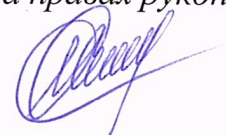


*На правах рукописи*



**Стойнова Анастасия Михайловна**

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АУТОАНТИТЕЛ  
ПРИ СОЗДАНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ КОНЬЮГАТОВ  
«НАНОНОСИТЕЛЬ-БИОЛИГАНД»**

1.5.6. – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

МОСКВА – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов»

**Научный руководитель:** **Станишевский Ярослав Михайлович**  
доктор химических наук, профессор,  
директор Института биохимической  
технологии и нанотехнологии  
Российского университета  
дружбы народов

**Официальные оппоненты:** **Левачев Сергей Михайлович**  
доктор химических наук,  
доцент кафедры коллоидной химии  
химического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова

**Воейкова Татьяна Александровна**  
кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории белковой инженерии  
НИЦ "Курчатовский институт",

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Защита диссертации состоится «21» июня 2022 г. в 14 часов 00 минут на заседании Диссертационного Совета 99.0.027.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss/muctr.ru>.

Автореферат диссертации разослан «      »      2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 99.0.027.03,  
кандидат технических наук, доцент

 И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время широко применяются конъюгаты «наночастица – библиганд» для адресной доставки лекарств (W.Yang *et al.*, 2018), при создании тест-систем для диагностики заболеваний различной этиологии (G. Japolla *et al.*, 2018), а также визуализации патологических процессов в организме (D.Rand *et al.*, 2011). Актуальной задачей при разработке конъюгатов «наночастица – библиганд» является сохранение высокой активности библиганда, иммобилизованного с наночастицей, что является важным критерием при создании высокочувствительных диагностических тест-систем.

### **Цели и задачи исследования.**

Целью работы являлось изучение влияния наночастиц различной природы на иммунологические свойства моноклональных антител к тиреоглобулину щитовидной железы при конструировании конъюгатов «наночастица-антитело».

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Получить частицы-носители различной природы в наноразмерном диапазоне с узким распределением по размерам.
2. Изучить динамику образования металлических наночастиц, кинетику полистирольных наночастиц, а также изучить физико-химические свойства и исследовать пригодность их использования в качестве носителей моноклональных антител при создании конъюгатов «наночастица-антитело» («НН-АТ»).
3. Провести иммобилизацию моноклональных антител к тиреоглобулину (ТГ) с наночастицами и определить наличие их связывания методом электрофореза.
4. Исследовать иммунологические свойства моноклональных антител к различным эпитопам ТГ, используя разработанные конъюгаты «НН-АТ».
5. Апробировать разработанные конъюгаты «НН-АТ» при диагностике заболеваний щитовидной железы методом иммуноферментного анализа (ИФА).

### **Научная новизна.**

1. Впервые выявлено влияние природы наночастиц на иммунологические свойства иммобилизованных моноклональных антител к тиреоглобулину щитовидной железы. Показано, что при создании диагностических конъюгатов «наночастица-антитело» («НН-АТ») предпочтительно использование наночастиц серебра, при котором наблюдается дозо-зависимый эффект усиления сигнала ИФА на 100 %.
2. Впервые проведен сопоставительный анализ иммунологической активности моноклональных антител к различным эпитопам ТГ, используя разработанные конъюгаты «НН-АТ».
3. Впервые предложен подход к регуляции биологической активности моноклональных антител тиреоглобулина, с применением наночастиц различной природы и концентрации при разработке высокочувствительных

диагностических тест-систем для выявления тиреоглобулина щитовидной железы.

### **Практическая и теоретическая значимость исследования.**

1. Разработаны условия получения наноносителей с заданным комплексом свойств. Показана возможность их применения при создании конъюгатов «наноситель-антитело» («НН-АТ»), используемых в иммунодиагностике тиреоглобулина щитовидной железы.
2. Изучено модулирующее влияние наноносителей различной природы (золота, серебра и полистирольных частиц) на иммунологические свойства моноклональных антител к основному белку щитовидной железы - тиреоглобулину. Установлено, что использование наночастиц серебра и золота позволяет регулировать чувствительность иммуноферментного анализа с целью повышения или снижения предела обнаружения тиреоглобулина или моноклональных антител к его эпитопам.
3. Разработана база данных диагностических тест-систем на основе серологических методов, для определения вирусных, бактериальных и аутоиммунных заболеваний, и получено Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2018622011 от 11.12.2018г
4. Разработана база данных диагностических тест-систем с использованием наночастиц для определения маркеров аутоиммунных заболеваний, и получено Свидетельство о государственной регистрации базы данных № № 2019622171 от 25.11.2019.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Результаты получения частиц-носителей различной природы в наноразмерном диапазоне с узким распределением по размерам.
2. Результаты изучения динамики, кинетики и физико-химических свойств полученных наночастиц.
3. Результаты исследования пригодности использования полученных наночастиц в качестве носителей моноклональных антител при создании конъюгатов «наноситель-антитело» («НН-АТ»).
4. Результаты иммобилизации наночастиц с моноклональными антителами и исследования активности полученных конъюгатов «НН-АТ» при детекции с ТГ в иммуноферментном анализе (ИФА)
5. Результаты апробации разработанных конъюгатов «НН-АТ» при диагностике заболеваний щитовидной железы методом ИФА.

**Надежность и достоверность** полученных результатов основана на статистической значимости экспериментальных данных. Результаты теоретических исследований подтверждены экспериментальными данными, полученными при помощи современных инструментальных методов химического, структурного и иммунобиологического анализов, включающих в себя спектрофотометрию, метод электрофоретического светорассеяния, спектроскопию кросс-корреляции фотонов,

иммуноферментный анализ, электрофорез белков, метод просвечивающей электронной микроскопии.

**Апробация результатов исследования.** Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: 11-ом международном форуме РосБиоТех, Россия, Москва, 2017 г.; Международном форуме по Наномедицине среди стран Балтийского региона «NanoBSR», Швеция, Уппсала, 2017г.; 10-м Международном конгрессе по вопросам химической инженерии (10<sup>th</sup> World Congress of Chemical Engineering) Испания, Барселона, 2017 г.; Международном конгрессе по биохимии FEBS Congress, Чехия, Прага, 2018 г.; Международной конференции SmartBIO, Литва, Каунас, 2018 г.; Научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности», Россия, Москва, 2018; Международной конференции по вопросам материалов и дизайна (International Workshop on Materials and Design), Великобритания, Оксфорд, 2019 г.

**Внедрение результатов исследования.**

1. Результаты исследований были использованы в проекте НИР при грантовой поддержке коммерчески ориентированных научно-технических проектов молодых ученых по программе «УМНИК» от Фонда содействия инновациям 2018-2020 гг.
2. Материалы диссертационной работы вошли в курсы лекций и практических занятий по дисциплине «Биохимические технологии получения БАС» для студентов, обучающихся в магистратуре по направлению подготовки 04.04.01 «Химия» Российского университета дружбы народов (РУДН) г.Москва.

**Личный вклад автора.** Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, диссертант непосредственно участвовал в планировании, выполнении эксперимента и обработке данных. Лично автором выполнены экспериментально-аналитические исследования по получению наночастиц различной природы и диаметра, а также изучению их физико-химических свойств, иммобилизации биополимеров с наночастицами и созданию конъюгатов «НН-АТ», осуществлена статистическая обработка данных и проведено обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии и выполнении всех этапов исследования: от постановки задач и их реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и их внедрения в практику.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из которых 2 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки России, 3 статьи и 2 тезисов в журналах, представленных в международных базах данных Scopus и Web of Science. По результатам исследования получено 2 свидетельства о регистрации баз данных.

## **Объем и структура диссертации.**

Диссертационная работа состоит из Введения, Обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты и их обсуждение», Заключения, Выводов, Списка литературы и приложений. Материалы диссертации изложены на 113 страницах машинописного текста, включая 12 таблиц и 40 рисунков. Список литературы содержит 152 работы.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность коллективу лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН и кафедре химии и технологии высокомолекулярных соединений имени С.С. Медведева РТУ за конструктивную критику и профессиональные консультации при подготовке диссертационной работы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты и методы исследования**

Металлические наночастицы получали методом химического восстановления танином соли серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) и золота ( $\text{HAuCl}_4$ ).

Наночастицы полистирола получали методом гетерофазной полимеризации в присутствии избыточного количества ПАВ и в отсутствие ПАВ.

Динамику образования наночастиц серебра и золота измеряли методом спектрофотометрии на приборе PerkinElmerLambda 650/850/950 UV / VISspectrometr.

Размер и распределение наночастиц по размерам определяли методом спектроскопии кросс-корреляции фотонов на приборе Nanophox Symphatec GmbH и методом просвечивающей электронной микроскопии на приборе JEOL JEM-2100.

Дзета- потенциал ( $\xi$ ) наночастиц измеряли методом электрофоретического рассеяния света на приборе Malvern.

Тиреоглобулин выделяли из супернатанта, полученного в результате ультрацентрифугирования гомогената ткани щитовидной железы. Очищенный тиреоглобулин выделяли методом гель-фильтрации.

В качестве биологически активных молекул при конструировании конъюгатов «носитель-биолиганд» использовали аффинно-очищенные моноклональные антитела к различным эпитопам тиреоглобулина щитовидной железы человека (MкАТ 1. и MкАТ 2.).

Исследование иммунологических свойств MкАТ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Получение пероксидазных конъюгатов проводили перйодатным методом по Nakane.

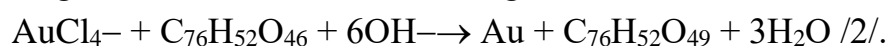
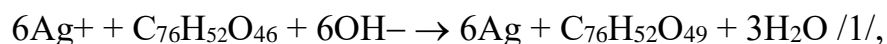
Реакцию связывания наночастиц с моноклональными антителами подтверждали электрофорезом белков в полиакриламидном геле.

Исследование влияния иммобилизованных наночастиц на иммунологические свойства антител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

## Результаты и обсуждение

На первом этапе экспериментов было необходимо получить металлические наносистемы различной природы с узким распределением по размерам. Для этого методом химического восстановления танином соли серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) и золота ( $\text{HAuCl}_4$ ) в присутствии буферного раствора тетрабората натрия с  $\text{pH}=9$  были получены наночастицы серебра ( $\text{Ag}$ ) и золота ( $\text{Au}$ ).

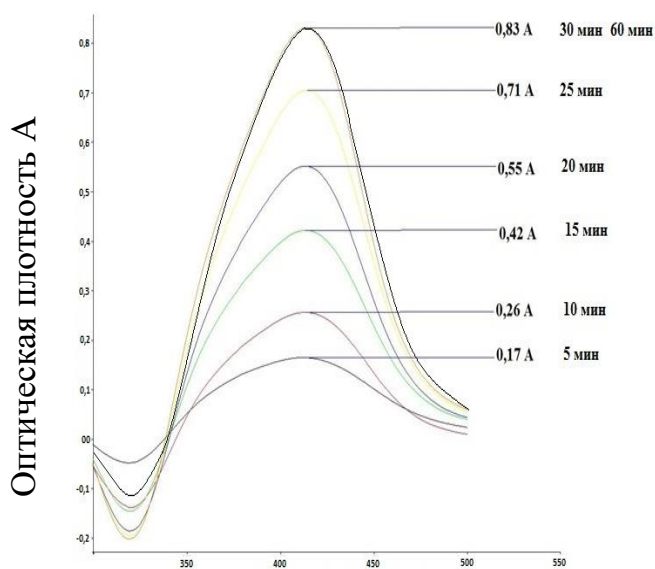
В реакции восстановления серебра и золота танин –  $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$  переходит в флобафены  $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{49}$  (Воюцкий С.С., Панич Р.М., 1974) по реакциям:



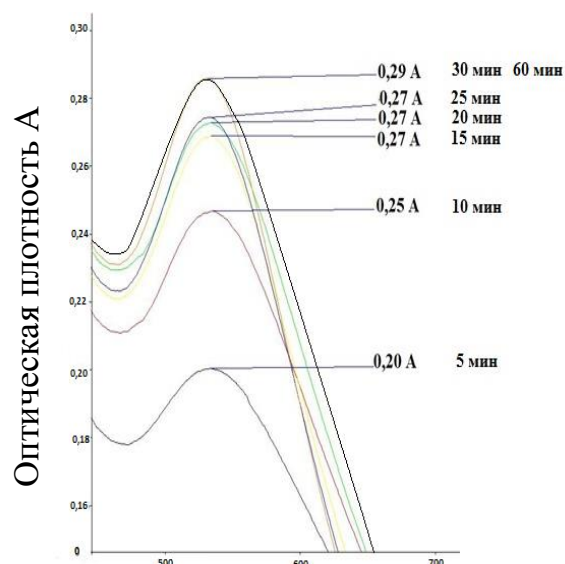
Процесс восстановления проходит в избытке танина, поэтому свободные ионы металлов в коллоидном растворе отсутствуют (реакции с ионами  $\text{Cl}^-$  нет).

В результате химической реакции образуются наночастицы серебра связанные электростатическим взаимодействием с поверхностным слоем, содержащим остатки танина и других исходных веществ.

Для исследования динамики образования наночастиц серебра ( $\text{Ag}$ ) и золота ( $\text{Au}$ ) в буферный раствор тетрабората натрия, содержащий восстановитель – танин, добавляли раствор соли серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) или золота ( $\text{HAuCl}_4$ ) при интенсивном перемешивании и через каждые пять минут отбирали пробы в течение 1 часа, до полной остановки процесса восстановления, исследуя их спектры поглощения в УФ-видимом диапазоне (Рис.1).



Максимум светопоглощения (нм)  
Наночастицы серебра (Ag)



Максимум светопоглощения (нм)  
Наночастицы золота (Au)

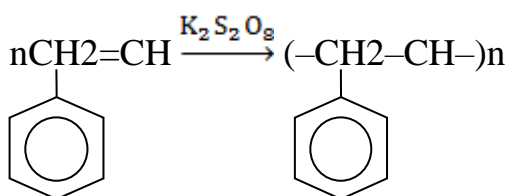
Рис.1. Динамика образования наночастиц серебра (Ag) и золота (Au)

Как видно из данных рис. 1 максимум поглощения спектра гидрозолей Ag лежал в характерной для этого золя области  $\lambda_m = 412 - 415$  нм. Для гидрозолей содержащих наночастицы Au максимум поглощения равен около  $\lambda_m = 510-530$  нм.

На втором этапе экспериментов необходимо было подобрать условия синтеза полистирольных наночастицы с узким распределением по размерам. Так, методом гетерофазной полимеризации в присутствие избыточного количества ПАВ были синтезированы полистирольные микросферы с диаметром  $\sim 40$  нм (St1). В качестве инициатора использовали 2,2'-азобис (2-метилпропионамидин) дигидрохлорид, водорастворимый катионный азо-инициатор, в концентрации 0,1 % в расчете на мономер. Полимеризацию вели при  $60^\circ\text{C}$  в течение 4 часов до полной конверсии. В качестве ПАВ использовали додецилсульфат натрия ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$ ) в концентрации 12 % масс. в расчете на водную фазу, концентрация стирола составляла 3 % масс. в расчете на водную фазу.

Методом гетерофазной полимеризации в отсутствие ПАВ были синтезированы полистирольные микросферы с диаметром  $\sim 700$  нм (St2).

Процесс проводили при  $70^\circ\text{C}$  до полной конверсии мономера в течение 24 часов. В качестве инициатора использовали персульфат калия ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) в количестве 1 % масс. в расчете на мономер, концентрация мономерной фазы составляла 10 % масс. в расчете на систему.



На рис.2 представлены кривые конверсия-время.

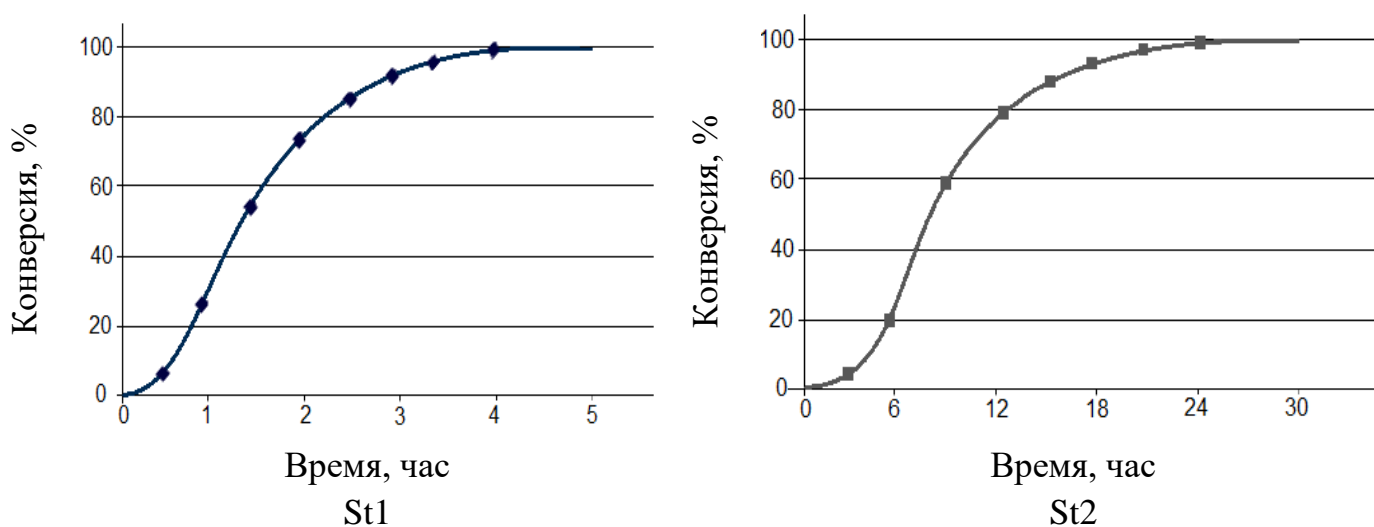


Рис.2. Кинетика образования полистирольных наночастиц St1 и St2



Размер полученных наночастиц и их распределение по размерам измеряли методом кросскорреляционной спектроскопии на приборе Nanophox (Япония) (рис3.).

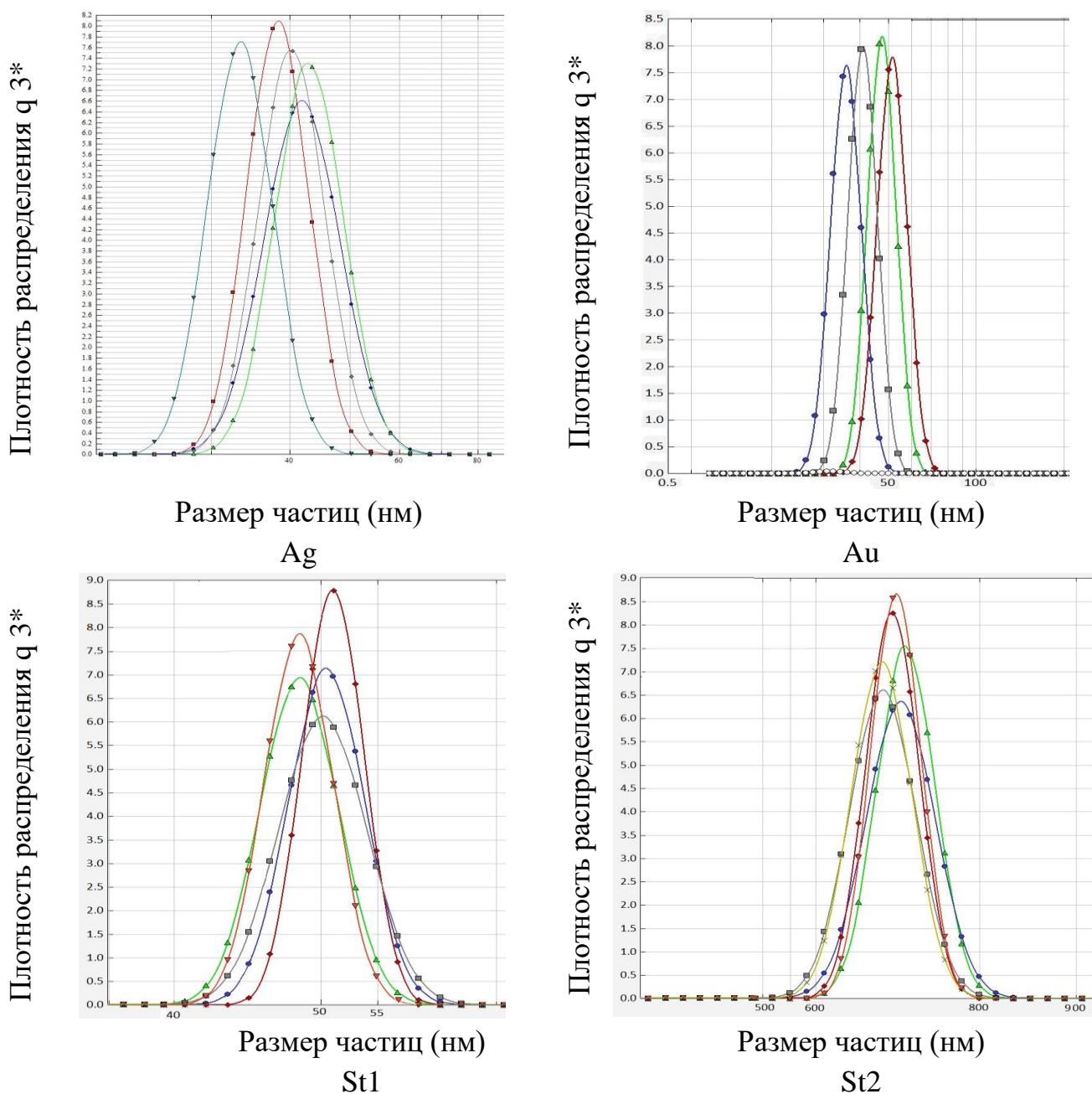
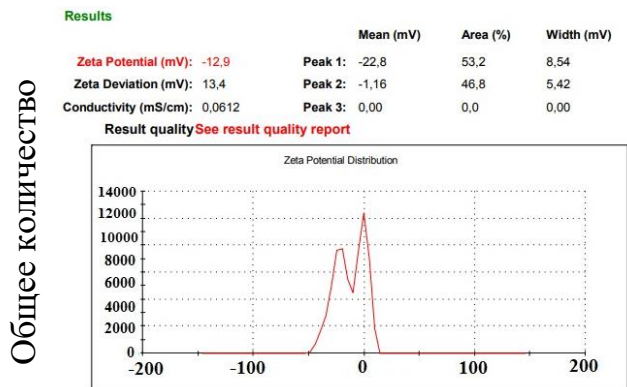


Рис.3 Кривые распределения наночастиц Ag, Au, St и St2 по размерам.

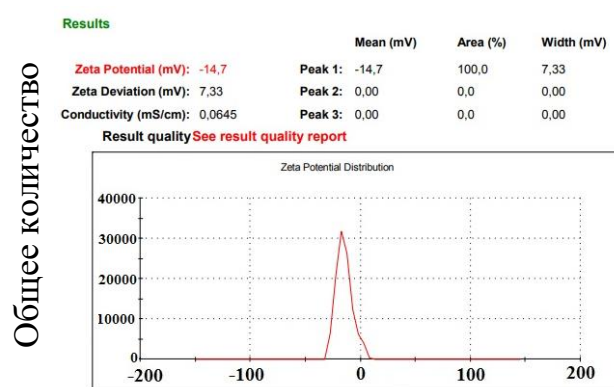
Как видно из рис 3. средний размер наночастиц составил для Ag – 40 нм, Au -40 нм, St1 – 49 нм и St2 – 706 нм.

На рис.4 представлены данные исследований по определению  $\xi$ -потенциала полученных наночастиц на приборе «Malvern» (Англия).



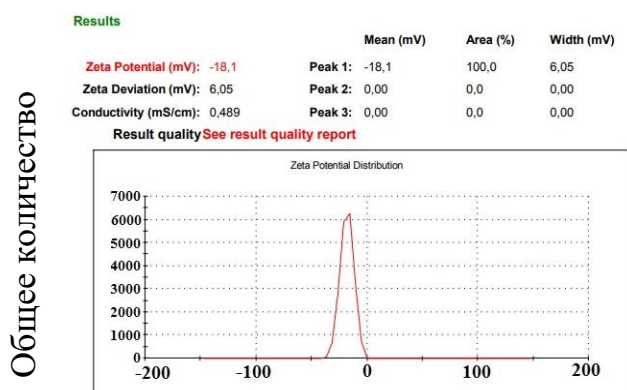
ξ-потенциал (мВ)

Ag



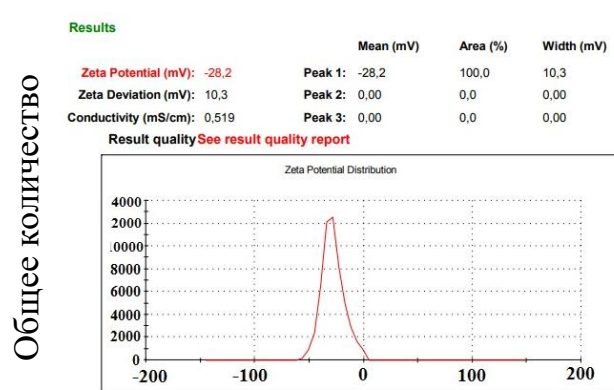
ξ-потенциал (мВ)

Au



ξ-потенциал (мВ)

St1



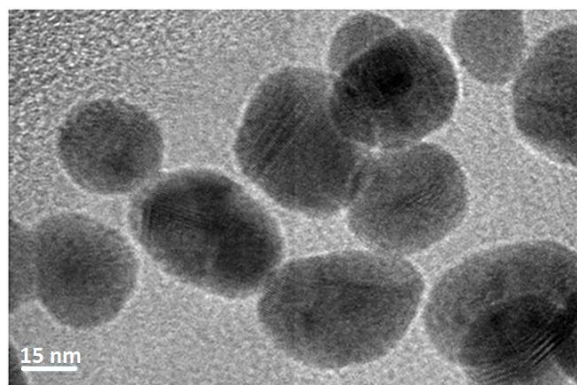
ξ-потенциал (мВ)

St2

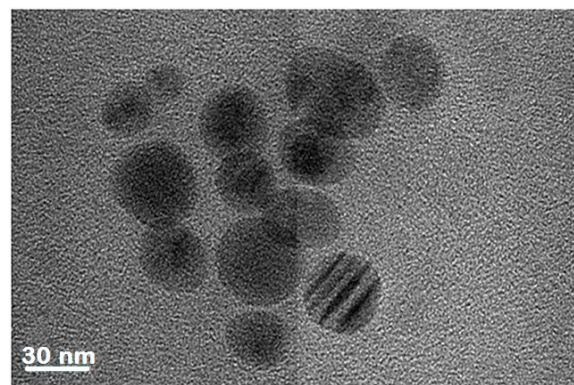
Рис.4. ξ-потенциал наночастиц Ag, Au, St1 и St2

Видно, что величина ξ-потенциал для Ag составила – 12,9мВ., для Au – 14,7мВ., для St1 -18,1 мВ и для St2 – 28,2.

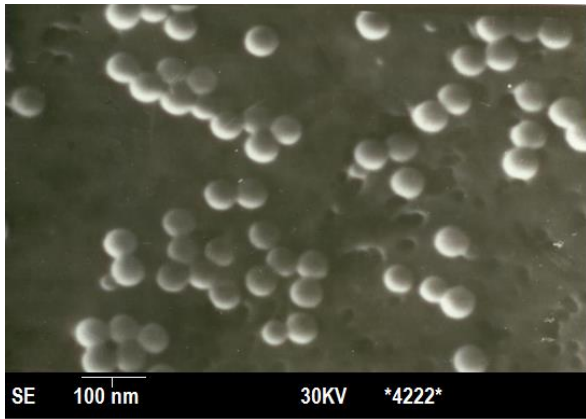
Данные по размерам наночастиц были подтверждены и методом просвечивающей электронной микроскопии на приборе Jeol JEM -2100 (Япония) (Рис.5).



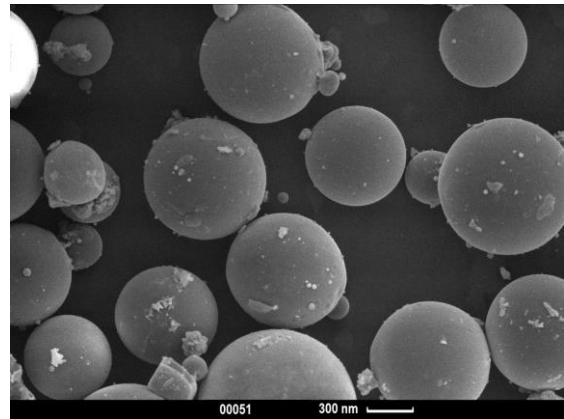
Ag



Au



St1



St2

Рис. 5. Микрофотографии наночастиц Ag, Au, St1 и St2

Как видно из полученных микрофотографий все наночастицы характеризовались узким распределением по размерам. Коэффициент вариации размера наночастиц составил в интервале от 4,8 до 5 %.

Для использования полученных наночастиц в качестве носителей биологандов при разработке диагностических тест-систем необходимо заменить водную фазу наночастиц суспензий на раствор электролита (буферный раствор), в котором протекают иммунохимические реакции. Для этого были приготовлены следующие солевые буферные системы (БР): 0,01М фосфатный буферный раствор с/без 0,15М хлорида натрия (рН 7,2) и (рН 8,0); 0,1М тетраборно-боратный буферный раствор (рН 8,1) и (рН 10,0); 0,1 М глицин-солянокислый буфер (рН 4,8).

При замене водной фазы на буферный раствор (фосфатно-солевой буфер рН=7,2) (БР) оказалось, что все суспензии сохраняли свою устойчивость в БР в течение полгода, что в полной мере отвечает требованиям, предъявляемым к носителям биологандов при конструировании диагностических тест-систем с использованием конъюгатов «носитель-биологанд».

Иммобилизацию моноклональных антител с наноносителями различной природы проводили методом физической адсорбции смешивая моноклональные антитела МкАТ 1. и МкАТ 2. в количестве 1,0 мл с 1,0 мл раствора наночастиц, с концентрацией 2, 4, 8, 16, 32, 64 мг/мл. Инкубировали при температуре +37С°, в течение 12 часов на орбитальном шейкере при 200-250 оборотах в минуту.

В качестве носителей использовали наночастицы серебра (Ag), золота (Au) со средним диаметром 40 нм и полимерных микросфер (St1, St2), со средним диаметром 49 нм и 706 нм соответственно.

Наличие связывания наночастиц с моноклональными антителами подтверждали электрофорезом белков в геле.

На рис.6 представлена фотография электрофореза в агарозном геле, на примере иммобилизованных моноклональных антител с наночастицами серебра различной концентрации.

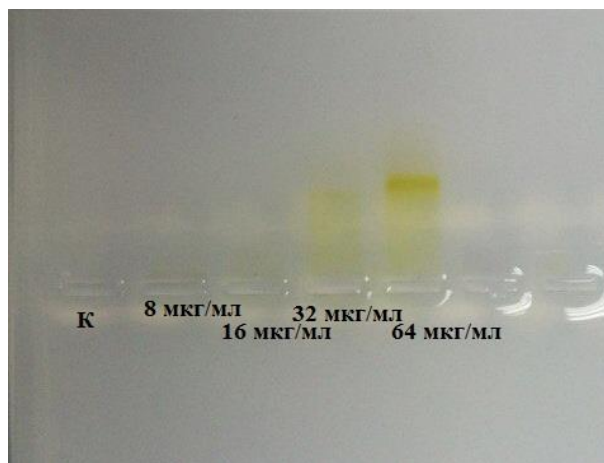


Рис. 6. Электрофорез конъюгатов «наночастицы серебра- антитело»

Как видно из рис. 6 конъюгат «наночастицы серебра-антитело» при концентрации наночастиц 64 мкг/мл визуализируется в методе электрофоретического разделения белков. Количество связавшихся наночастиц пропорционально интенсивности окрашенной полосы антител, а не связавшихся частиц – интенсивности фона трека. Количество связанных наночастиц составляет примерно 90 % от общего количества.

При меньшей концентрации наночастиц серебра чувствительность метода определения белка в геле недостаточна для детекции в оптическом диапазоне. Концентрация серебра в окрашивающем растворе для определения белка в геле составляет 0,5 % (масса/объём), концентрация наночастиц в растворе для синтеза конъюгата с антителами составляет 6,4 %. Полученные результаты согласуются с известными сведениями о возможности определения белка в гелях с использованием растворов с серебром.

Иммунологические свойства моноклональных антител иммобилизованных с наночастицами серебра (Ag), золота (Au) и полимерных частиц (St1, St2) изучали методом иммуноферментного анализа (ИФА).

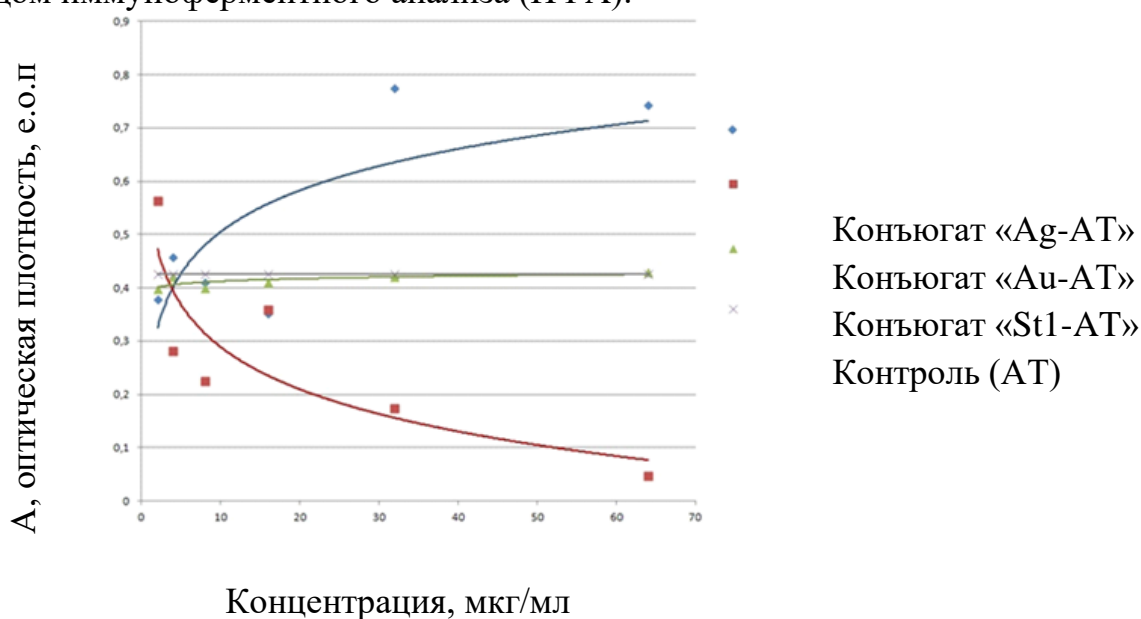


Рис. 7. Зависимость интенсивности ИФА от концентрации наночастиц (антитело МкАТ 2.)

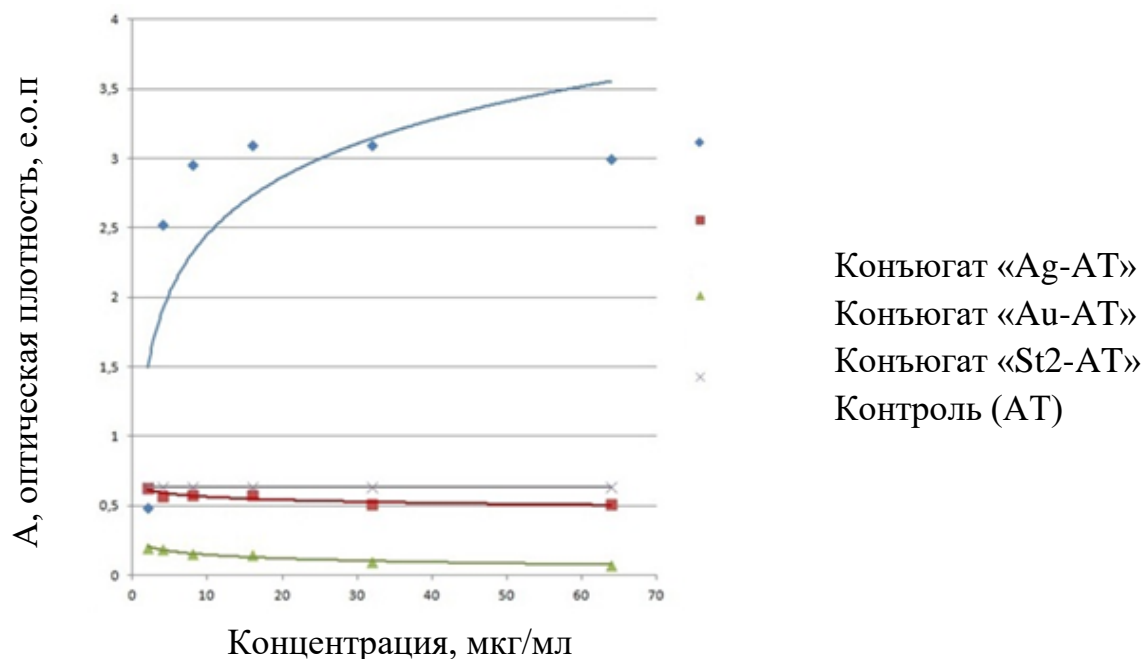


Рис. 8. Зависимость интенсивности результатов ИФА от концентрации наночастиц (антитело МкАТ 1.)

В контрольных экспериментах интенсивность сигнала в ИФА, пропорциональна степени связывания моноклональных антител с тиреоглобулином, стабильна и составляет 0,43 единицы оптической плотности (е.о.п.), полимерные микросферы (St1) со средним диаметром 49 нм (близким к диаметру наночастиц серебра и золота) не оказывают эффекта на связывание моноклональных антител с тиреоглобулином. При использовании наночастиц серебра наблюдается дозозависимый эффект усиления сигнала ИФА на 100 % до 0,8 е.о.п. с максимумом при концентрации наночастиц 32 мкг/мл. Для наночастиц золота наблюдался обратный эффект – при концентрации наночастиц 32 мкг/мл наблюдалось снижение сигнала на 50 %, а при концентрации 62 мкг/мл – полное подавление связывания моноклональных антител с тиреоглобулином.

Далее исследовали зависимость активности пероксидазы от концентрации наночастиц рис.10.

В результате наблюдался дозо-зависимый эффект подавления активности пероксидазы из корней хрена в присутствии наночастиц серебра и золота, начиная с концентрации 16 мкг/мл, максимум наблюдался при 64 мкг/мл. В экспериментах с использованием полимерных микросфер St2, диаметром 49 нм, наблюдалось резкое снижение активности фермента, начиная с концентрации 4 мкг/мл, при этом максимум подавления активности достигался уже при 8 мкг/мл.

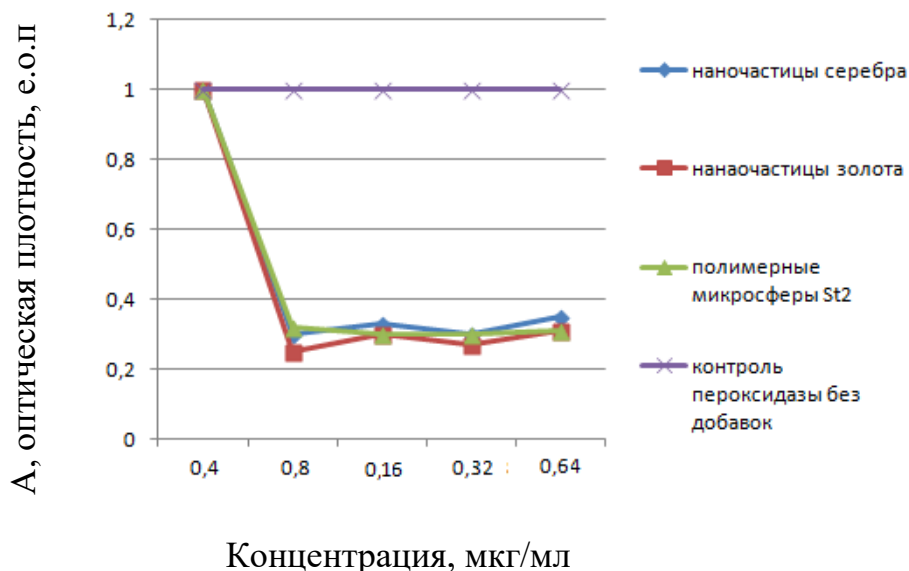


Рис.9 Зависимость активности пероксидазы от концентрации наночастиц

Разработанные конъюгаты «НН-АТ» были апробированы на панели сывороток крови 30 пациентов с установленным диагнозом заболеваний щитовидной железы методом иммуноферментного анализа (ИФА). Из них правильно идентифицированы, как заболевшие- 27 пациентов. Из других 30 сывороток крови пациентов с отсутствием заболеваний щитовидной железы, правильно идентифицированы как таковые -29 пациентов.

Исходя из полученных данных, были рассчитаны следующие показатели:

Чувствительность = число больных, выявленных данным тестом/ истинное число больных среди протестированных \* 100 =  $27/30 \cdot 100 = 90\%$

Специфичность = число здоровых, выявленных данным тестом/ истинное число здоровых среди протестированных \* 100 =  $29/30 \cdot 100 = 96,6\%$ .

Таким образом тесты характеризовались хорошей диагностической ценностью при высокой специфичности (96,6 %) и достаточной чувствительности (90 %).

Полученные результаты модулирования активности изофермента С пероксидазы из корней хрена и иммунологические реакции взаимодействия между моноклональными антителами к разным эпитомам тиреоглобулина подтверждают возможность создания биосенсоров нового поколения для улучшения аналитических характеристик иммуноферментных тест-систем, используемых в клинической лабораторной практике.

## Выводы

1. Методом химического восстановления получены наночастицы серебра (Ag) и золота (Au) со средним диаметром 40 нм, а методом гетерофазной полимеризации синтезированы полистирольные частицы (St1) – 49 нм и (St2) – 706 нм с узким распределением частиц по размерам.
2. Изучена динамика образования металлических наночастиц, кинетика полистирольных наночастиц и их физико-химические свойства: определена

величина  $\xi$ -потенциала, которая составила для Ag – 12,9 мВ, для Au -14,7 мВ, для St1 -18,1 мВ и для St2 – 28,2 мВ.

3. Проведена иммобилизация моноклональных антител к различным эпитопам ТГ (МкАТ1 и МкАТ2) с наночастицами различной природы методом физической адсорбции и методом электрофоретического разделения белков отмечено, что количество связанных наночастиц составило 90 % от общего количества. Метод визуализировался при концентрации наночастиц 64 мкг/мл.
4. Впервые установлено, что при использовании наночастиц серебра наблюдается дозо-зависимый эффект усиления сигнала ИФА на 100 %, с максимумом при концентрации наночастиц 32 мкг/мл. Для наночастиц золота наблюдался обратный эффект – при концентрации наночастиц 32 мкг/мл наблюдалось снижение сигнала на 50 %, а при концентрации 62 мкг/мл – полное подавление связывания моноклональных антител с тиреоглобулином. Полимерные микросферы с диаметром близким к диаметру наночастиц серебра и золота (49 нм) не оказывали эффекта на связывание моноклональных антител с тиреоглобулином.
5. Впервые проведен сопоставительный анализ иммунологической активности моноклональных антител, используя разработанные конъюгаты «НН-АТ» и установлено, что независимо от специфичности моноклональных антител к различным эпитопам ТГ сигнал ИФА усиливается при использовании наночастиц серебра и подавляется в случае применения наночастиц золота.
6. Разработанные конъюгаты «НН-АТ» были апробированы на панели сывороток крови 60 пациентов с установленным диагнозом заболеваний щитовидной железы и без диагноза, методом иммуноферментного анализа (ИФА). Специфичность тестов составила 96,6 %, чувствительность - 90 %.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи в рекомендуемых научных журналах*

1. Станишевская, И.Е. Наночастицы серебра: получение и применение в медицинских целях/ **А.М. Стойнова**, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский// Разработка и регистрация лекарственных средств. -2016.- №1(14). - С.66-69. (ВАК)
2. **Стойнова, А.М.** Изучение влияния наночастиц различной природы на иммунологические свойства иммобилизованных моноклональных аутоантител к тиреоглобулину/ А.В. Зубков, Я.М. Станишевский// Биотехнология. - 2020 г.- Том 36, №4, с. 106-112. (ВАК, Scopus)
3. **Stoynova, A.M.** Development of diagnostic test systems using nanoparticles for determination of markers of ecologically significant disease/ Ya.M. Stanishevskiy, A.V. Zubkov// Environmental Research, Engineering and Management. -2018. - Vol.74, Iss.3. –P. 64-73. (Scopus)
4. Kuzmenko, V.V. Influence of silver and selenium nanoparticles on mesenchymal stromal cells/ **A.M. Stoynova**, I.E. Stanishevskaya, Y.M. Stanishevskiy, I.A. Vasilenko// Environmental Research, Engineering and Management. -2018. - Vol.74, Iss.4. –P. 60-75. (Scopus)

5. **Stoinova, A.** Engineering research of bionanoconjugates for diagnostic test systems of autoimmune diseases/ Y. Stanishevskiy, A. Zubkov// FEBS Open Bio. Vol.8. S1. Abstracts of the 43rd FEBS Congress. -2018. - P. - 173-174. (WoS)
6. **Stoinova, A.** Diagnosis of the thyroid gland diseases: nanotechnology in the development of diagnostic test systems/ Y. Stanishevskiy, A. Zubkov// FEBS Open Bio. Vol. 9, S1. Abstracts of the 44th FEBS Congress: From Molecules to Living Systems. -2019. - P. - 384. (WoS)

*Статьи в других научных изданиях:*

1. **Стойнова, А.М.** Образование наночастиц серебра и золота в моно- и бинарных гидрозольях с ультразвуковой обработкой/ И.И. Михаленко, Я.М. Станишевский// Сборник докладов X конкурса молодых ученых Международная выставка химической промышленности и науки «Химия».- 2016.- С.76-77.
2. **Стойнова, А.М.** Высокочувствительные методы изучения аутоантител и иммунологических реакций при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы/ А.В. Зубков, Я.М. Станишевский // Материалы 9-го Международного конгресса Biotech World. - 2017- Т. 2 – С. 549-550.
3. **Stoinova, A.** Kinetics of silver and gold nanoparticles in mono- and binary hydrosols with sonication/ I. Mikhaleiko, Y. Stanishevskiy // Abstract book of 3rd International Conference on Mechanical Properties of Materials. -2016. - С. 19.
4. **Stoinova, A.** Development of diagnostic test systems using nanoparticles for determinations of markers of autoimmune diseases/ Yaroslav Stanishevskiy// Abstract book of 2ND International Conference "Smart Bio». -2018. - С. 147.

*Охранные документы на объекты интеллектуальной собственности*

1. База данных. Свид. № 2018622011. Диагностические тест-системы на основе серологических методов, для определения вирусных, бактериальных и аутоиммунных заболеваний/ **Стойнова А.М.:** автор и правообладатель- **Стойнова. А.М.-** дата регистрации 11.12.2018.
2. База данных. Свид. № 2019622171. Разработка диагностических тест-систем с использованием наночастиц для определения маркеров аутоиммунных заболеваний/ **Стойнова А.М.:** автор и правообладатель - **Стойнова. А.М.-** дата регистрации 25.11.2019.