

Ступин Даниил Дмитриевич

**ПОМЕХОУСТОЙЧИВАЯ ИММИТТАНСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ НА ОСНОВЕ
АДАПТИВНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *in vitro***

Специальность 03.01.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук».

Научный руководитель

Дубина Михаил Владимирович, академик РАН, доктор медицинских наук.

Официальные оппоненты:

Казанцев Виктор Борисович, доцент, доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой нейротехнологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Зубков Василий Иванович, профессор, доктор физико-математических наук, профессор кафедры микро- и наноэлектроники федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)».

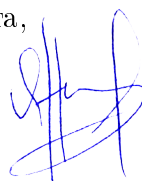
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук.

Защита состоится «29» апреля 2022 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета У.03.01.02 федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/defences-calendar/the-degree-of-candidate-of-sciences/stupin_daniil_dmitrievich/ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук



Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Электрическая иммитансная спектроскопия (ЭИС) [Barsoukov and Macdonald, 2018] является мощной экспериментальной техникой, которая сегодня с успехом используется для тестирования электронных приборов [Лебедев А. А. и Давыдов Д. В., 2000; Kokorev and Maleev, 1996; Kucherova et al., 2010], для изучения твердого тела и наноматериалов, включая гетеропереходы [Берман, Л. С.; Лебедев, А. А., 1981; Zubkov et al., 2021], при характеристике электролитов [Barbero and Lelidis, 2007; Tsai and Whitmore, 1982], для диагностики альтернативных источников энергии [Set et al., 2016; Wang et al., 2013], а также для исследования биологических объектов – органов, тканей, клеток, белков и т. д. [Grimnes and Martinsen, 2015; I. Giaever et. al., 2012; Stupin et al., 2021]. Более того, поскольку ЭИС является неинвазивным неразрушающим неоптическим безметочным¹ и чувствительным методом, который может работать в режиме реального времени и не требует сложного аппаратного обеспечения [Chang and Park, 2010], ее применение обладает огромным потенциалом для решения актуальных задач биосенсорной инженерии [Grimnes and Martinsen, 2015; I. Giaever et. al., 2012]. В частности, благодаря значительному прогрессу, достигнутому в области микроэлектроники в конце XX века, в конце 80-х – начале 90-х гг. была разработана технология импедансного зондирования клеточной популяции (electrcal cell-substrate impedance sensing, ECIS), авторами которой являются лауреат Нобелевской премии Ivar Giaever и Charles Keese [I. Giaever et. al., 2012]. В основе данной экспериментальной техники лежит исследование иммиттансного спектра (ИС) покрытого клеточной популяцией электрода (контакта металл/электролит/клетка, МЭК), который располагается на дне культивационной чашки Петри [Wegener et al., 2000]. Поскольку состояние клеточной популяции оказывает значительное влияние на электрические свойства контакта МЭК [Giaever and Keese, 1993], временная эволюция его ИС позволяет исследовать скорость деления клеток [Dutyshева et al., 2020; Witzel et al., 2015], определять их количество на электроде [Xiao and Luong, 2003], изучать подвижность клеток [Lazarev et al., 2018; Szulcek et al., 2014], оценивать их жизнеспособность [Ke et al., 2011; Stupin, 2018], исследовать взаимодействие различных типов клеток [Komarova et al., 2020; Parviz et al., 2017] друг с другом и т.д. На сегодняшний день технология ECIS и ее аналоги находят не только широкое применение в практической цитологии, например, при изучении процессов заживления ран [Asphahani and Zhang, 2007; Keese et al., 2004] и при тестировании различных фармакологических препаратов [Komarova et al., 2021; Lazarev et al., 2020; I. Giaever et. al., 2012; Nikotina et al., 2021], но и является крайне перспективной платформой как для

¹Label-free, англ.

исследования вирусных и раковых заболеваний [*Brown, 2001; Sverchinsky et al., 2017; Zou and Guo, 2003*], так и для создания гибридных биоэлектронных сенсоров, например на глюкозу [*Tlili et al., 2003*].

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на описанный в предыдущем разделе успех практического применения технологии ECIS, очевидно, что область ее приложений может быть еще более расширена, если для исследования клеточной популяции использовать не два макроэлектрода (\varnothing 100 мкм), как в стандартной геометрии Giæver и Keese [*Giaever and Keese, 1993*], а массив из микроэлектродов [*Bisio et al., 2019; Kazantsev et al., 2009*], каждый из которых по своим размерам сравним с одиночной клеткой (\varnothing 10 мкм). Подобная мультиэлектродная измерительная геометрия позволит исследовать не только целую клеточную популяцию, но и каждую отдельную клетку в ней, что, во-первых, повысит чувствительность установки [*Jiang and Spencer, 2010*], во-вторых, позволит исследовать пространственное распределение клеток в популяции, и в-третьих, откроет новые перспективы в области изучения взаимодействия различных клеток друг с другом (например раковых и нормальных). Также технологию ECIS можно значительно улучшить, если для получения импеданса электродов использовать не классические частотные методы измерения (например метод синхронного усиления [*Barsoukov and Macdonald, 2018*]), а современные высокоскоростные временные методы ЭИС, например, метод Фурье-ЭИС [*Chang and Park, 2010*]. Последняя измерительная техника позволяет просканировать образец одновременно в целой полосе частот, обеспечивая при этом высокое временное разрешение (высокую скорость сбора данных) и высокое частотное разрешение, то есть ИС, измеренный с помощью Фурье-ЭИС, несет значительно больше информации, чем спектр полученный с помощью относительно медленной техники синхронного усиления. Таким образом, переход с почастотной измерительной стратегии в технологии ECIS на временную позволит получать более информативные данные и, следовательно, позволит более детально изучать состояние и поведение клеток в клеточной популяции.

Однако совмещение вышеописанных улучшений технологии ECIS – увеличение пространственного разрешения за счет уменьшения размера электрода и увеличение частотного и временного разрешений за счет использования метода Фурье-ЭИС – встречает на своем пути фундаментальное препятствие, вызванное, с одной стороны, уменьшением соотношения сигнал/шум при работе с безопасными для одиночных клеток плотностями токов (15 mA/cm^2) [*Asphahani et al., 2011*], и отсутствием шумоподавляющего свойства у Фурье-ЭИС, с другой.²

²При этом стоит отдельно подчеркнуть, что *медленный* почастотный метод синхронного усиления, который используется в классической технологии ECIS, обладает высокой устойчивостью к шумам и наводкам [*Barsoukov and Macdonald, 2018*].

Если различные аппаратные ухищрения для подавления шумов, вроде экранирования или варьирования геометрии электродов, окажутся неприменимыми, ИС, полученный с помощью Фурье-ЭИС, будет искажен шумами, что сильно затруднит его интерпретацию. Данная проблема, в частности, актуальная для имплантируемых ЭИС-датчиков, например, зрительных протезов, в которых ЭИС используется для диагностики интерфейса между сетчаткой и имплантом [Нероев *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2013].

В то же время мощное развитие вычислительной техники, произошедшее в последние три десятилетия, привело к тому, что сегодня многие задачи, связанные с выделением полезного сигнала из зашумленных данных, решаются не только аппаратными средствами, но и с помощью методов цифровой обработки информации, например с помощью калмановской фильтрации [Hamilton *et al.*, 2016; Schütte *et al.*, 2016] и адаптивной фильтрации (АФ) [Widrow *et al.*, 1975].

В частности, идея использования АФ для ЭИС ранее упоминалась в работе [Wang *et al.*, 2013]. Поскольку АФ обладает тем замечательным свойством, что подавляет все нескоррелированные со входными данными шумы и помехи [Уидроу Б., Стирнс С., 1989], ее использование для ЭИС может представлять решение для очерченной в конце предыдущего параграфа проблемы совмещения высокого пространственного, частотного и временного разрешений в технологии ECIS. Однако несмотря на успешную реализацию АФ-ЭИС в работе [Wang *et al.*, 2013], в ней отсутствуют теоретический анализ АФ-ЭИС, исследование ее помехоустойчивости и ее сравнение с другими методами ЭИС, что и легло в основу первой части настоящей диссертации.

Вторая же часть данной работы является логическим продолжением первой части и посвящена применению разработанной технологии АФ-ЭИС для воплощения в жизнь высокоразрешающей технологии ECIS, ее приложениям для исследования одиночных клеток и клеточных популяций *in vitro*, а также созданию на ее основе прототипов биосенсоров на цитотоксические вещества, поражающее излучение УФ диапазона и на ферменты.

Цели и задачи

Таким образом, **целью** данной работы является разработка ЭИС на основе адаптивной фильтрации и ее применение для создания высокоскоростной и высокоразрешающей технологии исследования одиночных клеток и клеточных популяций *in vitro*.

Для достижения поставленной цели в настоящей диссертации были решены следующие задачи:

- 1) Теоретическое построение основ АФ-ЭИС и ее экспериментальная апробация:
 - а) Определение зависимости между параметрами адаптивного фильтра и иммитансным спектром образца, а также определение аппаратной и весовой

- функций АФ-ЭИС;
- б) Теоретическое и экспериментальное доказательство помехоустойчивости АФ-ЭИС, а также ее экспериментальное сравнение с Фурье-ЭИС;
- 2) Практическое применение АФ-ЭИС для исследования клеточных популяций и одиночных клеток *in vitro*:
- а) Исследование применимости АФ-ЭИС для изучения свойств контакта металл/электролит/клетка;
 - б) Сравнение АФ-ЭИС и Фурье-ЭИС как методов оценки жизнеспособности клеточных популяций и одиночных клеток;
 - в) Применение АФ-ЭИС одиночных клеток для создания прототипов многофункциональных биосенсоров.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач в настоящей диссертации были использованы следующие материалы и методы.

- 1) В качестве основы для создания АФ-ЭИС был использован временной подход к измерению иммитанса.
- 2) Отличительной чертой предлагаемой методики от классического временного подхода на основе Фурье-ЭИС является обработка токового отклика образца и приложенного к нему напряжения с помощью методов адаптивной фильтрации и ее приложений для идентификации неизвестных линейных систем.
- 3) Построение теории АФ-ЭИС и анализ ее свойств выполнялся с помощью методов цифровой фильтрации, операционного исчисления, преобразования Фурье, аппарата обобщенных функций, методов вычислительной алгебры, теории оптимизации и линейной регрессии, а также с помощью методов анализа обусловленности линейных систем.
- 4) Практическая аппаратная реализация АФ-ЭИС была выполнена с помощью использования коммерческих доступных приборов [АЦП L-Card E2010 (Россия) и генератор АКИП-3413-3 (Россия)] и электронных микросхем от Analog Devices (США).
- 5) Обработка полученных данных осуществлялась в пакете MATLAB.
- 6) В качестве биологического объекта исследования были использованы клетки HeLa.

- 7) Визуальная диагностика клеток осуществлялась методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии с помощью микроскопов Leica 4000DM (Leica, Германия) и Zeiss Observer.Z1 (Zeiss, Германия).
- 8) Исследование клеток с помощью ЭИС базировалось на концепции технологии ECIS.
- 9) Для обеспечения возможности работы как с одиночными клетками, так и с клеточными популяциями использовались коммерческие мультиэлектродные матрицы от MultiChannel Systems (Германия) и Alpha MED-Panasonic (Япония).
- 10) Интерпретация получаемых иммиттансных спектров проводилась с помощью теории Giæver-Keese.
- 11) Для исследования физического, химического и биологического воздействия на клетки использовалось УФ-излучение, детергент Тритон X-100 и раствор трипсин-Версена соответственно.

Положения, выносимые на защиту

- **Положение 1.** Адаптивная фильтрация в рамках полу-БИХ архитектуры позволяет по экспериментально измеренным временным последовательностям отсчетов зондирующего напряжения и токового отклика образца выразить его адмиттанс с помощью аппроксимации Levy, параметрами которой являются весовые коэффициенты адаптивного фильтра. При этом в качестве весовой функции и аппаратной функции АФ-ЭИС выступают соответственно квадрат модуля зондирующего напряжения и функция Котельникова, которая определяет частотное разрешение АФ-ЭИС как обратное время сбора данных.
- **Положение 2.** При вычислении иммиттансных спектров с помощью АФ-ЭИС ошибка в их определении, так же как и ошибка в определении весовых коэффициентов, убывает обратно пропорционально корню из числа весовых коэффициентов, что позволяет проводить измерения с помощью АФ-ЭИС даже в условиях отрицательного соотношения сигнал/шум, при которых Фурье-ЭИС оказывается неприменимой. Данное шумоподавляющее свойство АФ-ЭИС создает принципиальную возможность исследования одиночных клеток в их естественном состоянии с помощью высокоразрешающей ЭИС в режиме реального времени и в условиях сильного внешнего зашумления, вызванного малыми плотностями безопасных для клеток токов (15 мА/см^2), протекающих через микроэлектроды.

- **Положение 3.** АФ-ЭИС позволяет проводить диагностику био-специфичных электродов, которые обладают сложной, развитой поверхностью, и, как следствие, описываются сложной, псевдоемкостной эквивалентной схемой, состоящей из нескольких R -СРЕ звеньев.
- **Положение 4.** АФ-ЭИС позволяет исследовать одиночные клетки и определять их функциональное состояние в режиме реального времени и в условиях сильного зашумления (соотношение сигнал/шум 1-3 дБ), которое на практике, как правило, возникает из-за необходимости измерения низкоамплитудных, безопасных для клеток токов на фоне помех от различных электронных приборов. В частности, благодаря высокой помехоустойчивости АФ-ЭИС в отличие от Фурье-ЭИС способна детектировать одиночные клетки на поверхности микроэлектрода и статистически достоверно оценивать их жизнеспособность.
- **Положение 5.** Реализованные на основе АФ-ЭИС и клеточной lift-off литографии биоэлектронные сенсоры, чувствительным элементом которых являются одиночные живые клетки *in vitro*, не только демонстрируют на порядок более высокое быстродействие, чем классические флуоресцентные датчики, но и благодаря наличию контрольных электродов и использованию широкого диапазона частот позволяют одновременно получать информацию о жизнеспособности и об изменении морфологии клеток и о свойствах окружающей их среды, в частности, проводимости буферного раствора и исправности электродов, что повышает надежность работы АФ-ЭИС сенсоров по сравнению со стандартным ECIS подходом.

Научная новизна

В результате выполнения данной работы был создан новый подход к измерению иммиттанса, в основе которого лежит адаптивная фильтрация – простейший искусственный интеллект. Разработанная измерительная техника позволяет получать иммиттансные спектры образца с высокими временным и частотным разрешениями даже в условиях отрицательного соотношения сигнал/шум (С/Ш),³ что делает ее не только уникальной экспериментальной технологией для исследования физических и химических систем, но и перспективной методикой для решения медико-биологических задач и проблем биосенсорной инженерии. Благодаря вышеописанным свойствам предлагаемая в настоящей диссертации АФ-ЭИС выводит на принципиально новый уровень электрические методы исследования, в том числе импедансные методы диагностики клеточных попу-

³В данной работе соотношение сигнал/шум измеряется в децибелах, то есть $C/Ш=20\lg\frac{S}{N}$, где S – амплитуда полезного сигнала, а N – амплитуда шума. Отрицательное $C/Ш$ означает, что уровень шума превзошел уровень полезного сигнала.

ляций, поскольку ее применение решает проблему низкого соотношения сигнал/шум, возникающую при изучении микроэлектродов с характерным размером 10 мкм, что позволяет увеличить пространственное разрешение технологии ECIS до масштаба одиночных клеток, обеспечивая при этом максимально возможную скорость сбора данных и максимально возможное частотное разрешение получаемых спектров. Апробация подобной концепции высокоразрешающей технологии ECIS на основе АФ-ЭИС, также выполненная в данной работе, продемонстрировала принципиальную возможность детального исследования таким образом свойств контакта металл/электролит/клетка при воздействии на него физических, химических и биологических факторов, в результате чего на ее основе были созданы прецизионные биоэлектронные сенсоры, которые реагируют на опасные для клеток химические соединения, на поражающее действие УФ-излучения и на ферменты.

Теоретическая и практическая значимость

Поскольку разработанный в данной работе метод отличается от стандартного Фурье преобразования только способом обработки данных, он сочетает в себе достоинства Фурье-ЭИС – высокое временное и частотное разрешения – и дополнительно обеспечивает помехоустойчивость измерений, что позволяет проводить на практике исследования ИС в условиях сильного внешнего зашумления с низкими уровнями зондирующего напряжения и токового отклика. С точки зрения теоретической значимости, данные достоинства разработанного метода значительно расширяют возможности ЭИС во всех областях ее применения, в том числе в области создания имплантируемых биосенсоров (например, зрительных и слуховых протезов), для которых использование стандартных аппаратных средств защиты от помех оказывается неприменимо. В то же время с точки зрения практической значимости, предложенное в данной работе улучшение временного, частотного и пространственного разрешений в технологии ECIS при помощи ее совмещения с АФ-ЭИС открывает новые пути для исследования клеточных популяций *in vitro*, позволяя, в частности, детально исследовать каждую отдельную клетку в популяции, что крайне важно для изучения гетерогенных культур и для изучения взаимодействия клеток друг с другом, для создания платформ экспресс-диагностики заболеваний (например, с помощью детектирования малого количества раковых или инфицированных клеток в образце крови пациента), для оценки целостности клеточной популяции в технологиях клеточной терапии кожи, а также для разработки прецизионных биосенсоров, реагирующих на малые дозы токсинов или поражающего излучения.

Апробация работы

Результаты работы были изложены в девяти научных публикациях, девять из которых индексируются в системе Scopus и семь в системе Web of science (WOS), а также доложены на четырнадцати международных конференциях. Кроме того, достижения настоящей диссертации неоднократно обсуждались на лабораторных семинарах СПбАУ им. Алфёрова, ГУАП, СПИИРАН, СПбПУ, ФТИ им. А.Ф. Иоффе, ПИЯФ.

Личный вклад автора

Создание предложенной в настоящей работе методики измерения иммиттанса и основанной на ней технологии исследования клеток, разработка ее теории, аппаратной и программной базы, доказательство ее помехоустойчивости, а также ее экспериментальная апробация на примере исследования свойств био-специфичных электродов, клеточных популяций и одиночных клеток *in vitro* и демонстрация ее достоинств для решения задач биосенсорной инженерии полностью выполнены автором диссертации.

Степень достоверности научных результатов

Достоверность полученных в настоящей работе результатов определяется корректностью и строгостью математических выкладок, а также повторяемостью получаемых экспериментальных иммиттансных спектров, которые находятся в согласии со сторонними методами исследования, выполненными на коммерческих приборах.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, трех глав (одной обзорной и двух основных), раздела с выводами, заключения, раздела с благодарностями и из списка литературы, в который вошло 211 источников на русском, английском и французском языках. Диссертация изложена на 162 страницах и содержит 38 рисунков, 123 формулы и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе, являющейся вспомогательной и представляющей собой литературный обзор, рассматриваются современные подходы к измерению иммиттанса как в частотном, так и во временном представлении, а также приводится теоретический анализ взаимодействия одиночных клеток и клеточных популяций с металлическим электродом. Начинается данная глава с описания принципов работы классических осциллографических и мостовых методов измерения иммиттанса, после чего изложение материала

фокусируется на современных измерительных подходах таких как мост Verberian-Cole, метод синхронного усиления (FRA) и Фурье-ЭИС. Далее следует описание электрических свойств контакта металл/электролит в малосигнальном приближении, а именно рассматриваются формирование двойного электрического слоя в приближении Дебая и в модели Гуи-Чапмена-Штерна и явление дисперсии емкости двойного слоя в теории Варбурга и модели Levie. Завершается глава изложением модели Giæver-Keese, которая уже целиком описывает свойства контакта металл/электролит/клетка.

Во второй главе описывается разработанная в настоящей диссертации АФ-ЭИС, а также проводится ее экспериментальное сравнение с Фурье-ЭИС. Основная идея АФ подхода к измерению иммитанса состоит в поиске (обучении) и в последующем анализе такого цифрового фильтра, который связывал бы между собой токовый отклик образца (выходной сигнал фильтра) и приложенное к нему напряжение (входной сигнал фильтра). Далее, после того, как такой фильтр будет найден, несложно вычислить адмиттанс образца, который пропорционален передаточной функции обученного адаптивного фильтра (Рисунок 1), что и доказывается в начале данной главы. А именно, в ее первом параграфе дается математическое описание метода АФ-ЭИС, в частности, вводится полу-БИХ модель адаптивного фильтра, которая с математической точки зрения описывает связь между током, протекающим через образец, и приложенным к нему напряжением с помощью уравнения

$$J_k^a = \sum_{j=1}^{\ell_d} d_j J_{k-j} + \sum_{j=0}^{\ell_n} n_j V_{k-j}, \quad (1)$$

которое в итоге приводит к следующей задаче на обучение адаптивного фильтра

$$\sum_{k=\max(\ell_n, \ell_d)}^L \left| J_k - \sum_{j=1}^{\ell_d} d_j J_{k-j} - \sum_{j=0}^{\ell_n} n_j V_{k-j} \right|^2 = \min, \quad (2)$$

где V_k и J_k – временные последовательности зондирующего напряжения и токового отклика соответственно (k – счетчик по времени), n_j и d_j – весовые коэффициенты (ВК), L – общее число отсчетов и $\max(\ell_n, \ell_d)$ – порядок фильтрации. Данная полу-БИХ модель позволяет свести саму задачу обучения адаптивного фильтра к решению системы линейных алгебраических уравнений и одновременно обеспечивает большую его гибкость по сравнению с КИХ моделью.

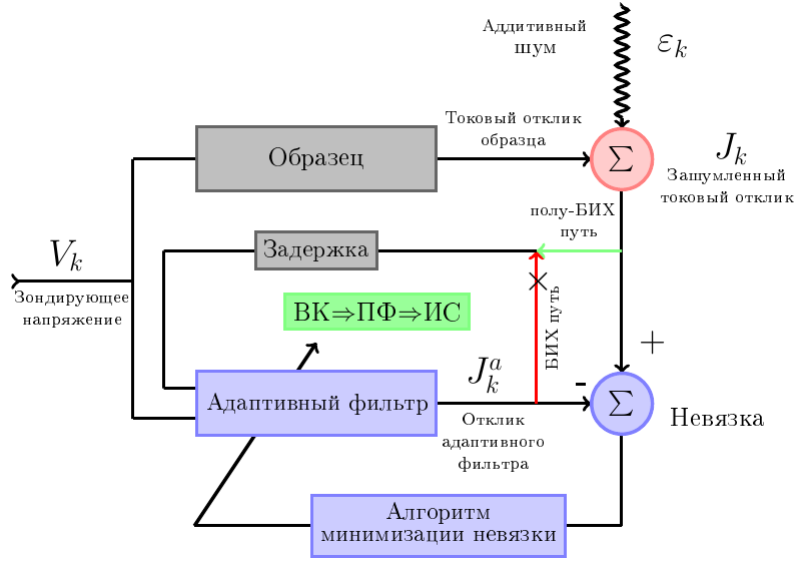


Рисунок 1 – Получение ИС с помощью адаптивной фильтрации. Классическая задача идентификации для случая БИХ-фильтра соответствует включенной БИХ-ветке (красная) и отключенной полу-БИХ ветке (зеленая), в противном случае схема описывает полу-БИХ фильтр. Если обе ветки отключены, схема описывает идентификацию с помощью КИХ-фильтра. Здесь ПФ – передаточная функция адаптивного фильтра.

Затем во втором и третьем параграфах устанавливается связь между передаточной функцией адаптивного фильтра и иммиттансом образца, а именно показывается, что адмиттанс образца Y может быть вычислен через аппроксимацию Levy его спектра, параметрами которой являются ВК, а именно

$$Y \approx \left(\sum_{j=0}^{\ell_n} n_j \varphi_j \right) / \left(1 - \sum_{j=1}^{\ell_a} d_j \varphi_j \right), \quad (3)$$

где $\varphi_j(f) = \exp[2\pi i \cdot j(f/f_0)]$ – Фурье-образ задержки на $\Delta t = 1/f_0$, f – частота и f_0 – частота дискретизации. Также в третьем параграфе устанавливается аппаратная и весовая функции АФ-ЭИС, которыми являются соответственно функция Котельникова

$$K = \frac{\sin(\pi f T)}{\pi f}, \quad (4)$$

и квадрат модуля зондирующего напряжения (здесь T – общее время сбора данных). Затем в четвертом параграфе приводятся результаты исследования границ применимости АФ-ЭИС, из которых следует, что данная техника применима для широкого класса систем, а пятый параграф посвящен вопросу практического вычисления ВК для полу-БИХ модели, из которого теоретически доказывается, что ошибки в определении ВК и в определении иммиттанса образца убывают обратно пропорционально корню из порядка

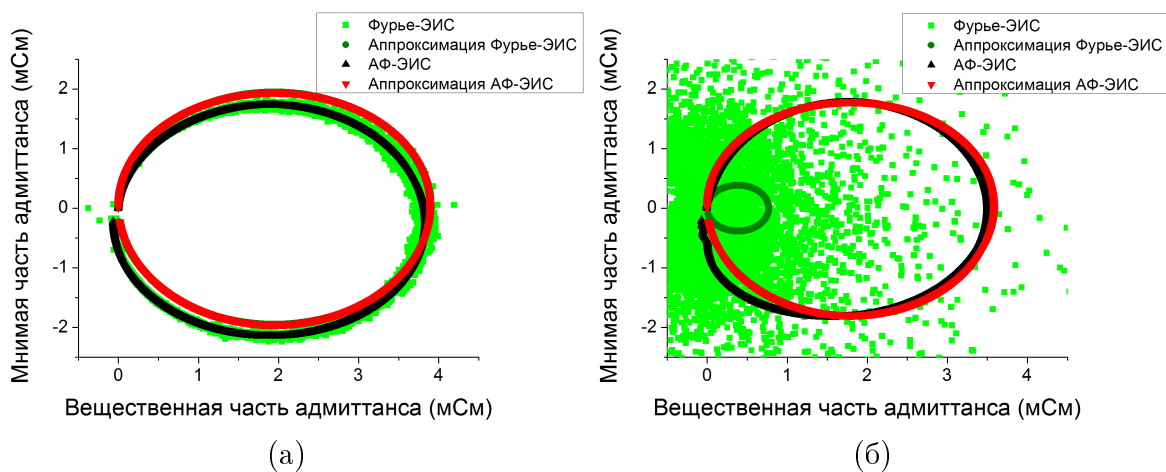


Рисунок 2 – Сравнение результатов работы АФ-ЭИС и Фурье-ЭИС в условиях высокого (а) и низкого (б) соотношения сигнал/шум на примере измерения иммиттанса последовательной RLC-цепи.

фильтрации, то есть

$$\text{Ошибка ВК} \leq C \frac{\langle \varepsilon^2 \rangle}{\sqrt{l_n + l_d + 1}}. \quad (5)$$

откуда следует устойчивость АФ-ЭИС к шумам и помехам, которые нескоррелированы с зондирующим напряжением. Здесь величина C определяется обусловленностью задачи (2), а $\langle \varepsilon^2 \rangle$ – уровень шума. Наконец, в разделе 2.2 приводятся результаты экспериментального сравнения АФ-ЭИС и Фурье-ЭИС, в котором на примере исследования иммиттанса последовательной RLC-цепи было продемонстрировано, что АФ-ЭИС позволяет проводить измерения в условиях сильного зашумления вплоть до соотношения сигнал/шум -25 дБ, в то время как Фурье-ЭИС перестает корректно работать уже при соотношении сигнал/шум 3 дБ (Рисунок 2 и Таблица 1).

Дополнительно в конце данного раздела помещены вспомогательные вычисления, которые доказывают равномерность спектра зондирующего напряжения, создаваемого генератором с качающейся частотой, а также демонстрируют появление виртуальной индуктивности в наблюдаемых спектрах, которая обусловлена неидеальностью амперметра, построенного на операционном усилителе.

Далее следует **третья глава**, которая посвящена приложению АФ-ЭИС для исследования клеточных популяций и одиночных клеток. В начале данной главы приводится описание экспериментальной установки, а также используемые при проведении экспериментов материалы и методы. Затем приводятся экспериментальные данные, посвященные исследованию с помощью АФ-ЭИС контакта металл/электролит на примере золотого, ИТО- и рутениевого электрода, которые доказывают применимость разработанного метода для изучения свойств био-специфичных электродов, обладающих сложной, развитой поверхностью и, как следствие, сложным иммиттансным спектром,

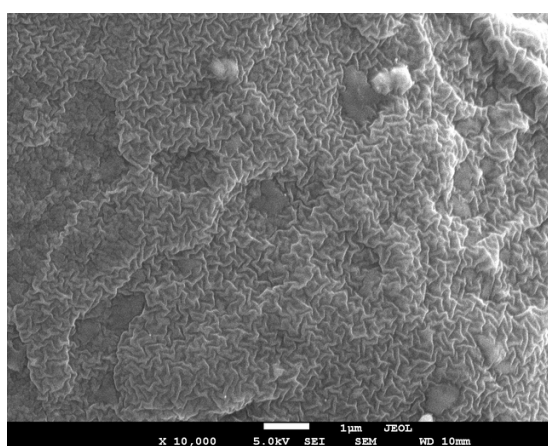
эквивалентная схема которого содержит несколько R -СРЕ звеньев (Рисунок 3).

Таблица 1 – Результаты аппроксимации иммиттансных спектров последовательной RLC-цепи, полученных с помощью АФ-ЭИС и Фурье-ЭИС при различном соотношении сигнал/шум. Из приведенных данных следует, что обе методики дают одинаковые значения параметров эквивалентной цепи в случае слабого зашумления, в то время как в условиях сильного зашумления корректные значения R , L и C позволяет получить только АФ-ЭИС.

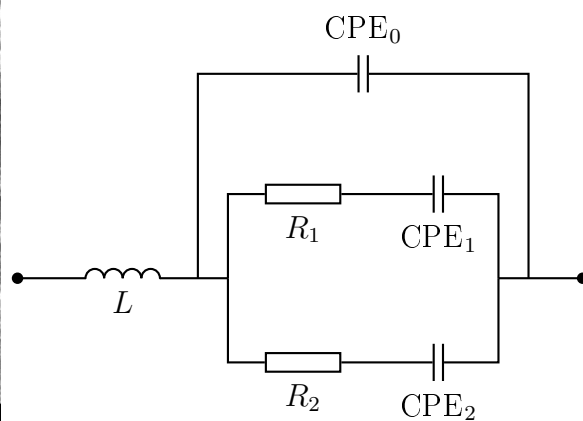
Метод и С/Ш	Номиналы элементов		
	R , Ом	C , нФ	L , мГн
АФ-ЭИС, 30 дБ	256.7 ± 0.4	9.209 ± 0.007	19.36 ± 0.02
АФ-ЭИС, 3 дБ	290 ± 50	9.7 ± 0.9	19 ± 2
Фурье-ЭИС, 30 дБ	256.7 ± 0.3	9.207 ± 0.006	19.360 ± 0.007
Фурье-ЭИС, 3 дБ	1000 ± 2000	4 ± 3	50 ± 30

Далее следует изложение результатов применения АФ-ЭИС для исследования контакта МЭК, которое начинается с экспериментов, направленных на детектирование и оценивание жизнеспособности одиночных клеток на поверхности микроэлектродов как с помощью АФ-ЭИС, так и с помощью Фурье-ЭИС, после чего в данной главе развивается идея использования АФ-ЭИС одиночных клеток в качестве основы для создания биоэлектронных сенсоров, реагирующих на цитотоксические вещества (химическое воздействие), поражающее излучение (физическое воздействие) и растворы ферментов (биологическое воздействие).

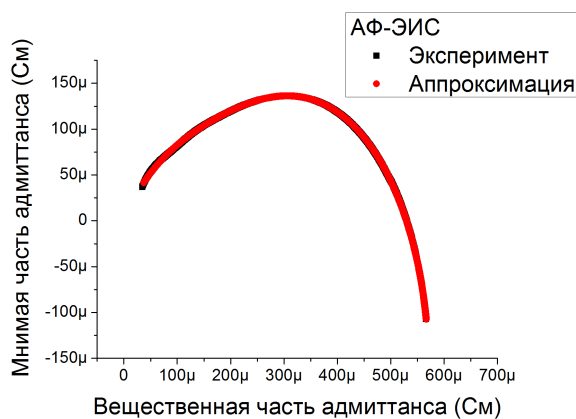
Первый тип АФ-ЭИС биосенсоров был апробирован на примере детектирования цитотоксического эффекта, вызванного добавлением в клеточную среду разрушающего клеточную мембрану детергента Тритон X-100 (объемная доля 2.5 мкл на 1 мл среды). Как видно из Рисунка 5(а) и (б), при добавлении в клеточную среду данного цитотоксического вещества модуль импеданса содержащего клетку электрода начинает экспоненциально уменьшаться до уровня контрольного электрода, что связано с разрушением клеточной мембраны и гибелью клетки под его действием. Данный эффект обладает статистической устойчивостью, которая позволяет оценить время гибели клеток под действием Тритона X-100 как 11 ± 7 с. При этом стоит подчеркнуть, что отчетливо видимая в микроскоп флуоресценция йодистого пропидия, свидетельствующая о гибели клетки, возникает только через 81 ± 50 с после добавления Тритона X-100 в клеточную среду, то есть биосенсорная АФ-ЭИС техника детектирования цитотоксических соединений обладает значительно большим быстродействием, чем классические флуоресцентные датчики. Из результатов проведения аналогичного эксперимента на коммерчески доступном ЭИС цитосенсоре xCelligence [Рисунке 5(в)] также следует, что добавление Тритона X-100 в клеточную среду приводит к экспоненциальному умень-



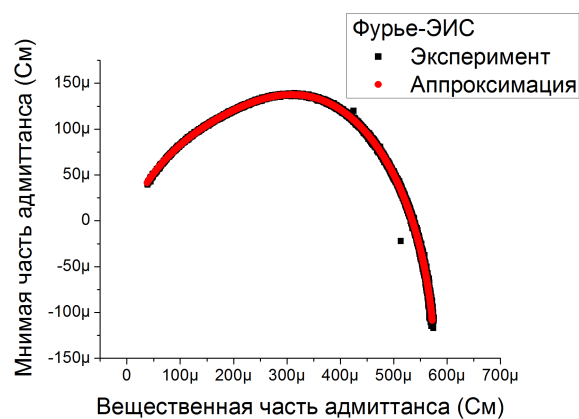
(a)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 3 – Исследование свойств рутениевого электрода. (а) СЭМ изображение поверхности электрода, на которой видна иерархическая структура, состоящая из больших пор, внутри которых находятся маленькие зигзагообразные трещины. (б) Эквивалентная схема рутениевого электрода, у которой одно R - CPE звено соответствует импедансу пор с трещинами, а второе – импедансу трещин непосредственно на поверхности электрода. АФ-ЭИС (в) и Фурье-ЭИС (г) ИС рутениевого электрода и их аппроксимации схемой (б). Как видно из полученных данных, АФ-ЭИС позволяет без искажений измерять ИС электродов, обладающих сложной структурой и, как следствие, сложной эквивалентной схемой.

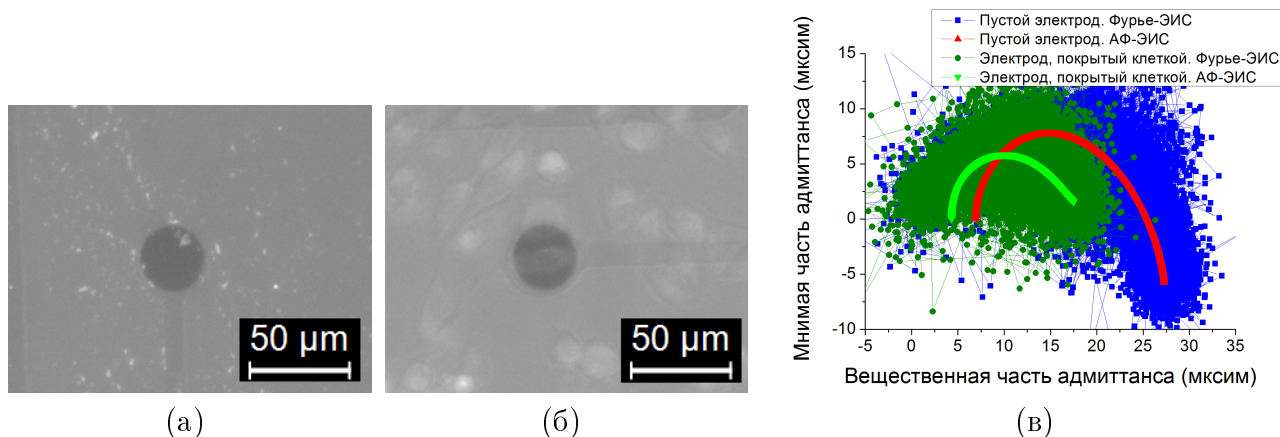


Рисунок 4 – Сравнение АФ-ЭИС и Фурье-ЭИС как методов детектирования одиночных клеток на поверхности микроэлектродов. (а) Изображение пустого (контрольного) электрода. (б) Изображение электрода с клеткой. (в) Полученные с помощью АФ-ЭИС и Фурье-ЭИС спектры данных электродов. Как видно из приведенных результатов, Фурье-ЭИС спектры сильно зашумлены, и поэтому с их помощью невозможно надежно определить наличие клетки на электроде. В то же время АФ-ЭИС спектры представляют собой гладкие, незашумленные кривые, из анализа которых можно сделать вывод о том, что электрод, содержащий клетку, имеет меньший высокочастотный адмиттанс, чем пустой электрод, что согласуется с моделью Giæver-Keese [Grimnes and Martinsen, 2015; I. Giaever et al., 2012; Stupin et al., 2021].

пению модуля импеданса контакта МЭК,⁴ однако, поскольку в приборе xCelligence импеданс измеряется только на одной частоте, по данным, представленным на Рисунке 5(в), невозможно достоверно связать изменение ИС контакта МЭК именно с гибелью клеток. В частности, аналогичное падение импеданса на одной частоте может быть связано с изменением проводимости среды после добавления Тритона X-100 или с разрушением изоляции электродов. В противоположность xCelligence, АФ-ЭИС биосенсор проводит измерения в целом диапазоне частот и позволяет таким образом по низкочастотной составляющей ИС оценивать состояние электрода и клеточной среды, а по высокочастотной составляющей определять состояние клеток. Так, из представленной на Рисунке 5(б) частотной эволюции импедансных спектров контакта МЭК видно, что их низкочастотные составляющие движутся параллельно друг другу и сходятся к спектру контрольного электрода, следовательно, свойства среды не меняются и изменения в высокочастотной составляющей спектров связано именно с гибелью клеток.

⁴В приборе xCelligence импеданс измеряется в величинах $\text{Cell Index} = Z(t)/Z(0) - 1$, где $Z(t)$ – модуль ИС на частоте 10 кГц в момент времени t , $Z(0)$ – модуль ИС на частоте 10 кГц в момент начала проведения эксперимента [Peters et al., 2015].

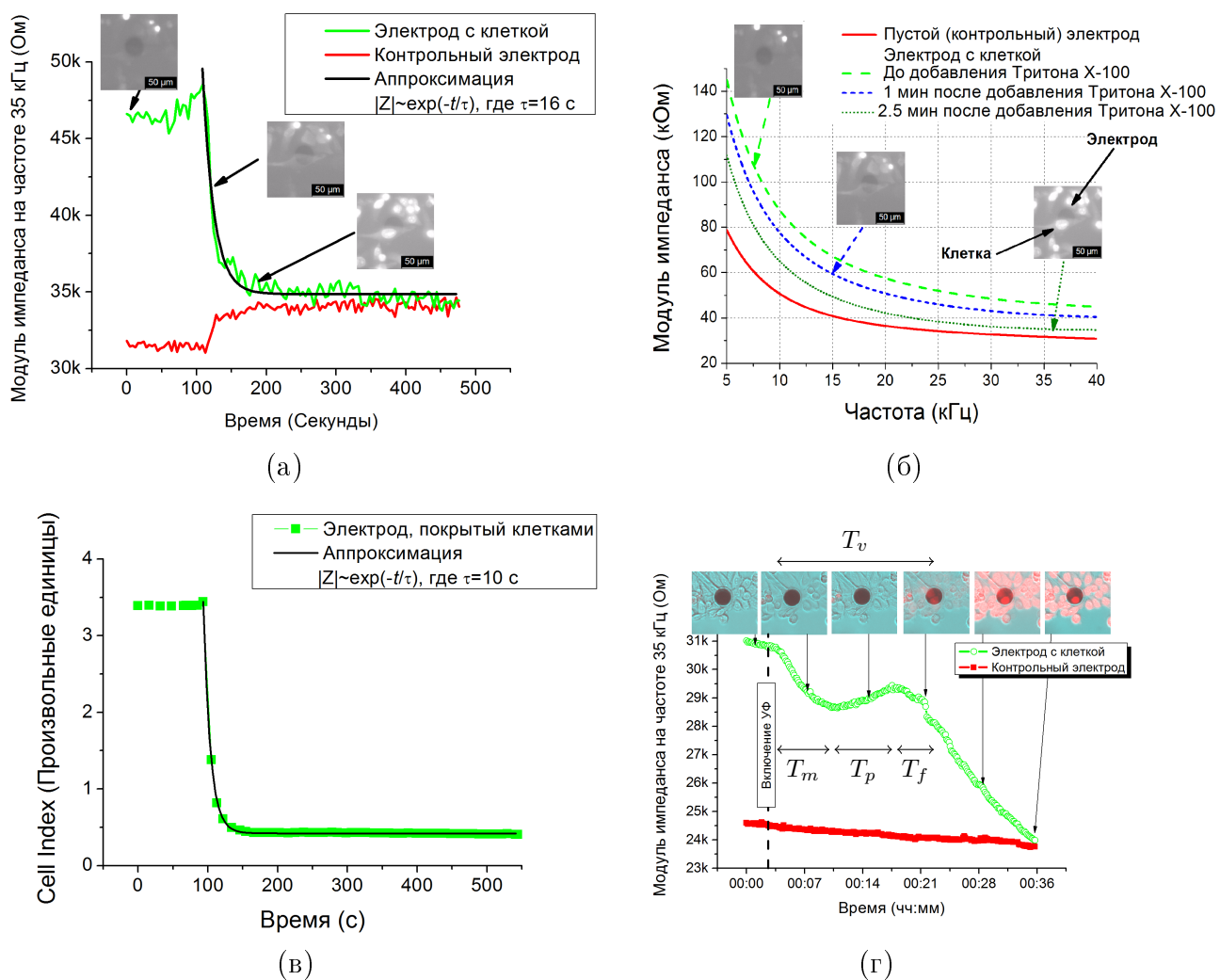


Рисунок 5 – Демонстрация работы ЭИС-сенсоров цитотоксических соединений (а)-(б) и АФ-ЭИС сенсора поражающего действия УФ излучения. (а) и (г) Временная и (б) почастотная развертка эволюции ИС контакта МЭК, полученные с помощью АФ-ЭИС биосенсора. (в) Результат работы биосенсора на основе коммерческого прибора xCelligence (ACEA Bioscience, США). Фотографические вставки на панели (г) выполнены в псевдоцвете: синему каналу соответствует изображение в проходящем свете, а красному каналу соответствует флуоресценция йодистого пропидия.

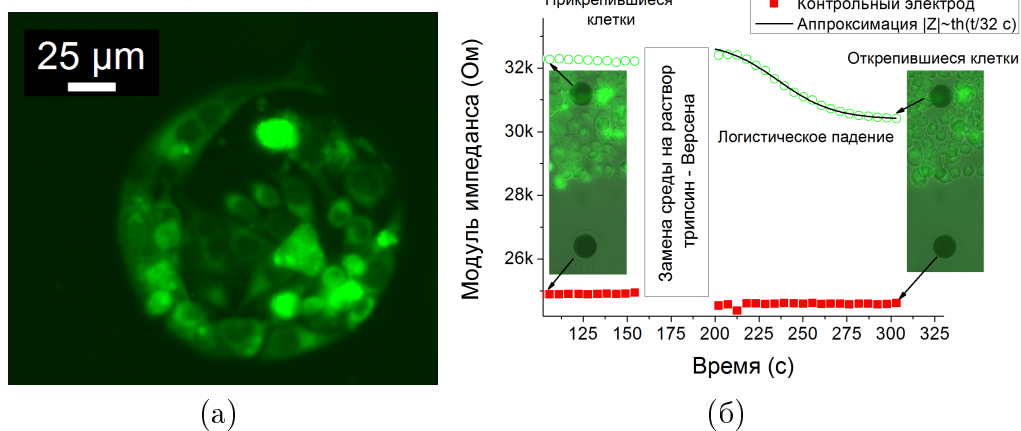


Рисунок 6 – Результаты апробации клеточной lift-off литографии (а) и АФ-ЭИС детектора ферментов (б). Из полученных данных видно, что после замены клеточной среды на раствор трипсин-Версена импеданс покрытого клетками электрода начинает логистически уменьшаться в согласии с Ур. (6), в то время как импеданс контрольного электрода не меняется, следовательно, все изменения импедансе покрытого клетками электрода носят биологический характер.

Тестирование второго типа биосенсоров было проведено на примере исследования влияния УФ излучения на контакт МЭК [Рисунок 5(г)]. Как видно из полученных данных, модуль ИС покрытого одиночными клетками электрода при его УФ облучении немонотонно меняется во времени: сначала наблюдается его уменьшение (участок T_m), затем модуль ИС начинает возрастать (участок T_p), далее он достигает максимума, после чего следует его естественное сначала медленное (участок T_f), а затем резкое уменьшение до уровня ИС контрольного электрода. Такое немонотонное поведение ИС электрода, на поверхности которого находятся облученные клетки, можно объяснить образованием пузырей на поверхности их клеточной мембраны при поглощении ими некоторой дозы УФ излучения [Charras et al., 2008; Montgomery et al., 1957]. Образовавшиеся пузыри препятствуют протеканию электрического тока, что и приводит к росту модуля ИС контакта МЭК. Далее, при поглощении клетками еще большей дозы УФ излучения данные пузыри начинают разрушаться, в результате чего внутри клеточных мембран образуются поры, через которые начинает свободно протекать электрический ток, что и приводит к резкому падению модуля импеданса содержащего облученные клетки электрода. Описанная выше форма зависимости ИС от времени также обладает статистической устойчивостью, которая позволяет оценить длительность каждого из характерных ее участков как $T_m=8$ мин 42 с (± 41 с), $T_p=10$ мин 26 с (± 2 мин 14 с) и $T_f=3$ мин 54 с (± 2 мин 43 с). В то же время, длительность интервала T_v между началом УФ облучения и появлением флуоресценции йодистого пропидия, которая сигнализирует о гибели клеток, в проведенных экспериментах составила 21 мин 52 с (± 10 мин 39 с), что снова подтверждает бóльшую чувствительность АФ-ЭИС диагностики

состояния клеток по сравнению со стандартным подходом на основе флуоресцентной микроскопии.

Наконец, работоспособность АФ-ЭИС сенсора, реагирующего на ферменты, была продемонстрирована на примере исследования влияния раствора трипсин-Версена на иммиттанс контакта МЭК (Рисунок 6). В данных экспериментах для повышения надежности регистрации биологического воздействия на свойства контакта МЭК протокол пересева клеток на микроэлектроды был оптимизирован с помощью разработанной в настоящей диссертации техники клеточной lift-off литографии, которая позволяет создавать заданное наперед распределение клеток на поверхности мультиэлектродного массива. Демонстрация возможностей данной техники пробоподготовки на примере формирования дискообразного распределения клеток приведена на Рисунке 6(а), из которого видно, что данная технология позволяет создавать обладающие резкими границами и сопоставимые по размерам с одиночными клетками структуры. С помощью техники клеточной lift-off литографии можно также формировать пары из близкорасположенных электродов, один из которых в каждой паре покрыт клетками, а другой является пустым, контрольным электродом. Таким образом, в каждой такой паре контрольный электрод находится на максимально близком расстоянии от покрытого клетками электрода, то есть исследуемый и контрольный электроды находятся в одинаковых физико-химических условиях, и, следовательно, использование таких структур типа «пустой электрод – электрод с клетками» позволяет по разнице в ИС этих электродов отличать биологические явления от физико-химических феноменов, связанных, например, с диффузией или переносом тепла в клеточной среде. На фотографических вставках на Рисунке 6(б) изображен пример такой пары, а на самом графике, представленном на данном рисунке, приведена эволюция иммиттансных спектров электродов из этой пары до и после замены клеточной среды на раствор трипсин-Версена. Как видно из полученных данных, под действием раствора трипсин-Версена клетки начинают менять свою форму с эпитеолиоподобной на сферическую, что приводит к уменьшению площади их контакта с электродом и, как следствие, к логистическому уменьшению модуля ИС контакта МЭК. Такое поведение ИС также обладает статистической устойчивостью и может быть описано с помощью несложной модели, в которой упругие силы в клетке заменяются действием одной эффективной пружины, сила растяжения которой приложена между верхней и нижней частями мембраны и в которой потери пропорциональны площади контакта клетки с электродом. В таких предположениях эволюция высокочастотной части ИС контакта МЭК при воздействии на него раствором трипсин-Версена описывается выражением

$$Z(t) = A + c \times \operatorname{th} \left(\frac{t - t_0}{\tau} \right), \quad (6)$$

где A , c и t_0 – масштабные и сдвиговые подгоночные параметры, а τ – характерное время дезадгезии клеток от поверхности электродов. Данная зависимость хорошо описывает экспериментальные данные и позволяет по ним оценить время дезадгезии клеток как 32 ± 6 с, что находится в согласии со стандартными протоколами пересева клеток HeLa [Kangro, 1996].

Далее следует заключительная часть диссертации, в которой содержится перечисление **основных выводов работы**:

- В результате теоретического анализа АФ-ЭИС была установлено, что весовые коэффициенты определяют аппроксимацию Леву для иммитанса, причем аппаратной и весовой функциями АФ-ЭИС является функция Котельникова и квадрат модуля зондирующего напряжения соответственно.
- Дальнейший теоретический анализ показал, что увеличивая порядок фильтрации, можно сколь угодно ослабить влияние шумов на вычисление ВК, а, следовательно, и на вычисляемый по ним иммитансный спектр. Помехоустойчивость АФ-ЭИС была также апробирована на эксперименте и с помощью моделирования, в результате чего было установлено, что АФ-ЭИС обеспечивает стабильность измерений ИС даже в условиях отрицательного соотношения сигнал/шум, где Фурье-ЭИС – «золотой стандарт» ЭИС во временном представлении – перестает корректно работать.
- Гибкость АФ-ЭИС была продемонстрирована на примере исследования биоспецифичных электродов, обладающих сложной, развитой поверхностью и, как следствие, сложной эквивалентной схемой, в результате чего было установлено, что АФ-ЭИС способна без качественных и количественных искажений передавать спектры таких сложных систем.
- Во второй части настоящей диссертации были изложены результаты практического применения АФ-ЭИС для изучения клеточных популяций и одиночных клеток *in vitro*, из которых можно сделать вывод о том, что АФ-ЭИС позволяет получать более статистически точную оценку жизнеспособности одиночных клеток и клеточных популяций *in vitro*, чем Фурье-ЭИС.
- Завершается работа демонстрацией применения АФ-ЭИС для создания сенсора опасных для клеток соединений, датчика поражающего действия УФ излучения и детектора ферментов, чувствительным элементом которых является одиночная живая клетка. Полученные результаты позволяют утверждать, что высокоразрешающая технология ECIS, полученная совмещением АФ-ЭИС, технологии мультиэлектродных матриц, а также разработанной в данной работе техники клеточной lift-off литографии, позволяет создавать надежные и высокочувствительные

биосенсоры, которые по своим характеристикам превосходят классические флуоресцентные датчики, а также стандартную технологию ECIS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате выполнения настоящей диссертации был создан и апробирован помехоустойчивый и высокоразрешающий подход к измерению иммиттансного спектра во временном представлении, в основе которого лежит адаптивная фильтрация – простейший искусственный интеллект. Поскольку разработанная методика позволяет получать ИС в условиях низкого и даже отрицательного соотношения сигнал/шум, в результате ее совмещения с ECIS-подходом к исследованию клеток *in vitro* удалось не только увеличить частотное и временное разрешения технологии ECIS, но и перейти от импедансной диагностики всей клеточной популяции к диагностике каждой отдельной клетки в ней. Достоинства разработанной цитосенсорной технологии были также продемонстрированы в ряде биофизических экспериментов, в ходе которых с ее помощью удалось изучить как химические (на примере детектирования цитотоксического действия детергента Тритон X-100), так и физические (на примере детектирования УФ-излучения) и биологические (на примере детектирования раствора трипсин-Версена) воздействия на электрические свойства клеток. В заключение стоит подчеркнуть, что применение АФ-обработки для получения ИС сочетает в себе достоинства Фурье-ЭИС – высокую скорость измерений, высокое частотное разрешение и широкий диапазон частот – и дополнительно обеспечивает помехоустойчивость измерений, что значительно расширяет возможности ЭИС и ставит ее на принципиально новый уровень во всех областях ее приложений: от диагностики полупроводниковых приборов до создания прецизионных импедансных биодатчиков, где необходимо проводить измерения с низкими уровнями токового отклика и, как следствие, в условиях сильного зашумления. Подобные биодатчики могут найти широкое применение для автоматического контроля качества воды, для обнаружения ядовитых веществ в продуктах питания, а также для создания недорогих персональных сенсоров ядовитых веществ и датчиков поражающего излучения, например, для ядерной и аэрокосмической промышленности и предприятий, работающих с опасными веществами. Можно смело надеяться, что разработанная в данной работе технология АФ-ЭИС найдет не только широкое применение в науке и технике, но также откроет новую нишу в экологических исследованиях и решит большинство актуальных проблем биологии и здравоохранения.

Благодарности

Выражаю благодарность Коняхину С.В., Верлову Н.А., Князеву Н.А., Емельянову А.К., Корневу А.А., Филатову Н.А., Нашёкину А.В., Лихачёву А.И., Кузиной Е.А.,

Абелит А.А. за всестороннюю помощь и поддержку, Рязанцеву М.Н., Вязьмину С.Ю., Тертерову И.Н., Черневу А.Л., Букатину А.С., Павлову С.И., Налитову А.В. и Утёсову О.И. за ценные дискуссии, преподавательский состав СПбАУ за прекрасное образование, а также хочу отдельно поблагодарить свою семью и оргкомитеты конференций «Физика – наукам о жизни» и SPbOPEN.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи

- 1) Stupin, D.D., Koniakhin, S. V., Verlov, N. A. и Dubina, M. V. Adaptive Filtering to Enhance Noise Immunity of Impedance and Admittance Spectroscopy: Comparison with Fourier Transformation // Physical Review Applied. – 2017. – Т. 7. – № 5. – С. 054024. (Scopus)
- 2) Stupin D. D. A Single-Cell Electronic Sensor of Toxins // Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2017. – Т. 917. – № 4. – С. 042006. (Scopus, WOS)
- 3) Stupin D. D. TiN Nanoporous Electrode Covered by Single Cell as Bio-Electronic Sensor of Radiation Hazard //Semiconductors. – 2018. – Т. 52. – № 5. – С. 600-601. (Scopus, WOS)
- 4) Stupin D. D. The single cells and cell populations viability estimation in vitro by the time-domain impedance spectroscopy //Technical Physics. – 2018. – Т. 63. – № 9. – С. 1384-1389. (Scopus, WOS)
- 5) Stupin D. D., Koniakhin S. V. и Verlov N. A. An inexpensive MP3-Player based 45-kHz band noise generator for engineering and scientific applications //JPhCS. – 2018. – Т. 1038. – № 1. — С. 012038. (Scopus, WOS)
- 6) Stupin D. D., Lihachev A. I. и Nashchekin A. V. How to take fractional-order derivative experimentally? //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2018. – Т. 1124. – № 7. – С. 071011. (Scopus)
- 7) Stupin D. D., Kornev, A. A., Filatov, N. A. и Koniakhin, S. V. Cell-substrate lift-off lithography: Proof of concept //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2018. – Т. 1135. – № 1. – С. 012015. (Scopus, WOS)

- 8) Panov, M. S., Grishankina, A. E., Stupin, D. D., Lihachev, A. I., Mironov, V. N., Strashkov, D. M., Khairullina, E. M., Tumkin, I. I. и Ryazantsev, M. N., In Situ Laser-Induced Fabrication of a Ruthenium-Based Microelectrode for Non-Enzymatic Dopamine Sensing // MDPI Materials. – 2020. – Т. 13. – № 23. – С. 5385. (Scopus, WOS)
- 9) Stupin, D. D., Kuzina, E. A., Abelit, A. A., Emelyanov, A. E., Nikolaev, D. M., Ryazantsev, M. N., Koniakhin, S. V. и Dubina, M. V. Bio-Impedance Spectroscopy: Basics and Applications // ACS Biomaterials Science and Engineering 2021, 7, 6, 1962–1986 (Scopus, WOS, на обложке журнала)

Тезисы конференций

- 1) Stupin D.D. “Single-Cell Toxin Detector” // Conference SPbOPEN 2017, Академический Университет, 04.04.2017 - 06.04.2017, Сборник тезисов, С. 166-167
- 2) Stupin D.D. “TiN nanoporous electrode covered by Single Cell as Bio-Electronic Sensor of Radiation Hazard” // Nanostructures 2017, Академический Университет, 26.06.2017 - 30.06.2017, Сборник тезисов, С. 309
- 3) Ступин Д.Д., Коняхин С.В., Верлов Н.А. и Дубина М.В. “Помехоустойчивая иммитансная спектроскопия на базе адаптивной фильтрации: сравнение с преобразованием Фурье” // Физика.СПб 2017, ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 24.10.2017 - 26.10.2017, Сборник тезисов С. 80-82 (*доклад отмечен дипломом*)
- 4) Stupin D.D., Lihachev A.I., and Nashchekin A.V. “How to take fractional-order derivative experimentally?” // Conference SPbOPEN 2018, Академический Университет, 02.04.2018 - 05.04.2018, Сборник тезисов, С. 506-507
- 5) Ступин Д.Д. “Оценка жизнеспособности одиночных клеток с помощью импедансной спектроскопии *in vitro*” // Конференция «Физика – наукам о жизни 2017», ФТИ им. Иоффе, 18.09.2017 - 22.09.2017, Сборник тезисов, С. 114 (*доклад отмечен дипломом*)
- 6) Stupin D.D., Koniakhin S.V., and Verlov N.A. “Adaptive Filtering to Enhance Noise Immunity of Immittance Spectroscopy: Comparison with Fourier Transformation” // 11th International Workshop on Impedance Spectroscopy Technische Universitat Chemnitz, Хемниц, Германия, 24.09.2018 - 28.09.2018, Program Book, С. 21
- 7) Ступин Д.Д. и Корнев А.А. “Исследование одиночных клеток и клеточных популяций с помощью электрической импедансной спектроскопии во временном

- представлении” // Конференция «Физика.СПб 2018», ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 22.10.2018 - 24.10.2018, Сборник тезисов, С. 48-49
- 8) Daniil D. Stupin, Nikita A. Filatov, Ekaterina A. Kuzina, and Anton S. Bukatin “Cell-Substrate Lift-off Lithography” // Conference SPbOPEN 2019, Академический Университет, 22.04.2019 - 25.04.2019, Сборник тезисов, С. 214-215 (*доклад отмечен дипломом*)
 - 9) Ступин Д. Д., Лихачёв А. И., Нащёкин А. В. и Корнев А. А. “Комплексное исследование свойств биоэлектродов” // Конференция «Физика.СПб 2019», ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 19.10.2019 - 23.10.2019 Сборник тезисов, С. 207-208
 - 10) Ступин Д.Д. и А.А. Корнев “Одиночная клетка как детектор токсинов” // Конференция «Физика – наукам о жизни 2019», ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 14.10.2019 - 18.10.2019, Сборник тезисов, С. 193
 - 11) Е.А. Кузина и Д.Д. Ступин “Эффект сохранения псевдоемкости контакта металл/электролит/клетка” // Конференция «Физика – наукам о жизни 2019», ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 14.10.2019 - 18.09.2019, Сборник тезисов, С. 192
 - 12) Abelit A.A. and Stupin D.D. “The adaptation of cell-substrate impedance sensing technique for suspension cell lines” // Conference SPbOPEN 2020, Академический университет, 27.04.2020 - 30.04.2020, Сборник тезисов, С. 179-180 (*доклад отмечен дипломом*)
 - 13) Корнев А.А., Емельянов А.К., Кузина Е.А., Ступин Д.Д. и Дубина М.В. “Разработка помехоустойчивого цитосенсора для регистрации токсинов” // XXII Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» СПбГУ, 20.04.2020 - 20.04.2020 Сборник тезисов С. 266-267 (*доклад отмечен дипломом*)
 - 14) Ступин Д.Д. и Абелит А.А. “Фотоимпедансный эффект в контакте металл/электролит/клетка” // Конференция «Физика.СПб 2020», ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 19.10.2020 - 23.09.2020, Сборник тезисов С. 78-79