

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»

На правах рукописи

Стойнова Анастасия Михайловна

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

1.5.6. – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Станишевский Ярослав Михайлович

МОСКВА – 2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Сведения о наночастицах металлов	11
1.1.1 Основные характеристики наночастиц металлов:.....	11
1.1.2 Физико-химические свойства наночастиц металлов	14
1.1.3 Формирование наночастиц в жидкой фазе.....	22
1.1.4 Формирование взвешенных наночастиц в газовой фазе.....	22
1.1.5 Применение наночастиц металлов.....	23
1.2 Взаимодействие наночастиц с наночастицами.....	26
1.2.1 Взаимодействие наночастиц с живыми системами.....	27
1.2.2 Взаимодействие наночастиц с белками.....	29
1.2.3 Изменения в структуре адсорбированных белков, вызванные действием наночастиц	35
1.2.4 Белковая корона наночастицы: влияние на клеточные взаимодействия	41
1.2.5 Физико-химические характеристики наночастиц, влияющие на адсорбцию белка и на взаимодействия его с клеткой.....	45
1.2.6 Аналитические подходы к изучению взаимодействия наночастиц с белками.....	48
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
2.1 Получение золей Ag, Au.....	54
2.2 Динамика образования моно- и биметаллических золей, изменение оптических характеристик биметаллических дисперсий.	55
2.3 Получение наночастиц полистирола	56
2.4 Определение размера и распределение наночастиц по размерам методом спектроскопии кросс- корреляции фотонов.....	57
2.5 Определение размера наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии.	57
2.6 Измерение электрического потенциала наночастиц.	58
2.7 Выделение и очищение тиреоглобулина.....	58
2.8 Получение пероксидазных конъюгатов.....	59
2.9 Реакция связывания наночастиц с моноклональными антителами.....	60

2.10 Исследование влияния наночастиц на иммунологические свойства антител.	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1 Получение металлических наноносителей различной природы с узким распределением по размерам.....	62
3.2 Изучение физико-химических свойств наноносителей различной природы.....	72
3.3 Создание конъюгатов «наночастицы-биолиганд».....	82
3.4 Изучение иммунобиологических свойств полученных конъюгатов «наноноситель-биолиганд»	85
3.5 Исследование взаимодействия наночастиц с изоферментом С пероксидазы из корней хрена	92
3.6 Апробация разработанных конъюгатов «НН-АТ» на панели сывороток крови.....	93
ВЫВОДЫ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	114

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ТГ- тиреоглобулин

НЧ- наночастица

НН-АТ - наноноситель-антитело

Т4- тироксин

Т3- трийодтиронин

IgG- антитела иммуноглобулин G

ИФА- иммуноферментный анализ

ППР- поверхностный плазмонный резонанс

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

е.о.п.- единицы оптической плотности

ЧСА- человеческий сывороточный альбумин

БСА- бычий сывороточный альбумин

МРТ- магнитно-резонансная томография

ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК- рибонуклеиновая кислота

ПЭГ- полиэтиленгликоль

МкАТ- моноклональные антитела

КББ- карбонат-бикарбонатный буфер

БР- буферный раствор

ПДТ- проверяемый диагностический тест

ВВЕДЕНИЕ

Наноносители биологически активных молекул (антител, антигенов и др.) в последние годы вызывают повышенный интерес в медицине и фармацевтике. Их применяют при разработке лекарственных препаратов с адресной доставкой лекарств, при создании тест-систем для диагностики заболеваний различной этиологии, а также визуализации патологических процессов в организме и т.д.

Как известно из литературных данных, в качестве наноносителей биомолекул могут выступать частицы различной природы. Например, липосомальные наночастицы содержащие на поверхности специфические антитела, представляют собой конъюгаты «липосома-антитело» для адресной доставки лекарственных препаратов к поврежденным тканям [1], наночастицы золота в сочетании с детектируемой биомолекулой, при помощи рентгеновской визуализации стали активно использоваться для ранней диагностики гепатоцеллюлярной карциномы [2], полимерные наночастицы модифицированные антителами используются при разработке диагностических тест-систем применяемых в медицинской и ветеринарной практике для выявления антигенов вирусов и бактерий [3].

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы являются одной из актуальных проблем современной эндокринологии. Одним из основных патогенетически значимых аутоантигенов щитовидной железы является тиреоглобулин, который является антигенным фактором и представляет собой белок, участвующий в биосинтезе тиреоидных гормонов щитовидной железы - тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3).

Таким образом, тиреоглобулин является специфическим маркером при определении болезней щитовидной железы (тиреоидит Хасимото, Базедова болезнь и другие).

Обнаружение биомаркеров в анализируемых биожидкостях особенно важно при ранней диагностике потенциального заболевания, что позволяет

четко и своевременно оценить ситуацию и выбрать систему адекватных оздоровительных мероприятий.

Актуальной задачей при разработке конъюгатов «наночастица - биомолекула» является сохранение высокой активности биомолекулы иммобилизованной с наночастицей, что является важным критерием при создании высокочувствительных диагностических тест-систем.

Высокая чувствительность тест-систем при разработке конъюгатов «наночастица - биомолекула» зависит от многих факторов, например: от природы носителя, его размеров, физико-химических свойств, условий иммобилизации, а также от конформационной ориентации биомолекулы на поверхности носителя.

В уже существующих методиках, при иммобилизации биомолекулы с макроносителями возможна экранизация активных центров биомолекулы, а также изменение ее нативной конформации в результате прочной многоточечной адсорбции с поверхностью макроносителя, что в последствии негативно сказывается на иммунологических свойствах биомолекулы при аффинном связывании ее с детектируемой молекулой или рецептором клеточной мембраны.

Решение данной задачи видится в использовании наночастиц (не более 100 нм) в качестве носителей биомолекул для создания конъюгатов «носитель-биомолекула» с высокой аффинной активностью иммобилизованной биомолекулы, содержащейся на поверхности наночастицы.

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 «наноноситель-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 эпитомам 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 «наноситель-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 эпитомам ТГ, используя разработанные конъюгаты «НН-АТ».
3. Впервые предложен подход к регуляции биологической активности моноклональных антител тиреоглобулина, с применением наноносителей различной природы и концентрации при разработке

высококочувствительных 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.

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 (10th 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 государственной 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 116 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 РГУ за конструктивную критику и профессиональные консультации при подготовке диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сведения о наночастицах металлов

Металлические наночастицы - это наноразмерные металлы размером от 10 до 100 нм. Их можно синтезировать и модифицировать, благодаря этому, они могут связываться с лигандами, антителами и лекарствами [4].

Наночастицы металлов обладают уникальными химическими и физическими свойствами по сравнению с другими твердыми объемными материалами из-за их большой площади поверхности и электронных свойств. Кроме того, эти частицы используются во многих сферах, например, в электрохимии, фотохимии и биомедицине [5].

Наночастицы золота и серебра обладают большим количеством функциональных свойств, которые можно использовать для визуализации и терапевтических функций. [6].

1.1.1 Основные характеристики наночастиц металлов:

1. Большое отношение площади поверхности к объему по сравнению с объемными эквивалентами;
2. Специфическая электронная структура (большие поверхностные энергии перехода между молекулярным и металлическим состояниями (локальная плотность состояний ЛПС));
3. Уникальные оптические свойства;
4. Плазмонное возбуждение/ плазмонный резонанс;
5. Квантовое ограничение;
6. Повышенное количество перегибов;
7. Большое количество участков с низкой координацией, таких как углы и края, имеющих большое количество «оборванных связей»;
8. Специфические химические свойства;
9. Способность накапливать избыточные электроны [7, 8].

Наночастицы благородных металлов отличаются от других наноплатформ, таких как полупроводниковые квантовые точки, магнитные наночастицы и полимерные наночастицы, своим одиночным поверхностным плазмонным резонансом (ППР), который имеет небольшой размер частиц и усиливает все радиационные свойства наночастиц [9].

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) - это проявление резонансного эффекта, обусловленного взаимодействием электронов проводимости металлических наночастиц с падающими фотонами. Взаимодействие зависит от размера и формы металлических наночастиц, а также от природы и состава дисперсионной среды [10].

Плазмонные наночастицы металлов, включая золото и серебро, очень эффективно поглощают и рассеивают свет [11]. Изменяя размер, форму и состав наночастиц, можно настроить оптический отклик от ультрафиолета через видимую до ближней инфракрасной области электромагнитного спектра. Смещая поглощение и рассеяние, можно настроить цвет дисперсий и пленок наночастиц: например, растворы сферических наночастиц золота имеют рубиново-красный цвет из-за сильного рассеяния и поглощения в зеленой области спектра, тогда как растворы наночастицы серебра желтые из-за плазмонного резонанса в синей области спектра (красный и зеленый свет не затрагиваются) [12].

Причина уникального спектрального отклика наночастиц серебра и золота заключается в том, что определенные длины волн света могут заставить электроны проводимости в металле коллективно колебаться - явление, известное как ППР. Когда эти резонансы возбуждаются, интенсивности поглощения и рассеяния могут быть в 40 раз выше, чем у частиц одинакового размера, которые не являются плазмонными (рисунок 1.1) [13]. Яркость и возможность настройки оптических свойств плазмонных наночастиц делают их очень полезными во многих приложениях, таких как молекулярное обнаружение, материалы для солнечной энергии, а также обнаружение и лечение рака [14].

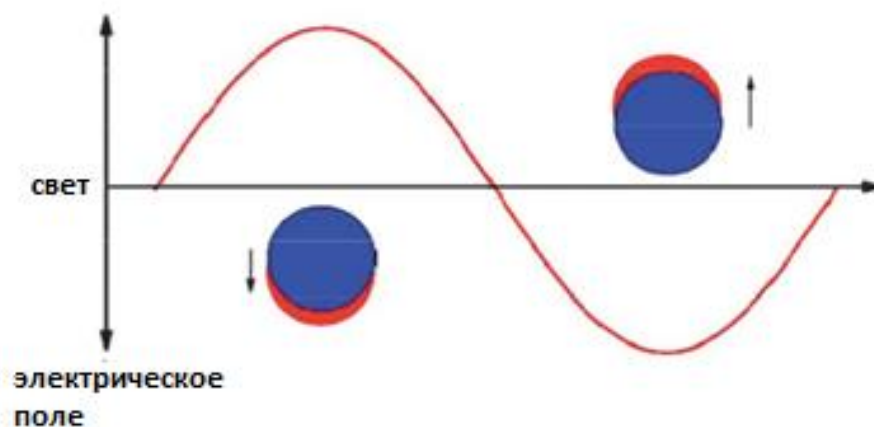


Рисунок 1.1. Колебание электронного облака металлической наночастицы (красный) относительно металлического ядра (синий) в ответ на электромагнитное поле; основа эффекта поверхностного плазмонного резонанса, наблюдаемого в наночастицах

Поверхностные плазмоны, связанные с двумерными кристаллическими листами наночастиц серебра, демонстрируют чувствительную настройку плазмонного резонанса. На границах раздела металл/диэлектрик могут возникать два вида оптических возбуждений: распространяющиеся поверхностные плазмоны и локализованные плазмоны, но геометрия возбуждений различается [15]. На плоских поверхностях металл/диэлектрик при полном внутреннем отражении облучаемого света или на границах раздела металл/диэлектрик, происходит возбуждение распространяющихся поверхностных плазмонов, в то время как локализованные поверхностные плазмоны возбуждаются на границах раздела металл-наночастица/диэлектрик. Оба возбуждения чувствительны к событиям адсорбции материала, которые изменяют диэлектрическую проницаемость на поверхности металла [16]. Такая высокая чувствительность возникает из-за того, что диэлектрическая проницаемость наночастиц золота намного больше, чем у органических материалов. Изменение диэлектрической проницаемости тонких пленок золота регистрировалось по изменению провала ППР, вызванного адсорбцией

наночастиц золота, модифицированных биомолекулами, на металлических поверхностях. Такое поведение приводит к применению высокочувствительных биосенсоров [17].

1.1.2 Физико-химические свойства наночастиц металлов

Наночастицы благородных металлов обладают уникальными электронными и оптическими свойствами, которые во многом зависят от их размера и формы. Эти эффекты являются результатом изменений поверхностного плазмонного резонанса, частоты, на которой электроны проводимости колеблются в ответ на переменное электрическое поле падающего электромагнитного излучения [9].

Наночастицы золота (Au/NP) представляют из себя раствор винно-красного цвета, бывают разных размеров, от 1 нм до 800 нм, и различной формы, например, сферическое кольцо, субоктаэдрические, икосаэдрические, тетраэдрические, декаэдрические, октаэдрические и наностержни (рисунок 1.2) [12, 18].

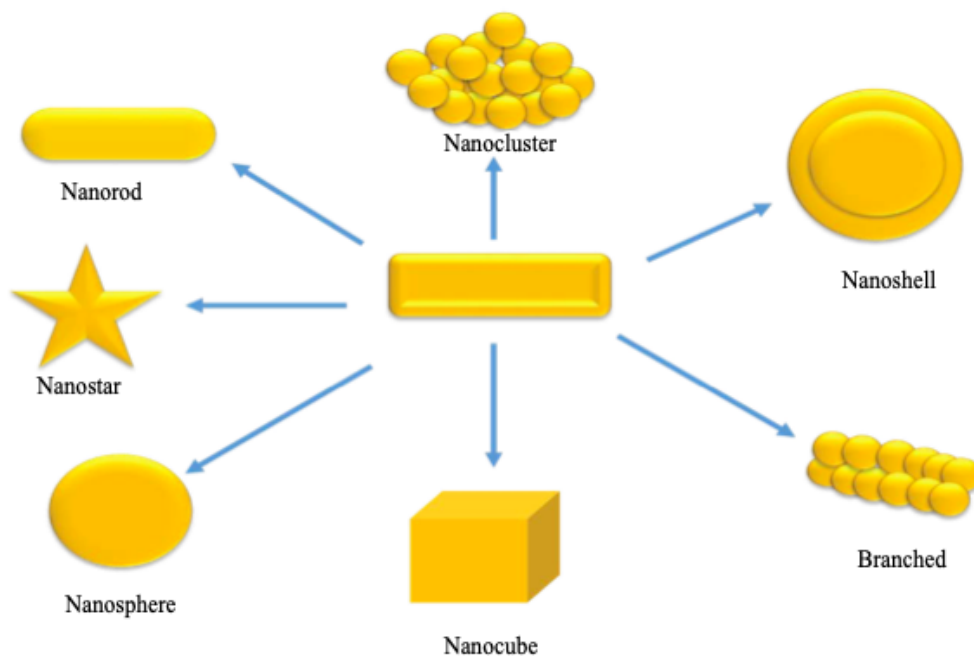


Рисунок 1.2 Различные формы наночастиц золота

Маленькие наночастицы золота размером примерно 30 нанометров (нм) поглощают свет в диапазоне от синего до зеленого спектра (450 нм) и отражают красный свет. По мере увеличения размера частиц длина волны поверхностного плазмонного резонанса смещается в сторону более длинных волн с более темным красным цветом, что означает отражение синего света. Когда соль добавляется к растворам наночастиц, поверхностный заряд становится нейтральным и заставляет частицы агрегироваться и менять цвет раствора с красного на синий [19].

Наночастицы золота обычно используются в области радиационной медицины в качестве усилителя излучения и улучшения лучевой терапии благодаря способности доставки лекарств. Более того, Au/NP имеют различное применение в нанотехнологиях в качестве платформы для мечения белков и биомолекулярного обнаружения [20].

Au/NP - это нетоксичные частицы с большой площадью поверхности, которые можно модифицировать другими молекулами и использовать в биомедицинских областях [21]. Значение наночастиц золота в области биохимии связано с совместимостью и оптическими свойствами. Наночастицы являются хорошими терапевтическими агентами из-за их легкого транспорта в больной клетке и лекарственного средства, загружающего носитель. Золотые наностержни широко используются в визуализации клеток в естественных условиях из-за плазмона резонансного поглощения и рассеяния света в ИК-диапазоне [22]. Кроме того, коллоидные Au/NP имеют очень маленький размер для введения в ткани и клетки биологических молекул, таких как белки и ДНК. Из-за своих электронных свойств Au/NP обычно используются в аналитических методах и используются в качестве электродного сенсора для различных образцов.

Наночастицы серебра (Ag/NP) являются коммерчески доступными благодаря таким свойствам, как хорошая проводимость, химическая стабильность, каталитическая активность и их антимикробная активность.

Благодаря своим свойствам они обычно используются в медицине и электротехнике [23].

Оптические свойства Ag/NP также зависят от размера наночастиц. Меньшие наносферы поглощают свет и имеют пики около 400 нм, а более крупные наночастицы имеют повышенное рассеяние, давая пики, которые расширяются и смещаются в сторону более длинных волн. Большие сдвиги в инфракрасную область электромагнитного спектра достигаются за счет изменения формы наночастиц на стержни или пластины.

Наночастицы серебра обладают новыми биологическими, химическими и физическими характеристиками по сравнению с их твердой объемной формой серебра [24].

Ag/NP обладают особыми химическими и физическими свойствами, такими как комбинационное рассеяние света с усилением поверхности и оптические свойства, электропроводность, высокая термическая, химическая стабильность, нелинейная и каталитическая активность. Эти свойства Ag/NP получены как в электронике, так и для медицинского применения.

Наночастицы серебра обычно используются в области противомикробных препаратов для лечения микробов, таких как грибы, вирусы и бактерии [25]. Благодаря доказанным антимикробным свойствам Ag/NP широко используются в повседневных коммерческих продуктах; в различных областях, таких как коллоидные покрытия, краски или твердые материалы, такие как полимерные каркасы. Кроме того, Ag/NP используются в текстильной промышленности, в качестве фильтрационных мембран воды из-за медленной скорости высвобождения мембраны, которая используется в качестве защитной перегородки против различных бактерий и других микробов, присутствующих в воде [20, 26].

Однако только металлы со свободными электронами, в основном Au и Ag обладают плазмонными резонансами в видимой области спектра, которые вызывают такие интенсивные цвета. Удлиненные наночастицы (эллипсоиды и наностержни) демонстрируют две отчетливые плазмонные

полосы, связанные с поперечными и продольными колебаниями электронов. Продольные колебания очень чувствительны к соотношению сторон частиц, поэтому небольшие отклонения от сферической геометрии могут привести к впечатляющим изменениям цвета.

Помимо свойств отдельных частиц, среда, в которой находятся частицы металла, также имеет значение для оптических свойств. Показатель преломления окружающей среды, а также среднее расстояние между соседними металлическими наночастицами влияют на спектральные характеристики. Перед исследователями по-прежнему стоит задача определения физико-химических свойств наночастиц металлов и изучения их взаимосвязей между структурой и функцией. Ключевым ограничением является их способность полностью исследовать наноразмерную область: различные методы определения характеристик основаны на разных физических свойствах, поэтому они дают лишь частичное представление о характеристиках наночастиц. Что еще более усложняет задачу, сами методы определения характеристик могут напрямую влиять на измеряемые количества наночастиц [27].

Наночастицы металлов существуют в различных химических составах, от мицелл до металлов (оксидов), от синтетических полимеров до крупных биомолекул. Каждый из этих материалов имеет различный химический состав, который можно анализировать различными методами, включая оптическую спектроскопию, рентгеновскую флуоресценцию и оптическую плотность, рамановскую спектроскопию и ЯМР [28]. Однако часто поведение наночастиц во многом определяется их нанометровыми размерами. Таким образом, на протяжении всей характеристики наночастиц исследование размера, формы, поверхностного заряда и пористости является фундаментальным шагом для полного понимания и прогнозирования их поведения.

Решающей особенностью, которая делает наночастицы металлов технически интересными, является их отношение поверхности к объему. Это соотношение увеличивается с уменьшением диаметра частиц. Наночастица

состоит из нескольких или нескольких тысяч атомов. Это означает, что значительная часть атомов находится на поверхности частицы [28].

При диаметре частицы 10 нм 20% из примерно 30 000 атомов всей частицы расположены на ее поверхности; при диаметре частиц 5 нм значение увеличивается до 40% из примерно 4000 атомов, а при диаметре 1 нм почти все из примерно 30 атомов находятся на поверхности. Поверхностные атомы, в отличие от атомов внутри материала, имеют меньше прямых соседей и поэтому содержат так называемые ненасыщенные связи. Они ответственны за более высокую реакционную способность поверхности частицы. Повышенная реактивность - основа для множества применений [12, 28].

Точное регулирование диаметра частиц позволяет получать катализаторы нового поколения с высокой селективностью; такие катализаторы будут ускорять только те химические процессы, которые производят целевой продукт из сырья. Эта высокая реакционная способность также снизит температуру плавления, так что использование металлических наночастиц снизит температуру «обжига» в случае производства керамики [29].

Что еще более важно, композиты (твердые тела, состоящие из различных материалов) будут меньше давать усадку в процессе затвердевания, что особенно важно, например, в зубном протезировании. Несмотря на то, что поверхность отдельной частицы естественным образом уменьшается вместе с ее диаметром, удельная поверхность порошка увеличивается по мере уменьшения размера составляющих его частиц - при условии, что рассматривается то же самое количество по весу. Это объясняет, почему наноструктурированные материалы интересны для фильтрации и катализа [30]. Нанопористые материалы обладают большой удельной поверхностью, на которой могут осаждаться отфильтрованные вещества. Они также обладают высокой реакционной способностью, что способствует адсорбции или их каталитическому эффекту. Изменяющийся размер наночастиц не только изменяет реакционную способность, но также может изменять

оптические характеристики, такие как прозрачность, поглощение, люминесценция и рассеяние. Хотя частицы размером всего несколько нм в диаметре лежат намного ниже диапазона длин волн видимого света (от 380 до 780 нм), они могут поглощать свет определенных длин волн (рисунок 1.3) [12, 28].

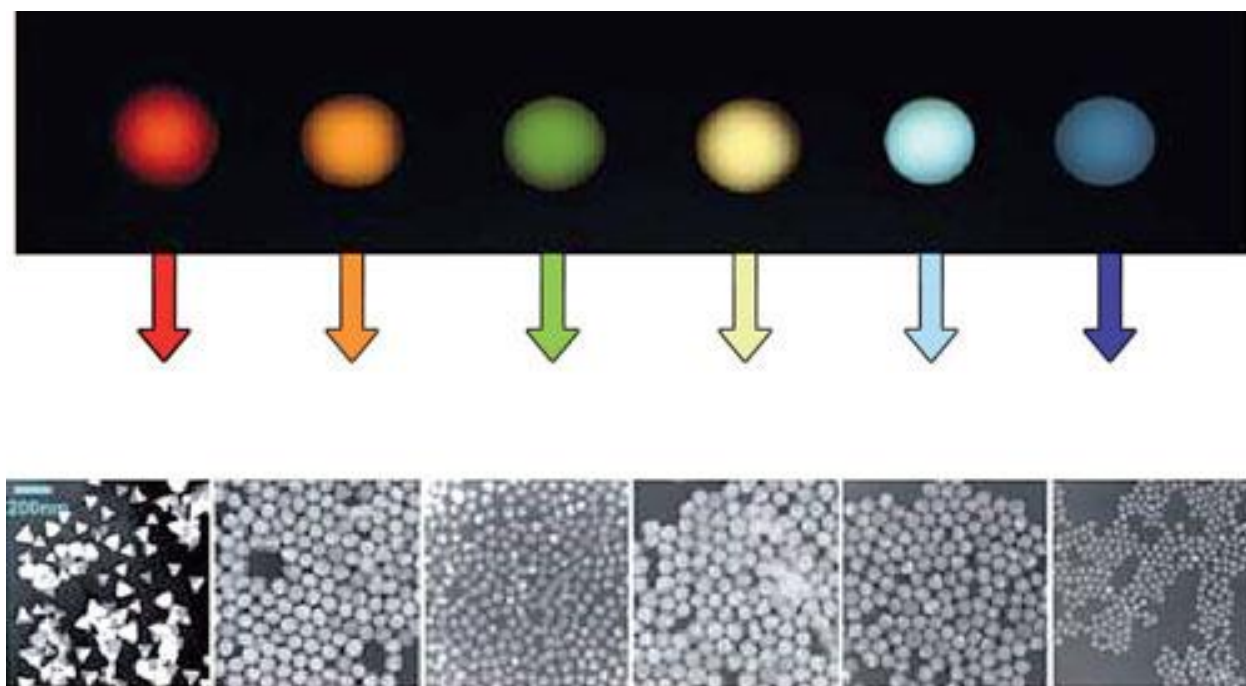


Рисунок 1.3 Рэлеевское рассеяние и электронно-микроскопические изображения нанокристаллов различной формы (сферическая, призматическая), размера (40-120 нм) и состава (золото-Au, серебро-Ag).

Рэлеевское рассеяние относится к рассеянию электромагнитных волн на сферических частицах, диаметр которых меньше длины волны рассеянных волн. Эти эффекты можно понять только на уровне квантовой механики. В случае квантовых точек, которые состоят из так называемых полупроводниковых материалов, размер частиц можно использовать, например, для регулировки длины волны флуоресценции. Эти оптические свойства делают наночастицы особенно интересными для применения в оптоэлектронике, косметике и медицинской диагностике. Важной особенностью магнитного поведения частиц с диаметром в нанометровом

диапазоне является то, что они намагничивают постоянные магниты в одном направлении [31].

Таким образом, наночастицы дают возможность увеличить емкость магнитных устройств, хранения данных, которая определяется количеством намагничиваемых элементов. Наконец, магнитные характеристики наночастиц относительно нечувствительны к колебаниям температуры [28].

Основными параметрами наночастиц являются их форма (включая соотношение сторон), размер и морфологическая субструктура вещества. Наночастицы представлены в виде аэрозоля (в основном твердая или жидкая фаза в воздухе), суспензии (в основном твердой в жидкостях) или эмульсии (две жидкие фазы).

Наночастицы могут иметь разный химический состав. Они могут состоять из металлов, полупроводниковых материалов, соединений, таких как оксиды металлов (неорганические наночастицы), или из углерода или углеродсодержащих соединений, таких как полимеры (органические наночастицы). В исследовательском и коммерческом секторах синтетические наночастицы часто группируются в следующие категории в зависимости от их химических и физических характеристик: углекислый газ, оксиды металлов, полупроводники или металлы [32].

Наночастицы могут быть отдельными частицами, агрегатами или агломератами. Агрегаты представляют собой рыхлые, обратимые прикрепления частиц, образованные сильным притягивающим взаимодействием отдельных частиц. В растворах такие агрегаты могут быть растворены в отдельные наночастицы. Напротив, агломераты представляют собой необратимые скопления элементов-частиц; они не могут быть рассеяны на отдельные частицы [33].

Некоторые методы производства и модификации поверхности частиц могут быть использованы для контроля образования агрегатов, что обычно желательно для обработки частиц. Более крупные композиты из наночастиц часто имеют характеристики, отличные от характеристик одиночных частиц.

В зависимости от состава и применения наночастицы наносятся на необработанную или модифицированную поверхность [10, 34].

Необработанные наночастицы часто располагаются рядом друг с другом и образуют агрегаты или агломераты (например, технический углерод). Соответственно, их форма может быть очень неоднородной и принимать различные формы, что сильно влияет на их характеристики. В зависимости от метода производства и условий производства материалы наночастиц имеют разные формы и структуры: сферы, иглы или трубки, гранулы и волокна [35]. В присутствии химических веществ (поверхностно-активных веществ) поверхность и межфазные свойства могут быть изменены. Косвенно такие агенты могут стабилизировать против коагуляции или агрегации, сохраняя заряд частицы и модифицируя самый внешний слой частицы. В зависимости от истории роста и срока службы наночастиц следует ожидать очень сложных составов, возможно, со сложными смесями адсорбатов. Например, в типичной истории горячей наночастицы многие различные агенты склонны к конденсации на частице, когда она охлаждается и подвергается воздействию различных атмосферных условий. Ожидаются сложные поверхностные химические процессы, которые были идентифицированы только для небольшого числа модельных систем твердых частиц. На границе наночастица-жидкость полиэлектролиты использовались для изменения свойств поверхности и взаимодействия между частицами и окружающей их средой. Они использовались в широком спектре технологий, включая адгезию, смазку, стабилизацию и контролируемую флокуляцию коллоидных дисперсий [36]. И физические, и химические свойства имеют сложное атомное и молекулярное происхождение. Например, электронные и оптические свойства и химическая реакционная способность небольших кластеров полностью отличаются от более известных свойств каждого компонента в объеме или на протяженных поверхностях [14, 29].

1.1.3 Формирование наночастиц в жидкой фазе

Формирование наночастиц в жидкой фазе в зависимости от размера частиц, химического состава, поверхности и свойств заряда происходит в основном за счет контролируемых химических реакций, а самоограничивающиеся процессы самосборки развиваются путем управления условиями роста [37]. Ввиду экологического круговорота наноматериалов необходимо уделять некоторое внимание коррозии и разложению объемных материалов, о которых в настоящее время малоизвестно. Естественные процессы, генерирующие наноразмерные структуры в жидкой фазе, включают эрозию и химический распад органических (остатки растений или микроорганизмов) или геологических (например, глины) исходных материалов. Во всех этих типах процессов дезинтеграции свойства поверхности и их изменение в результате химической реакции имеют решающее значение для определения того, будут ли отдельные наночастицы образовываться в соответствующих средах [38].

1.1.4 Формирование взвешенных наночастиц в газовой фазе

Основным путем восходящего образования наночастиц в газовой фазе является химическая реакция, приводящая к нелетучему продукту, который претерпевает гомогенное зародышеобразование с последующей конденсацией и ростом [39].

В последнее время это стало важным направлением промышленного производства порошков наночастиц, которые могут быть из металлов, оксидов, полупроводников, полимеров и различных форм углерода, а также могут иметь форму сфер, проволок, игл, трубок, пластинок или другие формы. Это также непреднамеренный путь, по которому наночастицы образуются после окисления газовой фазы в атмосфере, в вулканических шлейфах, в естественных и техногенных процессах горения или в парах, связанных с любым искусственным процессом с участием летучих материалов при температуре окружающей среды и повышенной температуре, такой как при

сварке или плавке металлов, при изготовлении полимеров или даже при приготовлении пищи [40].

Как и в случае с жидкой фазой, процессы распада исходных материалов обеспечивают путь, который приводит только к наночастицам, взвешенным в газовой фазе при определенных условиях. В то время как в жидкой фазе присутствие эмульгаторов, сопровождающих процесс эрозии или химического распада, может поддерживать процесс суспендирования, диспергирование наночастиц в газе из жидких эмульсий или сухих порошков сильно ограничивается сильными силами сцепления между отдельными наночастицами. Следовательно, любое механически вызванное напряжение в основном материале приводит к образованию частиц размером в микрометр и выше [41].

Только при случайных обстоятельствах, например в случае неконтролируемого высвобождения порошка или эмульсии из сосуда под высоким давлением сильные сдвиговые силы могут преодолеть эти силы сцепления. Напротив, распыление жидкостей, содержащих наночастицы или растворимый материал в очень низких концентрациях, с последующей сушкой растворителя может привести к ресуспендированию наночастиц или к образованию новых наночастиц из растворенных веществ. Это может привести к перераспределению наночастиц, биологического материала или токсичных веществ в виде наночастиц, переносимых по воздуху [16, 42].

1.1.5 Применение наночастиц металлов

Металлические наночастицы в первую очередь находят применение в катализе, а полупроводниковые нанокристаллы используются в лабораторной и медицинской диагностике на основе их оптических свойств.

Наночастицы золота и серебра широко используются в различных фармацевтических приложениях и системах доставки лекарств из-за их инертной природы, стабильности, высокого несоответствия, нецитотоксичности и биосовместимости.

Наночастицы золота находят применение в электрохимии, включая определение фармацевтических соединений. Он широко используется в электрохимических методах из-за простоты изготовления, лучшего определения чувствительности и модификации поверхности [43].

Наночастицы золота широко используются в биотехнологии и биомедицине из-за их большой площади поверхности и высокой электронной проводимости. Модификация нанометров проводится для усиления взаимодействия этих наночастиц с биологическими клетками [44].

Повышенная проницаемость и удерживание - уникальное свойство наночастиц накапливаться и взаимодействовать с опухолевыми клетками. Системы доставки лекарств зависят от наночастиц, которые используются для нацеливания на злокачественные опухоли головного мозга, где обычная терапия не так эффективна. Наночастицы золота оказались наиболее безопасными и гораздо менее токсичными агентами для доставки лекарств [45].

Наночастицы, такие как дендримеры, квантовые точки, полимерные гели и наночастицы золота, имеют больше свойств и широко используются в некоторых приложениях, таких как системы доставки лекарств и визуализация. Неорганические наночастицы широко используются в качестве контрастного вещества в некоторых приложениях, особенно в молекулярной визуализации, такой как компьютерная томография, позитронно-эмиссионная томография, магнитно-резонансная томография, оптическая визуализация и ультразвук [46]. Золотые наночастицы подходят для иммобилизации поверхности, действуют как проводящие материалы и улучшают перенос электронов между поверхностью наночастиц золота и целевым аналитом. Было разработано множество процедур для разработки иммунного сенсора с использованием электрода из модифицированной углеродной пасты с наночастицами золота [47]. Коллоидное золото, полученное разными методами, используется в медицине. Фарадей обнаружил образование золота, которое имеет темно-красный цвет в виде жидкого раствора за счет

восстановления хлораурата (AuCl^-) с фосфором в водной смеси. Наночастицы золота находят множество применений, таких как катализ, оптическое молекулярное зондирование, лечение рака и строительные блоки в нанотехнологиях [48]. Применимость наночастиц золота в системах доставки лекарств обусловлена наличием некоторых свойств, которые делают их хорошим средством доставки лекарств. Изготовление наночастиц золота может иметь различный размер от 1 нм до 150 нм. Их конструктивная конструкция позволяет покрывать поверхности различными целевыми добавками. Кроме того, важными свойствами наночастиц золота, как и у наночастиц серебра, являются нетоксичность и биосовместимость [49].

Индивидуальные физические, химические и фото свойства наночастиц золота могут быть инновационными способами контроля транспорта фармацевтических соединений и контроля [50].

Наночастицы серебра имеют множество применений из-за большой степени коммерциализации. Серебро является привлекательным материалом благодаря своим отличительным свойствам, таким как хорошая проводимость, химическая стабильность, каталитическая активность и антимикробная активность. Наночастицы Ag используются в антимикробных приложениях, поскольку антимикробный эффект ионов Ag хорошо известен [51]. Наночастицы серебра обладают индивидуальными свойствами плазмонных оптических спектров, которые позволяют использовать наночастицы серебра в приложениях для биодатчиков. Наиболее важное применение Ag/NP включает лечение заболеваний или нацеливание на клетки, такое как взаимодействие с вирусом ВИЧ-1 и предотвращение его способности связывать клетки-хозяева *in vitro* [52]. Гибридные материалы наночастиц Ag с амфифильными сверхразветвленными макромолекулами синтезированы для использования в поверхностных покрытиях из-за его антибактериальной активности [53]. Поверхности, покрытые краской на основе наночастиц Ag на основе растительного масла, показали отличные антимикробные свойства. Заболевания, связанные с водой, такие как диарея и обезвоживание, можно

уменьшить, улучшив микробиологическое качество питьевой воды. Бактерицидную активность можно снизить за счет использования угольных фильтров, осажденных серебром [54]. Биоаэрозоли - это переносимые по воздуху частицы, которые вызывают хронические заболевания и образуются в системах вентиляции, отопления и кондиционирования воздуха во влажной атмосфере. Использование фильтра с активированным углем с покрытием из серебра эффективно удаляет биоаэрозоли. Есть несколько коммерческих продуктов для обработки ран, которые содержат Ag в качестве противомикробного агента. Нанокристаллическое Ag в повязках на рану используется для лечения язв, а сульфадиазин Ag используется в пастах или кремах для лечения ожоговых ран [53, 54].

1.2 Взаимодействие наночастиц с наночастицами

На наноуровне во взаимодействиях частиц с частицами преобладают слабые силы Ван-дер-Ваальса, более сильные полярные и электростатические взаимодействия или ковалентные взаимодействия. В зависимости от вязкости и поляризуемости жидкости агрегация частиц определяется межчастичным взаимодействием. За счет модификации поверхностного слоя способность коллоида к коагуляции может быть усилена или затруднена [55]. Для наночастиц, взвешенных в воздухе, заряды могут накапливаться в результате физических процессов, таких как тлеющий разряд или фотоэмиссия. В жидкостях заряд частиц может быть стабилизирован электрохимическими процессами на поверхности. Детали взаимодействия наночастиц с наночастицами и взаимодействия наночастиц с жидкостью имеют ключевое значение для описания физических и химических процессов, а также временной эволюции свободных наночастиц. Их по-прежнему трудно охарактеризовать из-за небольшого количества молекул, вовлеченных в поверхностно-активный слой. Необходимо учитывать как поверхностную энергию, так и заряд, и сольватацию [56]. Из-за решающей роли взаимодействия наночастица-наночастица и взаимодействия наночастица-

жидкость, термин свободная наночастица может быть легко неправильно понят. Силы взаимодействия, притяжения или отталкивания, в решающей степени определяют судьбу индивидуальных и коллективных наночастиц. Это взаимодействие между наночастицами, приводящее к образованию агрегатов и / или агломератов, может влиять на их поведение. В газовых суспензиях агрегация в решающей степени определяется размером и диффузией, и коагуляция обычно происходит быстрее, чем в жидкой фазе, поскольку коэффициент прилипания ближе к единице, чем в жидкостях [57].

1.2.1 Взаимодействие наночастиц с живыми системами

Иерархическая самоорганизация жизни может существовать от отдельных молекул размером около 1 нм до крупных животных и растений (~ 10 м) и до очень больших организованных популяций вида (~ 100 м). Наночастицы могут иметь те же размеры, что и некоторые биологические молекулы, такие как белки и нуклеиновые кислоты. Многие из этих биомолекул состоят из длинных макромолекулярных цепей, которые сложены и сформированы за счет кооперативного и слабого взаимодействия между боковыми группами, водородными и солевыми мостиками [58].

Например, функционализированные наночастицы золота могут вторгаться в сложные складчатые структуры. Доказательства таких взаимодействий видны из опыта применения иммуномаркировки и связанных с ними методов функционализации поверхности для нацеливания наночастиц на биомолекулы в качестве маркеров для просвечивающей электронной микроскопии с высоким разрешением и систем оптической визуализации. Другие системы наночастиц, которые созданы для исследовательских целей в клеточных системах, включают квантовые точки и магнитные наночастицы. Было показано, что поверхностно-активные вещества изменяют путь наночастиц [59].

Все наночастицы при контакте с тканями и жидкостями тела немедленно адсорбируют на своей поверхности некоторые макромолекулы, с

которыми они сталкиваются на своем входе, образуя своего рода «корону». Специфические особенности этого процесса адсорбции будут зависеть от характеристик поверхности частиц, включая химию поверхности и поверхностную энергию, и могут регулироваться преднамеренной модификацией или функционализацией поверхностей. Это хорошо демонстрируется использованием специфических биомолекулярных линкеров, которые закреплены на поверхности наночастиц или внутри везикул и липосом [60].

Сродство наночастицы может быть сформировано таким образом, чтобы соответствовать конкретному белку и, таким образом, нацеливаться на конкретную биомолекулярную сборку на мембране или внутри конкретной органеллы или поверхности клетки. Специфичность таких поверхностных слоев используется в аналитических целях для оптического мечения биомолекул и для доставки лекарств или генов в клетки [36].

Таким образом, наличие, как пассивных поверхностных слоев, так и поверхностно-активных агентов ставит под угрозу оценку риска наночастиц на основе простого химического состава. В соответствии с объемной химией поверхности металлические наночастицы обладают значительной химической реакционной способностью, в то время как ионные кристаллические наночастицы накапливают белковые слои при воздействии на цитоплазму или лимфатическую жидкость. Этот белковый слой, возможно, участвует во взаимодействии наночастиц с клеточной системой [61].

На взаимодействие наночастиц с живыми системами также влияют характерные размеры. Наночастицы размером в несколько нанометров могут глубоко проникать внутрь биомолекул, что невозможно для более крупных частиц [62].

Известно, что вдыхаемые наночастицы достигают крови и могут достигать других участков-мишеней, таких как печень, сердце или клетки крови. Наночастицы могут перемещаться через мембраны. Существует мало

доказательств наличия неповрежденного клеточного или субклеточного механизма защиты. [63].

Ввиду активной функционализации и возможного взаимодействия металлических наночастиц с биомолекулярными структурами важно учитывать дозу и мощность дозы агента в виде частиц, его способность распространяться в организме и экосистеме, снижение числовой концентрации и эрозия отдельных частиц [64].

Многие наночастицы обладают значительной растворимостью. Для этих материалов взаимодействие с живыми системами остается достаточно близким к химическому веществу в массе, чтобы оправдать использование хорошо установленных процедур и подходов к токсикологическим испытаниям. Для биоразлагаемых частиц состав частиц и продукты разложения будут влиять на их биологические эффекты. С другой стороны, материалы с очень низкой растворимостью или способностью к разложению могут накапливаться в биологических системах и сохраняться там в течение длительного времени. Именно с наночастицами такого характера должны возникнуть наибольшие опасения, и следует обратить внимание на сравнение устойчивости частиц и постоянных времени метаболической и клеточной активности в пределах целевого хозяина [34, 62].

1.2.2 Взаимодействие наночастиц с белками

Взаимодействие наночастиц с белками основано на биореактивности наночастиц. Это взаимодействие приводит к образованию динамической короны наночастица-белок. Корона белка может влиять на поглощение, воспаление, накопление, деградацию и очищение наночастиц. Кроме того, поверхность наночастиц может вызывать конформационные изменения в адсорбированных белковых молекулах, которые могут влиять на общую биореактивность наночастицы [65]. Глубокое понимание таких взаимодействий может быть направлено на создание биосовместимых

наноматериалов с контролируемыми характеристиками поверхности в биологической среде.

Наночастицы обладают уникальными свойствами, которые могут быть полезны в самых разных областях применения, и, следовательно, они вызывают значительный интерес. В частности, ведутся исследования в биомедицинской области, интенсивно разрабатываются нановакцины и нанопрепараты [66]. Тем не менее, знания о биосовместимости и рисках воздействия наноматериалов ограничены. Все большее число исследований показывает отрицательное действие наноматериалов в клеточных системах *in vitro*, но неясно, можно ли достоверно экстраполировать имеющиеся данные для прогнозирования неблагоприятного воздействия нанотехнологий на людей. Следовательно, существует настоятельная необходимость понять молекулярные механизмы взаимодействия наночастиц и биологических систем.

В биологической среде наночастицы могут взаимодействовать с биомолекулами, такими как: белки, нуклеиновые кислоты, липиды и даже биологические метаболиты из-за их наноразмеров и большого отношения поверхности к массе [67]. Особое значение имеет адсорбция белков на поверхности наночастиц. Образование конъюгатов наночастица-белок обычно называют коронацией [68]. Можно предположить несколько последствий, к которым приводит адсорбция белка на поверхности наноносителя.

Белки представляют собой полипептиды с определенной конформацией и несут поверхностный заряд в зависимости от pH окружающей среды. Адсорбции белков на нано-биоинтерфейсе помогают несколько сил, такие как водородные связи, силы сольватации, взаимодействия Ван-дер-Ваальса и т.д. Общее формирование комплекса наночастица-белок является многофакторным процессом и зависит не только от характеристик наночастиц, но и от взаимодействующих с ними белков и среды. Определенные скорости ассоциации и диссоциации для каждого белка определяют долговечность их взаимодействия с поверхностью наноносителя.

Необратимое (или, по крайней мере, долгосрочное) связывание белков на поверхности наночастицы приводит к образованию «твердой короны», тогда как быстрое обратимое связывание белков с быстрым обменным курсом образует «мягкую корону» [69-73].

Конъюгированные с антителом наночастицы могут использоваться главным образом в двух биомедицинских применениях: терапии и диагностике. В терапии развитие целенаправленной доставки лекарств представляет собой наряду с восстановлением тканей основное применение наночастиц, конъюгированных с антителами.

Сывороточные / плазменные клеточные белки представляют собой сложные биологические системы, и следует учитывать, что наночастицы могут образовывать комплексы при воздействии нескольких, очень разных систем *in vivo*. При вдохе наночастицы могут проходить через слой слизистой оболочки, эпителиальные клетки легких и, наконец, проникать в кровь. Аналогично, на клеточном уровне после фагоцитирования моноцитом наночастица может быть взята в эндосомы, которые в конечном счете сливаются с лизосомами. Все это может привести к тому, что наночастица подвергнется сложной последовательной модификации, механизмы которой до сих пор полностью не изучены [74]. На кинетику адсорбции белка на поверхности наночастиц может влиять несколько факторов. Количество белков, доступных для взаимодействия с поверхностью наночастицы, является одним из таких факторов, которые могут сильно влиять на состав конъюгата наночастица-белок. На примере плазменных белков, взятых в концентрациях от 3% до 80% плазмы, наблюдалось, что связывание белков с носителем зависело от концентрации их в плазме, таким образом, определенное количество белков, адсорбированных на поверхностях кремнезема или полистирольных наночастиц, увеличивалось с увеличением их концентрации в плазме [75]. При прохождении через различные среды, богатые белком, в системе *in vivo* поверхность наночастицы может быть предварительно покрыта конкретными белками. Это также может определять, какой новый белок будет

связываться с уже сформированным комплексом. Было показано, что кремниевые или полистирольные наночастицы сохраняют «отпечаток» белков плазмы даже после последующих инкубаций с другими биологическими жидкостями [76].

В плазме человека наночастицы могут связываться с такими белками, как сывороточный альбумин, иммуноглобулины, фибриноген, аполипопротеины и т.д. (таблица 1.1).

Таблица 1.1 Белки сыворотки / плазмы, адсорбированные на поверхности различных типов наноматериалов с различными размерами и химией поверхности [76].

Наноматериал	Размер (нм)	Химия поверхности	Дисперсионная среда	Определяемые белки
Полистирольные наночастицы	50, 100	NH ₂ , COOH	Сыворотка человека	Факторы коагуляции, Иммуноглобулины, липопротеины, белки комплемента, белки острой фазы
Полистирольные наночастицы	100	COOH	Сыворотка человека (обедненная)	Плазминоген, анти-CD4, иммуноглобулин, альбумин, белки системы комплемента
Наночастицы сополимера	70, 200	-	Плазма человека	Альбумин, фибриноген, аполипопротеины, иммуноглобулины
Супермагнит	-	-	Плазма человека	Альбумин, альфа-1-антитрипсин, цепи

ные наночастицы оксида железа				фибриногена, трансферрин, цепи иммуноглобулинов,
Наночастицы TiO ₂ , ZnO, SiO ₂ , углеродные нанотрубки	-	-	Плазма человека	Цепи фибриногена, легкие цепи иммуноглобулина, фибрин, альбумин, полипротеин, белки системы комплемента, фибронектин
Магнитные наночастицы	50, 200	Декстран COOH, NH ₂ , ПЭГ COOH, ПЭГ-NH ₂	Бычья сыворотка	Альбумин, Аполипротеин Факторы комплемента, Витронектин, Гемоглобин
Наночастицы золота	5,10,20	Полимерн ое покрытие	Плазма человека	Альбумин, цепи фибриногена, аполипротеин
Наночастицы золота	15,40,8 0	-	Бычья сыворотка	Транспортные белки, факторы коагуляции, тканевые белки

Исследования показали наличие липопротеинов высокой плотности в короне белка на полистироловых наночастицах [77]. Адсорбционная картина белков крови на чужеродных неорганических поверхностях является динамической, где более распространенные белки, такие как альбумин и фибриноген, могут первоначально занимать поверхность и впоследствии заменяться другими белками, имеющими более высокую аффинность связывания с поверхностью. Такая последовательная картина связывания

белков плазмы основана на теории Вромана [78], и также была предложена для нанопервохностей.

Адсорбция белка на поверхности наночастицы также зависит от сродства белка к данной поверхности, его способности полностью занимать поверхность. Способ, с помощью которого молекулы белка располагаются на поверхности наночастиц, может влиять на биологическую реакцию способность последнего на клеточном уровне [79]. Показано, что плазменные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и трансферрин, адсорбируются монослойным способом на поверхности наночастицы железа-платины (FePt) [80]. Профессор Курош Резван с коллегами наблюдали, что бычий сывороточный альбумин (БСА) адсорбируется на поверхности оксида алюминия в виде монослоя, используя 30-36% его общего отрицательного заряда, и что дополнительные молекулы БСА из среды связываются с этим монослоем в виде димеров [81].

В диагностике применение наночастиц может быть разделено на то, которое используется *in vivo* и то, которое используется в экспериментах *in vitro* (таблица 1.2). Применения *in vitro* и *in vivo* включают в себя контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии (МРТ), зондирование, сортировку клеток, биосепарацию, иммобилизации ферментов, иммунологические анализы, трансфекцию (доставку генов), очищение и т.д. [82].

Таблица 1.2 Общая схема различных применений конъюгированных с антителами наночастиц [82].

Конъюгаты антител с наночастицами			
Терапия		Диагностика	
Доставка лекарств	Термическая абляция/фототерапия	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>

	Восстановление тканей	Магнитно-резонансная томография	Иммуноанализ
	Радиотерапия		Трансфекция
			Биосепарация
			Иммобилизация ферментов
			Сортировка клеток
			Зондирование

1.2.3 Изменения в структуре адсорбированных белков, вызванные действием наночастиц

Поверхность наночастицы может изменять структуру и, следовательно, функцию адсорбированного белка, влияя, таким образом, на его общую биореактивность. Изогнутые поверхности наночастиц по сравнению с плоскими поверхностями обеспечивают дополнительную гибкость и увеличение площади поверхности адсорбированных белковых молекул [83].

Изогнутые поверхности наночастиц могут также влиять на вторичные структуры белков и в некоторых случаях вызывать необратимые изменения [84]. Интересно отметить, что химические свойства отдельных белков и их структурная гибкость также играют важную роль в регулировании поверхностных модификаций их вторичных структур [85]. Наночастицы золота, как было показано, влияют на конформационные изменения в структуре БСА дозо-зависимым способом [86], тогда как никаких серьезных конформационных изменений не было зарегистрировано для БСА, при его адсорбировании на наночастицах фуллерена C_{60} [87]. Было показано, что наночастицы диоксида титана (TiO_2) вызывают конформационные изменения

и повторную полимеризацию тубулина, являющегося основным цитоскелетным белком [88]. Спектроскопическое исследование взаимодействия наночастиц оксида цинка (ZnO-NP) с БСА также не показало структурного искажения его общей структуры, однако были зарегистрированы незначительные конформационные изменения [89]. Конформационные изменения белка, вызванные действием NPs, могут влиять на последующие белок-белковые взаимодействия, клеточную сигнализацию, а также ДНК-транскрипцию. Потеря активности фермента может быть вызвана конформационными изменениями в активном сайте, в результате его связывания с наночастицей. Доктор Франческо Турчи и коллеги показали, что РНКазы и лизоцим сохранили свои нативные структуры на наночастицах кремнезема, тогда как альбумин и лактопероксидаза подверглись необратимому конформационному изменению [90-91]. Подобным образом, такие конформационные изменения также могут увеличить доступность активного сайта фермента для его субстрата. Было показано, что наночастицы кремнезема (SiO_2) способны индуцировать конформационное изменение, подобное расплавленной глобуле, в карбоксиангидразе человека, в то время как удаление наночастиц приводило к образованию трех промежуточных нативных конформаций, каждая из которых сохраняла каталитическую активность. Конформационные эпитопы являются результатом специфического сгибания белковой полипептидной цепи. В то время как непрерывные (линейные) эпитопы являются областями на первичной структуре белка и состоят из 10-12 аминокислот, и также способны вызывать иммунный ответ [92-94]. Поверхность наночастиц может вызывать аномальное разворачивание связанных белков с образованием новых конформационных эпитопов или может также индуцировать развёртывание нативной структуры белка для обнаружения скрытых эпитопов (рисунок 1.4) [95]. Такие скрытые эпитопы могут влиять на функциональность связанных белков, например, на выявление нежелательного иммунного ответа. Постдок Джейсон Денг с коллегами показали, что отрицательно заряженная

полиакриловая кислота – конъюгированная с золотыми наночастицами связывает фибриноген из плазмы крови и вызывает его разворачивание, что, в свою очередь, приводит к активации рецептора Mac-1 на клетках THP-1, вызывая высвобождение воспалительных цитокинов через путь NF-κB [95]. Изменение структуры белка может привести к потере толерантности к собственным клеткам организма, что в худшем случае может спровоцировать аутоиммунные реакции и является важной проблемой [96].

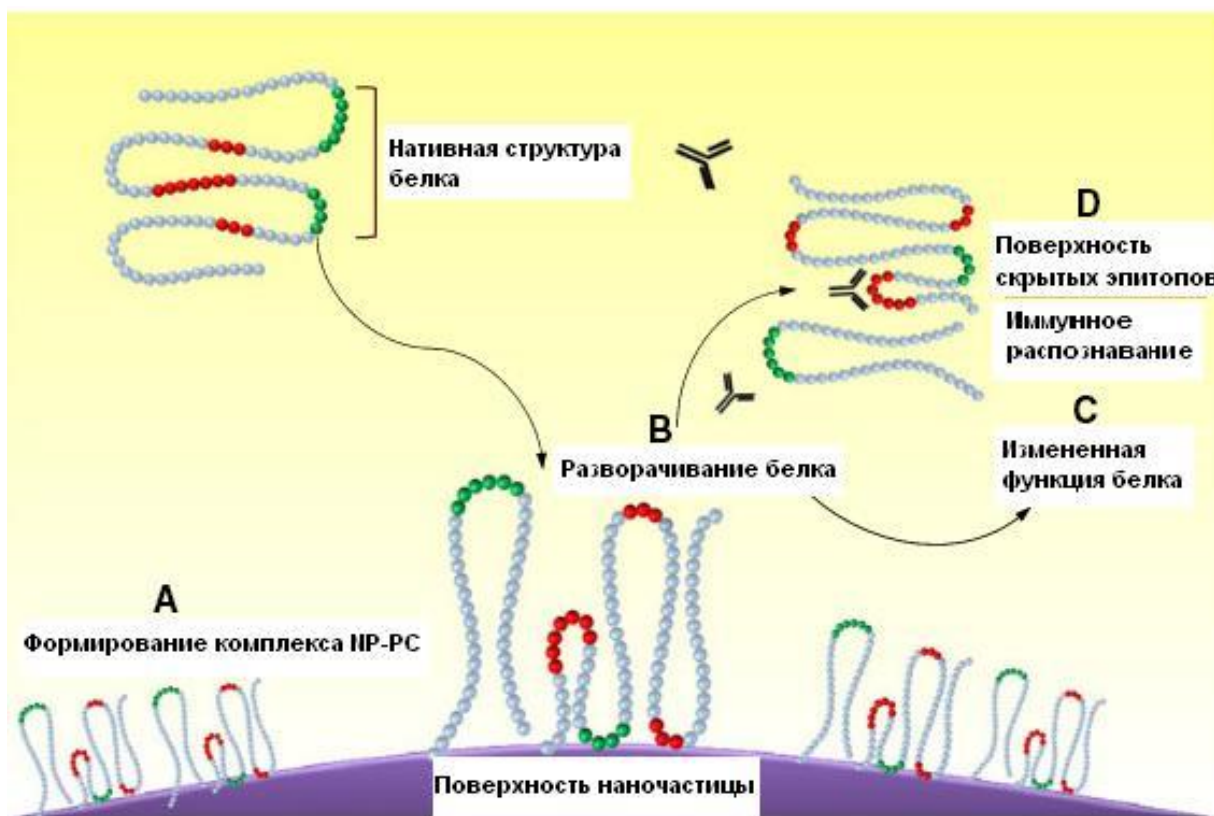


Рисунок 1.4 Схематическое изображение поверхности наночастицы, вызывающей разворачивание белковой молекулы при их взаимодействии.

(А) Молекулы белка адсорбируются на поверхности наночастицы, образуя комплекс, называемый (В). Поверхность наночастицы может вызвать конформационное изменение нативной структуры адсорбированной молекулы белка, заставляя его разворачиваться. Такие конформационные изменения белка могут либо (С) изменять функцию нативной молекулы белка, либо даже привести к (D) обнаружению «скрытых» эпитопов, что может привести к иммунологическому распознаванию комплекса [95].

Наночастицы также могут вызывать конформационные изменения в белках, которые могут приводить к образованию фибрилл [97-98]. Профессор Сара Линсе с коллегами показали, что ряд наночастиц (сополимер, оксид церия, углеродные нанотрубки, квантовые точки) способны индуцировать фибрилляцию β 2-микроглобулина, обусловленной увеличением локализации белка на поверхности наночастицы, что приводит к образованию олигомеров [99]. Фибриллирование белков ассоциировано с такими заболеваниями, как болезнь Паркинсона и Альцгеймера. Тот факт, что наночастицы могут выступать в качестве платформ для инициирования таких структурных изменений белка, требует дальнейшего изучения этого явления.

Поверхность наночастиц также может представлять термодинамическую неустойчивость для адсорбированной молекулы белка, что делает ее восприимчивой к химической денатурации. Наночастицы ZnO индуцировали разворачивание периплазматического домена белка ToxR холерного токсина, восприимчивого к денатурации хаотропными агентами [100]. Интересно, что наночастицы ZnO смогли стабилизировать α -спиральное состояние лизоцима против денатурирующих агентов [101]. Таким образом, «судьба» белков после связывания на поверхности наночастиц частично определяется их собственными химическими свойствами. Список структурных изменений, вызванных взаимодействием NPs с одиночными белками, представлен в таблице 1.3 [102].

Таблица 1.3. Конформационные изменения белков, образующиеся в результате взаимодействия с наночастицей [102].

Тип и размер наночастиц (нм)	Исследуемый белок	Молекулярный вес белка (кДа)	Изменение в структуре белка	Метод исследования	Что наблюдалось

Наночастицы ZnO, 25	Белок ToxR холерного вибриона	32,5	Есть	Спектроскопия кругового дихроизма	НП-белковый комплекс, чувствительный к денатурации
Наночастицы ZnO, 50	БСА	66	Есть	Спектроскопия кругового дихроизма	Незначительные конформационные изменения, вторичная структура сохранена
Наночастицы ZnO, 100	БСА	66	Есть	Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье	Незначительные конформационные изменения во вторичной структуре
Наночастицы TiO ₂ , 20	Тубулин	55	Есть	Флуоресцентная спектроскопия	Полимеризация белка
Наночастицы SiO ₂ , 6,9,15	Карбоновая ангидраза	29	Есть	Ядерный магнитный резонанс	Активность белка сохранялась
Наночастицы SiO ₂ , 40	БСА Лактопероксидаза	66 77,5	Есть Есть	Спектроскопия комбинации	БСА и лактопероксидазы связываются необратимо

	Лизоцим куриного яйца	14,3	Нет	онного рассеяния	
	РНКаза А	13,7	Нет		
Наночастицы золота, 45	БСА	66	Есть	Спектроск опия кругового дихроизма	Конформацион ные изменения зависят от дозы
Наночастицы золота, 5-100 нм	Альбумин Фибриноге н Гамма- глобулин	67 340 120	Есть	Спектроск опия кругового дихроизма и флуоресце нтная спектроско пия	Незначительные конформацион ные изменения
Супермагнит ные наночастицы оксида железа, 5-10	Трансфе рин	80	Есть	Спектроск опия кругового дихроизма	Необратимое взаимодействие
Одностенные углеродные нанотрубки	Пероксида за хрена Лизоцим куриного яичного белка	44 14,3	Нет Нет	Спектроск опия кругового дихроизма	Комплексы «наночастица- белок» сохраняли ферментативную активность

1.2.4 Белковая корона наночастицы: влияние на клеточные взаимодействия

Учитывая небольшой размер наночастиц, вполне вероятно, что они могут столкнуться с различными типами клеток, а также транслоцировать через мембранные барьеры в организме. Наночастицы менее 100 нм в диаметре могут проникать в клетки, меньше, чем 40 нм могут проникать в ядро клетки и меньше 35 нм пересекают гематоэнцефалический барьер [103-105]. Поглощение наночастиц может происходить через фагоцитоз, макропиноцитоз или эндоцитоз.

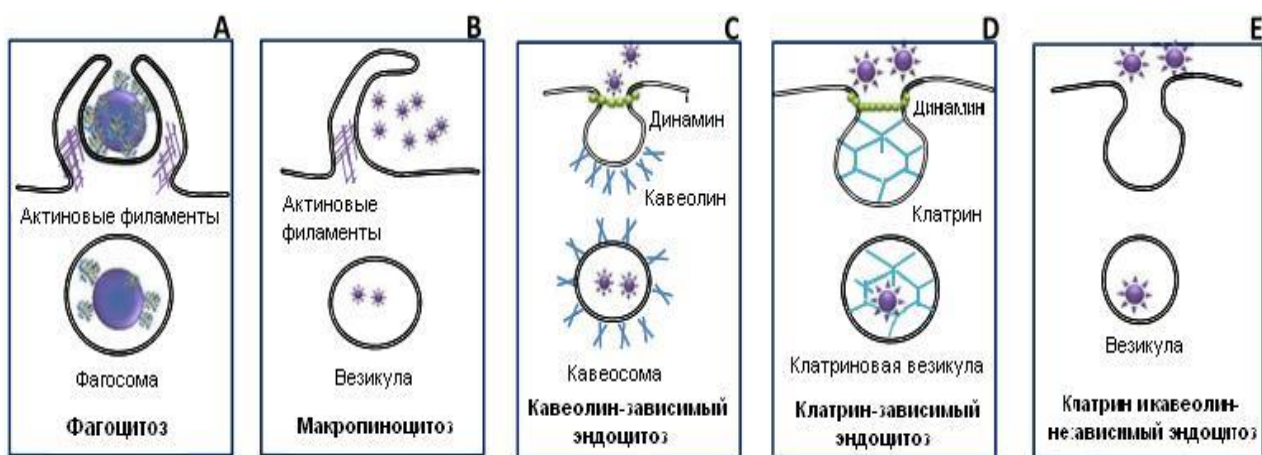


Рисунок 1.5. Взаимодействие наночастиц с клеткой [105].

Наночастицы взаимодействуют с клетками через корону белка. (А) Поглощение крупных конъюгатов, скопления наночастиц может происходить через поглощение специализированными клетками, такими как макрофаги и нейтрофилы, посредством фагоцитоза. Это связано с сгибанием плазматической мембраны над комплексом с последующим образованием фагосомы. (В) Неспецифическое поглощение внеклеточной жидкости, содержащей агрегаты наночастиц могут также поглощаться клетками посредством макропиноцитоза, который включает в себя раздражение плазматической мембраны с образованием везикул, которые в итоге сливаются с образованием лизосом. Эндоцитоз комплексов наночастица-белок также может управляться специфическими рецепторами, включающими образование (С) кавеолы, которая представляет собой отложение плазматической мембраны, состоящее из связывающих холестерин белков,

называемых кавеолинами или (D) везикулами, покрытыми клатрином (E). Помимо указанных механизмов существуют и другие эндоцитарные пути, независимые от клатрина или кавеолина, которые также могут способствовать поглощению наночастицы.

После проникновения наночастицы могут накапливаться в лизосомах [106,107], внутриклеточных вакуолях, как сообщается в случае поглощения одностенных нанотрубок (SWCNT) клетками HeLa [108], или цитоплазме клеток, в случае поглощения наночастиц сополимера [109]. Цитотоксичность и иммунная модуляция являются двумя наиболее важными последствиями поглощения наночастиц клетками. Это особенно важно, при рассмотрении наночастиц, которые имеют склонность к растворению после достижения кислотных лизосомальных отделений клетки, что способствует клеточной токсичности. Чтобы понять судьбу наночастиц в биологической среде, необходимо систематически анализировать сложные факторы, влияющие на поглощение этих новых материалов [110].

Адсорбция белка, физические характеристики наночастиц и свойства взаимодействующих с ними клеток могут влиять на поглощение наночастиц. Было показано, что у разных типов клеток кинетика поглощения одного и того же наноматериала будет отличаться. Адсорбция белков на поверхности наночастиц может произойти мгновенно. Поэтому можно предположить, что взаимодействие наночастиц с клеточными структурами является косвенным и происходит в основном через белковую корону наночастицы, а не напрямую с поверхностью наночастиц таким образом, конъюгат может влиять на поглощение наночастиц клетками [111].

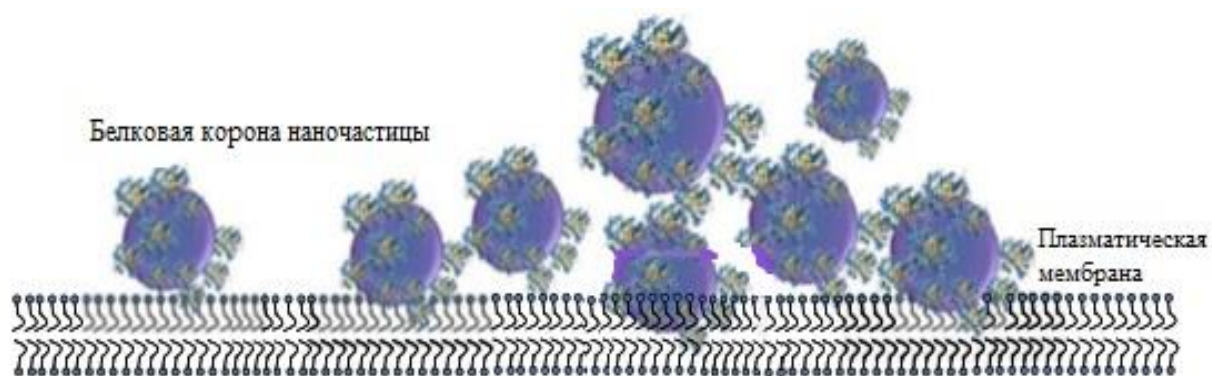


Рисунок 1.6. Взаимодействие наночастиц с плазматической мембраной клетки [111].

Поглощение может быть либо ингибировано, из-за потери адсорбированным белком своей структуры, либо облегчено, за счет доступа к рецепторам на поверхности клетки, в результате разворачивания адсорбированного белка. Это особенно важно при рассмотрении дифференциального связывания физиологически активных белков на поверхности наночастиц. В нескольких исследованиях *in vitro* изучалось клеточное поглощение наночастиц в присутствии сывороточных белков. Доктор Д. Дутта с коллегами провели подробное исследование, чтобы показать, что альбумин, адсорбированный на поверхности SWCNT, ответственен за индуцирование противовоспалительного пути в макрофагах RAW. Аналогичным образом, было определено, что адсорбция легочного сурфактанта SP-A на магнитных наночастицах повышает их поглощение макрофагами по сравнению с теми, которые были предварительно покрыты БСА [112]. Также, было показано, что кавеолин-опосредованный эндоцитоз наночастиц флуоресцентного полистирола, размером 20-100 нм, зависит от присутствия альбумина на поверхности наночастиц. Кроме того, кавеола, которая представляет собой инвагинацию клеточных мембран, как правило, 60-80 нм в диаметре, вмещала в себя до трех полистирольных наночастиц 20 и 240 нм, что позволяет предположить, что эти структуры могут быть гибкими при размещении нано-белковых комплексов большого размера [113].

Аполипопротеины представляют собой класс белков, которые часто образуют конъюгат наночастица-белок в крови для ряда поверхностей. Они представляют интерес из-за их способности облегчать поглощение наночастиц, путем связывания с конкретными рецепторами на клетках. Было определено, что аполипопротеины В и Е способствуют переносу наночастиц, покрытых полисорбатом 80, связанных с лекарством, через гематоэнцефалический барьер. Предполагается, что рецепторно-опосредованный эндоцитоз является способом поглощения наночастиц в этом случае [114, 115]. Непроницаемая природа гематоэнцефалического барьера затрудняет доставку основных веществ и других соединений в мозг. Способность наночастиц транслоцировать через этот барьер обеспечивает многообещающее будущее в этом направлении, но также представляет и ряд проблем, связанных с токсичностью наноматериалов.

Определенные белки сыворотки, такие как иммуноглобулины и белки системы комплемента, обладают опсонизирующими характеристиками. Присутствие таких опсонизирующих белков на поверхности наночастиц в крови может привести к иммунному распознаванию «наночастица-белкового» комплекса. Было показано, что адсорбция белка системы комплемента С3 и опсонизирующего белка IgG на 50 нм полистирольных наночастицах, покрытых лецитином, со временем увеличивается, что напрямую влияет на их поглощение клетками Купфера [116]. Таким образом, опсонизация поверхности наночастиц сывороточными белками заметно влияет на их поглощение.

Большая площадь поверхности белков, адсорбирующихся на поверхности наночастиц, часто приводит к увеличению гидродинамического размера последних. Такие крупные конъюгаты могут быть захвачены как фагоцитарными клетками, так и клетками не фагоцитарного типа. Доктор А. Лесняк с коллегами показали, что поглощение наночастиц полистирола нефагоцитарными эпителиальными клетками легкого значительно увеличивалось, при инкубировании их в не нагретой сыворотке, по сравнению

с тем, когда их инкубировали в теплой инактивированной сыворотке [117]. Хотя в этом исследовании не указывается точный механизм, авторы сообщают, что количество протеина, а также присутствие термолабильных белков системы комплемента в не нагретой инактивированной сыворотке, может увеличивать их способность к поглощению клетками.

Другим возможным объяснением усиленного поглощения является то, что взаимодействие наночастиц с клетками является не таким специфичным; и зависит исключительно от количества белка, а не от наличия определенных белков на поверхности наночастиц. Это было показано Эренбергом и др. в их исследовании, где инкубирование наночастиц с полной и истощенной сывороткой не оказывало влияния на связывание наночастиц с эндотелиальными клетками *in vitro* [118].

Надо сказать, что большинство из этих исследований проводятся в условиях *in vitro*, часто с бессмертными клеточными линиями, которые могут иметь характеристики отличные от их аналогов *in vivo*. Более того, *in vivo* наночастицы взаимодействуют не только с белковыми средами, но также, одновременно и с другими частями клетки, что является сложной задачей для того, чтобы правильно экстраполировать поведение наночастиц *in vivo*. Изменение нативной структуры связанного белка зависит от поверхности взаимодействующей наночастицы, и вместе эти два фактора определяют биологическую реактивность наночастиц. Помимо адсорбции белка существует также ряд других физико-химических характеристик, таких как дзета-потенциал и размер поверхности наночастицы, также оказывающих влияние на способность к поглощению наночастиц клетками [119-122].

1.2.5 Физико-химические характеристики наночастиц, влияющие на адсорбцию белка и на взаимодействия его с клеткой

Состав наночастиц [122,123], гидрофобность [124], наличие определенных функциональных групп, рН и температура [125] оказывают влияние на адсорбцию белка на поверхности наночастицы. Сообщалось также,

что осаждение наночастиц, особенно в системе воздействия *in vitro*, влияет на клеточные взаимодействия [126].

Коллоидные растворы наночастиц часто имеют тенденцию образовывать агломераты. Размер наночастиц, концентрация и поверхностный заряд могут влиять на его формирование.

Крупные агломераты наночастиц могут существенно отличаться по биологическим свойствам по сравнению с наночастицами, которые эффективно диспергируются [127-129]. Агломерация также может изменить доступную площадь поверхности для связывания белка. Неровная поверхность агломерированных наночастиц может вызывать конформационные изменения белка. Наночастицы, диспергированные в безбелковых средах, часто склонны к агломерации. Высокие концентрации наночастиц в растворе, содержащем определенные белки, такие как фибриноген, могут, напротив, привести к агрегации из-за образования дисульфидных мостиков в белках.

Еще одна физическая характеристика наночастиц, которая, как известно, влияет на связывание белка, - это размер. Сообщалось, что отрицательно заряженная полиакриловая кислота, связанная с наночастицами золота, размером 12 нм, связывает фибриноген с более высокой аффинностью по сравнению с наночастицами размером 7 нм [130]. В другом исследовании, было показано, что 15 нм наночастицы кремния индуцировали изменение вторичной структуры белка карбоангидразы I человека намного сильнее, чем наночастицы кремния с размером 6 нм [131]. Стабильность рибонуклеазы А при связывании с наночастицами резко снижалась при увеличении размеров последних [132]. Силикатные наночастицы (100 нм) способны индуцировать большую потерю структуры и функции белка лизоцима по сравнению с действием этих же частиц размером 4 нм [133,134].

Форма наночастиц также играет важную роль при связывании с белками. Это подтверждается исследованием, в котором изучались наноструктуры TiO_2 и нанотрубки, которые дифференциально адсорбировали на себе белки

плазмы [135]. Аналогично, модификация поверхностного заряда наночастиц также может влиять на адсорбцию белка. Исследования также показали, что поверхности наночастиц без заряда связывают меньше белков, чем их отрицательно заряженные (функционализированные COOH) или положительно заряженные (NH₂-функционализированные) аналоги [136,137]. Недавнее исследование показало, что структурная модификация самопротеина, такого как фибриноген, может быть затронута поверхностными свойствами золотых наночастиц. Было показано, что отрицательно заряженные золотые наночастицы, в отличие от положительно или нейтрально заряженных, связывают фибриноген, что приводит к высвобождению цитокинов в моноцитарных ТНР-1 клетках человека *in vitro* [138].

Химическая модификация поверхности наночастиц для предотвращения адсорбции белков может быть осуществлена с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ). Такие изменения поверхности наночастицы защищают ее от распознавания иммунными клетками [139]. Сообщается также, что кремниевая обработка поверхности наночастиц предотвращает адсорбцию белка [140].

Важным вопросом, требующим дальнейшего внимания, является косвенное влияние физико-химических характеристик наночастиц на цитотоксичность, сигнализацию клеток и т.д. Цитотоксичность и выделение цитокинов эпителиальными клетками легких, при воздействии нанопорошков ZnO или TiO₂, определялись формой и кристаллической структурой последних [141]. Показано, что серебряные наностержни токсичны для эпителиальных клеток легких человека, тогда как наносферы с той же массовой концентрацией токсического воздействия не оказали [142]. Также, различные воспалительные реакции в клетке регистрировались при взаимодействии с наночастицами ZnO сферической формы [143].

1.2.6 Аналитические подходы к изучению взаимодействия наночастиц с белками

Идентификация белков, входящих в состав конъюгата, необходима для понимания биореактивности наночастиц. Взаимодействие поверхностей наночастиц с отдельными белками или протеомами может быть изучено с использованием ряда аналитических методов (таблица 1.4). Масс-спектрометрия белков является широко используемым методом для изучения конъюгатов белок-наночастица (рисунок 1.7). Полезной разработкой для данного метода является использование стабильной маркировки изотопов аминокислотами в культуре клеток SILAC. Этот метод использовался не только для идентификации, но и для определения количества белков, связанных на поверхностях наночастиц [144].

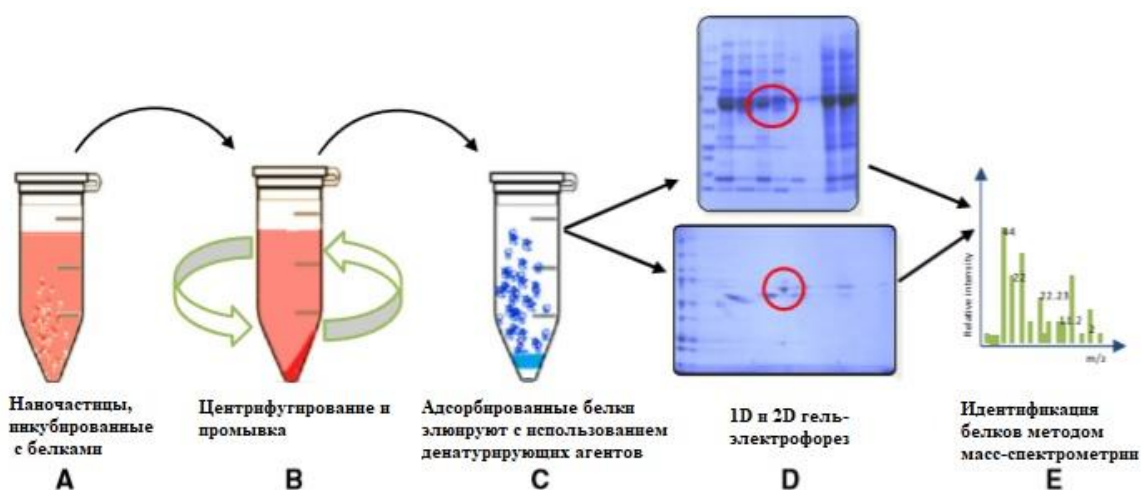


Рисунок 1.7 Схематическое изображение широко используемой стратегии для выделения и идентификации поверхностных адсорбированных белков, когда наночастицы взаимодействуют со сложными белковыми смесями.

(А) Инкубация наночастиц с белковыми растворами приводит к адсорбции белка на поверхности наночастиц. Концентрация белка может влиять на количество и идентичность белков, адсорбированных на представленной поверхности НЧ. (В) Центрифугирование для удаления

несвязанных белков с последующей повторной промывкой осадка наночастица-белок важно для выделения «твердой белковой короны». (С) Выделение конъюгата может быть достигнуто путем элюирования адсорбированных белков с использованием денатурирующих агентов, таких как буфер Лаэмми, который содержит додецилсульфат натрия и 2-меркаптоэтанол, которые облегчают общую десорбцию белков. (D) Таким образом, десорбированные белки могут быть разделены с использованием одного или двухмерного гель-электрофореза. (E) Отдельные полосы белков, представляющие интерес, могут также быть подвергнуты трипсическому расщеплению и могут быть впоследствии идентифицированы с использованием масс-спектрометрических методов.

Взаимодействие поверхностей наночастиц с одиночными очищенными белками может быть исследовано методом флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма (CD). Флуоресцентная спектроскопия использует внутреннюю флуоресценцию белка, тогда как CD-спектроскопия использует изменения хиральных свойств белка для прогнозирования изменений в его вторичной структуре. Информация о структуре белка также может быть получена с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Специфические взаимодействия молекул убиквитина с поверхностью наночастиц золота изучались с использованием ЯМР, что позволило идентифицировать точное место связывания убиквитина с поверхностью наночастиц [145]. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия также использовалась для мониторинга адсорбции белка на поверхностях наночастиц и, как было показано, чувствительна к наномолярным количествам наночастиц.

Таблица 1.4. Аналитические методы для проверки физико-химических характеристик, мониторинга конформационных изменений поверхностного белка на поверхности наночастиц и поглощения наночастиц клеточными структурами [144].

Анализируемые характеристики	Метод, используемый для анализа	Краткое описание
Физические характеристики наночастиц		
Размер и заряд	Динамическое рассеяние света Ультрацентрифугирование	Изменения гидродинамического диаметра наночастиц при связывании с белками Изменения в гидродинамическом диаметре наночастиц
Распад	Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой	Для определения элементарного состава наноматериала
Форма и структура	Дифракция рентгеновского излучения Электронная микроскопия	Определяет кристаллическую структуру Визуализация структуры наночастиц
Площадь поверхности	Метод математического описания физической адсорбции	Измеряет удельную площадь поверхности, с использованием адсорбции газа на поверхности
Деагломерация	Ультразвук	Использование звуковой энергии для разрушения больших агрегатов наночастиц
Взаимодействие наночастицы с белком		

Аффинность связывания белка	<p>Флуоресцентная спектроскопия</p> <p>Ультрафиолетовая спектроскопия</p> <p>Поверхностный плазмонный резонанс</p> <p>Атомно-силовая микроскопия</p>	<p>Фиксирует изменения спектров флуоресценции за счет взаимодействия наночастиц с белком</p> <p>Фиксирует изменения спектров поглощения, в результате взаимодействия наночастица-белок</p> <p>Определяет изменения колебаний электронов на поверхности металла из-за взаимодействия наночастиц с белком</p> <p>Позволяет определить контур поверхности наноматериала</p>
Структурные изменения белка после связывания	<p>Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье</p> <p>Циркулярный дихроизм</p> <p>Рамановская спектроскопия</p>	<p>Измеряет адсорбцию амидных связей в белках для получения структурных изменений</p> <p>Определяет изменения во вторичной структуре белков в зависимости от их хиральных свойств</p> <p>Изучает молекулярные колебания для определения структуры</p>

	Ядерный магнитный резонанс	Опирается на магнитные свойства атомных ядер для определения структуры
Взаимодействие наночастиц с клеткой		
Поглощение наночастиц	Конфокальная микроскопия Конфокальная рамановская спектроскопия	Визуализация флуоресцентных наночастиц <i>in vitro</i>

Недавнее исследование показало, что наночастицы сополимера размером 70 нм связывают около 650 человеческих сывороточных альбуминовых молекул, а частицы размером 200 нм могут вмещать до 4600 молекул, это было определено с помощью метода изотермической калориметрии [145].

Визуализация поглощения наночастиц клетками часто осуществляется путем флуоресцентной маркировки поверхности наночастиц или синтеза флуоресцентных наночастиц, которые могут быть обнаружены с помощью проточной цитометрии или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Флуоресцентная маркировка наночастиц может, однако, модифицировать ее поверхность, что мешает последующим взаимодействиям с белком. Конфокальная рамановская микроскопия была недавно использована для изучения поглощения наночастиц Al_2O_3 и CeO_2 [146]. Сообщалось также, что этот метод не содержит метки и специфичен на уровне отдельных клеток.

Доцент Даниэль Делл'Орко с сотрудниками разработали математическую модель для прогнозирования кинетики связывания белка с поверхностями наночастиц [147]. Профессор Нанги с коллегами разработали имитационную модель для прогнозирования энергетических барьеров,

констант скорости транслокации и периодов полураспада наночастиц через липидные мембраны в зависимости от их физических свойств [148]. Экспериментальный подход, используемый в большинстве исследований, в настоящее время включает детальное исследование одного белка с поверхностью наночастицы, который состоит из нескольких различных типов белков [149].

Таким образом, несмотря на большое количество источников влияние наночастиц на иммунологические свойства антител не изучено, поэтому целью работы являлось изучение влияния наноносителей различной природы на иммунологические свойства моноклональных антител к тиреоглобулину щитовидной железы при конструировании конъюгатов «наночастица-антитело».

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Получение золь Ag, Au.

Гидрозоли серебра и золота были приготовлены при комнатной температуре по методике [114] восстановлением танином прекурсоров (AgNO_3 – золь $\text{Ag}_{(1)}$, и HAuCl_4) в присутствии буферного раствора тетрабората натрия с $\text{pH}=9$. Синтезированные этим методом золи отличаются высокой стабильностью с воспроизводимыми в течение двух лет спектрами поглощения.

Характеристики веществ: AgNO_3 (нитрат серебра) марки «х.ч.»; HAuCl_4 (тетрахлораурат водорода) марки «ч» (ВТУ МХП 2129-50, кристаллы жёлтого цвета находились в ампуле, запаянной под вакуумом); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (тетраборат натрия) марки «х.ч.»; танин $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ (пентадигаллоидглюкоза) марки «ч.» производства Германии.

Методика синтеза гидрозолей: к 1000 мл дистиллированной воды добавили 30 мл 0,05М раствора тетрабората натрия, 20 мл 0,1%-ного раствора танина. Затем отобрали 650 мл этого раствора и добавили к нему 2,5 мл 0,025М раствора соли металла.

Были взяты следующие навески (мг): $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – 523,5; танин – 20; соли серебра 10,625 (AgNO_3) и 19,5 (Ag_2SO_4); HAuCl_4 – 21,25. Полученные золи имели концентрацию наночастиц в растворе 2 мкг/мл [114].

Было приготовлено три биметаллических золя Ag_mAu_n , по методике аналогичной синтезу монометаллических золь, но к 650 мл буферного раствора добавляли эквимольные количества 0,025 М растворов AgNO_3 и HAuCl_4 в следующих объёмах (мл):

$V_{\text{AgNO}_3} + V_{\text{HAuCl}_4}$	золь 1: 2 + 0,5	золь 2: 1 + 1,5	золь 3: 0,5 + 2
Атомные соотношения Ag/Au	5	1	0,2

Три биметаллические композиции Ag_mAu_n получали из исходных моно-металлических гидрозолей Ag и Au с теми же атомными соотношениями Ag/Au.

2.2 Динамика образования моно- и биметаллических золей, изменение оптических характеристик биметаллических дисперсий.

Динамику образования моно- и биметаллических золей, а также изменение оптических характеристик биметаллических дисперсий изучали по спектрам поглощения наночастиц Ag и Au в видимой области (плазмонным спектрам).

Коллоидные растворы серебра и золота поглощают в видимой области, поэтому об образовании металлических частиц судили по изменению интенсивности спектра поглощения. Максимум поглощения спектра гидрозолей Ag лежал в области $\lambda_m = 413 - 420$ нм, а гидрозоль Au $\lambda_m = 520 - 530$ нм. Спектры регистрировали при комнатной температуре с использованием спектофотометра PerkinElmerLambda 650/850/950 UV / VIS Spectrometr. Использовали кюветы с длиной оптического пути 10 мм, в канале сравнения – дистиллированная вода.

В спектродинамических опытах после смешения и быстрого перемешивания буферного раствора с раствором соли Ag (Au) отбирали 4 мл в кювету и записывали спектры образующихся частиц Ag и Au в цифровом виде с интервалом 5 мин. в диапазоне длин волн от 300 до 800 нм с шагом 5 нм. Для анализа спектров поглощения, с целью получения параметров наночастиц металлов, использовали длинноволновую область плазмонного спектра наночастиц, в которой влияние поглощений других типов (не Друде, например, полоса-полоса) минимально.

2.3 Получение наночастиц полистирола

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

В качестве инициатора использовали 2,2'-азобис (2-метилпропионамидин) дигидрохлорид, водорастворимый катионный азоинициатор, в концентрации 0,1 % в расчете на мономер. Полимеризацию вели при 60°C в течение 4 часов до полной конверсии. В качестве ПАВ использовали додецилсульфат натрия ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) 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 ~700 нм (St2).

Процесс проводили при 70°C до полной конверсии мономера в течение 24 часов. В качестве инициатора использовали персульфат калия ($K_2S_2O_8$) в количестве 1 % масс. в расчете на мономер, концентрация мономерной фазы составляла 10 % масс. в расчете на систему.

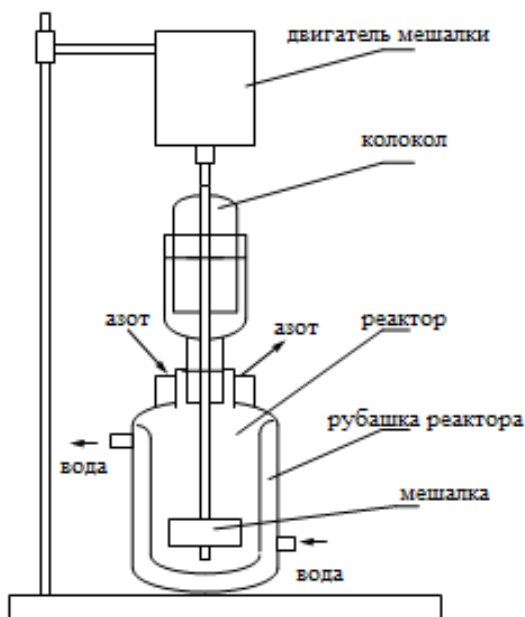


Рисунок 2.1 Схема реактора полимеризации

2.4 Определение размера и распределение наночастиц по размерам методом спектроскопии кросс- корреляции фотонов.

Размер и распределение наночастиц по размерам определяли методом спектроскопии кросс- корреляции фотонов на приборе Nanophox Symphatec GmbH

Таблица 2.1 Условия проведения измерений на приборе Nanophox Symphatec GmbH

принцип:	динамическое световое рассеяние
диапазон измерения:	1 нм - 10000 нм
расчет:	3D кросс-корреляция
применение:	эмульсии, суспензии
угол рассеяния:	90 градусов
контейнер для образца:	Кюветы 10 x 10 мм ² , 4 мл max; или 10/2 x 10 мм ² , 2 мл max., 50мкм min.
источник луча:	Гелий-неоновый лазер, 10 мВт max., интенсивность регулируется через ПО1

2.5 Определение размера наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии.

Размер наночастиц также определяли методом просвечивающей электронной микроскопии на приборе JEOL JEM-2100. Каплю золя переносили на предметную сетку, образец помещали в колонну просвечивающего электронного микроскопа и облучали электронным пучком с энергией 200кэВ. Область облучения на образце представляла круг с радиусом около 1 мкм. Наблюдение за процессом слияния происходило на площади 72 нм × 72 нм.

2.6 Измерение электрического потенциала наночастиц.

Дзета– потенциал (ξ) наночастиц измеряли методом электрофоретического рассеяния света на приборе Malvern.

Основной физической принцип - электрофорез. Образец помещали в кювету с двумя электродами. Электрическое поле прикладывали к электродам, а частицы, которые имеют заряд (эффективный дзета-потенциал), двигались по направлению к противоположно заряженному электроду, при этом их скорость (подвижность) зависела от величины дзета-потенциала. Наряду с обычными стеклянными кюветами погружного типа для исключения перекрёстного загрязнения при измерениях дзета-потенциала образцов использовали уникальные капиллярные одноразовые кюветы. Использовали золотые электроды, которые обеспечивают совместимость с широким спектром различных растворителей. Компактность позволяет осуществлять анализ (размер частиц и дзета-потенциал) образцов малых объемов, вплоть до 0.75 мл.

Диапазон измерения электрофоретической подвижности и дзета-потенциала макромолекул, наночастиц и коллоидных частиц (дисперсий, эмульсий, липосом) составляет 5 нм - 10 мкм в водных и неводных растворах.

2.7 Выделение и очищение тиреоглобулина

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 (МкАТ 1. и МкАТ 2.). Исследование иммунологических свойств МкАТ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Характеристика реактивов:

1. Фосфатно-солевой буфер PBS pH 7.4
2. Карбонат-бикарбонатный буфер (КББ) 10-кратный конц.
3. Тиреоглобулин
4. Twin 20 Sigma Fine Chemicals Biosciences
5. Субстрат ТМВ Sigma Aldrich
6. Серная кислота (H_2SO_4) 2 моль/л
7. Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase linked whole antibody (from sheep) GPR. (Антитела к Fc-фрагменту иммуноглобулина)

Состав буферов:

Буфер КББ:

1. 1,59 г Na_2CO_3H Sigma
2. 2,93 г $NaHCO_3$ Sigma
3. 1 л дистиллированной воды

20X PBS:

1. 160 г $NaCl$ Sigma
2. 4 г KCl Sigma
3. 28,8 г Na_2HPO_4 Sigma
4. 4,8 г KH_2PO_4 Sigma
5. 1 л дистиллированной воды

Лабораторное оборудование

1. 96-луночный планшет (Nunc)
2. Шейкер-встряхиватель (BioSan)
3. Многофункциональный планшетный анализатор Thermo Scientific

Varioskan Flash

4. Микропланшетный ридер Anthos 2020

2.8 Получение пероксидазных конъюгатов.

Получение пероксидазных конъюгатов проводили периодатным методом по Nakane. Смешивали антитела 5C7.1 и 3F11.1 в количестве 1 мл с 1 мл золя, концентрацией 2, 4, 8, 16, 32, 64 мг/мл. Далее инкубировали пробирки

с образцами на орбитальном шейкере при 200-250 оборотах в минуту, +37°C, 12 часов.

2.9 Реакция связывания наночастиц с моноклональными антителами.

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

Характеристика реактивов:

Растворы

30% раствор акриламида на 50 мл: 14,6г. акриламида и 0,4 г. Бисакриламида

44% раствор акриламида на 50 мл: 21,4 г акриламида и 0,55 г Бисакриламида

10% раствор ДСН: 5 г на 50 мл

0,1 М р-р ЭДТА: 2,6 г. на 100 мл

1,5 М трис- HCl буфер рН 8,8 18,5г триса. на 100 мл

0,5 М трис-HCl буфер рН 6,8 3,2 г триса на 50 мл

50% р-р глицерина

Электродный буфер: рН 8,34, содержащий 0,1% ДСН. 28,8 г. глицина растворить в 900 мл воды, оттитровать сухим трис до рН 8,34, добавить 20 мл 10% ДСН, довести водой до 1 л.

0,05% р-р бромфенолового синего 50 мг на 100 мл

2.10 Исследование влияния наночастиц на иммунологические свойства антител.

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

Имуноферментный анализ проводился в соответствии с нижепредставленным протоколом.

Сорбция антигена:

1) Разводили тиреоглобулин однократно карбонатно-бикарбонатным буфером до концентрации 5 мкг/мл, раскапывали в планшет и оставляли на ночь на +4°C

На следующий день:

2) Промывали планшет 3 раза TPBS (отмывочный буфер) по 350 мкл на лунку (отмывку производили после каждого этапа инкубации с новыми компонентами ИФА);

3) Добавляли конъюгаты антител к тиреоглобулину с наночастицами;

4) Далее инкубировали планшет на орбитальном шейкере при 200-250 оборотах в минуту, +37°C, 1 час;

5) Затем добавляли вторичные антитела в разведении 1:4000;

6) На последнем этапе добавляли субстрат ТМВ по 100 мкл (ставили планшет в темное место до появления окраски, ~15-20 мин.). Реакцию останавливали 4М H₂SO₄ (50 мкл на лунку);

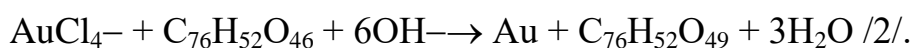
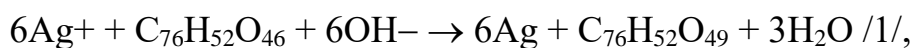
7) Измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 и 620 нм.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение металлических наночастиц различной природы с узким распределением по размерам

На первом этапе экспериментов было необходимо получить металлические наночастицы различной природы с узким распределением по размерам. Для этого методом химического восстановления танином соли серебра (AgNO_3) и золота (HAuCl_4) в присутствии буферного раствора тетрабората натрия с $\text{pH}=9$ были получены наночастицы серебра (Ag) и золота (Au).

В реакции восстановления серебра и золота танин – $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ переходит в флорафены $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{49}$ [150] по реакциям:



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

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

Полученные коллоидные растворы золота имели характерный малиновый оттенок, коллоидные растворы серебра - лимонный. Внешний вид металлоколлоидов с концентрацией серебра 0,001 вес. % и золота 0,001 вес. % показан на рис. 3.1.а, 3.1.б.



Рисунок 3.1.а. Гидрозоль серебра



Рисунок 3.1.б. Гидрозоль золота

Для исследования динамики образования наночастиц серебра (Ag) и золота (Au) в буферный раствор тетрабората натрия, содержащий восстановитель – танин, добавляли раствор соли серебра (AgNO_3) или золота (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 (рисунок 3.2.а, 3.2.б).

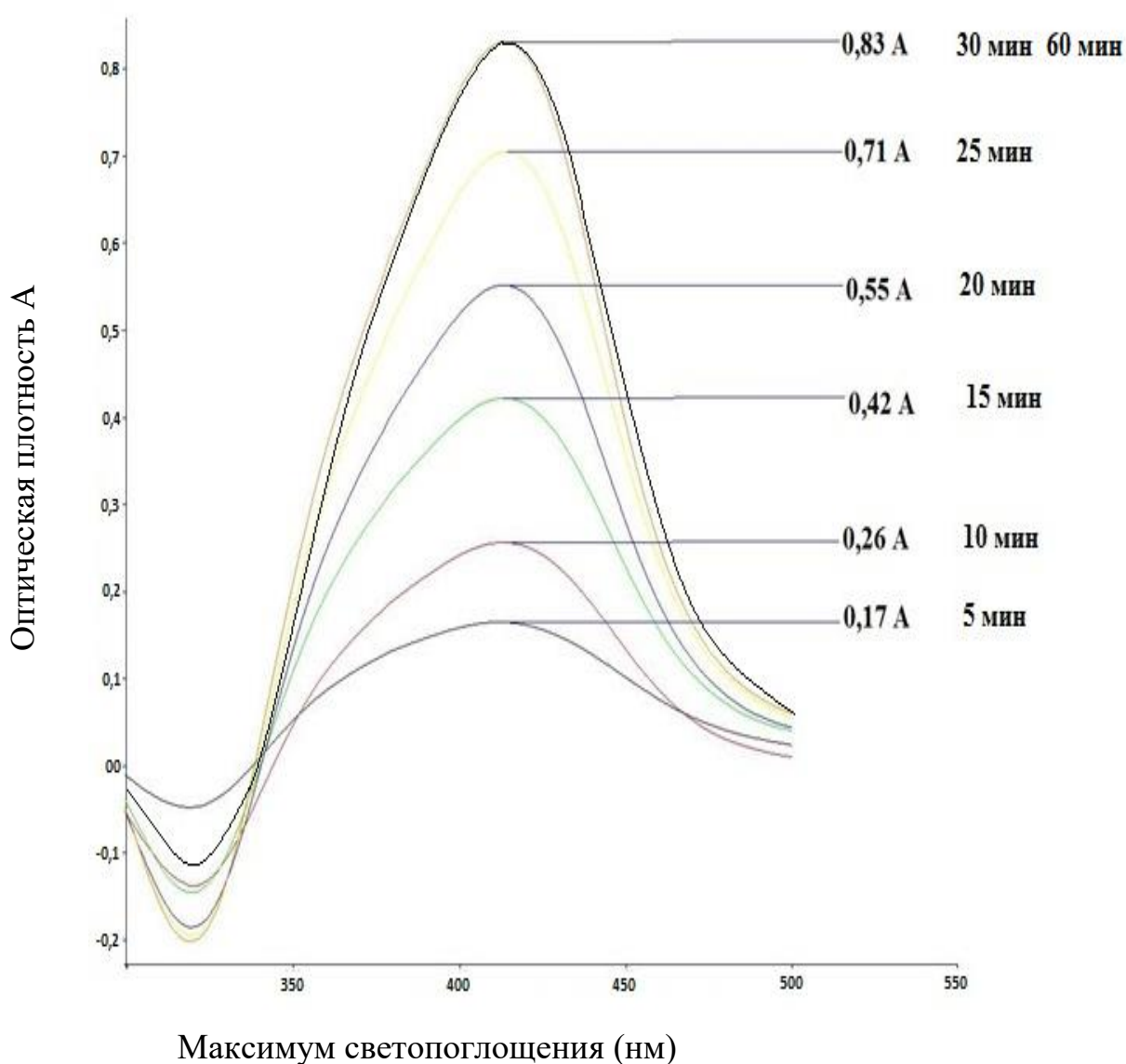


Рисунок 3.2.а Динамика образования наночастиц серебра (Ag)

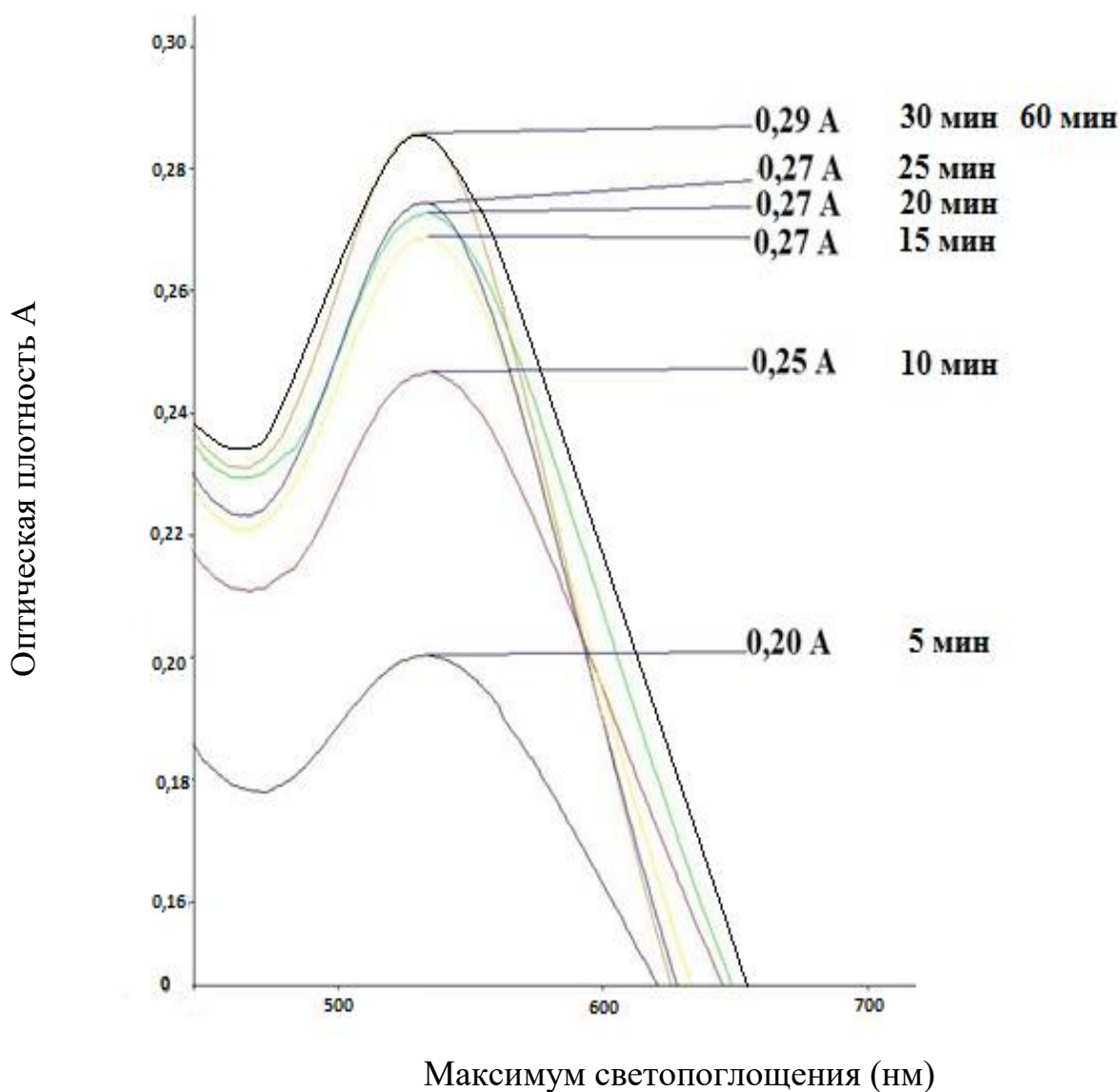


Рисунок 3.2.б Динамика образования наночастиц золота (Au)

Как видно из данных рисунка 3.2.а, 3.2.б 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. Анализируя полученные спектры, можно выделить несколько фаз восстановления ионов металлов: быструю - не диффузионную, и медленную, которая лимитируется диффузией. Так же следует отметить, что скорость восстановления ионов металлов танином достаточно высокая, так как уже на пятой минуте, на графике отсутствует спектр характерный для Ag^+ и Au^{3+} .

Были получены также бинарные гидрозоли со спектральным контролем образования наночастиц в системах с различным атомным соотношением золота и серебра: Au₇₅-Ag₂₅ (3:1); Au₅₀-Ag₅₀ (1:1); Au₂₅-Ag₇₅ (1:3). Для каждого из растворов проводили измерения спектров оптического поглощения в трех равных временных промежутках.

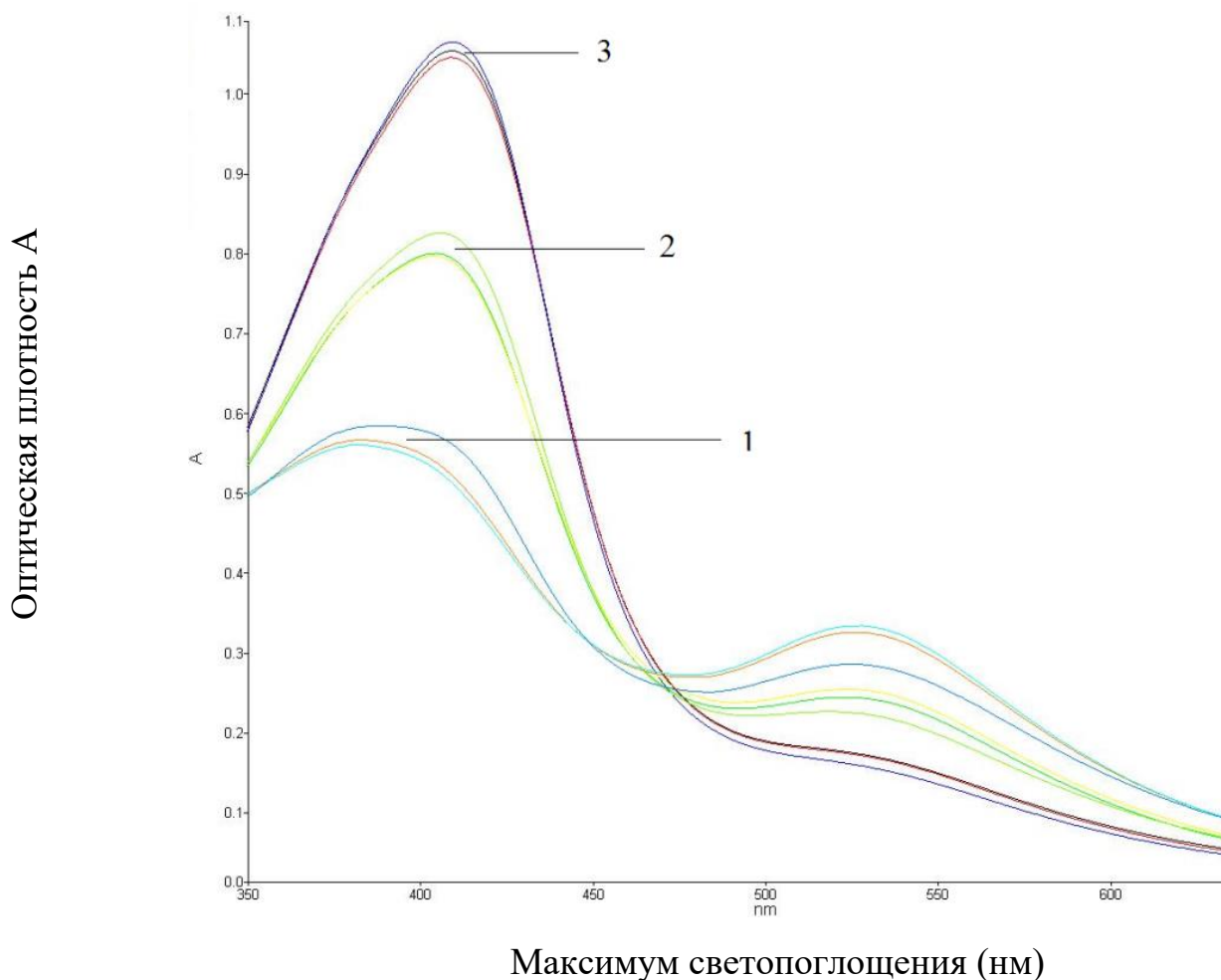


Рисунок 3.3. Кинетика образования композитов Ag-Au. 1) Au 75 % + Ag 25%; 2) Au 50 % + Ag 50%; 3) Au 25 % + Ag 75%

Графики распределения спектров четко подтверждают концентрацию каждого из золь в растворе. Таким образом, чем больше наночастиц золота в полученном золе, тем более характерный для золота максимум поглощения спектра проявляется на графике и наоборот.

Постепенное смещение полосы плазмонного резонанса от 400 нм, характерного для чистого серебра, до 550 нм, характерного для золота, наглядно иллюстрирует изменение состава данных композитов, что подтверждается так же цветовыми переходами в растворах.

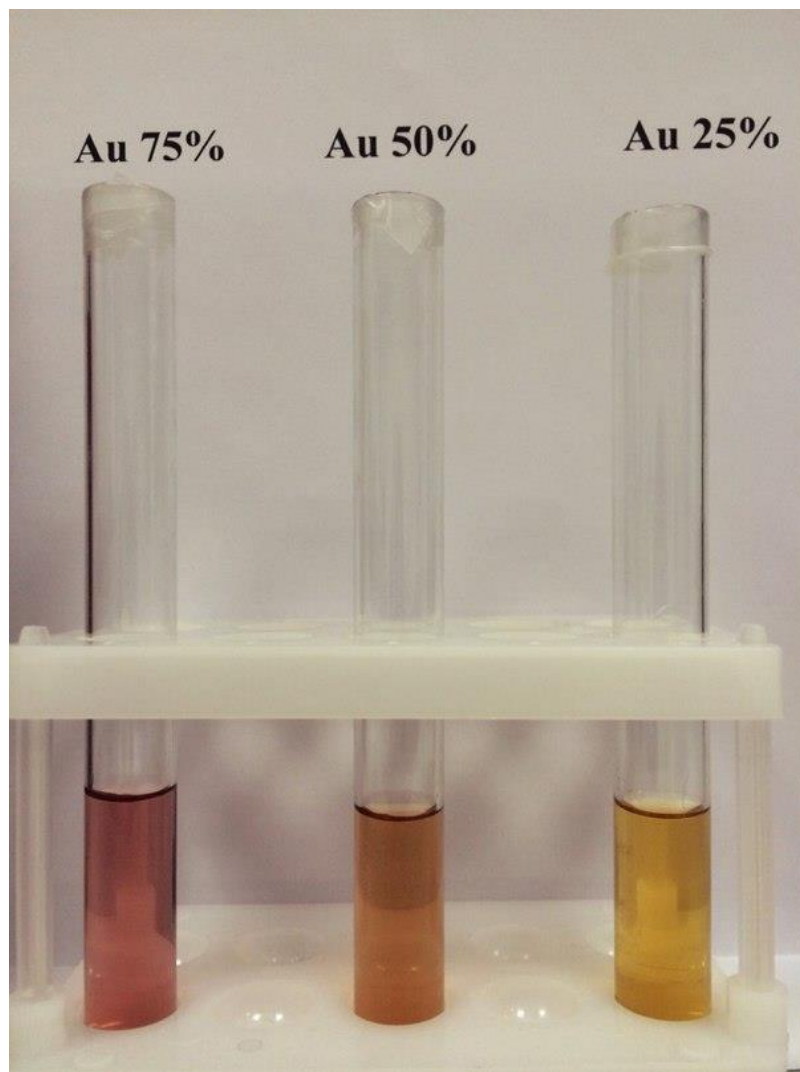


Рисунок.3.4. Композиты Ag-Au

Для определения влияния ультразвуковой обработки на спектроскопические характеристики наночастиц, гидрозолы обрабатывали ультразвуком (генератор И10-840, Россия). УЗ-обработку проводили при постоянной частоте 25,56 Гц, варьируя мощности воздействия 10, 20, 30 и 40%. После УЗ обработки регистрировали спектры поглощения наночастиц. Установлено, что с увеличением мощности УЗ обработки стабильных гидрозолей наблюдается увеличение амплитуды спектра без смещения длины

волны в максимуме поглощения. Это предварительно можно объяснить увеличением концентрации наночастиц за счет стимулированного ультразвуковым воздействием восстановления ионов Ag^+ и Au^{3+} , адсорбированных на поверхности наночастиц. На каждые 10 % увеличения мощности пришлось различное процентное увеличение концентрации частиц (оптической плотности в максимуме поглощения плазмонного спектра). Линейной зависимости не обнаружено.

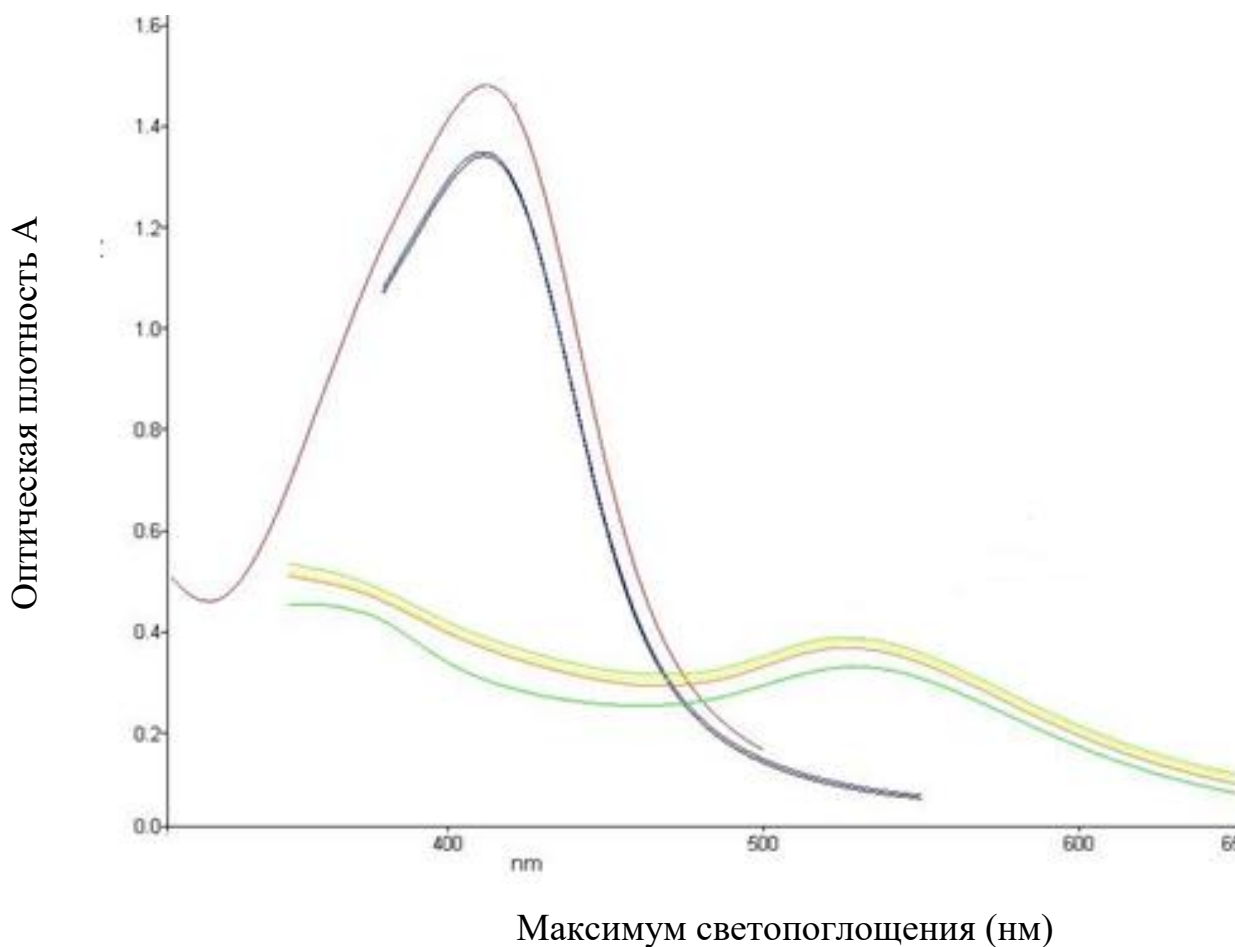


Рисунок 3.5. Оптическая плотность гидрозоля серебра после обработки УЗ мощности воздействия 10, 20, 30 и 40%

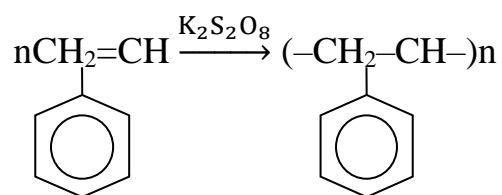
Можно отметить высокую скорость метода восстановления ионов благородных металлов танином. Уже после 5 минуты хода реакции на графике спектроскопических кривых, нет спектра характерного для Ag^+ .

Исследование динамики зольей с различным количеством буфера приводит к выводу, о негативном влиянии буферного раствора тетрабората натрия на скорость образования наночастиц. Скорость образования наночастиц золота в растворе с 1 мл тетрабората натрия выше, чем в растворе с 15 мл буфера.

Спектроскопический анализ композитов серебра и золота показал процесс смещения полос плазмонного резонанса в зависимости от изменения количества тех или иных частиц в растворе.

Ультразвуковая обработка гидрозолей показала увеличение концентрации наночастиц в золе с увеличением мощности ультразвуковой установки. На каждые 10 % мощности пришлось различное увеличение концентрации. Линейной зависимости не обнаружено.

На втором этапе экспериментов необходимо было подобрать условия синтеза полистирольных наночастицы с узким распределением по размерам.



Полистерол

Так, методом гетерофазной полимеризации в присутствии избыточного количества ПАВ (кремнийорганические соединения) были синтезированы полистирольные микросферы St1.

Полимеризацию вели при 60°C в течение 4 часов до полной конверсии. Методом гетерофазной полимеризации в отсутствие ПАВ были синтезированы полистирольные микросферы St2.

На рисунке 3.6 представлен реактор полимеризации.



Рисунок 3.6 Реактор полимеризации

На рисунке 3.7.а, 3.7.б представлены кривые конверсия-время.

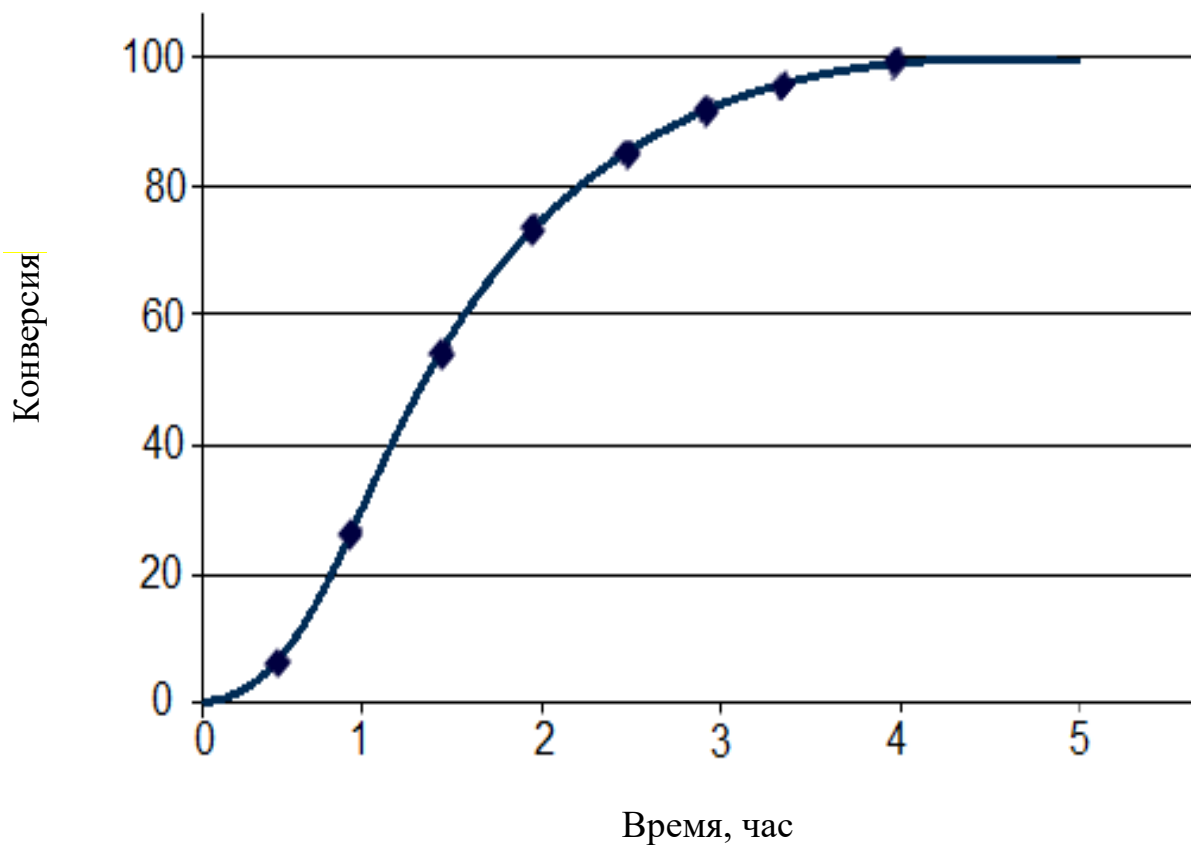


Рисунок 3.7.а. Кинетика образования полистирольных наночастиц St1

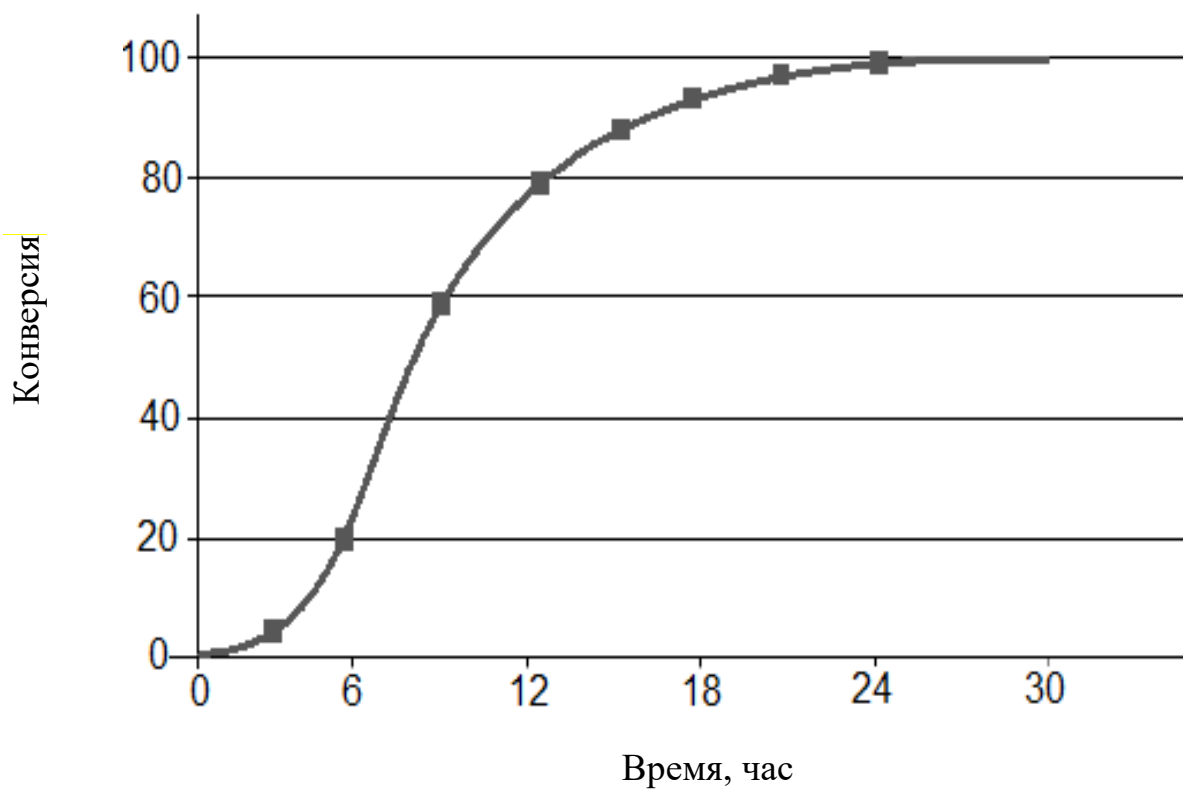


Рисунок 3.7.б Кинетика образования полистирольных частиц St2

3.2 Изучение физико-химических свойств наночастиц различной природы

Размер полученных наночастиц и их распределение по размерам измеряли методом кросскорреляционной спектроскопии на приборе Nanophox (Германия) (рисунок 3.8). Перед началом измерения образца, проверяли чистоту воды в водяной бане. Затем проводили измерение стандартного образца полистирольного латекса с известным размером частиц (102 ± 3 нм) для подтверждения калибровки прибора. Выполняли 5 повторных измерения для каждого образца (рисунок 3.8.a)

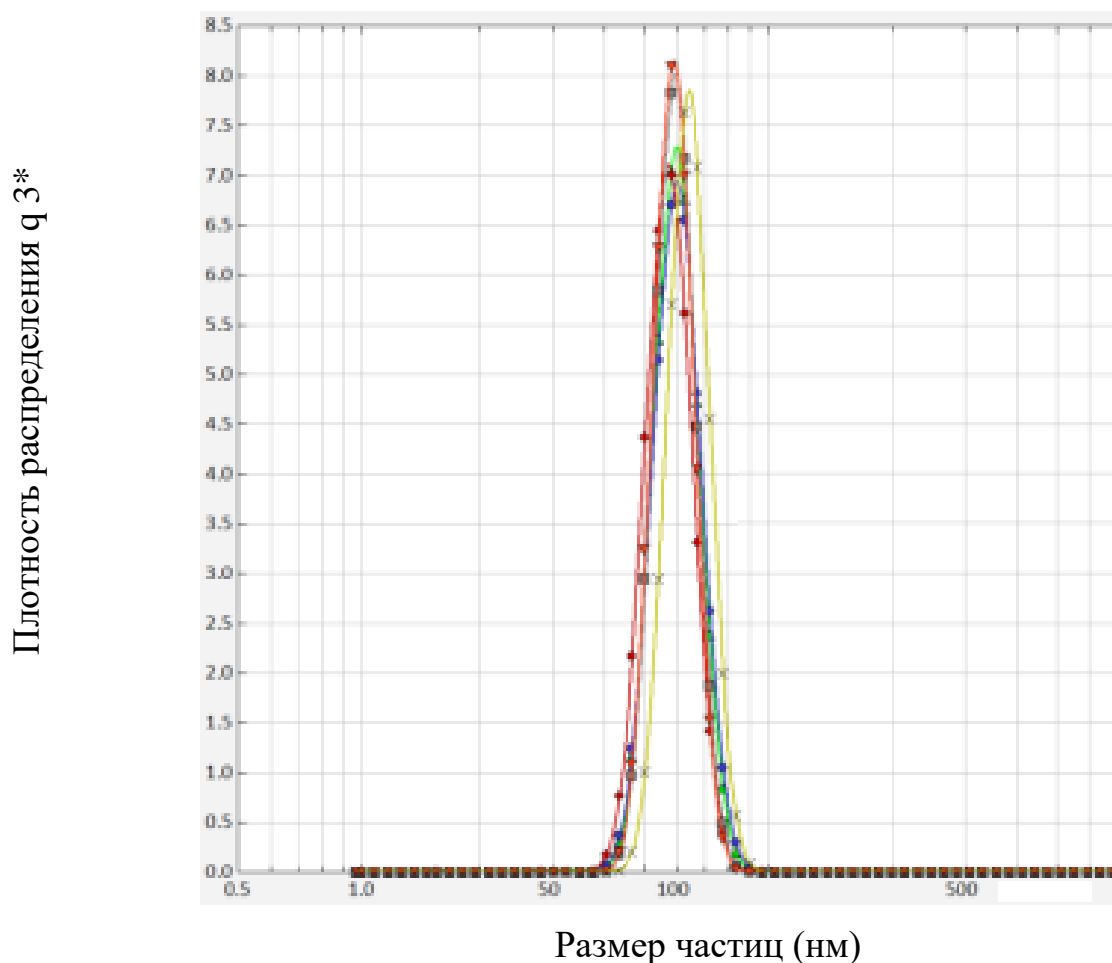


Рисунок 3.8.a Кривые распределения частиц латекса по размерам.

Согласно справочным данным наночастицы латекса имели средний размер 100 нм. Далее измеряли размеры наночастиц металлов и полистирола, а так же стабильность металлических и полистирольных растворов (рисунок 3.8.б – 3.8).

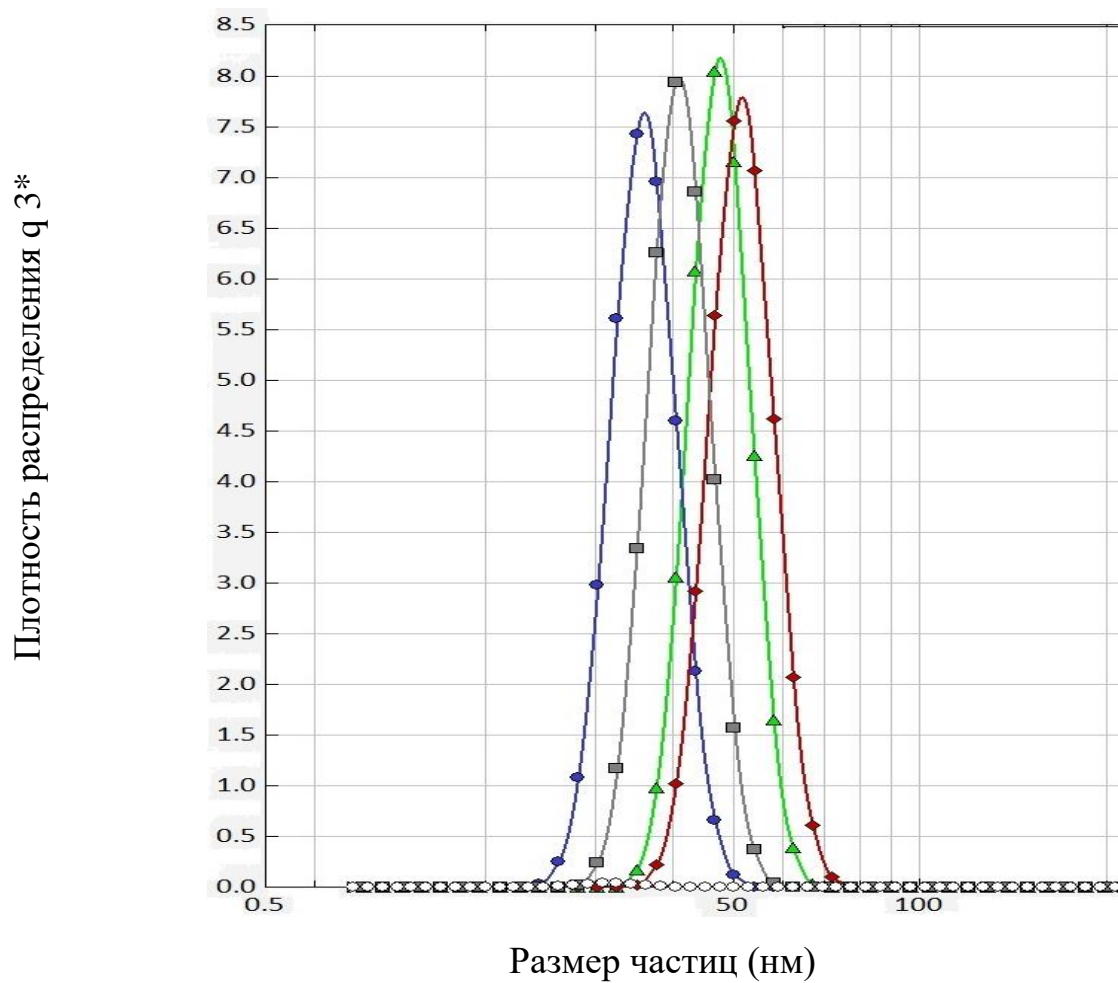


Рисунок 3.8.б Кривые распределения частиц серебра (Ag) по размерам.

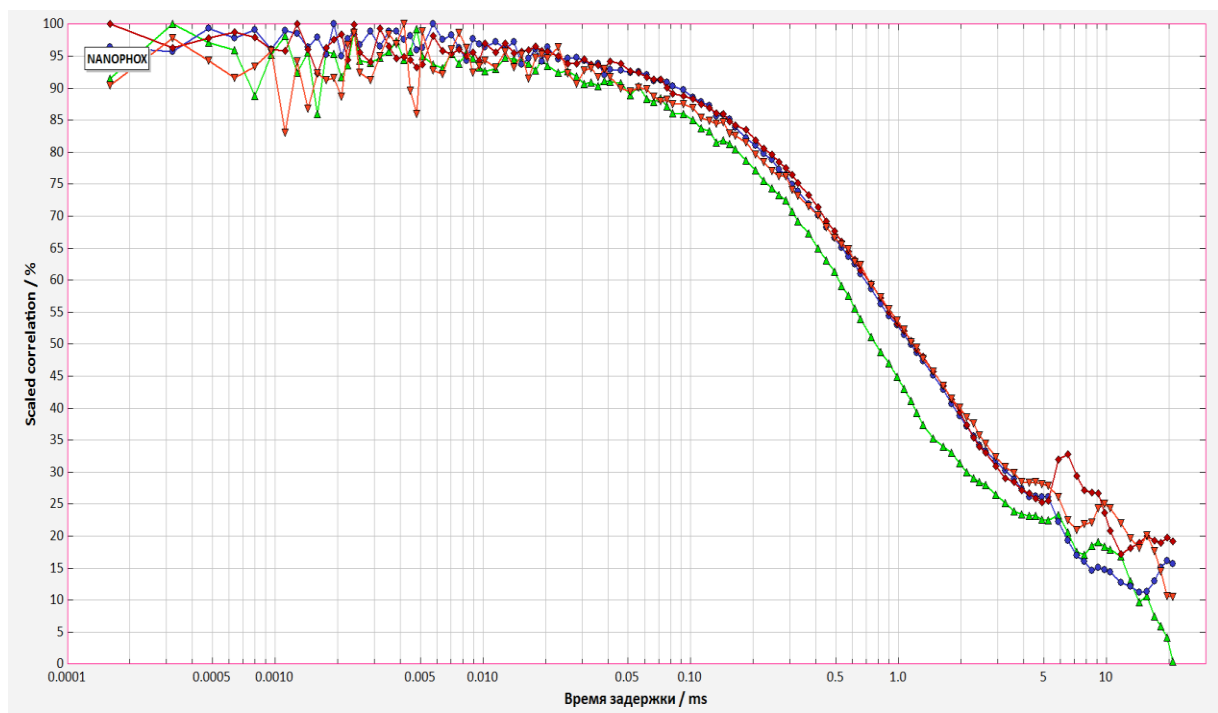


Рисунок 3.8.в Корреляционная кривая. График стабильности коллоидного раствора с наночастицами серебра

Плотность распределения $\rho(z^*)$

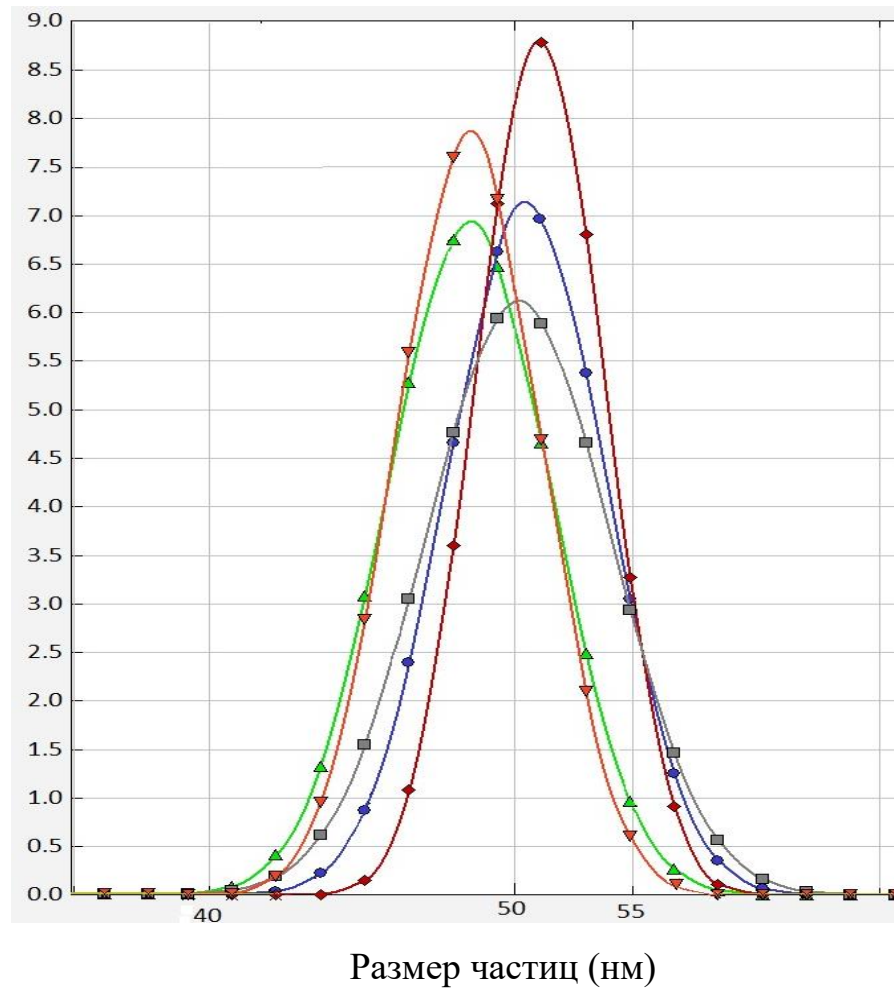


Рисунок 3.8.г Кривые распределения частиц золота (Au) по размерам.

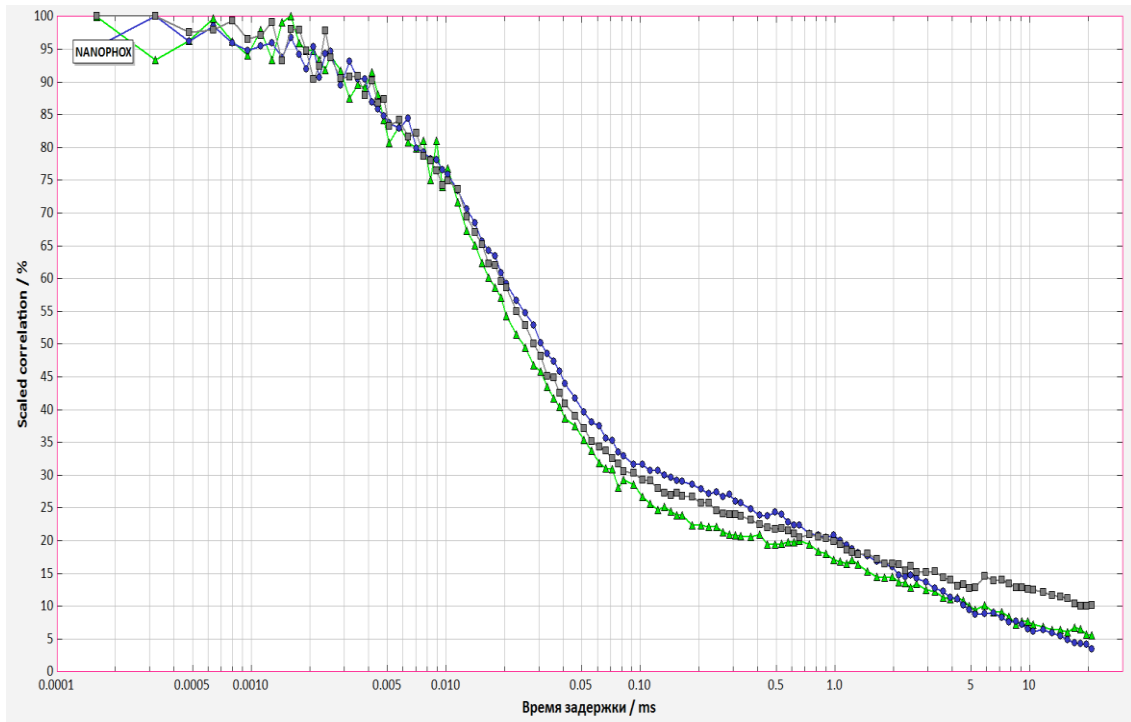


Рисунок 3.8.д Корреляционная кривая. График стабильности коллоидного раствора с наночастицами золота

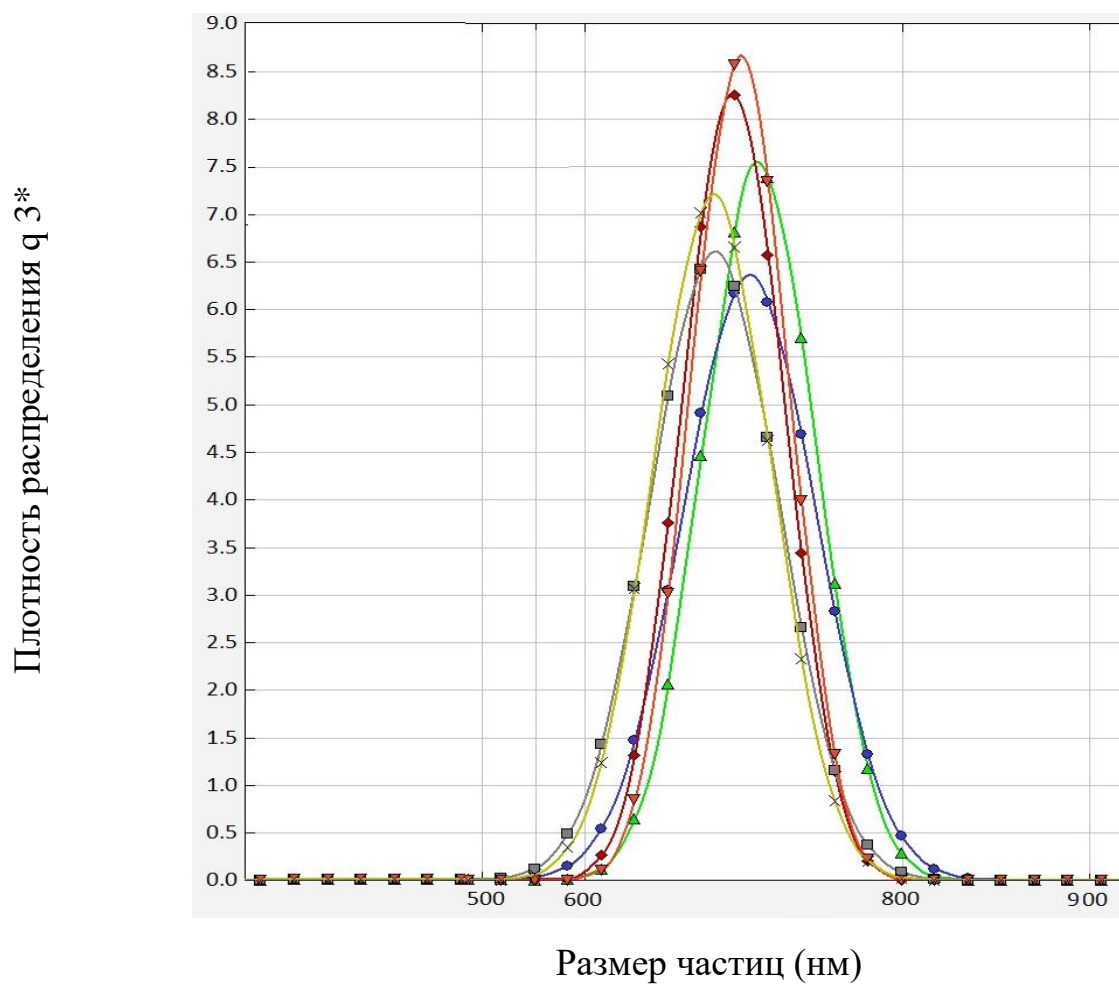


Рисунок 3.8.е Кривые распределения частиц полистерола St2 по размерам.

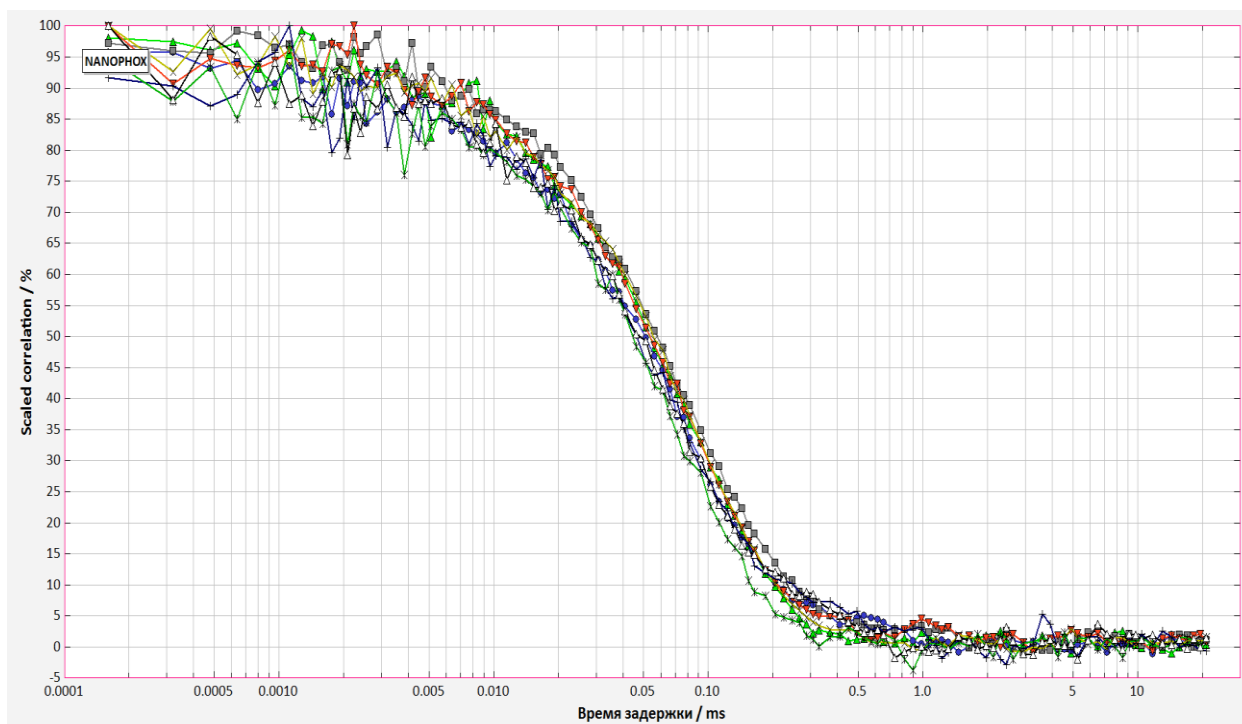


Рисунок 3.8.ж Корреляционная кривая. График стабильности коллоидного раствора с наночастицами полистерола St2

Плотность распределения φ 3*

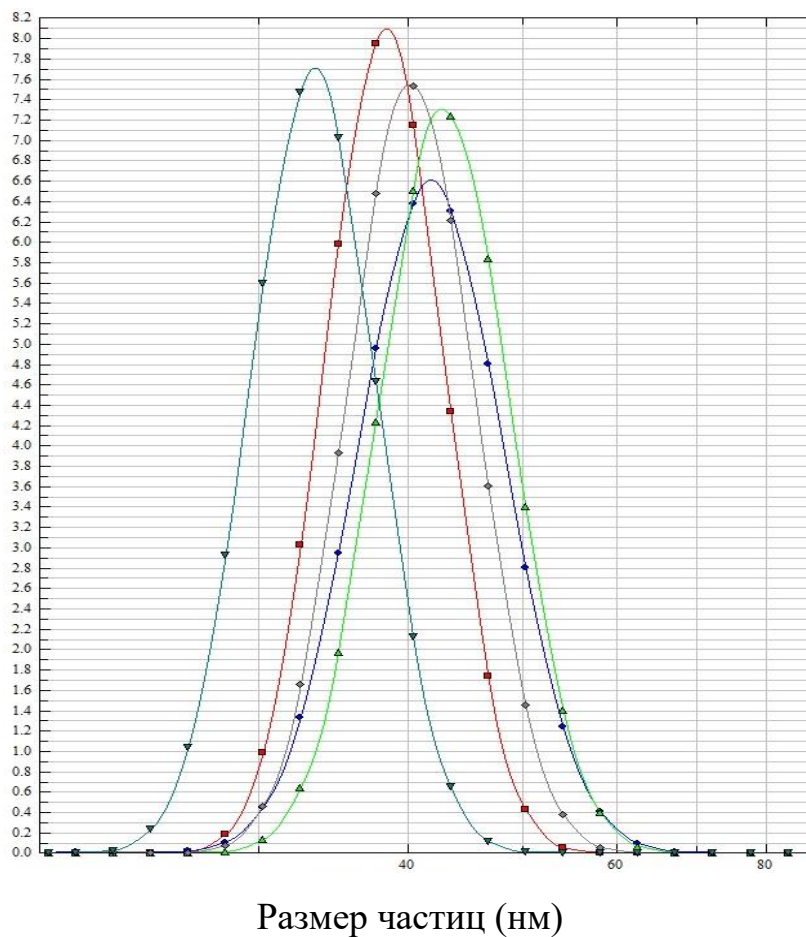


Рисунок 3.8.з Кривые распределения частиц полистерола St1 по размерам.

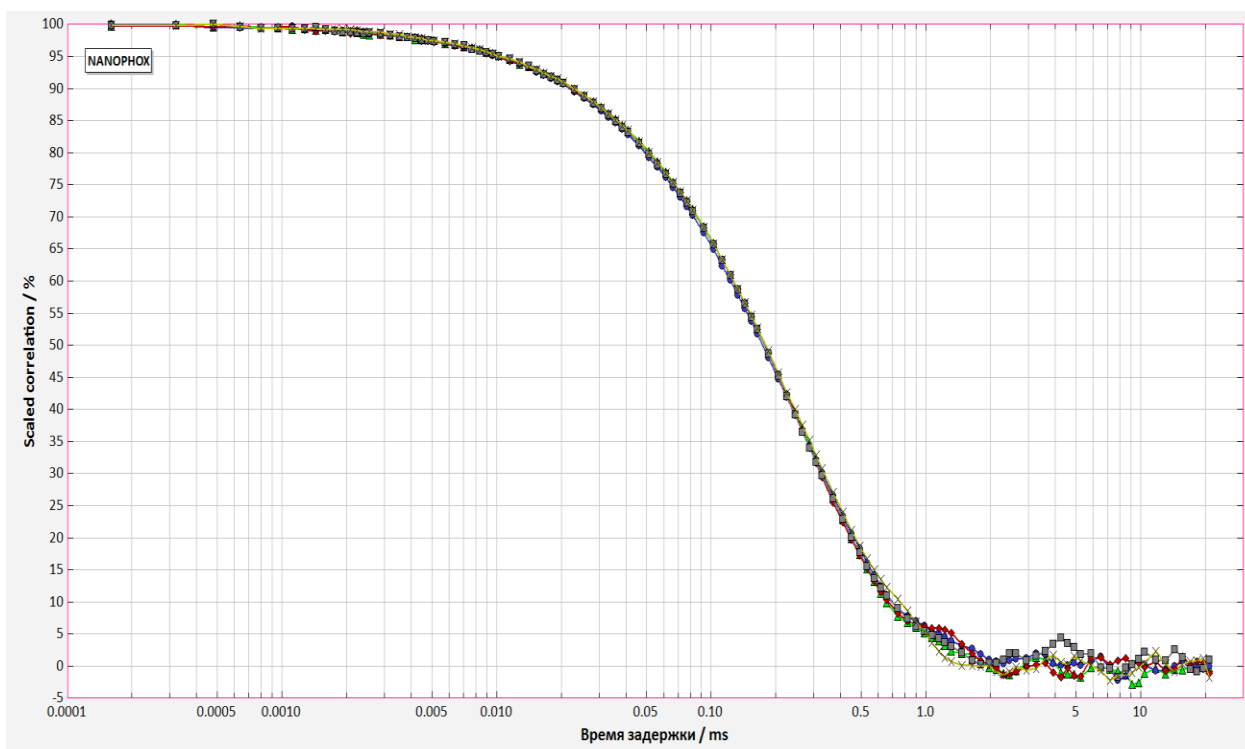
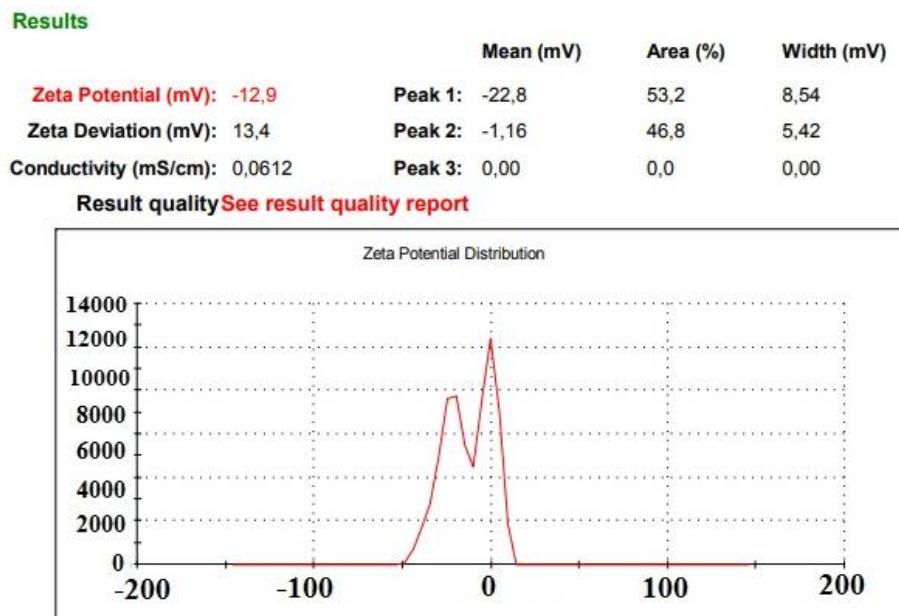


Рисунок 3.8.и Корреляционная кривая. График стабильности коллоидного раствора с наночастицами полистерола St1

Как видно из рисунке 3.8 средний размер наночастиц составил для Ag – 40 нм, Au -40 нм, St1 – 49 нм и St2 – 706 нм.

На рисунке 3.9 представлены данные исследований по определению ξ -потенциала полученных наночастиц на приборе «Malvern» (Англия).

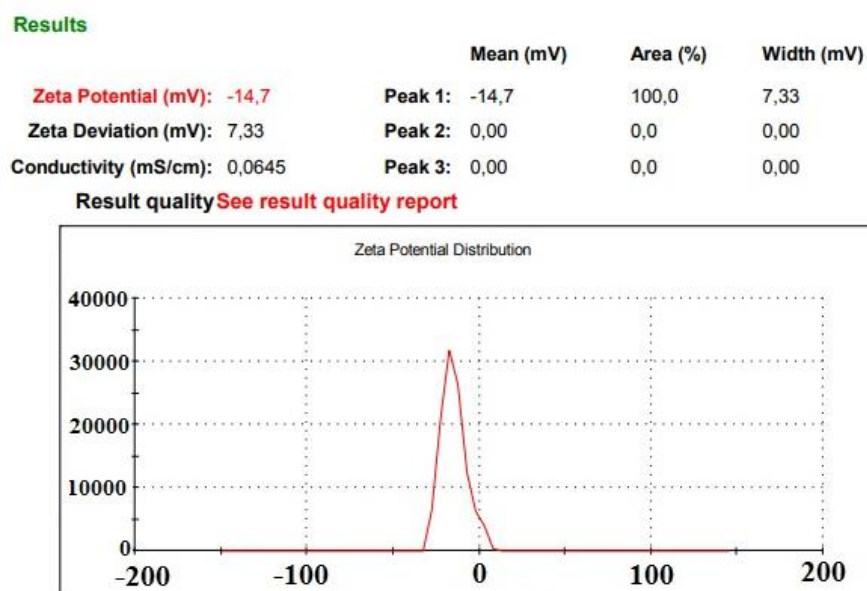
Плотность распределения ζ^*



ξ -потенциал (мВ)

3.9.а ξ -потенциал наночастиц Ag

Плотность распределения ζ^*



ξ -потенциал (мВ)

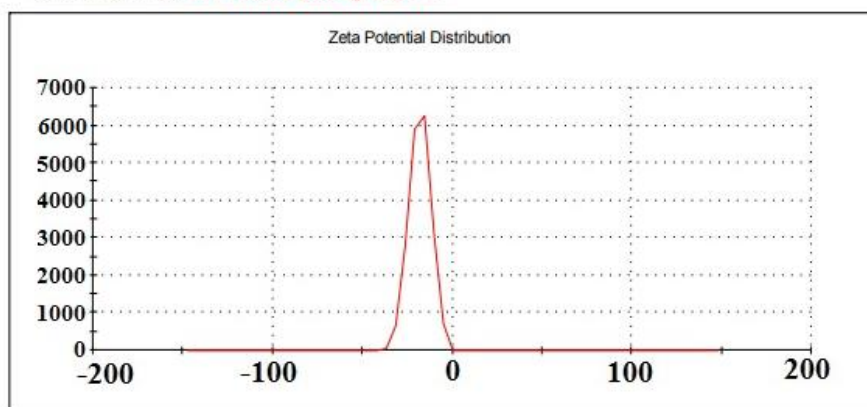
3.9.б ξ -потенциал наночастиц Au

Плотность распределения ζ *

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -18,1	Peak 1: -18,1	100,0	6,05
Zeta Deviation (mV): 6,05	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,489	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality See result quality report



ζ -потенциал (мВ)

3.9.в ζ -потенциал наночастиц St1

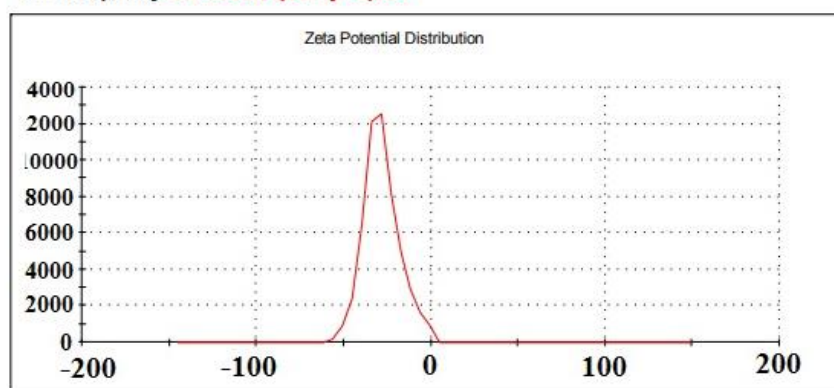
ζ -потенциал (мВ)

Плотность распределения ζ *

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -28,2	Peak 1: -28,2	100,0	10,3
Zeta Deviation (mV): 10,3	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,519	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality See result quality report



ζ -потенциал (мВ)

3.9.г ζ -потенциал наночастиц St2

Рисунок 3.9. ζ -потенциал наночастиц Ag, Au, St1 и St2

Видно, что величина ζ -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) (рисунок 3.10).

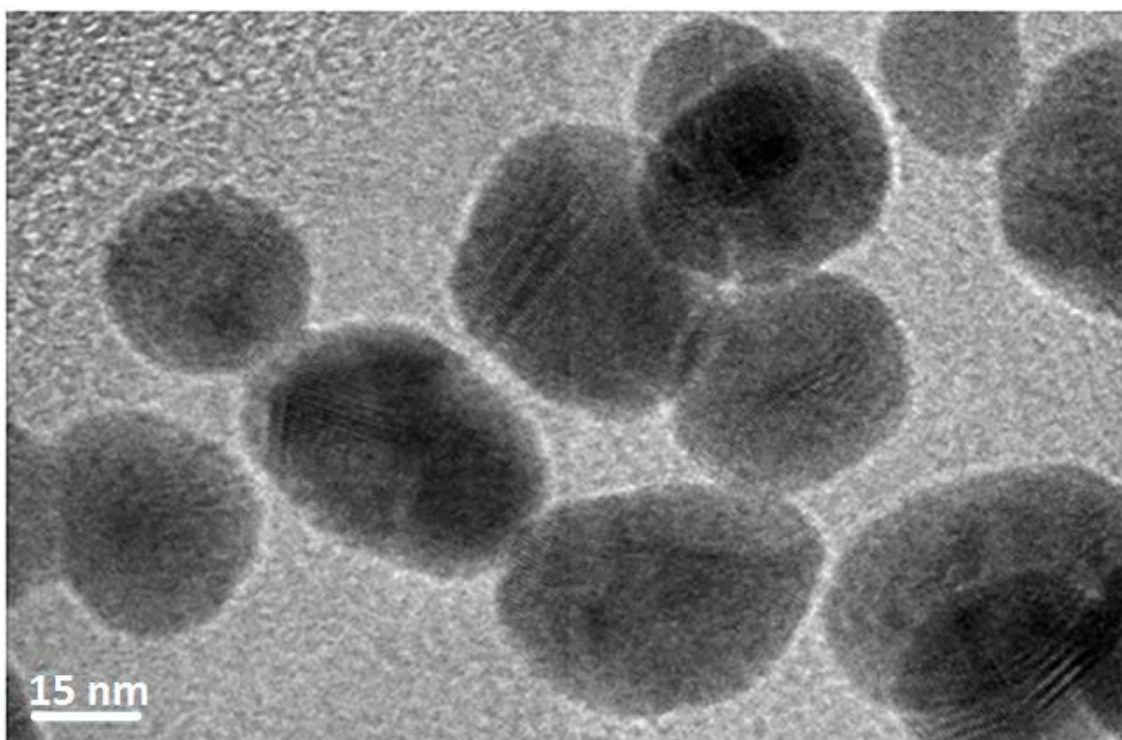


Рисунок 3.10.а Микрофотографии наночастиц Ag

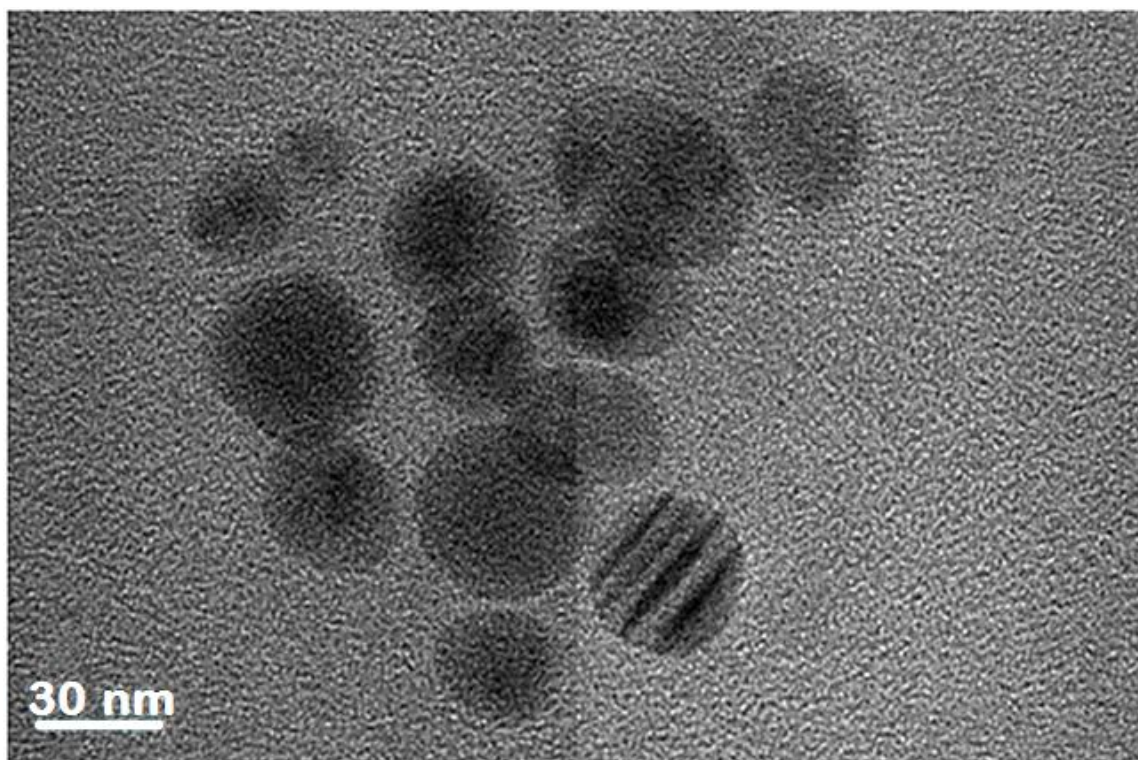


Рисунок 3.10.б Микрофотографии наночастиц Au

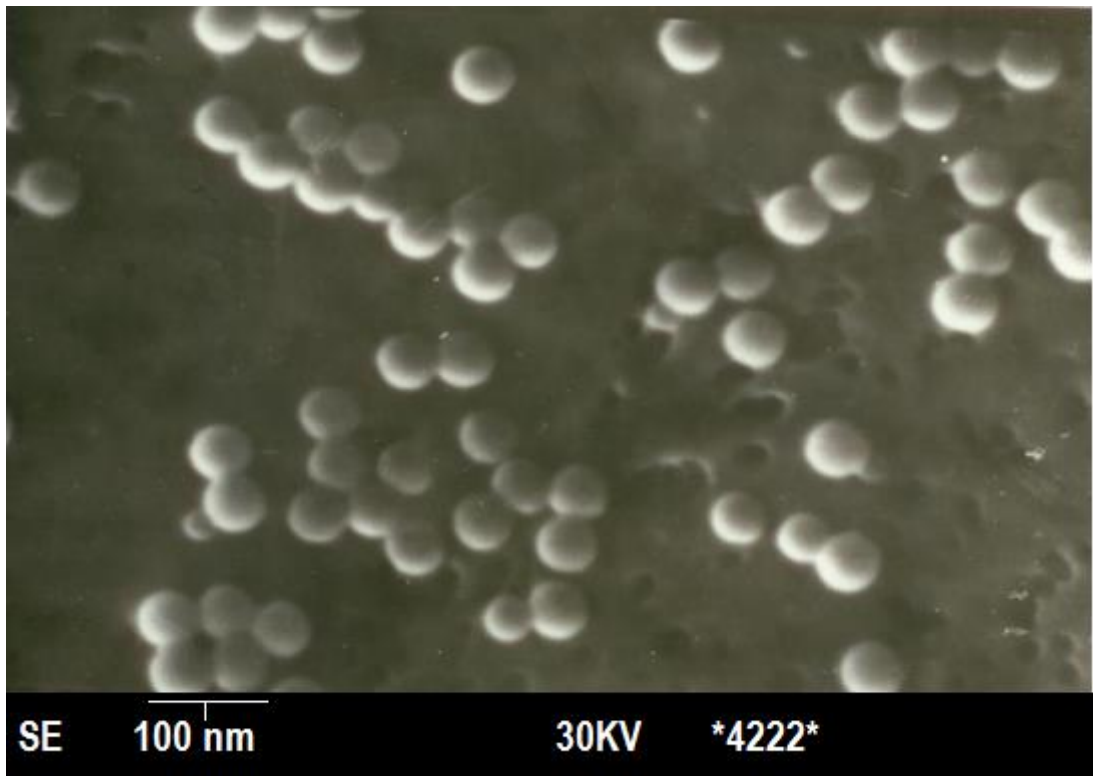


Рисунок 3.10.в Микрофотографии наночастиц St1

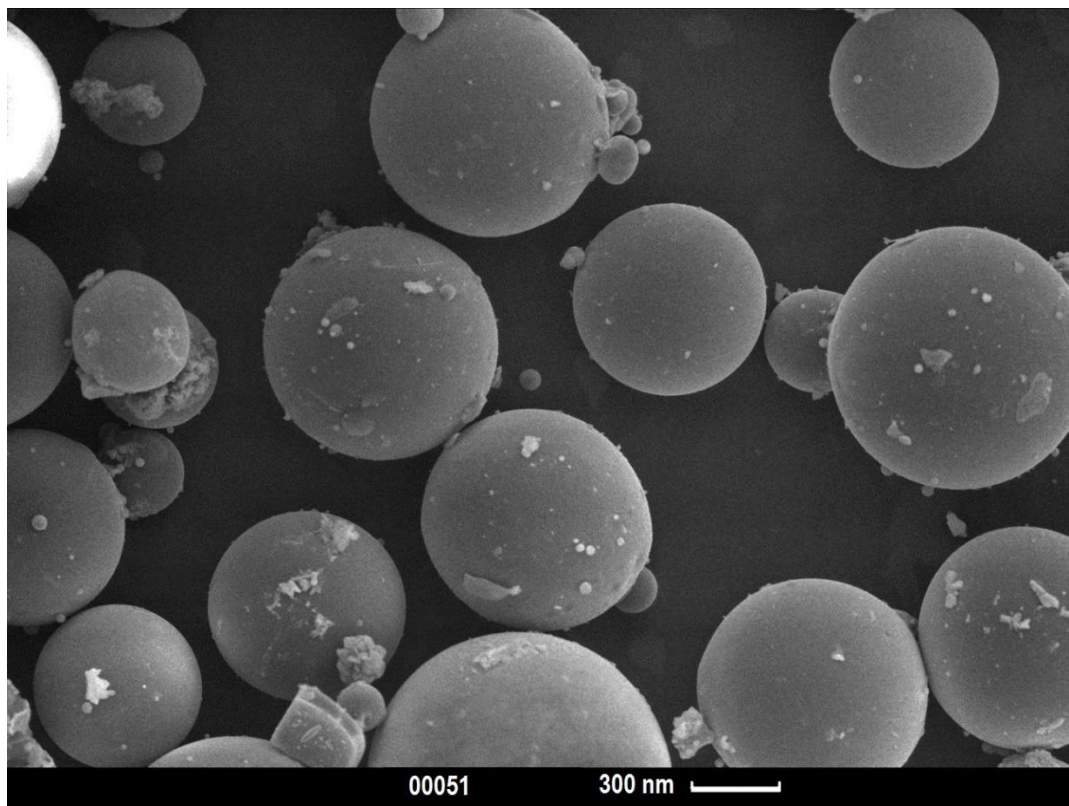


Рисунок 3.10 Микрофотографии наночастиц St2

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 библигандов 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 полгоода, что в полной мере отвечает требованиям, предъявляемым к носителям библигандов при конструировании диагностических тест-систем с использованием конъюгатов «носитель-библиганд».

По корреляционным кривым определяли стабильность коллоидного раствора с НЧ. Наклон корреляционной кривой отражает, как быстро частица покидает зону измерения. Время задержки указывает на время затухания частиц. Чем крупнее частицы, тем больше время затухания и следовательно кривая имеет более пологий склон. Для оценки стабильности коллоидного раствора с НЧ селена все полученные корреляционные кривые были совмещены в одном графике (рисунок 3.11). На графике видно, что частицы в растворе не увеличиваются в размере и не агрегируют. Следовательно, можно сказать, что изучаемый образец стабилен.

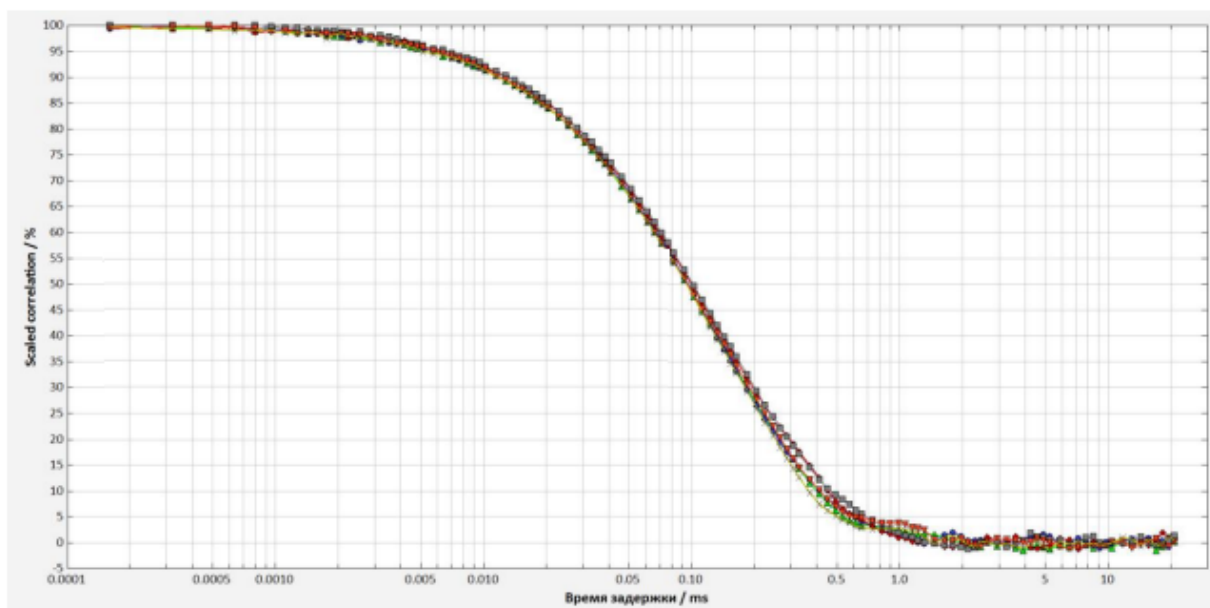


Рисунок 3.11 Корреляционная кривая. График стабильности коллоидного раствора с наночастицами серебра

3.3 Создание конъюгатов «наночастицы-биолиганд»

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 рисунке 3.12 представлена фотография электрофореза в агарозном геле, на примере иммобилизованных моноклональных антител с наночастицами серебра различной концентрации.

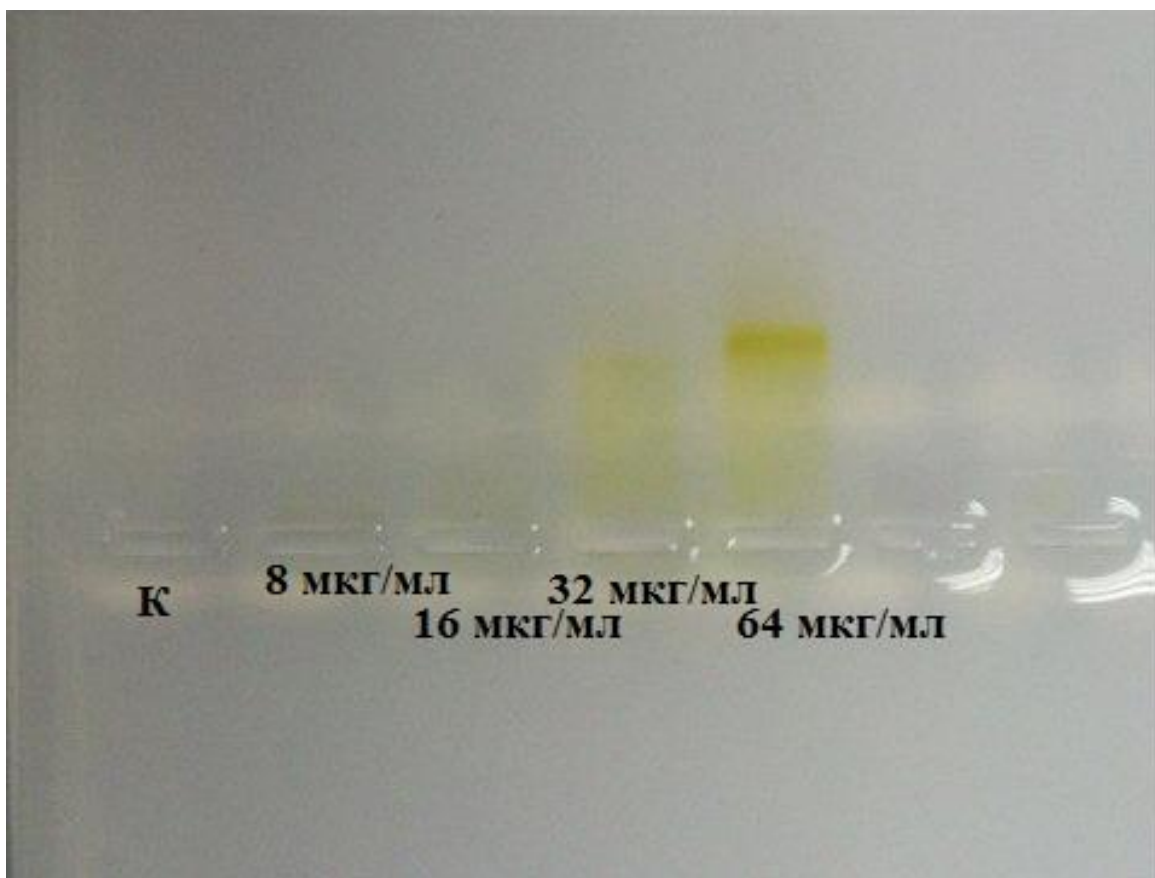


Рисунок 3.12 Электрофорез конъюгатов «наночастицы серебра-антитело»

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/объем), 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.

Формирование конъюгатов «наночастица - аутоантитело», так же изучали при исследовании оптической плотности раствора наночастиц серебра перед добавлением в него моноклональных аутоантител и после.

В таблице 3.1 приведены данные исследования оптических плотностей исследуемых растворов.

Таблица 3.1. Сравнение оптических плотностей коллоидного раствора серебра до и после добавления в него аутоантител.

Концентрация наночастиц в растворе	Оптическая плотность раствора без аутоантител	Оптическая плотность раствора после добавления аутоантител
2 мкг/мл	1.392	0.382
4 мкг/мл	2.577	0.888
8 мкг/мл	4.104	1.942
16 мкг/мл	4.592	3.954

Уменьшение оптической плотности коллоидного раствора с добавлением аутоантител можно объяснить электрокинетическим потенциалом участников реакции. Так, ζ - потенциал на поверхности коллоидного раствора серебра составил – 12,9мВ, а поскольку ζ - потенциал пропорционален заряду коллоидной частицы [151], то заряд наночастицы серебра отрицательный. В свою очередь аутоантитело добавляемое в коллоидный раствор наночастиц обладает положительным зарядом [152]. В результате взаимодействия наночастиц серебра с аутоантителами происходит электризация, разноименные заряды притягиваются, образуя конъюгат «наночастица-аутоантитело». Такая иммобилизация позволяет уменьшить концентрацию несвязанных с белками наночастиц в растворе и, соответственно, уменьшить его оптическую плотность [153].

3.4 Изучение иммунобиологических свойств полученных конъюгатов

«наночеситель-биолиганд»

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

В таблице 3.2-3.6 представлены результаты измеряемой оптической плотности конъюгатов с различной концентрацией наночастиц в растворе при помощи планшетного фотометра.

Таблица 3.2. Данные оптической плотности для конъюгата «Au-AT»

1 мкг/мл	2 мкг/мл	4 мкг/мл	8 мкг/мл	16 мкг/мл	32 мкг/мл	64 мкг/мл
0,762	0,54	0,251	0,185	0,358	0,147	0,049
0,755	0,551	0,26	0,222	0,352	0,153	0,054
0,762	0,52	0,313	0,199	0,351	0,165	0,53
0,729	0,563	0,281	0,225	0,358	0,173	0,047
0,697	0,577	0,315	0,24	0,409	0,185	0,062
0,746	0,546	0,283	0,206	0,367	0,18	0,058
0,771	0,552	0,29	0,226	0,345	0,154	0,051
0,027	0,021	0,019	0,019	0,02	0,018	0,016

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
1	0,803	0,589	0,295	0,233	0,41	0,196	0,111	0,595
2	0,041	0,049	0,044	0,048	0,052	0,049	0,062	0,053

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
1	0,795	0,591	0,304	0,269	0,398	0,197	0,1	0,652
2	0,04	0,04	0,044	0,047	0,046	0,044	0,046	0,048

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
1	0,805	0,57	0,363	0,249	0,4	0,216	0,101	0,564

2	0,043	0,05	0,05	0,05	0,049	0,051	0,048	0,054
---	-------	------	------	------	-------	-------	-------	-------

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
1	0,869	0,605	0,323	0,272	0,4	0,216	0,093	0,567
2	0,04	0,042	0,042	0,047	0,042	0,043	0,046	0,046

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
1	0,737	0,626	0,363	0,29	0,458	0,233	0,112	0,641

Таблица 3.3. Данные оптической плотности для конъюгата «St1-AT»

1 мкг/мл	2 мкг/мл	4 мкг/мл	8 мкг/мл	16 мкг/мл	32 мкг/мл	64 мкг/мл
0,575	0,621	0,658	0,611	0,345	0,684	0,686
0,68	0,607	0,596	0,596	0,661	0,65	0,727
0,646	0,598	0,58	0,652	0,633	0,61	0,703
0,534	0,609	0,554	0,523	0,304	0,58	0,656
0,531	0,611	0,589	0,556	0,642	0,582	0,67
0,709	0,623	0,572	0,602	0,646	0,595	0,813
0,629	0,612	0,559	0,614	0,682	0,641	0,722
0,019	0,023	0,021	0,026	0,641	0,668	0,715

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,68	0,589	0,613	0,233	0,71	0,696
2	0,33	0,049	0,044	0,048	0,052	0,049

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,517	0,565	0,602	0,204	0,698	0,694
2	0,034	0,035	0,037	0,042	0,043	0,042

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,517	0,58	0,605	0,265	0,652	0,692
2	0,029	0,045	0,041	0,041	0,043	0,044

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,522	0,532	0,605	0,282	0,685	0,691
2	0,028	0,031	0,036	0,039	0,037	0,041

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,499	0,585	0,613	0,233	0,71	0,691

Таблица 3.4. Данные оптической плотности для конъюгата «Ag-AT» (МкАТ
2)

2 мкг/мл	4 мкг/мл	8 мкг/мл	16 мкг/мл	32 мкг/мл	64 мкг/мл
0,405	0,422	0,395	0,294	0,765	0,949
0,396	0,485	0,375	0,322	0,783	0,706
0,378	0,457	0,41	0,350	0,775	0,743
0,361	0,49	0,372	0,373	0,737	0,731
0,394	0,483	0,378	0,24	0,691	0,458
0,38	0,45	0,306	0,192	0,649	0,611
0,426	0,394	0,391	0,402	0,423	0,378
0,016	0,022	0,012	0,01	0,014	0,02

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,38	0,489	0,413	0,333	0,71	0,696
2	0,33	0,049	0,044	0,048	0,052	0,049

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,317	0,465	0,402	0,304	0,698	0,694

2	0,034	0,035	0,037	0,042	0,043	0,042
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,317	0,48	0,405	0,365	0,652	0,692
2	0,029	0,045	0,041	0,041	0,043	0,044

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,322	0,432	0,405	0,382	0,685	0,691
2	0,028	0,031	0,036	0,039	0,037	0,041

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,499	0,485	0,413	0,333	0,71	0,691

Таблица 3.5. Данные оптической плотности для конъюгата «Ag-AT» (МкАТ

1)

2 МКГ/МЛ	4 МКГ/МЛ	8 МКГ/МЛ	16 МКГ/МЛ	32 МКГ/МЛ	64 МКГ/МЛ
0,647	2,618	3,049	3,134	3,125	3,068
0,483	2,524	3,043	3,163	3,095	3,021
0,488	2,521	2,955	3,195	3,093	3
0,494	2,594	3,057	3,104	3,066	2,944
0,47	2,545	3,032	3,084	3,05	2,942
0,474	2,447	2,986	3,048	2,959	2,898

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,68	2,659	3,085	3,175	3,163	3,112
2	0,33	0,041	0,036	0,041	0,038	0,044

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,517	2,559	3,08	3,205	3,138	3,063

2	0,034	0,035	0,037	0,042	0,043	0,042
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,517	2,566	2,996	3,136	3,136	3,044
2	0,029	0,045	0,041	0,041	0,043	0,044

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,522	2,625	3,093	3,143	3,103	2,985
2	0,028	0,031	0,036	0,039	0,037	0,041

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,499	2,588	3,074	3,122	3,153	2,992

Таблица 3.6. Данные оптической плотности для конъюгата «St2-AT»

2 мкг/мл	4 мкг/мл	8 мкг/мл	16 мкг/мл	32 мкг/мл	64 мкг/мл
0,191	0,194	0,207	0,193	0,116	0,093
0,207	0,249	0,214	0,202	0,119	0,245
0,197	0,189	0,154	0,148	0,096	0,069
0,235	0,215	0,166	0,149	0,106	0,082
0,195	0,252	0,186	0,17	0,107	0,087
0,234	0,284	0,176	0,158	0,106	0,083

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,232	0,234	0,249	0,233	0,155	0,134
2	0,041	0,04	0,042	0,041	0,039	0,041

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,245	0,285	0,252	0,244	0,159	0,291
2	0,038	0,036	0,038	0,042	0,04	0,046

#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,238	0,23	0,194	0,191	0,132	0,113
2	0,041	0,041	0,04	0,043	0,036	0,044
#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,271	0,253	0,2	0,188	0,143	0,121
2	0,036	0,042	0,034	0,039	0,037	0,043
#	A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	0,234	0,288	0,224	0,207	0,145	0,128

Для оценки зависимости интенсивности ИФА от концентрации наночастиц, полученные данные систематизировали, усреднили и построили график зависимости интенсивности ИФА от концентрации наночастиц связанных с антителом МкАТ 2 (рисунок 3.13) и график зависимости интенсивности ИФА от концентрации наночастиц связанных с антителом МкАТ 1 (рисунок 3.14)

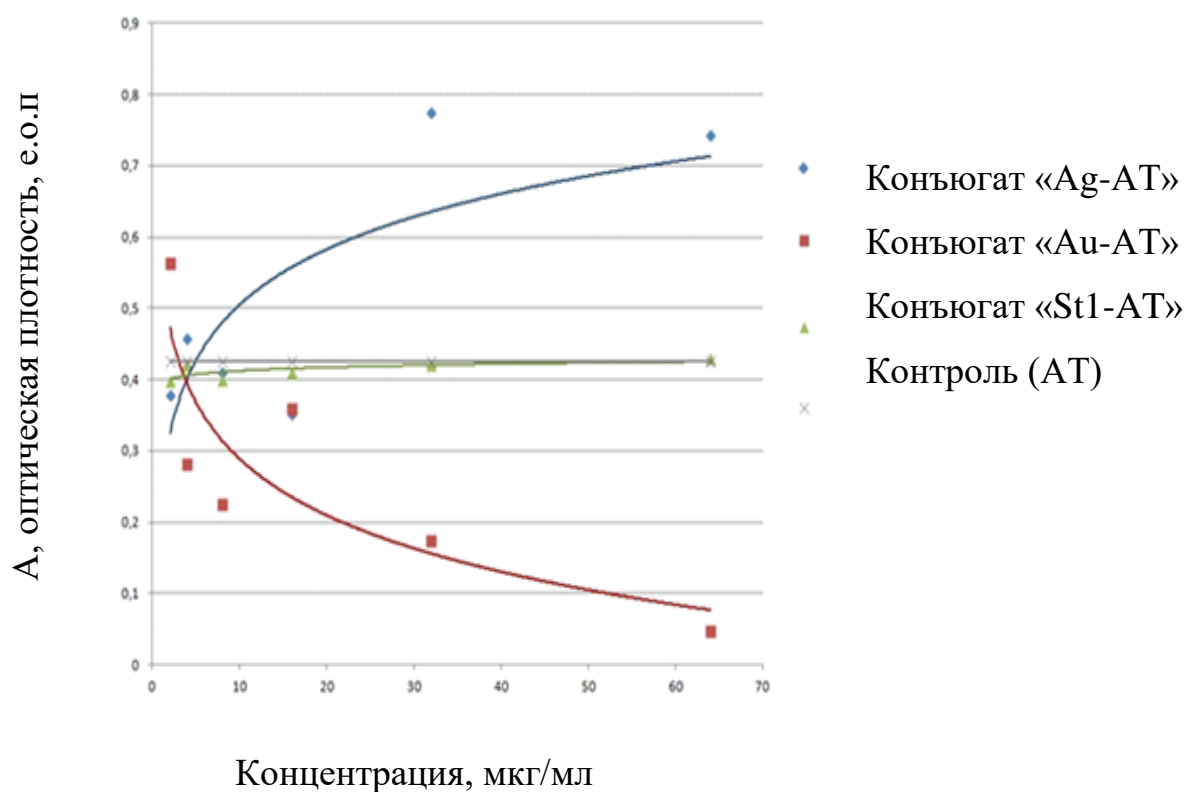


Рисунок 3.13 Зависимость интенсивности ИФА от концентрации наночастиц (антитело МкАТ 2).

Данные зависимости интенсивности ИФА от концентрации наночастиц (антитело МкАТ 2.) подтверждали графиком зависимости интенсивности ИФА от концентрации наночастиц связанных с антителом МкАТ 1 (рисунок 3.14)

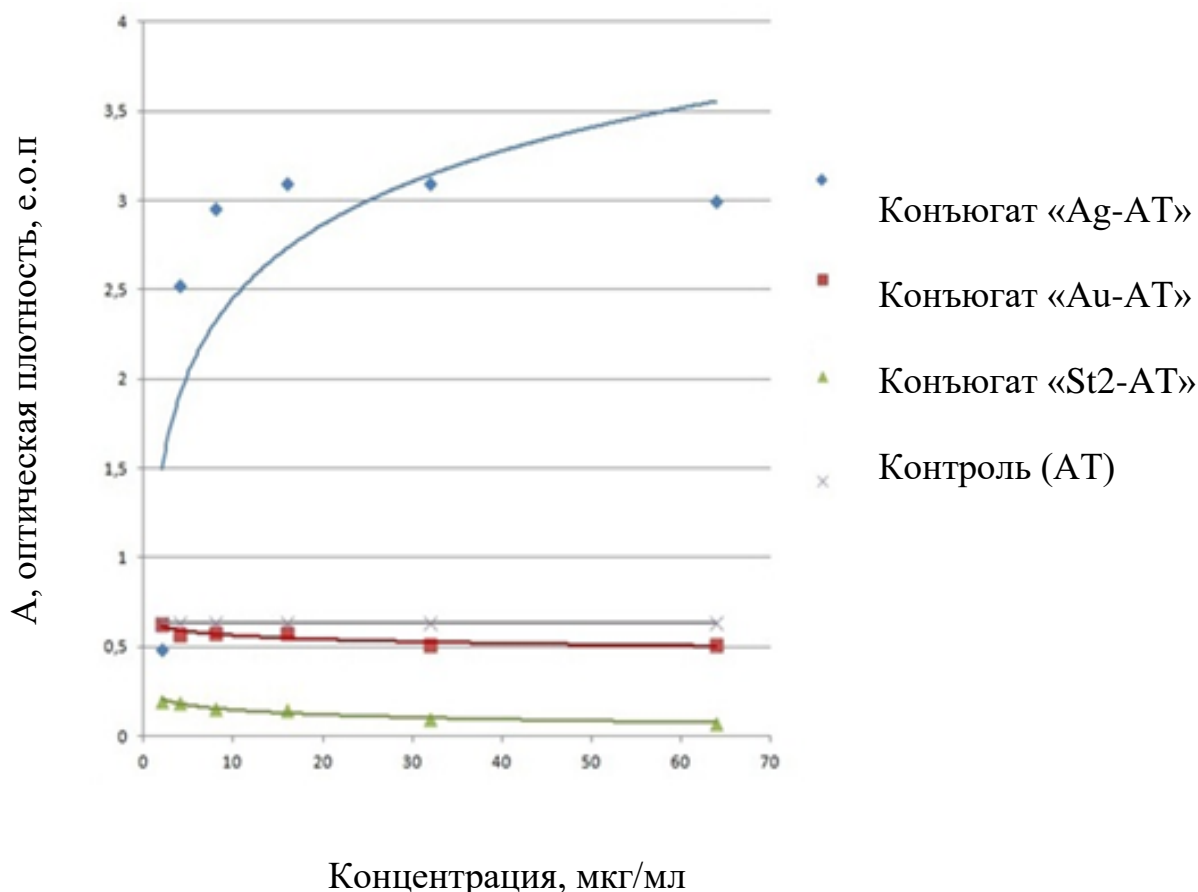


Рисунок 3.14 Зависимость интенсивности результатов ИФА от концентрации наночастиц (антитело МкАТ 1).

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 дозо-зависимый 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.

3.5 Исследование взаимодействия наночастиц с изоферментом С пероксидазы из корней хрена

В контрольных экспериментах исследовали взаимодействие наночастиц с изоферментом С пероксидазы из корней хрена. На рисунке 3.15 представлен градуировочный график активности пероксидазы [11].

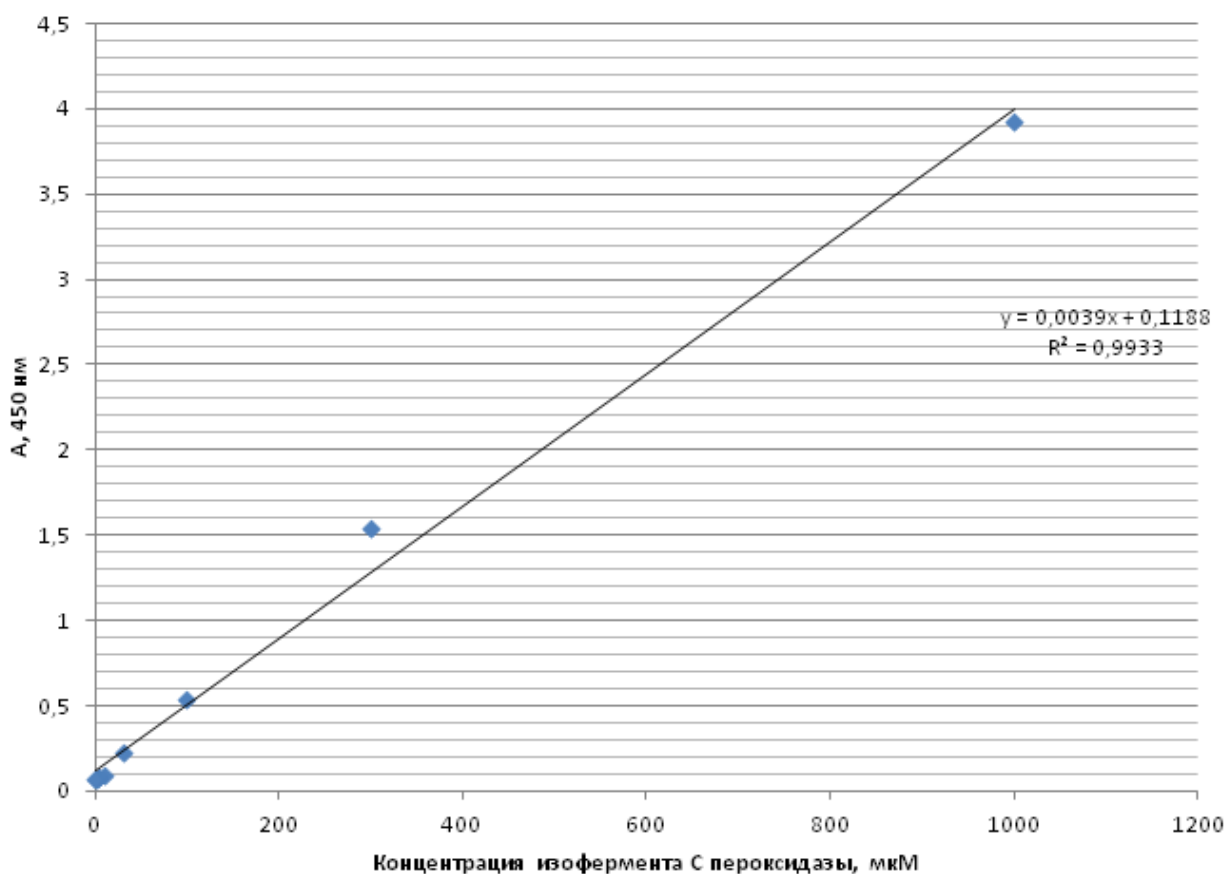


Рисунок 3.15 Градуировочный график активности изофермента С пероксидазы из корня хрена.

Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация изофермента С пероксидазы из корней хрена 300 мкМ, для которой оптическая плотность фотометрического сигнала составляла примерно 1,0 о.е.

Далее исследовали зависимость активности пероксидазы от концентрации наночастиц рисунок 3.16.

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.

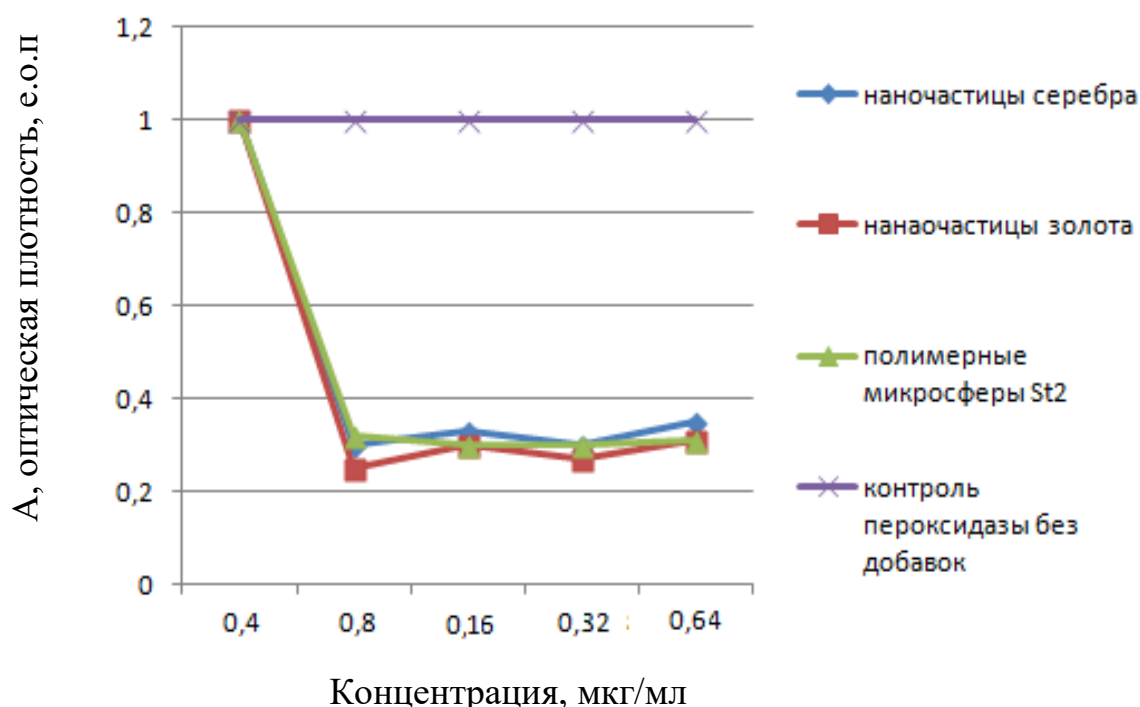


Рисунок 3.16 Зависимость активности пероксидазы от концентрации наночастиц

3.6 Апробация разработанных конъюгатов «НН-АТ» на панели сывороток крови

Для оценки качества проверяемого диагностического теста (ПДТ), 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.

Данные проверяемого диагностического теста представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7. Данные проверяемого диагностического теста

ПДТ		Результат:	
		Болезнь есть [+]	Болезни нет [-]
Результат:	Положительный, [+]	Истинный «позитив»	Ложный «позитив»
		27	1
	Отрицательный, [-]	Ложный «негатив»	Истинный «негатив»
		3	29
Всего		30	30

Исходя из полученных данных, были рассчитаны следующие показатели:

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

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

Таким образом, диагностические тесты характеризовались высокой 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 эпитопам 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 ξ -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 эпитомам ТГ (MкАТ1 и MкАТ2) 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 эпитомам 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. Специфичность тестов составила 96,6 %, чувствительность - 90 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang W., Hu Q., Zhong, L et al. Materials development and potential applications of transparent ceramics: A review// *Materials Science and Engineering*. - 2018. -V. 139. - P. 328-335.
2. Rand D., Ortiz V., Liu Y. et al. Nanomaterials for X-ray Imaging: Gold Nanoparticle-Enhancement of X-ray Scatter Imaging of Hepatocellular Carcinoma// *Nano Letters*. -2011. -Vol. 11. -N 7. -P. 2678-2683.
3. Japolla G., Cunha-Junior J.P., Taketomi E.A., Development of a nanogold slot blot inhibition assay for the detection of antibodies against bovine herpesvirus type 1// *Archives of Virology*. -2018. -V.136. -N. 6. -P. 1549-1557.
4. Huang H., Yang X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method // *Carbohydrate research*. – 2014. – Т. 339. – №. 15. – С. 2627-2631.
5. Loomba L., Scarabelli T. Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part I: gold and silver colloids // *Therapeutic delivery*. – 2019. – Т. 4. – №. 7. – С. 859-873.
6. Stepanov A. L. et al. Optical properties of metal nanoparticles // *ICONO 2010: International Conference on Coherent and Nonlinear Optics*. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 7993. – С. 79931Y.
7. Schröfel A. et al. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles—a review // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Т. 10. – №. 10. – С. 4023-4042.
8. Zhang J. et al. The effects and the potential mechanism of environmental transformation of metal nanoparticles on their toxicity in organisms // *Environmental Science: Nano*. – 2018. – Т. 5. – №. 11. – С. 2482-2499.
9. Kumar H. et al. Metallic nanoparticle: a review // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. – 2018. – Т. 4. – №. 2. – С. 3765-3775.

10. Lue J. T. A review of characterization and physical property studies of metallic nanoparticles //Journal of physics and chemistry of solids. – 2015. – T. 62. – №. 9-10. – C. 1599-1612.
11. Wang C. et al. Preparation, characterization and application of polysaccharide-based metallic nanoparticles: a review //Polymers. – 2017. – T. 9. – №. 12. – C. 689.
12. Gatto F., Bardi G. Metallic nanoparticles: General research approaches to immunological characterization //Nanomaterials. – 2018. – T. 8. – №. 10. – C. 753.
13. Saucedo H. E., Garzón I. L. Structural determination of metal nanoparticles from their vibrational (phonon) density of states //The Journal of Physical Chemistry C. – 2019. – T. 119. – №. 20. – C. 10876-10880.
14. Bonačić-Koutecký V. et al. Density functional study of structural and electronic properties of bimetallic silver–gold clusters: comparison with pure gold and silver clusters //The Journal of chemical physics. – 2020. – T. 117. – №. 7. – C. 3120-3131.
15. Alaqad K., Saleh T. A. Gold and silver nanoparticles: synthesis methods, characterization routes and applications towards drugs //J. Environ. Anal. Toxicol. – 2020. – T. 6. – №. 4. – C. 525-2161.
16. Jain P. K. et al. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems //Plasmonics. – 2017. – T. 2. – №. 3. – C. 107-118.
17. Del Fatti N. et al. Electron dynamics and surface plasmon resonance nonlinearities in metal nanoparticles //Chemical Physics. – 2016. – T. 251. – №. 1-3. – C. 215-226.
18. Jana J., Ganguly M., Pal T. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application //RSC advances. – 2016. – T. 6. – №. 89. – C. 86174-86211.
19. Kelly K. L. et al. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. – 2019. –C.259.

20. Feng P., Zhong M., Zhao W. Stretchable multifunctional dielectric nanocomposites based on polydimethylsiloxane mixed with metal nanoparticles //Materials Research Express. – 2019. – T. 7. – №. 1. – C.1589.
21. Alaqad K., Saleh T. A. Gold and silver nanoparticles: synthesis methods, characterization routes and applications towards drugs //J. Environ. Anal. Toxicol. – 2016. – T. 6. – №. 4. – C. 525-2161.
22. Bai X. et al. The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 7. – C. 2480.
23. Reddy V. R. Gold nanoparticles: synthesis and applications //Synlett. – 2016. – T. 2006. – №. 11. – C. 1791-1792.
24. Giljohann D. A. et al. Gold nanoparticles for biology and medicine //Angewandte Chemie International Edition. – 2016. – T. 49. – №. 19. – C. 3280-3294.
25. Amjadi M., Farzampour L. Fluorescence quenching of fluoroquinolones by gold nanoparticles with different sizes and its analytical application //Journal of luminescence. – 2019. – T. 145. – C. 263-268.
26. Murawala P. et al. In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: effective carrier of anticancer drug methotrexate to MCF-7 breast cancer cells //Materials Science and Engineering: C. – 2014. – T. 34. – C. 158-167.
27. Lu A. H., Salabas E. L., Schüth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application //Angewandte Chemie International Edition. – 2017. – T. 46. – №. 8. – C. 1222-1244.
28. Krutyakov Y. A. et al. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects //Russian Chemical Reviews. – 2018. – T. 77. – №. 3. – C. 233.
29. Monteiro D. R. et al. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver //International journal of antimicrobial agents. – 2019. – T. 34. – №. 2. – C. 103-110.

30. Tamayo L. et al. Polymer composites with metal nanoparticles: synthesis, properties, and applications //Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles. – Elsevier, 2019. – C. 249-286.
31. Russier-Antoine I. et al. Wavelength dependence of the hyper Rayleigh scattering response from gold nanoparticles //The Journal of chemical physics. – 2018. – T. 120. – №. 22. – C. 10748-10752.
32. Castro L. et al. Mechanism and applications of metal nanoparticles prepared by bio-mediated process //Reviews in Advanced Sciences and Engineering. – 2018. – T. 3. – №. 3. – C. 199-216.
33. Yan Z. et al. Size-, shape-, and composition-dependent model for metal nanoparticle stability prediction //Nano letters. – 2018. – T. 18. – №. 4. – C. 2696-2704.
34. Rance G. A. et al. van der Waals interactions between nanotubes and nanoparticles for controlled assembly of composite nanostructures //ACS nano. – 2020. – T. 4. – №. 8. – C. 4920-4928.
35. Roiter Y. et al. Interaction of nanoparticles with lipid membrane //Nano letters. – 2018. – T. 8. – №. 3. – C. 941-944.
36. Zahmakıran M., Özkar S. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals //Nanoscale. – 2021. – T. 3. – №. 9. – C. 3462-3481.
37. Lorke A. et al. (ed.). Nanoparticles from the gasphase: Formation, structure, properties. – Springer Science & Business Media – 2019. – T. 145. – C. 263-268.
38. Sur I. et al. Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells //Nanotechnology. – 2010. – T. 21. – №. 17. – C. 175104.
39. Mailander V., Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells //Biomacromolecules. – 2018. – T. 10. – №. 9. – C. 2379-2400
40. Albanese A., Tang P. S., Chan W. C. W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems //Annual review of biomedical engineering. – 2018. – T. 14. – C. 1-16.

41. Chen P. C., Mwakwari S. C., Oyelere A. K. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing //Nanotechnology, science and applications. – 2019. – T. 1. – C. 45.
42. Daraee H. et al. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery //Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. – 2018. – T. 44. – №. 1. – C. 410-422.
43. Hutchings G. J., Edwards J. K. Application of gold nanoparticles in catalysis //Frontiers of nanoscience. – Elsevier, 2019. – T. 3. – C. 249-293.
44. Yoon K. Y. et al. Antimicrobial effect of silver particles on bacterial contamination of activated carbon fibers //Environmental science & technology. – 2018. – T. 42. – №. 4. – C. 1251-1255.
45. Aymonier C. et al. Hybrids of silver nanoparticles with amphiphilic hyperbranched macromolecules exhibiting antimicrobial properties //Chemical Communications. – 2020. – №. 24. – C. 3018-3019.
46. Wei L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications //Drug discovery today. – 2019. – T. 20. – №. 5. – C. 595-601.
47. Zhang J. et al. The effects and the potential mechanism of environmental transformation of metal nanoparticles on their toxicity in organisms //Environmental Science: Nano. – 2018. – T. 5. – №. 11. – C. 2482-2499.
48. Sanderson P., Delgado-Saborit J. M., Harrison R. M. A review of chemical and physical characterisation of atmospheric metallic nanoparticles //Atmospheric Environment. – 2014. – T. 94. – C. 353-365.
49. Oberdörster G., Stone V., Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective //Nanotoxicology. – 2007. – T. 1. – №. 1. – C. 2-25.
50. Hayes A., Bakand S. Inhalation toxicology //Molecular, clinical and environmental toxicology. – 2019. – C. 461-488.
51. Oberdörster G., Stone V., Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective //Nanotoxicology. – 2017. – T. 1. – №. 1. – C. 2-25.

52. Gaumet M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters //European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2018. – T. 69. – №. 1. – C. 1-9.
53. Mourdikoudis S., Pallares R. M., Thanh N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties //Nanoscale. – 2018. – T. 10. – №. 27. – C. 12871-12934.
54. Gericke M., Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles //Hydrometallurgy. – 2016. – T. 83. – №. 1-4. – C. 132-140.
55. Daniel M. C., Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology //Chemical reviews. – 2019. – T. 104. – №. 1. – C. 293-346.
56. Huang H., Yang X. Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate //Biomacromolecules. – 2014. – T. 5. – №. 6. – C. 2340-2346.
57. Bisker G. et al. Controlled release of Rituximab from gold nanoparticles for phototherapy of malignant cells //Journal of controlled release. – 2019. – T. 162. – №. 2. – C. 303-309.
58. Ahmad A. et al. Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species //Nanotechnology. – 2018. – T. 14. – №. 7. – C. 824.
59. Kojima C. et al. Preparation of near-infrared light absorbing gold nanoparticles using polyethylene glycol-attached dendrimers //Colloids and surfaces B: Biointerfaces. – 2017. – T. 81. – №. 2. – C. 648-651.
60. Chen K. S. et al. Preparation of thermosensitive gold nanoparticles by plasma pretreatment and UV grafted polymerization //Thin Solid Films. – 2019. – T. 518. – №. 24. – C. 7557-7562.
61. Eustis S., Hsu H. Y., El-Sayed M. A. Gold nanoparticle formation from photochemical reduction of Au³⁺ by continuous excitation in colloidal solutions. A

proposed molecular mechanism //The Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – T. 109. – №. 11. – C. 4811-4815.

62. Namazi H., Fard A. M. P. Preparation of gold nanoparticles in the presence of citric acid-based dendrimers containing periphery hydroxyl groups //Materials Chemistry and Physics. – 2019. – T. 129. – №. 1-2. – C. 189-194.

63. Tarnawski R., Ulbricht M. Amphiphilic gold nanoparticles: synthesis, characterization and adsorption to PEGylated polymer surfaces //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2019. – T. 374. – №. 1-3. – C. 13-21.

64. Chen D. et al. Synthesis and electrical properties of uniform silver nanoparticles for electronic applications //Journal of materials science. – 2019. – T. 44. – №. 4. – C. 1076-1081.

65. Starowicz M., Stypuła B., Banaś J. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles //Electrochemistry Communications. – 2016. – T. 8. – №. 2. – C. 227-230.

66. Mulfinger L. et al. Synthesis and study of silver nanoparticles //Journal of chemical education. – 2017. – T. 84. – №. 2. – C. 322.

67. Singh R. et al. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications //Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – T. 99. – №. 11. – C. 4579-4593

68. Birla S. S. et al. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* //Letters in Applied Microbiology. – 2019. – T. 48. – №. 2. – C. 173-179.

69. Pulit-Prociak J., Banach M. The use of plant materials in the process of obtaining silver and gold nanoparticles //Journal of Computational and Theoretical Nanoscience. – 2018. – T. 13. – №. 5. – C. 2697-2704

70. Shaligram N. S. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain //Process biochemistry. – 2011. – T. 44. – №. 8. – C. 939-943.

71. Gericke M., Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles //Hydrometallurgy. – 2015. – T. 83. – №. 1-4. – C. 132-140.
72. Southam G., Beveridge T. J. The in vitro formation of placer gold by bacteria //Geochimica et Cosmochimica Acta. – 2014. – T. 58. – №. 20. – C. 4527-4530.
73. Nair B., Pradeep T. Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by Lactobacillus strains //Crystal growth & design. – 2012. – T. 2. – №. 4. – C. 293-298.
74. Senapati S. et al. Extracellular biosynthesis of bimetallic Au–Ag alloy nanoparticles //Small. – 2015. – T. 1. – №. 5. – C. 517-520.
75. Tolaymat T. et al. Analysis of metallic and metal oxide nanomaterial environmental emissions //Journal of cleaner production. – 2017. – T. 143. – C. 401-412.
76. Gottschalk F., Sun T. Y., Nowack B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies //Environmental pollution. – 2018. – T. 181. – C. 287-300.
77. Sun T. Y. et al. Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials //Environmental science & technology. – 2016. – T. 50. – №. 9. – C. 4701-4711.
78. Philippe A., Schaumann G. E. Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with UV-visible, fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors for sizing and quantifying colloids in environmental media //PLoS One. – 2019. – T. 9. – №. 2. – C. e90559.
79. Levard C. et al. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity //Environmental science & technology. – 2019. – T. 46. – №. 13. – C. 6900-6914.
80. Cummings H. Z., Pike E. R. Photon Correlation and Light-Beating Spectroscopy, Vol. 3 of NATO Advanced Study Institute Series B: Physics. – 2015.
81. Meyer W. V. et al. Photon correlation and scattering: introduction to the feature issue //Applied optics. – 2019. – T. 45. – №. 10. – C. 2149-2154.

82. Kalimuthu K, Lubin BC, Bazylevich A, et al. Gold nanoparticles stabilize peptide-drug-conjugates for sustained targeted drug delivery to cancer cells // *J Nanobiotechnology*. -2018. -16(1).
83. Landsiedel R, et al: Testing Metal-Oxide Nanomaterials for Human Safety. // *Adv Mater*. – 2010. – P. 2601–2627.
84. Dong J, Carpinone PL, Pyrgiotakis G, Demokritou P, Moudgil BM. Synthesis of precision gold nanoparticles using turkevich method// *KONA Powder Part J*. -2020.- P. 224–232.
85. Shimpi JR, Sidhaye DS, Prasad BLV. Digestive ripening: a fine chemical machining process on the nanoscale// *Langmuir*. -2017.-P 9491–9507.
86. Karajanagi SS, Vertegel AA, Kane RS, Dordick JS: Structure and Function of Enzymes Adsorbed onto Single-Walled Carbon Nanotubes. // *Langmuir*. – 2020. - V. 20.-P.11594–11599.
87. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Baldelli Bombelli F, Dawson KA: Physical – Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles.// *J Am Chem Soc*. - 2011. - V. 133.-P. 2525–2534.
88. Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggård T, Flanagan MB, Lynch I, Elia G, Dawson K: The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. // *ACS Nano*. -2018. -V.5.-P. 7503–7509.
89. Vroman L: Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids. // *Nature*. -1962. - V. 196.-P. 476–477.
90. Ge C, Du J, Zhao L, Wang L, Liu Y, Li D, Yang Y, Zhou R, Zhao Y, Chai Z, Chen C: Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. // *Proc Natl Acad Sci* . -2018. - V. 108.-P. 16968–16973.
91. Jiang X, Weise S, Hafner M, Rocker C, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU: Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. // *J Royal Soc Interface* 2019. - V. 7.-P.S5–S13.
92. Verma A, Stellacci F: Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions// *Small*. -2019. - V. 6.-P.12–21.

93. Worrall JWE, Verma A, Yan HH, Rotello VM: “Cleaning” of nanoparticle inhibitors via proteolysis of adsorbed proteins. //Chem Commun. - 2016.-P.2338–2340.
94. Lacerda SHDP, Park JJ, Meuse C, Pristiniski D, Becker ML, Karim A, Douglas JF: Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. //ACS Nano 2019, 4:365–379.
95. Wangoo N, Suri CR, Shekhawat G: Interaction of gold nanoparticles with protein: A spectroscopic study to monitor protein conformational changes. //Appl Phys Lett. -2018. - V. 92.-P.133104.
96. Shufang Liu YS, Kai G, Zhijuan Y, Xibao G: Spectroscopic study on the interaction of pristine C60 and serum albumins in solution. //Nanoscale Res Lett. -2012. - V. 7.-P.433.
97. Gheshlaghi ZN, Riazi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R: Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. //Acta Biochim Biophys Sin. -2018. - V. 40.-P.777–782.
98. Bardhan M, Mandal G, Ganguly T: Steady state, time resolved, and circular dichroism spectroscopic studies to reveal the nature of interactions of zinc oxide nanoparticles with transport protein bovine serum albumin and to monitor the possible protein conformational changes. //J Appl Phys. - 2019. - V. 106.-P. 701.
99. Mahmoudi M, Shokrgozar MA, Sardari S, Moghadam MK, Vali H, Laurent S, Stroeve P: Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. // Nanoscale. -2011. - V. 3. - 1127–1138.
100. Turci F, Ghibaudi E, Colonna M, Boscolo B, Fenoglio I, Fubini B: An Integrated Approach to the Study of the Interaction between Proteins and Nanoparticles. //Langmuir. -2018. - V. 26.-P.8336–8346.
101. Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF: Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. // Nat Nano. - 2011. - V. 6.-P. 39–44.
102. Nel A, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek E, Somasundaran P, Klaessig

F, Castranova V, Thompson M: Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. //Nat Mater. -2019. - V. 8.-P. 543–557.

103. Colvin VL, Kulinowski KM: Nanoparticles as catalysts for protein fibrillation. //Proc Natl Acad Sci. -2017. - V. 104.-P.8679–8680.

104. Wagner SC, Roskamp M, Pallerla M, Araghi RR, Schlecht S, Kokschi B: Nanoparticle-Induced Folding and Fibril Formation of Coiled-Coil-Based Model Peptides// Small . -2010. - V. 6.-P. 1321–1328.

105. Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue W-F, Lynch I, Lindman S, Thulin E, Radford SE, Dawson KA: Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. //Proc Natl Acad Sci . -2017. - V. 104.-P. 8691–8696.

106. Chatterjee T, Chakraborti S, Joshi P, Singh SP, Gupta V, Chakraborti P: The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* ToxR protein. //FEBS J. -2020. - V. 277.-P. 4184–4194

107. Chakraborti S, Chatterjee T, Joshi P, Poddar A, Bhattacharyya B, Singh SP, Gupta V, Chakraborti P: Structure and Activity of Lysozyme on Binding to ZnO Nanoparticles. //Langmuir. -2019. - V. 26.-P. 3506–3513.

108. Dawson KA, Salvati A, Lynch I: Nanotoxicology: Nanoparticles reconstruct lipids. // Nat Nano. -2019. - V. 4.-P. 84–85.

109. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C: Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. // Inhal Toxicol. - 2019. - V. 16.-P. 437–445.

110. Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA, Salvati A: Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. // ACS Nano. -2012. - V. 6.-P. 5845–5857

111. Cho WS, Duffin R, Howie SEM, Scotton CJ, Wallace WAH, MacNee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K: Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. // Particle and Fibre Toxicology. -2018. - V. 8.-P.27.

112. Hadi NY, Rockford KD, Carole M, Erin W, Pooja B, Inga HM, Meredith CD, Gregg RD, Paul P: Single-walled carbon nanotube interactions with

HeLa cells. // J Nanobiotechnol. -2017. - V. 5.-P.8.

113. Davda J, Labhasetwar V: Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. //Int J Pharm. -2020. - V. 233.-P.51–59.

114. Ruge CA, Kirch J, Canadas O, Schneider M, Perez-Gil J, Schaefer UF, Casals C, Lehr C-M: Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. //Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine. - 2018. - V. 7.-P. 690–693.

115. Wang Z, Tiruppathi C, Minshall RD, Malik AB: Size and Dynamics of Caveolae Studied Using Nanoparticles in Living Endothelial Cells. // ACS Nano. - 2019. - V. 3.-P. 4110–4116.

116. Kreuter J: Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood–brain barrier (BBB). // J Microencapsul. -2013. - V. 30.-P. 49–54.

117. Jörg Kreuter DS, Valery P, Peter R, Klaus C, Claudia K-B, Renad A: Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood–brain Barrier. // J Drug Target. -2019. - V. 10.-P. 317–325.

118. Nagayama S, Ogawara K, Fukuoka Y, Higaki K, Kimura T: Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. //Int J Pharm. -2007. - V. 342.-P. 215–221.

119. Lesniak A, Campbell A, Monopoli MP, Lynch I, Salvati A, Dawson KA: Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. // Biomaterials. -2018. - V. 31.-P. 9511–9518.

120. Ehrenberg MS, Friedman AE, Finkelstein JN, Oberdorster G, McGrath JL: The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. // Biomaterials. -2019. - V. 30.-P.603–610.

121. Albanese A, Chan WCW: Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity. // ACS Nano. -2011. - V. 5.-P.5478–5489.

122. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW: Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. //J Am Chem Soc. -2011. - V. 134.-P.2139–2147.

123. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW: Determining the Size and

Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. // Nano Lett. -2006. - V. 6.-P.662–668.

124. Angeles Villanueva MC, Roca AG, Macarena C, Sabino V-V, Serna CJ, del Puerto Morales M, Rodolfo M: The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. // Nanotechnology. - 2009. - V. 20.-P. 115103.

125. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC: Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. // Mol Pharm. -2008. - V. 5.-P. 505–515.

126. Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang LP: Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. //Particle and Fibre Toxicology. -2010. - V. 7.-P.22.

127. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI: Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: Effect of particle composition. //Environ Health Perspect. -2017. - V. 115.-P.403–409.

128. Kopac T, Bozgeyik K, Yener J: Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. //Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp. -2018. - V. 322.-P.19–28.

129. Cho EC, Zhang Q, Xia Y: The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. // Nat Nano. -2011. - V. 6.-P.385–391.

130. Herzog E, Byrne HJ, Davoren M, Casey A, Duschl A, Oostingh GJ: Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. //Toxicol Appl Pharmacol. - 2019. - V. 236.-P.276–281.

131. Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, Coester C, Tuomi T, Rehberg M, Krombach F: Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. // Particle and Fibre Toxicology. -2018. - V. 5.-P.14.

132. Skebo JE, Grabinski CM, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM:

Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. // *Int J Toxicol.* -2017. - V. 26.-P.135–141.

133. Deng ZJ, Liang M, Toth I, Monteiro MJ, Minchin RF: Molecular Interaction of Poly(acrylic acid) Gold Nanoparticles with Human Fibrinogen. // *ACS Nano.* -2012. - V. 6.-P.8962–8969.

134. Lundqvist M, Sethson I, Jonsson B-H: Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. // *Langmuir.* -2014.-P.20:10639–10647

135. Shang W, Nuffer JH, Dordick JS, Siegel RW: Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticle Surfaces. // *Nano Lett.* -2017. - V. 7.-P.1991–1995.

136. Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS: Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. // *Langmuir.* -2014. - V. 20.-P.6800–6807.

137. Deng Z, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D, Minchin R: Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. // *Nanotechnology.* -2019. - V. 20.-P.455101.

138. Deng ZJ, Liang M, Toth I, Monteiro M, Minchin RF: Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses. // *Nanotoxicology.* -2013. - V. 7.-P. 314–322.

139. Fertsch-Gapp S, Semmler-Behnke M, Wenk A, Kreyling WG: Binding of polystyrene and carbon black nanoparticles to blood serum proteins. // *Inhal Toxicol.* -2011. - V. 23.-P.468–475.

140. Gref R, Lück M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T, Müller RH: 'Stealth'corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. // *Colloids Surf B Biointerfaces.* -2019. - V. 18.-P.301–313.

141. Hsiao IL, Huang Y-J: Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung

epithelial cells. //Sci Total Environ. -2011. - V. 409.-P. 1219–1228.

142. Stoehr LC, Gonzalez E, Stampfl A, Casals E, Duschl A, Puentes V, Oostingh GJ: Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. //Particle and Fibre Toxicolog. -2011. - V. 8.-P.36.

143. Heng BC, Zhao XX, Tan EC, Khamis N, Assodani A, Xiong SJ, Ruedl C, Ng KW, Loo JSC: Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. // ArchToxicol. -2011. - V. 85.-P. 1517–1528.

144. Cai X, Ramalingam R, Wong HS, Cheng J, Ajuh P, Cheng SH, Lam YW: Characterization of carbon nanotube protein corona by using quantitative proteomics. //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. -2013. - V. 9.-P.583–593.

145. Calzolari L, Franchini F, Gilliland D, Rossi F: Protein–Nanoparticle Interaction: Identification of the Ubiquitin–Gold Nanoparticle Interaction Site. //Nano Lett 2019. - V. 10.-P.3101–3105.

146. Huo C., Xiao J., Xiao K., Zou S., Wang M., Qi P., Liu T., Hu Y. Pre-treatment with zirconia nanoparticles reduces inflammation induced by the pathogenic H5N1 influenza virus. //Int. J. Nanomedicine. -2020. - V. 15.-P.661–674.

147. Estrela-Lopis I, Romero G, Rojas E, Moya SE, Donath E: Nanoparticle uptake and their co-localization with cell compartments – a confocal Raman microscopy study at single cell level. //J Phys Conf Ser. -2011. - V. 304.-P. 17.

148. Dell’Orco D, Lundqvist M, Oslakovic C, Cedervall T, Linse S: Modeling the Time Evolution of the Nanoparticle-Protein Corona in a Body Fluid. // PLoS One . -2010. - V. 5.-P. 10949.

149. Nangia S, Sureshkumar R: Effects of Nanoparticle Charge and Shape Anisotropy on Translocation through Cell Membranes. // Langmuir. -2012. - V. 28.-P.17666–17671.

150. «Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии» под ред Воюцкого С.С. и Панич Р.М М.:Химия. 1974. 224с.

151. ОФС.1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле/
152. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. -1970. - V. 227.-P.680–685.
153. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedures and some applications. // Proc Nat Acad Sei. USA. -1979. - V. 76.-P.4350-4354.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2018622011

Диагностические тест-системы на основе серологических методов, для определения вирусных, бактериальных и аутоиммунных заболеваний

Правообладатель: *Стойнова Анастасия Михайловна (RU)*

Автор: *Стойнова Анастасия Михайловна (RU)*

Заявка № 2018621656

Дата поступления 13 ноября 2018 г.

Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных 11 декабря 2018 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Изrael



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2019622171

Разработка диагностических тест-систем с использованием наночастиц для определения маркеров аутоиммунных заболеваний

Правообладатель: *Стойнова Анастасия Михайловна (RU)*

Автор: *Стойнова Анастасия Михайловна (RU)*



Заявка № 2019622105

Дата поступления 19 ноября 2019 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 25 ноября 2019 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев