**Комбинация микрофлюидного чипа и сенсора на основе ФИС для выделения и детекции малых внеклеточных везикул: ключевая роль модификации поверхности**

***Васильев С.Н.*1a,б*, Кузин А.Ю.*2а,б,в*, Флоря И.Н.*3б*, Ковалюк В.В.*4б,в*,***

***Вильданова А.Р.*2a*,* *Лучкин С.Ю.*5a*, Косолобов С.С.*7a*, Гольцман Г.Н.*7в,д*,***

***Чернышёв В.С.*6а,г*, Горин Д.А.*8а**

1*студент,* 2*аспирант,* 3*научный сотрудник,* 4*к.ф-м.н.,* 5*к.х.н.,* 6*к.т.н.,* 7*д.ф-м.н.,* 8*д.х.н.*

a*Сколковский институт наук и технологий, Москва, Россия*

б*Университет науки и технологий МИСИС, Москва, Россия*

в*НИУ «Высшая школа экономики», Москва, Россия*

г*НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, Москва, Россия*

д*Российский квантовый центр, Москва, Россия*

*E–mail*: *vsandal2002@mail.ru*

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний по всему миру среди женщин. За 2020 год было выявлено 2,3 млн новых случаев и 685000 смертей в мире, что соответствует 16% смертей от рака у женщин [1]. На данный момент, стоит важная задача по диагностике HER2-положительного РМЖ, сопровождающегося более высокой вероятностью летального исхода по сравнению с HER2-отрицательным РМЖ [2]. При протекании данного онкологического заболевания, в популяции малых внеклеточных везикул, высвобождаемых опухолевыми клетками, прослеживается высокое содержание HER2-мембранных белков [3]. Разработка методов диагностики и оценка эффективности терапии РМЖ на основе анализа тканеспецифических малых внеклеточных везикул является актуальной задачей современной клинической онкологии. Золотым стандартом современной диагностики является биопсия патологических тканей, однако недостатком данного подхода является инвазивность. В настоящее время альтернативный подход связан с анализом биологических жидкостей, например плазмы крови или мочи пациентов, так называемой ”жидкостной биопсии”. В качестве маркеров патологического состояния используются циркулирующая ДНК [4], малые внеклеточные везикулы [5] и циркулирующие опухолевые клетки [6]. Малые внеклеточные везикулы (МВВ) диаметром 30 - 100 нм, являются перспективными маркерами для диагностики онкологических заболеваний. Благодаря защите фосфолипидного бислоя, МВВ являются более стабильными в жидкости по сравнению с циркулирующей ДНК [7]. МВВ перспективны для ранней диагностики онкологических заболеваний в отличие от циркулирующих опухолевых клеток, которые появляются в плазме на поздних стадиях развития опухоли [7]. Среди существующих методов выделения и обнаружения МВВ используются различные методы такие, как дифференциальное центрифугирование, фильтрация, хроматография и др. [8]. На данный момент, перспективным устройством для детекции МВВ являются оптические сенсоры благодаря своей высокой чувствительности и специфичности. Одним из наиболее перспективных оптических сенсоров являются фотонные интегральные схемы (ФИС) [9]. В комбинации с микрофлюидикой такие ФИС могут стать эффективным медицинским инструментом ранней диагностики и оценки эффективности заболеваний. Однако, ФИС, в общем случае, реагируют только на изменение эффективного показателя преломления и не обладают необходимой специфичностью [10]. Поэтому необходима модификация чувствительной части специфическими молекулами (антитела, аптамеры или дарпины) для того, чтобы связывать на поверхности сенсора опухолевые МВВ.

В предыдущей работе нами была показана использование дарпинов, специфичных к связыванию HER2-мембранных белков, для выделения и детекции МВВ, используя интерферометр Маха-Цендера [11]. Доказана специфичность сенсора, а именно для МВВ, выделенных из клеточной линии с повышенной экспрессией HER2 рецептора характерен больший сдвиг резонансной длины волны, по сравнению с МВВ, выделенными из клеточной линии с существенно меньшей экспрессией HER2 рецептора. Однако, концентрация МВВ, при которой сенсор был специфичен (около 4,2 ⋅1010 мл-1), может быть значительно уменьшена с помощью протокола модификации, обеспечивающего большую концентрацию распознающих молекул на чувствительной части ФИС.

В рамках данной работы была разработана методика модификации поверхности нитрида кремния для выделения и обнаружения МВВ. В отличие от работ [11, 12], в качестве рецептора были использованы аптамеры вместо антител и дарпинов. Аптамеры обладают рядом преимуществ таких, как меньшие размеры, универсальность технологии синтеза для новых мишеней [13]. Разработанный в работе протокол модификации поверхности ФИС заключался в последовательном нанесении следующих слоёв: (3-аминопропил) триэтоксисилан (APTES), глутаральдегид, аптамер, с последующей прокачкой аналита - МВВ. Были использованы МВВ, выделенные из клеточной линии HCT116, и МВВ от здорового донора. Модификация поверхности подтверждалась с помощью измерения контактного угла, метода зонда Кельвина, АСМ, флуоресцентной микроскопии (ФМ). Была изучена зависимость эффективности модификации аптамера от времени инкубации при помощи ФМ. Продолжение данного исследования будет связано с отработкой протокола модификации поверхности ФИС с использованием микрофлюидного устройства; измерением спектров пропускания интерферометров Маха-Цендера в режиме реального времени. Будут измерены сдвиги резонансной длины волны для всех этапов модификации, проведены оценки предела обнаружения, чувствительности и специфичности устройства.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 23-13-00035 (выделение внеклеточных везикул, изготовление микрофлюидных каналов) и Министерства науки и высшего образования РФ FSME-2025-0002 (изготовление ФИС).

**Литература**

1. M. Arnold *et al.*, *The Breast*, vol. 66, no. 66, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>.
2. S. Loibl *et al*, *The Lancet*, vol. 389, no. 10087, pp. 2415, 2017,[https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32417-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736%2816%2932417-5).
3. L. Wang *et al.*, *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, 2020, <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00711-5>.
4. P. Bittla *et al.*, *Cureus*, vol. 15, no. 9, p. e45784, 2023, <https://doi.org/10.7759/cureus.45784>.
5. B. Bondhopadhyay *et al.*, *Cancers*, vol. 13, no. 18, p. 4672, 2021, https://doi.org/10.3390/cancers13184672.
6. E. S. Lianidou et al, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 51, no. 3, pp. 160, 2014, <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.896316>.
7. L. Ma *et al.*, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 9, no. 1, 2024, <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02021-w>.
8. J. Chen *et al.*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, 2022, https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971.
9. J. M. Morales *et al.*, *Optical Sensors and Sensing Congress 2022 (AIS, LACSEA, Sensors, ES)*, pp. SM3E.1–SM3E.1, 2022, <https://doi.org/10.1364/sensors.2022.sm3e.1>.
10. A. Kuzin *et al.*, *Applied physics letters*, vol. 124, no. 6, 2024, https://doi.org/10.1063/5.0190351.
11. A. Kuzin *et al.*, *Applied Physics Letters*, vol. 123, no. 19, 2023, <https://doi.org/10.1063/5.0167631>.
12. A. Kuzin *et al.*, *Analytical Chemistry*, vol. 94, no. 42, pp. 14517, 2022, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03909>.
13. V. Thiviyanathan et al , *PROTEOMICS - Clinical Applications*, vol. 6, no. 11–12, pp. 563, 2012, https://doi.org/10.1002/prca.201200042.