Научная статья
УДК 53.082.9, 577.113.083, 621.382.3
https://doi.org/10.32446/0368-1025it.2025-5-77-87

Ранняя диагностика почечно-клеточного рака: использование нанопроволочного биосенсора для обнаружения малой ядрышковой рибонуклеиновой кислоты SNORA77 в крови пациента

Юрий Дмитриевич Иванов[1], Кристина Витальевна Голдаева[2], Екатерина Дмитриевна Неведрова[3], Ангелина Владимировна Виноградова[4], Александр Наримановч Аблеев[5], Иван Дмитриевич Шумов[6]✉, Андрей Федорович Козлов[7], Светлана Ивановна Капустина[8], Олег Николаевич Афонин[9], Владимир Павлович Попов[10], Александр Викторович Глухов[11], Николай Евгеньевич Кушлинский[12], Иван Сократович Стилиди[13], Всеволод Борисович Матвеев[14], Дмитрий Викторович Еникеев[15], Наталья Валерьевна Бурундаева[16], Владимир Александрович Конев[17], Олег Борисович Ковалев[18], Вадим Юрьевич Татур[19], Вадим Серафимович Зиборов[20], Леонид Игоревич Гришин[21], Александр Юрьевич Долгобородов[22], Олег Федорович Петров[23], Сергей Васильевич Новиков[24], Евгений Семенович Юшков[25], Александр Иванович Арчаков[26]

[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 20, 26] Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия
[1, 20, 21, 22, 23] Объединённый институт высоких температур Российской академии наук, Москва, Россия
[10] Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[11] Новосибирский завод полупроводниковых приборов Восток, Новосибирск, Россия
[12, 13, 14] Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
[15, 16] Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия
[17, 18] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации Москва, Россия
[19] Фонд перспективных технологий и новаций, Москва, Россия
[24] Рекламно-издательский центр «Техносфера», Москва, Россия
[25] Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия
[1]yurii.ivanov.nata@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5041-1914
[2]goldaeva_1996@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-4082-1247
[3]nevedrova.kat@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-2767-2299
[4]angel.tomlinson@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0001-6044-3490
[5]ableev@mail.ru, https://orcid.org/0009-0004-3096-107X
[6]shum230988@yandex.ru✉, https://orcid.org/0000-0002-9795-7065
[7]afkozlow@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2117-8743
[8]sveta.kapustina7.05@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-5119-9449
[9]sunweb@mail.ru, https://orcid.org/0009-0008-7947-3674
[10] popov@isp.nsc.ru, https://orcid.org/0000-0002-7415-1405
[11] gluhov@nzpp.ru, https://orcid.org/0009-0008-3528-7060
[12]kne3108@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-3898-4127
[13]biochimia@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1490-8418
[14]vsevolodmatveev@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7748-9527
[15]dvenikeev@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-7169-2209
[16]natalis8282@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9947-9725
[17] https://orcid.org/0000-0002-1566-1771
[18]doctor87@list.ru, https://orcid.org/0000-0003-0273-6700
[19]v_tatur@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6415-5189
[20]ziborov.vs@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7942-3337
[21]lenya-grishin@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-3549-3736
[22]aldol@ihed.ras.ru, https://orcid.org/0000-0001-7054-7341
[23]ofpetrov@ihed.ras.ru, https://orcid.org/0000-0002-6373-0305
[24]svnovikov59@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0943-9488
[25] esyushkov@mephi.ru, https://orcid.org/0009-0002-9161-0877
[26]alexander.archakov@ibmc.msk.ru, https://orcid.org/0000-0002-2290-8090

Аннотация. Почечно-клеточный рак – наиболее распространённая форма рака почки (более 90 % всех онкологических патологий почки). На ранней стадии развития почечно-клеточный рак может протекать бессимптомно, что существенно

затрудняет диагностику. Существующие методы диагностики почечно-клеточного рака не позволяют своевременно выявлять это заболевание на ранних стадиях, поэтому необходимо разработать эффективные и неинвазивные методы диагностики по обнаруживаемым в крови биологическим макромолекулам – биомаркерам рака данного типа. В качестве таких биологических макромолекул предложено использовать малые ядрышковые рибонуклеиновые кислоты. В настоящем исследовании спроектирован и изготовлен SiNW-биосенсор для прямого обнаружения в крови малой ядрышковой рибонуклеиновой кислоты SNORA77, ассоциированной с почечно-клеточным раком. Ключевым элементом разработанного SiNW-биосенсора является нанопроволочный чип на основе структур «кремний-на-изоляторе». Чип изготовлен по технологии, аналогичной Smart Cut, и содержит массив из кремниевых нанопроволок с проводимостью *n*-типа, на поверхность которых ковалентно иммобилизованы олигодезоксирибонуклеотидные зонды. Для обеспечения специфичности проводимого анализа нуклеотидная последовательность иммобилизованных олигодезоксирибонуклеотидных зондов комплементарна целевой детектируемой последовательности малой ядрышковой рибонуклеиновой кислоты SNORA77. Проанализированы очищенные буферные растворы с различными концентрациями синтетических олигодезоксирибонуклеотидных зондов, последовательность которых аналогична целевой детектируемой последовательности SNORA77. С помощью разработанного SiNW-биосенсора определён предел обнаружения SNORA77, составивший порядка 10^{-17} М. В образце, выделенном из плазмы крови пациента с подтверждённым диагнозом «почечно-клеточный рак», SiNW-биосенсор позволил выявить повышенный уровень SNORA77 по сравнению с контрольным образцом, выделенным из плазмы крови пациента с заболеванием неонкологической природы. Результаты исследования будут полезны для дальнейшей разработки систем ранней диагностики почечно-клеточного рака.

Ключевые слова: биосенсор, кремниевая нанопроволока, малые ядрышковые рибонуклеиновые кислоты, биомаркер, почечно-клеточный рак

Для цитирования: Иванов Ю. Д., Голдаева К. В., Неведрова Е. Д. и др. Ранняя диагностика почечно-клеточного рака: использование нанопроволочного биосенсора для обнаружения малой ядрышковой рибонуклеиновой кислоты SNORA77 в крови пациента. *Измерительная техника*, **74**(5), 77–87 (2025). https://doi.org/10.32446/0368-1025it.2025-5-77-87

Original article

Early diagnosis of renal cell carcinoma: use of a nanowire biosensor for detection of small nucleolar ribonucleic acid SNORA77 in patient's blood

Yuri D. Ivanov[1], Kristina V. Goldaeva[2], Ekaterina D. Nevedrova[3], Angelina V. Vinogradova[4], Alexander N. Ableev[5], Ivan D. Shumov[6]✉, Andrey F. Kozlov[7], Svetlana I. Kapustina[8], Oleg N. Afonin[9], Vladimir P. Popov[10], Alexander V. Glukhov[11], Nikolay E. Kushlinskii[12], Ivan S. Stilidi[13], Vsevolod B. Matveev[14], Dmitry V. Enikeev[15], Natalia V. Burundaeva[16], Vladimir A. Konev[17], Oleg B. Kovalev[18], Vadim Yu. Tatur[19], Vadim S. Ziborov[20], Leonid I. Grishin[21], Alexander Yu. Dolgoborodov[22], Oleg F. Petrov[23], Sergey V. Novikov[24], Evgeniy S. Yushkov[25], Alexander I. Archakov[26]

[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 20, 26] Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
[1, 20, 21, 22, 23] Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[10]Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[11] Novosibirsk Plant of Semiconductor Devices Vostok, Novosibirsk
[12, 13, 14] N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia
[15, 16] Sechenov University, Moscow, Russia
[17, 18] Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
[19] Foundation of Perspective Technologies and Novations, Moscow, Russia
[24] Associate Printing-and-Publication Centre Technosphera, Moscow, Russia
[25] National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia
[1]yurii.ivanov.nata@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5041-1914
[2]goldaeva_1996@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-4082-1247
[3]nevedrova.kat@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-2767-2299
[4]angel.tomlinson@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0001-6044-3490
[5]ableev@mail.ru, https://orcid.org/0009-0004-3096-107X
[6]shum230988@yandex.ru✉, https://orcid.org/0000-0002-9795-7065
[7]afkozlow@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2117-8743
[8]sveta.kapustina7.05@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-5119-9449
[9]sunweb@mail.ru, https://orcid.org/0009-0008-7947-3674
[10] popov@isp.nsc.ru, https://orcid.org/0000-0002-7415-1405
[11] gluhov@nzpp.ru, https://orcid.org/0009-0008-3528-7060
[12]kne3108@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-3898-4127
[13]biochimia@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1490-8418
[14]vsevolodmatveev@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7748-9527
[15]dvenikeev@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-7169-2209

[16]natalis8282@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9947-9725
[17] https://orcid.org/0000-0002-1566-1771
[18]doctor87@list.ru, https://orcid.org/0000-0003-0273-6700
[19]v_tatur@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6415-5189
[20]ziborov.vs@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7942-3337
[21]lenya-grishin@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-3549-3736
[22]aldol@ihed.ras.ru, https://orcid.org/0000-0001-7054-7341
[23]ofpetrov@ihed.ras.ru, https://orcid.org/0000-0002-6373-0305
[24]svnovikov59@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0943-9488
[25] esyushkov@mephi.ru, https://orcid.org/0009-0002-9161-0877
[26]alexander.archakov@ibmc.msk.ru, https://orcid.org/0000-0002-2290-8090

Abstract. Renal cell carcinoma is the most common form of kidney cancer (more than 90 % of all oncological pathologies of the kidney). At an early stage of development, renal cell carcinoma can be asymptomatic, and this significantly complicates its diagnosis. Commonly used methods for diagnosing renal cell carcinoma do not allow for timely detection of this disease at early stages, thus it is necessary to develop effective and non-invasive methods for its diagnosis using biological macromolecules detectable in blood – biomarkers of this type of cancer. Small nucleolar RNAs are of great interest as such biological macromolecules. In this study, a SiNW biosensor was designed and manufactured for the direct detection of small nucleolar RNA SNORA77 in the blood, associated with renal cell carcinoma. The key element of the SiNW biosensor developed is a nanowire chip based on "silicon-on-insulator" structures. The chip is manufactured using a technology similar to Smart Cut, and contains an array of silicon nanowires with n-type conductivity, on whose surface DNA oligonucleotide probes are covalently immobilized. To ensure the specificity of the analysis, the nucleotide sequence of the immobilized DNA probes is complementary to the target sequence of the small nucleolar RNA SNORA77. Purified buffer solutions containing various concentrations of synthetic DNA oligonucleotides, whose sequence is similar to the target detectable sequence of SNORA77, have been analyzed. Using the SiNW biosensor developed, the detection limit of SNORA77 was determined to be approximately 10^{-17} M. The SiNW biosensor has allowed us to detect an elevated level of SNORA77 in a sample isolated from the blood plasma of a patient with confirmed diagnosis of renal cell carcinoma in comparison with that in a control sample isolated from the plasma of a patient with a non-oncologic disease. The results of the study will be useful for further development of early diagnostic systems for renal cell carcinoma.

Keywords: biosensor, silicon nanowire, small nucleolar ribonucleic acid, biomarker, renal cell carcinoma

For citation: Ivanov Yu. D., Goldaeva K. V., Nevedrova E. D. et al. Early diagnosis of renal cell carcinoma: use of a nanowire biosensor for detection of small nucleolar ribonucleic acid SNORA77 in patient's blood. *Izmeritel'naya Tekhnika*, **74**(5), 77–87 (2024). https://doi.org/10.32446/0368-1025it.2025-5-77-87

Введение. Почечно-клеточный рак (ПКР) возникает в почечном эпителии и является наиболее распространённой формой рака почки – более 90 % всех злокачественных новообразований почки [1, 2]. Соотношение заболеваемости ПКР среди мужчин и женщин составляет 1,5:1, при этом ПКР чаще встречается среди старшей возрастной группы, а пик заболеваемости приходится на возраст 60–70 лет [3, 4]. Наиболее распространённым гистологическим типом является светлоклеточный ПКР, на который приходится 75–85 % всех случаев ПКР [5]. На ранней стадии развития ПКР может протекать бессимптомно, что существенно затрудняет диагностику данного заболевания [6]. Например, классическая триада симптомов ПКР – гематурия, боль и образования в животе – проявляется редко и менее чем у 10 % пациентов [7, 8]. Более того, большинство случаев ПКР выявляются случайно при обследовании органов брюшной полости методами визуализации – магнитно-резонансной и/или компьютерной томографии, или при ультразвуковой диагностике [9–11]. Так, в когортном исследовании [12] показано, что ПКР был выявлен случайно у 60 % пациентов. Таким образом, для своевременного выявления ПКР требуются простые, эффективные и неинвазивные методы диагностики, к которым можно отнести методы на основе обнаружения (детекции) биологических макромолекул — биомаркеров ПКР.

В настоящее время исследуется возможность использования малых ядрышковых рибонуклеиновых кислот (РНК) в качестве биомаркеров онкологических заболеваний малые ядрышковые рибонуклеиновые кислоты (РНК). Малые ядрышковые РНК являются короткими некодирующими неполиаденилированными РНК длиной 60–300 нуклеотидов. Эти РНК в основном локализованы в ядрышках и присутствуют в эукариотических организмах [13, 14]. Малые ядрышковые РНК участвуют в процессинге рибосомной РНК путём 2′-О-метилирования и псевдоуридилирования молекул рибосомной РНК, соответственно [14]. В последние годы появляется всё больше данных, свидетельствующих о том, что дисрегуляция малых ядрышковых РНК связана с онкогенезом, влияя на пролиферацию, инвазию и миграцию опухолевых клеток [14]. Например, малая ядрышковая РНК SNORD104 при раке эндометрия ингибирует апоптоз и способствует росту опухоли [15]. Высокий уровень экспрессии малой ядрышковой РНК SNORA77 коррелирует с плохой выживаемостью пациентов с ПКР [16]. А в связи с тем, что малые ядрышковые РНК экспрессируются в стабильном состоянии

в крови и других жидкостях организма [13, 17], эти РНК являются перспективными биомаркерами для диагностики и прогнозирования ПКР.

К распространённым методам обнаружения малых ядрышковых РНК относятся полимеразная цепная реакция и нозерн-блоттинг. К недостаткам применения полимеразной цепной реакции для выявления РНК-мишеней относятся требования к квалификации оператора и инфраструктуре лаборатории и вероятность получения ложноположительных результатов вследствие контаминации образца при ненадлежащей организации диагностического процесса [18, 19], а также длительность и сложность диагностической процедуры (использование дополнительных меток) [18]. Амплификация может привести к неоднозначной интерпретации результатов, так как случайная контаминация образца может повлечь за собой амплификацию молекул-контаминантов. Использование меток усложняет процедуру анализа и увеличивает его длительность. Нозерн-блоттинг – многоэтапная и достаточно время- и трудозатратная процедура. Данный анализ имеет низкую чувствительность, а также требует использования меченых зондов и относительно большого количества исходного материала [19, 20]. Нозерн-блоттинг также чувствителен к контаминации, вследствие которой может происходить деградация РНК [20]. Таким образом, требуются простой и эффективный высокочувствительный метод обнаружения малых ядрышковых РНК в лабораторной практике и устройство, реализующее данный метод.

В этой связи SiNW-биосенсоры привлекательны из-за их селективности, высокой чувствительности, возможностей обнаружения целевых молекул в реальном времени, а также отсутствия трудоёмких манипуляций [21]. Помимо этого, SiNW-биосенсоры, основанные на полевых транзисторах, позволяют напрямую преобразовывать взаимодействие с аналитами, происходящее на поверхности сенсора, в читаемый сигнал, что позволяет исключить использование меток [21]. Принцип работы SiNW-биосенсора *n*-типа заключается в уменьшении проводимости сенсорных элементов биосенсора, за счет адсорбции на их поверхности отрицательно заряженных биомолекул-мишеней [22]. К настоящему времени разработаны биосенсоры с кремниевыми нанопроволоками (SiNW-биосенсоры), предназначенные для обнаружения молекул белков [23, 24] и нуклеиновых кислот [25–27] (а именно, микроРНК [25] и кольцевых РНК [26, 27]), которые являются биомаркерами различных заболеваний, а также вирусных частиц [28, 29]. В современной специальной литературе авторы настоящей статьи не нашли работ, описывающих создание таких биосенсоров для детекции малых ядрышковых РНК – перспективных биомаркеров онкологических заболеваний. Таким образом, важным направлением развития измерительной и аналитической аппаратуры является разработка SiNW-биосенсоров для обнаружения малых ядрышковых РНК, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, в том числе и ПКР.

Цель настоящего исследования – разработка SiNW-биосенсора для обнаружения малой ядрышковой РНК SNORA77, проверка его применимости для выявления повышенного уровня этой РНК в крови пациента с диагнозом «опухоль левой почки» на ранней стадии в реальном времени без использования меток, а также определение нижнего концентрационного предела обнаружения целевой последовательности SNORA77 с помощью этого биосенсора. Разработанный SiNW-биосенсор должен выявлять повышенный уровень SNORA77 в образцах плазмы крови пациента с подтверждённым диагнозом ПКР по сравнению с контрольным образцом, полученным от пациента с заболеванием неонкологической природы (мочекаменной болезнью).

Материалы и методы исследования. В работе использовали очищенный изопропанол (99,9 %, Acros Organics, Geel, Бельгия), этанол-ректификат 96 %, плавиковую кислоту HF, гидроксид калия KOH ч.д.а. и толуол х.ч. (Реахим, Москва, Россия), 3,3′-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат) (ДТССП, Thermo Fischer Scientific, США), 3-аминопропилтриэтоксисилан и дигидрофосфат калия KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, США). Все исследуемые в экспериментах растворы готовили с использованием в качестве растворителя ультрачистой деионизованной воды с удельным электрическим сопротивлением 18,2 мОм·см, очищенной на установке Simplicity UV (Millipore, Франция).

В экспериментах по определению нижнего концентрационного предела обнаружения целевой последовательности SNORA77 применяли очищенные буферные растворы синтетического олигодезоксирибонуклеотида (синтетической оДНК). Нуклеотидная последовательность синтетической оДНК (TCCAGGGTGCTGTGG) аналогична участку целевой детектируемой последовательности SNORA77. На поверхности нанопроволок в экспериментах иммобилизовали олигодезоксирибонуклеотидный зонд (оДНК-зонд), нуклеотидная последовательность которого ((NH_2)-T_{10}-CCACAGCACCCTGGA) комплементарна как последовательности синтетической оДНК, так и последовательности SNORA77. Использованные оДНК-зонд и синтетическая оДНК синтезированы компанией Евроген (Москва, Россия). Нуклеотидная последовательность оДНК-зонда модифицирована аминолинкером ((NH_2)-T_{10} для обеспечения его ковалентной иммобилизации на поверхность нанопроволок с помощью кросслинкера ДТССП.

Анализируемые буферные растворы, содержащие синтетическую оДНК концентрацией $1{,}1{\cdot}10^{-15}$–$1{,}1{\cdot}10^{-18}$ М, готовили из 1 мкМ исходного раствора этой оДНК в очищенном 1 мМ калий-фосфатном буфере (КФБ) путём последовательного десятикратного серийного разбавления. КФБ готовили следующим образом: pH раствора KH_2PO_4 50 мМ в ультрачистой воде доводили до значения 7,4, добавляя 50 мМ раствора KOH в ультрачистой

Клинико-морфологическая характеристика образцов плазмы крови пациентов

Образец	Возраст	Пол	Диагноз	Стадия
Рабочий	64	М	Опухоль левой почки	T1aN0M0
Контрольный	56	М	Мочекаменная болезнь	–

воде. Для получения 1 мМ КФБ полученный раствор разбавляли ультрачистой водой с последующим контролем значения pH. На каждом этапе разбавления буферные растворы инкубировали во встряхивателе Thermomixer Comfort (Eppendorf, ФРГ) в течение 30 мин при 10 °C и частоте встряхивания 600 мин$^{-1}$.

Образцы плазмы крови пациентов, полученные в Институте урологии и репродуктивного здоровья человека Сеченовского университета, готовили по процедуре, описанной в предыдущих работах [24, 25, 27]. Исследовали два образца плазмы крови: рабочий образец, взятый у пациента с подтверждённым диагнозом «опухоль левой почки (стадия T1aN0M0)», и контрольный образец, взятый у пациента с заболеванием неонкологической природы. Эксперименты проводили в соответствии с приказом[1] Министерства здравоохранения Российской Федерации № 1177н от 20 декабря 2012 г. Исследование выполнено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрено независимым этическим комитетом, организованным на базе Института урологии и репродуктивного здоровья (Протокол № 10-19 от 17 июля 2019 г.). От каждого пациента получено письменное информированное согласие на использование их биологического материала в данном исследовании. В таблице представлена информация об исследованных образцах плазмы крови пациентов.

Суммарную РНК выделяли из исследованных образцов плазмы крови пациентов с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) по методике производителя реагента[2]. Согласно методике, выделенную суммарную РНК разбавляли в 75 % этаноле и в таком виде хранили при температуре –80 °C до использования в экспериментах.

Схема и принцип работы SiNW-биосенсора. SiNW-биосенсор состоял из аналитического и электронно-измерительного модулей и схематически представлен на рис. 1.

Аналитический модуль включал измерительную ячейку, состоящую из нанопроволочного чипа *1* и фторопластовой измерительной кюветы *8* объёмом 1 мл, и служил для внесения в систему анализируемых растворов, содержащих синтетические оДНК или SNORA77. Между нанопроволочным чипом и измерительной кюветой

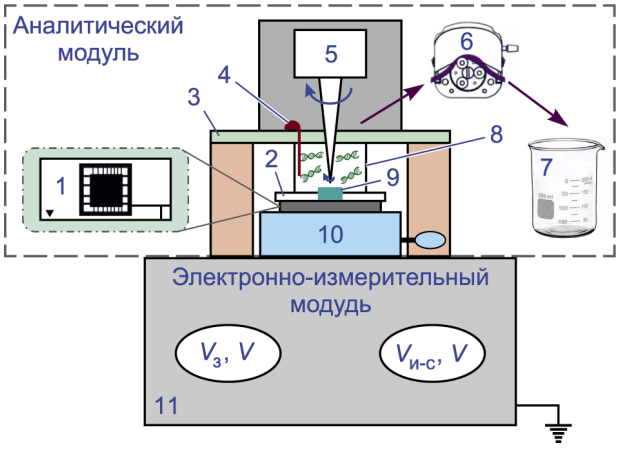

Рис. 1. Схема SiNW-биосенсора: *1* – нанопроволочный чип; *2* – полистирольная накладка; *3* – металлический прижимной механизм; *4* – платиновый электрод; *5* – мешалка; *6* – перистальтический насос; *7* – сосуд для слива растворов; *8* – фторопластовая измерительная кювета; *9* – поливинихлоридная прокладка; *10* – держатель чипа; *11* – десятиканальная система сбора и хранения данных (электронно-измерительный модуль биосенсора)

Fig. 1. Schematic of the SiNW biosensor. Numbers indicate: *1* – nanoribbon chip; *2* – polystyrene pad; *3* – metallic clamping mechanism; *4* – platinum electrode; *5* – stirrer; *6* – peristaltic pump; *7* – solution drainage vessel; *8* – fluoroplastic measuring cell; *9* – polyvinyl chloride gasket; *10* – chip holder; *11* – ten-channel data collection and storage system (electronic measuring module of the biosensor)

помещали прокладку из пластифицированного поливинилхлорида *9*, которую центрировали с помощью накладки из полистирола *2*, чтобы избежать смещения прокладки в чувствительную зону чипа. Металлический прижимной механизм *3* обеспечивал дополнительную фиксацию измерительной ячейки, чтобы избежать протекания анализируемого раствора. Платиновый электрод *4*, опускаемый в раствор измерительной кюветы, использовали для улучшения стабильности системы. Откачную трубку перистальтического насоса *6* опускали в измерительную кювету для откачивания из неё жидкости. Мешалку *5* (со скоростью вращения 3000 мин$^{-1}$) использовали для перемешивания раствора, находящегося в измерительной кювете.

В чувствительной зоне нанопроволочного чипа находился массив из кремниевых нанопроволок – сенсорных элементов SiNW-биосенсора. Диаметр чувствительной зоны составлял около 2 мм. Нанопроволочный чип представлял собой полевой транзистор на основе структур «кремний-на-изоляторе». Данные структуры изготавливали на основе технологии, аналогичной

[1] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 декабря 2012 г. № 1177н «Об утверждении порядка дачи информированного добровольного согласия на медицинское вмешательство и отказа от медицинского вмешательства в отношении определенных видов медицинских вмешательств, форм информированного добровольного согласия на медицинское вмешательство и форм отказа от медицинского вмешательства».

[2] Extract RNA. A Reagent for the Isolation of Total RNA from Biological Samples. Catalog Number BC032. Instructions for Use.

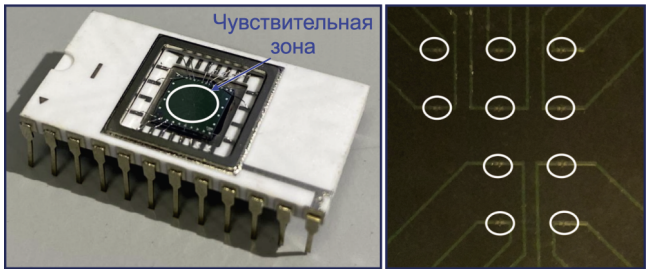

Рис. 2. Фото нанопроволочного чипа (*слева*) и оптическое изображение чувствительной зоны нанопроволочного чипа с массивом кремниевых нанопроволок (*справа*)

Fig. 2. Photographic image of the nanowire chip (*left*) and optical image of the sensitive zone of the chip with an array of silicon nanowires (*right*)

Smart Cut, но с рядом отличий от последней [30]. Использованный авторами настоящей статьи подход позволил обеспечить стабильность параметров структур «кремний-на-изоляторе» путём уменьшения риска возникновения дефектов в системе Si/SiO_2. Более подробно метод формирования таких структур описан в работе [30]. Кремниевые нанопроволоки имели следующие размеры: длина 10 мкм; ширина 3 мкм; толщина 32 нм. Фото нанопроволочного чипа и оптическое изображение чувствительной зоны чипа с массивом кремниевых нанопроволок представлены на рис. 2.

Электронно-измерительный модуль SiNW-биосенсора включал десятиканальную систему сбора и хранения данных (ООО «Агама+», Москва, Россия) *11*, см. рис. 1, которая предназначалась для регистрации сигналов в режиме реального времени, их оцифровывания с помощью аналого-цифрового преобразователя и отображения на мониторе персонального компьютера. Более подробно схема преобразования сигналов представлена в работе [26].

Биоспецифичность связывания целевых молекул синтетических оДНК и SNORA77 из анализируемых растворов обеспечивали путём функционализации поверхности кремниевых нанопроволок. Функционализация состояла из двух этапов – химической модификации поверхности кремниевых нанопроволок и сенсибилизации поверхности кремниевых нанопроволок за счёт ковалентной иммобилизации оДНК-зондов, комплементарных к последовательностям исследуемых синтетических оДНК и SNORA77.

На этапе химической модификации нанопроволочный чип сначала очищали от механических и органических загрязнений промывкой поверхности чувствительной зоны чипа изопропанолом и деионизированной водой. Раствор, содержащий HF и этанол в соотношении 1:50, использовали для удаления естественного окисла, образующегося в процессе хранения чипа. Далее для формирования гидроксильных групп на поверхности кремниевых нанопроволок чип помещали в озонатор (UV Ozone Cleaner-ProCleaner^{TM} Plus, Ossila Ltd., Великобритания) на 60 мин. Силанизацию поверхности нанопроволочного чипа проводили в парах 3-аминопропилтриэтоксисилана при комнатной температуре в течение 20 ч [29]. По окончании силанизации нанопроволочный чип промывали этанолом.

Для обеспечения специфичного связывания молекул SNORA77 из анализируемых растворов поверхность кремниевых нанопроволок сенсибилизировали путём ковалентной иммобилизации оДНК-зондов, комплементарных последовательности SNORA77 (рабочие нанопроволоки). Для этого поверхность нанопроволочного чипа активировали с помощью кросс-линкера ДТССП, после чего на активированную поверхность нанопроволок иммобилизовали оДНК-зонды [31]. В результате силанизации на поверхности кремниевых нанопроволок формировали монослой силана с концевыми NH_2-группами. Далее поверхность чувствительной зоны нанопроволочного чипа активировали бифункциональным кросс-линкером ДТССП [24]. Молекула ДТССП одним концом связывалась с NH_2-группой слоя силана [32]. Другой конец молекулы кросс-линкера связывался с аминолинкером оДНК-зонда, обеспечивая тем самым ковалентную иммобилизацию оДНК-зонда на поверхность нанопроволоки [32]. Нанопроволоки с иммобилизованными оДНК-зондами выступали в качестве рабочих и служили для специфичного связывания целевых молекул синтетических оДНК и SNORA77, а нанопроволоки, поверхность которых не была сенсибилизирована оДНК-зондами, – в качестве контрольных для учёта неспецифичного связывания.

При проведении процедуры сенсибилизации 1 мкМ растворы оДНК-зонда в 50 мМ КФБ точечно наносили на поверхность отдельных рабочих кремниевых нанопроволок с использованием роботизированной системы iONE-600, оснащённой пьезоэлектрическим дозатором (M2-Automation GmbH, ФРГ). При этом объём капли наносимого раствора составлял порядка 1 нл. После нанесения растворов нанопроволочный чип инкубировали во влажной среде при температуре 4 °C в течение 30 мин. После этого чип промывали деионизированной водой (50 мл, 60 °C). Кремниевые нанопроволоки без иммобилизованных оДНК-зондов выступали в качестве контрольных и служили для учёта неспецифического связывания.

Биосенсорные измерения. С помощью десятитиканальной системы сбора и хранения данных в ходе биосенсорных измерений регистрировали сигналы кремниевых нанопроволок. Эксперименты по обнаружению как синтетических оДНК, так и РНК SNORA77 проводили в буфере с малой концентрацией солей (1 мМ КФБ), чтобы исключить влияние дебаевского эффекта экранирования [33, 34].

Эффективность функционализации поверхности кремниевых нанопроволок оценивали с помощью сравнительного анализа вольтамперных характеристик –

зависимостей тока стока-истока $I_{и\text{-}с}$ от напряжения на затворе $V_з = 0…60$ В. Вольтамперные характеристики регистрировали на каждом этапе функционализации рабочих кремниевых нанопроволок, и для нефункционализированных контрольных нанопроволок.

Биосенсорные измерения проводили в режиме регистрации зависимости изменения тока стока-истока от времени $\Delta I_{и\text{-}с}(t)$ аналогично методике, описанной ранее в [27]. Эксперимент состоял из двух основных этапов: обнаружение синтетических оДНК в буферных растворах; обнаружение РНК SNORA77, ассоциированной с ПКР, в образцах плазмы крови. Биосенсорные измерения проводили при $V_з = 50$ В и напряжении сток-исток $V_{и\text{-}с} = 0{,}1$ В. После анализа каждого исследованного раствора, содержащего целевые молекулы, нанопроволочный чип промывали чистым 1 мМ КФБ и деионизированной водой (50 мл, 60 °С) для регенерации поверхности чипа (для удаления гибридизовавшихся на оДНК-зондах целевых молекул) и подготовки чипа к следующему измерению.

На первом этапе эксперимента обнаруживали синтетические оДНК, нуклеотидная последовательность которых была аналогична целевой детектируемой последовательности SNORA77, для определения нижнего концентрационного предела обнаружения нуклеиновых кислот с помощью SiNW-биосенсора. Обнаружение синтетических оДНК проводили в четырёх буферных растворах с концентрациями синтетических оДНК от $1{,}1 \cdot 10^{-18}$ до $1{,}1 \cdot 10^{-15}$ М. Для этого 150 мкл анализируемого раствора добавляли в измерительную кювету, содержащую 300 мкл чистого 1 мМ КФБ (pH 7,4). Таким образом, конечный объём раствора в кювете составлял 450 мкл, а начальная концентрация раствора оДНК уменьшалась в три раза. Холостые опыты проводили аналогичным образом с той лишь разницей, что в измерительную кювету добавляли 1 мМ КФБ (pH 7,4), не содержащий нуклеиновых кислот. Каждое измерение выполняли не менее чем в три технических повтора ($n = 3$).

На втором этапе эксперимента для обнаружения целевой детектируемой последовательности SNORA77, ассоциированной с ПКР, измерения проводили аналогичным образом. В этих экспериментах 7 мкл раствора, содержащего суммарную РНК, выделенную из плазмы крови пациентов, добавляли в измерительную кювету, содержащую 100 мкл чистого 1 мМ КФБ (pH 7,4). Таким образом, конечный объём раствора в кювете составлял 107 мкл. Растворы, содержащие РНК, выделенные из плазмы крови пациента с диагнозом ПКР, выступали в качестве рабочих, а растворы, содержащие РНК, выделенные из плазмы крови пациента с заболеванием неонкологической природы (мочекаменной болезнью), – в качестве контрольных. Каждое измерение, как и на первом этапе, выполняли не менее чем в три технических повтора ($n = 3$).

В ходе обработки данных полученные сигналы нормировали к единице делением на начальное значение тока. Далее из значений сигналов, полученных при

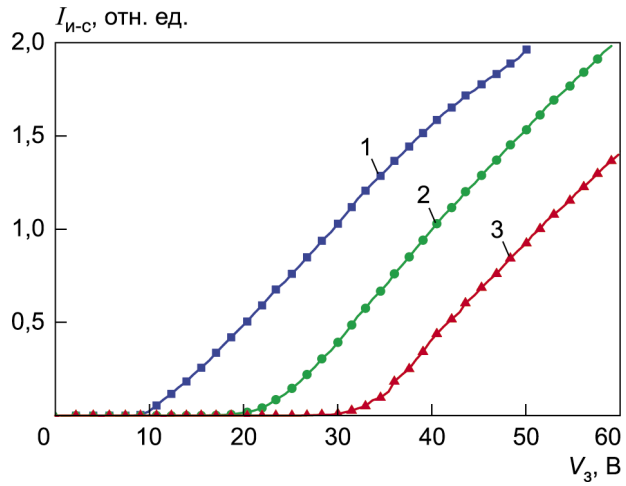

Рис. 3. Вольтамперные характеристики (зависимости тока сток-исток $I_{и\text{-}с}$ от напряжения на затворе $V_з$ при напряжении стока-истока 0,1 В), полученные для нефункционализированной нанопроволоки (*1*), нанопроволоки после силанизации (*2*) и нанопроволоки после сенсибилизации оДНК-зондами (*3*)

Fig. 3. Current-voltage characteristics (dependencies of source-drain current I_{SD} on gate voltage V_g at source-drain voltage of 0.1 V) obtained for non-functionalized nanowire (*1*); nanowire after silanization (*2*), and nanowire after sensitization with oDNA probes (*3*)

обнаружении целевых молекул, вычитали значения сигналов, полученные при контрольном измерении 1 мМ КФБ. Эту операцию проводили для учёта неспецифических взаимодействий. Затем рассчитывали разностный сигнал вычитанием из значений сигналов, полученных от рабочих нанопроволок, значений сигналов, полученных от контрольных нанопроволок. Результаты представляли в виде графиков зависимости тока стока-истока от времени *t* эксперимента (сенсограмм) аналогично способу представления данных в работе [27]. При обработке полученных результатов использовали функцию расчёта стандартного среднего квадратического отклонения с использованием ПО MS Office Excel 2007.

Оценка эффективности функционализации поверхности кремниевых нанопроволок. Об эффективности функционализации и, соответственно, пригодности чипа для использования в дальнейших экспериментах, судили по изменению проводимости нанопроволок после каждого из этапов функционализации. На рис. 3 представлены вольтамперные характеристики одной и той же нефункционализированной нанопроволоки, полученные после силанизации и после сенсибилизации оДНК-зондами. После силанизации нанопроволоки (см. рис. 3, кривая *2*), как и после сенсибилизации нанопроволоки оДНК-зондами (см. рис. 3, кривая *3*) зависимости смещаются вправо относительно кривой для нефункционализированной нанопроволоки (см. рис. 3, кривая *1*). Таким образом, проводимость кремниевой нанопроволоки изменилась и после силанизации, и после сенсибилизации, что свидетельствовало об успешной функционализации поверхности

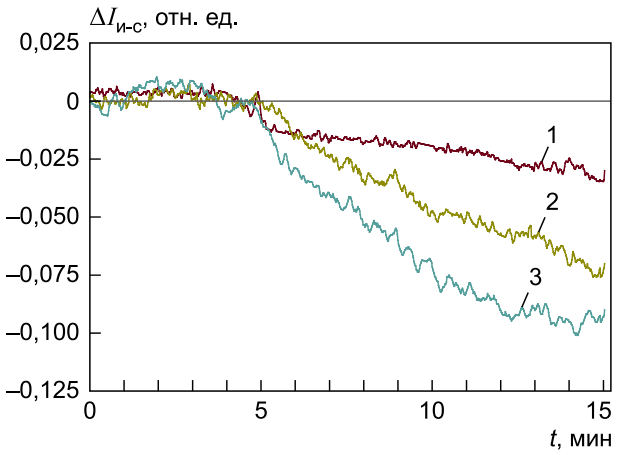

Рис. 4. Типичные сенсограммы одной и той же нанопроволоки, полученные в результате анализа буферных растворов синтетических оДНК с концентрациями $1{,}1\cdot10^{-17}$ М, $1{,}1\cdot10^{-16}$ М, $1{,}1\cdot10^{-15}$ М – *1–3* соответственно; анализируемые растворы в измерительную кювету добавляли в момент времени $t = 5$ мин

Fig. 4. Typical sensorgrams obtained for one and the same nanoribbon. The result of analysis of buffer solutions containing synthetic oDNA at concentrations of $1{,}1\cdot10^{-17}$ M, $1{,}1\cdot10^{-16}$ M, $1{,}1\cdot10^{-15}$ M – *1–3*, respectively; the analyzed oDNA solutions were added into the measuring cell at $t = 5$ min

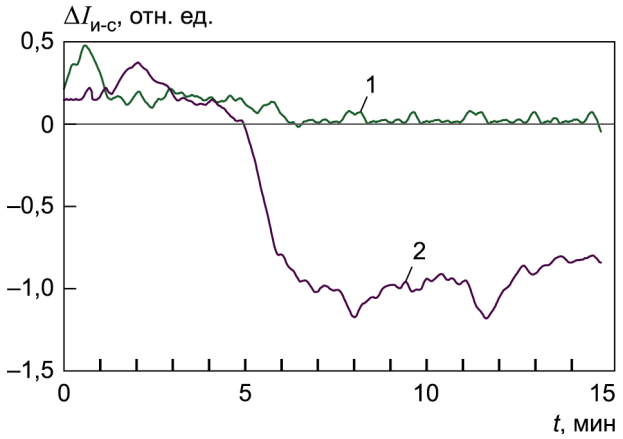

Рис. 5. Типичные сенсограммы одной и той же кремниевой нанопроволоки, полученные в результате анализа образцов суммарной РНК, выделенных из рабочего образца плазмы крови пациента с диагнозом «мочекаменная болезнь» (*1*), либо из контрольного образца плазмы крови пациента с диагнозом ПКР первой стадии (*2*); анализируемые образцы в измерительную кювету добавляли при $t = 5$ мин

Fig. 5. Typical sensograms recorded using the same silicon nanoribbon upon analysis of samples of total RNA isolated from a working plasma sample of a patient diagnosed with urolithiasis (*1*) or from a control plasma sample of a patient diagnosed with stage 1 RCC (*2*); the analyzed samples were added into the measuring cell at $t = 5$ min

кремниевой нанопроволоки. Соответственно, данный нанопроволочный чип пригоден для использования в дальнейших экспериментах.

Определение нижнего концентрационного предела обнаружения целевой детектируемой последовательности нуклеиновой кислоты. Буферные растворы с синтетическими оДНК концентрацией $1{,}1\cdot10^{-18}$–$1{,}1\cdot10^{-15}$ М исследовали для определения нижнего концентрационного предела обнаружения целевой детектируемой последовательности нуклеиновой кислоты, т. е. минимальной концентрации синтетических оДНК, вызвавшей отклик SiNW-биосенсора. На рис. 4 представлены сенсограммы одной и той же рабочей кремниевой нанопроволоки, полученные в результате анализа буферных растворов с различными концентрациями синтетических оДНК. С увеличением концентрации детектируемых синтетических оДНК в анализируемых буферных растворах уровень сигнала от кремниевой нанопроволоки ожидаемо уменьшился. Это характерно для нанопроволок с проводимостью *n*-типа и обусловлено накоплением отрицательно заряженных молекул синтетических оДНК, адсорбируемых на сенсибилизированнную комплементарными оДНК-зондами поверхность нанопроволоки [35]. Так, при анализе буферного раствора с синтетическими оДНК концентрацией $1{,}1\cdot10^{-15}$ М (см. рис. 4, кривая 3), наблюдается большее понижение уровня регистрируемого сигнала, чем при анализе буферного раствора с концентрацией $1{,}1\cdot10^{-16}$ М (см. рис. 4, кривая 2). С уменьшением концентрации раствора до $1{,}1\cdot10^{-17}$ М (см. рис. 4, кривая *1*) уменьшение уровня сигнала ещё менее значимо, чем при концентрации $1{,}1\cdot10^{-16}$ М. При концентрации оДНК $1{,}1\cdot10^{-18}$ М не обнаружили существенного изменения сигнала нанопроволочного биосенсора. Таким образом, $1{,}1\cdot10^{-17}$ М – минимальная концентрация оДНК, при которой наблюдался ответ биосенсора и которую приняли в качестве предела обнаружения целевой детектируемой последовательности нуклеиновой кислоты с помощью SiNW-биосенсора. Следует отметить, что возможность осуществлять обнаружение биомаркеров с таким высоким уровнем чувствительности крайне важна для ранней диагностики онкопатологий [36, 37].

Обнаружение целевой детектируемой последовательности SNORA77, ассоциированной с ПКР, проводили путём анализа растворов, содержащих РНК, выделенные из плазмы крови пациента с подтверждённым диагнозом ПКР на первой стадии развития (рабочие образцы) и из плазмы крови пациента с заболеванием неонкологической природы (контрольные растворы). На рис. 5 приведены сенсограммы одной и той же кремниевой нанопроволоки в результате анализа растворов, которые содержали РНК, выделенные из исследуемых образцов плазмы крови пациентов. При анализе раствора, полученного из рабочего образца, выделенного из плазмы крови пациента с диагнозом ПКР первой стадии, наблюдается значительное уменьшение уровня сигнала SiNW-биосенсора (см. рис. 5, кривая 2), обусловленное адсорбцией отрицательно заряженных

молекул SNORA77 на сенсибилизированную специфичными оДНК-зондами поверхность кремниевой нанопроволоки [35]. Напротив, при анализе раствора, выделенного из контрольного образца плазмы крови пациента с заболеванием неонкологической природы (см. рис. 5, кривая *1*), уровень сигнала SiNW-биосенсора не уменьшается. Полученные результаты анализа свидетельствуют о специфичности обнаружения целевой детектируемой последовательности малой ядрышковой РНК SNORA77. Таким образом, результаты проведённых экспериментов подтверждают, что SNORA77 присутствует в плазме крови пациента с диагнозом ПКР и может выступать в качестве потенциального маркера ПКР.

Обсуждение результатов. Для ранней диагностики онкопатологий принципиально важно обнаруживать биомаркеры с пределом обнаружения не выше субфемтомолярного (10^{-15} М), поскольку на ранних стадиях развития онкопатологий опухоль размером 1 мм^3 выделяет число молекул-онкомаркеров, соответствующее их концентрации в крови 10^{-15} М [37]. С учётом опубликованных в работе [38] значений энергии Гиббса ($\Delta G°$), образование комплексов РНК-ДНК термодинамически более выгодно, чем гибридизация ДНК-ДНК [39], что может приводить к некоторой недооценке предела обнаружения целевой детектируемой последовательности нуклеиновой кислоты.

При анализе растворов, содержащих суммарную РНК, выделенную из плазмы крови пациентов, малая ядрышковая РНК SNORA77 обнаружена в рабочем образце плазме крови пациента с диагнозом ПКР первой стадии – в отличие от контрольного образца плазмы крови пациента с заболеванием неонкологической природы. Этот факт свидетельствует о специфичности обнаружения целевой детектируемой последовательности SNORA77 в образцах РНК, выделенной из плазмы крови, и подтверждает корректность использования малой ядрышковой РНК SNORA77 в качестве потенциального биомаркера ПКР.

Заключение. Разработанный SiNW-биосенсор для обнаружения малых ядрышковых РНК SNORA77 содержит нанопроволочный чип. Чип является ключевым элементом SiNW-биосенсора и изготовлен на основе структур «кремний-на-изоляторе» по технологии, аналогичной Smart Cut, в чувствительной зоне содержит массив из кремниевых нанопроволок с проводимостью *n*-типа. На практике подтверждено, что спроектированный и изготовленный в работе биосенсор позволяет корректно выполнять физико-химические эксперименты по прямому обнаружению SNORA77, ассоциированной с ПКР. Предел обнаружения SiNW-биосенсора составил $1{,}1 \cdot 10^{-17}$ М. С помощью SiNW-биосенсора обнаружен повышенный уровень целевой SNORA77 в образце суммарной РНК, выделенной из плазмы крови пациента с подтверждённым диагнозом ПКР, по сравнению с контрольным образцом от пациента с заболеванием неонкологической природы. Полученные в настоящей работе результаты будут полезны при разработке диагностических систем для выявления ПКР на ранних стадиях развития этого заболевания.

Авторская декларация

Вклад авторов. Ю. Д. Иванов и А. И. Арчаков задумали это исследование и разработали его концепцию; Ю. Д. Иванов, В. П. Попов и О. Ф. Петров разработали методологию исследования; К. В. Голдаева, Е. Д. Неведрова, А. В. Виноградова, С. И. Капустина и А. Ф. Козлов проводили эксперименты на нанопроволочном биосенсоре; В. С. Зиборов, Л. И. Гришин и А. Ю. Долгобородов проводили эксперименты по модификации поверхности чипов к нанопроволочному биосенсору; Н. Е. Кушлинский и Д. В. Ениkeев разработали клиническую часть исследования; В. Б. Матвеев и Н. В. Бурундаева проводили сбор клинических образцов; И. С. Стилиди, В. А. Конев и О. Б. Ковалев анализировали клинические и экспериментальные данные и проводили валидацию результатов исследования; В. П. Попов и А. В. Глухов изготовили чипы к нанопроволочному биосенсору; А. Н. Аблеев, О. Н. Афонин, С. В. Новиков, Л. И. Гришин и Е. С. Юшков проводили формальный анализ и обрабатывали данные экспериментов; И. Д. Шумов подготовил и оформил графику (рисунки в статье); Ю. Д. Иванов и И. Д. Шумов написали статью и участвовали в её доработке. А. И. Арчаков осуществлял контроль, и наставничество в процессе планирования и проведения исследования, и получение финансовой поддержки исследовательского проекта, результатом которого является данная публикация. Все авторы прочитали и одобрили окончательную рукопись.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет потенциального конфликта интересов в связи с исследованием, представленным в данной статье.

Финансирование. Биосенсорные измерения на нанопроволочном биосенсоре выполнены в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2). Работа по подготовке биосенсорных чипов к анализу выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание № 075-00269-25-00).

Authors declaration

Author contributions. Y. D. Ivanov and A. I. Archakov conceived the study and developed its concept; Y. D. Ivanov, V. P. Popov and O. F. Petrov developed the study methodology; K. V. Goldaeva, E. D. Nevedrova, A. V. Vinogradova, S. I. Kapustina, and A. F. Kozlov performed

the experiments on the nanowire biosensor; V. S. Ziborov, L. I. Grishin and A. Y. Dolgoborodov performed the experiments on modification of the surface of the chips for the nanowire biosensor; N. E. Kushlinskii and D. V. Enikeev designed the clinical part of the study; V. B. Matveev and N. V. Burundaeva collected the clinical samples; I. S. Stilidi, V. A. Konev and O. B. Kovalev analyzed clinical and experimental data and validated the study results; V. P. Popov and A. V. Glukhov manufactured the chips for the nanowire biosensor; A. N. Ableev, O. N. Afonin, S. V. Novikov, L. I. Grishin, and E. S. Yushkov performed formal analysis and processed experimental data; I. D. Shumov prepared and designed graphics (figures in the paper); Y. D. Ivanov and I. D. Shumov wrote the paper and participated in its revision. A. I. Archakov supervised and mentored the planning and implementation of the study, and obtained financial support for the research project that resulted in this publication. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest. The authors declare that they have no potential conflict of interest in relation to the study reported in this paper.

Funding. Biosensor measurements with the nanowire biosensor were performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (no. 122030100168-2). The work on preparation of the biosensor chips for the analysis was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment no. 075-00269-25-00).

Список источников / References

1. Tran J., Ornstein M. C. Clinical review on the management of metastatic renal cell carcinoma. *JCO Oncology Practice*, **18**(3), 187–196 (2022). https://doi.org/10.1200/OP.21.00419

2. Hsieh J. J. et al. Renal cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, **3**(1), 1–19 (2017). https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.9

3. Ljungberg B., Purdue M. P., Signoretti S. et al. European Association of Urology guidelines on renal cell carcinoma: the 2022 update. *European Urology*, **82**(4), 399–410 (2022). https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.03.006

4. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, **71**(3), 209–249 (2021). https://doi.org/10.3322/caac.21660

5. Bosma N. A., Warkentin M. T., Gan C. L et al. Efficacy and safety of first-line systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma: a systematic review and network meta-analysis. *European Urology Open Science*, **37**, 14–26 (2022). https://doi.org/10.1016/j.euros.2021.12.007

6. Tenold M., Ravi P., Kumar M. et al. Current approaches to the treatment of advanced or metastatic renal cell carcinoma. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, **40**, 187–196 (2020). https://doi.org/10.1200/EDBK_279881

7. Motzer R. J., Bander N. H., Nanus D. M. Renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, **335**(12), 865–875 (1996). https://doi.org/10.1056/NEJM199609193351207

8. Gibbons R. P., Montie J. E., Correa Jr. R. J. et al. Manifestations of renal cell carcinoma. *Urology*, **8**(3), 201–206 (1976). https://doi.org/10.1016/0090-4295(76)90366-6

9. McLaughlin J. K., Lipworth L., Tarone R. E. Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Seminars in oncology. WB Saunders*, **33**(5), 527–533 (2006). https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2006.06.010

10. Padala S. A., Barsouk A., Thandra K. C. et al. Epidemiology of renal cell carcinoma. *World Journal of Oncology*, **11**(3), 79 (2020). https://doi.org/10.14740/wjon1279

11. Wein A. J., Barsouk A., etc. *Campbell-Walsh Urology*, 11th ed. Elsevier Health Sciences, Philadelphia (2016).

12. Vasudev N. S., Wilson M., Stewart G. D. et al. Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer. *BMJ Open,* **10**(5), e035938 (2020). https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035938

13. Wajahat M., Bracken C. P., Orang A. Emerging functions for snoRNAs and snoRNA-derived fragments. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(19), 10193 (2021). https://doi.org/10.3390/ijms221910193

14. Huang Z., Du Y., Wen J, et al. SnoRNAs: functions and mechanisms in biological processes, and roles in tumor pathophysiology. *Cell Death Discovery*, **8**(1), 259 (2022). https://doi.org/10.1038/s41420-022-01056-8

15. Lu B., Chen X., Liu X. et al. C/D box small nucleolar RNA SNORD104 promotes endometrial cancer by regulating the 2'-O-methylation of PARP1. *Journal of Translational Medicine*, **20**(1), 618 (2022). https://doi.org/10.1186/s12967-022-03802-z

16. Chow R. D., Chen S. Sno-derived RNAs are prevalent molecular markers of cancer immunity. *Oncogene*, **37**(50), 6442–6462 (2018). https://doi.org/10.1038/s41388-018-0420-z

17. Mannoor K., Liao J., Jiang F. Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, **1826**(1), 121–128 (2012). https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.005

18. Yang S., Rothman R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*, **4**(6), 337–348 (2004). https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8

19. Ro S., Park C., Jin J. et al. A PCR-based method for detection and quantification of small RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **351**(3), 756–763 (2006). https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.105

20. Yang T., Zhang M., Zhang N. Modified Northern blot protocol for easy detection of mRNAs in total RNA using radiolabeled probes. *BMC Genomics*, **23**(1), 66 (2022). https://doi.org/10.1186/s12864-021-08275-w

21. Ivanov Y. D., Romanova T.S., Malsagova K.A. et al. Use of silicon nanowire sensors for early cancer diagnosis. *Molecules*, **26**(12), 3734 (2021). https://doi.org/10.3390/molecules26123734

22. Ambhorkar P., Wang Z., Ko H. et al. Nanowire-based biosensors: from growth to applications. *Micromachines*, **9**(12), 679 (2018). https://doi.org/10.3390/mi9120679

23. Kim K., Park C., Kwon D. et al. Silicon nanowire biosensors for detection of cardiac troponin I (cTnI) with high sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, **77**, 695–701 (2016). https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.008

24. Ivanov Y. D., Malsagova K. A., Pleshakova T. O., et al. Aptamer-Sensitized nanoribbon biosensor for ovarian cancer marker detection in plasma. *Chemosensors*, **9**(8), 222 (2021). https://doi.org/10.3390/chemosensors9080222

25. Ivanov Y., Pleshakova T., Malsagova K. et al. Detection of marker miRNAs, associated with prostate cancer, in plasma using SOI-NW biosensor in direct and inversion modes. *Sensors*, **19**(23), 5248 (2019). https://doi.org/10.3390/s19235248

26. Ivanov Y. D., Malsagova K. A., Popov V. P. et al. Nanoribbon-based electronic detection of a glioma-associated circular miRNA. *Biosensors*, **11**(7), 237 (2021). https://doi.org/10.3390/bios11070237

27. Иванов Ю. Д., Неведрова Е. Д., Виноградова А. В. и др. Детекция кольцевых РНК hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715 и hsa_circ_0136666, ассоциированных с колоректальным раком, в плазме крови с помощью нанопроводных чипов. Альманах клинической медицины, **52**(3), 120–131 (2024) [Ivanov Y. D., Nevedrova E. D., Vinogradova A. V. et al. Detection of colorectal cancer associated circular RNAs hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715, and hsa_circ_0136666 in plasma with nanowire chips. *Almanac of Clinical Medicine*, **52**(3), 120–131 (2024). (In Russ.)]. https://doi.org/10.18786/2072-0505-2024-52-016

28. Patolsky F., Zheng G., Hayden O. et al. Electrical detection of single viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(39), 14017–14022 (2004). https://doi.org/10.1073/pnas.0406159101

29. Malsagova K. A., Pleshakova T. O., Kozlov A. F. et al. Detection of influenza virus using a SOI-nanoribbon chip, based on an N-type field-effect transistor. *Biosensors*, **11**(4), 119 (2021). https://doi.org/10.3390/bios11040119

30. Popov V. P., Antonova A. I., Frantsuzov P. A. et al. Properties of silicon-on-insulator structures and devices. *Semiconductors*, **35**, 1030–1037 (2001). https://doi.org/10.1134/1.1403567

31. Ivanov Y., Pleshakova T., Malsagova K. et al. Detection of marker miRNAs, associated with prostate cancer, in plasma using SOI-NW biosensor in direct and inversion modes. *Sensors*, **19**(23), 5248 (2019). https://doi.org/10.3390/s19235248

32. Mattson G., Conklin E., Desai S. et al. A practical approach to crosslinking. *Molecular Biology Reports*, **17**, 167–183 (1993). https://doi.org/10.1007/BF00986726

33. Stern E., Wagner R., Sigworth F. J. et al. Importance of the Debye screening length on nanowire field effect transistor sensors. *Nano Letters*, **7**(11), pp. 3405–3409 (2007). https://doi.org/10.1021/nl071792z

34. Laborde C., Pittino F., Verhoeven H. A. et al. Real-time imaging of microparticles and living cells with CMOS nanocapacitor arrays. *Nature Nanotechnology*, **10**(9), pp. 791–795 (2015). https://doi.org/10.1038/nnano.2015.163

35. Namdari P., Daraee H., Eatemadi A. Recent advances in silicon nanowire biosensors: synthesis methods, properties, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **11**, 1–16 (2016). https://doi.org/10.1186/s11671-016-1618-z

36. Zhang H., Kikuchi N., Ohshima N. et al. Design and fabrication of silicon nanowire-based biosensors with integration of critical factors: toward ultrasensitive specific detection of biomolecules. *American Chemical Society Applied Materials and Interfaces*, **12**(46), 51808–51819 (2020). https://doi.org/10.1021/acsami.0c13984

37. Rissin D. M., Kan C. W., Campbell T. G. et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology*, **28**(6), 595–599 (2010). https://doi.org/10.1038/nbt.1641

38. Banerjee D., Tateishi-Karimata H., Ohyama T. et al. Improved nearest-neighbor parameters for the stability of RNA/DNA hybrids under a physiological condition. *Nucleic Acids Research*, **48**(21), 12042–12054 (2020). https://doi.org/10.1093/nar/gkaa572

39. SantaLucia J., Hicks D. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annual Review of Biophysics*, **33**, 415–440 (2004). https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800

Статья поступила в редакцию 14.03.2025; одобрена после рецензирования 09.07.2025; принята к публикации 01.09.2025.
The article was submitted 14.03.2025; approved after reviewing 09.07.2025; accepted for publication 01.09.2025.