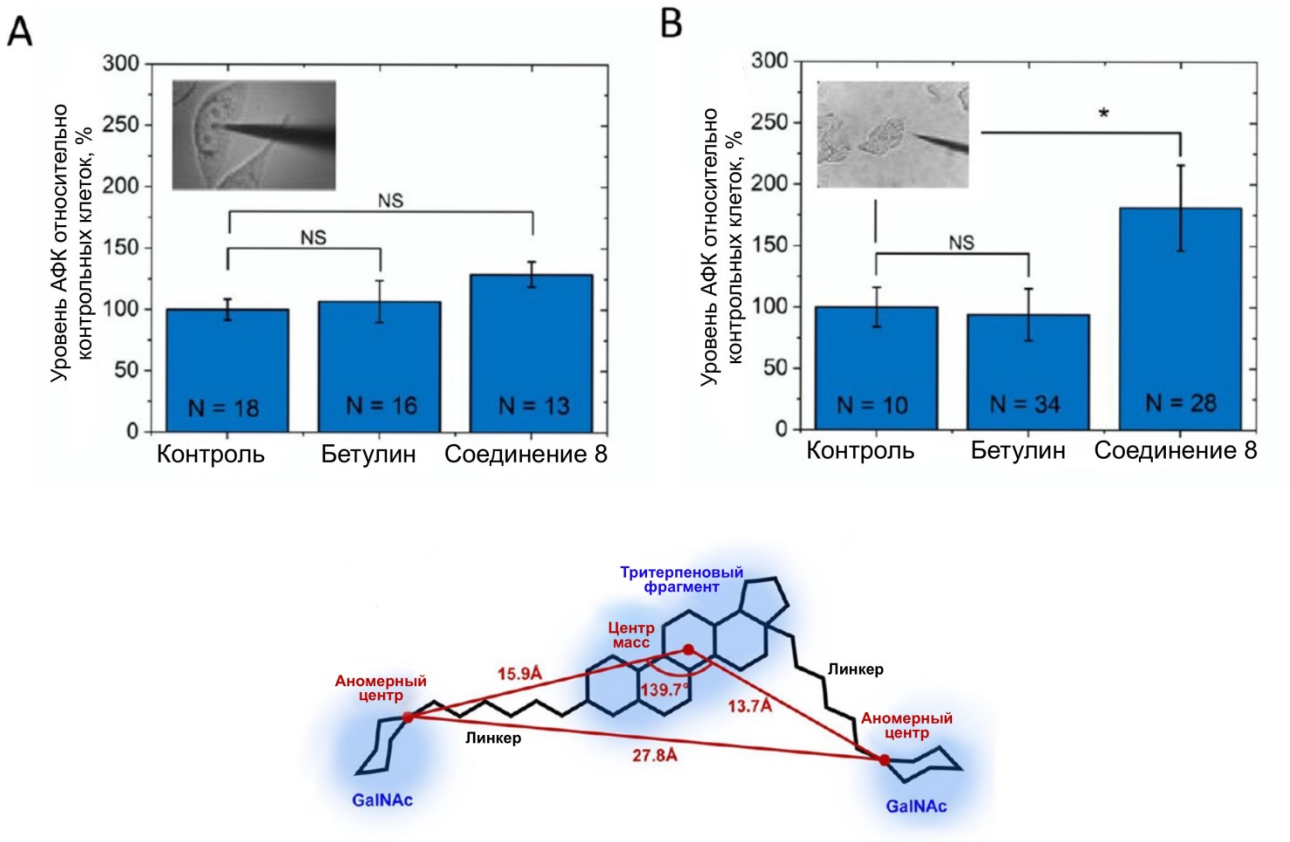


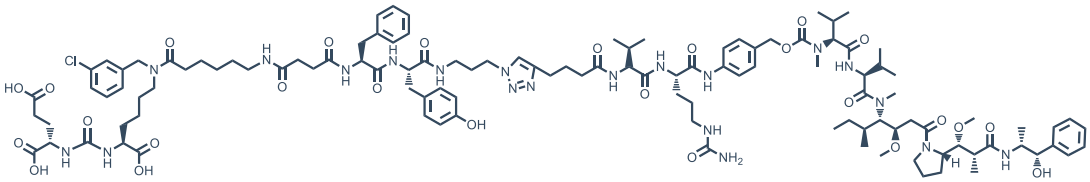
Рисунок 3.3.2.4.4 - Измерение уровня АФК внутри клеток PC-3 (A) и HepG2 (B), обработанных соединением b, бетулином или DMSO в течение 1 часа. На графике показано количество измеренных клеток (N) в эксперименте, а результаты представлены в виде средних значений с ошибкой SE. В качестве контрольного образца использовались необработанные клетки. (*) $p < 0,05$, NS - незначимо (однофакторный дисперсионный анализ) [321]

Кратковременная инкубация двух различных клеточных линий с тестируемыми соединениями продемонстрировала заметные различия в генерации АФК. После обработки клеток PC3 бетулином и соединением b оба агента оказали схожее воздействие на клетки рака предстательной железы (рисунок 3.3.2.4.4 A). Более того, не было зафиксировано увеличения уровня АФК для обоих тритерпеноидов по сравнению с контролем. В отличие от этого, двувалентный гликоконъюгат b привел к значительному повышению уровня АФК в клетках HepG2, тогда как в случае бетулина и контрольных клеток статистически значимых изменений не наблюдалось (рисунок 3.3.2.4.4 B). На основании этих данных можно

предположить, что соединение 8 является перспективным агентом для проведения доклинических и клинических испытаний.

В качестве препаратов, специфичных к ПСМА-рецепторам, были выбраны конъюгаты с активным веществом на основе доцетакселя [319] и монометилауристатина Е (ММАЕ) [320]. Ранее была продемонстрирована эффективность этих ПСМА-векторов для доставки веществ с помощью флуоресцентных меток в экспериментах *in vivo* [322]. Конъюгаты для терапии включали часть, специфичную к ПСМА-рецепторам, и непосредственно активное вещество (рисунок 3.3.2.4.5). Для оценки эффективности проникновения и воздействия препарата на клетки были выбраны клеточные линии аденокарциномы предстательной железы, экспрессирующие ПСМА-рецепторы на поверхности (22Rv1), а также не экспрессирующие (PC3).

А)



Б)

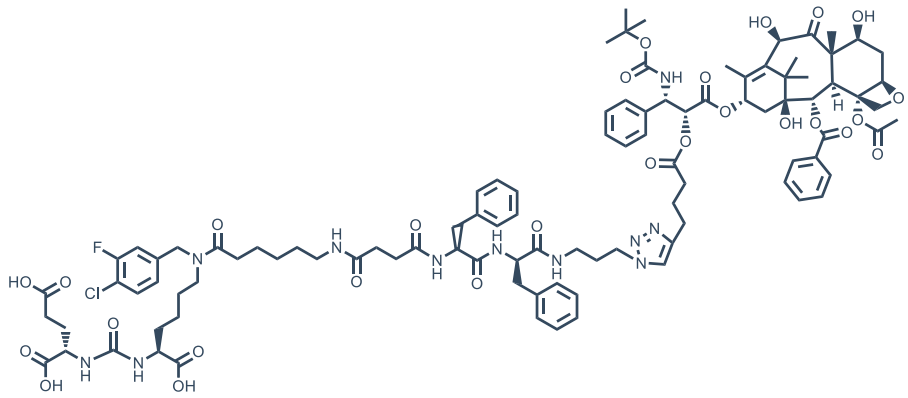


Рисунок 3.3.2.4.5 - Структурные формулы конъюгатов, специфичных к ПСМА-рецепторам на основе (А) ММАЕ и (Б) доцетакселя [319], [320].

Многие исследования продемонстрировали важность образования АФК как механизма воздействия на опухолевые клетки таксанами. Первоначально было изучено влияние доцетаксела и его конъюгата на внутриклеточную продукцию АФК. Клетки были инкубированы в течение 1 часа при 37°C с этими препаратами,

чтобы обеспечить их проникновение в одиночные раковые клетки. После инкубации клеток PC3 с доцетакселом и его конъюгатом (ПСМА-Доц) статистически значимых изменений концентрации АФК по сравнению с контролем не наблюдалось (рисунок 3.3.2.4.5 А). Этот факт свидетельствует об резистентности данной клеточной линии к этим веществам в течение 1 часа.

В случае клеточной линии 22Rv1 наблюдалось достоверное увеличение уровня АФК при воздействии как доцетакселя, так и его конъюгата. Конъюгат ПСМА-Доц, благодаря своей специфичности к ПСМА-рецепторам, вызвал значительное усиление окислительного стресса, что привело к апоптозу в клетках 22Rv1 (рисунок 3.3.2.4.6).

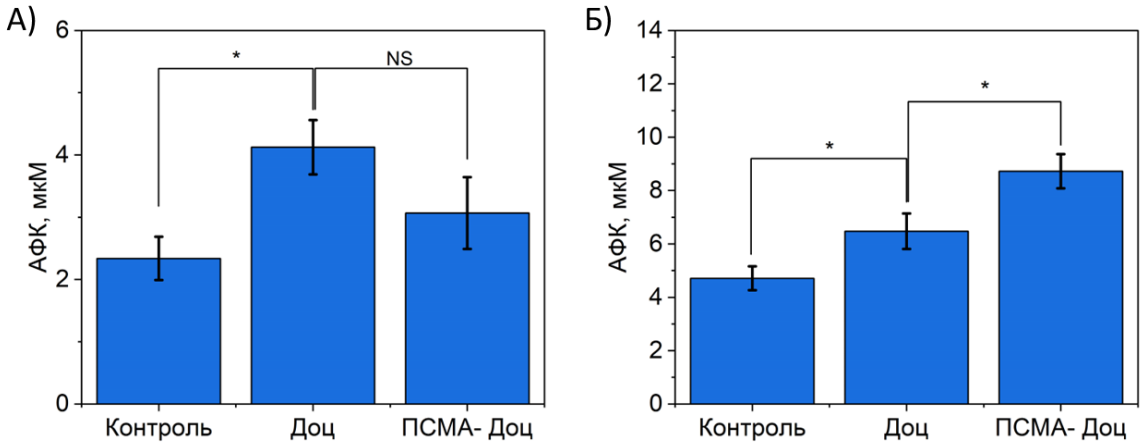


Рисунок 3.3.2.4.6 - Сравнение уровня АФК внутри клеток PC3 (А) и 22Rv1 (Б) под влиянием доцетакселя и ПСМА-доцетакселя. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. * - p <0,05 (однофакторный дисперсионный анализ) [319]

В течение часа значительное повышение уровня АФК наблюдалось при добавлении ММАЕ и ПСМА-ММАЕ. Следует отметить, что уровень АФК при воздействии ПСМА-ММАЕ превышал эффект самого ММАЕ и был в два раза выше значений для контрольной клеточной линии без препаратов, что указывает на высокую эффективность этого вещества для ПСМА-позитивной клеточной линии (рисунок 3.3.2.4.6 А). Эксперименты на клеточной линии 22Rv1 также подтвердили эффективность ММАЕ и ПСМА-ММАЕ. Уровень АФК при воздействии ПСМА-ММАЕ увеличился в 3 раза по сравнению с контролем. Таким

образом, ММАЕ и ПСМА-ММАЕ эффективно индуцировали окислительный стресс в обеих клеточных культурах, вызывая гибель клеток (рисунок 3.3.2.4.7 Б).

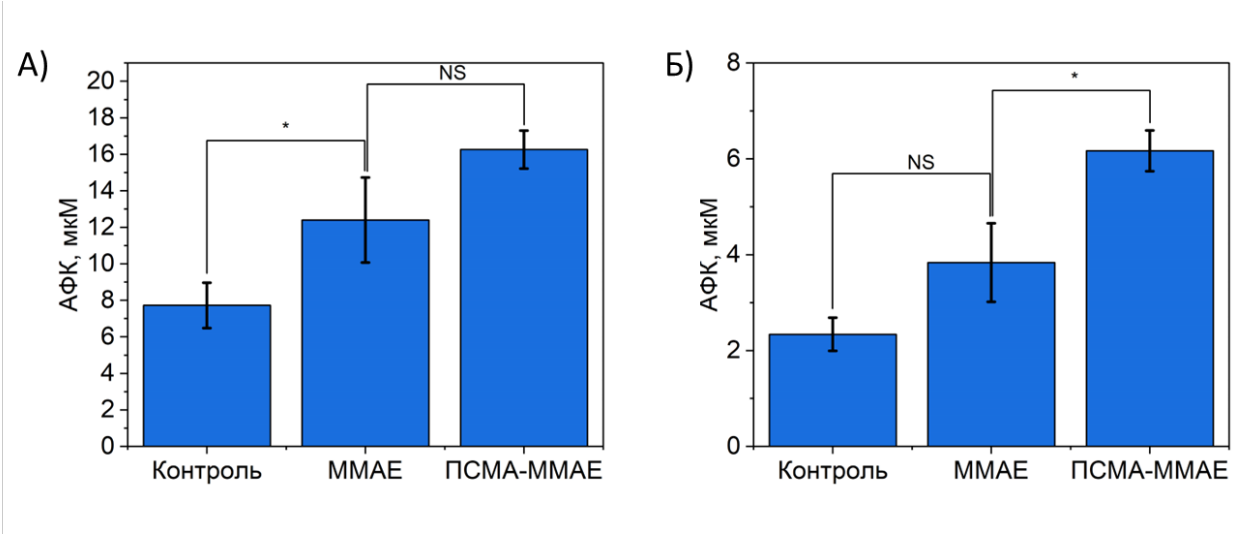


Рисунок 3.3.2.4.7 - Сравнение уровня АФК внутри клеток PC3 (А) и 22Rv1 (Б) под влиянием ММАЕ и ПСМА-ММАЕ. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. *: $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ) [320].

Таким образом, на примере таргетных препаратов, с помощью разработанной методики было показано, что они могут проникать в клетки при наличии соответствующих рецепторов значительно эффективнее своих предшественников. Результаты измерений АФК и проникновения в клетки были подтверждены с использованием флуоресцентных и других методов. Данные представлены в опубликованных статьях.

3.3.3 Исследование генерации АФК в режиме реального времени в единичных клетках под действием внешних факторов:

3.3.3.1 Исследование эффективности образования АФК при ФДТ за счет облучения флавинмононуклеотида в клетках меланомы

Меланома является одной из наиболее агрессивных и смертельных форм рака. Фотодинамическая терапия (ФДТ) - клинически утвержденный метод лечения онкологических патологий, включая немеланомный рак кожи. Однако большинство традиционных фотосенсибилизаторов оказываются недостаточно эффективными в борьбе с меланомой из-за возможной темновой токсичности при высоких концентрациях препаратов, пигментации меланина и активации

антиоксидантных механизмов защиты. В этом исследовании нами изучена эффективность генерации активных форм кислорода под воздействием синего света на флавинмононуклеотид (ФМН) (рисунок 3.3.3.1.1 А), водорастворимую форму рибофлавина (витамин В2), как перспективный агент для фотодинамической терапии меланомы [323]. Рибофлавин, или витамин В2, служит кофактором для множества флавопротеиновых ферментных реакций и может выступать как эндогенный фотосенсибилизатор. Рибофлавин и его водорастворимая форма, флавинмононуклеотид, имеют две полосы поглощения с максимумами на 375 и 450 нм.

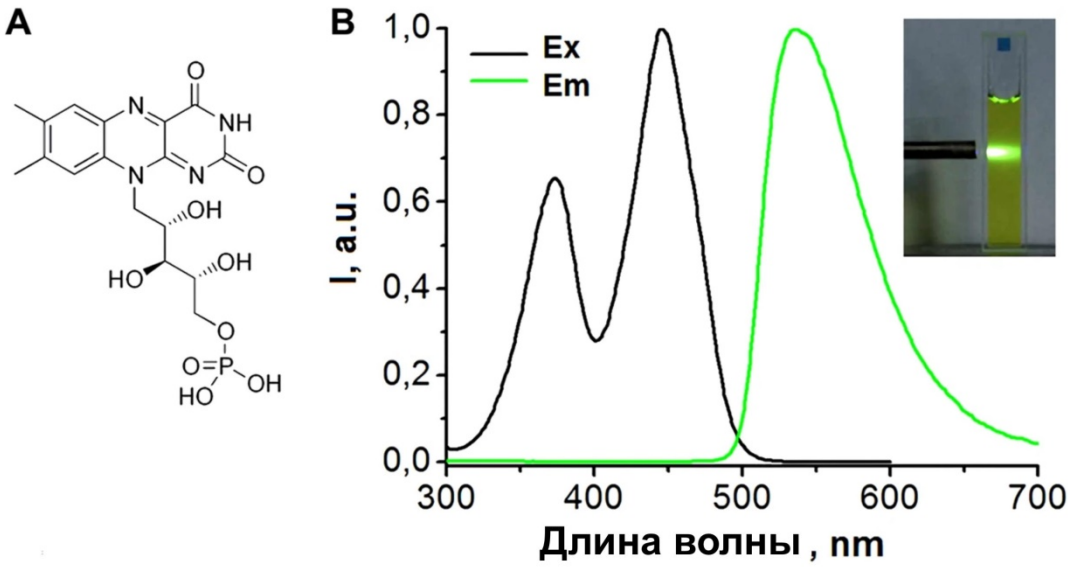


Рисунок 3.3.3.1.1 - Формула (А), а также спектры возбуждения и эмиссии ФМН в PBS (pH 7,4) (В); фотолюминесценция ФМН при возбуждении на 450 нм показана во вставке [323]

В этом исследовании нами впервые был применен стабильный электрохимический зонд, основанный на платинированных углеродных наноэлектродах, для измерения уровня внутриклеточных АФК во время фотодинамической терапии (ФДТ). Для эксперимента клетки меланомы А375 и Mel IL инкубировали в темноте в течение 30 минут с 100 мкМ флавинмононуклеотида (ФМН). После инкубации несвязанный ФМН был удален тройным промыванием PBS для исключения влияния внеклеточного ФМН на точность измерений. Далее, с помощью точного микроманипулятора,

платинированный наноэлектрод аккуратно вводили в отдельную клетку под контролем оптического микроскопа. Первоначально введение наноэлектрода вызвало резкое увеличение уровня АФК из-за механического стресса, однако, благодаря малым размерам (диаметр около 100 нм) и игольчатой форме, наноэлектрод минимально повреждал клетку, и уровень АФК возвращался к исходному значению в течение 10-50 секунд.

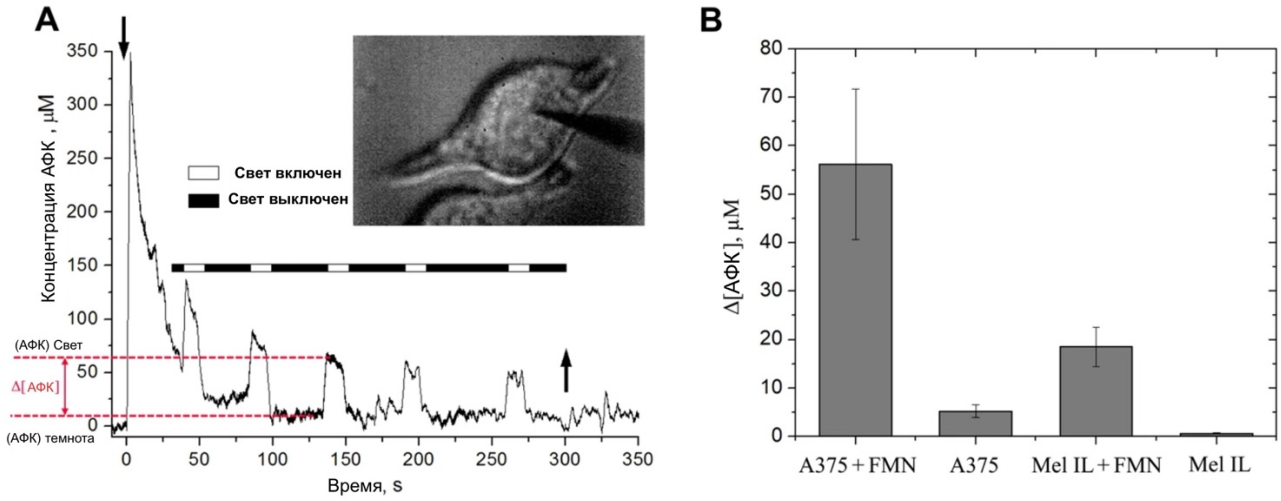


Рисунок 3.3.3.1.2 - Электрохимическое измерение АФК в клетках меланомы: определение уровня АФК, генерируемых в клетках меланомы A375 после предварительной инкубации с 100 мкМ ФМН (A). Черная шкала указывает на отсутствие света, белая шкала - на включение света. Моменты введения и извлечения электрода из клетки обозначены стрелками вниз и вверх соответственно; в правом верхнем углу показано изображение наноэлектрода, введенного в клетку. Изменение уровня АФК под воздействием светового облучения рассчитывалось по формуле: Δ[АФК]=[АФК]свет−[АФК]темнота. Сравнение Δ[АФК], измеренных в облученных синим светом клетках меланомы A375 и Mel IL, как предварительно инкубированных с ФМН, так и контрольных (B). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего, N=5 для клеток, инкубированных с ФМН, и N=3 для контрольных клеток [323]

Важно отметить, что в клетках A375 всплеск АФК был в 10 раз выше, чем в клетках Mel IL (рисунок 3.3.3.1.3), что можно объяснить антиоксидантной активностью меланина в клетках Mel IL. Измерения АФК, индуцированные светом, начинались, когда сигнал достигал плато, что можно рассматривать как фоновый уровень АФК для этой клеточной линии. Фотоактивация проводилась с использованием стандартной светодиодной (LED) установки. Облучение светом приводило к быстрому увеличению продукции АФК, что можно было

количественно оценить (рисунок 3.3.2.5.1.3 A). В результате клетки A375, предварительно инкубированные с 100 мкМ ФМН, продуцировали 56±15 мкМ АФК, в то время как клетки Mel IL – всего 18,5±4 мкМ (рисунок 3.3.2.5.1.3 B) [323].

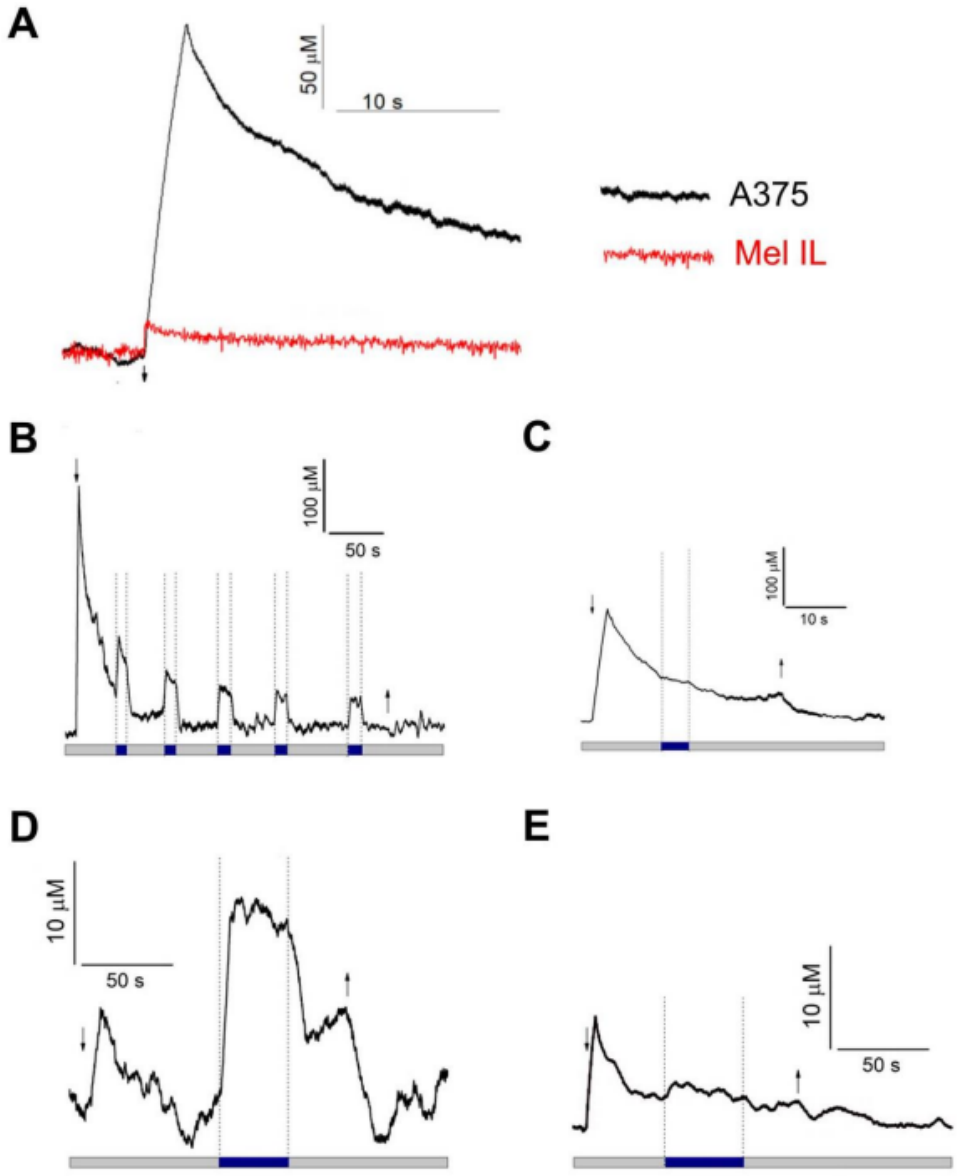


Рисунок 3.3.3.1.3 - Продукция активных форм кислорода (АФК) в клетках Mel IL и A375, измеренная с использованием электрохимического зонда: всплеск АФК, вызванный механическим воздействием, наблюдаемый после введения платинированного углеродного наноэлектрода в клетку (A). Кинетика изменения уровня АФК в клетках A375, предварительно инкубированных с 100 мкМ ФМН (B), и без предварительной инкубации с ФМН (C). Кинетика АФК в клетках Mel IL, инкубированных с 100 мкМ ФМН (D), и без инкубации с ФМН (E). Серая шкала указывает на отсутствие света, синяя шкала - на световое облучение. Введение и извлечение наноэлектрода обозначены стрелками вниз и вверх соответственно [323]

Прекращение облучения светом приводило к немедленному возврату уровня АФК к фоновому внутриклеточному уровню из-за короткого времени жизни АФК. Этот подход позволил контролировать продукцию АФК методом электрохимического измерения в режиме реального времени до и в процессе облучения, что невозможно при использовании традиционных флуоресцентных методов. Облучение контрольных клеток (без инкубации с ФМН) вызвало незначительные изменения уровня АФК (5±1 мкМ для клеток A375 и 1±0,5 мкМ для клеток Mel IL), что подтверждает роль ФМН в качестве источника АФК. Также стоит отметить, что измерение АФК с использованием электрохимического зонда обладает высокой чувствительностью и позволяет обнаруживать концентрации АФК менее 1 мкМ.

3.3.3.2 Исследования активации генерации АФК нейтрофилами человека при воздействии бактерий

Биологическая часть эксперимента была проведена в сотрудничестве с группой профессора Плесковой Светланы Николаевны из Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Нейтрофилы играют ключевую роль в иммунной системе, участвуя в процессе фагоцитоза. Они вырабатывают АФК для уничтожения бактерий и других патогенов, обеспечивая защиту организма.

Основная цель данного эксперимента заключалась в расширении возможностей использования разработанного сенсора для внутриклеточных измерений. После ввода платинового электрода внутрь нейтрофила, адгезированного к поверхности чашки Петри (рисунок 3.3.3.2.1), фаголизосомы нейтрофила случайным образом взаимодействовали с поверхностью платинового наноэлектрода (рисунок 3.3.3.2.2 А).

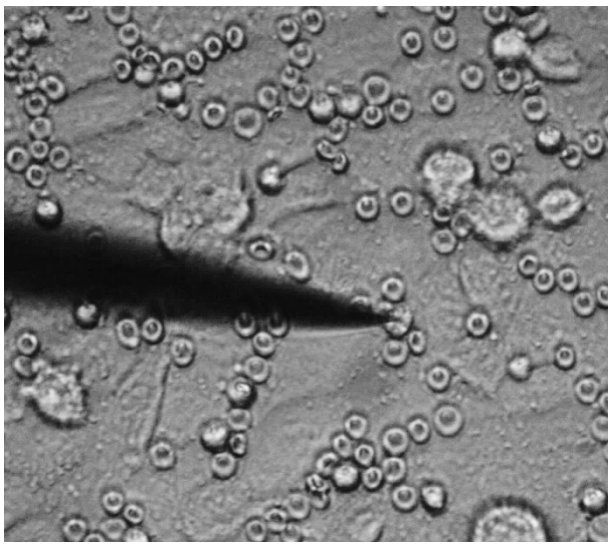


Рисунок 3.3.3.2.1 - Микрофотография нейтрофилов с подведенным к одному из них наноэлектродом [324]

Окисление активных форм кислорода, высвобождаемых из отдельных везикул, приводило к увеличению тока на электроде. Измерения проводились кулонометрически, и площадь под амперограммой отражала полное окисление АФК в каждой везикуле (рисунок 3.3.3.2.2 Б, В) [324].

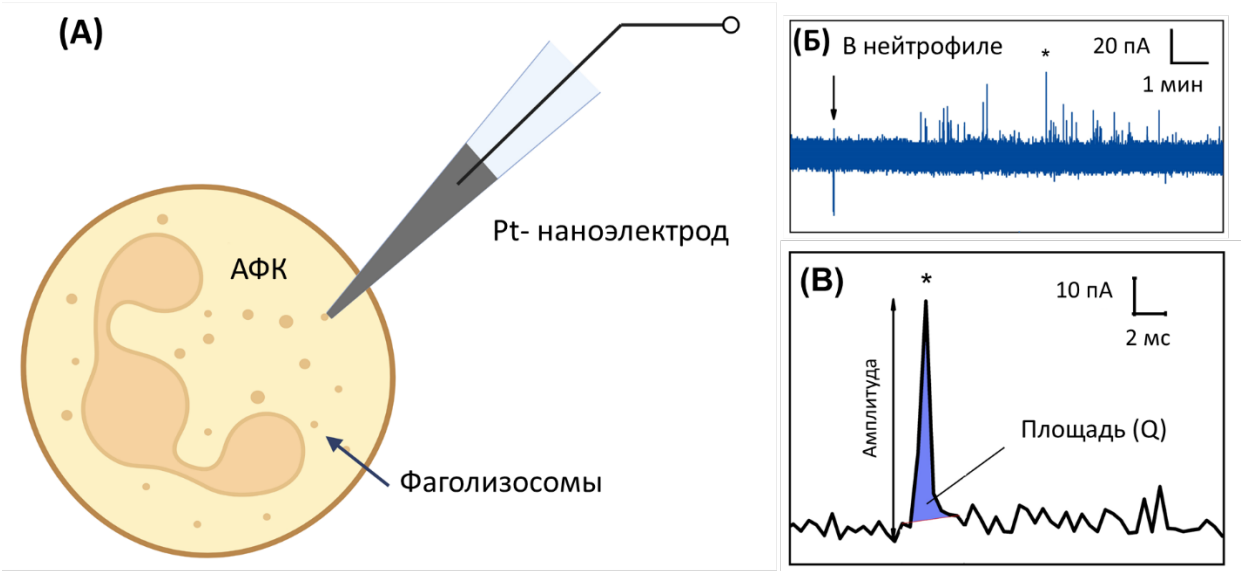


Рисунок 3.3.3.2.2 - Принцип электрохимического определения АФК и АФА внутри нейтрофилов с использованием Pt наноэлектрода. А) Схема эксперимента, демонстрирующая внутриклеточное измерение. Б) Хроноамперограмма, записанная внутри нейтрофила. В) Увеличенный спайк, отмеченный на хроноамперограмме [324]

Хроноамперограммы, измеренные с помощью платинизированного электрода, демонстрирующие спайковые сигналы, свидетельствующие о

выработке АФК нейтрофилами при активации последних E.coli, показывали значительную вариабельность ответа на стимуляцию как между отдельными нейтрофилами одного донора, так и среди клеток, выделенных от разных доноров (рисунок 3.3.3.2.3) [324].

Очевидно, что одни клетки максимально активно образуют спайки (рисунок 3.3.3.2.3), амплитуда и частота возникновения которых отражает продукцию АФК клетками, тогда как другие клетки либо не реагируют на стимуляцию E.coli, что проявляется отсутствием спайков, либо демонстрируют их крайне низкую амплитуду (рисунок 3.3.3.2.3 Б, В).

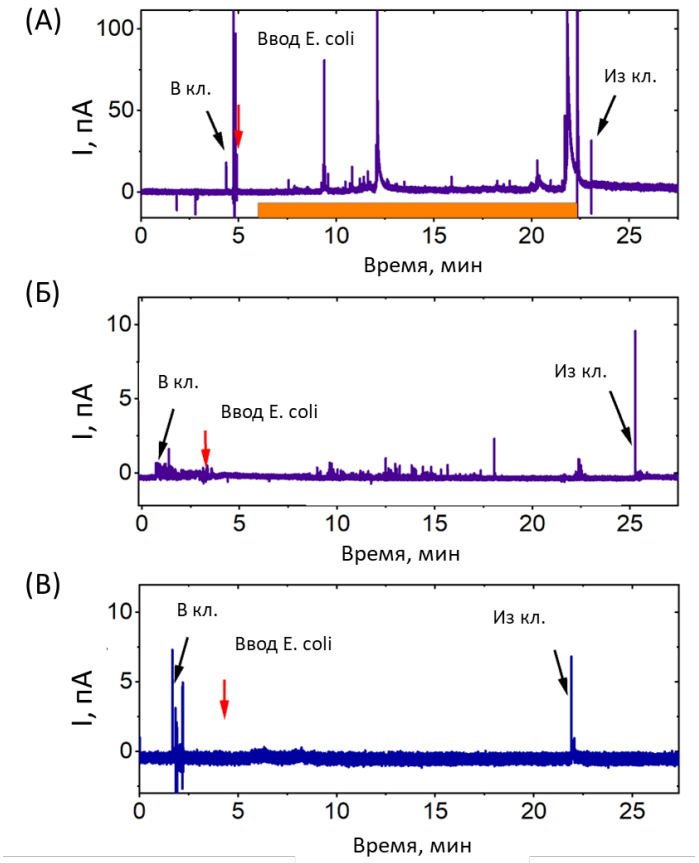


Рисунок 3.3.3.2.3 - Хроноамперограммы, полученные в ходе внутриклеточных измерений уровня АФК нейтрофилов при их стимуляции клетками E.coli, с потенциалом +800 мВ относительно ХСЭ. Показано время первого ответа нейтрофила после воздействия бактериальной суспензией. Оранжевым цветом выделены интервалы, в которых происходил наиболее интенсивный выброс АФК [324]

Интересен тот факт, что спайки обладают апериодическим характером и повторяются с различной амплитудой через разные интервалы времени. Время регистрации спайков варьировалось у разных нейтрофилов, и в среднем первая

серия спайков возникала через 4,5 минуты. Ранее было показано, что фагоцитоз неопсонизированных E.coli начинается через 11 минут после добавления бактерий к нейтрофилам, а через 15 минут фагоцитарный индекс достигал 60% [324].

Отмечены существенные различия в реакции нейтрофилов на стимуляцию S.aureus по сравнению с E.coli: (1) большее количество нейтрофилов активировалось и формировало спайки; (2) амплитуда и частота спайков были значительно выше; (3) спайки часто происходили в виде серий; (4) первая серия спайков происходила позже по сравнению с E.coli; (5) время регистрации спайков у нейтрофилов, активированных E.coli, составляло 8-15 минут, в то время как у нейтрофилов, стимулированных S.aureus, это происходило через 7-8 минут. Это указывает на то, что респираторный взрыв в первом случае был более продолжительным и менее интенсивным, тогда как во втором - более кратковременным и интенсивным (рисунок 3.3.3.2.4) [324].

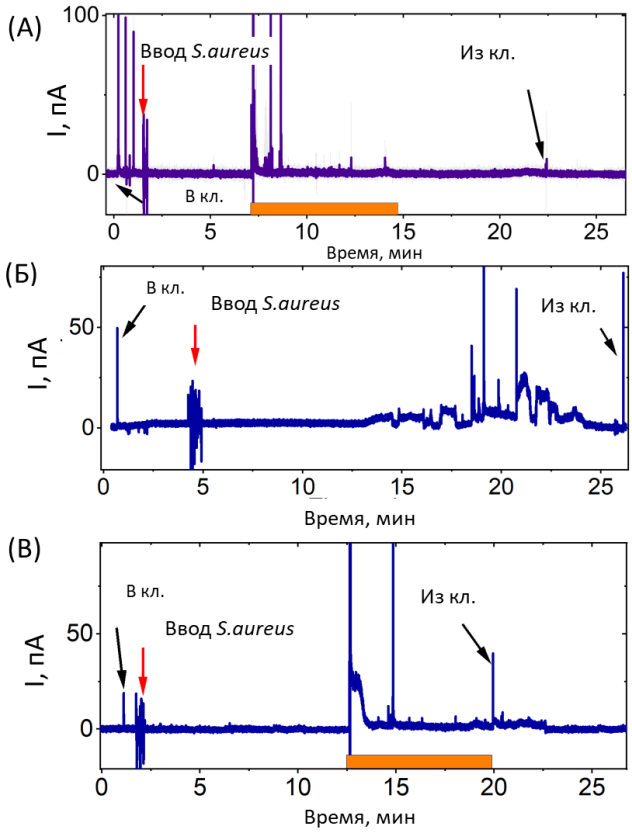


Рисунок 3.3.3.2.4 - Хроноамперограммы, записанные в ходе внутриклеточных измерений нейтрофилов под воздействием S.aureus. Потенциал +800 мВ относительно ХСЭ. Серым цветом отображены исходные данные, синим - данные после сглаживания (усреднение по 5 точкам). На графике показано время первого

ответа нейтрофила после стимуляции суспензией бактерий. Оранжевым цветом выделены интервалы, соответствующие максимальному выбросу АФК [324]

В целом, уровень АФК в нейтрофилах после активации S.aureus был значительно выше по сравнению с уровнем АФК после активации клеток E.coli (рисунок 3.3.3.2.5).

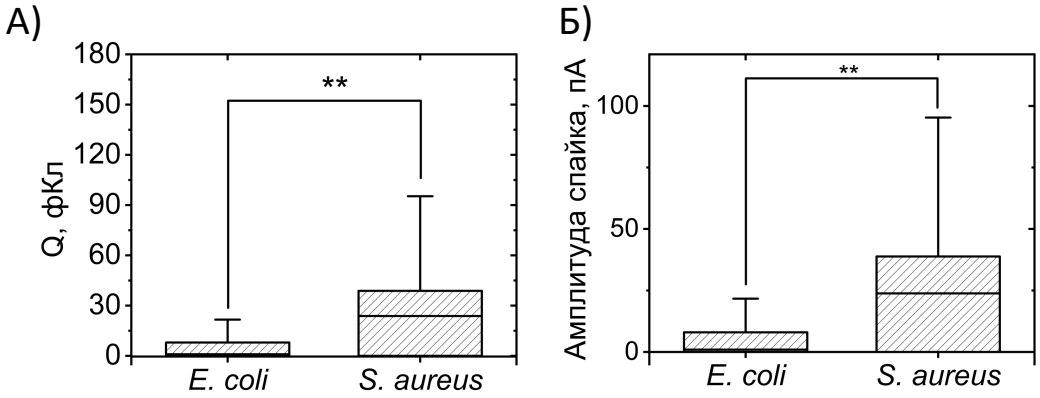


Рисунок 3.3.3.2.5 - Сравнение продукции АФК внутри нейтрофилов под воздействием двух различных культур. а) средняя площадь под кривой спайка, представленная как заряд, прошедший при окислении фаголизосомы. Значения указаны в фемтокулонах. б) средняя амплитуда спайков, значения приведены в пикоамперах. Количество спайков: для E.coli (N = 166), для S.aureus (N = 392). ** - $p < 0.001$ (ANOVA) [324]

На рисунке 3.3.3.2.5 представлен статистический анализ заряда, проходящего после высвобождения АФК из везикулы, и амплитуды пиков. Соответствующие распределения демонстрируют, что количество АФК, высвобождаемое каждой фаголизосомой, варьировалось. Количество АФК, производимых под воздействием S. aureus, было в 5.5 раз больше по сравнению с воздействием E. Coli [324].

Стоит отметить, что разработанный сенсор позволил исследовать динамические процессы в еденичной клетке с временным разрешением ~ 0.5 мс, что дало возможность измерить заряд и амплитуду отдельных спайков тока при генерации АФК нейтрофилами.

3.3.3.3 Изменения уровня АФК/АФА в эндотелиальных клетках при экспериментальной бактеремии

В данной работе мы определяли уровни АФК и активных форм азота АФА в эндотелиальных клетках. Нашей целью было измерить общий уровень окислительного стресса, возникающего при воздействии нейтрофилов и Staphylococcus aureus на эндотелиальные клетки в условиях экспериментальной бактеремии.

Модель экспериментальной бактеремии включала три ключевых биологических компонента: (1) эндотелиальный слой сосудов, который моделировался клеточной линией EA.hy926; (2) нейтрофилы, полученные из крови здоровых доноров непосредственно перед экспериментами; (3) бактерии. Бактеремия моделировалась введением в систему штамма S. aureus 2879 M с МОИ 10 (рисунок 3.3.3.3.1 a).

Основная идея эксперимента заключалась во введении наноэлектрода в эндотелиальную клетку EA.hy926 с одновременным добавлением нейтрофилов и S. aureus, а также в непрерывной регистрации тока в отдельной клетке EA.hy926 (рисунок 3.3.3.3.1 a).

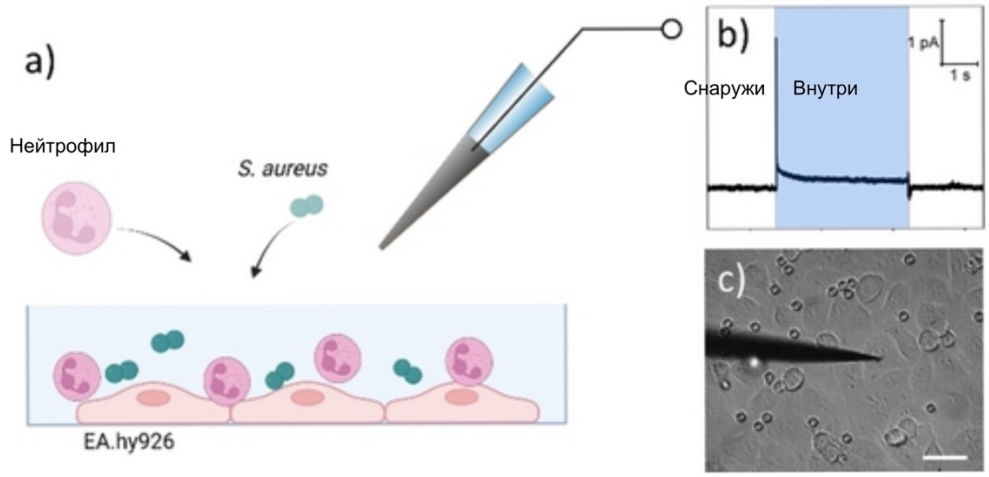


Рисунок 3.3.3.3.1 - Схема проведения эксперимента. (a) Иллюстрация эксперимента, изображающая эндотелиальные клетки с добавленными нейтрофилами и S. aureus. (b) Амперограмма, записанная внутри одной эндотелиальной клетки EA.hy926 при фиксированном потенциале +800 мВ относительно Ag/AgCl. Показаны измерения тока в клетке EA.hy926 (синим цветом). (c) Микрофотография эндотелиальной клетки EA.hy926, сделанная с использованием оптического микроскопа (увеличение 40×). Масштабная линейка: 10 мкм [325]

Во время экспериментов визуальных изменений в морфологии клеток до и после введения наноэлектрода не наблюдалось. Типичная запись внутри клетки и микрофотография показаны на рисунке 3.3.3.3.1 b, c. После проникновения в клетку наблюдалось увеличение тока, который затем уменьшался со временем. При достижении равновесного значения тока электрод был извлечен из клетки (рисунок 3.3.3.3.1 b). Далее была рассчитана разница между значениями тока внутри и снаружи клетки. Ранее платинированные наноэлектроды были откалиброваны с использованием водных растворов пероксида водорода и нитрита натрия с физиологически значимыми концентрациями 0,1–100 мкМ (рисунок 3.3.3.3.2).

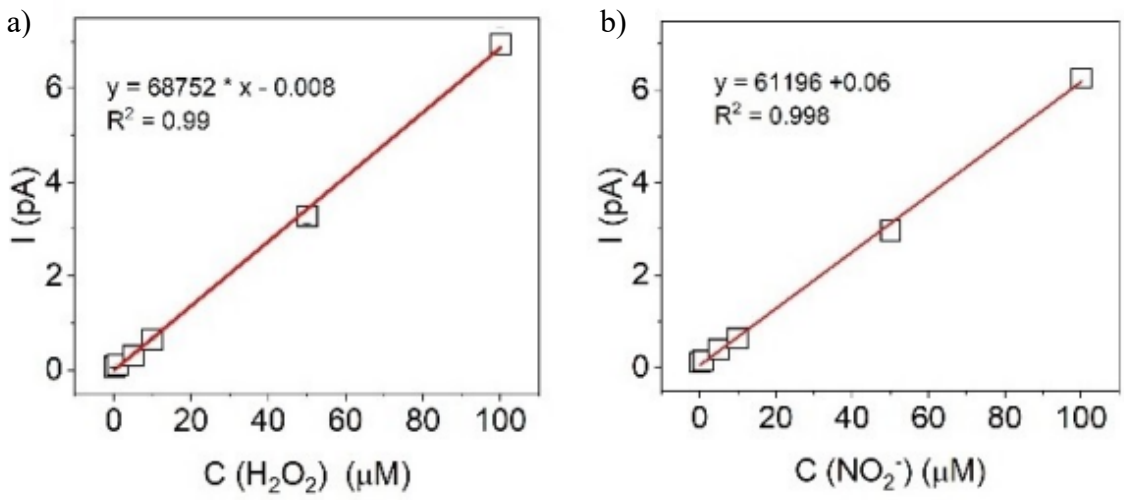


Рисунок 3.3.3.3.2 - a) Калибровочная кривая (ток в зависимости от концентрации H_2O_2 при +800 мВ относительно Ag/AgCl), демонстрирующая линейную зависимость. b) Калибровочная кривая (ток в зависимости от концентрации NO_2^- при +800 мВ относительно Ag/AgCl), также показывающая хорошую линейную зависимость [325]

Таким образом, разработанная система для обнаружения АФК/АФА позволила количественно оценить активацию эндотелиальных клеток под воздействием экзогенных патогенов, таких как S. aureus. Было установлено, что нейтрофилы не вызывали активацию эндотелиальных клеток в отсутствие бактерий (hисунок 3.3.3.3.3 a, b).

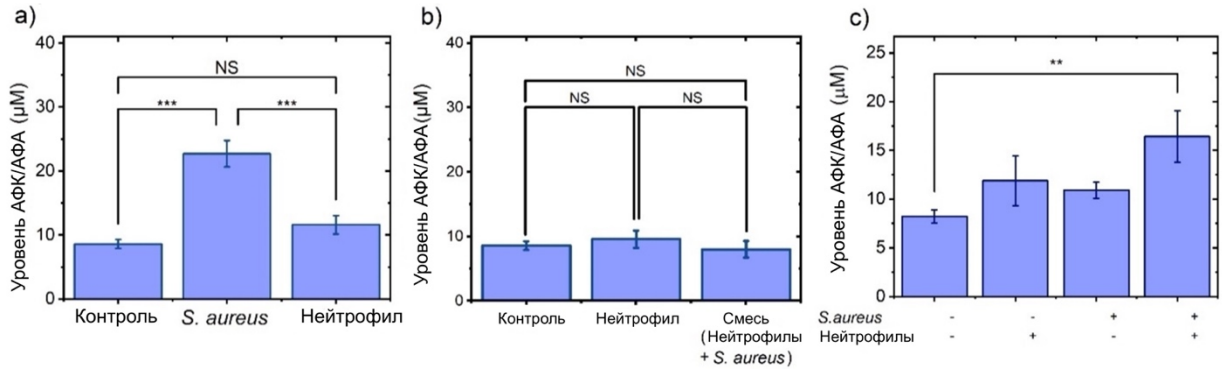


Рисунок 3.3.3.3.3 - (a) Активация эндотелиальных клеток после воздействия S. aureus 2879 M (МОИ 10) и неактивированных нейтрофилов. (b) Отсутствие активации эндотелиальных клеток после воздействия как неактивированных, так и активированных нейтрофилов. (c) Стимуляция продукции АФК/АФА в эндотелиальных клетках при последовательном введении S. aureus 2879 M (МОИ 10) и неактивированных нейтрофилов, что моделирует бактеремию in vitro. Показаны данные по продукции АФК/АФА внутри единичных клеток EA.hy926 при стимуляции нейтрофилами или S. aureus 2879 M (***-p <0,001; **-p<0,01; *-p<0,05; NS-не значимо (ANOVA)) [325]

Особый интерес представляют эксперименты с активированными нейтрофилами. После предварительной инкубации нейтрофилов с S. aureus 2879 M (МОИ 10, 30 минут) и их последовательного добавления в монослой клеток EA.hy926 в чашке Петри, измерение АФК/АФА не показало повышения уровня активации эндотелиальных клеток (рисунок 3.3.3.3.3 b). Вероятно, это связано с тем, что нейтрофилы уже завершили процесс фагоцитоза бактерий. В отличие от этого, совершенно противоположные результаты были получены при последовательном добавлении бактерий и нейтрофилов к эндотелиальным клеткам, то есть при моделировании бактеремии (рисунок 3.3.3.3.3 c). Это вызвало статистически значимое увеличение ($p<0,01$) уровня АФК/АФА внутри эндотелиальных клеток, аналогичное тому, что наблюдалось в эксперименте только с бактериями. Это происходило из-за того, что как эндотелиальные клетки, так и нейтрофилы одновременно активировались бактериями, и обе группы клеток стремились реализовать свои защитные функции [325].

Эндотелиальные клетки демонстрировали повышение продукции АФК/АФА при стимуляции Staphylococcus aureus. Однако они оставались неактивными при воздействии как неспецифически активированных, так и активированных нейтрофилов, предварительно инкубированных с бактериями. Примечательно, что последовательная стимуляция эндотелиальных клеток бактериями, а затем

нейтрофилами, приводила к значительному увеличению уровня АФК/АФА. Эти результаты подчеркивают потенциал нашей системы для количественной оценки динамики АФК/АФА в сложных биологических системах и предоставляют новые данные о взаимодействии различных клеточных компонентов при экспериментальной бактеремии [212].

3.3.4 Локальное измерение градиентов молекулярного кислорода в биологических системах

Изготовленный платиновый наноэлектрод может быть использован для измерения концентрации молекулярного кислорода. Для этого был разработан метод, обеспечивающий высокочувствительное и селективное определение кислорода как в растворах, так и в живых системах. Рисунок 3.3.4.1 показывает типичную вольт-амперную зависимость для углеродного и платинового наноэлектродов. Характерное плато на вольт-амперной кривой платинового наноэлектрода обусловлено реакцией $O_2 + 4\bar{e} + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$. Ток, измеряемый при этих потенциалах, находится в прямой зависимости от концентрации кислорода в растворе.

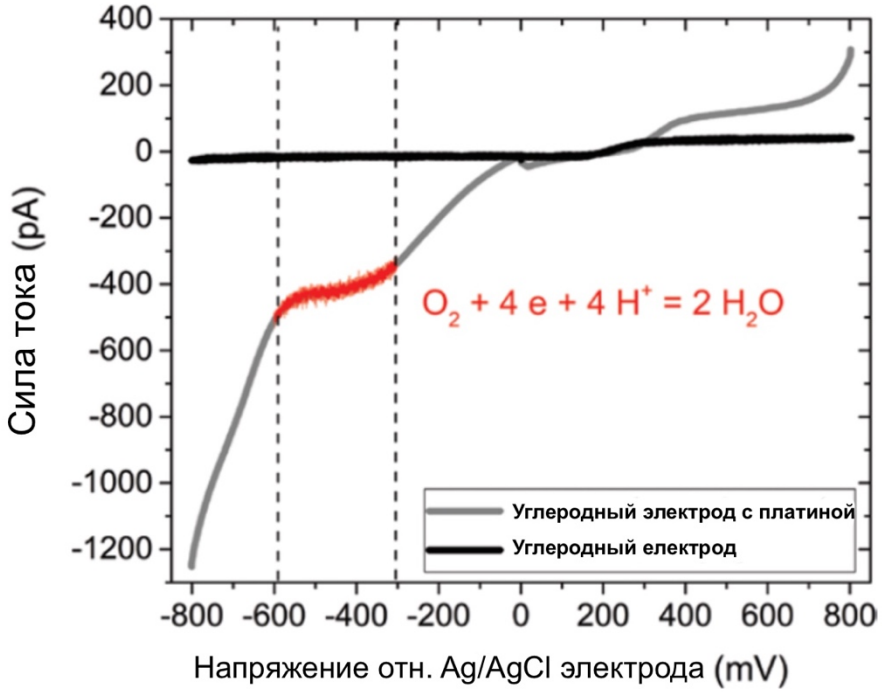


Рисунок 3.3.4.1 - Вольтамперные кривые углеродного и платинизированного электрода. Область при отрицательном потенциале плато соответствует

диапазону напряжений, при котором ток электрода прямо пропорционален концентрации кислорода

Линейная зависимость калибровочной кривой для полярографических O_2-электродов была подтверждена в предыдущих исследованиях [326]. В дополнительном рисунке 3.3.4.2 представлен калибровочный график, показывающий среднее значение тока в диапазоне потенциалов от -500 до -600 мВ, измеренное с использованием платинового электрода, в зависимости от концентрации O_2. Для построения графика проводились одновременные измерения восстановления O_2 с помощью коммерческого электрода типа Кларка (модель Expert-001, Expert, Россия) и разработанного платинового наноэлектрода, погружённых в искусственную прудовую воду (ИПВ). Содержание O_2 в растворе регулировалось добавлением Na_2SO_3 в различных концентрациях. Концентрация растворённого кислорода определялась по значениям электрического тока стандартного электрода Кларка для pO_2.

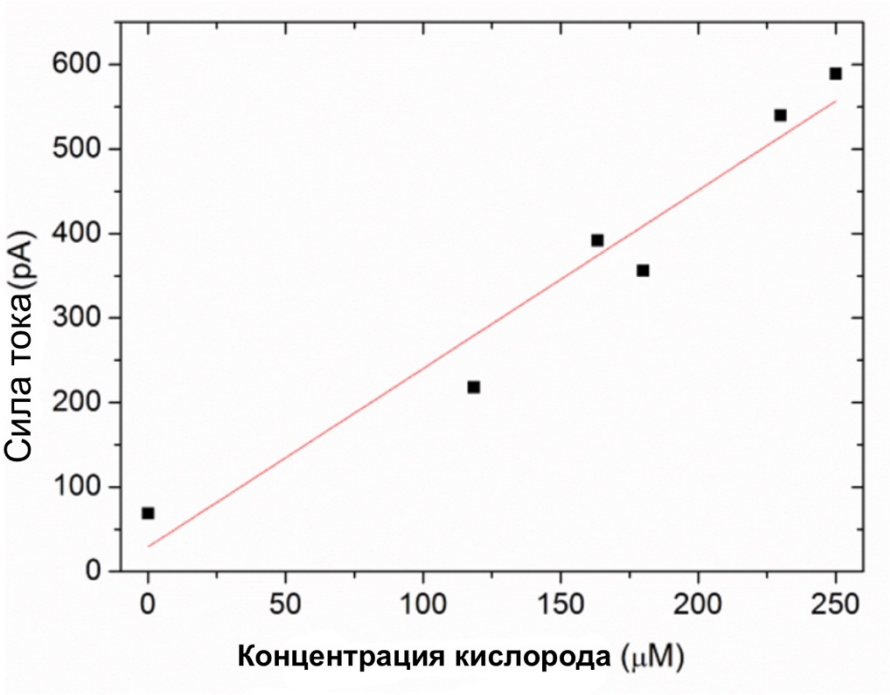


Рисунок 3.3.4.2 - Калибровочный график для платинизированного наноэлектрода. Представлено среднее значение тока в диапазоне потенциалов от -500 до -600 мВ, измеренное с помощью платинового наноэлектрода, в зависимости от концентрации кислорода. Содержание кислорода в растворе регулировалось добавлением различных концентраций Na_2SO_3. Концентрация растворённого кислорода определялась на основе значений электрического тока, измеренного стандартным электродом Кларка для pO_2 (Expert-001, Expert, Россия)

Для улучшения временного разрешения и повышения чувствительности системы было исследовано влияние увеличение скорости развертки потенциала на ЦВ. На рисунке 3.4.3.4 представлены ЦВ для различны сокростей, пики тока соответствуют одному потенциалу независимо от скорости развертки потенциала. Наблюдается линейная зависимость между пиковым током и квадратным корнем из скорости развертки потенциала (рисунок 3.3.4.3). Это соответствует диагностическим критериям Рандлса-Шевчека, что говорит о том, что реакция обратимая и определяется диффузионным процессом. Уравнение Рандлса-Шевчека подразумевает линейную зависимость тока от концентрации аналита.

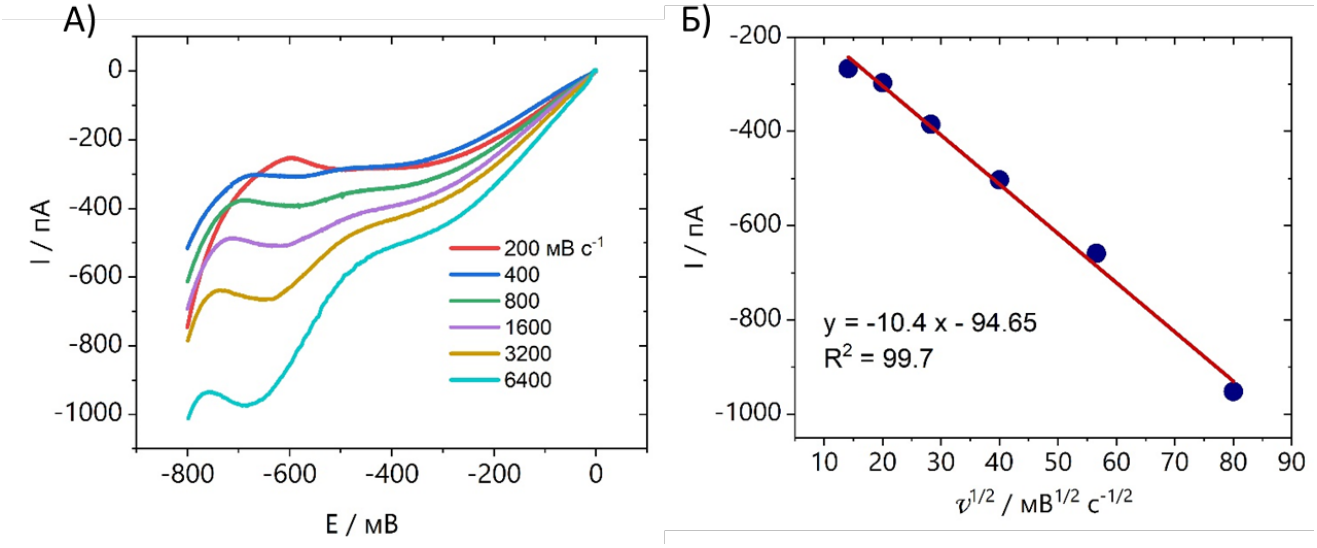


Рисунок 3.3.4.3 - (А) ЦВ для различны сокростей развертки потенциала в насыщенном кислородом натрий-фосфатном буфере; (Б) Линейная зависимости величины пика тока от корня квадратного скорости развертки потенциала.

3.3.4.1 Исследования распределения внеклеточного молекулярного кислорода при механическом стимуле клеточной стенки водоросли Chara corallina

Уникальная особенность большинства растений заключается в их неподвижном образе жизни, что не позволяет им активно избегать неблагоприятных изменений в окружающей среде. Следовательно, их выживание зависит от способности распознавать внешние изменения и активировать сигнальные пути, приводящие к адаптации на уровне клетки, органа или всего организма. Клеточная стенка растений выступает первой и наиболее важной защитной линией против механических повреждений и атак патогенов, таких как

микробы, грибы и насекомые-фитофаги. Интернодальные клетки *Chara* идеально подходят для изучения механорецепции и ответов на повреждения на клеточном уровне. Благодаря своим большим размерам эти клетки представляют собой удобную модель для изучения явлений самоорганизации, возбудимости и фотосинтеза. Изучение отдельных клеток, в отличие от многоклеточных тканей, упрощает интерпретацию результатов, поскольку исключает межклеточные взаимодействия.

Мы установили, что микроповреждение интернодальных клеток *Chara corallina* с использованием стеклянной микропипетки приводит к резкому снижению концентрации кислорода вблизи места повреждения. Циклические вольтамперные кривые регистрировались непрерывно во время измерений O_2 рядом с поверхностью клетки. Продолжительность каждой записи составляла 5 секунд, а интервал между записями - 1 секунда. Средние значения тока, зависящего от O_2, рассчитывались в диапазоне потенциалов от -500 до -600 мВ на основе 150 точек данных для каждой записи. Таким образом, временное разрешение измерений O_2 составляло 6 секунд. Измеренный ток сенсора был преобразован в концентрацию O_2. Процедура калибровки проводилась перед каждым измерением концентрации O_2 у поверхности клетки *C. corallina*. Для этого платиновый наноэлектрод помещали на расстояние в несколько миллиметров от поверхности клетки. Для воды, находящейся в равновесии с воздухом, концентрация O_2 составляет примерно 250 мкМ при комнатной температуре. Значения тока, зарегистрированные в растворе, насыщенном воздухом, и после разрыва цепи использовались для построения линейной калибровочной кривой, которая применялась для пересчета концентрации O_2 в апопласте в точке микроповреждения клеточной стенки.

Для проверки работоспособности кислородных сенсоров (наноэлектродов) на клетках *C. corallina* были измерены изменения концентрации O_2 вблизи поверхности клетки при переходах от света к темноте (рисунок 3.3.4.1.1). Фотосинтетическое образование O_2 на свету увеличивало его концентрацию до 20-30 мкМ. После перехода в темноту дыхание снижало уровень O_2 рядом с поверхностью клетки. Одним из ключевых преимуществ этих электродов является

их высокое пространственное разрешение, что позволяет отслеживать изменения концентрации O_2 на расстоянии всего нескольких микрометров от места микроповреждения клеточной стенки.

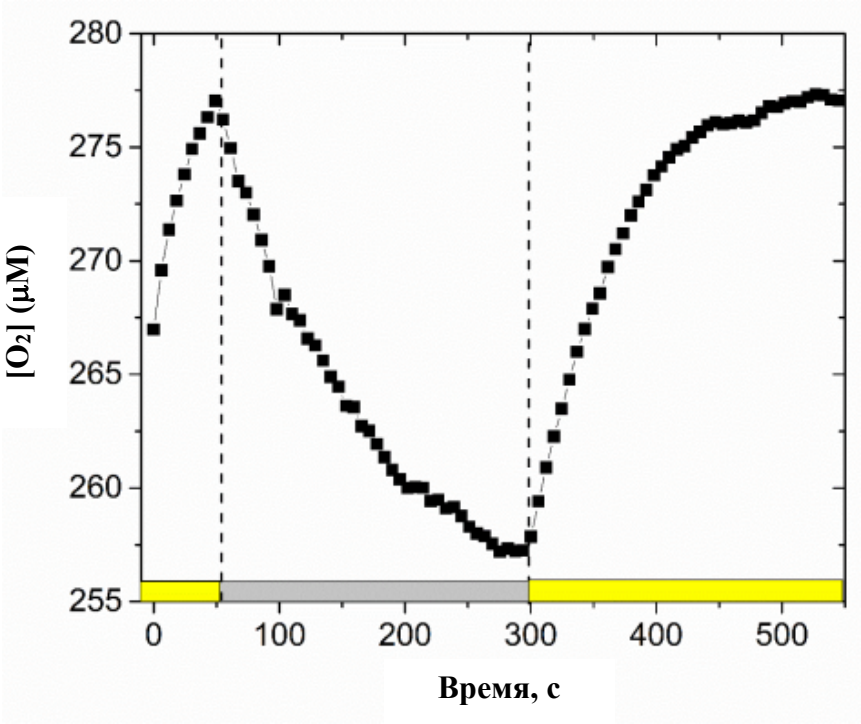


Рисунок 3.3.4.1.1 - Изменения концентрации кислорода на расстоянии нескольких микрометров от поверхности клетки *Chara corallina* при прерывистом освещении. Желтые и серые полосы вдоль оси абсцисс обозначают периоды света и темноты соответственно [327]

На рисунке 3.3.4.1.2 Б показаны изменения концентрации O_2 рядом с поверхностью интернодальной клетки *C. corallina* после кратковременного (1-2 с) введения стеклянной микропипетки с диаметром наконечника ≤1 мкм в клеточную стенку (рисунок 3.3.4.1.2). Кроме микроперфорации клеточной стенки, других экспериментальных манипуляций не проводилось. Введение не повлияло на цитоплазматический ток. Как показано на рисунке 3.3.4.1.2 Б, сразу после микроперфорации клеточной стенки наблюдалось резкое снижение концентрации O_2. Скорость снижения pO_2 могла достигать 50 мкМ O_2 в секунду. Концентрация O_2 восстанавливалась медленно, занимая до 30-40 минут.

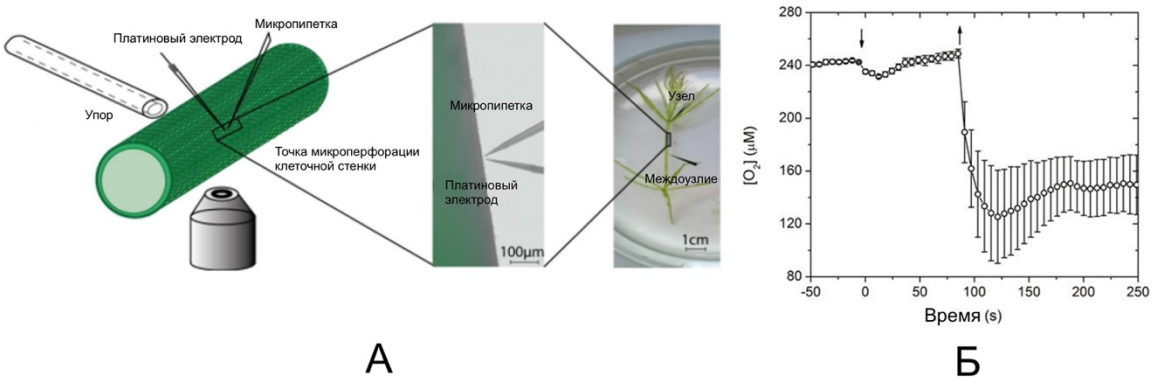


Рисунок 3.3.4.1.2 - А) Схема и изображения экспериментальной установки и интернодальной клетки *Chara corallina*. Б) Изменения локальной концентрации O_2 вызванные микроперфорацией клеточной стенки с введением микропипетки (стрелка вниз) и её извлечением через 100 секунд (стрелка вверх)

3.3.4.3 Исследование распределения молекулярного кислорода внутри тканей и мозга на животных моделях *in vivo*

Мы впервые продемонстрировали использование платиновых наноэлектродов для измерения концентрации кислорода внутри и снаружи среза мозга (300-микрометровые поперечные срезы гиппокампа, полученные от трехнедельных животных, подготовленные и поддерживаемые в соответствии со стандартными протоколами электрофизиологии [328]). Наноэлектрод был поляризован до -600 мВ относительно Ag/AgCl для диффузионно-ограниченного определения O_2 и вручную подведен к поверхности среза мозга (рисунок 3.3.4.3.1a). На рисунках 3.3.4.3.1 b и 3.3.4.3.1 c продемонстрировано снижение катодного тока при приближении к срезу мозга, что связано с локальным истощением кислорода, вызванным дыхательной активностью нейронов. Важно отметить, что наноэлектрод многократно подводился и отводился на определенное расстояние от среза, при этом кривая зависимости катодного тока от расстояния сохранялась (рисунок 3.3.4.3.1 b). При введении наноэлектрода в срез мозга катодный ток еще больше снизился с -40 до -9 пА. Это снижение обусловлено не только затрудненной диффузией O_2 в ткани, как это наблюдается в других биологических тканях, а также его потреблением нейронами.

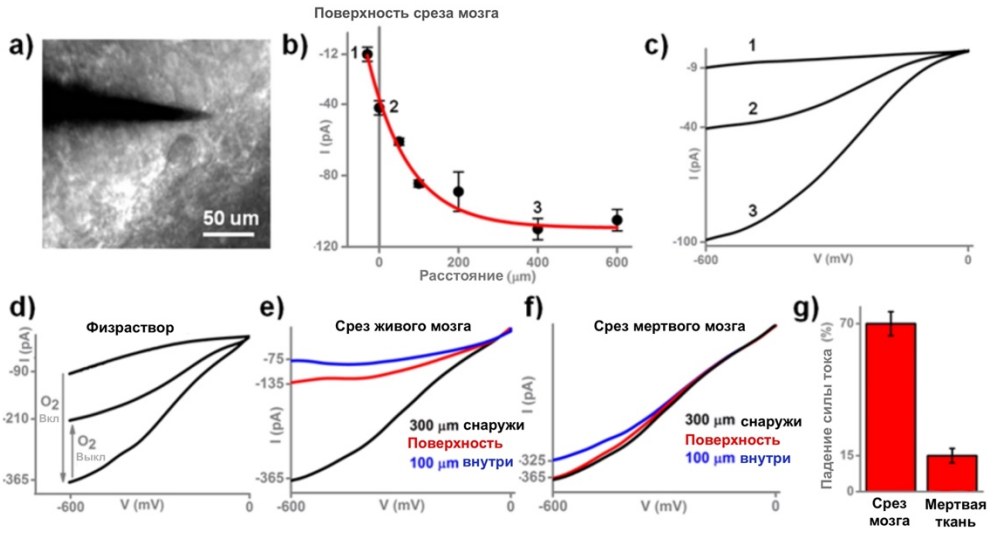


Рисунок 3.3.4.3.1 - Измерения концентрации кислорода снаружи и внутри среза мозга. (a) Оптическая микрофотография поверхности среза мозга (гиппокампальная область CA1) с изображением профилей клеточных тел и углеродного наноэлектрода. (b) Значение тока при -600 мВ относительно Ag/AgCl в зависимости от положения наноэлектрода внутри и снаружи среза мозга. (c) Вольтаммограммы платинированного наноэлектрода, записанные на разном расстоянии от среза мозга: 1 (внутри), 2 (на поверхности), 3 (на расстоянии 400 мкм). (d) Вольтаммограммы платинированного наноэлектрода, погруженного в физиологический раствор в условиях окружающей среды (верхняя кривая), после 10-минутной перфузии раствором, насыщенным кислородом (нижняя кривая), и через 10 минут после отключения системы перфузии (средняя кривая). (e) Пример других вольтаммограмм платинированного наноэлектрода на разном расстоянии от живого среза мозга. (f) Вольтаммограммы того же платинированного наноэлектрода, как на рисунке (e), на разном расстоянии от среза мозга с дефицитом кислорода. (g) Уменьшение катодного тока углеродного наноэлектрода (при -600 мВ относительно Ag/AgCl) при проникновении в живой и мертвый срез мозга. Ошибки отображают среднее значение трёх измерений, выполненных с тем же наноэлектродом [252]

Отклик платинированного наноэлектрода в одном и том же растворе (среде для роста клеток) с разной степенью оксигенации. При погружении наноэлектрода в среду без оксигенации был зарегистрирован ток -90 пА (при -600 мВ). Затем раствор в ванне постоянно перфузировался насыщенным молекулярным кислородом и катодный ток увеличился до -365 пА, что примерно в 4 раза превышает первоначальное значение. После отключения системы перфузии, через 10 минут катодный ток уменьшился до -210 пА. Ток вернулся к начальному значению -90 пА только при перфузии неоксигенированного раствора. Тем же наноэлектродом мы измерили зависимость катодного тока от расстояния до живого (рисунок 3.3.4.3.1 e) и мёртвого (рисунок 3.3.4.3.1 f) среза мозга. Катодный ток

уменьшился с -365 пА (в растворе) до -135 пА вблизи поверхности живого среза мозга, тогда как рядом с мёртвым срезом не было обнаружено никаких изменений. Ток на электроде ещё больше уменьшился при погружении его внутрь среза, причём различие в токе между живой и мертвой тканью было явно заметным (рисунок 3.3.4.3.1 g). Поскольку снижение O_2 в ткани связано с метаболической активностью, эти результаты демонстрируют потенциал функциональных нанозондов для мониторинга кислород-зависимой активности в срезах мозга. Кроме того, нанометровый размер наноэлектрода позволяет измерять потребление кислорода глубоко внутри среза мозга с минимальным повреждением и нарушением биологической среды.

Для тестирования работы сенсора *in vivo* были проведены измерения в верхних слоях коры головного мозга крысы (рисунок 3.3.4.3.2 А). Стабильность тока и низкая инвазивность метода позволили нам осуществлять мониторинг содержания O_2 *in vivo* в мозге крыс. На первом этапе оценивали содержание кислорода в глубоких слоях головного мозга здоровой крысы. Наноэлектрод вводился в подготовленное отверстие на голове крысы с использованием микроманипулятора. Было установлено, что концентрация кислорода уменьшалась при продвижении электрода внутрь, а резкое увеличение уровня кислорода можно объяснить достижением кровеносных сосудов (рисунок 3.3.4.3.2 Б).

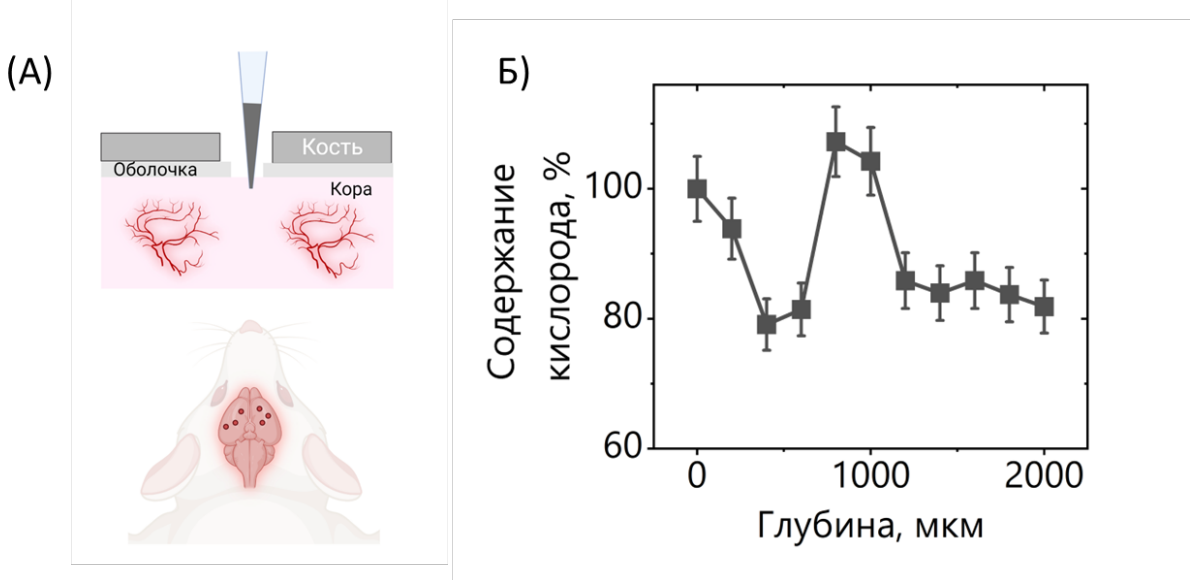


Рисунок 3.3.4.3.2 - (А) Схема проведения эксперимента *in vivo* с помощью платинового элетрода (Б) Кислородный профиль, полученный в коре головного мозга крысы

Также был смоделирован процесс церебральной ишемии и продемонстрировано снижение содержания кислорода после пережатия артерий, ведущих к мозгу. Была воспроизведена предварительная ишемия головного мозга средней степени тяжести путем зажима обеих общих сонных артерий хирургическими зажимами. Затем зажимы удаляли, и кровоток в сонных артериях восстанавливался. После освобождения от зажимов артерий наблюдалось постепенное увеличение содержания кислорода, которое со временем превышало базовую концентрацию кислорода. За счет наноразмеров электрода можно было наблюдать динамические процессы в мозге крысы *in vivo* (рисунок 3.3.4.3.3).

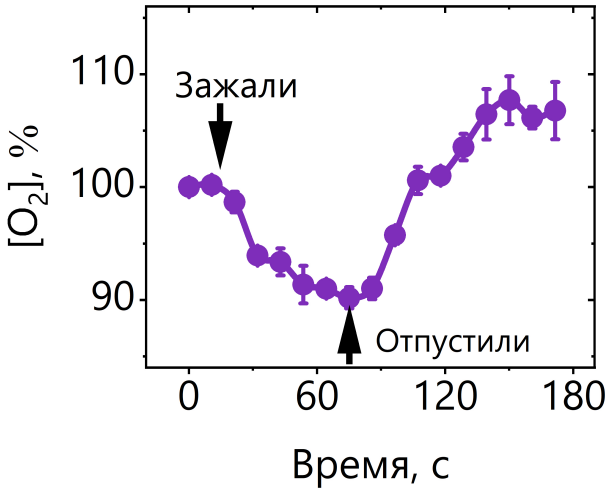


Рисунок 3.3.4.3.3 – На рисунке представлена зависимость концентрации молекулярного кислорода при моделировании процесса церебральной ишемии. Стрелки указывают на моменты зажима сосудов и их освобождение

Впервые было открыто перепективное направление локального количественного определения АФК и молекулярного кислорода в режиме реального времени на уровне единичных клеток, тканей и животных с помощью нанокапиллярных электрохимических сенсоров на основе. Были разработаны углеродные наноэлектроды с улучшенной адгезией каталитически активной платины, что открыло возможности для многократных воспроизводимых измерений. При валидации сеноров впервые установлена кинетика генерации АФК в единичных клетках и на различных глубинах опухолей мышей *in vivo* прижизненно под действием коммерчески доступных и инновационных терапевтических препаратов. Нами предложен новый подход для исследования

эффективности ФДТ в режиме реального времени на *in vitro* и *in vivo* моделях. Нами были исследованы градиенты кислорода вблизи модельных клеток растений, клеток млекопитающих сфероидов, в нейрональных тканях и мозге мыши. Определена кинетика количественного изменения концентрации кислорода в мозге крысы в норме и в условиях модели ишемии.

3.4 Исследование распределения платиносодержащих соединений в биосистемах методом электрохимической локальной детекции с помощью платиновых наноэлектродов

Ранее была описана разработка и изготовление платиновых наноэлектродов и характеризация их физических параметров. Была продемонстрирована возможность их использования для локальной детекции АФК и молекулярного кислорода в различных биологических системах. Данная глава посвящена расширению возможностей таких электродов для селективной детекции платиносодержащих препаратов, в том числе цисплатина и его производных.

3.4.1 Разработка метода электрохимической локальной детекции комплексов Pt(II) с помощью платиновых наноэлектродов

Для определения комплексов Pt(II) применялся платиновый наноэлектрод. Однако для детекции этих комплексов был разработан протокол, отличный от того, который применялся для измерения АФК. Определение проводилось в режиме циклической вольтамперометрии. Предварительно были записаны ЦВ в 0,5 мМ растворе цисплатина в PBS с использованием как платинового, так и углеродного наноэлектродов. При проведении измерений углеродным наноэлектродом не наблюдалось пика окисления Epa(PtII/PtIV). Однако с применением платинового наноэлектрода на ЦВ был зафиксирован ярко выраженный пик окисления при потенциале 0,65-0,7 В относительно ХСЭ (рисунок 3.4.1.1).

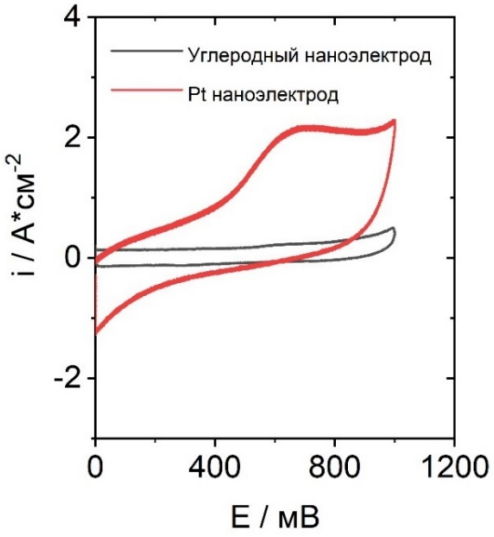


Рисунок 3.4.1.1 - Циклические вольтаммограммы (ЦВ), записанные в 0,5 мМ растворе цисплатина с использованием углеродного и платинового наноэлектрода. Скорость развертки составляет 400 мВ/с. [329]

Были проведены эксперименты по изучению зависимости тока от скорости развертки потенциала (рисунок 3.4.1.2 А). На рисунке 3.4.1.2 приведена зависимость пика в виде функции скорости сканирования потенциала, и может быть описана уравнением Рэндлса-Шевчика [165]. Согласно этому уравнению, зависимость тока пика I_p от скорости сканирования пропорциональна корню квадратному из v, что указывает на процесс, контролируемый диффузией. С увеличением скорости сканирования (150-1500 мВ/с) наблюдался незначительный сдвиг потенциала для I_p, что объясняется вкладом емкостных токов, которые особенно проявляются на больших скоростях развертки потенциала. Таким образом, надо учитывать вклад базовой линии на I_p при проведении измрений. Для процессов, контролируемых диффузией и описываемых уравнением Рэндлса-Шевчика свойственна линейная зависимость I_f ~C. Для количественной оценки детекции комплексов платины (II) в живых системах предварительно была проведена калибровка наноэлектрода с использованием растворов цисплатина в PBS (рисунок 3.4.1.3) [329].

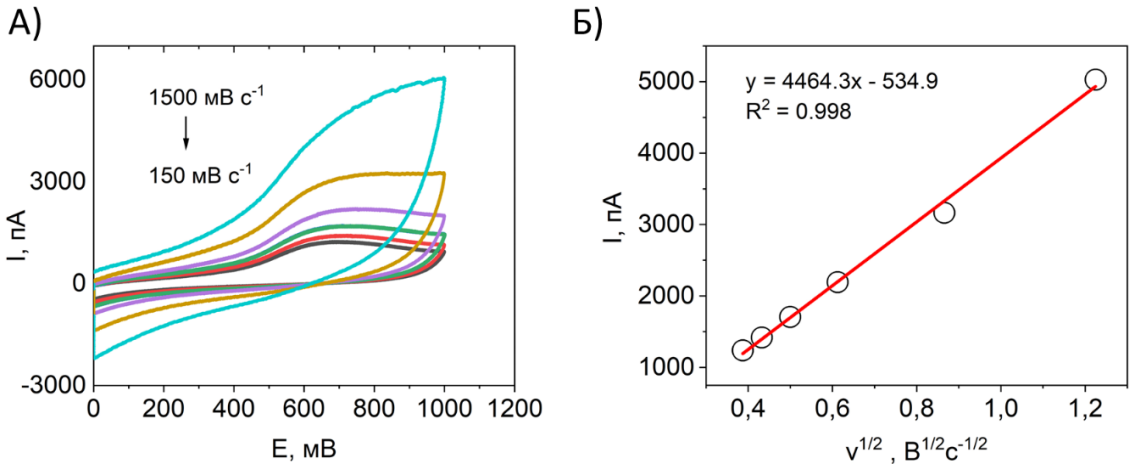


Рисунок 3.4.1.2 - А) Влияние скорости сканирования на циклические вольтаммограммы в присутствии 0,5 мМ цисплатина в растворе PBS (pH 7,4), в диапазоне 150-1500 мВс$^{-1}$. Б) График зависимости I_p от $\upsilon^{1/2}$ [329]

Экспериментальные данные зависимости пикового тока от объемной концентрации имеют хорошо аппроксимируемую линейную зависимость (рисунок 3.4.1.3 Б). Предел обнаружения этого сенсора составил 1 мкМ. Увеличение количества осажденной платины позволяет снизить предел обнаружения, но при этом возрастает размер наноэлектрода. Чрезмерное осаждение платины на поверхность наноэлектрода может вызвать повреждение клетки.

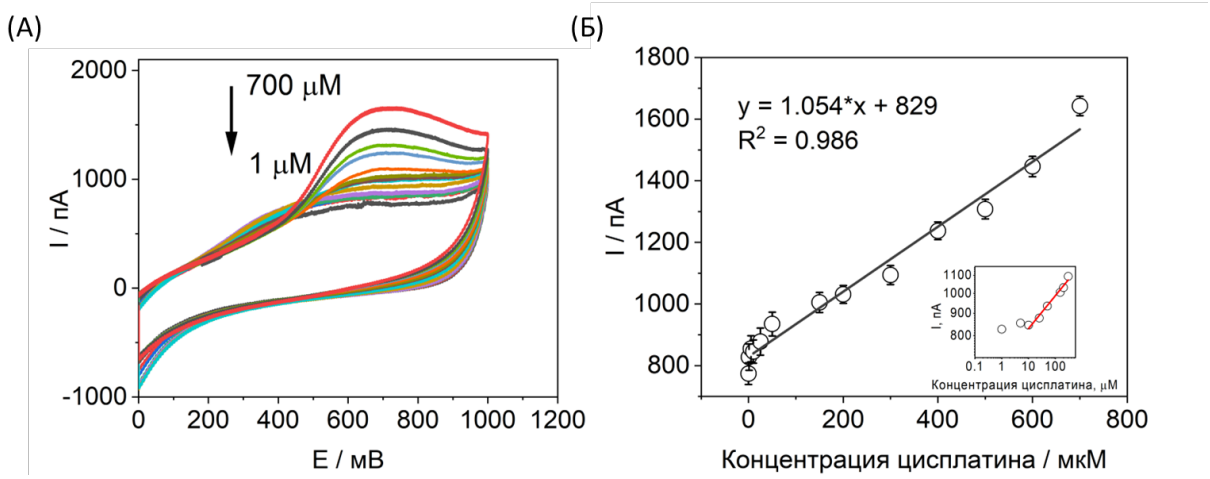


Рисунок 3.4.1.3 - А) Циклические вольтаммограммы, записанные в растворах с различными концентрациями цисплатина. Б) Калибровочный график для цисплатина в растворе PBS [329]

Перед проведением *in vitro/in vivo* экспериментов была выполнена оценка влияния ДНК и БСА на форму пика ЦВ. Поскольку цисплатин взаимодействует с ДНК, а белки, присутствующие в организме, могут адсорбироваться на поверхности наноэлектрода, что может сказаться на отклике наносенсора, изучение

влияния этих биомолекул крайне важно. Результаты показали, что указанные биомолекулы не влияют на проведение измерений (рисунок 3.4.1.4).

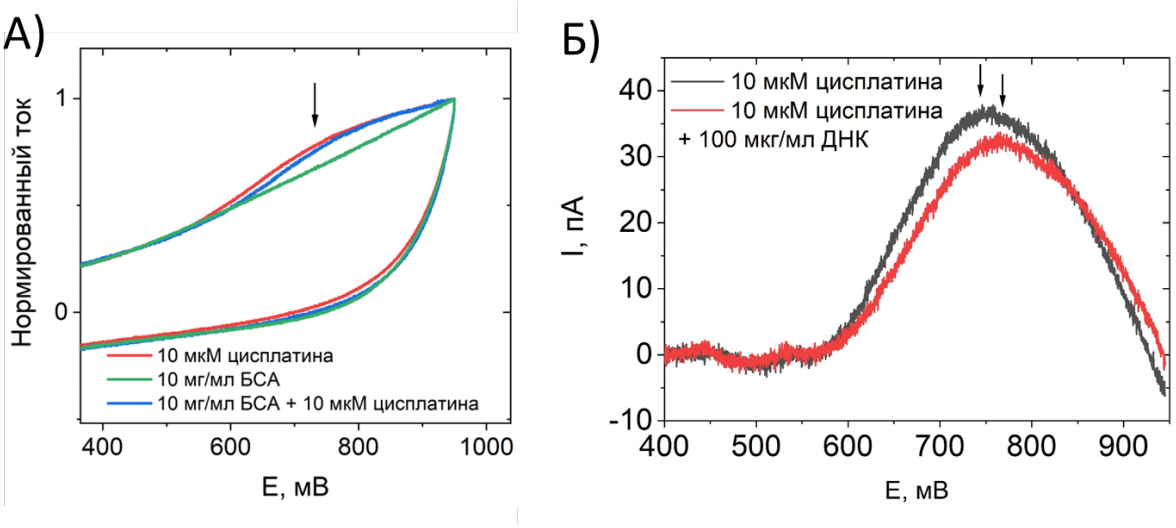


Рисунок 3.4.1.4 - Влияние бычьего сывороточного альбумина (БСА). А) и ДНК. Б) на циклические вольтаммограммы [329].

Добавление БСА в концентрации 10 мг/мл не приводило к изменению ЦВ (рисунок 3.4.1.4). Инкубации с ДНК в концентрации 100 мкг/мл приводила к незначительному уменьшению пика. Внутриклеточные измрения проводятся нами в цитоплазме, поэтому взаимодействие с ДНК является маловероятным событием.

ЦВ в растворе цисплатина в присутствии H_2O_2 были записаны в экспериментах *in vitro*/*in vivo*, так как цисплатин индуцирует образование АФК в клетках. ЦВ регистрировались в растворах цисплатина с добавлением H_2O_2 в физиологической концентрации (0-10 мкМ), что сопровождалось увеличением тока при добавлении H_2O_2 (рисунок 3.4.1.5 А). При добавлении пероксида водорода в раствор цисплатина велична пика тока увеличивалась (рисунок 3.4.1.5 Б). Для определения высоты анодного пика была рассчитана базовая линия (рисунок 3.4.1.5 В). Был визуализирован пик высоты анодного тока за вычетом базового значения, обусловленного предельным диффузионным током перекиси водорода и емкостного тока. При добавлении пероксида водорода угол наклона зависимости тока от концентрации пероксида водорода был одинаковым для разных концентраций цисплатина (рисунок 3.4.1.5 Г). Исходная линия соответствовала ЦВ в 10 мкМ растворе пероксида водорода. Было показано, что с увеличением концентрации пероксида водорода значение базовой линии возрастало, в свою очередь высота анодного окислительного пика Pt(II)/Pt(IV) оставалась неизменной

(рисунок 3.4.1.5 Д). Следовательно, предложенный способ вычета базовой линии, обусловленной окислением пероксида водорода, позволяет исключить влияние содержания H_2O_2 на обнаружение Pt(II) в образцах.

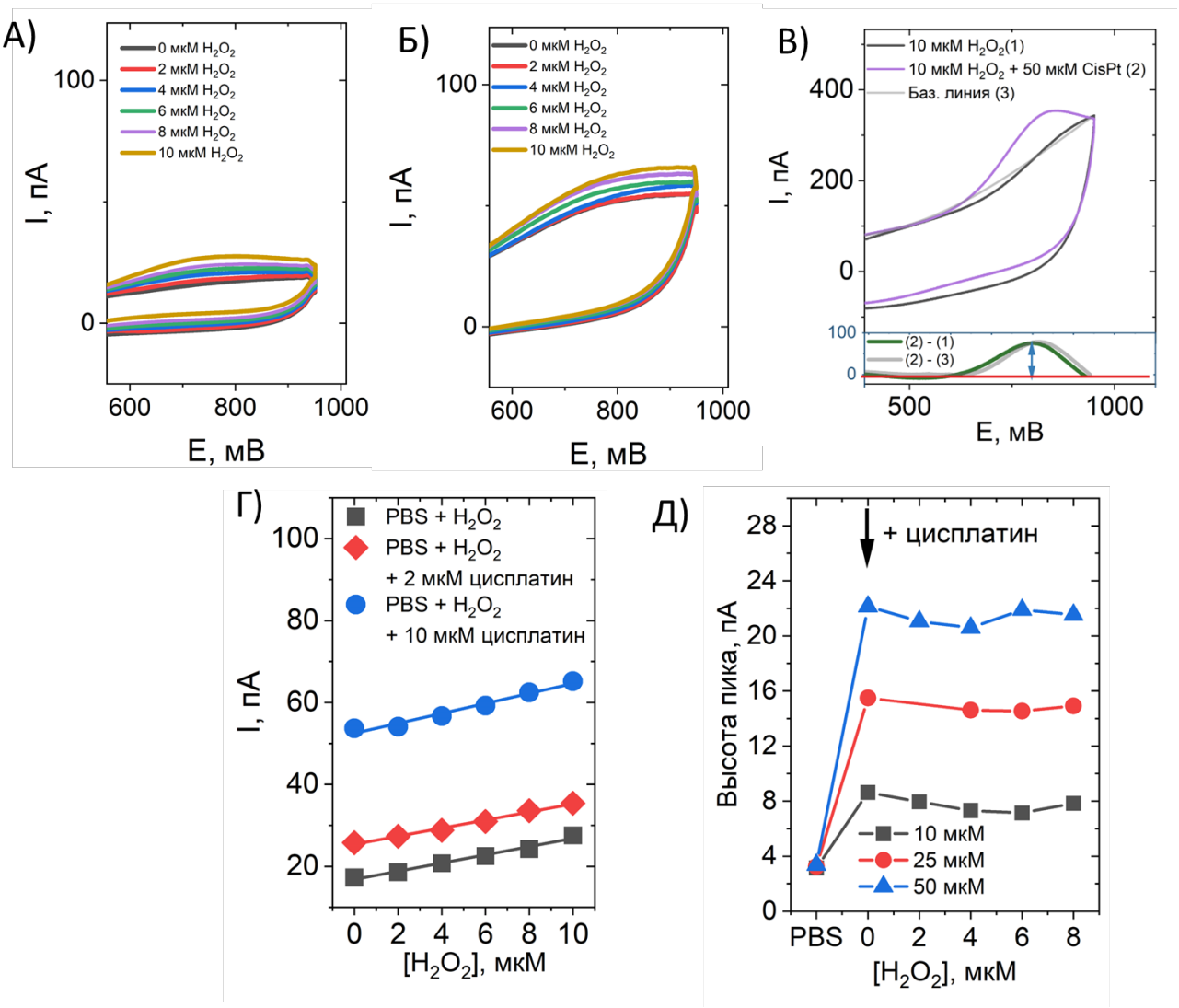


Рисунок 3.4.1.5 - (А) Циклические вольтаммограммы при различных концентрациях H_2O_2 (0-10 мкМ) (Б) ЦВ в растворе 10 мкМ цисплатина с варьированием концентрации H_2O_2 (0-10 мкМ) (В) ЦВ в 10 мкМ пероксида водорода в присутствии 50 мкМ цисплатина. В нижней вставке график пика анодного тока за вычетом базового значения, обусловленного предельным диффузионным током перекиси водорода и емкостного тока (Г) Измеренный ток при потенциале +800 мВ в разных растворы перекиси водорода (0-10 мкМ) и смеси перекиси водорода и 2 или 10 мкМ цисплатина (Д) Зависимость высоты велечины пика тока от концентрации H_2O_2. Все измерения проводились в растворе PBS (pH 7,4). Скорость развертки потенциала – 0,25 В/с.

3.4.2 Определение комплексов Pt(II) внутри единичных клеток и сфероидов

Для оценки внутриклеточных концентраций цисплатина в клеточной линии MCF-7 проводили инкубацию клеток с 100 мкМ цисплатина в течение 6 и 24 часов (рисунок 3.4.2.1 А, Б). Затем платиновый наноэлектрод использовался для проникновения в отдельные клетки, с записью ЦВ как в цитоплазме, так и во внешней среде (рисунок 3.4.2.1 В).

После 6-часовой инкубации был выявлен воспроизводимый пик окисления цисплатина, и градуировочный график использовался для определения средних концентраций цисплатина в клетках MCF-7. Интересно, что пик был смещен влево (на 50-75 мВ) по сравнению с измерениями в растворе. Это явление можно объяснить использованием среды, отличной от буферного раствора, а также влиянием клеточного метаболизма на окружение Pt (II). После 24-часовой инкубации наблюдалось снижение концентрации цисплатина в клетках.

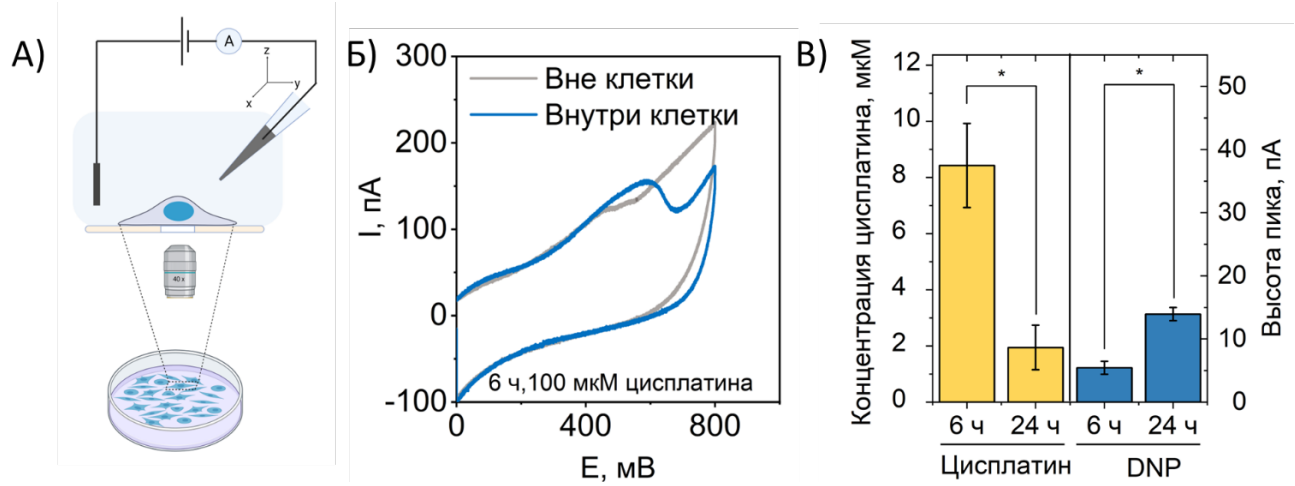


Рисунок 3.4.2.1 - А) Схематическое изображение электрохимической детекции цисплатина в единичных клетках. Б) ЦВ внеклеточного и внутриклеточного измерения цисплатина после инкубации клеток в 100 мкМ растворе в течение 6 часов. В) Накопление DNP и цисплатина в клетках MCF-7 через 6 и 24 часа [329].

В данном исследовании использовалось высоколипофильное пролекарство DNP как альтернатива стандартному цисплатину с целью улучшения его накопления в клетках. DNP представляет собой цисплатин, модифицированный двумя аксиальными лигандами напроксена, с целью улучшения его накопления в клетках. С применением рентгеновской спектроскопии ближней адсорбции

(XANES) на опухолевых клетках, предварительно инкубированных с этим препаратом, было показано, что DNP действует как пролекарство, проникая в клетку в форме Pt(IV) и медленно высвобождая цисплатин. В ходе исследования клетки MCF-7 инкубировались с 5 мкМ DNP в течение 6 и 24 часов. По истечении 24 часов инкубации с DNP наблюдался рост анодного пика Epa(PtII/PtIV), что связывалось с накоплением DNP и последующим высвобождением цисплатина. Увеличение концентрации цисплатина при использовании DNP оказалось сопоставимым с результатами для 100 мкМ цисплатина, несмотря на значительно меньшую концентрацию DNP.

Ограниченная доступность лекарств, а также градиенты кислорода и питательных веществ являются важными аспектами для сфероидов, приближая их к модели опухоли *in vivo*. Для измерения концентрации цисплатина на разных уровнях сфероида на основе MCF-7 после инкубации 6 часов с 100 мкМ цисплатина или DNP использовался наноэлектрод, вводимый в сфероид с шагом в 5 мкм. Полученные вольтамперограммы (рисунок 3.4.2.2 А) показали присутствие Pt(II) как в предварительно инкубированных цисплатином, так и DNP сфероидах MCF-7. Внутри сфероидов наблюдалось высокое накопление липофильного пролекарства DNP по сравнению с менее липофильным цисплатином (рисунок 3.4.2.2 Б). Установлено, что наибольшие концентрации цисплатина и DNP наблюдались во внешнем слое сфероидов, снижаясь по мере приближения к ядру. Эти результаты соответствуют ранее опубликованным данным, полученным с применением LA-ICP-MS для анализа цисплатина и его производных в сфероидах.

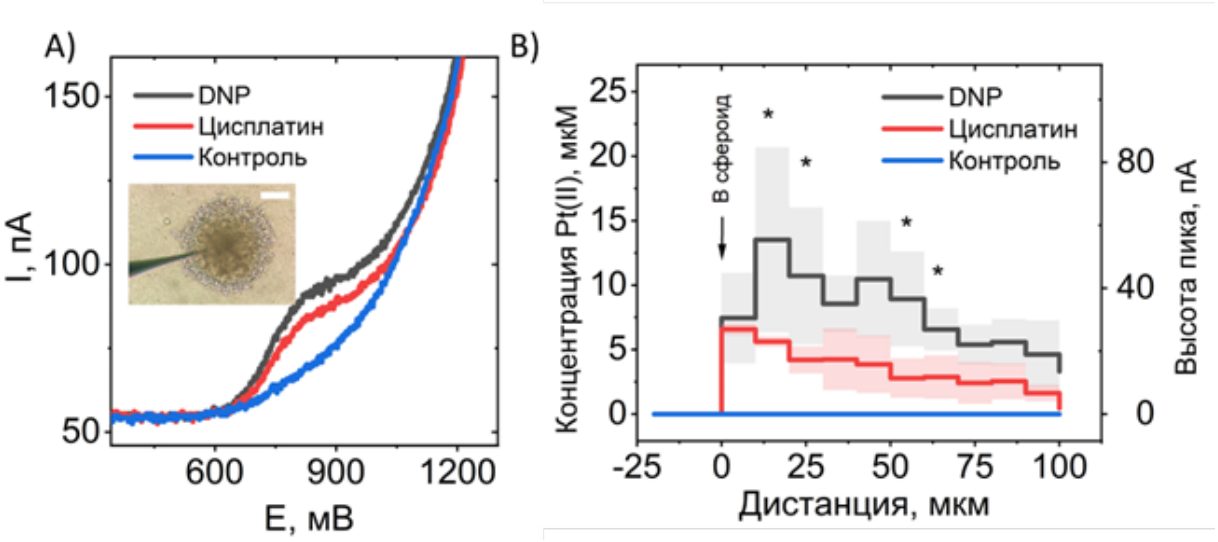


Рисунок 3.4.2.2 - А) ЦВ внутри сфероида для цисплатина и DNP. Б) Профили накопления DNP и цисплатина внутри сфероидов [329].

3.4.3 Детекция Pt(II)-содержащих веществ внутри опухоли мыши *in vivo* прижизненно

Исследования по распределению платиносодержащих препаратов были проведены измерения *in vivo* на модели мышиной карциномы молочной железы EMT6. Группам мышей вводили внутривенно 2 мг/кг цисплатина или DNP, тогда как контрольной группе вводили PBS. Подготовка мышей проводилась по описанной ранее методике. После промывания опухоли раствором PBS, измерения выполняли с использованием наноэлектрода, аккуратно вводя его под углом 45° с использованием манипулятора. ЦВ регистрировали на разных глубинах опухоли, с интервалом 100 мкм до максимальной глубины 800 мкм. Задетектированный пик варьировался на разных глубинах, указывая на изменение концентрации Pt(II) внутри опухоли. Следует отметить, что стабильность наноэлектрода и его электрохимические характеристики сохранялись после *in vivo* измерений. Также в опухолях, обработанных DNP, наблюдалось более глубокое проникновение по сравнению с цисплатином, что согласуется с ранее полученными результатами, подтверждающими более эффективное накопление DNP в клетках и сфероидах по сравнению с цисплатином[329].

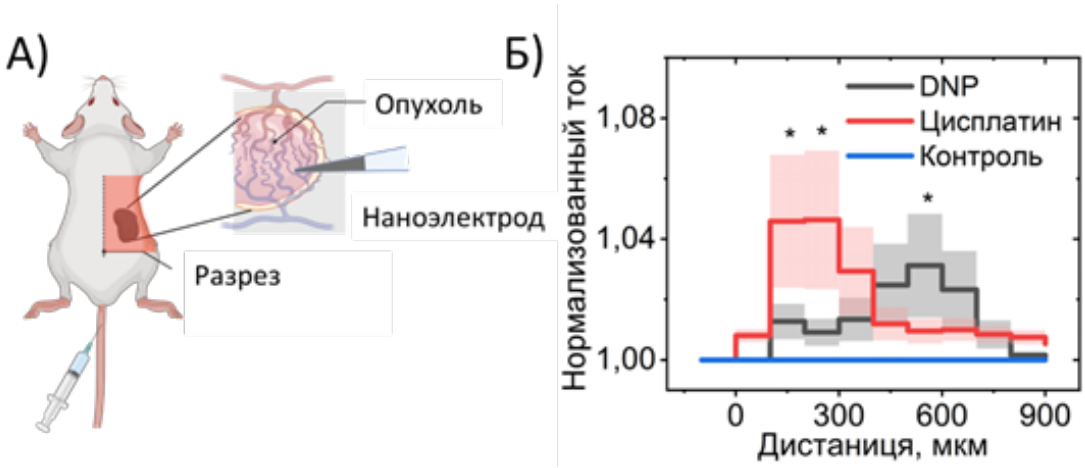


Рисунок 3.4.3.1 - (А) Схема проведения эксперимента (Б) Профиль распределения цисплатина и DNP внутри опухоли [329].

3.4.4 Электрохимическое определение нового пролекарства Pt(IV) с аксиальным лигандом метронидазола в условиях гипоксии

Эффективность противоопухолевой терапии во многом зависит от способности лекарственных препаратов достигать целевого участка в организме. Метод электрохимического определения ионов Pt^{2+} с помощью платинированного наноэлектрода позволяет проводить прямую количественную оценку содержания платинсодержащих препаратов в терапевтической зоне, что дает возможность оценивать их эффективность. В данном исследовании мы рассматриваем метаболит пролекарства Pt-Mnz, индуцированный гипоксией. Предполагается, что нитроароматический компонент комплекса Pt-Mnz способствует его направленной доставке в зоны гипоксии благодаря необратимому восстановлению нитрогруппы. В качестве контрольных соединений были синтезированы два пролекарства Pt(IV) - Pt-COOH и Pt-Pcm, в которых использованы невосстанавливаемые аксиальные лиганды (рисунок 3.4.4.1).

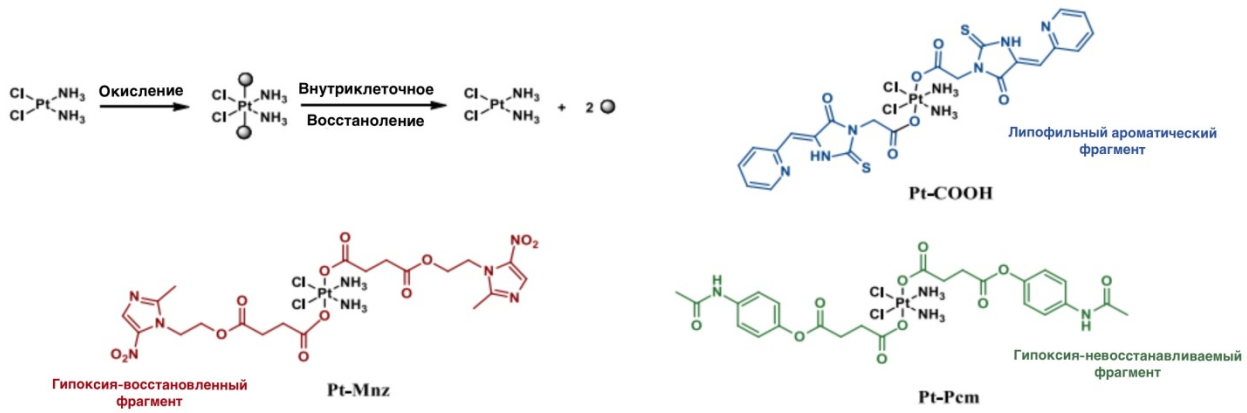


Рисунок 3.4.4.1 - Пролекарства платины(IV) с гипоксически-чувствительными аксиальными лигандами Pt-Mnz и контрольные соединения Pt-Pcm [330]

Трехмерные (3D) сфероиды являются полезным инструментом для исследования гипоксии и активируемых гипоксией агентов, поскольку такие клеточные модели более точно имитируют реальные опухоли. Для определения ионов Pt^{2+} на разных глубинах опухолевых сфероидов, включая зоны гипоксии, использовали платиновый наноэлектрод диаметром 60 нм. Циклические вольтаммограммы были записаны на различных глубинах сфероида в диапазоне 400–1200 мВ. Пик окисления Pt(II)/Pt(IV) наблюдался при потенциале 0,6–0,7 В относительно Ag/AgCl. Градуировочный график, построенный по результатам измерений в различных растворах цисплатина, позволил количественно оценить концентрацию Pt^{2+} внутри сфероида и сравнить накопление Pt^{2+} в сфероидах, инкубированных с различными пролекарствами на основе Pt(IV) или цисплатином. Метронидазол специфичен для анаэробных бактерий, так как внутриклеточно восстанавливается до нитросодержащих промежуточных соединений [331]. Предполагается, что конъюгат метронидазола с цисплатином будет восстанавливаться в глубине сфероидов, способствуя удержанию цисплатина в гипоксической зоне (рисунок 3.4.4.3 А). С использованием платинового наноэлектрода для электрохимических измерений в отдельных сфероидах можно также зафиксировать восстановление метронидазола внутри сфероидов. В качестве модели гипоксической опухоли использовали сфероид MCF-7. Для подтверждения наличия гипоксии внутри сфероидов MCF-7 был измерен профиль распределения кислорода на разных глубинах. Уровень pO2 в 3D-модели опухоли определяли,

погружая платиновый наноэлектрод на различные глубины внутри сфероида (0-50 мкм от поверхности). Количество кислорода определялось по току при потенциале в диапазоне -500 до -600 мВ ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$). На глубине 40 мкм уровень кислорода уменьшался в пять раз по сравнению с уровнем на поверхности (рисунок 3.4.4.2 А).

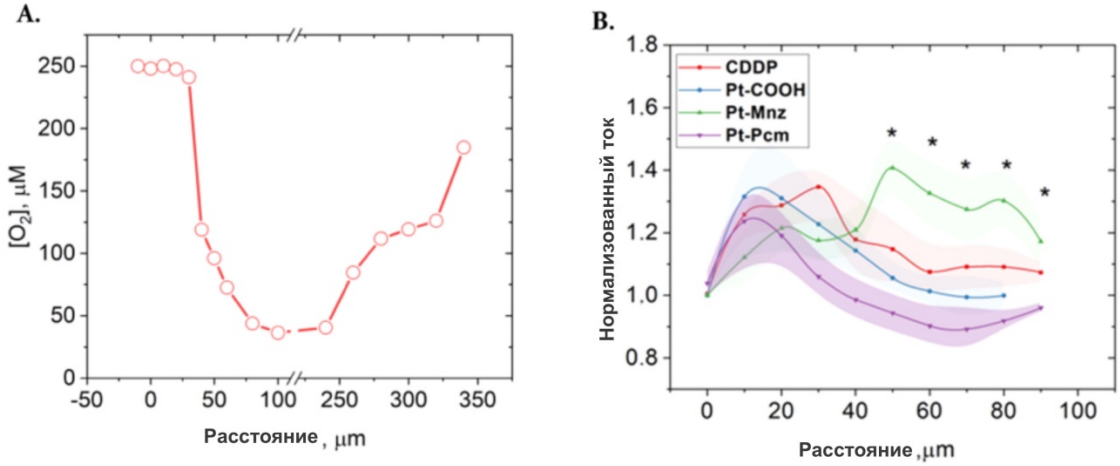


Рисунок 3.4.4.2 - (А) Профиль содержания кислорода на разных глубинах сфероидов MCF-7, измеренный с использованием платинового наноэлектрода. (Б) Профиль распределения Pt^{2+} в сфероидах MCF-7, инкубированных с пролекарствами Pt(IV) и цисплатином в течение 6 ч. Нормализованный ток в зависимости от расстояния от поверхности сфероида MCF-7, инкубированного с Pt-Mnz (n = 3), Pt-COOH (n = 4), Pt-Pcm (n = 4) и цисплатином (n = 3). Ток прямо пропорционален концентрации Pt^{2+}. Стандартная ошибка обозначена цветным фоном. *p < 0,05 (ANOVA) Pt-Pcm [330]

Для оценки способности пролекарств Pt(IV) накапливаться в гипоксических зонах сфероидов MCF-7 их инкубировали 6 часов с 100 μM пролекарств Pt(IV). Этот период необходим для равномерного распределения пролекарств в объемах сфероидов и высвобождения активных ионов Pt^{2+}. В качестве положительного контроля использовали сфероиды MCF-7, инкубированные с 100 μM цисплатина. Затем платиновые наноэлектроды вводили на различные глубины сфероидов для обнаружения сигнала цисплатина (или его внутриклеточных метаболитов, ионов Pt^{2+}). Для измерений использовали по три-четыре сфероида для каждого пролекарства Pt(IV). На полученных ЦВ-зависимостях был отмечен характерный пик окисления Pt(II)/Pt(IV) около 800 мВ. Результаты ЦВ-измерений в сфероидах MCF-7, инкубированных с пролекарствами Pt-Mnz, Pt-Pcm, Pt-COOH и цисплатином, демонстрируют, как концентрация Pt^{2+} меняется с увеличением

глубины сфероидов (рисунок 3.4.4.2 В). Профиль распределения Pt^{2+} типичен для сфероидов: наибольшая концентрация Pt^{2+} наблюдается у поверхности сфероида, а с увеличением глубины концентрация снижается из-за ограниченной диффузии. Для пролекарств Pt-COOH и Pt-Pcm профили распределения Pt^{2+} схожи с аналогичными для цисплатина (рисунок 3.4.4.2 В, фиолетовая и синяя линии). Несмотря на высокую липофильность, Pt-COOH не накапливается в гипоксических зонах сфероидов. Сравнение способности накапливать Pt^{2+} между Pt-COOH и цисплатином показывает, что быстрая деградация пролекарств Pt(IV) снижает их эффективность. Это указывает на то, что эффективность пролекарств Pt-COOH и Pt-Pcm сопоставима с цисплатином,

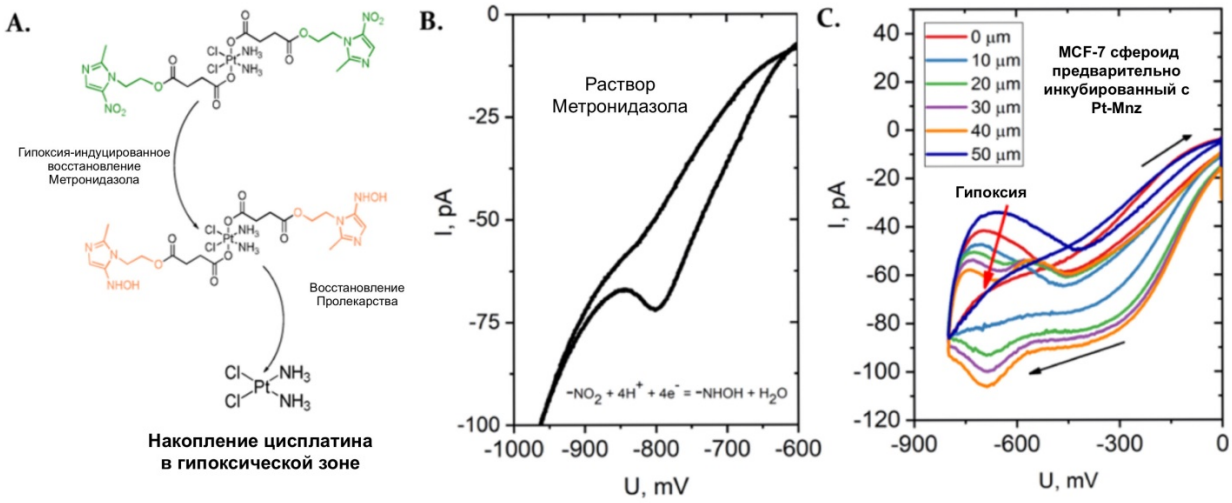


Рисунок 3.4.4.3 - (A) Схематическое изображение внутриклеточного метаболизма Pt-Mnz. (B) Циклические вольтамперограмы раствора метронидазола (1 мМ) в буфере PBS, зарегистрированные с использованием платинового наноэлектрода при скорости сканирования 400 мВ/с. (C) Вольтамперограммы, снятые на разных глубинах сфероидов MCF-7, предварительно инкубированных с Pt-Mnz в течение 2 часов. Восстановление метронидазола и снижение уровня кислорода указаны стрелками. Скорость сканирования составила 400 мВ/с Pt-Pcm [330]

Для подтверждения роли фрагмента метронидазола в поведении Pt-Mnz внутри сфероидов было изучено восстановление фрагмента метронидазола Pt-Mnz на глубине сфероидов. Сначала было проведено электрохимическое исследование раствора метронидазола в буфере PBS с использованием платинового наноэлектрода. Восстановление нитрогруппы наблюдалось в диапазоне −860 до −700 мВ ($-NO_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow -NHOH + H_2O$). Количество электронов рассчитали по уравнению Лавирона (рисунок 4.4.2 В). Затем сфероиды MCF-7 инкубировали с

Pt-Mnz в течение 2 часов и фиксировали электрохимически восстановление метронидазола по мере его проникновения в гипоксическую зону. Пик около −700 мВ, указывающий на восстановление метронидазола, постепенно появлялся на внутриклеточных вольтаммограммах по мере увеличения глубины проникновения наносенсора в сфероид с Pt-Mnz (рисунок 3.4.4.2 С). Чем ниже концентрация кислорода в сфероиде, тем более выражен пик восстановления метронидазола до гидроксиламина. Таким образом, чувствительное к гипоксии восстановление метронидазола было впервые подтверждено вживую в сфероиде MCF-7 при помощи электрохимического метода.

Стоит отметить, что распределение пролекарства Pt-Mnz отличается от других препаратов и цисплатина. В сфероидах MCF-7, инкубированных с пролекарством Pt-Mnz, ионы Pt^{2+} были обнаружены на глубине до 100 мкм (рисунок 4.4.2 В, зеленая кривая). Pt-Mnz обладает способностью накапливать ионы Pt^{2+} в гипоксических зонах, значительно превосходя по накоплению Pt-COOH, Pt-Pcm и цисплатин. Скорее всего, восстановление метронидазола, стимулированное гипоксией, способствует задержке Pt-Mnz в сфероидах, в то время как комплекс действует как пролекарство, постепенно высвобождая цисплатин. Примечательно, что электрохимическое обнаружение возможно по всему объему сфероидов, тогда как флуоресцентные метки обычно ограничиваются только поверхностным слоем (до 50 мкм).

3.4.5 Пролекарства Pt(IV) с нестероидными противовоспалительными препаратами в аксиальной позиции

Результаты, представленные в данном разделе, получены в сотрудничестве с к.х.н. Красновской О.О. и Спектором Д.В. Проведено исследование серии новых пролекарств Pt(IV), содержащих нестероидные противовоспалительные средства (напроксен, диклофенак, флубипрофен) и стеариновую кислоту в аксиальной позиции. Было разработано шесть пролекарств Pt(IV) (5−10), которые продемонстрировали более высокую антипролиферативную активность по сравнению с цисплатином, а также способность преодолевать резистентность опухолевых клеток к цисплатину.

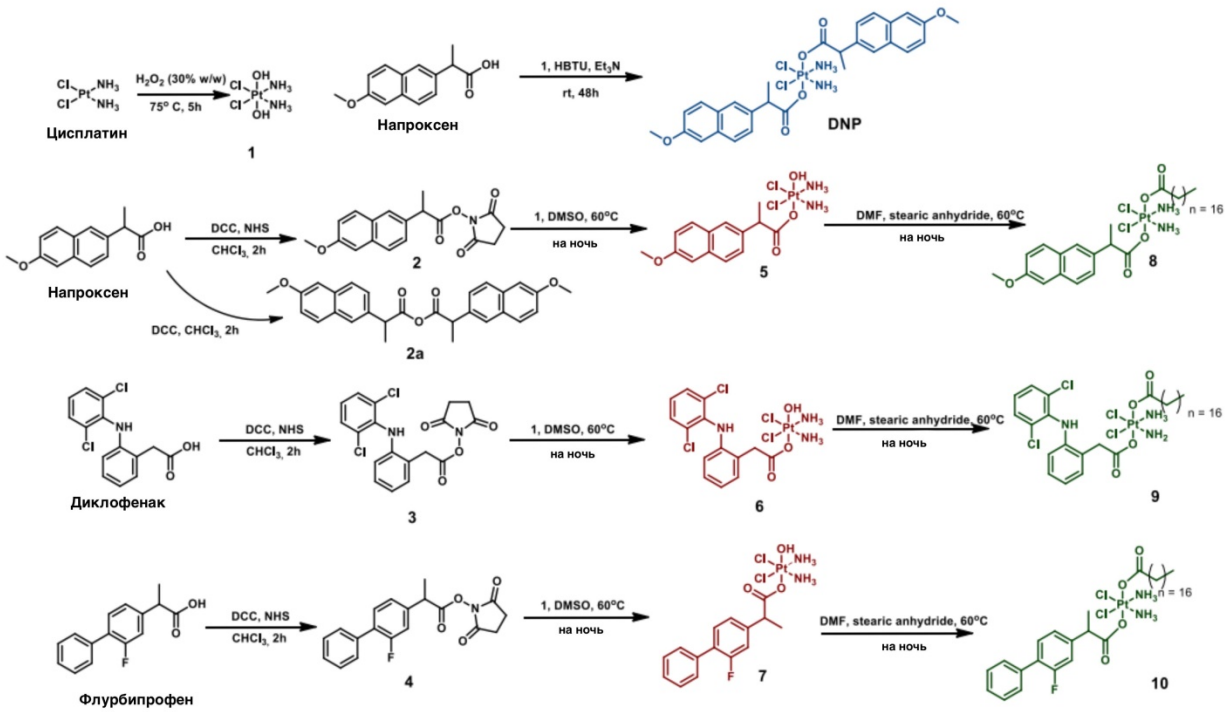


Рисунок 3.4.5.1 - Синтетический процесс получения пролекарств на основе Pt(IV): 5-10 и DNP [332][333]

Регулировка липофильности препарата путем изменения аксиальных лигандов позволила разработать наиболее эффективное пролекарство Pt(IV) 7, которое показало увеличение внутриклеточного накопления до 153 раз по сравнению с цисплатином, а также наномолярную цитотоксичность как в 2D-, так и в 3D-клеточных культурах [332]. С помощью платинового наноэлектрода был определен профиль распределения ионов платины внутри сфероидов MCF-7 после инкубации с пролекарствами цисплатина. Накопление цисплатина в тканях опухоли молочной железы EMT6 у мышей линии BALB/c после введения пролекарств Pt(IV) было подтверждено электрохимическим методом.

Для исследования распределения ионов Pt^{2+} в сфероидах аденокарциномы MCF-7, предварительно обработанных пролекарствами Pt(IV) 7, 10, DNP и цисплатином, использовали платиновый наноэлектрод. Сфероиды MCF-7 инкубировали с 100 μM растворами препаратов в течение 6 часов, затем промывали и переносили в свежеприготовленную среду. В качестве контроля использовали необработанные сфероиды. На полученных вольтаммограммах наблюдалось присутствие ионов Pt^{2+} на различных глубинах обработанных препаратовами сфероидов, что указывает на высвобождение цисплатина из пролекарств Pt(IV).

Пик окисления цисплатина E(Pt^{2+}/Pt^{4+}) регистрировался примерно при 800 мВ. Определяя глубину сигнала и высоту пика тока, можно оценить степень проникновения препарата. Профили распределения ионов Pt^{2+}, высвобожденных из пролекарств 7, 10, DNP и цисплатина в сфероидах MCF-7, представлены на рисунке 3.4.5.2 B. Результаты показывают, что в сфероидах, обработанных пролекарствами Pt(IV), обнаружено большее количество цисплатина по сравнению с обработкой такой же дозой цисплатина. Максимальная концентрация ионов Pt^{2+} была зарегистрирована в сфероидах, обработанных пролекарством 7 (рисунок 3.4.5.2 C).

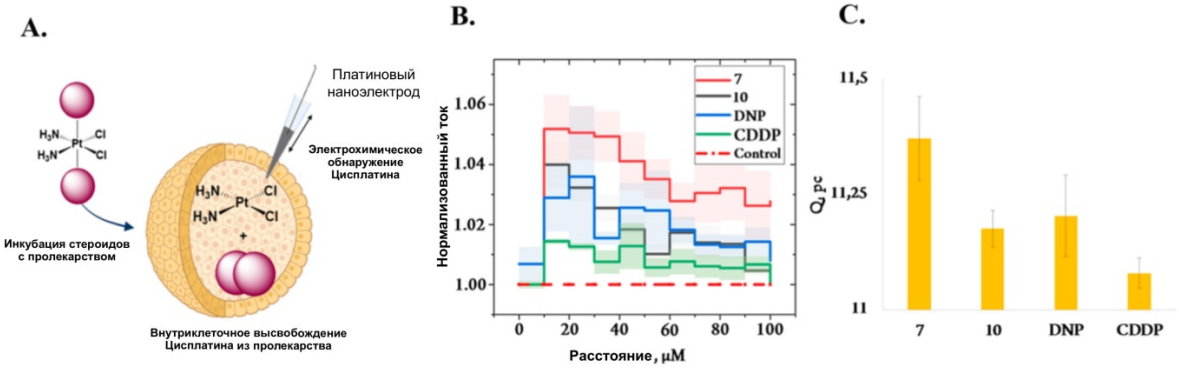


Рисунок 3.4.5.2 - (A) Схема электрохимического обнаружения цисплатина внутри сфероида MCF-7 с использованием платинового наноэлектрода. (Б) Профиль распределения ионов Pt^{2+} в сфероидах MCF-7, инкубированных с пролекарствами 7, 10, DNP или цисплатином (CDDP) в течение 6 часов. (C) Общий ток окисления цисплатина Pt2+/Pt4+, измеренный после инкубации сфероидов MCF-7 с цисплатином и пролекарствами Pt(IV) и [332]

Ионы Pt^{2+} были обнаружены на большей глубине в сфероидах по сравнению с контрольными соединениями. Профили распределения ионов Pt^{2+}, определенные электрохимически в сфероидах, характерны для 3D-культур. Наибольшее накопление препарата наблюдалось во внешнем слое сфероидов, при этом концентрация снижалась с увеличением глубины из-за ограничений диффузии. Накопление платины было прямо связано с липофильностью соединений. Таким образом, электрохимическое определение ионов Pt^{2+} в живых опухолевых сфероидах позволяет быстро оценить распределение препаратов на основе платины без необходимости специальной подготовки образцов.

Пролекарства Pt(IV) предназначены для введения в кровоток *in vivo*. Таким образом, пролекарство должно быть достаточно стабильным, чтобы доставить цисплатин в опухоль в защищенной форме, при этом сохраняя способность высвобождать цисплатин внутри опухоли. Ожидалось, что разработанные

пролекарства Pt(IV) будут медленно разрушаться в кровотоке и эффективно накапливать цисплатин в опухоли. Для проверки этой гипотезы оценили способность пролекарств Pt(IV) доставлять цисплатин в опухоль молочной железы EMT-6 у мышей линии BALB/C. Эксперимент заключался в введении одинаковых доз пролекарства 7, DNP и цисплатина разным группам мышей и оценке количества накопленного цисплатина в опухолях. Через 2 или 24 часа после инъекции электрохимически определяли уровень ионов $Pt^{2}+$ на различных глубинах опухолей EMT-6 у мышей. Препарат вводили интротуморальным и внутривенным методами. Электрохимические измерения проводили в том порядке, в котором вводились препараты, чтобы избежать различий в метаболизме. При интротуморальном введении дозу 2 мг/кг пролекарства 7 вводили непосредственно в опухоль EMT-6 у трех мышей. Такая же доза цисплатина была введена другой группе из трех мышей внутривенно. Еще три мыши получили растворитель и использовались в качестве контрольной группы. Через 2 часа мышей седатировали по очередности, фиксировали на чашке Петри, и кожный лоскут над опухолью отделяли от подлежащих тканей (рисунок 3.4.5.3 А).

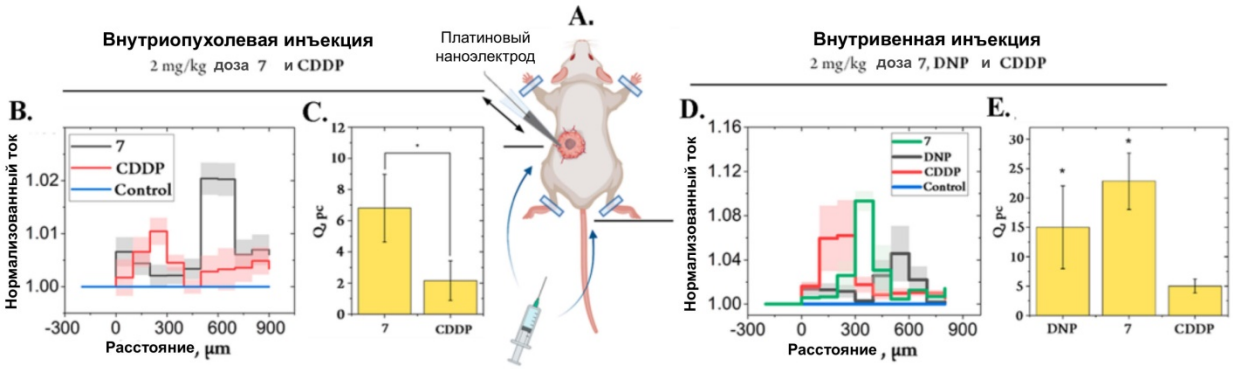


Рисунок 3.4.5.3 - (А) Схема электрохимического определения ионов Pt^{2+} *in vivo.* (Б) Профиль распределения ионов Pt^{2+} в опухоли EMT-6 через 2 часа после интротуморального введения соединения 7 или цисплатина (CDDP). Ионы Pt^{2+} регистрировались по пику окисления Pt^{2+}/Pt^{4+} на разных глубинах опухоли EMT-6 через 2 часа после интротуморального введения пролекарства 7 (три мыши), CDDP (три мыши) и растворителя (контроль, три мыши). (С) Общее количество ионов Pt^{2+}, обнаруженное через 2 часа после интротуморального введения пролекарства 7 и CDDP. (D) Профиль распределения ионов $Pt^{2}+$ в опухоли EMT-6 через 2 часа после внутривенного введения соединения 7 (три мыши), DNP (три мыши) или CDDP (три мыши). (Е) Общее количество ионов $Pt^{2}+$, обнаруженное через 24 часа после внутривенного введения пролекарств 7, DNP и CDDP. $p < 0,01$ [332]

Платиновый наноэлектрод вводили на разные глубины опухолей EMT-6 и регистрировали циклические вольтаммограммы в диапазоне 400−1200 мВ. Редокс-волны, соответствующие окислению Pt^{2+}/Pt^{4+} цисплатина, фиксировались на различных глубинах опухоли EMT-6. Суммарные результаты электрохимического обнаружения ионов Pt^{2+} в опухолях EMT-6 после интротуморального введения представлены на рисунке 4Б. Пики тока на ЦВ присутствовали только при измерениях на глубине до 200 мкм после введения цисплатина. После введения пролекарства 7 соответствующие пики тока на ЦВ регистрировались на глубине до 600 мкм (Рисунок 6B). Концентрация ионов Pt^{2+} была гораздо выше в опухоли после введения пролекарства 7 по сравнению с эквивалентной дозой цисплатина (Рисунок 6C). В исследовании системного введения 2 мг/кг пролекарства 7 (три мыши), цисплатина (три мыши) и DNP (три мыши) вводили внутривенно, а электрохимическое определение ионов Pt^{2+} в опухолях каждой группы проводилось через 24 часа, как было описано ранее. Результаты электрохимического определения ионов Pt^{2+} в опухолях EMT-6 после внутривенного введения препаратов представлены на рисунке 4D и 4E. Наибольшая концентрация ионов Pt^{2+} в опухоли EMT-6 была измерена после введения пролекарства 7. Введение аналогичной дозы цисплатина также приводило к значительному накоплению ионов Pt^{2+} в опухоли, но их концентрация была меньше по сравнению с пролекарством 7. После введения пролекарства DNP ионы Pt^{2+} обнаруживались на глубине 600 мкм, однако общее количество обнаруженного цисплатина после введения пролекарства 7 было выше. Такое распределение ионов Pt^{2+} в опухолях можно объяснить гетерогенностью сосудистой сети опухоли, которая преимущественно располагается на поверхности, но также образует нерегулярную структуру внутри объема опухоли. Прямое сравнение способности препаратов проникать в опухоль показало высокую проникающую способность наиболее липофильного пролекарства Pt(IV).

3.4.6 Комбинированная детекция АФК и цисплатина в результате активации Рибоплатина

Результаты, представленные в данном разделе, получены в сотрудничестве с к.х.н. Красновской О.О. и Спектором Д.В. Фотоактивируемые пролекарства являются инновационными соединениями, представляющими собой конъюгаты комплексов Pt(II) с фотосенсибилизатором, который активируется видимым или ближним ИК-светом. Возбуждение фотосенсибилизатора вызывает перенос электрона к центру комплекса Pt(IV), что приводит к восстановлению пролекарства и высвобождению активного комплекса Pt(II). Кроме того, использование фотосенсибилизатора, генерирующего активные формы кислорода (АФК), в сочетании с комплексами Pt(II) позволяет объединить ФДТ и химиотерапию в одном препарате. В данной работе использовалось пролекарство Pt(IV) (рибоплатин), основанное на цисплатине и тетраацетилрибофлавине (TARF) в аксиальном положении, предоставленное научной группой к.х.н. Красновской О.О.

Для оценки фотодинамических свойств рибоплатина измеряли концентрацию АФК при фотоактивации 10 мкМ рибоплатина. В результате фотоактивации наблюдалось увеличение тока, после отключения света он возвращался к исходным значениям (рисунок 3.4.6.1 А). Построена градуировочная зависимость: растворы рибоплатина (2-80 мкМ) облучали светодиодной лампой для флуоресцентной микроскопии (λвозб = 450 нм) с последующей записью хроноамперограммы при 800 мВ. Наблюдалась линейная зависимость АФК от концентрации рибоплатина (рисунок 3.4.6.1 Б).

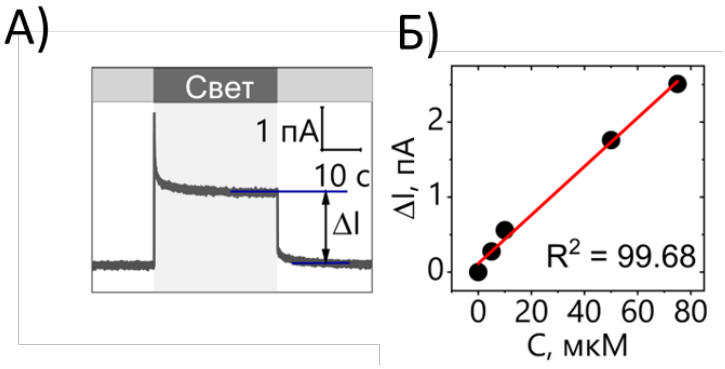


Рисунок 3.4.6.1 - (А) Хроноамперограмма в 10 мкМ растворе рибоплатина при облучении светом (Б) Градуировочный график для растворов рибоплатина (2-80 мкМ).

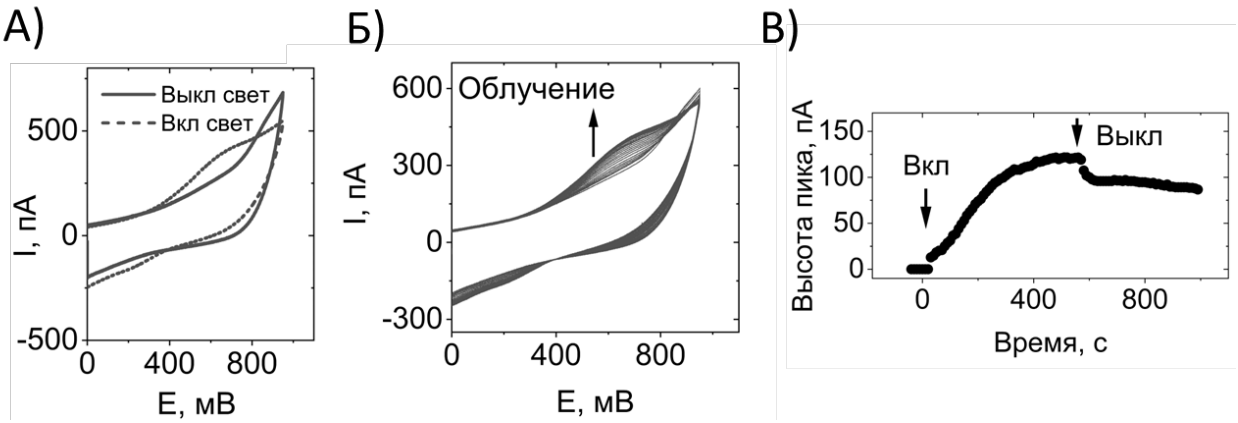


Рисунок 3.4.6.2 – (А) ЦВ в растворе рибоплатина до и после облучения (Б) ЦВ при фотоактивации рибоплатина в течение 10 минут (В) Зависимость высоты пика тока от времени при фотоактивации рибоплатина [334].

Результаты продемонстрировали способность рибоплатина высвобождать цисплатин в растворе под воздействием света. Раствор рибоплатина в концентрации 25 мкМ подвергался постоянному облучению ($\lambda_{возб}$ = 450 нм) с записью ЦВ в течение 10 минут. На ЦВ видны заметные изменения до и после светового воздействия (рисунок 3.4.6.2 А). Возрастание величины пика тока во время облучения, по-видимому, связано с высвобождением форм Pt(II) из рибоплатина (рисунок 3.4.6.2 Б, В). Высвобождение цисплатина под действием света было дополнительно подтверждено методом ВЭЖХ [334].

Для моделирования опухолевых условий были выбраны сфероиды MCF-7, учитывая их повышенную устойчивость к ФДТ и химиотерапии. На рисунке 3.4.6.3 А представлена схема проведения электрохимических измерений внутри сфероидов с использованием платинового наноэлектрода. Для количественного анализа АФК измерения проводили при постоянном напряжении +0,8 В относительно ХСЭ. Разница между силой тока при включении и выключении света измерялась на различных глубинах сфероидов (рисунок 3.4.6.3 Б). Облучение синим светом приводило к значительному увеличению токовых значений.

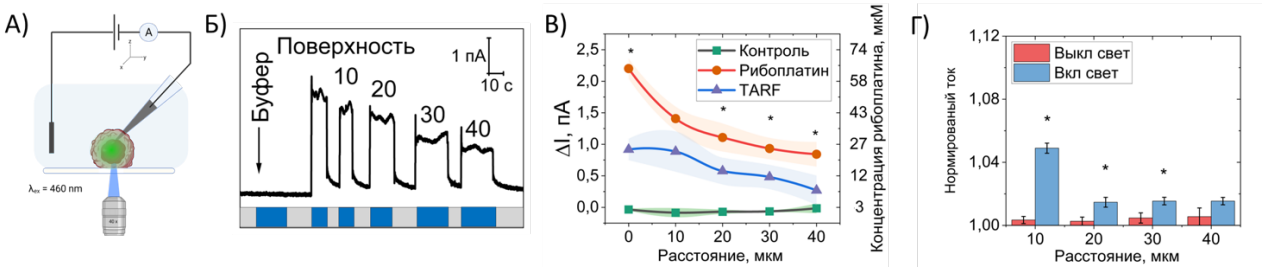


Рисунок 3.4.6.3 - А) Схематическое изображение эксперимента на сфероидах. Б) Хроноамперограммасна разных глубинах сфероида. Синим цветом показаны области включения освещения. В) Распределение АФК внутри сфероидов в результате фотоактивации накопленных рибоплатина и TARF. Г) Сравнительное исследование Pt(II) внутри сфероидов при фотоактивации и без рибоплатина [334]

Отсутсвтие света вызвало понижение величины тока к первоначальному значению. Экспериментальные данные по генерации АФК на различных глубинах сфероидов при фотоактивации рибоплатина представлены на рисунке 3.4.6.3 В. В сфероидах, предварительно инкубированных. Концентрация АФК была выше в сфероидах с рибоплатином, чем с TARF, что объясняется способностью рибоплатина хорошо накапливаться в клетках.

Фотоуправлянмое высвобождение цисплатина определяли по соответсвующему пику тока ЦВ. Фотоактивация синим светом приводила к увеличению пика анодного тока, что прямо подтверждало высвобождение цисплатина из пролекарства (рисунок 3.4.6.3 Г) [334].

Таким образом, впервые фотоуправляемое высвобождение цисплатина и выработка АФК были обнаружены электрохимически в режиме реального времени. За счет использования разработанного метода удалось впервые подтвердить одновременное высвобождение фотоактивированного противоопухолевого препарата цисплатина и АФК, сгенерированных пролекарством Pt(IV) двойного действия, внутри живых опухолевых сфероидов.

3.5 Исследование коррелятивной генерации АФК и распределения медьсодержащих соединений внутри единичных клеток и тканей животных с помощью модифицированных золотых наноэлектродов

В предыдущих разделах были продемонстрированы возможности дисковых платиновых наноэлектродов для электрохимической детекции металл-содержащих

комплексов платины, и определен уровень генерируемых ими АФК. В данном разделе будет исследована генерация АФК ионами меди и медными металлокомплексами и медьсодержащими поверхностями. Будет продемонстрирована возможность создания золотых дисковых наноэлектродов с дальнейшей модификацией селективными лигандами на ионы меди.

3.5.1 Исследование эффективности генерации АФК в клетках и 3D-сфероидах металлокомплексами меди

Успех цисплатина в лечении различных онкологических заболеваний способствовал выходу металлоорганических соединений на передовые позиции в разработке противораковых препаратов. Среди них производные меди представляют значительный интерес благодаря их способности катализировать образование активных форм кислорода и азота.

Для многих опухолей характерно плохое кровоснабжение, что приводит к низким уровням кислорода, благоприятствуя инвазии, метастазированию и переходу к анаэробному метаболизму. Однако гипоксия в опухолях может быть использована для создания пролекарств, которые активируются в восстановительной среде раковых клеток. В этом контексте медь является особенно перспективной, поскольку она может существовать в клетках в двух окислительных состояниях. Гипоксические условия раковых клеток способствуют восстановлению Cu(II) до Cu(I), что сложно реализовать в нормальных клетках, открывая возможность для целенаправленного воздействия на опухоли. Ионы Cu(I) могут катализировать образование АФК и АФА, вызывая проапоптотический окислительный стресс. Соли меди имеют существенно меньшую токсичность по сравнению с соединениями платины, а медь необходима организму. Её физиологическая концентрация в организме строго контролируется различными механизмами. Однако избыток меди может оказывать токсическое действие на здоровые клетки, вызывая образование активных форм кислорода и азота, что объясняет необходимость строгого контроля уровня меди в организме. Свободная медь способна участвовать в образовании АФК через реакцию Хабера-Вейсса, в ходе которой гидроксильные радикалы (OH•) образуются из перекиси водорода, а

полученные АФК могут повреждать ДНК и вызывать нековалентные взаимодействия с двойной спиралью ДНК.

Таким образом, способность меди образовывать активные формы кислорода делает её перспективной для окислительного повреждения опухолевых клеток. Проникновение меди и её производных в клетки происходит преимущественно в окислительном состоянии Cu(I). Ключевая задача заключается в разработке цитотоксических соединений, способных эффективно проникать через клеточную мембрану. Важно подчеркнуть, что многие опухоли накапливают аномально высокие концентрации меди, а её уровень в сыворотке крови может удваиваться у пациентов с опухолями молочной железы. Поэтому изучение распределения меди в клетках и тканях, а также её влияние на метаболиты, такие как АФК, представляет собой важную научную задачу.

Эффективность терапии с применением металлсодержащих агентов часто зависит от дозировки и снижается со временем из-за слабого проникновения таких агентов в опухолевые ткани и возникновения устойчивости к ним. При системном введении препаратов *in vivo* их распределение варьируется не только в масштабе организма, но и на уровне микроокружения в тканях и органах. Для оценки эффективности лекарств важно контролировать их поведение в реальном времени. Это требует разработки наноразмерных сенсорных систем, способных контролировать параметры *in vivo.*

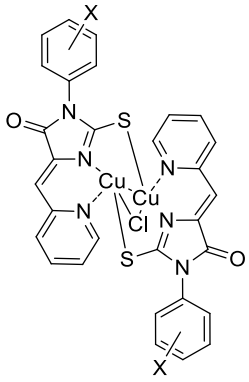
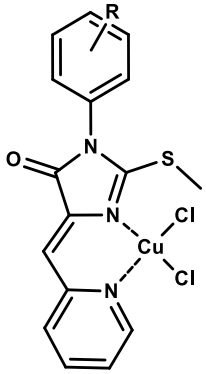
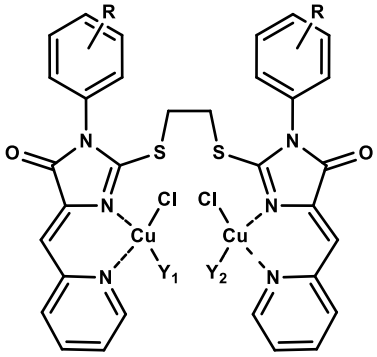
Использование современных высокочувствительных наносенсоров на медь позволяет осуществлять малоинвазивный мониторинг содержания препаратов внутри опухолей и здоровых тканей *in vivo*. Разработанные ранее сенсоры на основе нанокапилляров помогут определить кинетику формирования внутриклеточных АФК, изменения концентрации кислорода и локальные значения pH в опухолевых клетках. Мониторинг этих параметров в реальном времени даст возможность оценить эффективность медьсодержащих противоопухолевых комплексов.

Окислительно-восстановительные свойства ионов меди, их способность к восстановлению внутри клетки, селективное накопление в гипоксических зонах и устойчивость в кровотоке указывают на возможность использования медьсодержащих препаратов не только для лечения, но и в качестве

диагностических и тераностических средств комплексов [335]. Внутриклеточные редокс-процессы играют ключевую роль в поддержании жизнеспособности клеток, и нарушение редокс-гомеостаза может привести к их гибели [336].

С помощью разработанного платинового наноэлектрода, чувствительного к АФК, мы протестировали представителей трех типов медьсодержащих координационных соединений на клеточной линии MCF-7 (аденокарциномы протоков молочной железы человека) (таблица 3.5.1.1).

Таблица 3.5.1.1 - Исследуемые типы медьсодержащих комплексов [335]

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_2	44k	2-tBu	65k	2-Br, 4-F	Cl	-
				71k	4-Br		
				72k	4-Cl		

Выбор клеточной линии MCF-7 был обусловлен частым использованием медьсодержащих координационных соединений в терапии рака молочной железы комплексов [335]. Для детекции АФК в клетках MCF-7, помимо электрохимического метода, был также использован флуоресцентный метод с применением коммерчески доступного красителя Cell ROX, чувствительного к перекиси водорода ($\lambda_{возб}$/ $\lambda_{исп}$ = 644/665 нм). Основная цель состояла в проверке и сравнении обоих методов, а также в сопоставлении их результатов (рисунок 3.5.1.1).

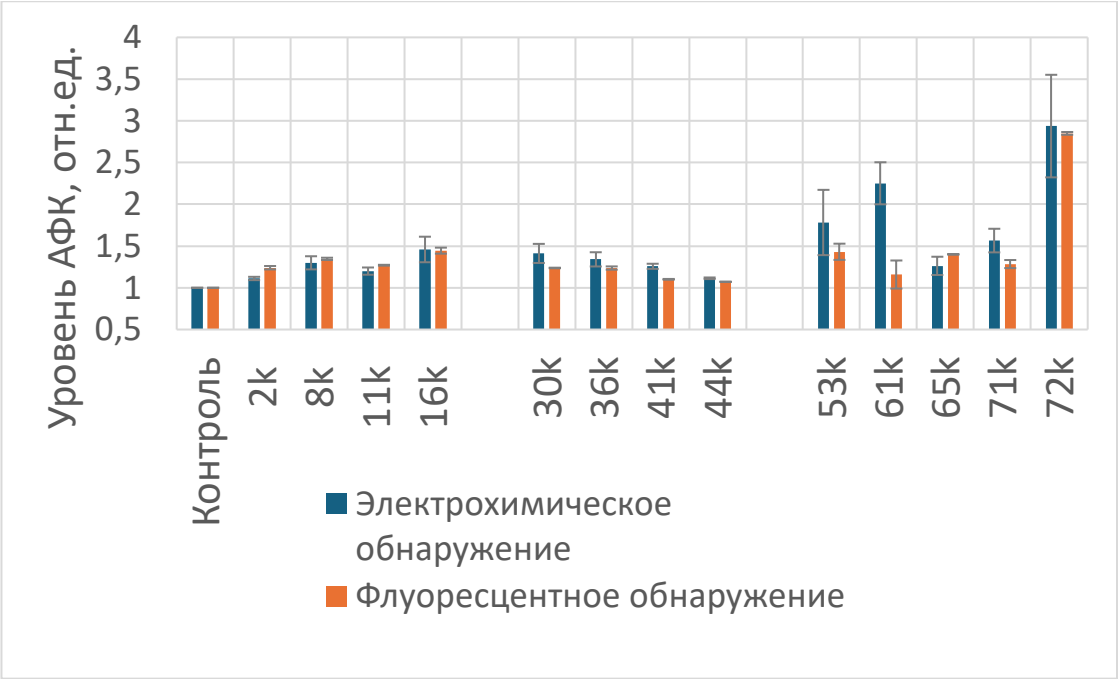


Рисунок 3.5.1.1 - Результаты измерений уровня АФК внутри клеток MCF-7 с использованием электрохимического и флуоресцентного методов. Все данные нормированы по уровню контрольных клеток [335]

На рисунке 3.5.1.1 представлены результаты сравнения уровней АФК в клетках MCF-7, измеренных двумя разными методами. В целом, значения, полученные с помощью наноэлектрода, коррелируют с результатами флуоресцентного метода. Однако преимущество электрохимического метода заключается в возможности количественного определения АФК непосредственно внутри клеток, что затруднительно для флуоресцентного метода с использованием красителя CellROX Deep Red.

Как видно из представленных данных, структурно похожие координационные соединения по-разному влияют на генерацию АФК. В соединениях 1-го типа наибольшую активность в выработке АФК показало соединение 16k. Способность соединений 2-го типа генерировать АФК в клетках также варьируется внутри группы. Очевидно, что структура лиганда играет ключевую роль в определении как электрохимического поведения, так и способности координационных соединений генерировать АФК. Чем сложнее происходит восстановление соединения с образованием комплекса Cu(I), тем ниже его способность к генерации АФК.

Наибольшую активность в выработке АФК показали координационные соединения 3-го типа (61k и 72k). Таким образом, различия в окислительно-восстановительных потенциалах определяют различное поведение комплексов в клетках.

Медьсодержащие координационные соединения привлекают большое внимание из-за их высокой окислительно-восстановительной активности. Различия в структуре лигандов оказывают влияние на окислительно-восстановительный потенциал пары Cu^{2+}/Cu^{+}, что, по-видимому, определяет способность этих соединений к генерации АФК внутри клеток. Наличие меди в обеих степенях окисления, Cu^{2+} и Cu^{+}, в составе одного координационного соединения способствует наиболее интенсивному образованию АФК. Таким образом, системы с ионами Cu^{2+}/Cu^{+} можно рассматривать как окислительно-восстановительные буферы, которые поддерживают равновесие между окисленными и восстановленными формами меди.

Результаты, полученные с использованием двух методов детекции АФК, хорошо согласуются между собой. Различия в данных можно объяснить разной чувствительностью флуоресцентного красителя и наноэлектрода.

Переход на более релевантные сложные модели опухолей, такие как 3D-сфероиды, приводит к ограничениям применения оптических флуоресцентных зондов по нескольким причинам. Трудности возникают при достоверном зондировании по глубине: слабый сигнал на значительных глубинах может быть связан не столько с низкой активностью металлокомплекса или ограниченным биораспределением, а также с низкой диффузией оптического зонда. Оптическое излучение теряет интенсивность на глубине, что снижает чувствительность измерений. Оценка реальных потерь интенсивности света затруднена из-за неоднородности структуры 3D-сфероидов, а пространственное разрешение ограничено автофлуоресценцией окружающих клеток.

В качестве альтернативной модели для исследования механизма действия противоопухолевых препаратов использовали 3D-сфероид. Уровень АФК измеряли на различных глубинах сфероидов MCF-7, предварительно инкубированных с координационными соединениями. Для измерений

использовали платиновый наноэлектрод, который позволял проводить измерения внутри сфероида. ЦВ записывали по мере погружения электрода на каждые 10 мкм внутрь сфероида (рисунок 3.5.1.2). Соединение 61k показало наибольшую эффективность в генерации АФК на разных глубинах сфероида MCF-7, в то время как смешанновалентное соединение 72k было немного менее активным из-за более низкой редокс-активности. Соединение 71k, как и предполагалось, продемонстрировало меньшую редокс-активность, что связано с высокой стабильностью моновалентного комплекса Cu^{+1}/Cu^{+1} [335].

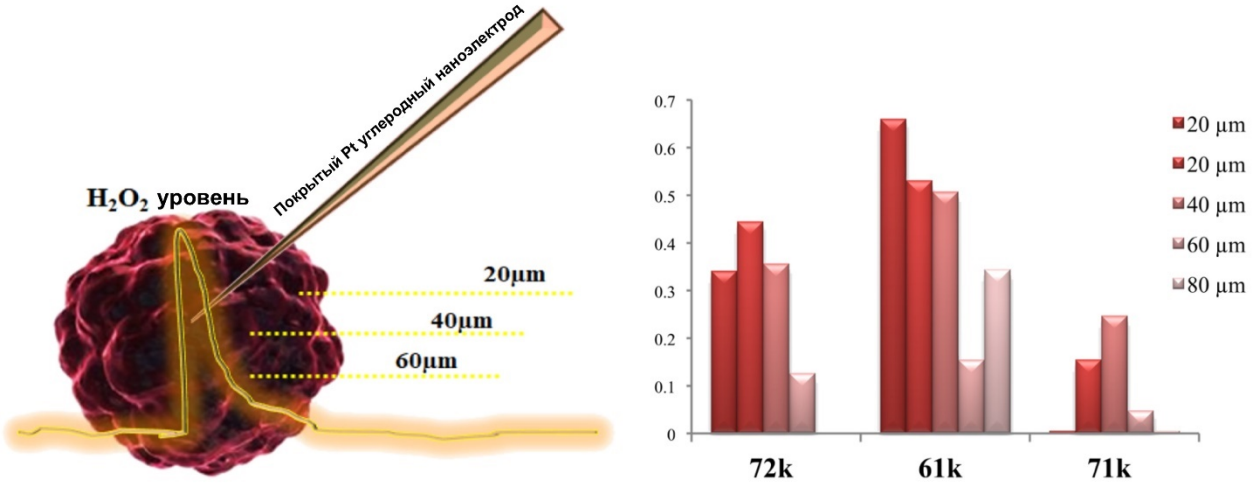


Рисунок 3.5.1.2. Электрохимическое определение уровня АФК на разных глубинах сфероида MCF-7 после предварительной инкубации с координационными соединениями [335].

3D-сфероид выступает как отличная модель для исследования проникновения препаратов, отражая ключевые особенности твердых опухолей человека, такие как структурная организация и гипоксия. Накопление АФК на различных глубинах сфероидов MCF-7 было выявлено с использованием платинового наноэлектрода. Соединения 61k и 72k продемонстрировали генерацию АФК на глубине до 100 мкм в сфероиде.

3.5.2 Исследование распределения медьсодержащих соединений в биологических системах методом локальной электрохимической детекции с использованием модифицированных золотых наноэлектродов

3.5.2.1 Разработка модифицированных золотых наноэлектродов для селективной количественной детекции меди

Для разработки золотых наноэлектродов использовали аналогичный способ как для платиновых наноэлектродов. Нанокапилляры размером 50-150 нм заполняли углеродом за счет термической декомпозиции бутан-пропановой смеси. Размер углеродных электродов характеризовали по предельному диффузионному току в 1 мМ FcMeOH в PBS (рисунок 3.5.2.1.1). Аналогично разработанным платиновым электродам для повышения адгезии золотого покрытия осуществлялось электрохимическое травление углеродных электродов, представленное на рисунке 3.5.2.1.1.

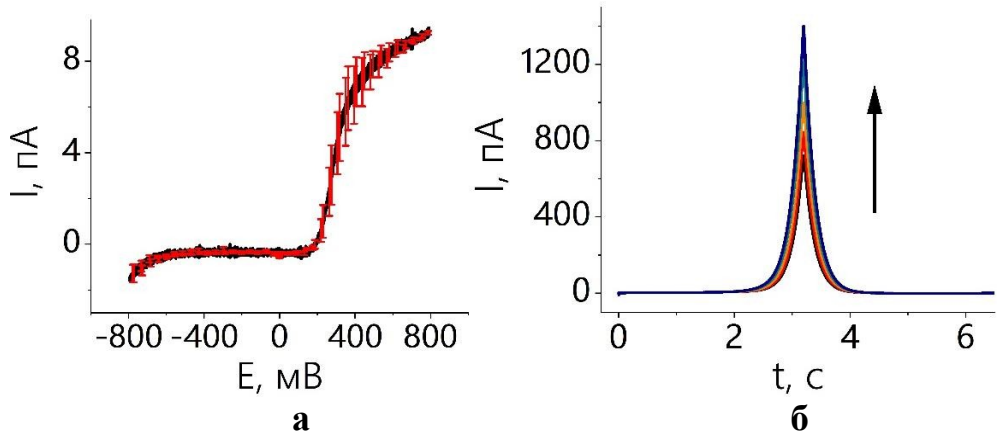


Рисунок 3.5.2.1.1 - (а) Вольтамперная характеристика стационарного состояния дискообразного углеродного наноэлектрода в 1 мМ FcMeOH в растворе PBS (диапазон от -0,8 до 0,8 В относительно ХСЭ, скорость развертки потенциала 0,4 В/с). (б) ЦВ травления углеродного наноэлектрода в растворе 0,1 М NaOH и 10 мМ KCl (диапазон от 0 до 2,2 В относительно ХСЭ, скорость развертки потенциала 2,2 В/с) [253]

В процессе травления происходит рост амплитуды тока из-за увелечения площади поверхности электрода (рисунок 3.5.2.1.1). После травления увеличение площади поверхности и ограничение диффузии приводят к появлению почти симметричных пиков окисления и восстановления Fc.

В работе были рассмотрены наноэлектроды с различной степенью травления углерода, которая определяет величину и форму полости внутри углеродного электрода. (рисунок 3.5.2.1.2). Электрохимическое осаждение золота контролировали по величине заряда, протекающего в каждом независимом цикле ВАХ. По изменению величины заряда измерялся прирост или уменьшение активной площади осажденного золота. При малом размере вытравленной полости (при пиковом значении тока до 200 пА) наблюдалось значительное увеличение заряда со второго цикла осаждения, что указывало на быстрое заполнение полостей и дальнейший рост дендритных структур за пределами границ стекла (рисунок 3.5.2.2.1, верхняя панель).

На второй панели представлены ВАХ для наноэлектродов со средним размером вытравленной полости (при пиковом значении тока до 3000 пА). На рисунке 3.5.2.1.2, столбце Б видно, что в первые пять циклов ВАХ демонстрировалось уменьшение величины заряда, а затем его постепенное увеличение. Это свидетельствовало о постепенном заполнении полости и дальнейшем равномерном росте золотых дендритов. Для такого уровня травления не наблюдалось лавинообразного роста кристаллов золота, что говорит о том, что рост дендритов был ограничен стенками кварцевого капилляра.

В третьем случае, где электрод подвергался сильному травлению (при пиковом значении тока до 6000 пА), динамика изменения заряда от цикла к циклу отсутствовала. После осаждения золота электроды не достигали стационарного состояния, отсутствовал предельный диффузионный ток (рисунок 3.5.2.1.2, нижняя панель). Для такого уровня имеются серьезные диффузионные ограничения как для роста кристаллов золота в полости, так и для дальнейшего определения аналитов.

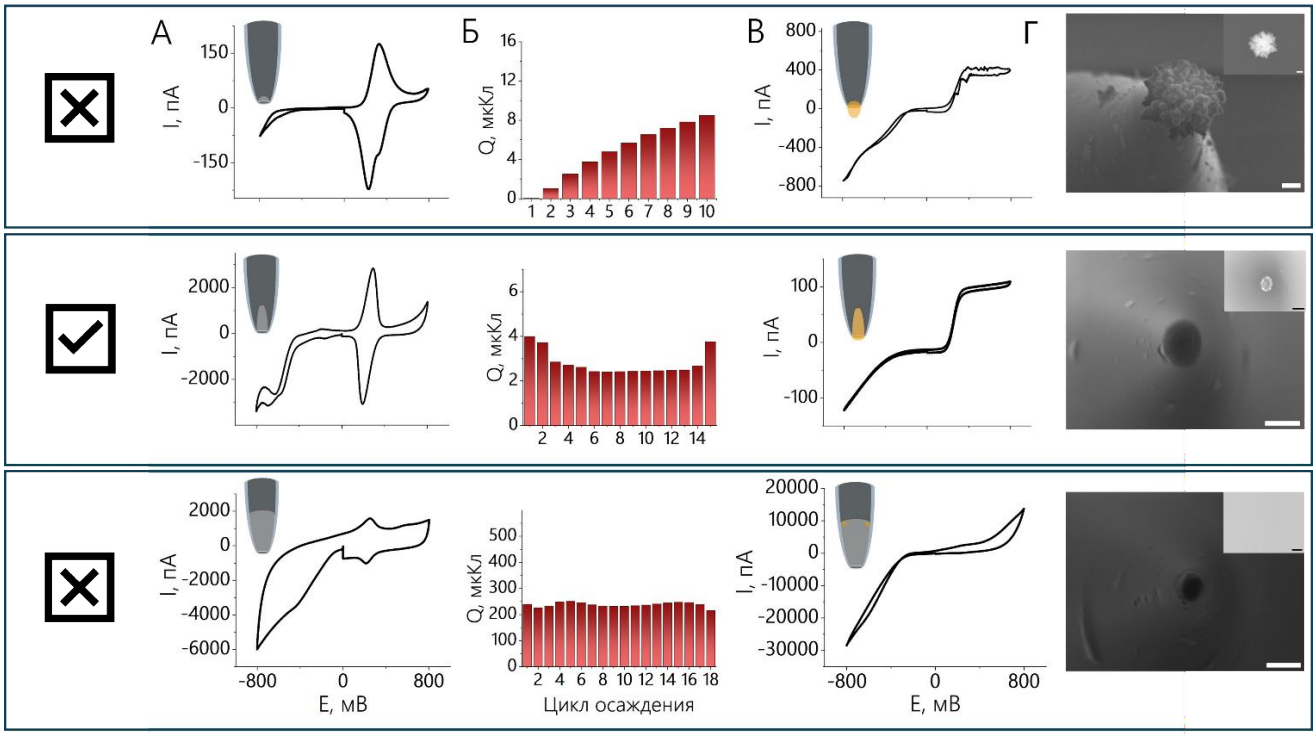


Рисунок 3.5.2.1.2 – Ряды: (А) ЦВ углеродного наноэлектрода в FcMeOH относительно ХСЭ. (Б) Величина заряда для каждого цикла электрохимического осаждения золота (В) ВАХ углеродного наноэлектрода после осаждения золота в FcMeOH относительно ХСЭ. Г) РЭМ-изображения наноэлектрода после осаждения золота (на вставках показаны изображения, сделанные с использованием обратно отражённых электронов). Масштабный отрезок: 500 нм. Панели: верхняя панель для электрода с малым травлением (при пиковом значении тока до 0,2 нА); средняя панель для электрода со средним травлением (при пиковом значении тока до 3 нА); нижняя панель для электрода с сильным травлением (при пиковом значении тока до 6 нА) [253]

Электрохимическое осаждение золота на углеродной поверхности наноэлектрода было подтверждено методами EDX и ЦВ в растворе H_2SO_4. Метод EDX применим благодаря отсутствию элементов у углеродного электрода на основе кварцевого нанокапилляра с близкими по энергиям переходами и может достоверно подтвердить присутствие осажденного золота [157] [337]. Спектр EDX, полученный с нанокапиллярного электрода, демонстрировал четкие характерные пики золота. Высокий весовой процент золота подтверждает успешность процесса электрохимического осаждения (рисунок 3.5.2.1.3 А). Кроме того, была записана классическая циклическая вольтамперограмма наноэлектрода с восстановленным золотом в 0,5 М H_2SO_4 (рисунок 3.5.2.1.3 Б) [253].

А) Б)

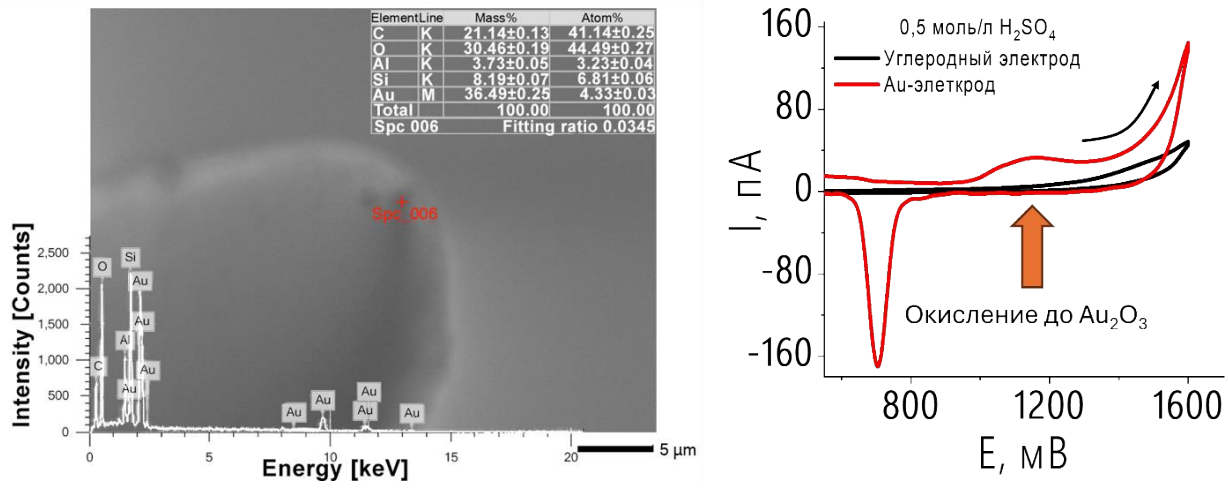


Рисунок 3.5.2.1.3 – (А) EDX-спектр острия золотого наноэлектрода и его РЭМ изображение, красным обозначена область исследования. (Б) ЦВ углеродного наноэлектрода до и после модификации золотом, в 0,5 М H_2SO_4 (от 0 до 1600 мВ относительно Ag / AgCl, 100 мВ/с) [253].

Снятие таких ЦВ является общепринятым для детекции металлов [338][339]. ЦВ имеет характерный вид для осажденного золота, в области положительного потенциала виден пик при напряжении около 1,2 В относительно ХСЭ, что соответствует восстановлению Au_2O_3 [340][341].

Таким образом, метод электрохимического осаждения золота с предварительным контролем степени травления наноэлектродов позволил существенно улучшить качество и стабильность работы наноэлектродов, что подтверждается как полученными циклическими вольтамперограммами, так и анализом их физических характеристик после осаждения с помощью РЭМ и EDX анализа.

Для повышения чувствительности и селективности метода осуществлялась дополнительная модификация специфическим к ионам меди лигандом. Был использован лиганд на основе липоевой кислоты и трипептида GHK, который способен хелатировать ионы меди с образованием координационного соединения. Молекулы трипептидов часто применяются для повышения чувствительности сенсора за счет предварительного концентрирования ионов Cu^{2+} вблизи его поверхности [342].

3.5.2.2 Аналитические характеристики модифицированных золотых наноэлектродов для селективной количественной детекции меди

Известно, что на металлических микроэлектродах может проходить обратимая окислительно-восстановительная реакция $Cu^{2+} \leftrightarrow Cu^{+}$ в узком диапазоне приложенных потенциалов [343][344]. В данном случае процесс определяется диффузионными ограничениями и описывается уравнением Рандлса-Шевчека. В таком случае пиковый ток $I_p \sim C\nu^{\frac{1}{2}}$. Для количественного определения ионов Cu^{2+} применялась методика циклической вольтамперометрии с быстрым сканированием, что должно повысить чувствительность сенсора, также уменьшить временное разрешение, что необходимо при исследовании динамических процессов *in vitro* и *in vivo*. В ходе калибровки сенсора были проанализированы высоты пиков окисления Cu^{2+} и построены градуировочные зависимости как до, так и после химической модификации золотого наноэлектрода GHK-лигандом (рисунок 3.5.2.2.1) [253].

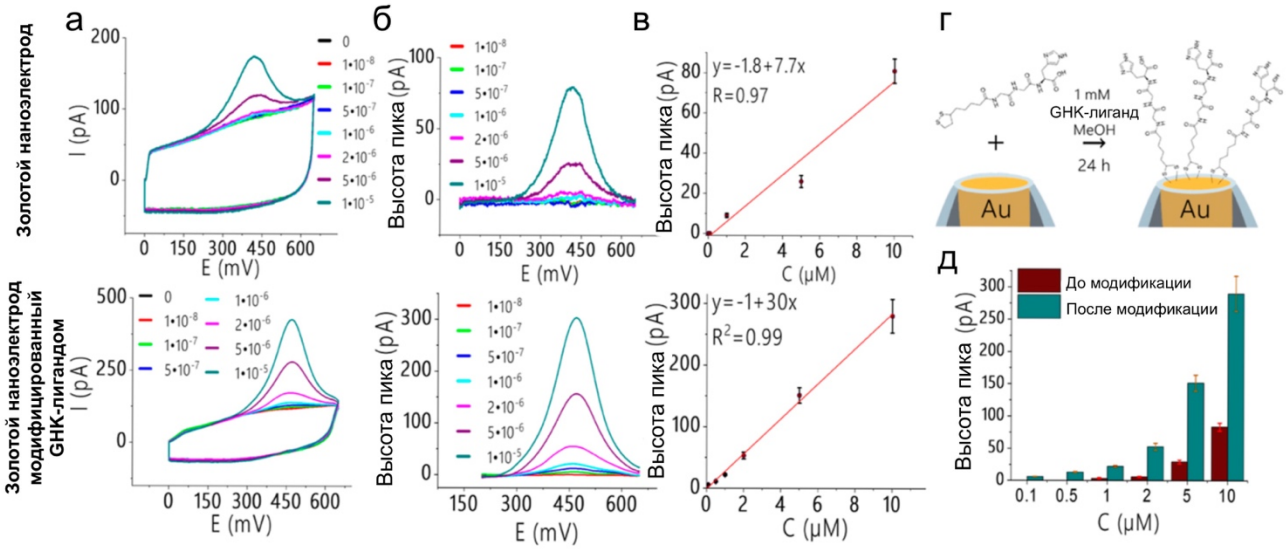


Рисунок 3.5.2.2.1 – А) ЦВ для разных концентраций Cu2+ при скорости развертки потенциала 13 В/с относительно ХСЭ. (Б) Высоты пиков тока с учетом вычитания фонового уровня. (В) Градуировочная зависимость в буферном растворе HBSS. Результаты представлены как средние значения ± SEM, n = 7. (Г) Схематическое изображение процесса модификации GHK-лигандом. (Д) Сравнение высоты пиков тока (за вычетом фона) до и после модификации золотого наноэлектрода GHK-лигандом [253].

На рисунке 3.5.2.2.1 a и b, представлены ЦВ до и после вычета базовой линии соответственно. Как было показано ранее в разделе 3.4, такой прием позволяет избежать вклада предельного диффузионного тока от АФК и исключить влияние емкостных токов. Использование специфического лиганда к ионам меди позволяет увеличить локально их приповерхностную концентрацию, которая вносит основной вклад в фарадеевский ток, проходящий через золотой наноэлектрод. Для избежания вклада сорбционных процессов меди на золотом электроде при ЦВ не использовали отрицательную область потенциалов относительно ХСЭ.

Предел обнаружения ионов меди для немодифицированного золотого наноэлектрода составил 1 мкМ. После химической пришивки лиганда GHK (рисунок 3.5.2.2.1, нижняя панель) предел обнаружения модифицированного наноэлектрода был уменьшен на порядок и составил 0,1 мкМ. В обоих случаях наблюдалась линейнвя зависимость высоты пика тока от концентрации ионов меди. Таким образом, была продемонстрирована возможно проведения количественных концентрационных измерений ионов меди в диапазоне от 0,1-10 мкМ с помощью разработанного модифицированного золотого наноэлектрода.

Были проведены измерения ЦВ в растворах, содержащих Cu^{2+} и нецелевые аналиты (рисунок 3.5.2.2.2 А) [253]. В прикладываемом диапазоне напряжений (от 0 до 650 мВ) нецелевых окислительно-восстановительных реакций не наблюдалось (рисунок 3.5.2.2.2 А). Также, была определена высота пика тока в присутствии нецелевых аналитов. Следует отметить, что, как показано на рисунке 3.5.2.2.2 Б, вклад в высоту пика окисления был незначительным. Таким образом, разработанный сенсор продемонстрировал высокую селективность к детектируемым ионам меди [253].

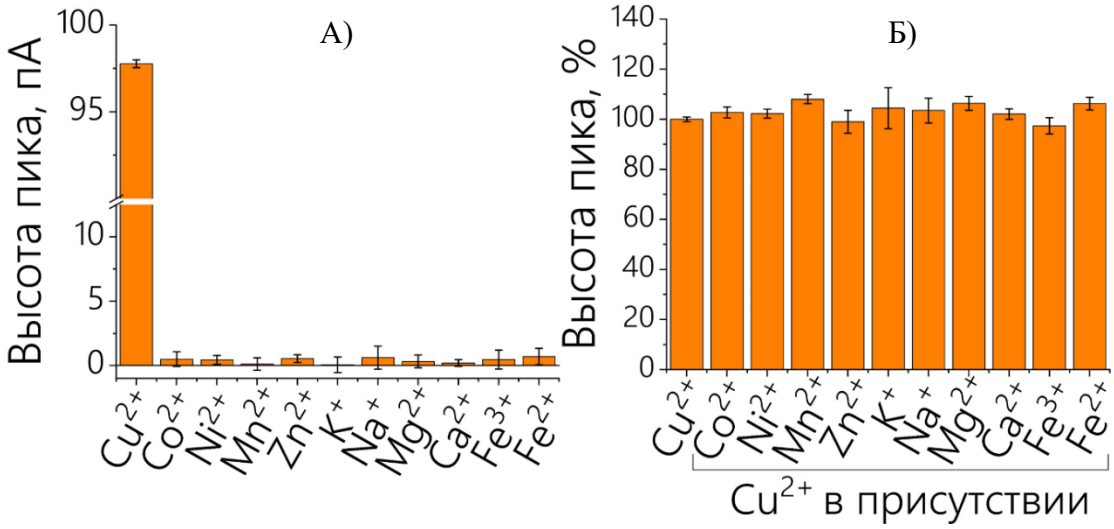


Рисунок 3.5.2.2.2 – Высоты пиков тока ЦВ в присутствии Cu^{2+} (4 мкмоль/л) и/или различных нецелевых аналитов: 10 мкмоль/л для Ni^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Fe^{2+}, Zn^{2+} и 1 мМ для K^{+}, Na^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}. (А) Высота пика ЦВ в независимых растворах в диапазоне потенциалов от 0 до 650 мВ, относительно ХЭС. (Б) Высота пика тока (в %) относительно контроля (4 мкмоль/л Cu^{2+}) в присутствии различных нецелевых аналитов [253].

3.5.2.3 Количественное определение ионов Cu^{2+} внутри единичных опухолевых клеток, 3D-сфероидов и *in vivo* моделях

В качестве модельного медьсодержащего препарата было использовано координационное соединение 72k, которое продемонстрировало хорошие цитотоксические свойства, а также возможность вызывать окислительный стресс у опухолевых клеток и в 3D-сфероидах. Совместно с коллегами из химического факультета МГУ была подготовлена липосомальная форма комплекса 72k (далее «Cu-комплекс (лип.)») для увеличения растворимости в водных растворах и дальнейшего использования в *in vivo* экспериментах. Без инкубации с комплексом в контрольной группе клеток MCF-7 и B16 не наблюдалось соответствующих окислительно-восстановительных реакций. Однако после 2 часов инкубации с 50 мкмоль/л Cu-комплекса (лип.) на ЦВ, полученных на единичных клетках MCF-7 и B16, наблюдались соответствующие пики тока (рисунок 3.5.2.3.1А).

Концентрация Cu^{2+} в отдельных клетках MCF-7 и B16 составляла 0,4 ± 0,1 и 1 ± 0,2 мкмоль/л соответственно (рисунок 3.5.2.3.1Б). Стоит отметить, что процент внутриклеточной накопленной меди составил около 0,8% для клеток MCF-7 и 1% для клеток B16 от общего количества инкубированного соединения [253].

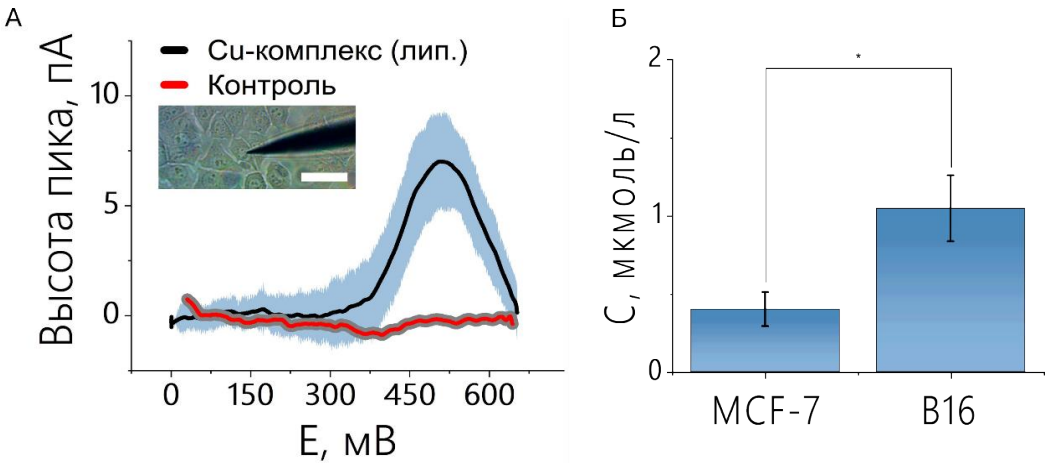


Рисунок 3.5.2.3.1 – Электрохимическое обнаружение Cu2+ внутри клеток MCF-7 и B16 после 2- часовой инкубации с 50 мкмоль/л липосомального комплекса Cu. (А) Пики тока до и после обработки единичных клетках MCF-7. (Б) Сравнение способности к накоплению липосомального Cu-комплекса в клетках MCF-7 и B16. Результаты представлены как средние значения ± SEM, n = 3, *p < 0,05 (ANOVA) [253].

Далее была оценена способность Cu-комплекса (лип.) накапливаться в 3D-сфероидах (рисунок 3.5.2.3.2). Осуществлялось зондирование сфероида наноэлектродом с шагом 10 мкм при помощи микроманипулятора. Максимальное накопление Cu^{2+} было обнаружено на глубине около 20 мкм, что соответствует наружному слою из 2-3 клеток. В более глубоких слоях липосомального Cu-комплекса накапливалась значительно хуже [253].

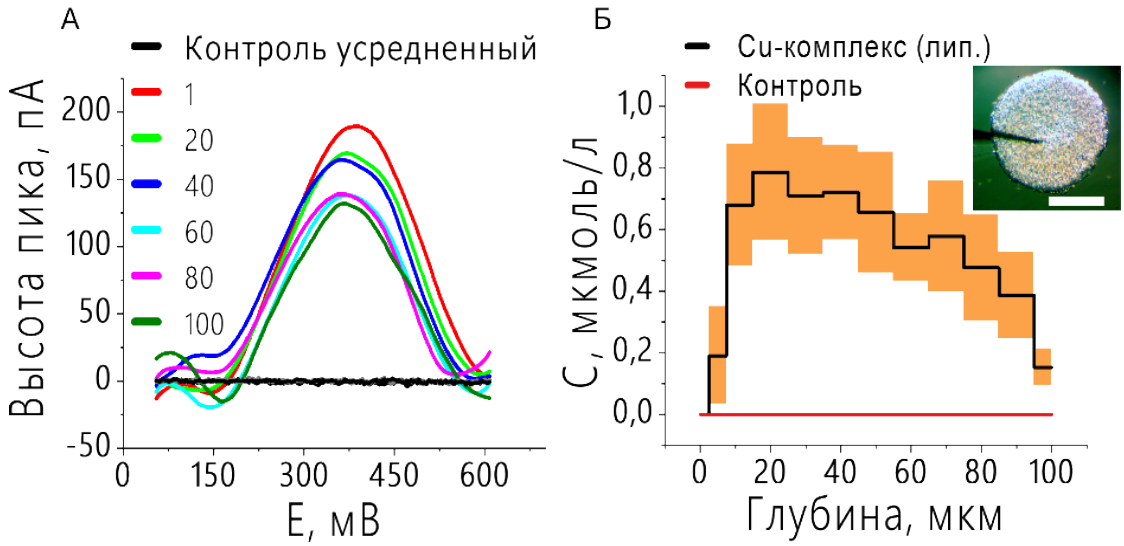


Рисунок 3.5.2.3.2 – Электрохимическое обнаружение Cu^{2+} внутри сфероида MCF-7 после 2-часовой инкубации с липосомальным Cu-комплексом (100 мкмоль/л). (А) ЦВ для разных глубин в сфероиде MCF-7. (Б) Профиль распределения ионов меди в сфероиде MCF-7. На вставке показан процесс измерения внутри сфероида MCF-7 (масштабный орезок 200 мкм). Результаты представлены как средние значения ± SEM, n = 3 [253].

Эффективность использования разработанного метода была продемонстрирована на наиболее релевантных *in vivo* моделях. B16 высоко метастатическая опухоль с выраженной способностью к накоплению меди [76]. В экспериментах использовалась доза липосомального Cu-комплекса 2 мг/кг. Измерения проводились через 16 часов после внутривенного введения препарата. Модифицированный золотой электрод вводился в опухоль на глубину до 1000 мкм с шагом 50 мкм (рисунок 3.5.2.3.3А). На ЦВ контрольной группы мышей не наблюдалось электрохимических реакций соответсвующих ионам меди (рисунок 3.5.2.3.3Б). Хорошо разлечимые пики тока были обнаружены в группе мышей, которым вводили медный комплекс (лип.) (рисунок 3.5.2.3.3В) [253]. На глубине 100 мкм наблюдается значительное уменьшение концентрации ионов меди, далее наблюдается равномерное распределение липосомальной формы медь-содержащего комплекса до 1000 мкм по глубине (рисунок 3.5.2.3.3Г) [253].

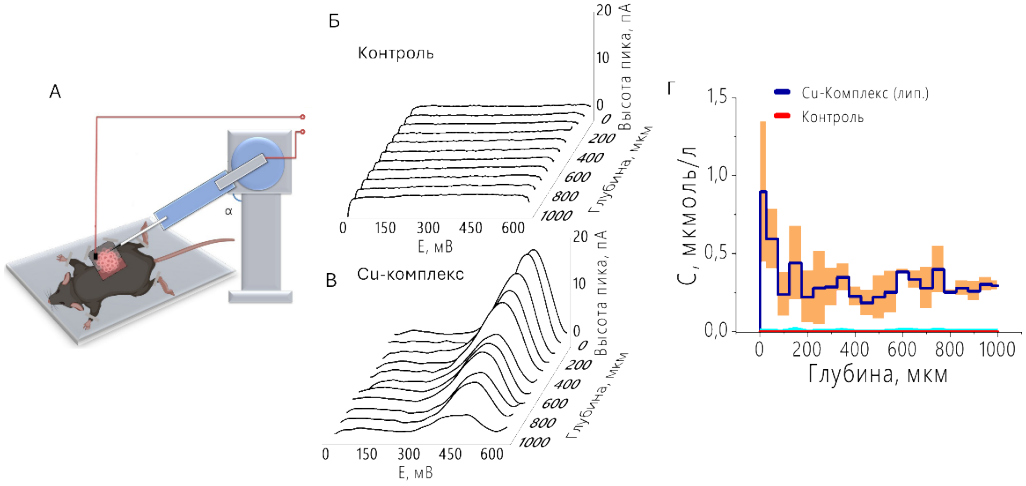


Рисунок 3.5.2.3.3 – (А) Схематическое изображение установки для проведения in vivo измерений. ЦВ, полученные внутри опухоли у контрольных мышей (Б) и у мышей, которым предварительно вводили комплекс (В), на разных глубинах до 1000 мкм. (Г) Профиль накопления меди до (контроль) и после введения Cu-комплекса (лип.)[253].

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

3.5.2.4 Количественное определение концентрации ионов Cu^{2+} в модели трансгенной мышиной APP/PS1 *in vivo* с БА

Для решения задачи обнаружения лекарственных средств и метаболитов в мозге *in vivo* необходимы высокочувствительные, специфичные и минимально инвазивные методы. Сложная структура мозга и изменчивая природа нейрохимических веществ при различных физиологических и патологических процессах предъявляют строгие требования к методам мониторинга мозга *in vivo*. Во-первых, обнаружение химических соединений с помощью жидкостной или газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией требует значительного объема образцов [345]. Это ограничивает временное и пространственное разрешение метода, что может оказаться недостаточным для локального обнаружения лекарственных средств и клеточных метаболитов. Микродиализ позволяет проводить локальные измерения, но его временное разрешение остается низким [346,347]. Обнаружение химических соединений *in vivo* с высокой временной разрешающей способностью порядка секунды возможно при использовании биолюминесцентных или флуоресцентных зондов, однако пространственное разрешение обычно ограничено. Глубина проникновения в ткани является критическим фактором для эффективности флуоресцентной визуализации *in vivo*. Традиционные флуоресцентные зонды часто не обеспечивают достаточный сигнал из глубоких слоев тканей из-за рассеяния и поглощения биологических компонентов, что снижает качество изображений [348–351].

Разработанный метод может быть применим для измерения уровня Cu^{2+} на модели трансгенной мыши APP/PS1 с БА *in vivo* (рисунок 3.5.2.4.1 А).

Для модели БА у APP/PS1 мышей свойственно значительное увеличение продукции β-амилоида, что сопровождается повышением локальной концентрации Cu^{2+} [3]. Малоинвазивные измерения концентрации Cu^{2+} в разных отделах мозга показали: в контрольной группе концентрация ионов меди в коре составила 0,26 ± 0,03 мкмоль/л и 0,37 ± 0,04 мкмоль/л в гиппокампе. Однако в таламусе уровень меди был выше, чем в коре, и концентрация была равна 0,43 ± 0,04 мкмоль/л (рисунок 3.5.2.4.1 Б). Эти значения концентрации Cu^{2+} в контрольной группе

близки к литературным данным, полученным не для прижизненных измерений. В гиппокампе (0,66 ± 0,06 мкмоль/л) и таламусе (0,73 ± 0,09 мкмоль/л) у трансгенных мышей APP/PS1 были выявлены повышенные уровни ионов меди по сравнению с контролем.

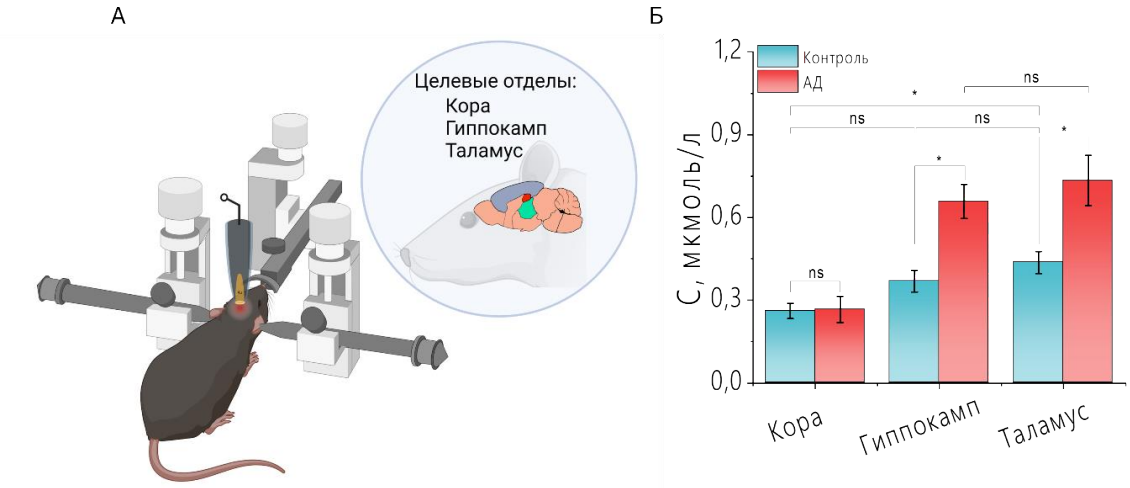


Рисунок 3.5.2.4.1 – Обнаружение Cu2+ in vivo в мозге трансгенной мышиной модели APP/PS1 с БА. (А) Схематическое изображение, демонстрирующее измерения in vivo в целевых областях мозга. (Б) Концентрации Cu2+ в различных областях мозга у контрольных мышей и мышей APP/PS1[253].

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

3.5.3 Коррелятивные измерения уровня АФК и ионов меди в модельных системах болезни Альцгеймера

При нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, наблюдается повреждение мозга, в развитии которого значительную роль играет окислительный стресс. Мозг особенно уязвим к окислительному повреждению из-за его высокого потребления кислорода (20% от общего потребления кислорода организмом). Мониторинг лекарственных препаратов и клеточных метаболитов в реальном времени в микроокружении *in vivo* играет ключевую роль в оценке эффективности разрабатываемых лекарственных кандидатов. Системное введение этих препаратов приводит к их

пространственному и временному распределению не только по всему организму, но и во внеклеточные и внутриклеточные микроокружения каждого органа [352].

3.5.3.1 Таргетированные внутриклеточные измерения активных форм кислорода (АФК) в клетках с агрегатами амилоидов Aβ42

В данном разделе будет продемонстрировано таргетированное измерение АФК в клетках, содержащих агрегаты амилоидов Aβ42. Генерация активных форм кислорода АФК и митохондриальная дисфункция являются ключевыми причинами токсичности, наблюдаемой в нейрональных клетках при инкубации с агрегатами Aβ**42**. Клетки инкубировали с амилоидом согласно протоколам, представленным в разделе 2 «Материалы и методы». Амилоид был помечен флуоресцентной меткой FAM, что позволяло точно идентифицировать агрегаты на клеточной мембране.

Для измерения внутриклеточного уровня АФК были использованы платиновые наноэлектроды (рисунок 3.5.3.1.1 A). Преимущество данного метода заключается в его практически неинвазивном характере анализа на уровне отдельных клеток, что, в сочетании с флуоресцентной микроскопией, позволяет разделять и измерять уровень АФК как в клетках с агрегатами Aβ, так и без них в одной и той же чашке Петри. В клетках с агрегатами FAM-Aβ42 на мембране было зафиксировано значительное увеличение уровня АФК (рисунок 3.5.3.1.1), что связано с разрушительным воздействием Aβ42 на митохондрии и индукцией окислительного стресса. Примечательно, что измерения уровня АФК (Рисунок 3.5.3.1.1 B, C) в клетках, обработанных FAM-Aβ42 без мембранных агрегатов, показали наличие окислительного стресса, но в меньшей степени по сравнению с клетками, имеющими мембранные агрегаты (FA+) (рисунок 3.5.3.1.1 E, F). Таким образом, формирование амилоидных агрегатов на клеточной поверхности усиливает токсический эффект олигомеров Aβ42, вероятно, из-за локального повреждения мембраны, снижения мембранного потенциала и индукции АФК [353].

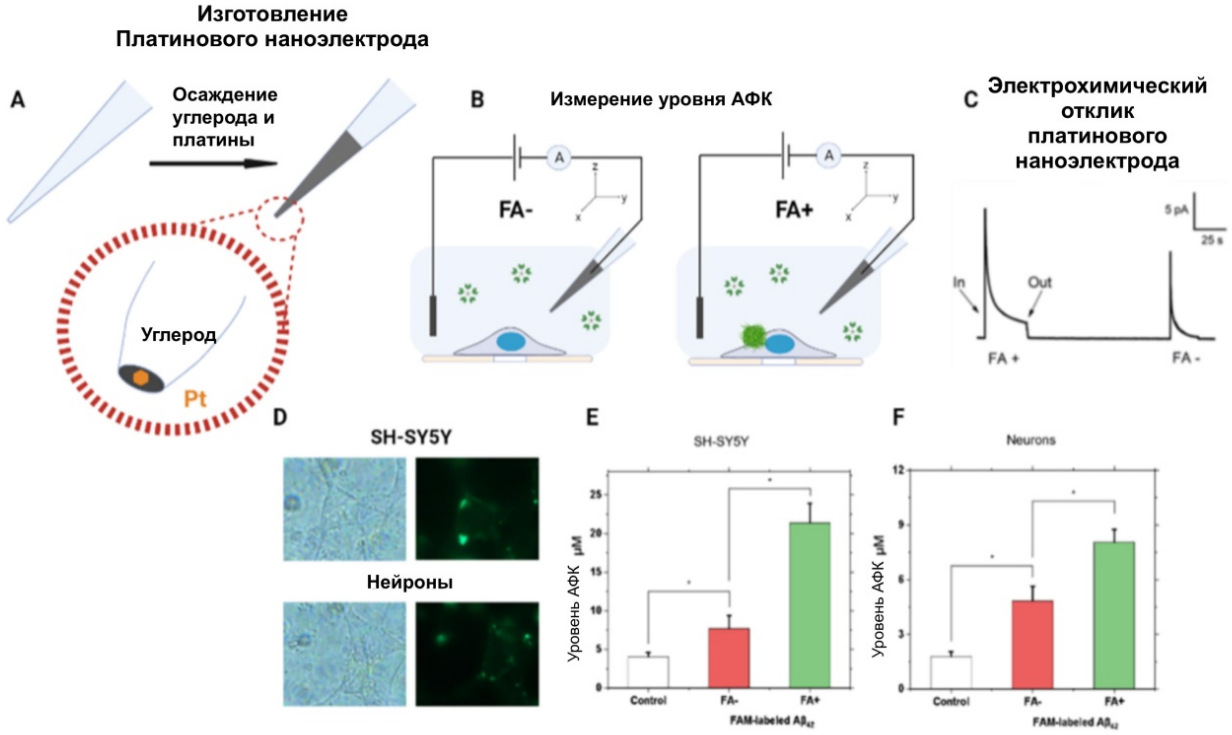


Рисунок 3.5.3.1.1 - (A) Платиновый наноэлектрод для внутриклеточных измерений уровня АФК. (B) Измерение уровня АФК в клетках, инкубированных с FAM-Aβ42 без сформированных агрегатов (FA−) и с агрегатами (FA+). (C) Электрохимический отклик платинового наноэлектрода. Увеличение тока в ответ на повышение уровня АФК. (D) Флуоресцентные изображения клеток SH-SY5Y и нейронов с агрегатами FAM-Aβ42. (E) Средний внутриклеточный уровень АФК в клетках SH-SY5Y и нейронах для FA− и FA+ ((*p ≤ 0,01, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, количество клеток в каждой точке – 30-40) [353].

По изменению уровня АФК можно определять эффективность действия препаратов на состояние модельных клеток для БА. Были синтезированы пять бифункциональных хелатообразующих агентов меди Alz-(1-5), предназначенных для предотвращения агрегации бета-амилоида (Aβ), и было выбрано лидирующее соединение (Alz-5) (рисунок 3.5.3.1.2).

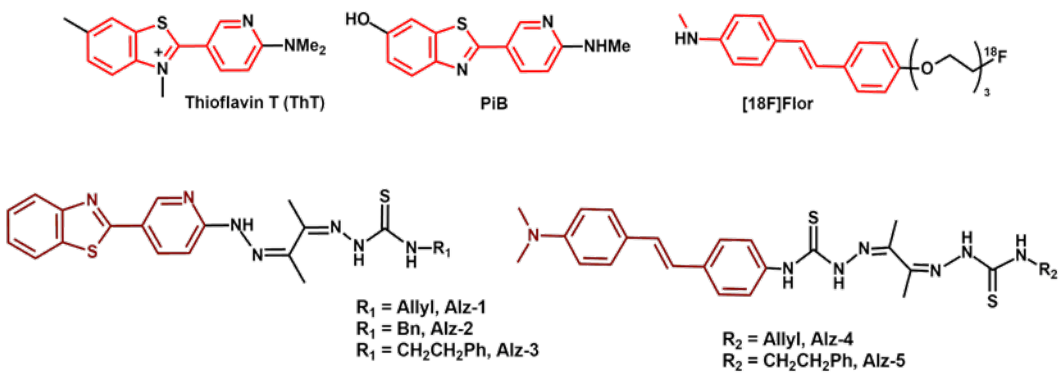


Рисунок 3.5.3.1.2 - Структуры тиофлавина-Т, соединения Питтсбурга B, ^{18}F – Флорбетабена и бифункциональных соединений Alz-1 - Alz-5 [354]

Alz-5 функционирует как бифункциональный хелатор, который способен взаимодействовать с агрегатами Aβ42 и ионами меди, за счет чего снижать нейротоксичность амилоидов. Интерес представляет способность Alz-5 снижать окислительный стресс, вызванный присутствием амилоидов Aβ. Для оценки уровня внутриклеточных АФК применялись хроноамперометрические измерения на уровне отдельных клеток с использованием платиновых наноэлектродов (Рисунок 3.5.3.1.3).

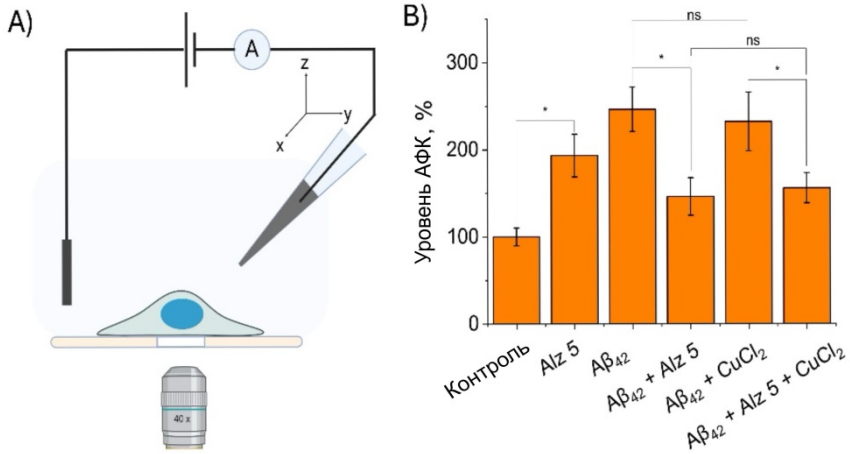


Рисунок 3.5.3.1.3 - Электрохимическое внутриклеточное измерение уровня АФК (A) Схематическая схема измерения (B) Уровень АФК внутри клеток SH-SY5Y после инкубации с Aβ42, Alz-5, $CuCl_2$ или их комбинацией. Средний уровень АФК в контрольных клетках составил 1,2 ± 0,2 μM. Результаты представлены в виде средних значений, стандартных ошибок и (*) $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA) [354]

Основное преимущество внутриклеточных электрохимических измерений заключается в точном анализе на уровне одной клетки, что позволяет последовательно измерять уровень АФК в интактных клетках, а также в клетках, обработанных Aβ42, металло-хелатирующим препаратом Alz-5, или их комбинацией. Таким образом, было оценено влияние Aβ42, Alz-5 или их комбинации на уровень внутриклеточных АФК в отдельных клетках SH-SY5Y (рисунок 3.5.3.1.3). Согласно полученным данным, внутриклеточный уровень АФК увеличился в 2,2 раза после инкубации клеток SH-SY5Y с Aβ42 в течение 4 часов. Это указывает на токсическое действие Aβ42, которое приводит к образованию АФК и развитию окислительного стресса. Затем мы оценили влияние Alz-5 на снижение уровня АФК в клетках SH-SY5Y, пораженных Aβ42. Несмотря на то, что добавление Alz-5 к клеткам вызывало повышение уровня АФК, одновременная

инкубация Aβ42 с Alz-5 приводила к 1,7-кратному снижению уровня АФК по сравнению с клетками, обработанными только Aβ42. Статистически незначительные различия в уровне АФК были зафиксированы в группах с присутствием Cu^{2+}. Таким образом, антиоксидантная активность Alz-5 и его способность снижать окислительный стресс, вызванный Aβ, были подтверждены. Это стало первым примером мониторинга в реальном времени снижения окислительного стресса, вызванного Aβ42, при помощи бифункционального хелатора меди [354].

3.5.3.2 Разработка *in vivo* скрининговых систем для лечения болезни Альцгеймера. Локальный мониторинг АФК и ионов меди в различных отделах мозга живых мышей под действием препаратов.

Электрохимические методы с применением микро- и наноэлектродов активно используются для обнаружения лекарственных средств, клеточных метаболитов и ионов металлов в живом организме [355,356][253]. Электрохимическое обнаружение *in vivo* стало важным инструментом для мониторинга взаимодействий лекарственных средств и фармакокинетики в мозге средств средств [181,182][357]. Этот подход использует уникальные свойства и малые размеры электрохимических сенсоров, что позволяет в реальном времени отслеживать нейрохимические изменения, возникающие в ответ на введение лекарств [358,359]. Разработка имплантируемых электрохимических сенсоров произвела революцию в исследованиях мозга *in vivo*. Эти сенсоры обеспечивают надежный и непрерывный мониторинг нейрохимических сигналов, что имеет решающее значение для понимания фармакологических эффектов лекарств на функции мозга [360].

В данной работе был сделан фокус на разработке электрохимических подходов для оценки воздействия фармацевтических препаратов на мозг мышей с болезнью Альцгеймера (модель 5xFAD). Основное внимание уделялось детекции активных форм кислорода и содержания меди в мозге, поскольку их роль в патогенезе болезни Альцгеймера хорошо изучена [361–363]. Избыточное образование АФК вызывает окислительный стресс, который характеризуется

дисбалансом между образованием АФК и антиоксидантными защитными механизмами мозга. Было установлено, что окислительный стресс возникает еще до появления симптомов БА. Окислительное повреждение охватывает не только те области мозга, которые обычно подвержены поражению при БА, но также затрагивает периферические области. Предыдущие исследования показали, что β-амилоид, основной фактор в патогенезе Альцгеймера, генерирует перекись водорода в процессе электронного переноса с участием редокс-активных ионов меди и железа [364,365]. При БА повышенные уровни АФК способствуют образованию амилоидных бляшек и нейровоспалению, создавая порочный круг, который усиливает повреждение нейронов [366,367]. Высокое содержание липидов в мозге делает его особенно уязвимым к окислительным повреждениям, так как АФК могут инициировать перекисное окисление липидов, что приводит к клеточной гибели и дисфункции [368].

3.5.3.2.1 Электрохимические измерения уровня АФК и содержания меди в различных полушариях мозга мышей 5xFAD

В рамках длительного мониторинга воздействия препарата на локальную область мозга измерения могут проводиться не только в одной микросреде, но и в симметричной области противоположного полушария. Для этого были проведены исследования по определению уровня АФК и содержания меди в симметричных участках теменной части мозга на глубине 300, 1500 и 2500 мкм (рисунок 3.5.3.2.1.1).

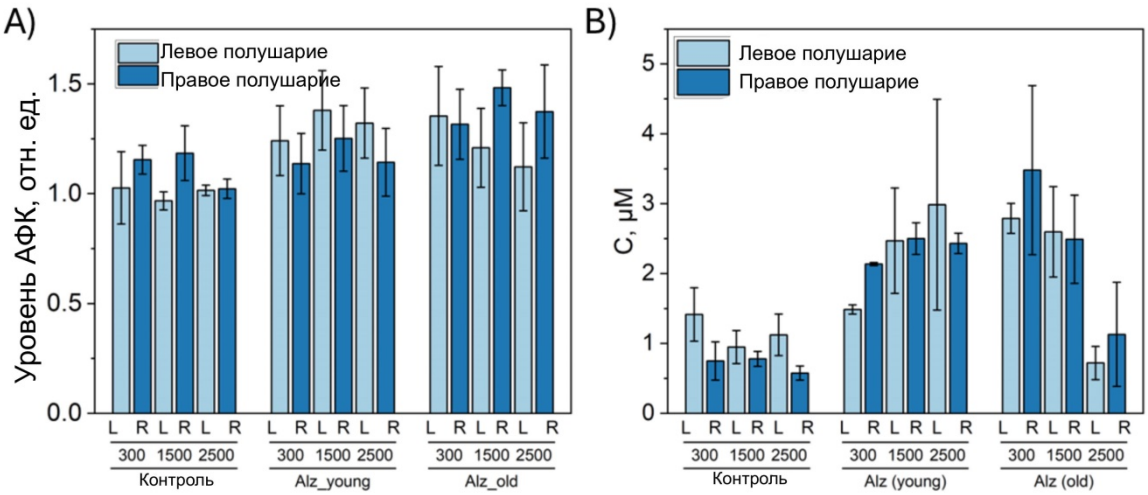


Рисунок 3.5.3.2.1.1 - Измерение уровней АФК (А) и концентрации меди (Б) в мозге мышей 5xFAD (n=3) в различных полушариях.

В контрольной группе уровни АФК в левых и правых полушариях мозга на разных глубинах (300, 1500, 2500 мкм) остаются относительно стабильными и не показывают значительных отличий. У молодых мышей 5xFAD уровни АФК заметно выше по сравнению с контрольной группой, особенно на глубинах 1500 и 2500 мкм, что свидетельствует о повышенном уровне окислительного стресса в мозге. У возрастных мышей 5xFAD уровни АФК остаются высокими на всех глубинах, что указывает на перманентный окислительный стресс, связанный с возрастом. В большинстве случаев уровни АФК в левых и правых полушариях относительно одинаковы, что свидетельствует об отсутствии значительных асимметрий в распределении окислительного стресса в мозге. Однако в некоторых точках наблюдаются незначительные различия в уровнях АФК между полушариями, что может указывать на локальные различия в реакции на окислительный стресс (рисунок 3.5.3.2.1.1 А).

Концентрация меди низкая и относительно равномерная в обоих полушариях на всех глубинах в контрольной группе мышей. В группе молодых мышей 5xFAD наблюдается увеличение концентрации меди по сравнению с контрольной группой. В некоторых случаях концентрация меди в правом полушарии выше, чем в левом, особенно на глубинах 1500 и 2500 мкм. В группе возрастных мышей 5xFAD концентрация меди еще выше, чем у молодых мышей с болезнью Альцгеймера. Различия между полушариями наблюдаются и здесь, но они менее выражены, чем у молодых мышей (рисунок 3.5.3.2.1.1Б).

3.5.3.2.2 Электрохимические измерения в мозге мышей 5xFAD разного возраста

Модель мышей 5xFAD характеризуется быстрым образованием амилоидных бляшек и нейродегенерацией, что делает её ценным инструментом для изучения патофизиологии болезни Альцгеймера и роли таких металлов, как медь.

На рисунке 3.5.3.2.2.1 показано, что концентрация меди в мозге мышей 5xFAD, являющихся моделью болезни Альцгеймера, значительно выше по сравнению с контрольными мышами и увеличивается с возрастом.

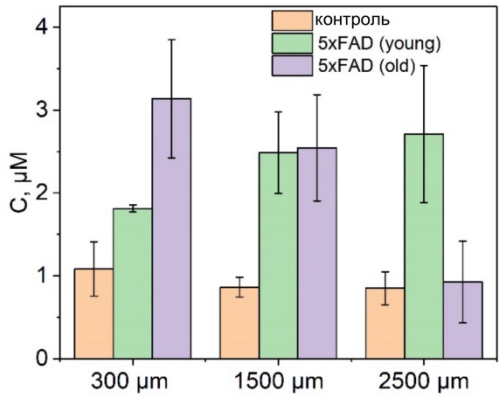


Рисунок 3.5.3.2.2.1 - Измерение концентрации меди в мозге мышей 5xFAD (n=3)

В контрольной группе концентрация меди остаётся на уровне около 1 мкМ на всех глубинах, тогда как у молодых мышей 5xFAD она варьируется от 2 мкМ на глубине 300 мкм до 2,5 мкМ на глубинах 1500 и 2500 мкм. У старых мышей 5xFAD концентрация меди ещё выше: около 3 µM на глубине 300 мкм и около 2,5 µM на глубинах 1500 и 2500 мкм. Эти данные указывают на возрастное накопление меди в мозге мышей 5xFAD, что может быть связано с прогрессированием патологических процессов, характерных для болезни Альцгеймера.

Модель мышей 5xFAD демонстрирует выраженное накопление Aβ, начиная с 2–3 месяцев, с заметными поведенческими нарушениями, появляющимися к 4–5 месяцам [369]. Это раннее развитие патологии предоставляет уникальную возможность для исследования взаимосвязи между накоплением меди и отложением Aβ. Исследования показали, что присутствие меди может усиливать агрегацию Aβ, что приводит к увеличению окислительного стресса и повреждению нейронов [370]. Взаимодействие между медью и Aβ вызывает особую обеспокоенность, так как оно может усиливать нейродегенеративные процессы, наблюдаемые при болезни Альцгеймера.

3.5.3.2.3 Влияние клиохинола на содержание меди в мозге мышей 5xFAD

Клиохинол, производное 8-гидроксихинолина, широко применяется как наружное противогрибковое и противопротозойное средство для лечения кожных заболеваний. Однако клиохинол обладает хелатирующими свойствами и может образовывать комплексы с цинком и медью, что открывает перспективы его использования в терапии болезни Альцгеймера [371]. Способность клиохинола хелатировать медь и цинк снижает нейротоксические эффекты, вызванные накоплением металлов в амилоидных бляшках в мозге. Ранее было выявлено, что клиохинол влияет на амилоидные бляшки Aβ в трансгенных моделях мышей [372]. В исследовании Церни и соавторов сообщалось о снижении уровня амилоида в мозге на 49% у трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера APP2576, которым клиохинол вводили перорально [373]. Клиохинол и PBT2 (5,7-дихлоро-2-[(диметиламино)метил]-8-гидроксихинолин) показали значительные перспективы в ранних исследованиях на моделях болезни Альцгеймера у мышей и прошли клинические испытания для оценки их эффективности и безопасности при нейродегенеративных заболеваниях у человека [374–376]. Клинические исследования показали, что клиохинол способен замедлять когнитивные нарушения у пациентов с болезнью Альцгеймера. В одном из ключевых клинических исследований II фазы было показано, что пациенты, принимавшие клиохинол, испытывали значительное замедление когнитивного спада по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, а также снижение уровня Aβ в плазме крови. Предполагается, что механизм действия клиохинола связан с хелатированием ионов металлов из агрегатов Aβ, что способствует растворению бляшек и снижению окислительного стресса, вызванного нейротоксичностью металлов [377]. Таким образом, клиохинол является одним из эффективных препаратов, прошедших клинические испытания и доказавших свою способность эффективно хелатировать ионы меди.

Анализ содержания меди на разных глубинах в мозге показал следующие закономерности. В контрольной группе уровень меди демонстрировал небольшие колебания между различными глубинами, что характерно как для электрохимического метода, так и для метода ICP-MS. Различия между этими

методами минимальны, однако по данным электрохимии были получены несколько более высокие значения меди.

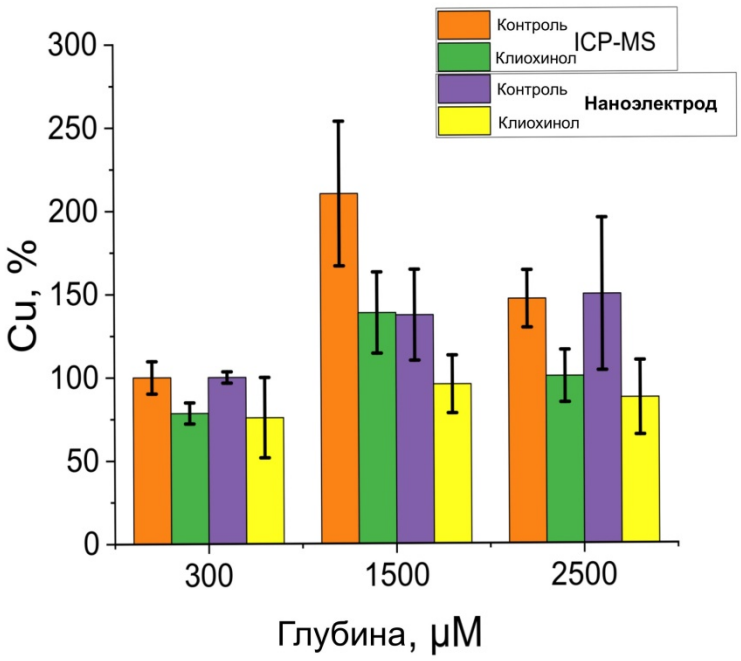


Рисунок 3.5.3.2.3.1 – Содержание уровня ионов меди на разной глубине мозга до и после терапии клиохинолом у трансгенных мышей с БА. Содержание меди измерено двумя способами: элетрохимически прижизненно и методом ICP-MS

В группах, получавших клиохинол (обозначены зелёным и жёлтым на рисунке 3.5.3.2.3.1), было зафиксировано значительное увеличение содержания меди в мозге, особенно на больших глубинах. Это было наиболее выражено в группе, анализированной методом электрохимии (обозначено зелёным на рисунке 3.5.3.2.3.1). По сравнению с контрольной группой содержание меди значительно возросло в центральных областях мозга.

Электрохимический метод показал более высокие уровни меди по сравнению с ICP-MS в обеих исследуемых группах, что может быть связано с большей чувствительностью электрохимии к локальным изменениям концентрации металлов.

Наиболее выраженные различия были зафиксированы в группе с клиохинолом, где электрохимический метод показал пик содержания меди в центральных областях мозга, превышающий значения других групп. Метод ICP-

MS также подтвердил увеличение содержания меди, хотя его показатели были ниже по сравнению с данными электрохимических методов.

Полученные результаты указывают на то, что лечение клиохинолом приводит к увеличению уровня меди в мозге мышей, что подтверждается двумя независимыми методами. Эти данные согласуются с ранее опубликованными исследованиями, которые демонстрируют, что клиохинол способен изменять уровни металлов в мозге, что, возможно, связано с его нейропротекторными свойствами. Значительное увеличение содержания меди в группе с клиохинолом, особенно выявленное методом электрохимии, может быть связано с локальными изменениями распределения меди, которые данный метод лучше улавливает. Это подчёркивает необходимость дальнейших исследований для лучшего понимания механизмов накопления меди в мозге и роли клиохинола в этом процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате систематического комплексного исследования и разработки методов локального исследования биофизических процессов на единичных клетках и биологических моделях *in vivo* с помощью нанокапиллярных сенсоров для выявления физико-химических параметров, которые можно использовать для объективной диагностики функционального состояния клеток и тканей организма, получены результаты, позволяющие сформулировать следующие выводы:

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

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

3) Разработан метод для 3D pH картирования с нанометровым пространственным разрешением для живых *in vitro* и *in vivo* систем на основе нанокапилляра с цвиттер-ионной мембраной, основанный на явлении выпрямления тока. pH-чувствительный сенсор обладает следующими характеристиками:

пространственное разрешение не более 50 нм, скорость отклика не более 2 мс, точность измерения не более 0,01 pH. 3D pH внеклеточное картирование меланомы A375M выявило неоднородный pH-градиент по сравнению со здоровыми меланоцитами. Был получен профиль градиента pH внутри опухоли 4T1 мыши *in vivo* прижизненно, зарегистрировано падение pH до 5,3-5,6. На примере магнитных наночастиц, конъюгированных с pHLIP, продемонстрирована возможность достоверно определять эффективность доставки pH-чувствительных диагностических и терапевтических препаратов в опухоль мыши *in vivo* прижизненно с помощью 3D PH картирования.

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

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

6) Разработан метод для количественной локальной электрохимической детекции платиносодержащих препаратов с помощью дисковых наноэлектродов с пределом обнаружения 1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения цисплатина и его современных аналогов в единичных клетках, 3D-

сфероидах и опухолях мыши. На примере 3D-сфероидов (MCF-7) продемонстрирована возможность локального определения зон с повышенной и пониженной гипоксией концентрации кислорода. Определена прямая корреляция между распределением метронидазол содержащей производной цисплатина и градиентом области гипоксии 3D-сфероида. Обнаружено одновременное высвобождение цисплатина и генерация АФК за счет фотоактивации пролекарства Pt(IV) (Рибоплатина) внутри опухолевых сфероидов.

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

Полученные научно-исследовательские результаты открывают широкие перспективы для дальнейшей разработки темы. Были выработаны новые подходы для исследования биофизических параметров единичных клеток, что позволяет получать фундаментальные знания отклика биологических систем на нано- и субмикронном уровне с высоким временным разрешением. Также была продемонстрирована возможность создания широкого спектра сенсоров на базе наноразмерных капиллярных сенсоров за счет использования специфических окислительно-восстановительных потенциалов и селективных лигандов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Swietach P. et al. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer // Phil. Trans. R. Soc. B. The Royal Society, 2014. Vol. 369, № 1638. P. 20130099.

2. Evans S.M. et al. Hypoxia Is Important in the Biology and Aggression of Human Glial Brain Tumors // Clinical Cancer Research. 2004. Vol. 10, № 24. P. 8177–8184.

3. Scheiber I.F., Mercer J.F.B., Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain // Prog Neurobiol. 2014. Vol. 116. P. 33–57.

4. Hansma P.K. et al. The Scanning Ion-Conductance Microscope // Science (1979). 1989. Vol. 243, № 4891. P. 641–643.

5. Novak P. et al. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy // Nat Methods. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 6, № 4. P. 279–281.

6. Laslau C., Williams D.E., Travas-Sejdic J. The application of nanopipettes to conducting polymer fabrication, imaging and electrochemical characterization // Prog Polym Sci. 2012. Vol. 37, № 9. P. 1177–1191.

7. Novak P. et al. Imaging single nanoparticle interactions with human lung cells using fast ion conductance microscopy // Nano Lett. ACS Publications, 2014. Vol. 14, № 3. P. 1202–1207.

8. Novak P. et al. Nanoscale-Targeted Patch-Clamp Recordings of Functional Presynaptic Ion Channels // Neuron. 2013. Vol. 79, № 6. P. 1067–1077.

9. Shevchuk A. et al. Angular approach scanning ion conductance microscopy // Biophys J. Elsevier, 2016. Vol. 110, № 10. P. 2252–2265.

10. Clarke R.W. et al. Low Stress Ion Conductance Microscopy of Sub-Cellular Stiffness // Soft Matter. 2016/09/05. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 12, № 38. P. 7953–7958.

11. Comstock D.J. et al. Integrated Ultramicroelectrode−Nanopipet Probe for Concurrent Scanning Electrochemical Microscopy and Scanning Ion Conductance Microscopy // Anal Chem. 2010. Vol. 82, № 4. P. 1270–1276.

12. Sa N. et al. Rectification of Ion Current in Nanopipettes by External Substrates // ACS Nano. 2013. Vol. 7, № 12. P. 11272–11282.

13.Umehara S. et al. Label-free biosensing with functionalized nanopipette probes // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. Vol. 106, № 12. P. 4611–4616.

14.Vitol E.A. et al. *In Situ* Intracellular Spectroscopy with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)-Enabled Nanopipettes // ACS Nano. 2009. Vol. 3, № 11. P. 3529–3536.

15.Vilozny B. et al. Reversible cation response with a protein-modified nanopipette // Analytical Chemistry. 2011. Vol. 83, № 16. P. 6121–6126.

16.Vilozny B. et al. Dynamic Control of Nanoprecipitation in a Nanopipette // ACS Nano. 2011. Vol. 5, № 4. P. 3191–3197.

17.Zhang Y. et al. Spearhead Nanometric Field-Effect Transistor Sensors for Single-Cell Analysis // ACS Nano. 2016. Vol. 10, № 3. P. 3214–3221.

18.Takahashi Y. et al. Multifunctional Nanoprobes for Nanoscale Chemical Imaging and Localized Chemical Delivery at Surfaces and Interfaces // Angewandte Chemie International Edition. 2011. Vol. 50, № 41. P. 9638–9642.

19.Deng X.L. et al. Ion Current Oscillation in Glass Nanopipettes // The Journal of Physical Chemistry C. 2012. Vol. 116, № 28. P. 14857–14862.

20.Takami T. et al. Direct observation of potassium ions in HeLa cell with ion-selective nano-pipette probe // J Appl Phys. 2012. Vol. 111, № 4.

21.Singhal R. et al. Multifunctional carbon-nanotube cellular endoscopes // Nat Nanotechnol. 2011. Vol. 6, № 1. P. 57–64.

22.Ito S., Iwata F. Nanometer-Scale Deposition of Metal Plating Using a Nanopipette Probe in Liquid Condition // Jpn J Appl Phys. 2011. Vol. 50, № 8S3. P. 08LB15.

23.Suryavanshi A.P., Yu M.-F. Electrochemical fountain pen nanofabrication of vertically grown platinum nanowires // Nanotechnology. 2007. Vol. 18, № 10. P. 105305.

24.Kousuke Nogawa et al. Nanopipette with a lipid nanotube as nanochannel // 2007 7th IEEE Conference on Nanotechnology (IEEE NANO). IEEE, 2007. P. 1207–1211.

25.Rodolfa K.T. et al. Two-Component Graded Deposition of Biomolecules with a Double-Barreled Nanopipette // Angewandte Chemie International Edition. 2005. Vol. 44, № 42. P. 6854–6859.

26.Nikolaev V.O. et al. β_2 -Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation // Science (1979). 2010. Vol. 327, № 5973. P. 1653–1657.

27.Bruckbauer A. et al. An Addressable Antibody Nanoarray Produced on a Nanostructured Surface // J Am Chem Soc. 2004. Vol. 126, № 21. P. 6508–6509.

28.Babakinejad B. et al. Local Delivery of Molecules from a Nanopipette for Quantitative Receptor Mapping on Live Cells // Anal Chem. 2013. Vol. 85, № 19. P. 9333–9342.

29.Adam Seger R. et al. Voltage controlled nano-injection system for single-cell surgery // Nanoscale. 2012. Vol. 4, № 19. P. 5843.

30.Takami T. et al. Development of Beetle-Type Robot with Sub-Micropipette Probe // Jpn J Appl Phys. 2012. Vol. 51, № 8S3. P. 08KB12.

31.Yuill E.M. et al. Electrospray Ionization from Nanopipette Emitters with Tip Diameters of Less than 100 nm // Anal Chem. 2013. Vol. 85, № 18. P. 8498–8502.

32.Geraskevich A. v. et al. Electrochemical Sensors for the Detection of Reactive Oxygen Species in Biological Systems: A Critical Review // Crit Rev Anal Chem. 2022. P. 1–33.

33.Munteanu R.-E.E. et al. 2D materials in electrochemical sensors for in vitro or in vivo use // Anal Bioanal Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020. Vol. 413, № 3. P. 701–725.

34.Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. // Physiol Res. 2010. Vol. 59, № 4.

35.Deng Z. et al. Recent advances in electrochemical analysis of hydrogen peroxide towards in vivo detection // Process Biochemistry. 2022. Vol. 115. P. 57–69.

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

37.Scheinok S. et al. Comparison of different methods for measuring the superoxide radical by EPR spectroscopy in buffer, cell lysates and cells // Free Radic Res. 2018. Vol. 52, № 10. P. 1182–1196.

38.Faulkner K., Fridovich I. Luminol and lucigenin as detectors for O2ṡ− // Free Radic Biol Med. 1993. Vol. 15, № 4. P. 447–451.

39.Kettle A.J., Carr A.C., Winterbourn C.C. Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils // Free Radic Biol Med. 1994. Vol. 17, № 2. P. 161–164.

40.Lippert A.R., Van de Bittner G.C., Chang C.J. Boronate Oxidation as a Bioorthogonal Reaction Approach for Studying the Chemistry of Hydrogen Peroxide in Living Systems // Acc Chem Res. 2011. Vol. 44, № 9. P. 793–804.

41.Gatin-Fraudet B. et al. Evaluation of borinic acids as new, fast hydrogen peroxide–responsive triggers // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. Vol. 118, № 50.

42.Winterbourn C.C. Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide // Antioxid Redox Signal. 2018. Vol. 29, № 6. P. 541–551.

43.Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress // Redox Biol. 2017. Vol. 11. P. 613–619.

44.Forman H.J. et al. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology // Free Radic Biol Med. 2015. Vol. 78. P. 233–235.

45.Kowaltowski A.J. Strategies to detect mitochondrial oxidants // Redox Biol. 2019. Vol. 21. P. 101065.

46.Brandes R.P., Rezende F., Schröder K. Redox Regulation Beyond ROS // Circ Res. 2018. Vol. 123, № 3. P. 326–328.

47.Kalyanaraman B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations // Free Radic Biol Med. 2012. Vol. 52, № 1. P. 1–6.

48.Bilan D.S., Belousov V. V. *In Vivo* Imaging of Hydrogen Peroxide with HyPer Probes // Antioxid Redox Signal. 2018. Vol. 29, № 6. P. 569–584.

49.Morgan B. et al. Real-time monitoring of basal H2O2 levels with peroxiredoxin-based probes // Nat Chem Biol. 2016. Vol. 12, № 6. P. 437–443.

50.Hao Z., Zhu R., Chen P.R. Genetically encoded fluorescent sensors for measuring transition and heavy metals in biological systems // Curr Opin Chem Biol. 2018. Vol. 43. P. 87–96.

51.Wang H., Jing M., Li Y. Lighting up the brain: genetically encoded fluorescent sensors for imaging neurotransmitters and neuromodulators // Curr Opin Neurobiol. 2018. Vol. 50. P. 171–178.

52.Pak V. V. et al. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function // Cell Metab. 2020. Vol. 31, № 3. P. 642-653.e6.

53.Ferrer-Sueta G. et al. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration // Chem Rev. 2018. Vol. 118, № 3. P. 1338–1408.

54.Guo J., Huang X., Ma X. Clinical identification of diabetic ketosis/diabetic ketoacidosis acid by electrochemical dual channel test strip with medical smartphone // Sens Actuators B Chem. 2018. Vol. 275. P. 446–450.

55.Dou B. et al. Trimetallic Hybrid Nanoflower-Decorated MoS_2 Nanosheet Sensor for Direct in Situ Monitoring of H_2O_2 Secreted from Live Cancer Cells // Anal Chem. 2018. Vol. 90, № 9. P. 5945–5950.

56.Lewińska-Preis L. et al. Bioelements and mineral matter in human livers from the highly industrialized region of the Upper Silesia Coal Basin (Poland) // Environ Geochem Health. 2011. Vol. 33, № 6. P. 595–611.

57.Willis M.S. et al. Zinc-Induced Copper Deficiency A Report of Three Cases Initially Recognized on Bone Marrow Examination. 2005. P. 125–131.

58.Minoia C. et al. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects // Science of The Total Environment. 1990. Vol. 95. P. 89–105.

59.Osredkar J., Sustar N. Copper and Zinc , Biological Role and Significance of Copper / Zinc Imbalance Journal of Clinical Toxicology. 2011. P. 1–18.

60.Linder M.C. et al. Copper transport // Am J Clin Nutr. 1998. Vol. 67, № 5. P. 965S-971S.

61.Harris E.D., Ph D. Copper Homeostasis : The Role of Cellular Transporters. 2001. № September. P. 281–285.

62.Bhattacharya P.T., Misra S.R., Hussain M. Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review // Scientifica (Cairo). 2016. Vol. 2016. P. 1–12.

63.ARAYA M. et al. Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health // Biol Res. 2006. Vol. 39, № 1. P. 183–187.

64.Davis C.D. Low Dietary Copper Increases Fecal Free Radical Production, Fecal Water Alkaline Phosphatase Activity and Cytotoxicity in Healthy Men // J Nutr. 2003. Vol. 133, № 2. P. 522–527.

65.Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease // Am J Clin Nutr. 2000. Vol. 71, № 2. P. 621S-629S.

66.Rubino J.T., Franz K.J. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function // J Inorg Biochem. 2012. Vol. 107, № 1. P. 129–143.

67.Tisato F. et al. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies // Med Res Rev. 2009. Vol. 30. P. 708–749.

68.The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // Proc R Soc Lond A Math Phys Sci. 1934. Vol. 147, № 861. P. 332–351.

69.Valko M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int J Biochem Cell Biol. 2007. Vol. 39, № 1. P. 44–84.

70.Khan A.U., Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994. Vol. 91, № 26. P. 12365–12367.

71.Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // Exp Physiol. 1997. Vol. 82, № 2. P. 291–295.

72.Gupte A., Mumper R.J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment // Cancer Treat Rev. 2009. Vol. 35, № 1. P. 32–46.

73.Pavelková M. et al. Biological role of copper as an essential trace element in the human organism // Ceska a Slovenska Farmacie. 2018. Vol. 2018, № 4. P. 143–153.

74.Roberts E.A. Wilson’s disease // Medicine. 2011. Vol. 39, № 10. P. 602–604.

75.Bull P.C. et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the menkes gene // Nat Genet. 1993. Vol. 5, № 4. P. 327–337.

76.Scheinberg I.H. Wilson’s disease // Major Probl Intern Med. 1984. Vol. 23. P. 9–16.

77.Fenu M. et al. Kayser–Fleischer ring in Wilson’s disease: A cohort study // Eur J Intern Med. 2012. Vol. 23, № 6. P. e150–e156.

78.Datar S., Wijdicks E.F.M. Neurologic manifestations of acute liver failure. 2014. P. 645–659.

79.Lenartowicz M. et al. Copper therapy reduces intravascular hemolysis and derepresses ferroportin in mice with mosaic mutation (Atp7a mo-ms): An implication for copper-mediated regulation of the Slc40a1 gene expression // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2017. Vol. 1863, № 6. P. 1410–1421.

80.Galhardi C.M. et al. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction // Food and Chemical Toxicology. 2004. Vol. 42, № 12. P. 2053–2060.

81.Strausak D. et al. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer’s, Menkes, and Wilson diseases // Brain Res Bull. 2001. Vol. 55, № 2. P. 175–185.

82.DiDonato M., Sarkar B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 1997. Vol. 1360, № 1. P. 3–16.

83.Majouga A.G. et al. Mixed Valence Copper(I,II) Binuclear Complexes with Unexpected Structure: Synthesis, Biological Properties and Anticancer Activity // J Med Chem. 2014. Vol. 57, № 14. P. 6252–6258.

84.Ceramella J. et al. From coins to cancer therapy: Gold, silver and copper complexes targeting human topoisomerases // Bioorg Med Chem Lett. 2020. Vol. 30, № 3. P. 126905.

85.Tian Q. et al. Hydrophilic Flower-Like CuS Superstructures as an Efficient 980 nm Laser-Driven Photothermal Agent for Ablation of Cancer Cells // Advanced Materials. 2011. Vol. 23, № 31. P. 3542–3547.

86.Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction // Apoptosis. 2000. Vol. 5, № 5. P. 415–418.

87.Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer // Journal of Clinical Investigation. 2015. Vol. 125, № 9. P. 3335–3337.

88.Lee A. et al. Recent progress in therapeutic antibodies for cancer immunotherapy // Curr Opin Chem Biol. 2018. Vol. 44. P. 56–65.

89.Zhou P. et al. Multifunctional nanoparticles based on a polymeric copper chelator for combination treatment of metastatic breast cancer // Biomaterials. 2019. Vol. 195. P. 86–99.

90.Leont'ev V.K. et al. Antibacterial Properties of Aqueous Colloid Solutions of Metal and Metal Oxide Nanoparticles against Dental Plaque Bacteria // Nanotechnol Russ. 2018. Vol. 13, № 3–4. P. 195–198.

91.Mamonova I.A. et al. Study of physical properties and biological activity of copper nanoparticles // Nanotechnol Russ. 2013. Vol. 8, № 5–6. P. 303–308.

92.Ingle A.P., Duran N., Rai M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. Vol. 98, № 3. P. 1001–1009.

93.Mokhtar A. et al. CuNPs-magadiite/chitosan nanocomposite beads as advanced antibacterial agent: Synthetic path and characterization // Int J Biol Macromol. 2018. Vol. 118. P. 2149–2155.

94.Rajeshkumar S., Rinitha G. Nanostructural characterization of antimicrobial and antioxidant copper nanoparticles synthesized using novel Persea americana seeds // OpenNano. 2018. Vol. 3. P. 18–27.

95.Krasnovskaya O. et al. Copper coordination compounds as biologically active agents // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, № 11.

96.Krasnovskaya O. et al. Metals in imaging of alzheimer?s disease // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, № 23. P. 1–35.

97.Litwin T. et al. Brain metal accumulation in Wilson's disease // J Neurol Sci. 2013. Vol. 329, № 1–2. P. 55–58.

98.Colon M. et al. Development of novel and sensitive methods for the determination of sulfide in aqueous samples by hydrogen sulfide generation-inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy // Anal Chim Acta. 2008. Vol. 609, № 2. P. 160–168.

99.Hill S.J., Fisher A.S. Atomic Absorption, Methods and Instrumentation // Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. Elsevier, 2017. P. 37–43.

100. White A.R. et al. Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice // Brain Res. 1999. Vol. 842, № 2. P. 439–444.

101. Giese A. et al. Mouse Brain Synaptosomes Accumulate Copper-67 Efficiently by Two Distinct Processes Independent of Cellular Prion Protein // Journal of Molecular Neuroscience. 2005. Vol. 27, № 3. P. 347–354.

102. Goullé J.-P. et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair // Forensic Sci Int. 2005. Vol. 153, № 1. P. 39–44.

103. Hasegawa S. et al. Alterations in manganese, copper, and zinc contents, and intracellular status of the metal-containing superoxide dismutase in human mesothelioma cells // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2008. Vol. 22, № 3. P. 248–255.

104. Jones L.C., Beard J.L., Jones B.C. Genetic analysis reveals polygenic influences on iron, copper, and zinc in mouse hippocampus with neurobiological implications // Hippocampus. 2008. Vol. 18, № 4. P. 398–410.

105. Rahil-Khazen R. et al. Multi-element analysis of trace element levels in human autopsy tissues by using inductively coupled atomic emission spectrometry technique (ICP-AES) // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2002. Vol. 16, № 1. P. 15–25.

106. Lindh U., Johansson E., Gille L. Application of the nuclear microprobe to the study of elemental profiles in individual blood cells. Preparation and analysis // Nucl Instrum Methods Phys Res B. 1984. Vol. 3, № 1–3. P. 631–636.

107. Cao Y. et al. A highly efficient introduction system for single cell- ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells // Talanta. 2020. Vol. 206. P. 120174.

108. Szoboszlai N. et al. Direct elemental analysis of cancer cell lines by total reflection X-ray fluorescence // Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 2008. Vol. 63, № 12. P. 1480–1484.

109. Jeffery J. et al. Method for measurement of serum copper, zinc and selenium using total reflection X-ray fluorescence spectroscopy on the PICOFOX analyser: Validation and comparison with atomic absorption spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry // Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine. 2019. Vol. 56, № 1. P. 170–178.

110. Kim A.M. et al. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes // Nat Chem Biol. 2010. Vol. 6, № 9. P. 674–681.

111. Cialla-May D. et al. Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics // Chem Soc Rev. 2017. Vol. 46, № 13. P. 3945–3961.

112. Lee J.-H. et al. Rapid and Sensitive Determination of HIV-1 Virus Based on Surface Enhanced Raman Spectroscopy // J Biomed Nanotechnol. 2015. Vol. 11, № 12. P. 2223–2230.

113. Avella-Oliver M. et al. Label-free SERS analysis of proteins and exosomes with large-scale substrates from recordable compact disks // Sens Actuators B Chem. 2017. Vol. 252. P. 657–662.

114. Wang Y. et al. SERS Assay for Copper(II) Ions Based on Dual Hot-Spot Model Coupling with MarR Protein: New Cu 2+ -Specific Biorecognition Element // Anal Chem. 2017. Vol. 89, № 12. P. 6392–6398.

115. Dugandžić V. et al. A SERS-based molecular sensor for selective detection and quantification of copper(II) ions // Sens Actuators B Chem. 2019. Vol. 279. P. 230–237.

116. Gorelkin P. V et al. Use of biospecific reactions for the design of high-sensitivity biosensors based on nanomechanical cantilever systems // Polymer Science Series A. 2010. Vol. 52, № 10. P. 1023–1033.

117. Gorelkin P. V et al. Synthetic sialylglycopolymer receptor for virus detection using cantilever-based sensors // Analyst. 2015. Vol. 140, № 17. P. 6131–6137.

118. Beloglazkina E.K. et al. Bis-(4-(2-pyridylmethyleneiminophenyl))disulfide — A chelating ligand capable of self assembly on gold surface and its complexes with M(BF4)2 and M(ClO4)2; MCo, Cu and Ni. Experimental and theoretical study // Thin Solid Films. 2007. Vol. 515, № 11. P. 4649–4661.

119. Wu G. et al. Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. Vol. 98, № 4. P. 1560–1564.

120. PENG R.-P. et al. Detection of Pb2+ in Aqueous Solution by Using a DNA-modified Microcantilever // Analytical Sciences. 2016. Vol. 32, № 10. P. 1065–1069.

121. Du Y., Dong S. Nucleic Acid Biosensors: Recent Advances and Perspectives // Anal Chem. 2017. Vol. 89, № 1. P. 189–215.

122. Bange A.F. et al. Stripping voltammetry of Pb and Cu using a microcantilever electrode // Surf Sci. 2009. Vol. 603, № 21. P. L125–L127.

123. Xu X. et al. Ultrasensitive Detection of Cu 2+ Using a Microcantilever Sensor Modified with L-Cysteine Self-Assembled Monolayer // Appl Biochem Biotechnol. 2010. Vol. 183. P. 555–565.

124. Zhao H. et al. Detection of copper ions using microcantilever immunosensors and enzyme-linked immunosorbent assay // Anal Chim Acta. 2010. Vol. 676, № 1–2. P. 81–86.

125. Taniguchi M., Kawai T. Vertical electrochemical transistor based on poly(3-hexylthiophene) and cyanoethylpullulan // Appl Phys Lett. 2004. Vol. 85, № 15. P. 3298–3300.

126. Bäcklund T.G. et al. Current modulation of a hygroscopic insulator organic field-effect transistor // Appl Phys Lett. 2004. Vol. 85, № 17. P. 3887–3889.

127. Panzer M.J., Frisbie C.D. High Carrier Density and Metallic Conductivity in Poly(3-hexylthiophene) Achieved by Electrostatic Charge Injection // Adv Funct Mater. 2006. Vol. 16, № 8. P. 1051–1056.

128. Nguyen T.T.K. et al. Peptide-modified electrolyte-gated organic field effect transistor. Application to Cu2+ detection // Biosens Bioelectron. 2019. Vol. 127. P. 118–125.

129. Kergoat L. et al. Tuning the threshold voltage in electrolyte-gated organic field-effect transistors // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. Vol. 109, № 22. P. 8394–8399.

130. Chen J. et al. Cyclam-functionalized carbon dots sensor for sensitive and selective detection of copper(II) ion and sulfide anion in aqueous media and its imaging in live cells // Sens Actuators B Chem. 2016. Vol. 224. P. 298–306.

131. Fan J. et al. A Fluorescent Ratiometric Chemodosimeter for Cu 2+ Based on TBET and Its Application in Living Cells // Org Lett. 2013. Vol. 15, № 3. P. 492–495.

132. Upadhyay S. et al. Colorimetric chemosensors for d-metal ions: A review in the past, present and future prospect // J Mol Struct. 2019. Vol. 1193. P. 89–102.

133. Li M., Huang X., Yu H. A colorimetric assay for ultrasensitive detection of copper (II) ions based on pH-dependent formation of heavily doped molybdenum oxide nanosheets // Materials Science and Engineering: C. 2019. Vol. 101. P. 614–618.

134. Guo L. et al. Oriented Gold Nanoparticle Aggregation for Colorimetric Sensors with Surprisingly High Analytical Figures of Merit // J Am Chem Soc. 2013. Vol. 135, № 33. P. 12338–12345.

135. YALING Y., YI H. A Sensitive and Selective Method for Visual Chronometric Detection of Copper(II) Ions Using Clock Reaction // Analytical Sciences. 2019. Vol. 35, № 2. P. 159–163.

136. Feng S. et al. Fluorescent sensor for copper(II) ions based on coumarin derivative and its application in cell imaging // Inorg Chem Commun. 2019. Vol. 102. P. 51–56.

137. Xue X. et al. In vivo fluorescence imaging for Cu2+ in live mice by a new NIR fluorescent sensor // Dyes and Pigments. 2016. Vol. 130. P. 116–121.

138. Xu Z. et al. Near-infrared fluorescent probe for selective detection of Cu2+ in living cells and in Vivo // Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2019. Vol. 216. P. 404–410.

139. Jung H.S. et al. Coumarin-Derived Cu 2+ -Selective Fluorescence Sensor: Synthesis, Mechanisms, and Applications in Living Cells // J Am Chem Soc. 2009. Vol. 131, № 5. P. 2008–2012.

140. Carter K.P., Young A.M., Palmer A.E. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems // Chem Rev. 2014. Vol. 114, № 8. P. 4564–4601.

141. Domaille D.W., Que E.L., Chang C.J. Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals // Nat Chem Biol. 2008. Vol. 4, № 3. P. 168–175.

142. Liang J. et al. Genetically encoded red fluorescent copper(I) sensors for cellular copper(I) imaging // Biochem Biophys Res Commun. 2014. Vol. 443, № 3. P. 894–898.

143. Hao C. et al. A new peptide-based chemosensor for selective imaging of copper ion and hydrogen sulfide in living cells // Microchemical Journal. 2020. Vol. 154. P. 104658.

144. Zhang N. et al. Rapid, Selective, and Ultrasensitive Fluorimetric Analysis of Mercury and Copper Levels in Blood Using Bimetallic Gold–Silver Nanoclusters with “Silver Effect”-Enhanced Red Fluorescence // Anal Chem. 2014. Vol. 86, № 23. P. 11714–11721.

145. Luo Q. et al. Synthesis and living cell imaging of a novel fluorescent sensor for selective cupric detection // Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2019. Vol. 214. P. 146–151.

146. Tiwari K. et al. An azine based sensor for selective detection of Cu 2+ ions and its copper complex for sensing of phosphate ions in physiological conditions and in living cells // Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2018. Vol. 191. P. 16–26.

147. Wei L.-F. et al. A nano-molar fluorescent turn-on probe for copper(II) detection in living cells // Methods. 2019. Vol. 168. P. 18–23.

148. Prasad B.B., Fatma S. Electrochemical sensing of ultra trace copper(II) by alga-OMNiIIP modified pencil graphite electrode // Sens Actuators B Chem. 2016. Vol. 229. P. 655–663.

149. Liu T. et al. Voltammetric detection of Cu2+ using poly(azure A) modified glassy carbon electrode based on mimic peroxidase behavior of copper // Sens Actuators B Chem. 2016. Vol. 235. P. 568–574.

150. Pathirathna P. et al. Fast-Scan Deposition-Stripping Voltammetry at Carbon-Fiber Microelectrodes: Real-Time, Subsecond, Mercury Free Measurements of Copper // Anal Chem. 2012. Vol. 84, № 15. P. 6298–6302.

151. Holmes J., Pathirathna P., Hashemi P. Novel frontiers in voltammetric trace metal analysis: Towards real time, on-site, in situ measurements // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2019. Vol. 111. P. 206–219.

152. Chai X. et al. A Two-Channel Ratiometric Electrochemical Biosensor for In Vivo Monitoring of Copper Ions in a Rat Brain Using Gold Truncated Octahedral Microcages // Angewandte Chemie International Edition. 2013. Vol. 52, № 31. P. 8129–8133.

153. Gu H. et al. On-line regeneration of electrochemical biosensor for in vivo repetitive measurements of striatum Cu2+ under global cerebral ischemia/reperfusion events // Biosens Bioelectron. 2019. Vol. 135. P. 111–119.

154. Karhanek M. et al. Single DNA Molecule Detection Using Nanopipettes and Nanoparticles // Nano Lett. 2005. Vol. 5, № 2. P. 403–407.

155. Howorka S., Siwy Z. Nanopore analytics: Sensing of single molecules // Chem Soc Rev. 2009. Vol. 38, № 8. P. 2360–2384.

156. Vilozny B. et al. Reversible Cation Response with a Protein-Modified Nanopipette // Anal Chem. 2011. Vol. 83, № 16. P. 6121–6126.

157. Erofeev A. et al. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles // Sci Rep. Springer US, 2018. № February. P. 1–11.

158. Sa N., Fu Y., Baker L.A. Reversible Cobalt Ion Binding to Imidazole-Modified Nanopipettes // Anal Chem. 2010. Vol. 82, № 24. P. 9963–9966.

159. Zhai Q. et al. Bare conical nanopore embedded in polymer membrane for Cr(III) sensing // Talanta. Elsevier, 2015. Vol. 140. P. 219–225.

160. Kaya D., Kececi K. Preparation of nanopores and their application for the detection of metals // Bulgarian Chemical Communications. 2017. Vol. 49. P. 37–42.

161. Steinbock L.J. et al. DNA Translocation through Low-Noise Glass Nanopores // ACS Nano. 2013. Vol. 7, № 12. P. 11255–11262.

162. Han C. et al. Enantioselective Recognition in Biomimetic Single Artificial Nanochannels // J Am Chem Soc. 2011. Vol. 133, № 20. P. 7644–7647.

163. Umehara S. et al. Label-free biosensing with functionalized nanopipette probes // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. Vol. 106, № 12. P. 4611–4616.

164. He H. et al. The facile surface chemical modification of a single glass nanopore and its use in the nonenzymatic detection of uric acid // Chemical Communications. 2015. Vol. 51, № 10. P. 1914–1917.

165. Шольц Ф. Электроаналитические методы. Теория и практика / trans. Майстренко В.Н. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006.

166. Gornall J.L. et al. Simple Reconstitution of Protein Pores in Nano Lipid Bilayers // Nano Lett. 2011. Vol. 11, № 8. P. 3334–3340.

167. Papp S., Jágerszki G., Gyurcsányi R.E. Ion-Selective Electrodes Based on Hydrophilic Ionophore-Modified Nanopores // Angewandte Chemie International Edition. 2018. Vol. 57, № 17. P. 4752–4755.

168. Erofeev A., Gorelkin P., Majouga A. A nanoelectrode for detecting cu(II) ions and a method of producing and using thereof: pat. WO2017/116267AI USA. 2017.

169. Wang G. et al. Nanopore detection of copper ions using a polyhistidine probe // Biosens Bioelectron. 2014. Vol. 53. P. 453–458.

170. Chen L. et al. Single glass nanopore-based regenerable sensing platforms with a non-immobilized polyglutamic acid probe for selective detection of cupric ions // Anal Chim Acta. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 889. P. 98–105.

171. Frag E.Y., Mohamed M.E.B., Fahim E.M. Corrigendum to “Application of carbon sensors for potentiometric determination of copper(II) in water and biological fluids of Wilson disease patients. Studying the surface reaction using SEM, EDX, IR and DFT” [Biosens. Bioelectron. 118 (2018) 122–128] // Biosens Bioelectron. 2019. Vol. 131. P. 309.

172. Wang P., Wu J., Zhao C. A water-soluble peptide fluorescent chemosensor for detection of cadmium (II) and copper (II) by two different response modes and its application in living LNcap cells // Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2020. Vol. 226. P. 117600.

173. Sardesai N.P. et al. Platinum-doped ceria based biosensor for in vitro and in vivo monitoring of lactate during hypoxia // Anal Chem. 2015. Vol. 87, № 5. P. 2996–3003.

174. Chatard C. et al. Minimally Invasive Microelectrode Biosensors Based on Platinized Carbon Fibers for in Vivo Brain Monitoring // ACS Cent Sci. 2018. Vol. 4, № 12. P. 1751–1760.

175. Iverson N.M. et al. In vivo biosensing via tissue-localizable near-infrared-fluorescent single-walled carbon nanotubes // Nat Nanotechnol. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 8, № 11. P. 873–880.

176. Wolfbeis O.S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging // Chem Soc Rev. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 44, № 14. P. 4743–4768.

177. Shafiee A. et al. Nanosensors for therapeutic drug monitoring: implications for transplantation // Nanomedicine. 2019. Vol. 14, № 20. P. 2735–2747.

178. Li X. et al. Quantum dots based molecular beacons for in vitro and in vivo detection of MMP-2 on tumor // Biosens Bioelectron. 2014. Vol. 61. P. 512–518.

179. Che Y. et al. In vivo live imaging of bone using shortwave infrared fluorescent quantum dots // Nanoscale. Royal Society of Chemistry (RSC), 2020. Vol. 12, № 43. P. 22022–22029.

180. Yao J., Yang M., Duan Y. Chemistry, biology, and medicine of fluorescent nanomaterials and related systems: New insights into biosensing, bioimaging, genomics, diagnostics, and therapy // Chemical Reviews. American Chemical Society, 2014. Vol. 114, № 12. P. 6130–6178.

181. Ogata G. et al. A microsensing system for the in vivo real-time detection of local drug kinetics // Nat Biomed Eng. 2017. Vol. 1, № 8. P. 654–666.

182. Hanawa A. et al. In Vivo Real-Time Simultaneous Examination of Drug Kinetics at Two Separate Locations Using Boron-Doped Diamond Microelectrodes // Anal Chem. 2020. Vol. 92, № 20. P. 13742–13749.

183. Xu C. et al. In Vivo Electrochemical Sensors for Neurochemicals: Recent Update // ACS Sensors. American Chemical Society, 2019. Vol. 4, № 12. P. 3102–3118.

184. Xiao T. et al. In Vivo Analysis with Electrochemical Sensors and Biosensors // Anal Chem. 2017. Vol. 89, № 1. P. 300–313.

185. He C. et al. Microelectrode-Based Electrochemical Sensing Technology for in Vivo Detection of Dopamine: Recent Developments and Future Prospects // Crit Rev Anal Chem. Taylor & Francis, 2020. Vol. 0, № 0. P. 1–11.

186. Xiao T. et al. In Vivo Analysis with Electrochemical Sensors and Biosensors // Anal Chem. 2017. Vol. 89, № 1. P. 300–313.

187. Deshpande A.S., Muraoka W., Andreescu S. Electrochemical sensors for oxidative stress monitoring // Curr Opin Electrochem. 2021. Vol. 29. P. 100809.

188. Rivera K.R. et al. Measuring and regulating oxygen levels in microphysiological systems: design, material, and sensor considerations // Cite this: Analyst. 2019. Vol. 144. P. 3190.

189. Vaneev A.N. et al. In Vitro / In Vivo Electrochemical Detection of Pt(II) Species // Anal Chem. American Chemical Society, 2022. Vol. 94, № 12. P. 4901–4905.

190. Kamal Eddin F.B., Wing Fen Y. Recent Advances in Electrochemical and Optical Sensing of Dopamine // Sensors (Basel). 2020. Vol. 20, № 4. P. 1–47.

191. Chauhan N. et al. Recent advancement in nanosensors for neurotransmitters detection: Present and future perspective // Process Biochemistry. Elsevier, 2020. Vol. 91, № December 2019. P. 241–259.

192. Puthongkham P., Venton B.J. Recent advances in fast-scan cyclic voltammetry // Analyst. Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 145, № 4. P. 1087–1102.

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

194. Wu F., Yu P., Mao L. Analytical and Quantitative in Vivo Monitoring of Brain Neurochemistry by Electrochemical and Imaging Approaches: review-article // ACS Omega. American Chemical Society, 2018. Vol. 3, № 10. P. 13267–13274.

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

196. Xu C. et al. In Vivo Electrochemical Sensors for Neurochemicals: Recent Update // ACS Sensors. American Chemical Society, 2019. Vol. 4, № 12. P. 3102–3118.

197. Alivisatos A.P. et al. Nanotools for Neuroscience and Brain Activity Mapping // ACS Nano. 2013. Vol. 7, № 3. P. 1850–1866.

198. Li Y.T. et al. Nanoelectrode for amperometric monitoring of individual vesicular exocytosis inside single synapses // Angewandte Chemie - International Edition. 2014. Vol. 53, № 46. P. 12456–12460.

199. Wu W.Z. et al. Monitoring dopamine release from single living vesicles with nanoelectrodes // J Am Chem Soc. 2005.

200. Bucher E.S., Wightman R.M. Electrochemical Analysis of Neurotransmitters // Annual Review of Analytical Chemistry. 2015. Vol. 8, № 1. P. 239–261.

201. Chatterjee S. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease // Oxidative Stress and Biomaterials. Academic Press, 2016. P. 35–58.

202. Reuter S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? // Free Radic Biol Med. Elsevier, 2010. Vol. 49, № 11. P. 1603–1616.

203. Gandhi S., Abramov A.Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration // Oxid Med Cell Longev. 2012. Vol. 2012. P. 1–11.

204. Srivastava S. et al. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders // Int J Biol Macromol. Elsevier, 2017. Vol. 101. P. 502–517.

205. Hu K. et al. Electrochemical Measurements of Reactive Oxygen and Nitrogen Species inside Single Phagolysosomes of Living Macrophages // J Am Chem Soc. 2019. Vol. 141, № 11. P. 4564–4568.

206. Li Y. et al. Highly Sensitive Platinum-Black Coated Platinum Electrodes for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Nitrite in Microchannel // Electroanalysis. 2013. Vol. 25, № 4. P. 895–902.

207. Clausmeyer J. et al. Nanosensors for the detection of hydrogen peroxide // Electrochem commun. Elsevier, 2014. Vol. 40. P. 28–30.

208. Amatore C. et al. 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 // ChemBioChem. Wiley Online Library, 2006. Vol. 7, № 4. P. 653–661.

209. Zhang X.-W. et al. Real-Time Intracellular Measurements of ROS and RNS in Living Cells with Single Core-Shell Nanowire Electrodes // Angewandte Chemie. 2017. Vol. 129, № 42. P. 13177–13180.

210. Jiang H. et al. Electrochemical Monitoring of Paclitaxel-Induced ROS Release from Mitochondria inside Single Cells // Small. 2019. P. 1901787.

211. Liu Y. et al. Highly sensitive platinum nanoparticles-embedded porous graphene sensor for monitoring ROS from living cells upon oxidative stress // Sens Actuators B Chem. Elsevier, 2018. Vol. 263. P. 543–549.

212. Vaneev A.N. et al. In Vitro and In Vivo Electrochemical Measurement of Reactive Oxygen Species After Treatment with Anticancer Drugs // Anal Chem. 2020. Vol. 92, № 12. P. 8010–8014.

213. Korchev Y.E.Y.E.Y.E. et al. Scanning ion conductance microscopy of living cells // Biophys J. Elsevier, 1997. Vol. 73, № 2. P. 653–658.

214. Kolmogorov V.S. et al. Mapping mechanical properties of living cells at nanoscale using intrinsic nanopipette–sample force interactions // Nanoscale. Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 13, № 13. P. 6558–6568.

215. Bard A.J. et al. Scanning Electrochemical Microscopy. Introduction and Principles // Anal Chem. 1989.

216. TAKAHASHI Y. Development of High-Resolution Scanning Electrochemical Microscopy for Nanoscale Topography and Electrochemical Simultaneous Imaging // Electrochemistry. 2016. Vol. 84, № 9. P. 662–666.

217. Pisoschi A.M. et al. Electrochemical methods for ascorbic acid determination // Electrochim Acta. 2014. Vol. 121. P. 443–460.

218. Rice M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain // Trends Neurosci. 2000. Vol. 23, № 5. P. 209–216.

219. Xiao T. et al. Controllable and Reproducible Sheath of Carbon Fibers with Single-Walled Carbon Nanotubes through Electrophoretic Deposition for in Vivo Electrochemical Measurements // Anal Chem. 2018. Vol. 90, № 7. P. 4840–4846.

220. Xiao T. et al. Electrochemical Monitoring of Propagative Fluctuation of Ascorbate in the Live Rat Brain during Spreading Depolarization // Angewandte Chemie - International Edition. 2019. Vol. 58, № 20. P. 6616–6619.

221. Qu Z. et al. Tailoring Oxygen-Containing Groups on Graphene for Ratiometric Electrochemical Measurements of Ascorbic Acid in Living Subacute Parkinson's Disease Mouse Brains // Anal Chem. 2021. Vol. 93, № 49. P. 16598–16607.

222. Xue Y. et al. Deep Learning for Voltammetric Sensing in a Living Animal Brain // Angewandte Chemie. 2021. Vol. 133, № 44. P. 23970–23976.

223. Gao X. et al. A single-atom Cu–N 2 catalyst eliminates oxygen interference for electrochemical sensing of hydrogen peroxide in a living animal brain // Chem Sci. 2021. Vol. 12, № 45. P. 15045–15053.

224. Li X. et al. Platinized Silica Nanoporous Membrane Electrodes for Low-Fouling Hydrogen Peroxide Detection // ChemElectroChem. 2020. Vol. 7, № 9. P. 2081–2086.

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

226. Wilson L.R. et al. Selective and Mechanically Robust Sensors for Electrochemical Measurements of Real-Time Hydrogen Peroxide Dynamics in Vivo // Anal Chem. American Chemical Society, 2018. Vol. 90, № 1. P. 888–895.

227. Zhu W. et al. A new microdialysis-electrochemical device for in vivo simultaneous determination of acetylcholine and choline in rat brain treated with N-methyl-(R)-salsolinol // Biosens Bioelectron. 2009. Vol. 24, № 12. P. 3594–3599.

228. Lowry J.P. et al. Characterization of Glucose Oxidase-Modified Poly(phenylenediamine)-Coated Electrodes in vitro and in vivo: Homogeneous Interference by Ascorbic Acid in Hydrogen Peroxide Detection // Anal Chem. 1994. Vol. 66, № 10. P. 1754–1761.

229. Pezzulo A.A. et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung // Nature. 2012. Vol. 487, № 7405. P. 109–113.

230. Rossi D.J., Brady J.D., Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia // Nat Neurosci. 2007. Vol. 10, № 11. P. 1377–1386.

231. Zhao H. et al. Emerging roles of Na+/H+ exchangers in epilepsy and developmental brain disorders // Prog Neurobiol. 2016. Vol. 138–140. P. 19–35.

232. Zhang Y. et al. High-resolution label-free 3D mapping of extracellular pH of single living cells // Nat Commun. 2019. Vol. 10, № 1. P. 5610.

233. Chen L.Q., Pagel M.D. Evaluating pH in the Extracellular Tumor Microenvironment Using CEST MRI and Other Imaging Methods // Adv Radiol. 2015. Vol. 2015. P. 1–25.

234. Cohen J.S. et al. Determination of intracellular pH and compartmentation using diffusion-weighted NMR spectroscopy with pH-sensitive indicators // Magn Reson Med. 2004. Vol. 51, № 5. P. 900–903.

235. Vāvere A.L. et al. A Novel Technology for the Imaging of Acidic Prostate Tumors by Positron Emission Tomography // Cancer Res. 2009. Vol. 69, № 10. P. 4510–4516.

236. Gillies R.J., Morse D.L. In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy in Cancer // Annu Rev Biomed Eng. 2005. Vol. 7, № 1. P. 287–326.

237. Hassan M. et al. Fluorescence lifetime imaging system for in vivo studies. // Mol Imaging. Vol. 6, № 4. P. 229–236.

238. Zhou J.X. et al. Monitoring of pH changes in a live rat brain with MoS2/PAN functionalized microneedles // Analyst. Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 143, № 18. P. 4469–4475.

239. Zhang Z. et al. In Vivo Monitoring of pH in Subacute PD Mouse Brains with a Ratiometric Electrochemical Microsensor Based on Poly(melamine) Films // ACS Sens. 2022. Vol. 7, № 1. P. 235–244.

240. Zhang K. et al. Micrometer-scale transient ion transport for real-time pH assay in living rat brains // Chem Sci. 2021. Vol. 12, № 21. P. 7369–7376.

241. Cao Y. et al. Electrophoretically Sheathed Carbon Fiber Microelectrodes with Metal/Nitrogen/Carbon Electrocatalyst for Electrochemical Monitoring of Oxygen

in Vivo: research-article // ACS Appl Bio Mater. American Chemical Society, 2019. Vol. 2, № 3. P. 1376–1383.

242. Zhang Q. et al. Cerebral oxygenation during locomotion is modulated by respiration // Nat Commun. Springer US, 2019. Vol. 10, № 1.

243. Pratush A., Kumar A., Hu Z. Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review // International Microbiology. 2018. Vol. 21, № 3. P. 97–106.

244. Mishra S. et al. Heavy Metal Contamination: An Alarming Threat to Environment and Human Health // Environmental Biotechnology: For Sustainable Future. Singapore: Springer Singapore, 2019. P. 103–125.

245. Yang T. et al. A review of ratiometric electrochemical sensors: From design schemes to future prospects // Sens Actuators B Chem. 2018. Vol. 274. P. 501–516.

246. Zhang C. et al. A Robust Au−C≡C Functionalized Surface: Toward Real-Time Mapping and Accurate Quantification of Fe 2+ in the Brains of Live AD Mouse Models // Angewandte Chemie. 2020. Vol. 132, № 46. P. 20680–20688.

247. Zhao F. et al. An Electrochemophysiological Microarray for Real-Time Monitoring and Quantification of Multiple Ions in the Brain of a Freely Moving Rat // Angewandte Chemie. 2020. Vol. 132, № 26. P. 10512–10516.

248. Liu W. et al. Development of an Efficient Biosensor for the In Vivo Monitoring of Cu + and pH in the Brain: Rational Design and Synthesis of Recognition Molecules // Angewandte Chemie. 2017. Vol. 129, № 51. P. 16546–16550.

249. Yu Y. et al. Functionalized poly (ionic liquid) as the support to construct a ratiometric electrochemical biosensor for the selective determination of copper ions in AD rats // Biosens Bioelectron. 2017. Vol. 87. P. 278–284.

250. Zhang C. et al. A Robust Au−C≡C Functionalized Surface: Toward Real-Time Mapping and Accurate Quantification of Fe 2+ in the Brains of Live AD Mouse Models // Angewandte Chemie. 2020. Vol. 132, № 46. P. 20680–20688.

251. Liu Y. et al. Long-Term Tracking and Dynamically Quantifying of Reversible Changes of Extracellular Ca 2+ in Multiple Brain Regions of Freely Moving Animals // Angewandte Chemie. 2021. Vol. 133, № 26. P. 14550–14558.

252. Actis P. et al. Electrochemical Nanoprobes for Single-Cell Analysis // ACS Nano. ACS Publications, 2014. Vol. 8, № 1. P. 875–884.

253. Timoshenko R. V et al. Electrochemical Nanopipette Sensor for In Vitro/In Vivo Detection of Cu^{2+} Ions // Anal Chem. 2024. Vol. 96, № 1. P. 127–136.

254. Bard A.J., Faulkner L.R., White H.S. Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, Ltd, 2022.

255. Allen D. et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management // Expert Rev Anti Infect Ther. 2015. Vol. 13, № 6. P. 787–798.

256. Montenegro M.I., Queirós M.A., Daschbach J.L. Microelectrodes: Theory and Applications. Dordrecht: Springer Science+Business Media Dordrecht, 1991.

257. Прохорова Г.В. Введение в электрохимические методы анализа / ed. Агасян П.К., Иванов В.М. Москва: МГУ, 1991.

258. Sakmann B., Neher E. Single-Channel Recording. Boston, MA: Springer US, 1995.

259. Weit C., Bard A.J., Feldberg S.W. Current Rectification at Quartz Nanopipet Electrodes // Anal Chem. 1997. Vol. 69, № 22. P. 4627–4633.

260. Umehara S. et al. Current rectification with poly-L-lysine-coated quartz nanopipettes // Nano Lett. 2006. Vol. 6, № 11. P. 2486–2492.

261. Fu Y., Tokuhisa H., Baker L.A. Nanopore DNA sensors based on dendrimer-modified nanopipettes // Chemical Communications. 2009. № 32. P. 4877.

262. Sexton L.T. et al. Resistive-Pulse Studies of Proteins and Protein/Antibody Complexes Using a Conical Nanotube Sensor // J Am Chem Soc. 2007. Vol. 129, № 43. P. 13144–13152.

263. Daniel C. et al. The role of proton dynamics in the development and maintenance of multidrug resistance in cancer // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2013. Vol. 1832, № 5. P. 606–617.

264. Parks S.K., Chiche J., Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth // J Cell Physiol. 2011. Vol. 226, № 2. P. 299–308.

265. Huber V. et al. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation // Semin Cancer Biol. 2017. Vol. 43. P. 74–89.

266. Chen M. et al. Hydroxide diffuses slower than hydronium in water because its solvated structure inhibits correlated proton transfer // Nat Chem. 2018. Vol. 10, № 4. P. 413–419.

267. Piper J.D. et al. Characterization and Application of Controllable Local Chemical Changes Produced by Reagent Delivery from a Nanopipet // J Am Chem Soc. 2008. Vol. 130, № 31. P. 10386–10393.

268. Hou H. et al. Single-cell pH imaging and detection for pH profiling and label-free rapid identification of cancer-cells // Sci Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 1759.

269. Nadappuram B.P. et al. Fabrication and characterization of dual function nanoscale pH-scanning ion conductance microscopy (SICM) probes for high resolution pH mapping // Anal Chem. ACS Publications, 2013. Vol. 85, № 17. P. 8070–8074.

270. Ke G. et al. A Cell-Surface-Anchored Ratiometric Fluorescent Probe for Extracellular pH Sensing // ACS Appl Mater Interfaces. 2014. Vol. 6, № 17. P. 15329–15334.

271. Longo D.L. et al. In Vivo Imaging of Tumor Metabolism and Acidosis by Combining PET and MRI-CEST pH Imaging // Cancer Res. 2016. Vol. 76, № 22. P. 6463–6470.

272. Huang Y. et al. Towards longitudinal mapping of extracellular pH in gliomas // NMR Biomed. 2016. Vol. 29, № 10. P. 1364–1372.

273. Ren R. et al. Nanopore extended field-effect transistor for selective single-molecule biosensing // Nat Commun. Springer US, 2017. Vol. 8, № 1.

274. Roberts M.E. et al. Water-stable organic transistors and their application in chemical and biological sensors // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. Vol. 105, № 34. P. 12134–12139.

275. Kocak G., Tuncer C., Bütün V. pH-Responsive polymers // Polym Chem. 2017. Vol. 8, № 1. P. 144–176.

276. Roy S., Singha N. Polymeric Nanocomposite Membranes for Next Generation Pervaporation Process: Strategies, Challenges and Future Prospects // Membranes (Basel). 2017. Vol. 7, № 3. P. 53.

277. Zhao C. et al. Polymeric pH-sensitive membranes—A review // Prog Polym Sci. 2011. Vol. 36, № 11. P. 1499–1520.

278. Krems M., Di Ventra M. Ionic Coulomb blockade in nanopores // Journal of Physics: Condensed Matter. 2013. Vol. 25, № 6. P. 065101.

279. Rollings R.C., Kuan A.T., Golovchenko J.A. Ion selectivity of graphene nanopores // Nat Commun. 2016. Vol. 7, № 1. P. 11408.

280. Medvedev E.S., Stuchebrukhov A.A. Proton diffusion along biological membranes // Journal of Physics: Condensed Matter. 2011. Vol. 23, № 23. P. 234103.

281. Serowy S. et al. Structural Proton Diffusion along Lipid Bilayers // Biophys J. 2003. Vol. 84, № 2. P. 1031–1037.

282. Grzywa T.M., Paskal W., Włodarski P.K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma // Transl Oncol. 2017. Vol. 10, № 6. P. 956–975.

283. Prasetyanti P.R., Medema J.P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective // Mol Cancer. 2017. Vol. 16, № 1. P. 41.

284. Hashim A.I. et al. Imaging pH and metastasis // NMR Biomed. 2011. Vol. 24, № 6. P. 582–591.

285. Cairns R.A. et al. Cancer Cell Metabolism // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2011. Vol. 76, № 0. P. 299–311.

286. Stock C. et al. pH Nanoenvironment at the Surface of Single Melanoma Cells // Cellular Physiology and Biochemistry. 2007. Vol. 20, № 5. P. 679–686.

287. Pershina A.G. et al. Variation in tumor pH affects pH-triggered delivery of peptide-modified magnetic nanoparticles // Nanomedicine. 2021. Vol. 32. P. 102317.

288. Pershina A.G. et al. pH-triggered delivery of magnetic nanoparticles depends on tumor volume // Nanomedicine. 2020. Vol. 23. P. 102086.

289. Pershina A. et al. 3-Aminopropylsilane-modified iron oxide nanoparticles for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of liver lesions induced by Opisthorchis felineus // Int J Nanomedicine. 2016. Vol. Volume 11. P. 4451–4463.

290. Demin A.M. et al. PMIDA-Modified Fe $_3$ O $_4$ Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Application for Liver MRI // Langmuir. 2018. Vol. 34, № 11. P. 3449–3458.

291. Demin A.M. et al. L-Lysine-modified Fe3O4 nanoparticles for magnetic cell labeling // Colloids Surf B Biointerfaces. 2020. Vol. 190. P. 110879.

292. Li D. et al. Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Shells for Nanoparticles: Enhanced Stealth Effect and Colloidal Stability // Langmuir. 2019. Vol. 35, № 26. P. 8799–8805.

293. Wike-Hooley J.L., Haveman J., Reinhold H.S. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease // Radiotherapy and Oncology. 1984. Vol. 2, № 4. P. 343–366.

294. Cornut R., Lefrou C. New analytical approximation of feedback approach curves with a microdisk SECM tip and irreversible kinetic reaction at the substrate // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2008. Vol. 621, № 2. P. 178–184.

295. SAITO Y. A Theoretical Study on the Diffusion Current at the Stationary Electrodes of Circular and Narrow Band Types // Review of Polarography. 1968. Vol. 15, № 6. P. 177–187.

296. Amphlett J.L., Denuault G. Scanning Electrochemical Microscopy (SECM): An Investigation of the Effects of Tip Geometry on Amperometric Tip Response // J Phys Chem B. 1998. Vol. 102, № 49. P. 9946–9951.

297. Shao Y., Mirkin M. V. Probing Ion Transfer at the Liquid/Liquid Interface by Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) // J Phys Chem B. 1998. Vol. 102, № 49. P. 9915–9921.

298. Mahon P.J., Oldham K.B. Convolutive modelling of the disk electrode geometry under reversible conditions // Electrochim Acta. 2004. Vol. 49, № 28. P. 5049–5054.

299. Fruehauf J.P., Trapp V. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? // Expert Rev Anticancer Ther. Taylor & Francis, 2008. Vol. 8, № 11. P. 1751–1757.

300. Wang Y. et al. Nanoelectrodes for determination of reactive oxygen and nitrogen species inside murine macrophages // Proceedings of the National Academy of Sciences. National Acad Sciences, 2012. Vol. 109, № 29. P. 11534–11539.

301. Hanot C. et al. Effects of Iron-Oxide Nanoparticle Surface Chemistry on Uptake Kinetics and Cytotoxicity in CHO-K1 Cells // Int J Mol Sci. 2015. Vol. 17, № 1. P. 54.

302. Alarifi S. et al. Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line // Biol Trace Elem Res. 2014. Vol. 159, № 1–3. P. 416–424.

303. Wu H. et al. Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides // J Food Drug Anal. 2014. Vol. 22, № 1. P. 86–94.

304. Batrakova E. V., Kabanov A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers // Journal of Controlled Release. 2008. Vol. 130, № 2. P. 98–106.

305. Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction // Apoptosis. 2000. Vol. 5, № 5. P. 415–418.

306. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // Free Radic Biol Med. 2010. Vol. 48, № 6. P. 749–762.

307. Kumari S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival // Biomark Insights. 2018. Vol. 13. P. 117727191875539.

308. Vaneev A.N. et al. In Vitro and in Vivo Electrochemical Measurement of Reactive Oxygen Species after Treatment with Anticancer Drugs // Anal Chem. 2020. Vol. 92, № 12. P. 8010–8014.

309. Shi Y.-K. et al. Synthesis and biological evaluation of new steroidal pyridines as potential anti-prostate cancer agents // Eur J Med Chem. Elsevier, 2018. Vol. 145. P. 11–22.

310. Mizumachi T. et al. Increased mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells // Oncogene. 2008. Vol. 27, № 6. P. 831–838.

311. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? // Nat Rev Drug Discov. 2009. Vol. 8, № 7. P. 579–591.

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

313. Cao D. et al. Amplification loop cascade for increasing caspase activity induced by docetaxel // J Cell Biochem. 2005. Vol. 96, № 4. P. 810–820.

314. Marullo R. et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 11. P. 1–15.

315. Wagner B.A. et al. Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells // Arch Biochem Biophys. 2005. Vol. 440, № 2. P. 181–190.

316. Lim H.-W. et al. Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells // Exp Mol Med. 2005. Vol. 37, № 5. P. 497–506.

317. Petrov R.A. et al. New Small-Molecule Glycoconjugates of Docetaxel and GalNAc for Targeted Delivery to Hepatocellular Carcinoma // Mol Pharm. 2021. Vol. 18, № 1. P. 461–468.

318. Novotortsev V.K. et al. Dispirooxindoles Based on 2-Selenoxo-Imidazolidin-4-Ones: Synthesis, Cytotoxicity and ROS Generation Ability // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, № 5. P. 2613.

319. Machulkin A. et al. PSMA-targeted small-molecule docetaxel conjugate: Synthesis and preclinical evaluation // Eur J Med Chem. 2021. Vol. 227. P. 113936.

320. Machulkin A.E. et al. Synthesis, Characterization, and Preclinical Evaluation of a Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Monomethyl Auristatin e Conjugate // J Med Chem. 2021. Vol. 64, № 23. P. 17123–17145.

321. Yamansarov E.Y. et al. Discovery of Bivalent GalNAc-Conjugated Betulin as a Potent ASGPR-Directed Agent against Hepatocellular Carcinoma // Bioconjug Chem. 2021. Vol. 32, № 4. P. 763–781.

322. Machulkin A.E. et al. Synthesis and Biological Evaluation of PSMA Ligands with Aromatic Residues and Fluorescent Conjugates Based on Them // J Med Chem. 2021. Vol. 64, № 8. P. 4532–4552.

323. Akasov R.A. et al. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide // Sci Rep. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 9, № 1. P. 9679.

324. Pleskova S.N. et al. ROS Production by a Single Neutrophil Cell and Neutrophil Population upon Bacterial Stimulation // Biomedicines. 2023. Vol. 11, № 5. P. 1361.

325. Pleskova S.N. et al. Changes in ROS/RNS Levels in Endothelial Cells in Experimental Bacteremia // ChemBioChem. 2024.

326. KANWISHER J. Polarographic Oxygen Electrode1 // Limnol Oceanogr. 1959. Vol. 4, № 2. P. 210–217.

327. Alova A. et al. Prolonged oxygen depletion in microwounded cells of Chara corallina detected with novel oxygen nanosensors // J Exp Bot. 2019. № September. P. 1–13.

328. Sylantyev S. et al. Electric Fields Due to Synaptic Currents Sharpen Excitatory Transmission // Science (1979). 2008. Vol. 319, № 5871. P. 1845–1849.

329. Vaneev A.N. et al. In Vitro/ in Vivo Electrochemical Detection of Pt(II) Species // Anal Chem. 2022. Vol. 94, № 12. P. 4901–4905.

330. Spector D. V et al. Electrochemical Detection of a Novel Pt(IV) Prodrug with the Metronidazole Axial Ligand in the Hypoxic Area // Inorg Chem. 2022. Vol. 61, № 37. P. 14705–14717.

331. Ito M. et al. PET and Planar Imaging of Tumor Hypoxia With Labeled Metronidazole // Acad Radiol. 2006. Vol. 13, № 5. P. 598–609.

332. Spector D. V et al. Pt(IV) Prodrugs with Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Axial Position // J Med Chem. 2022. Vol. 65, № 12. P. 8227–8244.

333. Spector D. et al. Biotinylated Pt(iv) prodrugs with elevated lipophilicity and cytotoxicity // Dalton Transactions. 2022. Vol. 52, № 4. P. 866–871.

334. Krasnovskaya O.O. et al. Photoinduced Reduction of Novel Dual-Action Riboplatin Pt(IV) Prodrug // ACS Appl Mater Interfaces. 2023. Vol. 15, № 10. P. 12882–12894.

335. Krasnovskaya O.O. et al. Novel Copper-Containing Cytotoxic Agents Based on 2-Thioxoimidazolones // J Med Chem. 2020. Vol. 63, № 21. P. 13031–13063.

336. Trachootham D. et al. Redox Regulation of Cell Survival // Antioxid Redox Signal. 2008. Vol. 10, № 8. P. 1343–1374.

337. Qi H. et al. Electroless deposition of gold nanoparticles on carbon nanopipette electrode for electrochemical detection of catecholamines released from PC12 cells // Microchimica Acta. 2020. Vol. 187, № 11. P. 595.

338. Jena B.K., Percival S.J., Zhang B. Au Disk Nanoelectrode by Electrochemical Deposition in a Nanopore // Anal Chem. 2010. Vol. 82, № 15. P. 6737–6743.

339. Kleijn S.E.F. et al. Electrochemistry of Nanoparticles // Angewandte Chemie International Edition. 2014. Vol. 53, № 14. P. 3558–3586.

340. Chandra S. et al. An Undergraduate-Level Electrochemical Investigation of Gold Nanoparticles-Modified Physically Small Carbon Electrodes // World Journal of Chemical Education. 2016. Vol. 4, № 5. P. 93–100.

341. Dai X. et al. Anodic Stripping Voltammetry of Arsenic(III) Using Gold Nanoparticle-Modified Electrodes // Anal Chem. 2004. Vol. 76, № 19. P. 5924–5929.

342. Lin M. et al. Electrochemical analysis of copper ion using a Gly–Gly–His tripeptide modified poly(3-thiopheneacetic acid) biosensor // Biosens Bioelectron. 2009. Vol. 25, № 1. P. 28–33.

343. Chen K. et al. Water-soluble inorganic salts with ultrahigh specific capacitance: crystallization transformation investigation of CuCl2 electrodes // CrystEngComm. 2013. Vol. 15, № 47. P. 10367.

344. Nakayama S. et al. Voltammetric Characterization of Oxide Films Formed on Copper in Air // J Electrochem Soc. 2001. Vol. 148, № 11. P. B467.

345. Li Y. et al. Sensitive isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of bumetanide in serum and brain tissue // Journal of Chromatography B. Elsevier, 2011. Vol. 879, № 13–14. P. 998–1002.

346. Kennedy R.T. Emerging trends in in vivo neurochemical monitoring by microdialysis // Curr Opin Chem Biol. 2013. Vol. 17, № 5. P. 860–867.

347. Shannon R.J. et al. Cerebral microdialysis in clinical studies of drugs: pharmacokinetic applications // J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2013. Vol. 40, № 3. P. 343–358.

348. Thompson J.M., Miller L.S. Preclinical Optical Imaging to Study Pathogenesis, Novel Therapeutics and Diagnostics Against Orthopaedic Infection // Journal of Orthopaedic Research. 2019. Vol. 37, № 11.

349. Sakadžić S. et al. Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue // Nat Methods. 2010. Vol. 7, № 9.

350. Liu W.F. et al. Real-time in vivo detection of biomaterial-induced reactive oxygen species // Biomaterials. 2011. Vol. 32, № 7.

351. Zhang R. et al. Real-Time Discrimination and Versatile Profiling of Spontaneous Reactive Oxygen Species in Living Organisms with a Single Fluorescent Probe // J Am Chem Soc. 2016. Vol. 138, № 11.

352. Seo J.W. et al. Real-time monitoring of drug pharmacokinetics within tumor tissue in live animals // Sci Adv. 2022. Vol. 8, № 1.

353. Kolmogorov V.S. et al. Scanning Ion-Conductance Microscopy for Studying β-Amyloid Aggregate Formation on Living Cell Surfaces // Anal Chem. 2023. Vol. 95, № 43. P. 15943–15949.

354. Krasnovskaya O. et al. Bifunctional Copper Chelators Capable of Reducing Aβ Aggregation and Aβ-Induced Oxidative Stress // ACS Omega. 2024.

355. Vaneev A.N. et al. Nano- and Microsensors for In Vivo Real-Time Electrochemical Analysis: Present and Future Perspectives // Nanomaterials. 2022. Vol. 12, № 21. P. 3736.

356. Abakumova T. et al. Intravital electrochemical nanosensor as a tool for the measurement of reactive oxygen/nitrogen species in liver diseases // J Nanobiotechnology. 2022. Vol. 20, № 1. P. 497.

357. Xu X. et al. Advancements in Brain Research: The In Vivo/In Vitro Electrochemical Detection of Neurochemicals // Biosensors. 2024. Vol. 14, № 3.

358. Xu C. et al. In Vivo Electrochemical Sensors for Neurochemicals: Recent Update // ACS Sens. American Chemical Society, 2019. Vol. 4, № 12. P. 3102–3118.

359. Xiao T. et al. In Vivo Analysis with Electrochemical Sensors and Biosensors // Anal Chem. 2017. Vol. 89, № 1. P. 300–313.

360. Liu Y. et al. Implantable Electrochemical Sensors for Brain Research // JACS Au. 2023. Vol. 3, № 6.

361. Bhatt S., Puli L., Patil C.R. Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease // Drug Discov Today. 2021. Vol. 26, № 3. P. 794–803.

362. Cassidy L. et al. Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics // Complement Ther Med. 2020. Vol. 49. P. 102294.

363. Gella A., Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease // Cell Adh Migr. 2009. Vol. 3, № 1. P. 88–93.

364. Huang X. et al. The Aβ Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction // Biochemistry. 1999. Vol. 38, № 24. P. 7609–7616.

365. Opazo C. et al. Metalloenzyme-like Activity of Alzheimer's Disease β-Amyloid // Journal of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277, № 43. P. 40302–40308.

366. Franzoni F. et al. Exploring Neurocognitive Deterioration in Alzheimer's Disease // Biology (Basel). 2023. Vol. 12, № 3. P. 343.

367. Yang J. et al. Imaging hydrogen peroxide in Alzheimer's disease via cascade signal amplification // Sci Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 35613.

368. Vinokurov A.Y. et al. Brain region specificity in reactive oxygen species production and maintenance of redox balance // Free Radic Biol Med. 2021. Vol. 174. P. 195–201.

369. Solovyev N. et al. Cu, Fe, and Zn isotope ratios in murine Alzheimer's disease models suggest specific signatures of amyloidogenesis and tauopathy // Journal of Biological Chemistry. 2021. Vol. 296.

370. Zhao J. et al. TDMQ20, a Specific Copper Chelator, Reduces Memory Impairments in Alzheimer's Disease Mouse Models // ACS Chem Neurosci. 2021. Vol. 12, № 1.

371. CUAJUNGCO M.P. et al. Metal Chelation as a Potential Therapy for Alzheimer's Disease // Ann N Y Acad Sci. 2000. Vol. 920, № 1. P. 292–304.

372. Gouras G.K., Beal M.F. Metal Chelator Decreases Alzheimer β-Amyloid Plaques // Neuron. 2001. Vol. 30, № 3. P. 641–642.

373. Cherny R.A. et al. Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits β-Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice // Neuron. 2001. Vol. 30, № 3. P. 665–676.

374. Faux N.G. et al. PBT2 Rapidly Improves Cognition in Alzheimer's Disease: Additional Phase II Analyses // Journal of Alzheimer's Disease. 2010. Vol. 20, № 2. P. 509–516.

375. Safety, tolerability, and efficacy of PBT2 in Huntington's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial // Lancet Neurol. 2015. Vol. 14, № 1. P. 39–47.

376. Lannfelt L. et al. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Aβ as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial // Lancet Neurol. 2008. Vol. 7, № 9. P. 779–786.

377. Deraeve C., Pitie M., Meunier B. Influence of chelators and iron ions on the production and degradation of H2O2 by β-amyloid–copper complexes // J Inorg Biochem. 2006. Vol. 100, № 12. P. 2117–2126.

ООО "ИКАППИК"
111033, г. Москва, ул. Волочаевская, 20-1-11
+7 495 361 7637/+7 926 536 0535
info@icappic.com
www.icappic.com

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ООО «ИКАППИК»
_____ П.В. Горелкин
«16» января 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий акт составлен о том, что pH-чувствительные нанозонды, представленные в диссертационной работе Ерофеева А.С. «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов», внедрен и используется в ООО «ИКАППИК» в рамках научно-исследовательской деятельности. Данные зонды используются в методиках СИПМ для pHe картирования поверхности клеток

Генеральный директор
ООО «ИКАППИК» к.ф.-м.н., П.В. Горелкин

MNT

111033, г. Москва, вн.тер. г.
Муниципальный Округ Лефортово, ул
Волочаевская, дом 20, корпус 1,
квартира 1

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель генерального директора
ООО «Медицинские Нанотехнологии»
_____ А.О. Преловская
«21» декабря 2023 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий акт составлен о том, что метод для локального количественного определения АФК в режиме реального времени на уровне единичных клеток, представленный в диссертационной работе Ерофеева А.С. «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов», внедрен и используется в ООО «Медицинские нанотехнологии» в рамках научно-исследовательской деятельности. Представленный метод используется при проведении доклинических исследований при подтверждении механизмов действия инновационных таргетных препаратов.

Заместитель генерального директора
ООО «Медицинские нанотехнологии»
(Доверенность №77 АГ 9805447 от 30.07.2023 г.) А.О. Преловская

ООО "ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП"

ИНН 7736501129/ КПП 773601001

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО «ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП»

_____ И.Б. Левшин

«02» 02 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий акт составлен о том, что метод для локального количественного определения АФК в режиме реального времени на уровне единичных клеток, представленный в диссертационной работе Ерофеева А.С. «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов», внедрен и используется в ООО «ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП» в рамках научно-исследовательской деятельности. Использование методики позволяет эффективно оценивать токсичность инновационных синтетических органических веществ, обладающих противогрибковой активностью.

Генеральный директор
ООО «ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП»

Профессор, д.фарм.н.
Левшин Игорь Борисович

Договор № 439/223/439
на оказание научно-технических услуг

г. Москва " 19 "сентября 2023г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», именуемое в дальнейшем «Исполнитель», в лице проректора по науке и инновациям Филонова Михаила Рудольфовича, действующего на основании доверенности №36-04 от 01.02.2023 г., с одной стороны, и федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России), именуемое далее «Заказчик», в лице первого заместителя генерального директора-заместителя генерального директора по научной работе Палеева Филиппа Николаевича , действующего на основании доверенности № 22 от 11.03.2022 г., с другой стороны, вместе именуемые в дальнейшем «Стороны», заключили в соответствии с Федеральным законом от 18.07.2011 г. N 223-ФЗ "О закупках товаров, работ, услуг отдельными видами юридических лиц" и на основании подп. 1 п. 7.1 «Положения о закупке товаров, работ, услуг федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (новая редакция)» настоящий договор (далее - Договор) о нижеследующем:

1. Предмет Договора

1.1. Исполнитель обязуется по заданию Заказчика оказать научно-технические услуги (далее – услуги), на условиях, в объеме и в сроки, предусмотренные Техническим заданием (Приложение № 1), в соответствии с Календарным планом (Приложение № 2), отчитаться об оказанных услугах, а Заказчик обязуется принять и оплатить услуги.

1.2. Результат оказанных услуг предоставляется Исполнителем в форме научно-технического отчета (заполняется при необходимости).

1.3. Сроки оказания услуг: с даты подписания Договора, не позднее 01 декабря 2023 г.

Промежуточные сроки оказания услуг определяются Календарным планом (Приложение № 3).

1.4. Место оказания услуг: НИТУ «МИСИС».

1.5. Оказание услуг производится в рамках проведения фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований в 2023 – 2026 годах с последующим возможным продлением срока выполнения указанных исследований на срок до трех лет по отобранному Фондом в рамках открытого публичного конкурса на получение грантов Российского научного фонда по мероприятию «Проведение исследований на базе существующей научной инфраструктуры мирового уровня» Президентской программы исследовательских проектов, реализуемых ведущими учеными, в том числе молодыми учеными (далее – конкурс) научному проекту: «Механизмы дисфункции адипоцитов жировой ткани и сосудистого эндотелия при метаболических нарушениях, связанных с ожирением и диабетом 2 типа», №.23-75-00027.

2. Цена услуг и порядок оплаты

2.1. За оказанные по Договору услуги Заказчик обязуется оплатить Исполнителю 1 000 000,00 руб. (один миллион рублей 00 копеек), НДС не облагается. Цена Договора является твердой и определяется на весь срок действия Договора.

2.2. В цену Договора включены все платежи и расходы, связанные с исполнением Договора, в том числе стоимость материалов.

2.3. Оплата по Договору производится Заказчиком по безналичному расчету путем перечисления денежных средств на расчетный счет Исполнителя платежным поручением в следующем порядке:

Договор 81-23-ЕПИ-240-2-2023-2026
на выполнение научно-исследовательской работы

г. Москва "24" августа 2023 г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», именуемое в дальнейшем «Исполнитель», в лице проректора по науке и инновациям Филонова Михаила Рудольфовича, действующего на основании доверенности №161-04 от 19.06.2023 г., с одной стороны, и Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», именуемое в дальнейшем «Заказчик», в лице проректора по науке и инновациям Грязнова Михаила Юрьевича, действующего на основании доверенности №06.49-03-0179/23 от 02.06.2023, с другой стороны, вместе именуемые в дальнейшем «Стороны», на основании пп. 16 п. 7 раздела 2 главы IV Положения ННГУ о закупке товаров, работ услуг, заключили настоящий Договор (далее – Договор) о нижеследующем:

1. Предмет Договора

1.1. Исполнитель обязуется по заданию Заказчика выполнить научно-исследовательскую работу на тему: «Исследование процессов прямой и обратной трансэндотелиальной миграции нейтрофильных гранулоцитов методом сканирующей ионпроводящей микроскопии» (№.23-74-00004) (далее – НИР).

1.2. Требования к научно-исследовательской работе, являющейся предметом Договора, изложены в Техническом задании (Приложение № 1).

1.3. Содержание, сроки, стоимость выполнения основных этапов определяются Календарным планом (Приложение № 2), являющимся неотъемлемой частью Договора.

1.4. Результат выполнения работы предоставляется Исполнителем в форме научно-технического отчета.

1.5. Сроки выполнения работы: с даты подписания Договора, не позднее 15 ноября 2023 г.

1.6. Место выполнения работ: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», 119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4, стр. 1.

1.7. Выполнение работы производится в рамках проведения фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований в 2023 – 2026 годах с последующим возможным продлением срока выполнения указанных исследований на срок до трех лет по отобранному Фондом в рамках открытого публичного конкурса на получение грантов Российского научного фонда по мероприятию «Проведение исследований на базе существующей научной инфраструктуры мирового уровня» Президентской программы исследовательских проектов, реализуемых ведущими учеными, в том числе молодыми учеными (далее – конкурс) научному проекту: «Исследование процессов прямой и обратной трансэндотелиальной миграции нейтрофильных гранулоцитов методом сканирующей ионпроводящей микроскопии», №.23-74-00004.

2. Стоимость работ и порядок оплаты

2.1. За выполнение научно-исследовательской работы согласно настоящему Договору, Заказчик перечисляет Исполнителю в соответствии с протоколом соглашения о договорной цене (Приложение № 3 к настоящему Договору) 1 400 000,00 (один миллион четыреста тысяч) рублей, НДС не облагается на основании пп.16, п.3, ст.149, гл.21, части 2 НК РФ.

2.2. В цену Договора включены все платежи и расходы, связанные с исполнением Договора, в том числе стоимость материалов.

2.3. Оплата по Договору производится Заказчиком в российских рублях по безналичному расчету путем перечисления денежных средств на расчетный счет Исполнителя платежным поручением в следующем порядке:

2.3.1. В течение 30 (тридцати) календарных дней со дня подписания Сторонами акта

эку-р МИСИС

Договор бюджетного учреждения № 1539-223-2023
на выполнение научно-исследовательских работ

г. Москва "30" 10 2023 г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС» - владелец крупного объекта научной инфраструктуры (ОИ), именуемое в дальнейшем «Исполнитель», в лице проректора по науке и инновациям Филонова Михаила Рудольфовича, действующего на основании доверенности №161-04 от 19.06.2023 г., с одной стороны, и Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (физический факультет МГУ), именуемое в дальнейшем «Заказчик», в лице и.о. декана Белокурова Владимира Викторовича, действующего на основании Доверенности №304-22/010-50 от 01.12.2022, с другой стороны, вместе именуемые в дальнейшем «Стороны», руководствуясь: Гражданским кодексом РФ, Бюджетным кодексом РФ, Федеральным законом «О закупках товаров, работ, услуг отдельными видами юридических лиц» от 18 июля 2011 г. N 223-ФЗ, Положением о закупке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (Далее - Положение) и иными нормативно-правовыми актами РФ, заключили настоящий договор бюджетного учреждения на выполнение научно-исследовательских работ (далее – Договор) на основании пп.31) п. 16.2 ст. 16 Положения (в рамках Соглашения №23-75-00007 от 12.04.2023 между Российским научным фондом, руководителем проекта, организацией и владельцем крупного объекта научной инфраструктуры о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований (СЭД № 336 от 25.04.2023.) о нижеследующем:

1. Предмет Договора

1.1. Исполнитель обязуется по заданию Заказчика выполнить научно-исследовательские работы по теме: «Проведение исследований топографии и механических свойств самособирающихся гидрогелей Fmoc-FF и Fmoc-F5 и живых клеток, адгезированных на их поверхности» (далее – работы), на условиях, в объеме и в сроки, предусмотренные Техническим заданием (Приложение № 1), в соответствии с Календарным планом (Приложение № 2), отчитаться о выполненных работах, а Заказчик обязуется принять и оплатить работы.

1.2. Результат выполненных работ предоставляется Исполнителем в форме научно-технического отчета.

1.3. Сроки выполнения работ: с даты заключения Договора до 24 ноября 2023 г.

1.4. Место выполнения работ: НИТУ «МИСИС».

1.5. Выполнение работ производится в рамках проведения фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований в 2023 – 2026 годах с последующим возможным продлением срока выполнения указанных исследований на срок до трех лет по отобранному Фондом в рамках открытого публичного конкурса на получение грантов Российского научного фонда по мероприятию «Проведение исследований на базе существующей научной инфраструктуры мирового уровня» Президентской программы исследовательских проектов, реализуемых ведущими учеными, в том числе молодыми учеными (далее – конкурс) научному проекту: № 23-75-00007 "Биоматериалы на основе коротких пептидов для регенеративной медицины: исследование кинетики самосборки и управление свойствами".

1.6. Договор считается заключенным с момента регистрации его в реестре контрактов (договоров) МГУ. О факте регистрации Договора в реестре контрактов (договоров) МГУ Заказчик обязан уведомить Исполнителя не позднее, чем в течение одного рабочего дня, следующего после регистрации Договора, путем направления соответствующего письменного уведомления по электронной почте на адрес prerlovskaya.ao@misis.ru.