

УДК 577.29

Производное красителя BODIPY для необратимого флуоресцентного маркирования эукариотических клеток и их одновременного цитометрического анализа

А. Ю. Фролова, С. В. Кутяков, В. И. Мартынов, С. М. Деев, А. А. Пахомов*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: alpah@mail.ru

Поступила в редакцию 19.10.2023

Принята к печати 03.11.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.26879

РЕФЕРАТ В настоящей работе мы синтезировали производное зеленого флуоресцентного красителя 1,3,5,7-тетраметил-BODIPY с гептильным заместителем в 8-положении. Полученное высокогидрофобное соединение было способным быстро и необратимо связываться с эукариотическими клетками. Инкубация клеток с красителем в течение различного времени либо при различных концентрациях позволила контролировать степень их мечения и уровень флуоресценции. Это позволило нам модулировать уровень флуоресценции различных культур эукариотических клеток и потом различать их по уровню флуоресцентного сигнала в зеленом канале в цитометрических экспериментах. Помеченные клетки можно объединить и далее тестировать в одной пробирке в идентичных условиях с использованием каналов, в которых краситель не флуоресцирует. Этот подход протестирован на ряде культур опухолевых клеток, содержащих рецептор HER2 на своей поверхности. Представленность рецептора в этих клетках была проанализирована в одной пробирке за один прием с использованием лиганда к HER2 на основе гибридного белка DARPIn9_29-mCherry, флуоресцирующего в красной области спектра.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА флуоресценция, хромофор, цитометрия, проточная цитофлуориметрия, BODIPY, мечение клеток, клеточный анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ BDP-C7 – 8-гептил-1,3,5,7-тетраметил-BODIPY; BODIPY – 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диаза-s-индацен; DARPIn – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека.

ВВЕДЕНИЕ

Проточная цитофлуориметрия – это метод, широко применяемый при изучении функционирования живых систем, разработке новых лекарств, а также в медицине для анализа образцов и выборе стратегии лечения. Метод основан на мечении клеток флуоресцентными красителями, часто конъюгированными с адресными белками (к примеру, антителами) к различным поверхностным маркерам, что позволяет фенотипировать клетки в популяции [1, 2]. Часто при анализе приходится сравнивать культуры клеток друг с другом, к примеру, оценивать параметры клеток в сравнении с контрольными образцами. В этом случае проводится параллельный анализ образцов в одинаковых условиях. Однако обеспечить полностью идентичные условия

при подготовке клеточных образцов от эксперимента к эксперименту невозможно, учитывая неизбежные ошибки пробоподготовки, связанные с пипетированием, возможно также влияние человеческого фактора.

В настоящей работе разработан подход, позволяющий анализировать в одной пробирке сразу несколько культур клеток, даже если исходно они не отличаются по параметрам, детектируемым цитометрическим методом. Для этого разные образцы клеток предварительно окрашивают неспецифическим красителем так, чтобы каждая из анализируемых культур обладала разной интенсивностью флуоресценции в одном из каналов детекции цитометра. Это возможно, если обработать клетки липофильным красителем, неспецифически связывающимся

с мембранными структурами клетки, в течение разного времени либо при разной концентрации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез 8-гептил-4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бор-3а,4а-диазаиндацена (BDP-C7)

Октаноилхлорид (1 мл, 10 ммоль) и 2,4-диметилпиррол (650 мг, 4 ммоль) последовательно растворяли в сухом дихлорметане (50 мл), предварительно продутом аргоном. Смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона. Затем добавляли триэтиламин (3 мл, 22 ммоль) и через 15 мин при 0°C порционно (за 3 раза) добавляли эфират трифторида бора (3 мл, 24 ммоль). Смесь далее перемешивали при 0°C в течение 3 ч. После окончания реакции полученную смесь пропускали через короткую колонку, заполненную силикагелем, в качестве элюента использовали толуол. Растворитель упаривали, продукт реакции выделяли колоночной хроматографией на силикагеле с использованием толуола в качестве элюента. Выход 558 мг (40%). ¹H-NMR (400 МГц, CDCl₃): δ 0.89 (t, 3H, CH₃CH₂), 1.31 (m, 6H, CH₃CH₂CH₂CH₂), 1.48 (m, 2H, CCH₂CH₂CH₂), 1.63 (m, 2H, CCH₂CH₂), 2.41 (s, 6H, CH₃), 2.51 (s, 6H, CH₃), 2.92 (t, 2H, CCH₂), 6.05 (s, 2H, CH). ¹³C-NMR (101 МГц, CDCl₃): δ 14.0, 14.4, 16.3, 22.6, 28.5, 29.0, 30.4, 31.7, 31.9, 76.7, 77.0, 77.3, 121.5, 131.4, 140.3, 146.7, 153.7. ¹⁹F-NMR (376 МГц, CDCl₃): δ 146.66 (q, J ¹⁹F-¹¹B = 32.3 Гц).

Спектрофотометрия

Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции измеряли с использованием спектрофотометра Cary50 Bio (Varian) и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian) соответственно. Квантовый выход флуоресценции измеряли с использованием гомологичного производного BODIPY: 8-децен-1,3,5,7-тетраметил-BODIPY [3–5], в качестве стандарта (квантовый выход стандарта в DMSO считали равным 0.99).

Клеточные культуры

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SKBR3, сверхэкспрессирующие онкомаркер HER2 [6], модифицированные клетки карциномы молочной железы мыши EMT6/P, сверхэкспрессирующие HER2 (EMT-HER2) [7], а также клетки рака шейки матки человека HeLa с нормальным уровнем экспрессии HER2 [8] культивировали в среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.), 100 ед/мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.),

при 37°C и 5% CO₂ в условиях повышенной влажности. Питательную среду обновляли каждые 2 дня. При культивировании использовали раствор Версена (PBS и 0.02% EDTA).

Проточная цитофлуориметрия

Клетки SKBR3, EMT-HER2 и HeLa снимали раствором Версена, осаждали при 125 g в течение 5 мин, удаляли супернатант и добавляли к клеткам PBS, содержащий 10% FBS, до концентрации 5 × 10³ клеток/мкл. Затем к 3 мкл клеточной суспензии добавляли 100 мкл раствора красителя **BDP-C7** в заданной концентрации в PBS, содержащем 1% ДМСО. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение заданного времени, осаждали при 500 g в течение 30 с и удаляли супернатант. Далее к клеткам либо добавляли 100 мкл PBS и проводили цитометрический анализ, либо добавляли раствор PBS, содержащий 1 мкМ белка DAPI-mCherry, инкубировали в течение 5 мин и после осаждения, удаления раствора белка и добавления 100 мкл PBS проводили цитометрический анализ. Использовали проточный цитофлуориметр Novocytte 3000 VYB (ACEA Biosciences, США). Зеленый канал детекции (FITC): возбуждение лазером 488 нм, детекция эмиссии через светофильтр 530/30 нм; красный канал детекции (PE-Texas Red): возбуждение лазером 561 нм, детекция эмиссии через светофильтр 615/20 нм. Перед анализом уровня флуоресценции клеток сначала проводили отбор событий, соответствующих живым клеткам (гейтинг в каналах A-FSC / A-SSC), а затем отбирали события, соответствующие неагрегированным клеткам (гейтинг в каналах A-FSC / H-FSC) [9].

Изучение жизнеспособности клеток

Клетки HeLa, культивируемые в полной питательной среде DMEM, высевали в 96-луночный планшет (10⁴ клеток) и растили в течение ночи. Перед тестированием удаляли культуральную среду и вносили 100 мкл свежей, содержащей BDP-C7 в заданной концентрации и 1% ДМСО. Вещество **BDP-C7** было протестировано в диапазоне концентраций от 33 нМ до 20 мкМ в трех повторах. Растворы образцов готовили при помощи последовательного разбавления концентрированного образца в 2.5 раза. К контрольным клеткам добавляли культуральную среду, содержащую 1% ДМСО. Затем проводили инкубацию в течение ночи, отбирали жидкость и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора метилтиазолилдифенилтетразолия бромид (МТТ) концентрацией 5 мг/мл в бессывороточной культуральной среде и далее инкубировали клетки при 37°C в течение 3 ч. Затем супернатант удаляли и добавляли

100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Измеряли оптическую плотность при помощи планшетного ридера Infinite M1000 Pro (Tecan, Австрия) при 570 и 640 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для демонстрации применимости предлагаемого подхода в качестве красителя выбрали производное 1,3,5,7-тетраметил-BODIPY, содержащего гептильный заместитель в 8-положении (**BDP-C7**, *рис. 1А*). Производные BODIPY характеризуются высокой яркостью и фотостабильностью, обладают узкими полосами возбуждения и эмиссии флуоресценции, что позволяет им минимально «интерферировать» с другими красителями [10–14]. Описаны примеры использования BODIPY, в том числе и в цитометрических задачах [15–17]. Метильные группы в **BDP-C7** защищают хромофор от взаимодействий с внешней средой, а гептильный заместитель повышает гидрофобность красителя и способствует необратимому связыванию красителя с клеточными мембранными структурами. **BDP-C7** синтезировали, начиная с октаноилхлорида, по протоколу, оработанному нами ранее на гомологичных соединениях [3, 18, 19] (*рис. 1А*).

При растворении в ДМСО краситель демонстрировал узкие полосы возбуждения и эмиссии флуоресценции, максимумы поглощения света и эмиссии флуоресценции равнялись 497 и 507 нм соответственно (*рис. 1Б*). Коэффициент экстинкции равнялся $87300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, а квантовый выход флуоресценции – 99%. Таким образом, **BDP-C7** является ярким флуоресцентным красителем и идеально подходит для детекции в «зеленом» канале большинства флуориметрических приборов с возбуждением лазером 488 нм и детекцией в диапазоне 495–525 нм.

Для тестирования окрашивания эукариотических клеток красителем **BDP-C7** использовали клеточную культуру HeLa, широко применяемую в рутинных клеточных экспериментах. Сначала клетки окрашивали при различной концентрации **BDP-C7** в течение небольшого периода времени. Клетки инкубировали в течение 2 мин в PBS, содержащем **BDP-C7** в заданной концентрации и 1% ДМСО. После инкубации несвязавшийся краситель отмывали, клетки анализировали на проточном цитофлуориметре (*рис. 2А,Б*). Из *рис. 2А* видно, что концентрации 1 нМ достаточно, чтобы хорошо отличить обработанные клетки от контрольных необработанных. При 1 мкМ красителя, вероятно, происходит практически максимальное насыщение клетки красителем, обработка большими концентрациями приводит только к незначительному росту уровня флуоресценции. Видно, что образцы, обработанные 1, 10, 100 нМ и 10 мкМ, красителя **BDP-C7** хорошо отличаются друг от друга и от контроля. Таким образом, за счет окрашивания клеток HeLa красителем **BDP-C7** удалось получить пять популяций, хорошо различимых в одном канале детекции. Видно, что число таких популяций можно довести как минимум до шести за счет области в районе 10 нМ.

Обработка образцов клеток красителем **BDP-C7** в одинаковой концентрации, но в течение разного времени (*рис. 2В,Г*) также позволила получить клетки с разным уровнем зеленой флуоресценции, однако этот эффект был не таким значительным. Из *рис. 2В* видно, что увеличение времени инкубации от 1 до 10 мин приводит к увеличению уровня флуоресценции клеток менее чем на порядок, при этом при инкубации в течение 10 мин наблюдается уширение пика за счет плеча в области низких интенсивностей, а с увеличением времени ин-

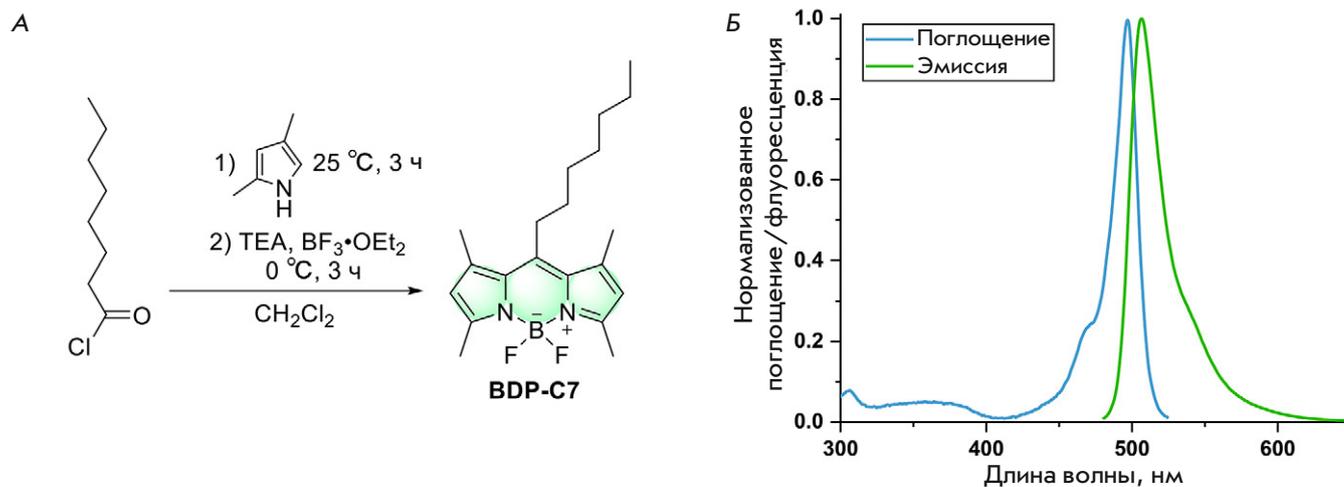


Рис. 1. Синтез красителя **BDP-C7** (А) и его спектры поглощения и эмиссии флуоресценции в ДМСО (Б)

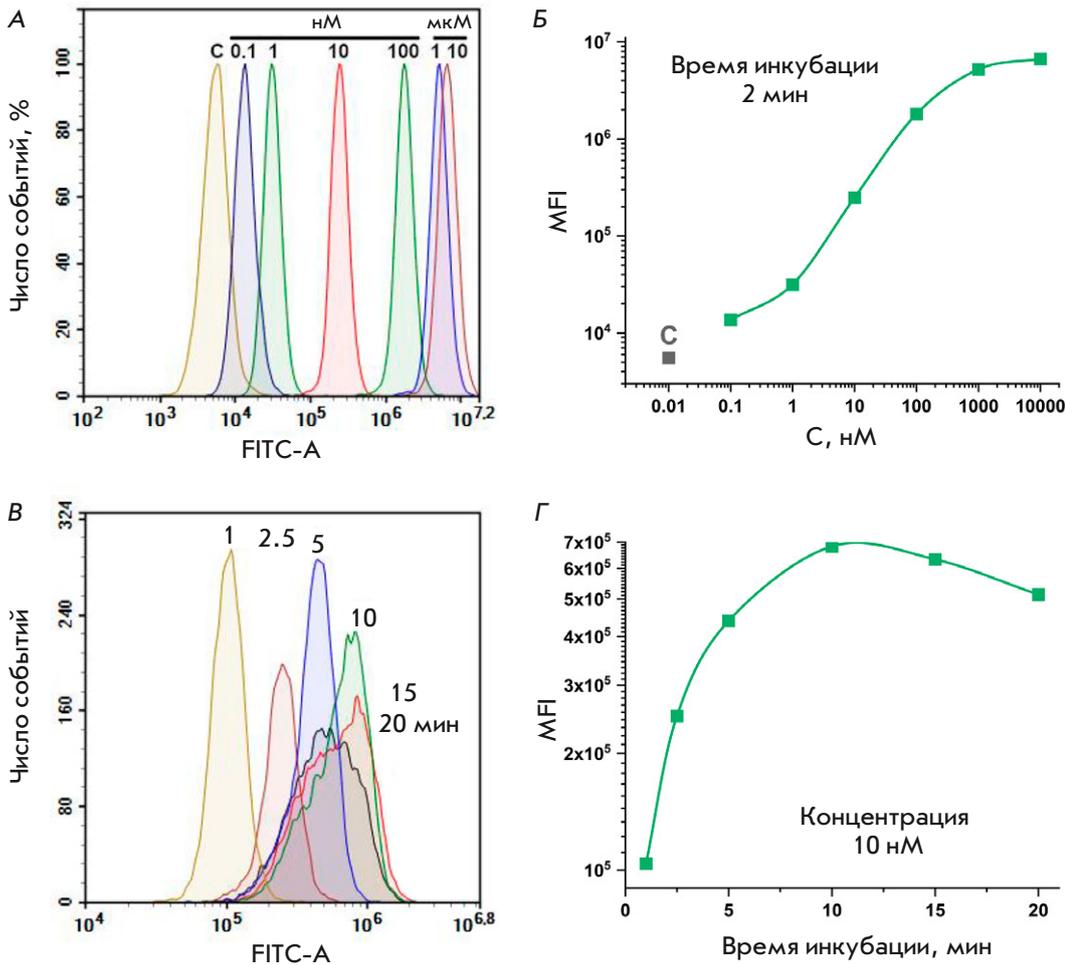


Рис. 2. Цитометрический анализ клеток HeLa, обработанных красителем **BDP-C7** в течение 2 мин при концентрации от 0.1 нМ до 10 мкМ (А, Б) и при 10 нМ в течение 1–20 мин (В, Г). С – контрольные клетки, без обработки красителем. Приведены гистограммы интенсивностей в зеленом канале флуоресценции с возбуждением при 488 нм и эмиссией 530/30 нм (А, В) и медианные значения флуоресценции (МФИ) клеточных популяций (Б, Г)

кубации до 15 и 20 мин, помимо уширения пиков, происходит уменьшение медианной флуоресценции клеток. Вероятнее всего, это связано с изменением морфологии клеток за 10–20 мин инкубации в неоптимальных условиях (1% ДМСО в PBS). При других концентрациях **BDP-C7** эффект был аналогичным (данные не показаны). Таким образом, инкубация клеток с красителем более 5 мин лишена практического смысла из-за изменений, происходящих в клетках в неблагоприятных условиях, и возникающего из-за этого уширения пиков, тем более что обработка красителем при разных концентрациях в течение короткого времени позволяет добиться на несколько порядков большей разницы флуоресцентного сигнала клеток (рис. 2А,Б).

Далее мы проверили, происходит ли отмывка красителя и изменение флуоресцентного сигнала после связывания **BDP-C7** с клетками. Для этого после отмывки несвязавшегося красителя клетки инкубировали в PBS в течение различных промежутков времени, а затем анализировали на проточном цитофлуориметре (рис. 3А). Во всех

протестированных образцах уровень флуоресцентного сигнала практически не менялся со временем (рис. 3). Мы не тестировали время более 30 мин, так как обычно такого периода времени достаточно для проведения манипуляций, необходимых для цитофлуориметрического анализа.

Также мы проверили, может ли краситель проявлять цитотоксичность в использованных концентрациях. Цитотоксичность проверяли с использованием стандартного МТТ-теста при концентрациях красителя вплоть до 20 мкМ (рис. 4). **BDP-C7** не проявлял токсичности во всем протестированном диапазоне концентраций.

Применимость подхода маркировки клеточных культур с помощью окрашивания зеленым флуоресцентным красителем **BDP-C7** в разных концентрациях мы проверяли на культурах клеток HeLa, SKBR3 и EMT-HER2. Эти клетки отличаются друг от друга уровнем экспрессии поверхностного онкомаркера – рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2, HER2). Считается, что клетки HeLa со-

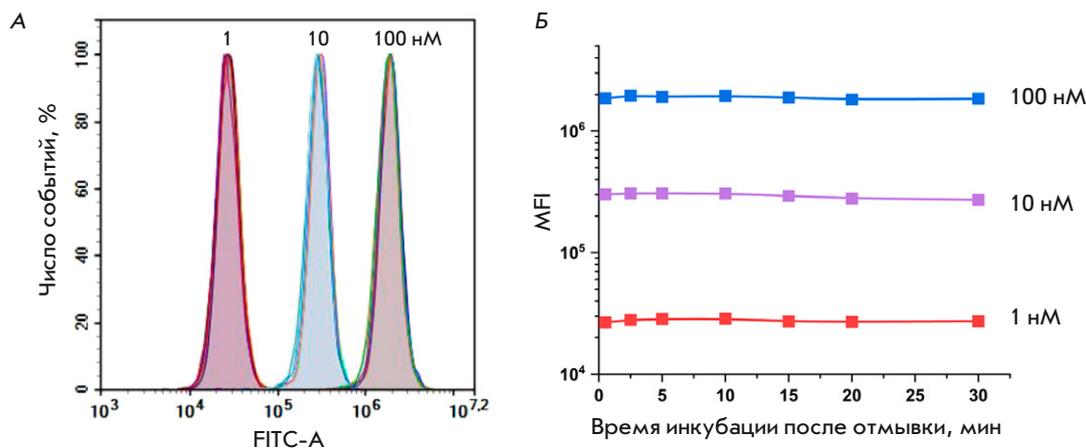


Рис. 3. Анализ отмычки красителя **BDP-C7** от клеток. Цитометрический анализ клеток HeLa, обработанных красителем в концентрации 1, 10 и 100 нМ в течение 2 мин. Клетки после отмыжки от несвязавшегося красителя и инкубации в буфере PBS в течение заданного времени. Приведены гистограммы интенсивностей в зеленом канале флуоресценции (А) и медианные значения флуоресценции (MFI) клеточной популяции (Б) при разном времени инкубации после отмычки

держат небольшое (нормальное) количество HER2 на поверхности [8], тогда как в SKBR3 [6] и искусственно полученных EMT-HER2 рецептор гиперэкспрессирован [7]. Представленность рецептора на поверхности клеток можно проверять с использованием флуоресцентно меченных антител к HER2 [20, 21], а также лигандов на основе искусственных белков с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Proteins, DARPins). Мы использовали гибридный белок DARPIn9_29-mCherry [22], где DARPIn9_29 – это адресный белок, эффективно связывающийся с HER2, а mCherry – красный флуоресцентный белок, обеспечивающий флуоресценцию конструкции в красной области видимого спектра.

Сначала мы по отдельности покрасили клеточные культуры красителем **BDP-C7** и DARPIn9_29-mCherry, чтобы оценить уровень представленности HER2 на различных культурах. Чтобы отличить клеточные культуры друг от друга в зеленом канале, клетки SKBR3, HeLa и EMT-HER2 обрабатывали 2 мин раствором PBS, содержащим 1% ДМСО и **BDP-C7** в концентрации 1, 10 и 100 нМ соответственно (рис. 5). Из наложения гистограмм флуоресценции клеток в зеленом канале видно, что после окрашивания **BDP-C7** культуры довольно хорошо отличаются друг от друга по уровню флуоресцентного сигнала (рис. 5B). После окрашивания клеток белком DARPIn9_29-mCherry в красном канале по онкомаркеру HER2 (рис. 5B) культура HeLa хорошо отличалась от EMT-HER2, тогда как используемые нами клетки SKBR3 имели промежуточное значение флуоресценции.

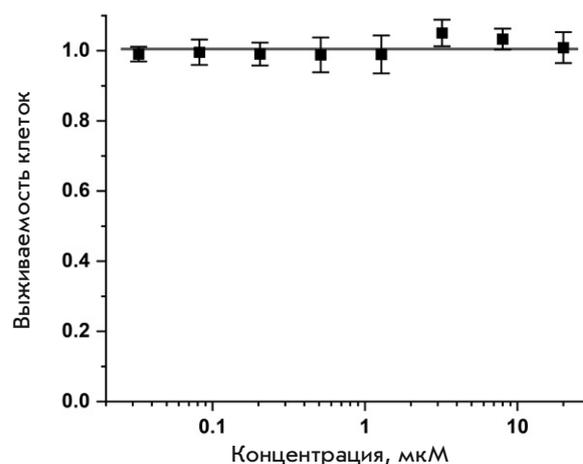


Рис. 4. Цитотоксичность красителя **BDP-C7** согласно МТТ-тесту на клетках HeLa

Чтобы сравнить представленность онкомаркера HER2 на анализируемых культурах в идентичных условиях, мы смешали клетки SKBR3, HeLa и EMT-HER2 в одной пробирке и потом обработали белком DARPIn9_29-mCherry (рис. 6). Видно, что если клетки предварительно не маркировать с помощью **BDP-C7**, то после окрашивания культура HeLa, содержащая небольшое количество HER2 на поверхности, частично отделяется от клеток, которые сверхэкспрессируют рецептор, однако отличить SKBR3 и EMT-HER2 друг от друга невозможно (рис. 6A,Б).

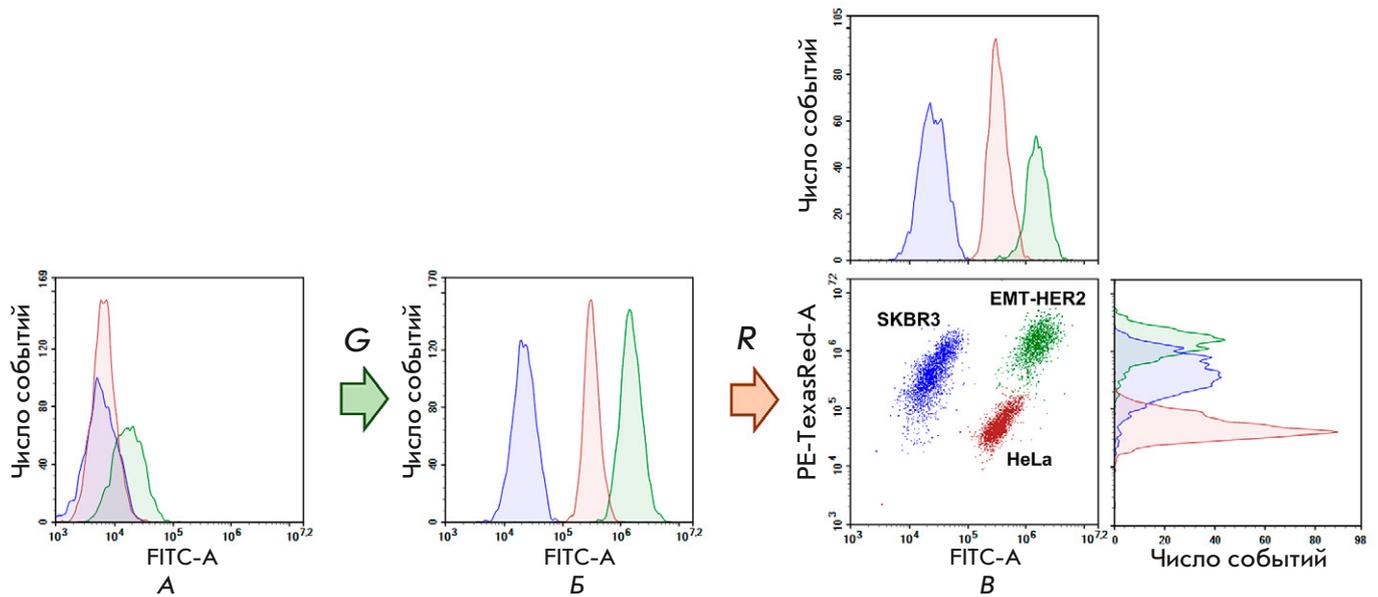


Рис. 5. Цитометрический анализ клеток SKBR3, HeLa и EMT-HER2: без обработки (А), обработанных по отдельности сначала зеленым красителем **BDP-C7** в концентрации 1, 10 и 100 нМ соответственно (Б), затем красным лигандом к онкомаркеру HER2 (DARPin9_29-mCherry, В). Приведено наложение результатов, полученных для каждой клеточной линии в параллельных экспериментах. Данные для HeLa показаны бордовым цветом, для SKBR3 – синим, для EMT-HER2 – зеленым

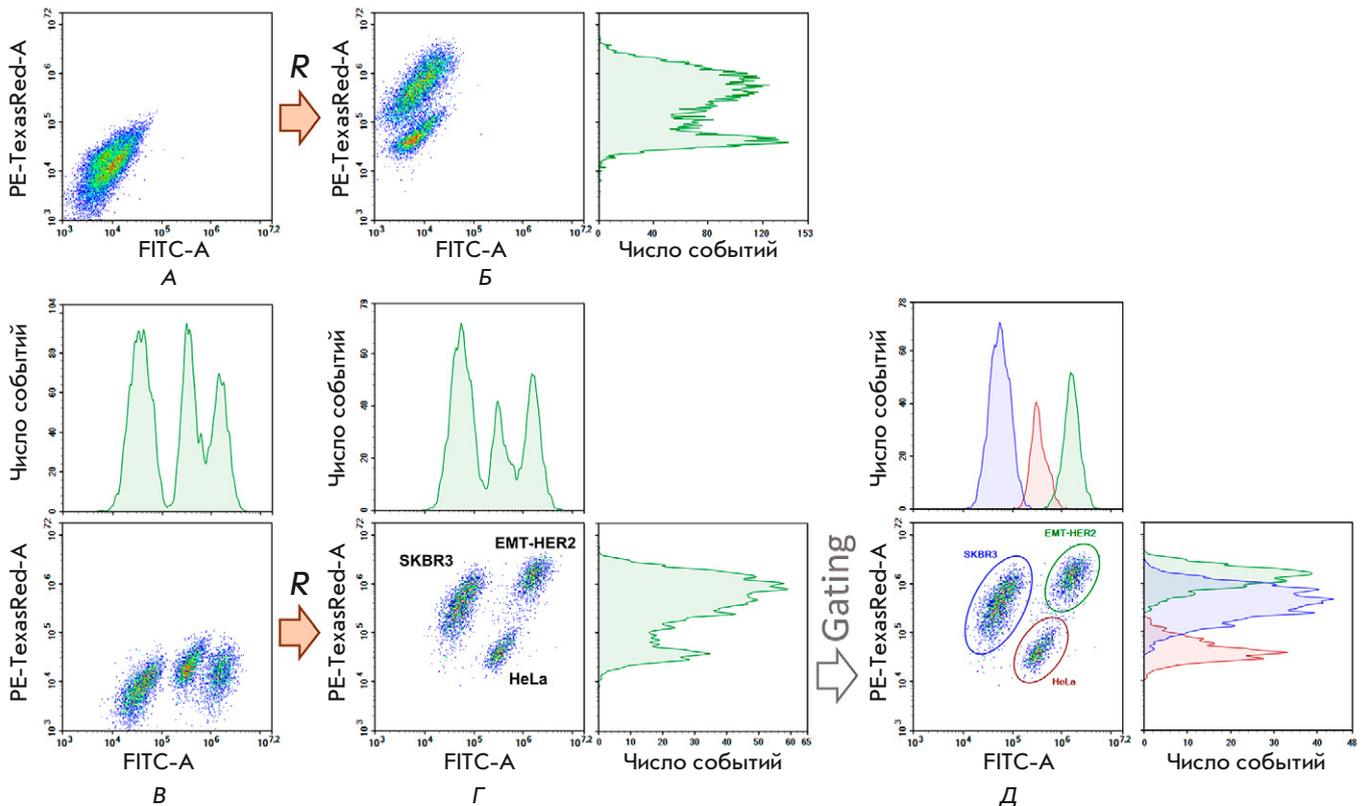


Рис. 6. Цитометрический анализ клеток HeLa, SKBR3 и EMT-HER2, смешанных вместе до окрашивания (А) и обработанных затем красным лигандом к онкомаркеру HER2 (DARPin9_29-mCherry, Б). Клетки (В) были предварительно покрашены зеленым красителем **BDP-C7** в различных концентрациях, отмыты и смешаны в одной пробирке, а затем обработаны DARPin9_29-mCherry (Г). Д – выделение отдельных популяций клеток и анализ их флуоресценции в зеленом (FITC) и красном (PE-Texas Red) каналах

Таблица 1. Сравнение результатов цитометрического анализа представленности HER2 на опухолевых клетках EMT-HER2, SKBR3 и HeLa, полученных в трех независимых экспериментах, а также в эксперименте с культурами клеток, предварительно маркированных красителем **BDP-C7** и смешанных в одной пробирке

Клеточная культура	Параллельные эксперименты		В одной пробирке	
	MFI*	HPCV**	MFI*	HPCV**
EMT-HER2	1 410 051	61.08%	1 380 511	61.64%
SKBR3	411 140	86.96%	410 552	100.83%
HeLa	46 678	123.57%	39 616	38.15%

*MFI – медианное значение флуоресценции в красном канале (PE-Texas Red).

**HPCV – коэффициент вариации полуширины пика (half-peak coefficient of variation).

$HPCV = FWHM / (2.36 \times X) \times 100\%$, где FWHM полуширина пика, X среднее значение набора данных.

Если же клетки перед смешиванием маркировать **BDP-C7** (рис. 6B), то после окрашивания белком DARPIn9_29-mCherry на точечной диаграмме, показывающей уровень флуоресценции клеток в зеленом и красном каналах, наблюдаются три четко различимых популяции клеток (рис. 6Г). Проведя гейтинг по этим популяциям клеток, можно по уровню флуоресцентного сигнала в зеленом канале определить их принадлежность к той или иной культуре (рис. 6Д), так как каждая культура была помечена зеленым флуоресцентным красителем в разной концентрации. В красном канале можно определить уровень флуоресценции каждой популяции по анализируемому онкомаркеру HER2.

Мы сопоставили результаты анализа представленности HER2 в тестируемых культурах согласно данным, полученным в трех экспериментах на каждой культуре клеток по отдельности, и данным, полученным в одной пробирке после маркировки клеток **BDP-C7** (табл. 1), и обнаружили практически полное совпадение результатов. Согласно полученным данным, в используемой нами линии SKBR3 онкомаркера HER2 на порядок больше, чем в HeLa, а в клетках EMT-HER2 представленность HER2 еще в 3.5 раза выше.

Разработанный подход позволяет смешивать в одной пробе несколько популяций клеток и ана-

лизировать их в одной пробирке в полностью идентичных условиях. Это позволяет минимизировать возможные артефакты, связанные с разбросом концентраций действующих на клетку веществ, вызванным ошибками пипетирования при пробоподготовке или неаккуратностью экспериментатора. Кроме того, настоящий подход позволяет экономить лиганды к анализируемым клеточным рецепторам, так как анализ происходит в одной пробирке, а не в своей для каждой культуры клеток. Это может быть актуальным, если лиганд коммерчески недоступен или качество лиганда различается в разных партиях. Наш подход позволяет экономить время, так как за один прогон можно проанализировать сразу несколько образцов. Стоит, однако, иметь в виду, что сначала надо потратить время на флуоресцентное маркирование культур клеток красителем при различных концентрациях и нужно подбирать концентрации так, чтобы клетки хорошо разделялись в канале флуоресценции красителя. Кроме того, использование лишнего красителя «отнимает» один канал детекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработан подход, позволяющий проводить цитометрический анализ различных клеточных культур в одной пробирке, т.е. в полностью идентичных условиях. При этом можно анализировать клетки, которые изначально не различаются по каким-то «маркерным» рецепторам. С помощью красителя **BDP-C7** клетки можно маркировать в зеленом канале и задавать уровень флуоресцентного сигнала, желаемый в каждом отдельном эксперименте.

Вместо используемого в этой работе **BDP-C7** теоретически можно использовать другие флуоресцентные красители, однако надо иметь в виду, что краситель должен быть химически стабильным и достаточно ярким, чтобы обеспечить хороший контраст; высокогидрофобным, чтобы хорошо связываться с клетками неспецифично, и нетоксичным в используемых концентрациях. **BDP-C7** прекрасно удовлетворяет всем этим требованиям, тогда как красители, содержащие двойные связи и протяженные ароматические системы, могут легко окисляться в клетках и претерпевать за счет этого спектральные превращения. Многие полярные красители могут недостаточно хорошо накапливаться в мембранных структурах клетки и элиминироваться из клетки со временем. ●

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1049.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manohar S.M., Shah P., Nair A. // *Bioanalysis*. 2021. V. 13. № 3. P. 181–198.
2. McKinnon K.M. // *Curr. Protoc. Immunol.* 2018. V. 120. № 1. P. 5.1.1–5.1.11.
3. Pakhomov A.A., Mironiuk V.B., Kononevich Y.N., Korlyukov A.A., Volodin A.D., Pryakhina T.A., Martynov V.I., Muzafarov A.M. // *Mendelev Comm.* 2017. V. 27. № 4. P. 363–365.
4. Pakhomov A.A., Kim E.E., Kononevich Y.N., Ionov D.S., Maksimova M.A., Khalchenia V.B., Maksimov E.G., Anisimov A.A., Shchegolikhina O.I., Martynov V.I., et al. // *Dyes Pigments*. 2022. V. 203. P. 110371.
5. Semenov A.N., Gvozdev D.A., Zlenko D.V., Protasova E.A., Khashimova A.R., Parshina E.Yu., Baizhumanov A.A., Lotosh N.Yu., Kim E.E., Kononevich Y.N., et al. // *Membranes*. 2022. V. 12. № 10. P. 905.
6. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // *Structure*. 2013. V. 21. № 11. P. 1979–1991.
7. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 3. P. 833.
8. Tang Q., Onitsuka M., Tabata A., Tomoyasu T., Nagamune H. // *Anticancer Res*. 2018. V. 38. № 7. P. 4319–4325.
9. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., et al. // *ACS Nano*. 2020. V. 14. № 10. P. 12781–12795.
10. Loudet A., Burgess K. // *Chem. Rev.* 2007. V. 107. № 11. P. 4891–4932.
11. Marfin Y.S., Solomonov A.V., Timin A.S., Rummyantsev E.V. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. № 25. P. 2745–2772.
12. Martynov V.I., Pakhomov A.A. // *Russ. Chem. Rev.* 2021. V. 90. № 10. P. 1213–1262.
13. Pakhomov A.A., Efremova A.V., Kononevich Y.N., Ionov D.S., Maksimova M.A., Volodin A.D., Korlyukov A.A., Dubinets N.O., Martynov V.I., Ivanov A.A., et al. // *ChemPhotoChem*. 2023. V. 7. № 5. P. e202200324.
14. Pakhomov A.A., Efremova A.V., Maksimova M.A., Kononevich Y.N., Ionov D.S., Dubinets N.O., Martynov V.I., Muzafarov A.M., Alfimov M.V. // *High Energy Chem*. 2023. V. 57. № 3. P. 192–199.
15. Qiu B., Simon M. // *Bio-Protoc.* 2016. V. 6. № 17. P. e1912.
16. Pakhomov A.A., Deyev I.E., Ratnikova N.M., Chumakov S.P., Mironiuk V.B., Kononevich Y.N., Muzafarov A.M., Martynov V.I. // *BioTechniques*. 2017. V. 63. № 2. P. 77–80.
17. Zhu J., Tan N.K., Kikuchi K., Kaur A., New E.J. // *Anal. Sens.* 2023. P. e202300049. doi.org/10.1002/anse.202300049.
18. Pakhomov A.A., Kononevich Y.N., Stukalova M.V., Svidchenko E.A., Surin N.M., Cherkaev G.V., Shchegolikhina O.I., Martynov V.I., Muzafarov A.M. // *Tetrahedron Lett.* 2016. V. 57. № 9. P. 979–982.
19. Pakhomov A.A., Kononevich Y.N., Korlyukov A.A., Martynov V.I., Muzafarov A.M. // *Mendelev Commun.* 2016. V. 26. № 3. P. 196–198.
20. Kuo W.-Y., Lin J.-J., Hsu H.-J., Chen H.-S., Yang A.-S., Wu C.-Y. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 13735.
21. Swain S.M., Shastry M., Hamilton E. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2023. V. 22. № 2. P. 101–126.
22. Mironova K.E., Chernykh O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Proshkina G.M., Deyev S.M. // *Biochem. Mosc.* 2014. V. 79. № 12. P. 1391–1396.