

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

на правах рукописи

Генералова Алла Николаевна

**МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИЕ ДИСПЕРСНЫЕ
МИКРО- И НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИМЕДИЦИНЫ**

Специальность 03.01.06 - биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в лаборатории полимеров для биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный консультант:

доктор химических наук, проф.

Зубов Виталий Павлович

Официальные оппоненты:

академик РАН, доктор биологических наук, проф.

Егоров Алексей Михайлович, главный научный сотрудник химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ)

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, проф.

Кочетков Сергей Николаевич, зав. лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук

доктор химических наук, проф.

Горин Дмитрий Александрович, профессор центра фотоники и квантовых материалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И.Менделеева» (РХТУ им. Д.И.Менделеева)

Защита состоится 4 декабря 2019 г. в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из актуальных направлений биотехнологии является проведение исследований с участием частиц дисперсий, которые играют важную роль в различных областях, начиная от решения фундаментальных задач до клинической практики. Широкий диапазон областей применения частиц, прежде всего, обусловлен необходимостью уйти от централизованных лабораторий, перейти к персонализированной медицине и проводить исследования быстро, эффективно при относительно низкой цене, используя минимальные объемы анализируемых образцов. Частицы, в основном, выступают в качестве носителей биомолекул, маркеров, позволяющих облегчить *in vitro* и *in vivo* визуализацию и количественно оценить результаты биоспецифических реакций, а также выполняют роль биосенсоров. Прогресс в области нанотехнологий связан не только с миниатюризацией, но также направлен на создание сложных структурированных систем с набором особых свойств, которыми не обладают индивидуальные частицы. Формирование структур может быть реализовано путем объединения частиц с биологически активными молекулами, функциональными полимерами, а также за счет сочетания частиц органической и неорганической природы. Такие мультифункциональные структуры позволяют разрабатывать новые методы биоанализа, диагностики, тераностики, решать задачи биовизуализации, регенеративной медицины, фармакологии.

Необходимыми условиями использования частиц в большинстве исследований являются: узкое распределение по размерам при заданном диаметре частиц; коллоидная и химическая устойчивость в условиях медико-биологических исследований; функциональность, обеспечивающая присоединение биолигандов, а также возможность введения различных меток (оптических, магнитных, плазмонных, и др.). В качестве таких частиц успешно себя зарекомендовали полимерные частицы, получаемые методом гетерофазной полимеризации, которая благодаря большому количеству разнообразных способов синтеза (эмульсионная, суспензионная, осадительная и др. полимеризации) дает возможность получать набор различных видов частиц. Особое место занимают частицы наноразмерного диапазона, активно применяемые для решения задач тераностики - новой области, сочетающей функции диагностики и терапии. Однако получение полимерных наночастиц (<100 нм) с узким распределением по размерам методом гетерофазной полимеризации является сложным, трудноконтролируемым процессом, кроме того, часто возникают проблемы при получении биореагентов на их основе, обусловленные низкой плотностью полимерных частиц. В этой связи большие

перспективы имеют неорганические наночастицы, синтезируемые с привлечением новейших достижений в области нанотехнологии, которые обладают уникальными оптическими и физико-химическими свойствами. Таким образом, актуальной задачей является разработка стратегии создания микро- и наноструктур для биотехнологии и биомедицины по двум направлениям: 1 на основе полимерных частиц, получаемых методом гетерофазной полимеризации; 2. на основе полимер-модифицированных неорганических наночастиц.

1. Метод гетерофазной полимеризации позволяет синтезировать микрочастицы в наиболее значимом диапазоне размеров 0.1-2 мкм. Однако каждый анализ имеет свои особенности и, соответственно, специфические требования к свойствам частиц, например, высокая оптическая плотность частиц для спектрофотометрических исследований или интенсивный флуоресцентный сигнал для визуализации опухоли. Получение полимерных частиц, удовлетворяющих этим требованиям, выдвигает задачу разработки методов синтеза, оптимальных для получения каждого вида частиц. Это является крайне трудоемкой процедурой, требующей высокой квалификации и учета очень многих факторов, таких как начальное состояние полимеризационной системы и, прежде всего, выбор мономера, чья растворимость в дисперсионной среде во многом определяет механизм формирования частиц; стабилизация в процессе и после синтеза; кинетика полимеризации; размер и форма получаемых частиц.

Вышесказанное вызывает необходимость разработки универсальных, простых подходов при использовании минимального количества мономеров и способов полимеризации, легко адаптируемых для получения частиц заданного диаметра и отвечающих особым требованиям каждого анализа. Перспективными способами получения микрочастиц на основе одного мономера являются осадительная анионная полимеризация акролеина и безэмульгаторная сополимеризация акролеина со стиролом. Таким образом, базируясь на данных способах синтеза и применяя методы модификации, основанные на последних достижениях в области полиэлектролитов, стимул-чувствительных полимеров, неорганических наночастиц, следует разработать концепцию получения набора микроструктур для различных видов анализа.

2. В настоящее время среди наноразмерных неорганических частиц (НЧ) одними из наиболее востребованных в биомедицинских исследованиях являются фотолюминесцентные НЧ. Особое место среди них занимают НЧ с антистоксовой фотолюминесценцией (НАФ), которая активируется светом из ближнего ИК-диапазона (975 нм), попадающим в «окно прозрачности» биоткани, что определяет перспективность их использования в *in vivo* исследованиях. Однако для практического решения такой задачи необходима разработка универсального подхода к модификации поверхности частиц,

который позволит исходные гидрофобные НАФ применять для решения задач диагностики и тераностики. Несмотря на большое количество разработанных подходов, актуальной остается проблема коллоидной и химической устойчивости, неизменности фотофизических свойств НАФ в буферных системах, условиях живого организма и при хранении. В этой связи большой потенциал имеет метод замены растворителя, проводимый без удаления стабилизатора с поверхности НАФ и без применения агрессивных реагентов. Таким путем можно формировать полимерное покрытие, которое предохраняет матрицу от воздействия окружающей среды при сохранении фотофизических свойств наночастиц. Реализация такого подхода позволит получать полимер-модифицированные НАФ, которые могут выступать в качестве, как *in vitro*, так и *in vivo* биореагентов.

Целью данной работы является разработка основных концепций, методов получения и демонстрация практического применения микро- и наноструктур на основе частиц с требуемой функциональностью в биотехнологии и биомедицине.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. разработать способ получения полимерных микрочастиц на базе одного мономера, акролеина, в диапазоне диаметров 0.15-2 мкм с управляемыми коллоидными и химическими свойствами и возможностью расширения набора свойств за счет проведения сополимеризации;
2. получить микроструктуры путем введения НЧ в полимерную матрицу, а также путем модификации поверхности стимул-чувствительными полимерами, содержащими НЧ. В качестве НЧ в работе использовать квантовые точки (КТ) и наночастицы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ);
3. продемонстрировать использование полученных микроструктур в различных форматах биоанализа, а также в качестве биосенсоров и визуализирующих агентов;
4. разработать метод модификации НАФ для создания гидрофильных коллоидно-стабильных реагентов, сохраняющих свои фотофизические свойства, на базе которых могут быть получены наноструктуры с биофункциональными молекулами;
5. продемонстрировать и исследовать особенности использования НАФ в качестве визуализирующих меток в анализах *in vitro*, а также для визуализации и терапии раковых опухолей *in vivo*.

Научная новизна

- Разработан подход для получения дисперсий микрочастиц на базе одного мономера с использованием простого, воспроизводимого, легко адаптируемого под необходимые требования метода анионной осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде. Расширение набора свойств полимерных микрочастиц проведено с участием метода радикальной безэмульгаторной сополимеризации акролеина со стиролом;
- Показано, что эффективное управление коллоидными и химическими свойствами микрочастиц, реализованное путем введения второго мономера, органических красителей, аминов, НАФ на стадии синтеза, при проведении реакции сшивки, позволяет получить набор микрочастиц, удовлетворяющих требованиям различных видов биоанализа. На основе частиц созданы микроструктуры с биофункциональными соединениями для проведения анализов в различных форматах реакции латексной агглютинации, а также для исследования биораспределения микрочастиц *in vivo*;
- Получены гибридные органо-неорганические микрочастицы путем введения КТ в сформированные полимерные микрочастицы. Созданы микроструктуры на основе конъюгатов гибридных микрочастиц и адресных молекул для специфической визуализации взаимодействий биомолекул в реакции латексной агглютинации и на поверхности клеток. Формирование гибридных микроструктур путем включения КТ в состав полиэлектролитных комплексов на поверхности микрочастиц лежит в основе дизайна оптического сенсора для определения ионов металлов и позволяет получать частицы с рН-чувствительной флуоресценцией. Созданы гибридные микроструктуры с термочувствительной флуоресценцией путем инкапсуляции КТ в слой термочувствительного полимера на поверхности микрочастиц;
- Найдено, что модификация гидрофобных НАФ с использованием метода замены растворителя является перспективным подходом для получения наноразмерных гидрофилизированных коллоидно-стабильных наночастиц с различной функциональностью и низкой цитотоксичностью. На основе конъюгатов с белком барстаром в качестве компонента высокоаффинного модуля барназа-барстар созданы наноструктуры НАФ, которые продемонстрировали специфичную визуализацию рецепторов на поверхности раковых клеток;
- Показано эффективное накопление НАФ в солидной опухоли при увеличении времени циркуляции в кровеносной системе в результате модификации поверхности НАФ молекулами полиэтиленгликоля. Продemonстрировано, что наноструктуры НАФ с эндогенным фотосенсибилизатором рибофлавином, в

которых реализуется резонансная передача энергии при возбуждении ИК-светом, являются тераностическими агентами.

Практическая значимость

Получены микроstructures на основе полиакролеин-содержащих частиц, которые позволили разработать простой, чувствительный метод ингибирования латексной агглютинации с визуальной и инструментальной детекцией результатов для определения гербицидов. Разработаны способы получения гибридных микроstructures на основе полимерных частиц и квантовых точек, которые являются перспективной платформой биореагентов, используемых для визуализации рецепторов раковых клеток и создания биосенсоров. Показано, что наноструктуры на основе апконвертирующих нанофосфоров имеют большой потенциал для проведения *in vivo* исследований и решения задач тераностики благодаря разработке подхода к созданию полимерного покрытия без снижения эффективности детектирования в глубоких слоях биоткани при возбуждении ИК-светом.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработан инновационный подход к созданию микроstructures из полимерных частиц, синтезируемых на базе одного мономера, для различных биомедицинских исследований на основе реакции латексной агглютинации, маркирования клеточных рецепторов, а также для применения в качестве оптических биосенсоров для определения ионов меди и мониторинга протекания экзотермических реакций, для исследования биораспределения частиц *in vivo*;
2. Создана универсальная технология модификации поверхности неорганических фотолюминесцентных наночастиц, которая позволяет получать полимер-модифицированные наноструктуры для визуализации клеточных рецепторов, биоимиджинга, тераностики.

Личный вклад автора. Автор принимал активное участие на всех этапах исследования – от постановки задачи, планирования и проведения ключевых экспериментов до обсуждения и литературного оформления полученных результатов.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на Всесоюзном совещании по молекулярной люминисценции (Караганда, 1989), 1 Всесоюзном съезде иммунологов (Сочи, 1989), World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. (Kyoto, Japan, 1991), VI-th Conference of young scientists on Organic and Bioorganic Chemistry. (Bechine, Czechoslovakia, 1989), Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (New Orleans, USA, 1992), 2-nd Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analyses (Lund, Sweden, 1996), 6-th Symposium on Chemistry and

Fate of Modern Pesticides (Amsterdam, Netherlands, 1997), 12-th International Symposium on Affinity Interactions (Kalmar, Sweden, 1997), 9-th International Congress of Pesticide Chemistry (London, UK, 1998), 2-ом Национальном Конгрессе Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов (Москва, 1998), European Chemistry at Interfaces Conference (Vladimir, 2003; Loughborough, England, 2005), NACBO International Nanobiotechnology Conference (Urbino, Italy 2006; Rome, Italy, 2009), «Лазерная физика и оптические технологии» (Гродно, Беларусь, 2006), Всероссийской Каргинской Конференции (Москва, 2007, 2010, 2014), «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (С.-Петербург, 2007), Менделеевском съезде по общей и прикладной химии, (Москва, 2007), III Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (Москва, 2008), «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009, 2013), 30-th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides (Bologna, Italy, 2010), International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (Strasbourg, France, 2011; Sitges, Spain, 2015), Frontiers in polymer science (Lyon, France, 2011), European Polymer Congress (Granada, Spain, 2011), V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011), SPIE Optics+Photonics (San Diego, USA, 2012), Zing Polymer Chemistry Conference (Cancun, Mexico, 2012), BioPhotonics Conference (Taipei, Taiwan, 2013), International Nanomedicine Conference (Sydney, Australia, 2015), Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2006, 2015, 2016, 2017, 2018), International Symposium "Topical problems of biophotonics" (Nizhny Novgorod, 2015), BIT'S 2-nd annual congress of smart materials (Singapore, 2016), III Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2017), HBSM-2018 (Suzdal, 2018), FEBS Open Bio (Praha, Czechia, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 49 оригинальных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, зарегистрировано 3 патента, опубликовано более 60 тезисов докладов на российских и международных конференциях, 1 глава в монографии.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 247 страницах, содержит 77 рисунков, 17 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения и обсуждения результатов, выводов и списка литературы (417 наименований).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В данной работе представлена методология создания микро- и наноструктур для решения различных задач нанобиотехнологии с участием двух типов частиц: 1 полимерных частиц, полученных методом гетерофазной полимеризации, содержащих как органические, так и неорганические метки; 2. полимерсодержащих неорганических наночастиц.

1. Микроструктуры на основе полимерных частиц

Для разработки подходов к получению микроструктур на основе полимерных частиц необходимо учитывать, что каждый вид анализа предъявляет особые требования к используемым частицам. Это вызывает необходимость разработки универсальных, простых, воспроизводимых, легко управляемых способов синтеза частиц, которые могли быть использованы в различных видах анализа, при необходимости, проводя только модификацию поверхности по известным протоколам. В данной работе в качестве такого способа выступает осадительная анионная полимеризация акролеина, которая представлена, как способ **M1**. Расширение спектра свойств частиц достигали, используя безэмульгаторную радикальную сополимеризацию акролеина со стиролом - способ **M2**.

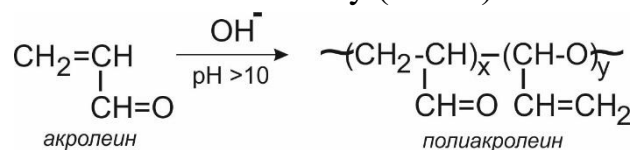
1.1 Получение полимерных частиц методом гетерофазной полимеризации

1.1.1. Синтез полимерных частиц методом осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде (M1)

Формат способа синтеза, прежде всего, связан с выбором мономера, в качестве которого в данной работе использовали акролеин, представляющий собой α,β -ненасыщенный альдегид, способный вступать в реакции полимеризации и сополимеризации по различным механизмам благодаря системе сопряженных связей. В результате получают частицы с реакционноспособными альдегидными группами на поверхности, легко взаимодействующими с аминоклассами биологически активных молекул. Кроме того, частицы полиакролеина по сравнению, например, с частицами полистирола, обладают более рыхлой структурой, что позволяет легко вводить в них как органические молекулы, так и неорганические частицы. Макромолекулы полиакролеина также имеют высокое сродство к большинству водорастворимых органических красителей. Эти свойства определяют возможность получения интенсивно окрашенных и флуоресцентных частиц.

Дисперсии полиакролеиновых частиц получали анионной осадительной полимеризацией, при которой в состав исходной реакционной смеси входят

только мономер и инициатор. В результате формировались цепи полимера, имеющие в своем составе звенья x и y (схема):



Осадительную полимеризацию акролеина проводили в водной среде при добавлении раствора щелочи до достижения pH=10 (20°C), инициирующего рост полимерной цепи акролеина. При достижении критической длины цепи растворимость полимера в воде уменьшалась, система становилась нестабильной и цепи агрегировали с образованием частиц. Интенсивный рост диаметра полимерных частиц происходил в течение первых 5 мин полимеризации и заканчивался в узком временном интервале (Рис.1б). В дальнейшем наблюдалось лишь незначительное увеличение диаметра, приводящее к образованию практически монодисперсных частиц. Такой способ проведения полимеризации позволяет синтезировать полиакролеиновые частицы с диаметром ~0,65 мкм, концентрацией альдегидных групп 35 мкмоль/г полимера и выходом полиакролеина ~40%. Низкий выход полиакролеина вызван образованием побочных олигомерных продуктов в процессе полимеризации (Рис.1а).

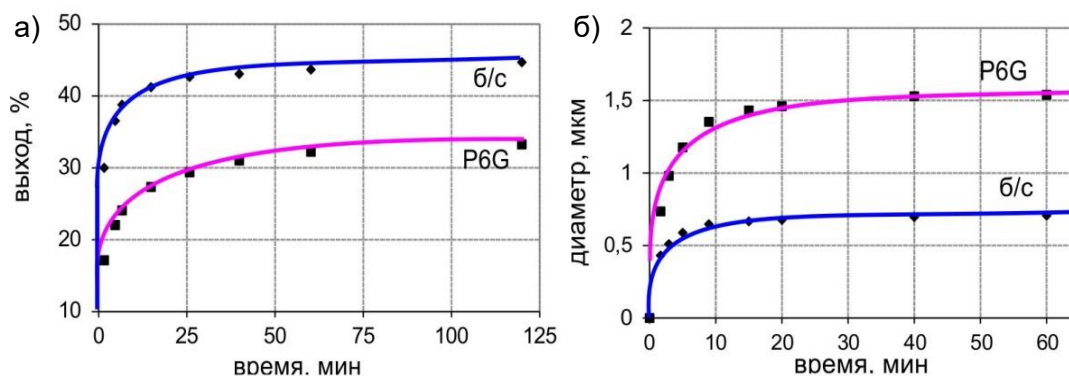


Рисунок 1. Зависимость изменения выхода полимера (а) и размера частиц (б) от времени полимеризации без красителя (б/с) и с красителем родамином 6G (P6G).

Недостаточная коллоидная и химическая стабильность частиц, отсутствие контрастного окрашивания привели к необходимости разработки подходов к управлению свойствами частиц. В качестве таких подходов в работе использовали: введение красителя на стадии синтеза, проведение реакции сшивки по радикальному механизму и при участии аминосоединений.

Синтез полиакролеиновых частиц в присутствии красителя

В настоящее время существует большое количество анализов с детекцией результатов невооруженным глазом, в которых необходимо использовать

окрашенные полимерные частицы. Полиакролеин обладает высоким сродством к ксантоновым красителям, а применение их водорастворимых форм, которые диссоциируют в водной среде, позволяет управлять как процессом полимеризации, так и свойствами получаемых частиц. В работе использовали аминоксантоновый краситель родамин 6G (Р6G), при диссоциации которого образуется цветной катион. Краситель в концентрации от 0.04 до 0.6% мас. в расчете на мономер добавляли в водную фазу на стадии осадительной полимеризации, что приводило к увеличению диаметра частиц по сравнению с частицами, полученными без красителя (Рис.1б). Для повышения химической стабильности частиц проводили реакцию радикальной сшивки непрореагировавших двойных связей полиакролеина (см. схему реакции) в присутствии инициатора персульфата калия ($K_2S_2O_8$). Увеличение концентрации Р6G, проведение реакции сшивки приводило к росту диаметра частиц, снижению диффузии олигомерных продуктов при уменьшении выхода полимера (Рис.2а,б). Р6G практически полностью включался в частицы и не вымывался в процессе очистки, что позволило получить интенсивно окрашенные дисперсии (Рис.2в).

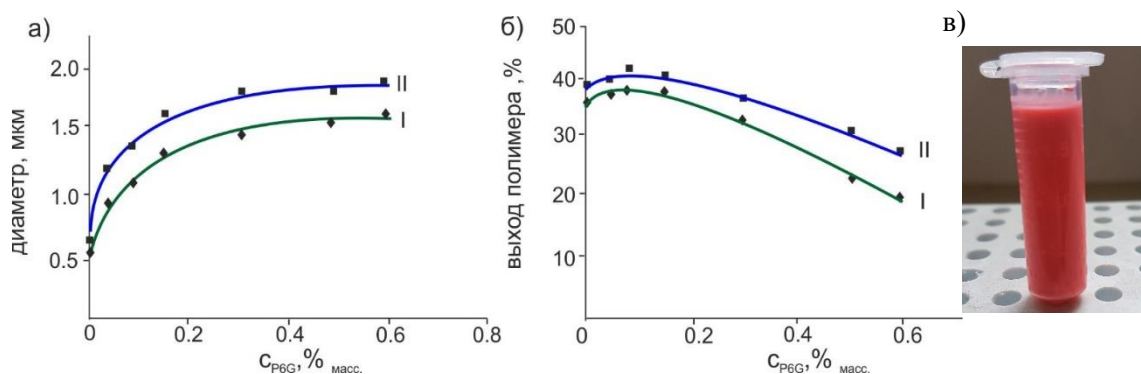


Рисунок 2. Зависимость диаметра частиц полиакролеиновой дисперсии **M1** (а) и выхода полимера (б) от концентрации Р6G на стадии осадительной полимеризации (I) и стадии радикальной сшивки (II); изображение дисперсии, окрашенной Р6G (в).

Таким образом, осадительная полимеризация является эффективным способом получения интенсивно окрашенных флуоресцентных частиц в диапазоне диаметров 1.2-2 мкм, отвечающих основным требованиям для их применения в биомедицинских исследованиях.

Синтез полиакролеиновых частиц в присутствии аминов

Более универсальным подходом для получения окрашенных частиц методом осадительной полимеризации акролеина является введение красителя в сформированные полимерные частицы. В процессе осадительной полимеризации были получены коллоидно- и химически стабильные частицы за счет введения в исходную реакцию среду аминов (аммиак, гидрат гидразина, этилендиамин, фенилендиамин) в диапазоне концентраций 0,05-0,3%

мас. в расчете на мономер. Амины с одной стороны, обладая основными свойствами, позволяют повысить эффективность инициирования, а с другой стороны, способны вступать в реакцию с альдегидными группами, что приводит к образованию межмолекулярных связей.

Найдено, что полимеризация идет до высоких конверсий с выходом полимера 60-90% в зависимости от природы используемого амина, причем наименьший выход полимера отмечен у дисперсий, полученных в присутствии этилендиамина (~70%), а наибольший – при добавлении фенилендиамина (~80%). С увеличением концентрации амина в реакционном объеме диаметр частиц возрастал. Максимальный диаметр частиц при минимальной диффузии олигомера был получен в случае использования этилендиамина в конц. 0.2% мас., а минимальный диаметр отмечен у частиц, полученных в присутствии фенилендиамина (0.05% мас.). Таким образом, найдено, что полиакролеиновые частицы, полученные в присутствии аммиака (0.2, 0.3% мас.) и этилендиамина (0.1, 0.2% мас.), являются коллоидно-устойчивыми дисперсиями (стабильны в 0.25М NaCl), химически стабильными (растворимость в этаноле меньше 5%) с диаметром частиц 1.0-1.5 мкм, и стабильными при хранении (концентрация олигомера <0.2 мг/мл). Данные частицы наиболее полно удовлетворяют требованиям их использования в биоанализе, а введение красителей (Р6G, кристаллический фиолетовый) обеспечивает интенсивное окрашивание и флуоресценцию при невысоких концентрациях используемого красителя.

1.1.2. Синтез частиц методом безэмульгаторной радикальной полимеризации акролеина со стиролом (M2)

Методом осадительной полимеризации акролеина не удастся получить агрегативно устойчивые частицы с диаметром 100–300 нм, что можно преодолеть путем проведения реакции сополимеризации. В качестве сомономера большой потенциал имеет стирол, поскольку его свойства хорошо изучены, а также он имеет высокий показатель преломления (1.59), который обеспечивает интенсивное рассеяние света, и низкую плотность полимера (1.05 г/см³), что повышает седиментационную устойчивость дисперсий. Эти параметры играют важную роль при создании микроструктур для анализов с инструментальной детекцией результатов.

Такие частицы могут быть получены радикальной безэмульгаторной сополимеризацией в присутствии инициатора K₂S₂O₈, которую проводили при соотношении мономеров в исходной смеси акролеин:стирол: 1:1, 5:1, 10:1(мол.). Данная сополимеризация является диффузионно-контролируемым процессом, что отражается на снижении скорости по сравнению с осадительной полимеризацией акролеина (Рис.3).

Полученные дисперсии **M2** имели меньший диаметр частиц (150-450 нм), чем при осадительной полимеризации акролеина **M1**. Однако частицы также содержали альдегидные группы, характеризовались высокой коллоидной и химической стабильностью, и они могут быть использованы для создания различных микроструктур.

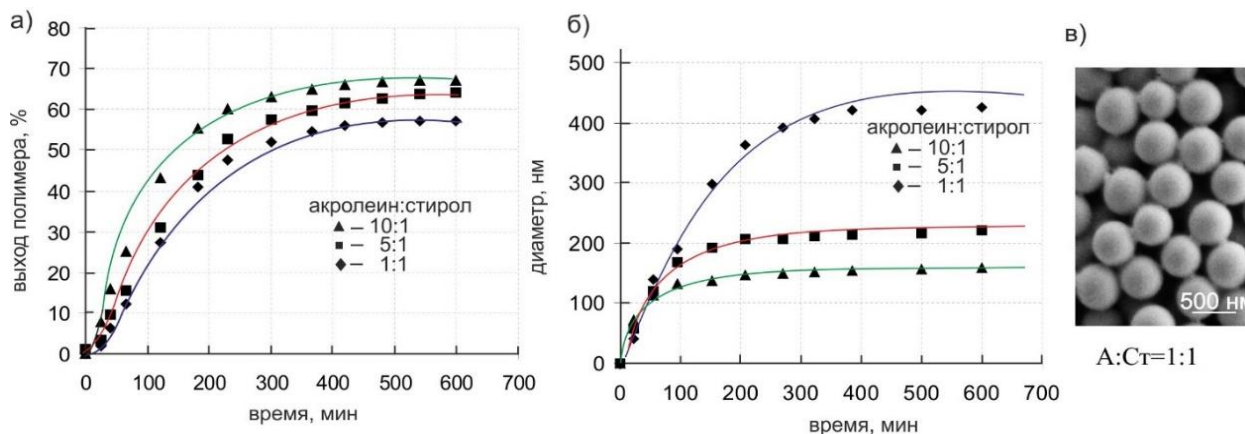


Рисунок 3. Зависимость выхода полимера (а) и диаметра микросфер **M2** (б) от времени полимеризации; СЭМ изображение частиц сополимера при соотношении акролеин:стирол=1:1 (А:Ст=1:1).

1.2. Микроструктуры на основе частиц, содержащих органические метки

1.2.1. Реакция латексной агглютинации

Для решения ряда задач бионанотехнологии требуются простые, недорогие анализы с визуальной детекцией результатов, обладающие при этом высокой чувствительностью и надежностью. Одним из таких методов является реакция латексной агглютинации (РЛА), основанная на агрегации полимерных частиц в результате протекания биоспецифической реакции между иммобилизованным лигандом и аналитом. Одним из вариантов проведения РЛА является постановка реакции в 96-ти луночном планшете с регистрацией результатов невооруженным глазом. В данной работе использовали окрашенные частицы, полученные на основе осадительной полимеризации акролеина (**M1**). В сотрудничестве с рядом научных организаций разработаны тест-системы для определения антител к антигенам чумы, бруцеллеза, туляремии, лептоспироза, а также для детекции *Mycobacterium Tuberculosis*, дифтерийного токсина, антител к липополисахаридам клеточной стенки условно-патогенных бактерий, тиреоглобулина и др.

1.2.2. Реакция ингибирования латексной агглютинации для определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты

В данной работе представлен анализ с использованием частиц **M1** в формате реакции ингибирования латексной агглютинации (РИЛА), которую применяют для определения моновалентных антигенов (гаптенов) на основе

конкурентной реакции свободного гаптена и гаптена, конъюгированного с носителем (Рис. 4)

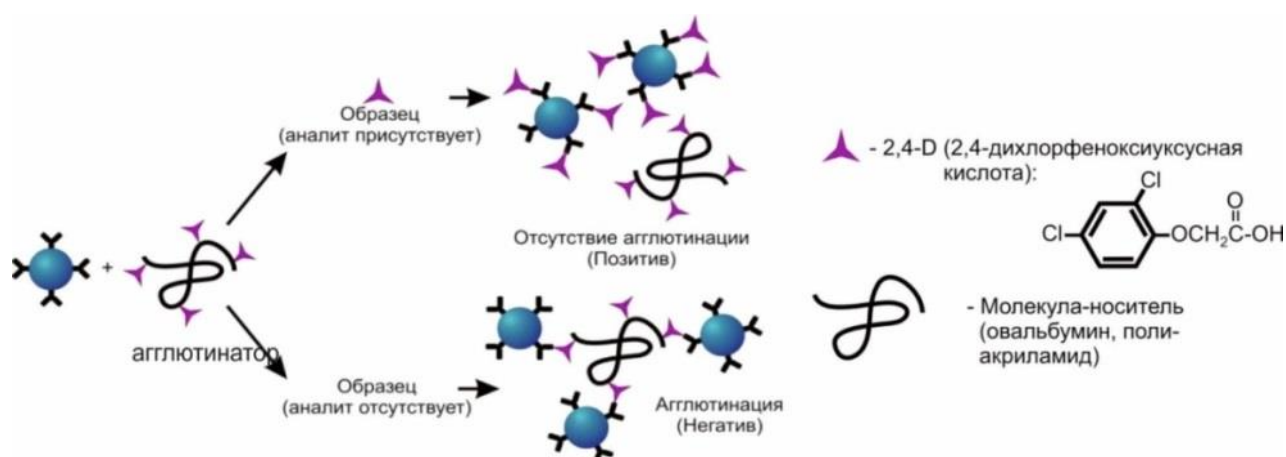


Рисунок 4. Схема реакции ингибирования латексной агглютинации.

На основе РИЛА разработан анализ для определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) с участием микроструктур в виде конъюгатов частиц **M1** с моноклональными антителами против 2,4-D (Ат). В качестве агглютинатора использовали гаптен 2,4-D, конъюгированный с молекулой-носителем, в качестве которой выступали глобулярный белок овальбумин (OVA) или синтетический полимер полиакриламид (ПАА). После оптимизации условий получения конъюгатов M1-Ат, определения диапазона рабочих концентраций агглютинаторов в прямой РЛА найдено, что при использовании 2,4-D-OVA в РИЛА предел специфического обнаружения 2,4-D составляет 0.62 нг/мл, а в случае 2,4-D-ПАА – 0.25 нг/мл (ПДК 2,4-D в воде 0.5 мкг/мл). Таким образом, полимерные частицы **M1** являются перспективными маркерами-носителями в микроструктурах, применяемых в РИЛА, представляющей собой неинструментальный, чувствительный, простой, одностадийный метод анализа, пригодный для скрининговых исследований.

1.2.3. Реакция латексной агглютинации со спектрофотометрической детекцией результатов для определения гербицида 2.4-D

Одним из количественных методов на основе РЛА является спектрофотометрическое титрование, которое дает возможность исследовать процесс агглютинации частиц по изменению интенсивности проходящего света через требуемые интервалы времени после введения агглютинатора, определять скорость реакции и предельное значение оптического поглощения, что дает возможность оптимизировать условия проведения РЛА. Полимерные частицы с диаметром 0.15 мкм, полученные методом безэмульгаторной радикальной сополимеризации акролеина и стирола, 10:1 (**M2**), отвечают требованиям, необходимым для их использования в этом формате РЛА. Микроструктуры (конъюгаты) получали либо прямой реакцией поверхностных альдегидных

групп с антителами по их первичным аминогруппам (M2-Ат), либо при участии спейсера б-аминокапроновой кислоты (M2-с-Ат). В прямой РЛА при добавлении тех же агглютинаторов, что и в предыдущей главе, наблюдали увеличение оптического поглощения в течение 200с с дальнейшим выходом на плато (ΔA_{max}), которое не изменялось до конца эксперимента. Скорость изменения оптического поглощения дисперсии ($\Delta A/\text{мин}$) в начале реакции и значение ΔA_{max} возрастали с увеличением концентрации иммобилизованных антител (Рис.5а) и концентрации агглютинаторов. В случае микроструктур, полученных без спейсера, введение агглютинатора практически не влияло на значение оптического поглощения образца.

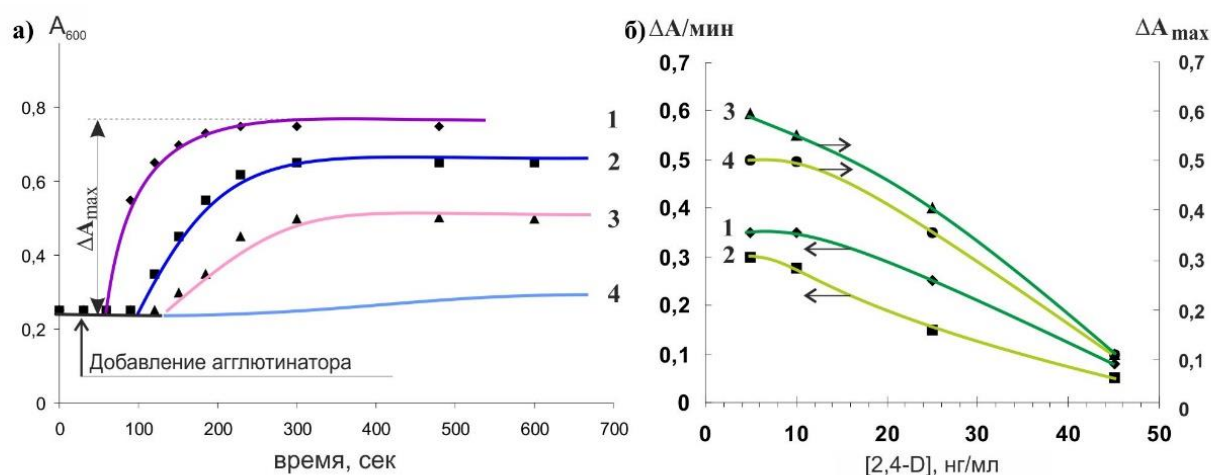


Рисунок 5. Зависимость оптического поглощения A_{600} от времени в РЛА между M2-с-Ат и 2,4-D-OVA (90 нг/мл). Концентрация антител 25 (1), 15 (2), 10 (3) мкг/мг полимера и 15 (4) мкг/мг полимера для M2-Ат (без спейсера) (а); Зависимость скорости РИЛА $\Delta A/\text{мин}$ (1,2) и ΔA_{max} (3,4) от концентрации 2,4-D при участии M2-с-Ат (25 мкг/мг полимера) для: 1, 3 – 2,4-D-OVA (140 нг/мл); 2, 4 - 2,4-D-ПАА (2,5% зам., 90нг/мл) (б).

Реакцию ингибирования с целью определения гаптена 2,4-D проводили при участии агглютинаторов, имеющих оптимальные показатели в РЛА с M2-с-Ат (25мкг/мл): 2,4-D-OVA (140 нг/мл) и 2,4-D-ПАА (2,5% замещения, 90 нг/мл). Увеличение концентрации 2,4-D в присутствии как 2,4-D-OVA, так и 2,4-D-ПАА выше 10 нг/мл приводило к снижению $\Delta A/\text{мин}$ и ΔA_{max} , причем большая степень ингибирования была зарегистрирована для синтетического агглютинатора 2,4-D-ПАА (50% ингибирования при 25 нг/мл) (Рис.5б). Таким образом, использование микроструктур на основе частиц M2 показало, что спектрофотометрия является простым и быстрым методом для изучения кинетики реакции латексной агглютинации.

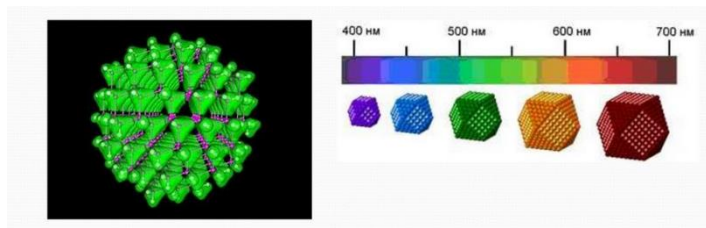
1.2. Микроструктуры на основе органо-неорганических частиц.

В последние годы особое внимание привлекают гибридные частицы, состоящие из органических и неорганических компонентов. С одной стороны, неорганические наночастицы (НЧ) характеризуются уникальными электрическими, магнитными, оптическими и др. свойствами. С другой стороны, полимеры выполняют функцию матрицы, а также участвуют в управлении свойствами НЧ, например, нивелируют дефекты поверхности НЧ, придают дополнительную функциональность, предотвращают воздействие окружающей среды. Таким образом, создание композиций НЧ с полимерными частицами позволяет получать новые материалы с особыми свойствами.

Наиболее перспективными НЧ для решения задач биотехнологии и биомедицины являются флуоресцентные наночастицы, которые наряду со специфическими индивидуальными свойствами характеризуются интенсивным сигналом флуоресценции, уникальной химической и фотостабильностью, большой спектральной разницей в длинах волн возбуждения и излучения. В работе использованы два типа НЧ: полупроводниковые нанокристаллы, известные также, как квантовые точки (КТ), и наночастицы с антистоксовой флуоресценцией, которые представлены апконвертирующими нанофосфорами (НАФ). Следует отметить, что оба типа НЧ являются гидрофобными, что вызывает трудности при получении коллоидно-устойчивых водных суспензий НЧ. Кроме того, отсутствие функциональной поверхности существенно ограничивает их применение в биоприложениях, поэтому актуальной задачей является разработка способов модификации поверхности НЧ.

1.3.1. Получение гибридных частиц с квантовыми точками (КТ) путем их введения в полимерную матрицу

Основной отличительной чертой КТ является широкий спектр цветов флуоресценции КТ, который непосредственно зависит от их размера, а также и то, что для возбуждения КТ всех цветов (размеров) достаточно одного источника излучения (схема). Одним из перспективных подходов, позволяющих использовать КТ в биомедицинских исследованиях, является включение их в полимерную матрицу, что может быть реализовано путем введения КТ в готовые полимерные частицы после их набухания в смеси органических растворителей.



Использовали КТ со структурой ядро/оболочка CdSe/ZnS , стабилизированные в процессе синтеза триоктилфосфиноксидом (ТОФО). КТ имели диаметры с соответствующими максимумами

флуоресценции ($\lambda_{эм.}$): 3,5 нм ($\lambda_{эм.}$ 546 нм), 4,2 нм ($\lambda_{эм.}$ 583 нм) и 6 нм ($\lambda_{эм.}$ 610 нм), возбуждаемые светом на длине волны 480 нм ($\lambda_{возб.}$).

КТ вводили в полиакролеин-содержащие частицы, полученные в процессе полимеризации **M2**. Получены коллоидно- и химически стабильные полимерные дисперсии с высокой интенсивностью флуоресценции, близкой к интенсивности флуоресценции исходных КТ (Рис.6в). Следует отметить, что при хранении отмечено усиление флуоресценции, которое, вероятно, связано с эффектом пассивации поверхности КТ (Рис.6а). На участках подложки, свободных от частиц, отсутствовала фоновая флуоресценция (Рис.6б), что наблюдалось для всех частиц. Это свидетельствует о практически полном включении КТ, которое не сопровождается десорбцией олигомеров, содержащих КТ, в дисперсионную среду.

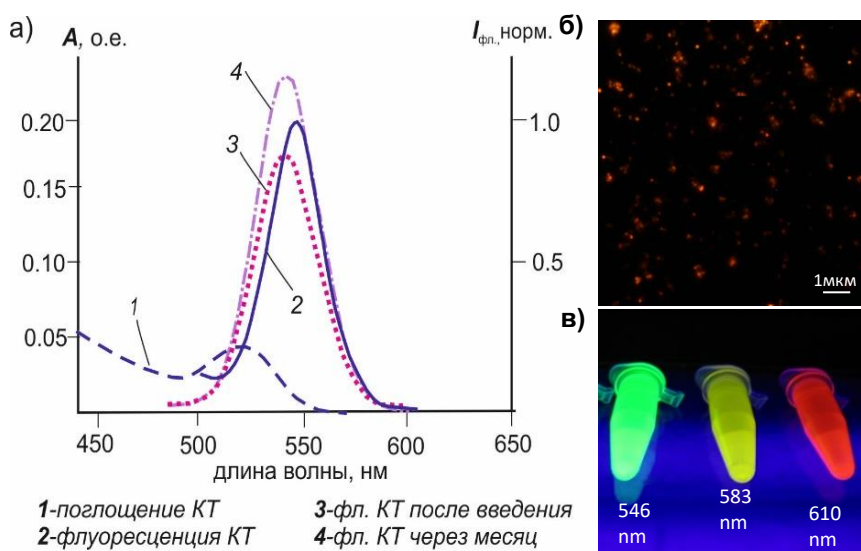


Рисунок 6. Спектры поглощения и флуоресценции КТ с $\lambda_{эм.}=546$ нм, нормализованные спектры флуоресценции КТ сразу и через месяц после включения в частицы **M2** при соотношении акролеин:стирол, 1:1 (а); Флуоресцентные изображения сополимерных частиц **M2** (акролеин:стирол, 10:1) после включения КТ (б) и дисперсий с разной эмиссией (в).

Таким образом, получены гибридные органо-неорганические частицы, содержащие КТ в матрице сополимеров акролеина со стиролом **M2**. Следует отметить, что инкапсуляция КТ в полимерную матрицу не приводит к формированию дополнительных каналов тушения флуоресценции, а положение и ширина пика флуоресценции не изменяются в течение длительного времени.

Применение микроструктур на основе гибридных частиц с КТ в биоанализах на основе иммунохимических реакций.

Для оценки свойств гибридных частиц при их использовании в качестве носителей биомолекул в составе микроструктур, прежде всего, исследовали характер взаимодействия частиц с белковыми молекулами на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА) в диапазоне концентраций 0,5-4 мг на 1 г полимера. Найдено, что количество присоединенного белка возрастает с увеличением концентрации добавленного белка, пока не достигается плато, при

этом концентрация иммобилизованного белка выше для частиц с более низким содержанием полиакролеина (**M2**, акролеин:стирол, 1:1). Этот эффект можно объяснить многоточечным характером взаимодействия белковых молекул с альдегидными группами акролеина на поверхности частиц.

Проведенные исследования позволили получить микроstructures на основе частиц **M2** и проиллюстрировать их применение в реакции латексной агглютинации и для визуализации клеточных рецепторов. Для постановки РЛА использовали частицы **M2** (акролеин-стирол, 1:1), содержащие КТ с $\lambda_{эм} = 583$ нм, с диаметром более 0,5 мкм. Микроstructures получали с антителами F-19 (1-20 мкг на 1 г полимера) к антигену F-1 *Y.pestis*. Реакцию с антигеном F-1 проводили в планшете и через 3 часа учитывали результаты при облучении УФ-светом. Минимальная определяемая концентрация антигена в данном анализе составила 15 нг/мл, которая незначительно превышает концентрацию антигена, детектируемую в иммуноферментном анализе (~ 5 нг/мл).

Для визуализации клеточных рецепторов необходимо использовать частицы с диаметром <0.25 мкм, которые легко отличить от других объектов на поверхности клетки с четко регистрируемым сигналом. Данным требованиям соответствуют частицы **M2** (акролеин: стирол, 10:1) с диаметром 0.15 мкм, содержащие КТ с $\lambda_{эм} = 610$ нм, на основе которых были получены микроstructures с мини-антителами 4D5scFv (1,5 и 6,8 мкг на 1г полимера) для мечения онкомаркера HER2/neu, гиперэкспрессируемого целым рядом опухолевых клеток. Полученными микроstructures обрабатывали HER2/neu-положительные клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3. В результате наблюдали специфическую флуоресценцию клеток, которая коррелировала с концентрацией иммобилизованных антител. Данные результаты показали возможность использования полимерных частиц в качестве «скаффолдов» миниантител, что открывает большие перспективы для решения задач биовизуализации.

1.3.2. Гибридные микроstructures со стимул-зависимой флуоресценцией

Микроstructures с pH-чувствительной флуоресценцией

Другим подходом для получения КТ-содержащих реагентов является создание гибридных частиц за счет адсорбции КТ на поверхности полимерных частиц в составе полиэлектролитного комплекса (ПЭК) (англ. layer-by-layer technique, LbL). В этом случае количество неорганических частиц можно легко контролировать количеством последовательных циклов адсорбции и получать многослойное покрытие. Кроме того, этот метод не требует сложных химических реакций, а основан на процессе самосборки и позволяет легко получать биофункционализированную поверхность. Это дает возможность

приготовить микроstructures, содержащие КТ в непосредственной близости к поверхности, что позволяет регистрировать незначительные изменения условий окружения, такие как pH, путем измерения флуоресценции.

В данной работе микроstructures с функциональными полимерами и КТ получали на основе частиц **M1** с диаметром 1.1 мкм, синтезированных в присутствии 0.2% NH₃. Отрицательный дзета-потенциал на поверхности частиц за счет протекания реакции Канниццаро и наличие альдегидных групп позволяет осаждать на поверхность в качестве первого слоя полиэлектролит поли-L-лизин (ПЛ) с изменением заряда на положительное значение. Следующий, отрицательно заряженный слой формировали из Na-соли полистиролсульфоната (ПСС). Таким образом были нанесены два первых ПЭК (ПЛ/ПСС) и слой из положительно заряженного ПЛ, необходимого для адсорбции КТ (Рис. 7).

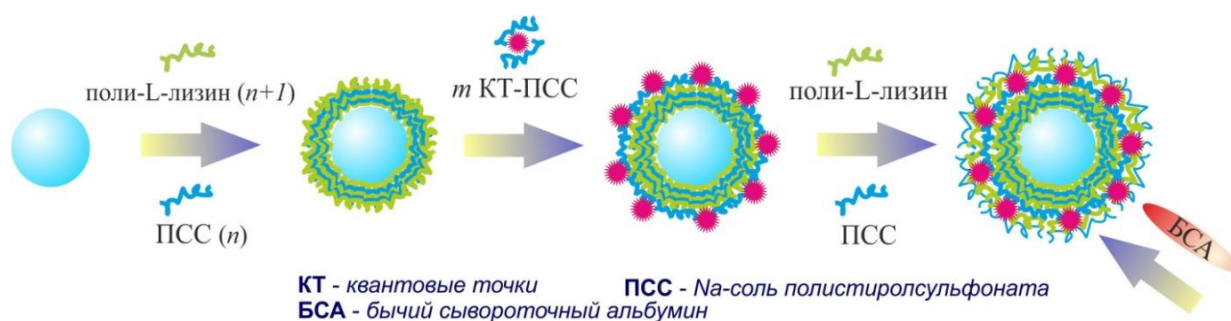


Рисунок 7. Схема получения полиакролеиновых частиц **M1**, содержащих КТ, методом последовательной адсорбции полиэлектролитов.

Для включения КТ в ПЭК их гидрофилизировали, что повышало сродство между полиэлектролитами и исходными гидрофобными КТ. Использовали гидроксид тетраметиламмония (ТМАГ), который способствует переводу НЧ из органической в водную среду с образованием отрицательно заряженных КТ. Для повышения коллоидной устойчивости КТ добавляли ПСС, который выполнял роль не только стабилизатора, но и слоя полиэлектролита, адсорбируемого на поверхность полимерных частиц. На всех стадиях модификации наблюдалось изменение положения максимума эмиссии (Рис. 8а), который, как известно из литературы, указывает на образование новых структур.

Стабилизация с помощью ПСС позволила ввести гидрофилизированные КТ в положительно заряженный слой полиэлектролита на поверхности частиц **M1**. В результате были получены интенсивно флуоресцирующие полимерные частицы (Рис.8б). Концентрацию введенных КТ можно регулировать путем изменения количества слоев, содержащих КТ, и получать требуемую флуоресценцию. Например, добавление КТ в два ПЭК повышает интенсивность флуоресценции более чем в три раза по сравнению с флуоресценцией частиц с

КТ в одном ПЭК. Метод послойной адсорбции также позволяет создавать полимерные частицы с многоцветной флуоресценцией (Рис.8б).

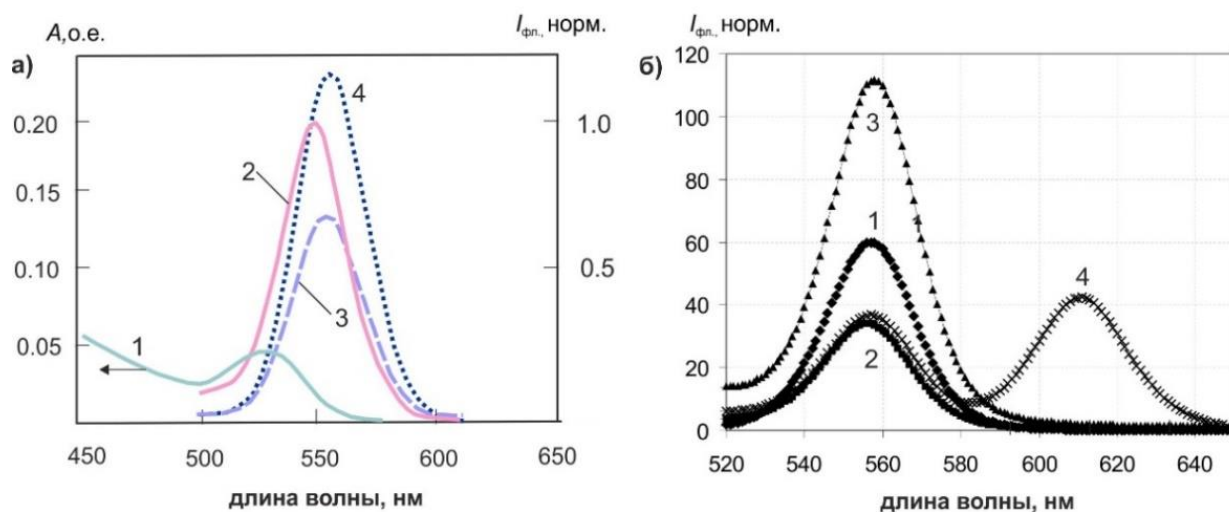


Рисунок 8. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) КТ ($\lambda_{эм} = 550$ нм) в хлороформе, спектры флуоресценции КТ, модифицированных ТМАГ (3), а также ТМАГ и ПСС (4) (а); спектры флуоресценции КТ ($\lambda_{эм} = 550$ нм) с ТМАГ (1), частиц М1, содержащих КТ в одном (2) и в двух слоях полиэлектролита (3), а также частиц М1, содержащих КТ с $\lambda_{эм} = 550$ и 610 нм в различных слоях полиэлектролита (4) (б).

Внешний полиэлектролитный слой определяет необходимые функциональные свойства полимерных частиц для их применения в биоанализе. Например, этот слой может быть образован молекулами белков. Известно, что молекулы белка – слабые полиэлектролиты с характерной изоэлектрической точкой pI . Степень ионизации слабых полиэлектролитов чувствительна к изменению pH , а сильные полиэлектролиты остаются полностью заряженными независимо от pH . Образование комплекса белок–полиэлектролит влияет на заряд белка, конформацию и гибкость цепи белка, плотность заряда и конформацию цепи полиэлектролита. На примерах различных белков показано, что внешняя оболочка, которая формируется за счет комплексообразования полианиона ПСС и белка, определяет интенсивность флуоресценции полимерных микросфер. Характер этого взаимодействия связан с пассивацией поверхности КТ и, как следствие, с уровнем сигнала флуоресценции.

При повышении pH , как известно из литературы, возрастает интенсивность флуоресценции КТ, при этом значительное влияние на такую зависимость оказывает молекула-модификатор поверхности. Были исследованы флуоресцентные свойства КТ после их гидрофилизации при участии ТМАГ и ПСС, а также полимерных частиц, содержащих КТ, в зависимости от pH среды на каждой стадии подготовки. Найдено, что флуоресценция всех образцов

чувствительна к рН в диапазоне 5.3–8.2 с максимальной интенсивностью излучения при рН 8.2.

Таким образом, метод последовательной адсорбции полиэлектролитов на частицы **М1** позволяет ввести КТ в непосредственной близости к поверхности и получить частицы, обладающие рН-чувствительной флуоресценцией.

Оптические биосенсоры для определения ионов меди на основе микроструктур с рН-чувствительной флуоресценцией

Оптический биосенсор на основе полимерных частиц был получен, базируясь на свойстве белковых молекул (на примере БСА) формировать комплексы с ионами металлов и изменять конформацию комплексов полиэлектролит-БСА при добавлении ионов металлов. Эти свойства влияют на пассивацию поверхности КТ, а, следовательно, вызывают изменение флуоресценции КТ.

Методом послойной адсорбции при использовании БСА в качестве внешнего полиэлектролита были получены частицы **М1**, содержащие КТ, которые выступали в качестве биосенсора. Данный биосенсор позволил с высокой чувствительностью и специфичностью детектировать ионы меди (II) по тушению флуоресценции. Видимых изменений флуоресценции при детекции других ионов (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+}) зарегистрировано не было (Рис.9а), даже в случае превышения их концентрации в 100 раз. Этот эффект, вероятно, связан с появлением дефектов при пассивации поверхности КТ полиэлектролитами при образовании комплекса Cu^{2+} -БСА-полианион. Наличие следовых количеств ионов Cu^{2+} в образце приводило к тушению флуоресценции (Рис.9б) без сдвига в красную область, что свидетельствовало об отсутствии агрегатов КТ в ПЭК при добавлении ионов меди.

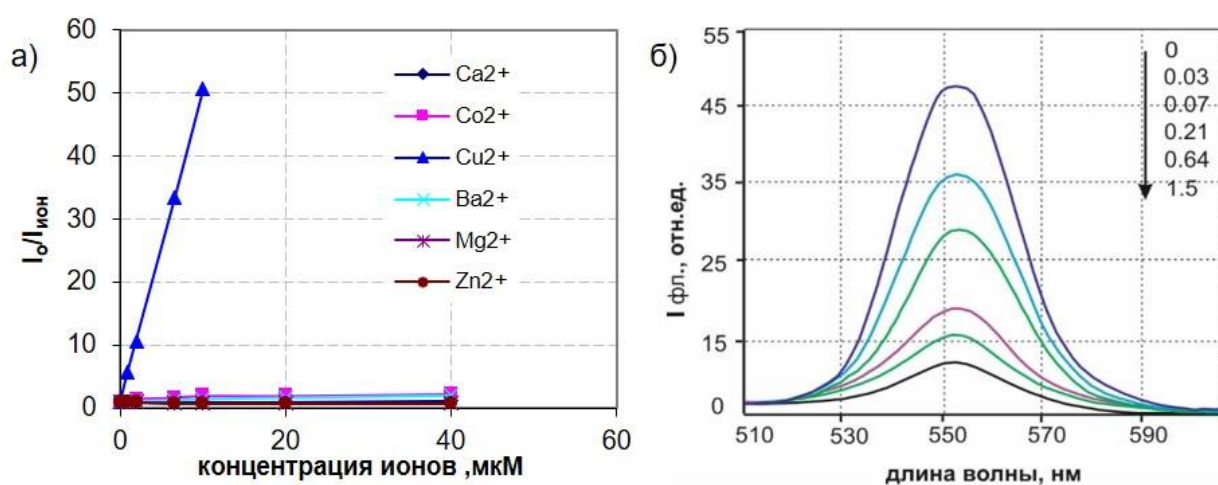


Рисунок 9. Изменение интенсивности флуоресценции $I_0/I_{\text{ион}}$ (I_0 –интенсивность флуоресценции частиц **М1** с внешним слоем БСА, $I_{\text{ион}}$ –интенсивность флуоресценции тех же частиц после добавления ионов) (а); Интенсивность флуоресценции частиц **М1** с внешним слоем БСА, содержащих на поверхности КТ в ПЭК, при добавлении ионов Cu^{2+} (мкМ) (б).

Минимальная детектируемая концентрация Cu^{2+} для данной оптической системы составила 15 нМ/л, что сопоставимо с результатами, полученными для КТ, модифицированными БСА (10 нМ/л).

Микроструктуры с термочувствительной флуоресценцией

Точные измерения температуры, в том числе биологических объектов, с высокой степенью разрешения являются одним из основных направлений современных исследований. В этой связи большой интерес представляет получение микроструктур на основе полимерных частиц, чья флуоресценция зависит от температуры окружения. Такие микроструктуры могут выступать в качестве биосенсоров для фиксации изменения температуры по интенсивности флуоресценции при протекании биореакций. Исходя из поставленной задачи, были получены микроструктуры в виде дисперсий полимерных частиц, состоящих из полимерной матрицы, покрытой термочувствительным полимером с инкапсулированными КТ (Рис.10).

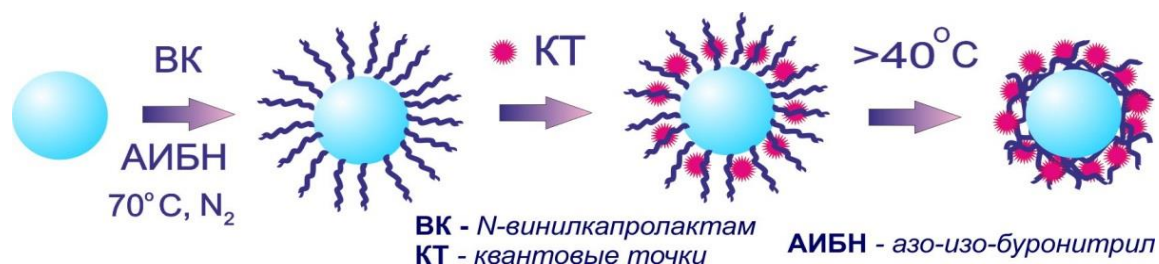


Рисунок 10. Схема получения термочувствительных полимерных частиц на основе частиц **M2** (акролеин-стирол, 10:1) с термочувствительным полимером поли-N-винилкапролактамом на поверхности, в который включены КТ.

Диаметр полимерной частицы в составе микроструктуры задавали в процессе полимеризации, а изменение интенсивности флуоресценции КТ можно было ожидать при изменении расстояния между КТ. Управление расстоянием между КТ реализовали путем введения КТ на поверхность частиц в слой термочувствительного полимера, молекулы которого при нагревании выше нижней критической температуры растворения (НКТР) изменяли свою конформацию за счет удаления связанной воды, что приводило к сжатию полимерного слоя. В качестве полимерной матрицы использовали сополимерные частицы **M2** (акролеин:стирол, 10:1) с диаметром 150 нм. Термочувствительную оболочку из поли-N-винилкапролактама (ПВК) с НКТР ~32°C получали путем радикальной затравочной полимеризации ВК после набухания 1% дисперсии частиц **M2** в 0.2% спиртовом растворе инициатора азо-изо-бутиронитрила и ВК. В этом случае была реализована прививочная полимеризация ВК за счет остаточных двойных связей полиакролеина.

Термочувствительные свойства микроструктур с ПВК оценивали по характеру изменения их гидродинамического радиуса, который постепенно уменьшался при нагревании до 29°C и значительно изменялся при достижении НКТР 32°C, что связано со сжатием слоя ПВК. В микроструктуры включали КТ с максимумом эмиссии на 556 нм. Интенсивность флуоресценции термочувствительных микроструктур почти в четыре раза превосходила интенсивность флуоресценции частиц, которые были получены в п.1.3.1 (Рис.11а). Вероятно, это связано со способностью ПВК более эффективно пассивировать поверхность КТ по сравнению с сополимерными цепями затравочных микросфер. Следует отметить, что повышение температуры выше НКТР приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции термочувствительных микроструктур.

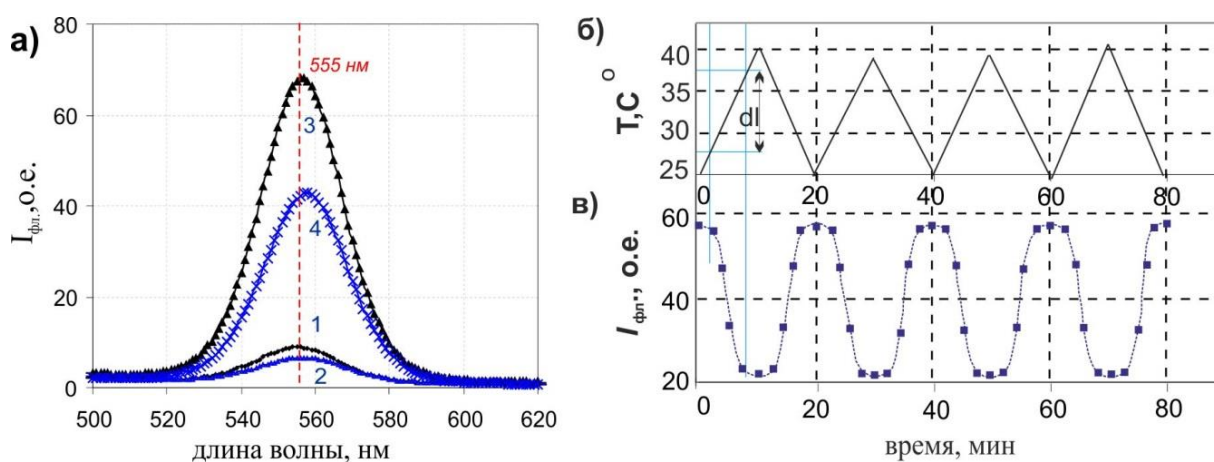


Рисунок 11. Спектры флуоресценции микроструктур на основе частиц **M2** с включенными КТ, немодифицированных ПВК, при 25 (1) и 40°C (2), а также модифицированных ПВК при 25 (3) и 40°C (4) (а); изменение температуры дисперсии микроструктур в циклах нагревание - охлаждение от 25° до 40°C (б) и соответствующие изменения флуоресценции (в).

Флуоресценцию термочувствительных микроструктур исследовали в циклах нагревание–охлаждение в интервале 25–40°C (Рис. 11 б,в). Интенсивность флуоресценции изменялась обратимо, демонстрируя незначительную фотодеградацию в каждом температурном цикле (20 мин), что, вероятно, связано с конформационными изменениями молекул ПВК и, соответственно, варьированию расстояния между включенными КТ.

Применение микроструктур с термочувствительной флуоресценцией в биоанализе

Для использования полученных микроструктур в биоанализе, прежде всего, необходимо подобрать условия получения стабильных конъюгатов, сохраняющих свои флуоресцентные и термочувствительные свойства, при иммобилизации белковых молекул на поверхности частиц. Иммобилизация

может быть осуществлена за счет способности ПВК формировать комплексы с белковыми молекулами посредством образования водородных связей между карбонильной группой ПВК и карбоксильными или аминокеттогруппами белков.

Условия и эффективность иммобилизации оценивали по методу Брэдфорда при использовании модельного белка БСА в концентрациях от 1,6 до 15 мг/г полимера. Насыщение поверхности микроструктур белком происходило при достижении концентрации БСА 10 мг/г полимера с уменьшением интенсивности флуоресценции, а после 10 мг/г видимых изменений флуоресценции не наблюдалось. По-видимому, до насыщения поверхности микроструктур молекулами БСА происходит образование таких комплексов с ПВК, которые ухудшают пассивацию поверхности КТ. Максимальное количество иммобилизованного белка было получено после инкубации частиц с белком при 40°C в течение часа.

Термочувствительные микроструктуры на основе частиц **M2** применяли для мониторинга протекания экзотермических реакций на примере ферментативного гидролиза белка (БСА) в присутствии трипсина и реакции химической сшивки хитозана при участии диглицидилового эфира бутандиола в качестве сшивающего агента в присутствии полиэтиленгликоля. Мониторинг проводили флуориметрически на длине волны возбуждения 488 нм, используя Рис.11б для сопоставления изменения интенсивности флуоресценции со значением температуры. В обоих случаях наблюдали одинаковое изменение температуры, однако, в случае второй реакции интенсивность флуоресценции снижалась в два раза дольше, и, следовательно, реакционная смесь нагревалась сильнее. После завершения реакции охлаждение образцов проходило одинаково, и флуоресценция восстанавливалась до первоначальных значений. Показано, что использование полимерных микроструктур с термочувствительной флуоресценцией позволяет детектировать изменение температуры в микрообъеме в процессе реакции с точностью до $\sim 0.1^\circ\text{C}$.

1.3.3. Гибридные полимерные частицы, содержащие апконвертирующие нанофосфоры

В последнее время большой интерес наряду с КТ вызывают наночастицы с антистоксовой фотолуминесценцией, известные также как апконвертирующие нанофосфоры (НАФ), для возбуждения которых используют спектрально выгодный источник излучения из ближнего ИК-диапазона (975 нм), попадающего в “окно прозрачности” биоткани, что обеспечивает глубокое проникновение света с минимальным поглощением и рассеянием. В этих НЧ реализуется эффект апконверсии, заключающийся в преобразовании излучения из ближнего ИК-диапазона в УФ- и видимый свет за счет протекания

нелинейных оптических процессов. В работе использовали НАФ на основе матрицы тетрафторида натрия, допированной ионами иттербия и эрбия/тулия ($\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ или $\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$) (Рис.12).

НАФ обычно синтезируют в среде органического растворителя с использованием олеиновой кислоты в качестве стабилизатора, что предопределяет их гидрофобные свойства и требует проведения гидрофиллизации для применения в биоанализе. Нами предложен способ, основанный на включении НАФ в частицы полимерных дисперсий.

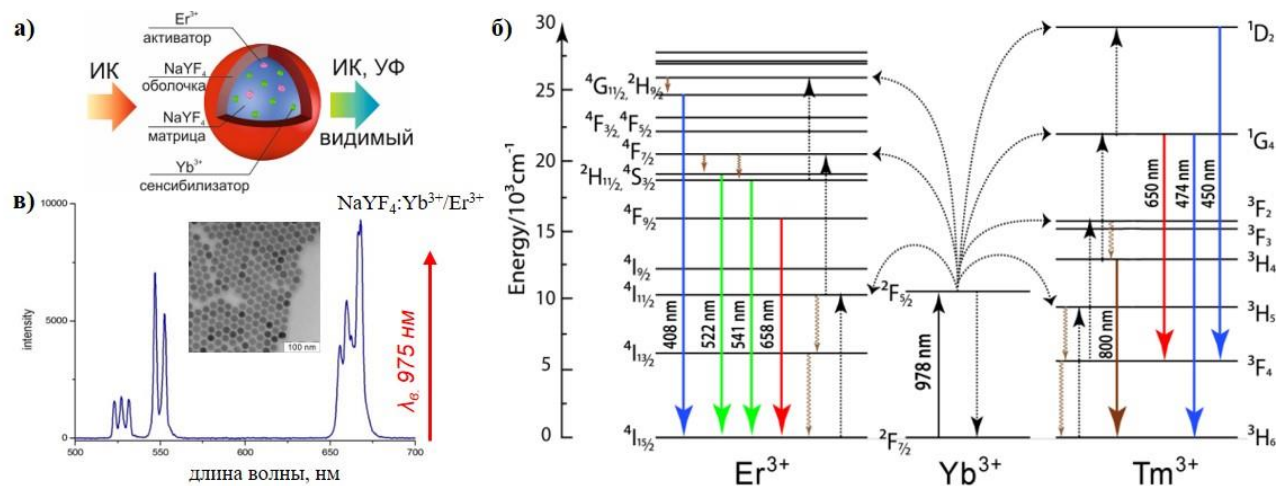


Рисунок 12. Схематическое изображение структуры НАФ (а); Преобразование энергии поглощенного фотона в НАФ происходит посредством сложных многоступенчатых процессов, которые показаны для $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ или $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ (б); Линии излучения в спектрах $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$; на вставке: ПЭМ изображение НАФ (в).

Для включения НАФ в полимерную матрицу предложена концепция синтеза, в которой полимеризацию инициируют гидрофиллизированными НАФ, при этом формируются связи с полимером в процессе полимеризации *in situ*, что дает возможность получить дисперсии гибридных субмикронных полимерных частиц, содержащих хорошо изолированные от внешней среды НАФ. Для этого необходимо обеспечить сродство НАФ к растущим полимерным цепям и поступление НАФ в зону роста полимерных частиц.

Наночастицы $\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ со средним размером 41 ± 3 нм вводили в процессе адаптированного метода осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде (метод М1), в котором использовали гидроксид тетраметиламмония (ТМАГ) в качестве инициатора полимеризации акролеина, поскольку константа основности ТМАГ близка к щелочи (1-ая стадия-полимеризация) (Рис.13). Для повышения химической стабильности полимерных частиц проводили дополнительную реакцию сшивки с использованием персульфата калия, как описано в п. 1.1.1 (2-ая стадия - сшивки).

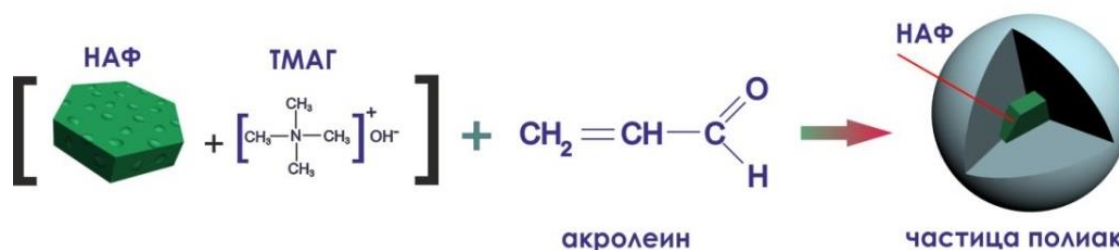


Рисунок 13. Схема осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде в присутствии НАФ и при участии ТМАГ в качестве гидрофилизующего агента и инициатора полимеризации.

Увеличение аффинности между НАФ и зарождающимися цепями полиакролеина было достигнуто путем гидрофизации НАФ с использованием того же соединения, которое выступает в роли инициатора (ТМАГ). ТМАГ способствует переносу из органической в водную фазу благодаря частичному удалению координационно-связанной олеиновой кислоты с поверхности НАФ, что было доказано с помощью метода ИК-Фурье спектроскопии.

В результате проведения двухстадийной полимеризации акролеина **М1** в присутствии НАФ получены коллоидно-стабильные в физиологических условиях (0.15 М NaCl) дисперсии полиакролеиновых микросфер, характеристики которых приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Коллоидно-химические характеристики дисперсий полиакролеиновых частиц **М1**, полученных в присутствии НАФ.

Концентрация НАФ % мас. в расчете на мономер	Диаметр, нм	Выход полимера, %	[Олигомер], мг/мл	[СОН], мкМ/г полимера
0	810	95	0,1	31
0,1	520	88	0,12	40,8
0,25	418	86,4	0,16	43,4
0,5	315	84,5	0,2	49,7
1,0	267	84	0,22	59,8
1,5	265	80	0,25	60,4

Полимеризация акролеина при добавлении НАФ на стадии синтеза может рассматриваться как матричная полимеризация, которая основана на специфических взаимодействиях НАФ (матрицы) с растущими полимерными цепями. Первоначально олигомеры, достигнув критической длины, адсорбируются на поверхности НАФ. Затем продолжается рост олигомеров от поверхности за счет поступления мономера из реакционной среды. ПЭМ изображение (Рис.14а) демонстрирует НАФ, инкапсулированные в объем

микросфер, тем самым подтверждая роль НАФ как матрицы, вокруг которой сформирована полимерная оболочка.

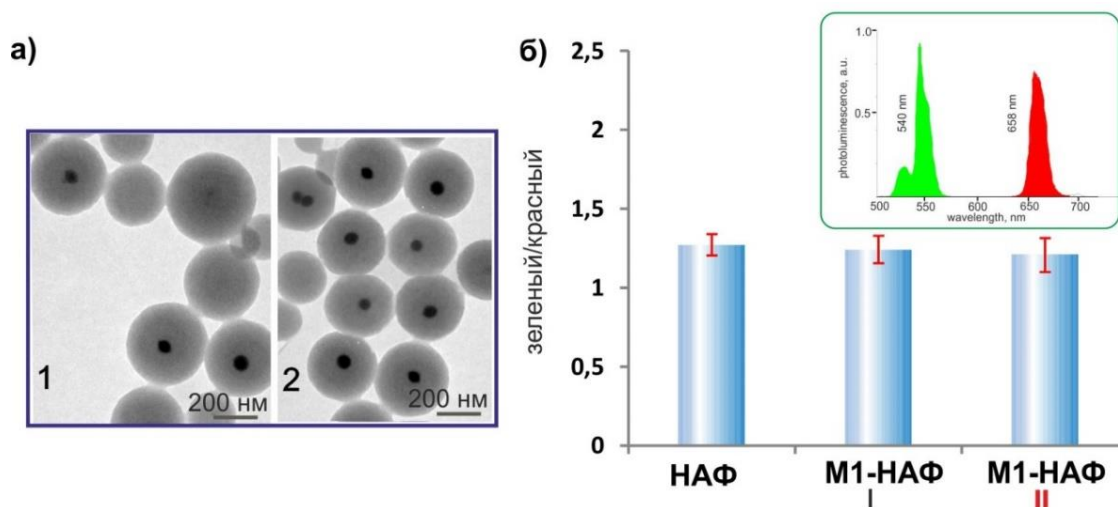


Рисунок 14. ПЭМ-изображение полиакролеиновых частиц **М1**, полученных в присутствии НАФ: 0.25 (1), 1.5 % мас. (2) в расчете на мономер (а); соотношение интенсивностей зеленого и красного максимумов флуоресценции для НАФ и полиакролеиновых микросфер **М1**, содержащих НАФ, после первой (I) и второй (II) стадий полимеризации получено при возбуждении лазером на длине волны 975 нм; интенсивность возбуждения 10 Вт см⁻²; на вставке представлен спектр флуоресценции НАФ в хлороформе (б).

Включение в полимерные микросферы позволяет предохранить флуоресцентные свойства НАФ от внешнего воздействия. В частности, отсутствие изменений в соотношении интенсивностей красного и зеленого максимумов флуоресценции (Рис. 14б) является важным индикатором сохранения флуоресцентных свойств НАФ после их инкапсулирования в полиакролеиновую оболочку.

Таким образом, гибридные полимерные частицы, полученные в присутствии НАФ, являются перспективными функционализированными микроструктурами, которые характеризуются апконвертирующей флуоресценцией и отвечают требованиям их использования в биоанализе и для оптического биоимиджинга.

Применение гибридных НАФ-содержащих частиц для биовизуализации in vivo

Применение дисперсий частиц **М1**, полученных в присутствии НАФ, продемонстрировано в экспериментах *in vivo* на малых животных (мышах). Предварительно, для оценки цитотоксичности полученных образцов был проведен колориметрический МТТ-тест на иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT. Инкубация клеток с **М1-НАФ** вызывала, в среднем, снижение жизнеспособности клеток на 20% или 30% после 24 и 120 часов инкубации, соответственно, по сравнению с контролем. Это означает отсутствие значительных изменений в жизнеспособности клеток.

Для демонстрации прижизненной оценки биораспределения гибридных полимерных частиц **М1**, полученных в присутствии НАФ, в организме мышей использовали оптическую эпифлуоресцентную визуализирующую систему, разработанную во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (Рис.15а).

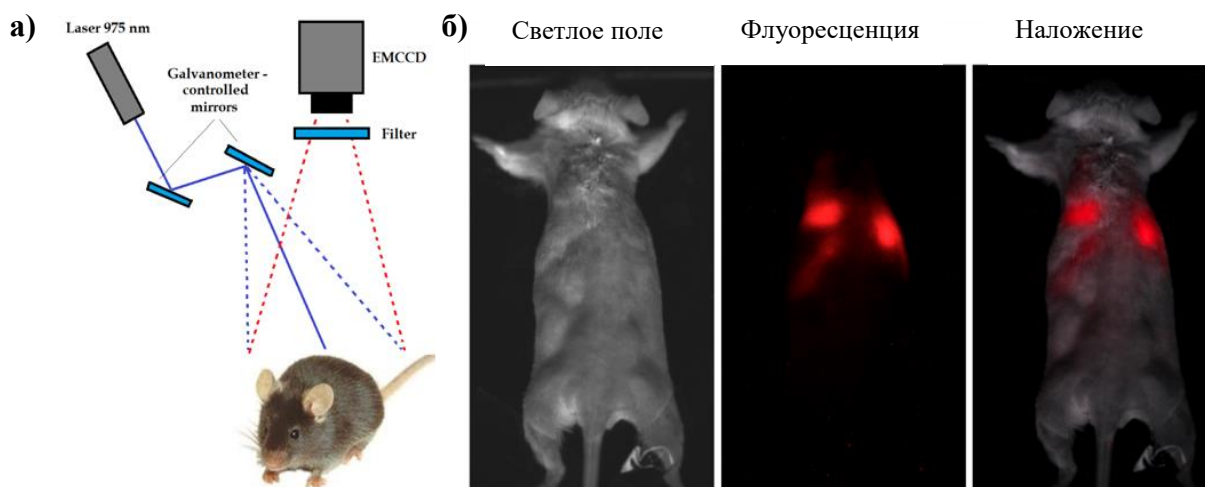


Рисунок 15. Схематическое изображение эпифлуоресцентной системы визуализации (а); фотолюминесцентная визуализация *in vivo* живой мыши через 1 час после внутривенного введения частиц **М1** с НАФ (б).

После внутривенного введения частиц регистрировали распределение флуоресцентного сигнала *in vivo*, а также на выделенных органах. Через 5–10 мин после введения частиц флуоресцентный сигнал появлялся сначала в легких, затем он перераспределялся в печень и селезенку, достигая максимума через 60–80 мин, и исчезал из легких. Слабую флуоресценцию фиксировали через 40–60 мин в почках и органах пищеварения. Наблюдения показали, что в кровеносной системе животных частицы не обнаруживались уже через 20 мин после инъекции (Рис.15б). По данным гистологических и гистохимических экспериментов на выделенных органах животных с использованием стандартных протоколов после введения гибридных частиц существенные патологические изменения в органах отсутствовали. Отмечены лишь незначительные признаки дистрофии и нарушение микроциркуляции.

Таким образом, частицы полиакролеина **М1**, наполненные НАФ *in situ*, являются перспективными микроструктурами для флуоресцентной визуализации биораспределения на уровне живого организма.

2. Наноструктуры на основе апконвертирующих нанофосфоров (НАФ)

2.1. Биофункционализация НАФ с использованием метода замены растворителя

НАФ обладают большими потенциальными возможностями для использования как в качестве визуализирующих меток *in vitro*, так и для *in vivo*

диагностики и терапии, которые в совокупности представляют новую область – тераностику. Это ставит задачу разработки универсального подхода для создания покрытия на поверхности НАФ, которое позволит приготовить биосовместимые наночастицы, одно из измерений которых не превосходит 100 нм. Большие возможности имеет подход, основанный на методе замены растворителя, проводимый без удаления стабилизатора (олеиновой кислоты) с поверхности НАФ и без применения агрессивных реагентов, что позволяет создавать полимерное покрытие, которое, определяя биофункциональность НАФ, предохраняет их от воздействия окружающей среды при сохранении фотофизических свойств наночастиц. Кроме того, полимерное покрытие обеспечивает коллоидную и химическую стабильность дисперсий НАФ в процессе модификации и применения для биомедицинских целей.

Данный метод используют для модификации неорганических НЧ природными или синтетическими полимерами, нерастворимыми или частично растворимыми в воде. НЧ диспергируют в летучем растворителе, смешивают с раствором полимера в том же растворителе, при этом полимерные цепи адсорбируются на поверхности НЧ. Затем смесь переводят в водную среду с образованием на поверхности НЧ полимерной оболочки, нерастворимой в воде за счет действия межмолекулярных сил между полимерными цепями.

Используя данный универсальный метод модификации, получены и охарактеризованы (диаметр, заряд частиц) водные дисперсии НАФ с покрытиями из полимеров, наиболее часто применяемых для целей биофункционализации: чередующегося сополимера малеинового ангидрида и 1-октадецена (НАФ-ПМАО), полиэтиленimina (НАФ-ПЭИ), поли(D, L-лактида) (НАФ-ПЛА) и сополимера лактида с гликолидом (НАФ-ПЛГ), а также с двуслойным покрытием из ПЭИ (1 слой) и Na-соль сульфата декстрана (ДС) (2 слой) (Рис.16).

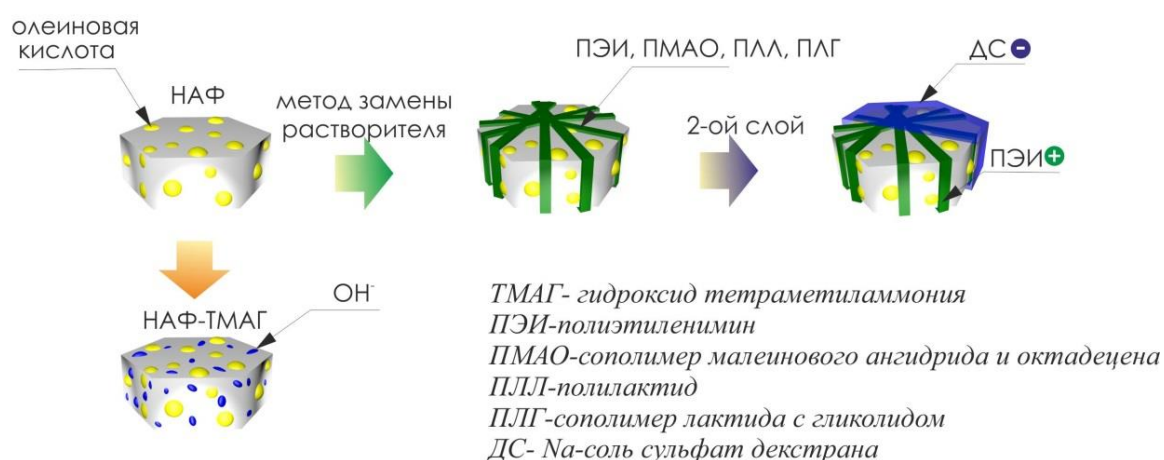


Рисунок 16. Схема модификации НАФ с использованием различных полимеров.

В качестве контроля были выбраны НАФ, гидрофилизированные с использованием ТМАГ, в которых отсутствие полимерного покрытия позволяло их рассматривать, как водные дисперсии исходных НАФ (после синтеза) и оценить собственную цитотоксичность НАФ.

2.1.1. Цитотоксические свойства биофункционализированных НАФ

Несмотря на большое количество исследований цитотоксичности НАФ, в литературе отсутствуют данные о влиянии НАФ без покрытия на жизнеспособность клеток. Кроме того, оценку выживаемости клеток обычно проводят на раковых клеточных линиях, которые, как известно, характеризуются высокой устойчивостью к цитотоксическим воздействиям. Следует также отметить, что практически отсутствуют данные о действии НАФ на клетки кожи, хотя НАФ имеют очевидные преимущества для диагностики и терапии кожных заболеваний, поскольку глубина визуализации с помощью НАФ была оценена на уровне ~ 500 мкм, что соответствует толщине кожи человека.

В данной работе исследование цитотоксических свойств гидрофилизированных НАФ проводили по МТТ-тесту и неспецифическому захвату НАФ двумя типами клеток кожи человека: кератиноцитами HaCaT и фибробластами. МТТ ставили после инкубации обоих типов клеток с НАФ, взятыми с концентрациями в диапазоне от 0 (контроль) до 125 мкг/мл в течение 24 часов при 37°C (Рис.17а).

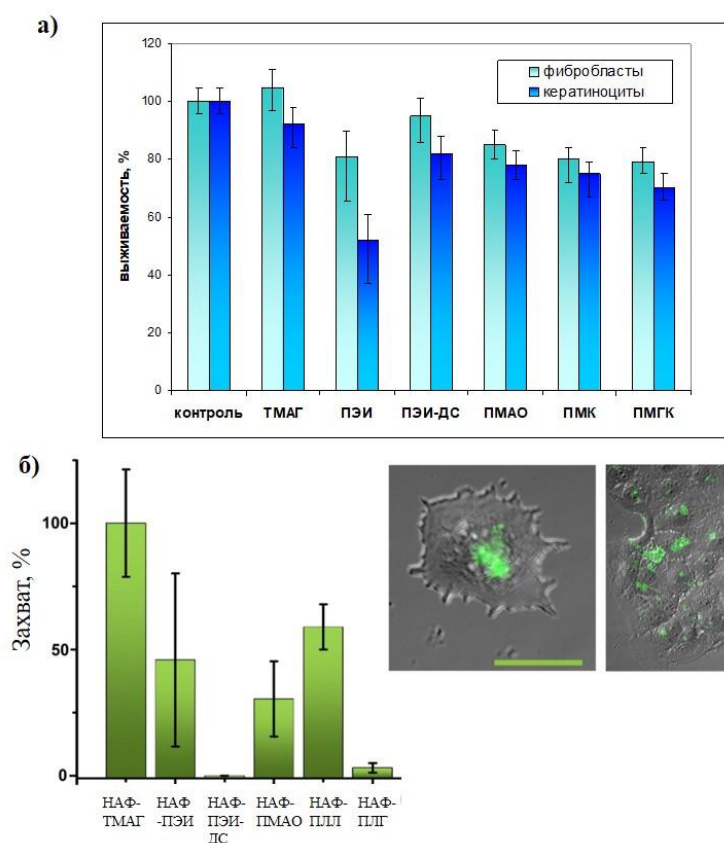


Рисунок 17. Гистограммы распределения выживаемости дермальных фибробластов и кератиноцитов человека (HaCaT), культивированных с [НАФ] 125 мкг/мл в течение 24ч (а); Неспецифический захват образцов НАФ кера-тиноцитами (HaCaT) через 24 ч после инкубации. Норми-рованное значение захвата, представленное как средний сигнал интенсивности флуоресценции/площадь, (НАФ-ТМАГ 100%). [НАФ] 125 мкг/мл. Вставка: наложение изображений светлого поля и конфокального флуоресцентного сигнала отдельной клетки и монослоя клеток после инкубации с НАФ-ТМАГ (б). Контроль: клетки без инкубации с НАФ (100%).

Эксперименты продемонстрировали, что все образцы НАФ, приготовленные с различными полимерными покрытиями, в диапазоне концентраций от 62,5 до 125 мкг/мл оказывали незначительный цитотоксический эффект на жизнеспособность дермальных фибробластов человека (Рис.17а). Кератиноциты HaCaT в зависимости от покрытия НАФ имели разную выживаемость. В случае НАФ без покрытия (НАФ-ТМАГ) не отмечено цитотоксического эффекта для концентрации 62,5 мкг/мл и слабое проявление токсичности при 125 мкг/мл. Наименьшую цитотоксичность проявляли образцы НАФ, модифицированные ПЛЛ и ПМАО, а существенное снижение выживаемости клеток зарегистрировано в случае использования НАФ-ПЭИ.

При исследовании захвата НЧ кератиноцитами HaCaT максимальное включение было зафиксировано для НАФ-ТМАГ, но без специфической локализации. Наблюдалась очевидная интернализация у НАФ-ПЛЛ (59%), НАФ-ПЭИ (46%) и НАФ-ПМАО (30%) (Рис.17б).

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют большие возможности биофункционализации НАФ с использованием метода замены растворителя, который позволяет получать биосовместимые наночастицы, пригодные для тераностического применения в области дерматологии при правильном выборе материала поверхностного покрытия НАФ, заряда, размера и дозировки материала.

2.2. Визуализация клеточных рецепторов с использованием наноструктур на основе НАФ

2.2.1. Биофункционализация НАФ с использованием амфифильных полимеров

Наиболее перспективными молекулами-модификаторами при использовании метода замены растворителя являются амфифильные полимеры, которые способны экспонировать гидрофильные сегменты в водную дисперсионную среду, а гидрофобные – в липофильную фазу. В результате происходит снижение поверхностного натяжения, и полимер стабилизирует НЧ, проявляя себя, как поверхностно-активное соединение. В настоящей работе в качестве амфифильного полимера использовали чередующийся сополимер малеинового ангидрида и октадецена (ПМАО). Модификация поверхности НАФ происходила за счет гидрофобных взаимодействий молекул стабилизатора (олеиновой кислоты) и гидрофобных участков ПМАО (октадецена), а в результате гидролиза ангидридных групп в водной среде на поверхности НАФ формировались карбоксильные группы.

Оптимизировали условия проведения модификации и результат подтверждали методом ИК-Фурье спектроскопии. Молекулы ПМАО формировали на поверхности НАФ супрамолекулярную структуру в виде тонкого слоя низкой электронной плотности практически без изменения диаметра исходных частиц НАФ (Рис.18). НАФ-ПМАО характеризовались коллоидной стабильностью в воде и буферных растворах, что подтверждается значением дзета-потенциала, которое составило -41,5 мВ.

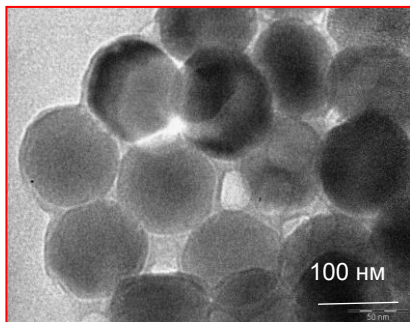


Рисунок 18. ПЭМ-изображение ПМАО-модифицированных НАФ.

После модификации сохранялась высокая интенсивность флуоресценции НАФ-ПМАО без изменения соотношения зеленого и красного пиков в спектре НАФ.

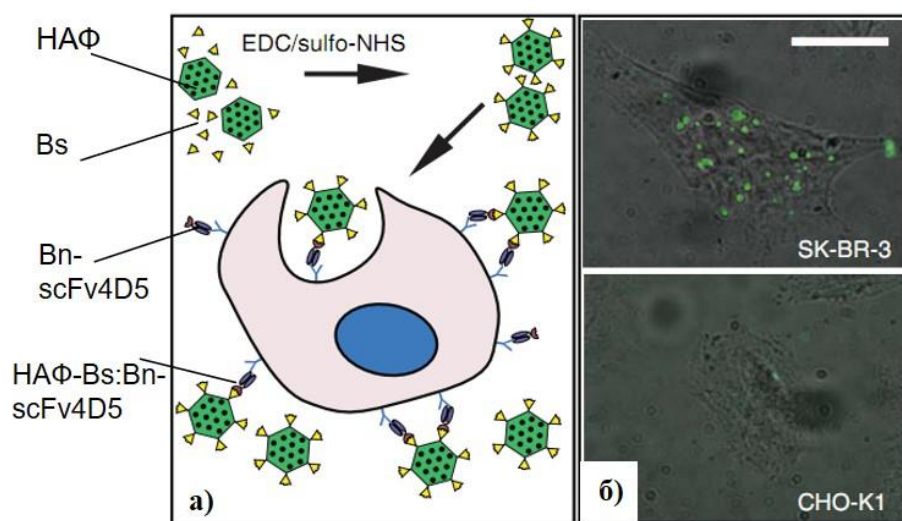
Таким образом, покрытие из амфифильного полимера, практически, не влияет на флуоресцентные свойства наночастиц, предохраняет от действия окружающей среды и создает функционализированное покрытие, необходимое для биоприложений.

2.2.2. Специфическая визуализация клеточных рецепторов с использованием НАФ-ПМАО

НАФ-ПМАО применяли для адресной доставки к раковым клеткам, которые гиперэкспрессируют специфической рецептор HER2/neu. Связывание НАФ-ПМАО с поверхностью клеток осуществляли с использованием высокоаффинной молекулярной пары барназа:барстар. Первый модуль в виде наноструктуры был получен путем конъюгации НАФ-ПМАО с барстаром, а барназа была включена в состав другого модуля, который содержал рекомбинантное мини-антитело scFv4D5 против HER2/neu.

Специфическую реакцию визуализации при участии наноструктур НАФ проводили на линии клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu. В качестве отрицательного контроля использовали клетки CHO-K1, у которых отсутствует значимое количество HER2/neu. Обе клеточные линии инкубировали с модулем барназа-scFv4D5 для связывания с HER2/neu через взаимодействие антитело–рецептор для иммобилизации барназы на поверхности клеток. Затем инкубировали с

наноструктурой НАФ-ПМАО-барстар для реализации высокоаффинного взаимодействия модуля барназа-барстар (Рис.19а).



Bs-барстар; Bn-барназа; EDC-карбодимид; sulfo-NHS-гидроксисульфосукцинимид

Рисунок 19. Схема визуализации клеток с помощью модулей наноструктура НАФ-барстар и барназа-scFv4D5 (а); Изображения с эпифлуоресцентного микроскопа линии клеток SK-BR-3 и CHO, меченных модулем наноструктура НАФ-барстар и барназа-scFv4D5. Шкала 20 мкм (б).

Анализ изображений клеток, обработанных наноструктурами НАФ-барстар после предварительной инкубации клеток с модулем барназа-scFv4D, с использованием эпифлуоресцентной микроскопии при возбуждении светом с длиной волны 975 нм показал, что на клетках SK-BR-3 регистрируется сигнал, почти в 10 раз превосходящий сигнал на контрольных клетках CHO-K1 (Рис.19б). Интегральный флуоресцентный контраст визуализации клеток линии SK-BR-3 по отношению к CHO-K1 был оценен на уровне 20:1, что является значимым результатом при адресной доставке к клеткам.

Моделирование визуализации раковой опухоли при участии наноструктур НАФ

Интенсивный сигнал от наноструктур при маркировании клеток явился основанием для моделирования визуализации клеток в биоткани, используя фантомы биоткани, которые служат моделью ткани с оптическими свойствами, аналогичными свойствам реального объекта. С этой целью был создан фантом биоткани на основе геля из агарозы, который имитирует оптическое поглощение и рассеяние ткани молочной железы человека в спектральном диапазоне возбуждения и излучения НАФ (Рис.20а). Для достижения светорассеяния фантома, соответствующего ткани молочной железы, в гель агарозы добавляли субмикронные частицы TiO₂. Важным фактором является согласование рассеяния в живой ткани и фантоме на длине волны 978 нм, поскольку в данной

модели, в первую очередь, рассеяние света на длине волны 978 нм определяет затухание сигнала флуоресценции на глубине.

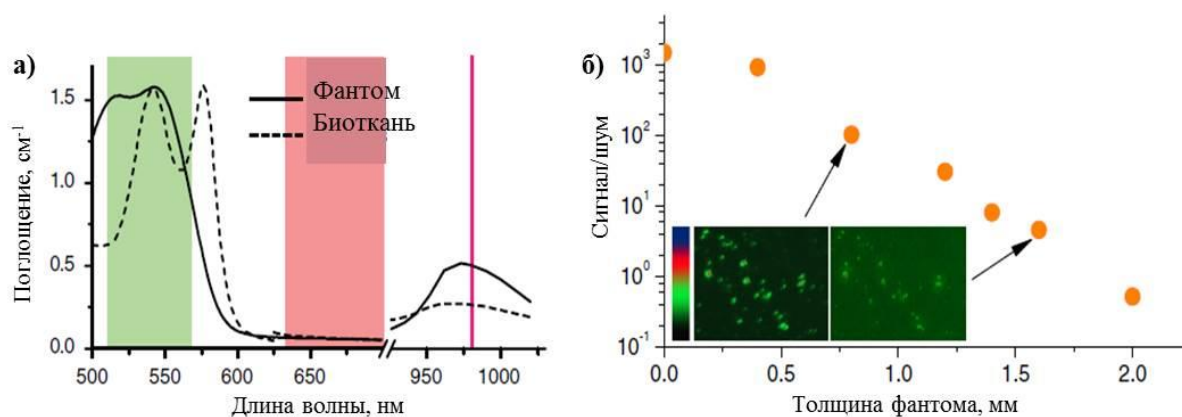


Рисунок 20. Спектр поглощения фантома в спектральном диапазоне возбуждения и флуоресценции НАФ (сплошная линия) и биоткани (пунктирная линия). Флуоресценция НАФ в видимой и ближней ИК-областях спектра показаны в виде окрашенных областей, а также показана линия возбуждения на 975 нм (а); Визуализация клеток SK-BR-3, меченных наноструктурой НАФ, через фантом биоткани при интенсивности возбуждения 100 Вт/см². На вставке: изображение клеток SK-BR-3 через фантомные пленки толщиной 0,8 и 1,6 мм, стрелки указывают на соответствующие точки на графике (б).

Готовили пленки фантомного материала (от 0,4 до 1,4 мм), которые укладывали между объективом эпилюминесцентного микроскопа и образцом клеток, меченых наноструктурами НАФ, приготовленных на стекле. Найдено, что глубина визуализации клеток под пленками фантома составила 1,6 мм (Рис.20б). Оценили, что на одну клетку SK-BR приходится 2.8×10^4 специфически связанных наноструктур НАФ.

Проведенные исследования демонстрируют значительный потенциал наноструктур НАФ для оптической визуализации патологических тканей, в том числе, для ранней диагностики рака и визуализации границ опухоли при хирургическом вмешательстве.

2.3. Оптическая визуализация раковой опухоли *in vivo*

2.3.1. Получение ПЭГ-содержащих наноструктур НАФ

Оптическая визуализация на уровне живого организма (биоимиджинг) с использованием флуорофоров, играет важную роль в медико-биологических исследованиях, поскольку позволяет проводить неинвазивную раннюю диагностику, наблюдение и терапию патологически измененных тканей, в частности, раковых опухолей. НАФ относятся к таким флуорофорам благодаря попаданию их длины волны возбуждения флуоресценции в «окно прозрачности» биоткани. Накопление НАФ в опухолевой ткани при внутривенном введении для ее последующей визуализации может протекать по пассивному механизму за счет эффекта увеличенного проникновения и удержания (англ. enhanced permeability and retention effect, EPR-эффект). Этот эффект связан с аномальной

структурой сосудов и слабым лимфодренажем. Доставка в опухоль в этом случае непосредственно определяется временем циркуляции наночастиц в кровеносной системе. На продолжительность циркуляции НАФ влияет диаметр (предпочтительно в диапазоне 10-150 нм), заряд, коллоидная стабильность, а также природа поверхности. Первостепенное значение имеет минимальный уровень неспецифического связывания поверхности НАФ с белками крови. Из литературы известно, что такая поверхность может быть организована из полиэтиленгликоля (ПЭГ).

В данной работе для создания НАФ, эффективно циркулирующих в кровотоке, была сформирована оболочка из ПЭГ-молекул на поверхности частиц при участии недорогого, коммерчески доступного сшивающего агента диглицидилового эфира полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ). Этот подход не требует использования дорогостоящих функционализированных производных ПЭГ или ПЭГ-содержащих сополимеров, полученных с использованием сложных синтетических процедур.

Использовали НАФ со структурой «ядро/оболочка», допированные ионами тулия ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}@\text{NaYF}_4$), со средним диаметром частиц 75 нм и гидрофилизированные при участии амфифильного сополимера ПМАО. Затем проводили реакцию сшивки с ПЭГ-ДГЭ в концентрациях 0,1 и 0,6 мг/мл. Сшивка проходила за счет реакции между карбоксильной группой ПМАО и эпоксидной группой ПЭГ-ДГЭ. В результате олигомерные цепи ПЭГ были включены в оболочку на поверхности НАФ (Рис.21а), что подтверждали ИК-Фурье спектроскопией. Полученные данные позволили сделать вывод, что в реакции сшивки принимают участие как карбоксильные группы, так и негидролизированные группы малеинового ангидрида, скрытые от воды гидрофобными цепями октадецена.

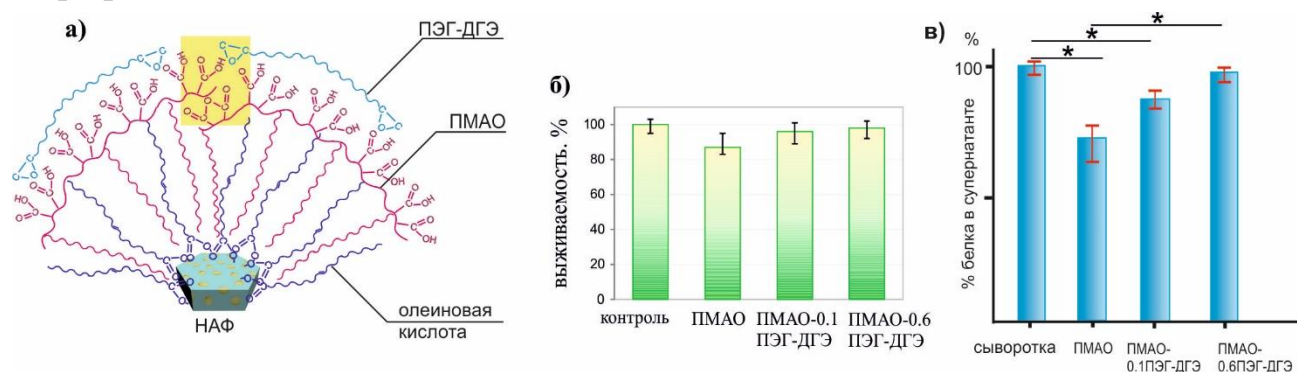


Рисунок 21. Схема модификации НАФ с использованием ПМАО и последующей реакцией сшивки при участии ПЭГ-ДГЭ (а); Выживаемость дермальных фибробластов по результатам проточной цитометрии (б); содержание белка (%) в чистой сыворотке и сыворотке после инкубации и центрифугирования с НАФ, модифицированными ПМАО и ПМАО с ПЭГ-ДГЭ в концентрациях 0,1 и 0,6 мг/мл (в).

Увеличение концентрации ПЭГ-ДГЭ приводило к более узкому распределению НАФ по размерам, уменьшению среднего диаметра, снижению дзета-потенциала. Полученные наноструктуры НАФ сохраняли коллоидную стабильность в течение более 2 месяцев и не подвергались воздействию электролитов. Спектры флуоресценции наноструктур НАФ ПЭГ-ДГЭ не претерпевали изменений в физиологическом диапазоне pH (от 6 до 8).

Исследование цитотоксичности проводили по оценке жизнеспособности дермальных фибробластов человека, инкубированных с НАФ-ПЭГ-ДГЭ в концентрации 0,1 мг/мл в течение 24 ч при 37°C, методом проточной цитометрии. Найдено, что жизнеспособность фибробластов практически не изменилась при инкубации всех образцов в тестируемой концентрации (Рис.21б).

Важной характеристикой наноструктур является их длительное время циркуляции в крови, которое непосредственно связано с низкой неспецифической адсорбцией белков крови. Для исследования адсорбционной способности образцов НАФ их диспергировали в разведенной сыворотке мыши и инкубировали при 37°C в течение часа. Затем образцы осаждали центрифугированием и определяли в надосадочной жидкости количество неадсорбированных сывороточных белков с использованием метода Брэдфорда. Показано, что происходит уменьшение количества белка в сыворотке после инкубации с НАФ без ПЭГ-покрытия по сравнению с чистой сывороткой. При увеличении концентрации ПЭГ-ДГЭ концентрация белка в супернатанте возрастала и, следовательно, меньшее количество белка адсорбировалось на поверхности наноструктур (Рис.21в). После инкубации в сыворотке распределение частиц НАФ-ПЭГ-ДГЭ по размеру при всех концентрациях сшивающего агента практически не изменялось, и агрегаты не формировались. Таким образом, ПЭГ-содержащий сшивающий агент предотвращает адсорбцию белка и обеспечивает стерическую стабилизацию НАФ-ПМАО.

2.3.2. Визуализация раковой опухоли при пассивной доставке наноструктур

Время циркуляции наноструктур НАФ в кровеносной системе малых животных определяли посредством забора образцов крови из хвостовой вены через определенные интервалы времени после внутривенного введения наноструктур в мышью Valb/c. Рис. 22б иллюстрирует распределение наноструктур НАФ в образцах крови, а Рис.22а - зависимость количества НАФ в кровеносной системе от времени циркуляции, полученную путем прямого подсчета НАФ на изображениях, полученных с использованием антистоксового флуоресцентного микроскопа, разработанного во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника».

Модификация НАФ-ПМАО при участии 0,1 мг/мл ПЭГ-ДГЭ привела к снижению времени выведения наноструктур из системы кровообращения почти в три раза. При концентрации 0,6 мг/мл ПЭГ-ДГЭ время циркуляции увеличилось до 60 минут (Рис.22а). Следует отметить, что отдельные НЧ детектировали в образцах крови в течение всего периода наблюдения (до 180 мин). Таким образом, при использовании высокой концентрации (0.6 мг/мл) сшивающего агента на поверхности НЧ формировалась ПЭГ-содержащая оболочка со свойствами, необходимыми для их длительного кровообращения.

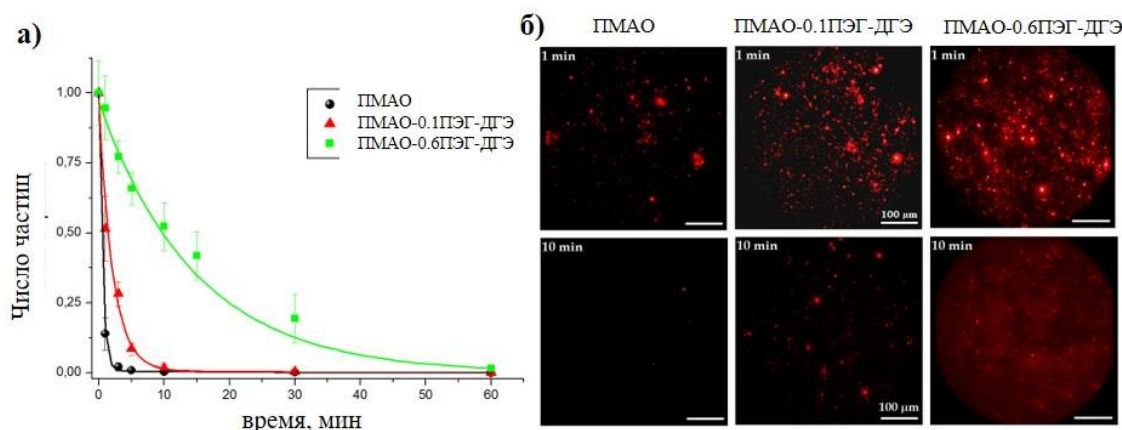


Рисунок 22. Нормированная зависимость количества НАФ-ПМАО и НАФ-ПМАО с [ПЭГ-ДГЭ] 0,1 и 0,6 мг/мл от времени кровообращения. Данные получены от 15 мышей (а); Флуоресцентные изображения образцов крови мышей, взятые с интервалами 1 и 10 минут после введения образцов НАФ (б).

Проведенные эксперименты показали, что увеличение времени циркуляции наноструктур в крови способствует их пассивному накоплению в солидных опухолях. При продолжительной циркуляции НЧ проникают в опухолевую ткань преимущественно через особую высокопроницаемую сосудистую сетку опухоли и остаются в ней из-за слабого лимфодренажа, что лежит в основе EPR-эффекта. Для оценки распределения наноструктур НАФ в опухоли на основе EPR-эффекта использовали специально разработанную эпилюминесцентную систему визуализации (см.п.1.3.3). Сигнал от наноструктур анализировали после их внутривенного введения в ретроорбитальный синус мышей с перевитой карциномой легкого Льюиса (LLC) (Рис.23). Следует отметить, что острой системной токсичности и аллергических реакций зарегистрировано не было. Флуоресценцию детектировали в опухоли через 1 мин после инъекции, затем свечение в ней уменьшалось. Через 5 мин сигнал начинал усиливаться в опухоли по сравнению с другими тканями и достигал максимума через 1 час после инъекции, который сохранялся в течение 2 дней. Такой эффект был отмечен у всех наноструктур НАФ.

Найдено, что наноструктуры в основном накапливаются на периферии опухоли (Рис.23а), правое изображение на вставке), где увеличена плотность

кровеносных сосудов, связанных с EPR-эффектом. 3D-реконструкция флуоресцентного сигнала позволяет оценить накопление наноструктур в опухоли в зависимости от покрытия НАФ (Рис.23б). Для НАФ-ПМАО с наибольшей концентрацией ПЭГ-ДГЭ (0,6 мг/мл) получен максимальный сигнал, однородно распределенный в патологической ткани.

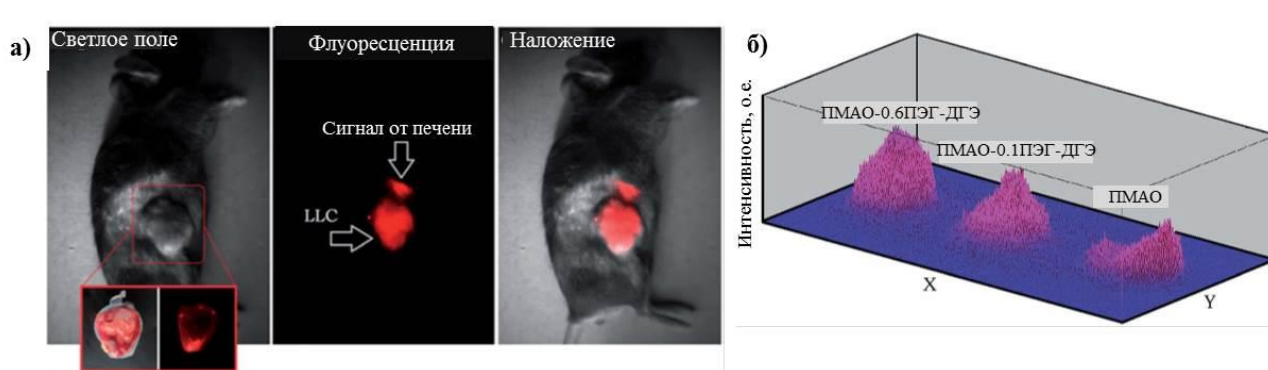


Рисунок 23. Доставка НАФ–ПМАО–ПЭГ–ДГЭ (0.6 мг/мл) в карциному легкого Льюиса (LLC) за счет EPR-эффекта. Изображения *in vivo* сделаны через 1 ч после инъекции. На вставке: эпифлуоресцентное изображение среза опухоли *ex vivo* (а); 3D-реконструкция эпифлуоресцентного сигнала для НАФ-ПМАО с 0, 0.1, 0.6 мг/мл ПЭГ-ДГЭ (б).

Таким образом, биофункционализация методом замены растворителя при использовании амфифильного полимера ПМАО с последующим созданием ПЭГ-покрытия позволяет получать коллоидно-стабильные в водной среде наноструктуры НАФ. Эти структуры характеризуются значительным увеличением времени циркуляции в организме мышей (до 1 часа), что приводит к эффективной доставке и накоплению НАФ в опухоли за счет EPR-эффекта.

2.4. Фотодинамическая терапия с использованием наноструктур на основе НАФ

Одним из современных, перспективных и малоинвазивных методов разрушения раковых опухолей является фотодинамическая терапия (ФДТ). ФДТ используют для лечения раковых опухолей под действием света совместно с применением фотосенсибилизаторов, генерирующих активные формы кислорода, которые вызывают гибель злокачественных клеток. Несмотря на целый ряд преимуществ ФДТ, в некоторых случаях отмечается воздействие только на поверхностные ткани, недостаточная селективность, относительно высокая темновая фототоксичность, поэтому стоит задача как поиска новых фотосенсибилизаторов, так и разработки новых подходов для проведения ФДТ.

Одним из перспективных соединений для использования в качестве фотосенсибилизатора является рибофлавин (витамин В2), который имеет эндогенную природу и способен генерировать активные формы кислорода под

действием УФ- и видимого света. Рибофлавин является нетоксичным продуктом, а в сочетании с фототоксичностью и способностью накапливаться в раковых клетках он представляет пример перспективного фотосенсибилизатора. Однако фотоактивация рибофлавина невозможна на глубине биоткани, поскольку ее высокое поглощение в УФ-видимом диапазоне не позволяет подвести свет возбуждения рибофлавина. Решение этой проблемы стало возможным при создании наноструктур с НАФ, которые способны конвертировать глубоко проникающий ближний ИК-свет на длине волны 975 нм в свет из УФ-видимого диапазона, необходимый для возбуждения рибофлавина для проведения ФДТ.

На первом этапе работы исследовали фотофизические и фототоксические свойства рибофлавина в его водорастворимой форме флавиномононуклеотида (ФМН) с использованием клеточных культур и живых лабораторных животных. Фотоцитотоксическое действие ФМН реализуется преимущественно за счет фотогенерации синглетного кислорода. На Рис.24а показаны результаты МТТ-теста для оценки жизнеспособности клеток линии SK-BR-3 и контрольных клеток CHO после их инкубации с ФМН и воздействия света с длиной волны 365 нм. При концентрации ФМН 30 мкМ в культуральной среде жизнеспособность клеток SK-BR-3 упала до $47 \pm 7\%$. Вероятно, что 30 мкМ ФМН в среде для инкубации клеток, является концентрацией, которая может вызвать гибель клеток SK-BR-3 без воздействия на окружающие ткани, представленные в эксперименте контрольными клетками CHO. Этот эффект может быть связан с усиленным захватом ФМН клетками SK-BR-3 по сравнению с клетками CHO и фибробластами (Рис.24б). Анализ клеток методом микроскопии через 2ч после воздействия света выявил разрушение клеточных мембран клеток SK-BR-3 в виде пузырьков на поверхности (Рис.24в).

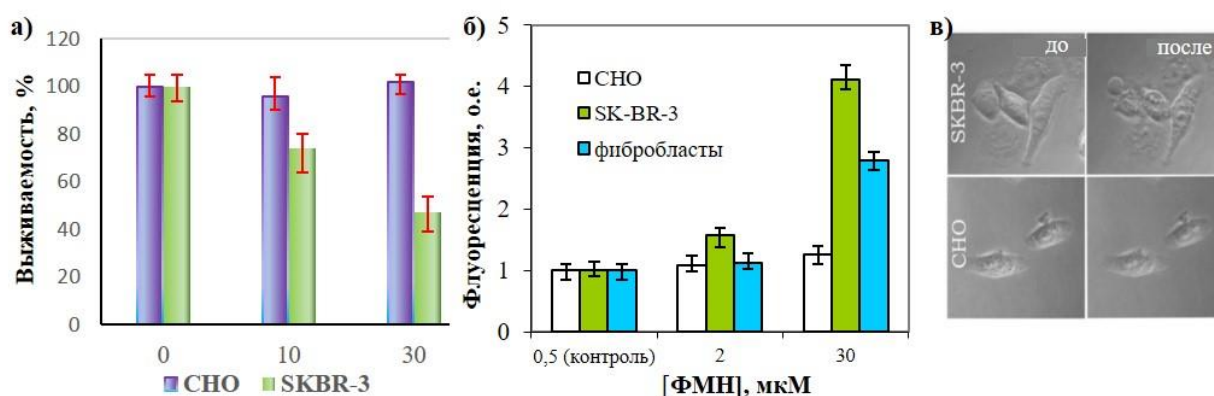


Рисунок 24. Результаты МТТ-теста клеток после инкубации в течение 90 мин с последующим облучением светом 365нм в дозе 4,2Дж/см². [ФМН]: 0, 10, 30 мкМ (а); Интенсивность флуоресценции ФМН ([ФМН]: 0,5, 2 и 30 мкМ) демонстрирует накопление ФМН линиями клеток: CHO, SK-BR-3 и фибробласты (б); Фазово-контрастные изображения клеток SK-BR-3 и CHO, инкубированных с 30 мкМ рибофлавина, до (слева) и через 2 часа после (справа) 10-минутного светового облучения светом 365 нм (в).

Эксперименты по определению механизма гибели клеток, предварительно инкубированных с ФМН в течение 6, 12, 24 часов, проводили методом проточной цитофлуориметрии по анализу активности каспазы-3. Повышенный уровень активной каспазы-3 у клеток после процедуры ФДТ свидетельствовал, что апоптоз является наиболее вероятным механизмом гибели клеток.

Сравнение сигналов флуоресценции ФМН в опухоли у мышей с перевитым раком легких Льюиса через 12 часов после внутривенного введения и растворе ФМН известной концентрации дало возможность оценить концентрацию ФМН в опухоли, которая составила не менее 60 мкМ с контрастом ~ 5 по отношению к подкожной ткани. Такой высокий контраст приемлем для ФДТ, что позволит селективно воздействовать на раковую опухоль с минимальным фототоксичным эффектом по отношению к нормальным тканям.

Ограниченная глубина проникновения света является одной из проблем ФДТ. Это стимулировало разработку новых подходов к ФДТ с использованием источников возбуждения из ближнего ИК-диапазона, где поглощение биологической ткани минимально. В данной работе для фотосенсибилизации ФМН использовали НАФ, которые способны к преобразованию ближнего ИК-света в УФ- и видимый свет на глубине биоткани до 1 см. Две полосы дублетов в УФ-синем диапазоне спектра фотолюминесценции (Рис. 25а) попадают в полосу поглощения ФМН, что делает возможным создание донорно-акцепторной пары НАФ-ФМН, в которой реализуется резонансная передача энергии. Для реализации эффективной безызлучательной передачи энергии (FRET процесс) молекулы ФМН должны быть удалены от излучающих ионов (Tm^{3+}) в НАФ не более, чем на 10 нм. Такая возможность была создана в наноструктурах НАФ-ФМН, в которых НАФ гидрофилизировали методом замены растворителя при участии ТМАГ (см. п.1.3.3). В этом случае поверхность НАФ была доступна для небольших молекул ФМН. Для коллоидной стабильности наноструктур НАФ-ТМАГ-ФМН в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo* добавляли полимерный стабилизатор поли-N-винилпирролидон (ПВП), выполняющий также функцию защитной оболочки.

Исследование процесса передачи энергии в донорно-акцепторной паре НАФ-ФМН, проводили при двух концентрациях ФМН и облучении светом с длиной волны 975 нм. Широкополосный сигнал флуоресценции от 500 до 620 нм и снижение интенсивности полос в УФ-видимом диапазоне спектра НАФ указывало на FRET-процесс между НАФ и ФМН (Рис.25б). Фототоксическое действие пары НАФ-ФМН было продемонстрировано на линии клеток SK-BR-3 *in vitro* при облучении светом с длиной волны 975 нм в присутствии йодида пропидия. Появление флуоресценции в красном канале указывает на гибель

клеток в результате разрушения клеточных мембран под действием активных форм кислорода (Рис.25в).

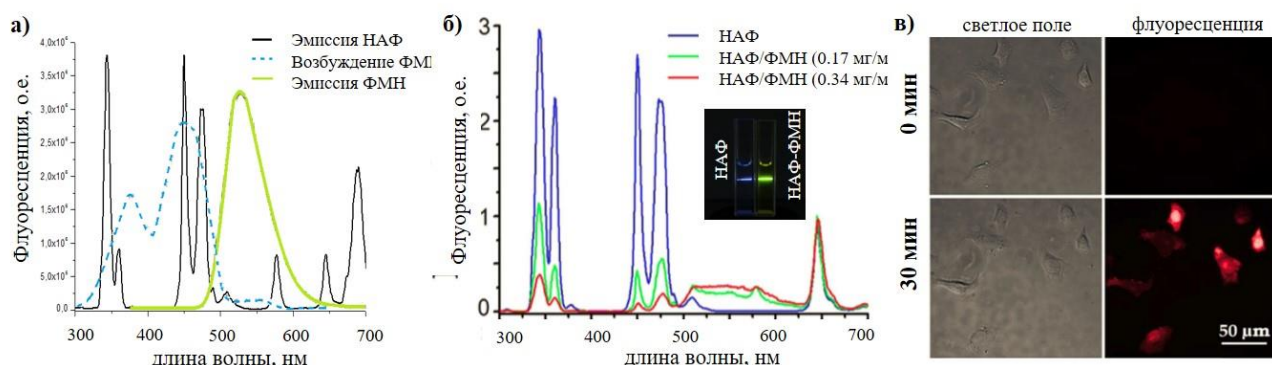


Рисунок 25. Спектры флуоресценции ФМН и НАФ, спектр поглощения ФМН (а); Спектры флуоресценции НАФ и наноструктур НАФ-ТМАГ-ФМН при возбуждении светом с длиной волны 975 нм. (б); Демонстрация эффекта фототоксичности наноструктур НАФ-ФМН на клетки SK-BR-3 после облучения лазером с длиной волны 975 нм. Светлопольные (слева) и флуоресцентные изображения с йодидом пропидия (справа) до (верхние изображения) и после облучения (нижние изображения) (в).

Возможность использования наноструктур НАФ-ФМН в качестве фотосенсибилизатора продемонстрировали при проведении ФДТ в экспериментах на мышах, которым были перевиты ксенографты опухоли из клеточной линии SK-BR-3. Наноструктуры НАФ-ФМН и ФМН вводили в окружающие опухоль ткани и инкубировали в течение 1,5 ч. с последующим облучением в режиме сканирования с дозой 900 Дж/см^2 (Рис.26а). В качестве контроля выступали лабораторные животные, которым вводили наноструктуры НАФ-ФМН без светового воздействия. Эффективность ФДТ под действием ближнего ИК-света *in vivo* оценивали путем измерения объема опухоли в течение 50 дней (Рис.26б). Анализ объема показал прогрессивный рост контрольной опухоли (без облучения) после 15-ого дня, т.е. после типичного инкубационного периода. В то же время зафиксирована очевидная регрессия объема опухоли при ФДТ с использованием фотосенсибилизатора НАФ-ФМН. Ингибирование роста опухоли оценивали как $90 \pm 5\%$ объема на 50 день после ФДТ (Рис.26). Следовательно, успешное проведение ФДТ обусловлено участием трех основных компонентов: НАФ, ФМН и лазерного излучения с длиной волны 975 нм. Гистологический анализ срезов опухолевой ткани через 24 часа после ФДТ показал, что возможным механизмом действия ФДТ является повреждение сосудов опухоли, приводящее к их тромбозу и кровоизлиянию, которое впоследствии вызывают гипоксию опухоли.

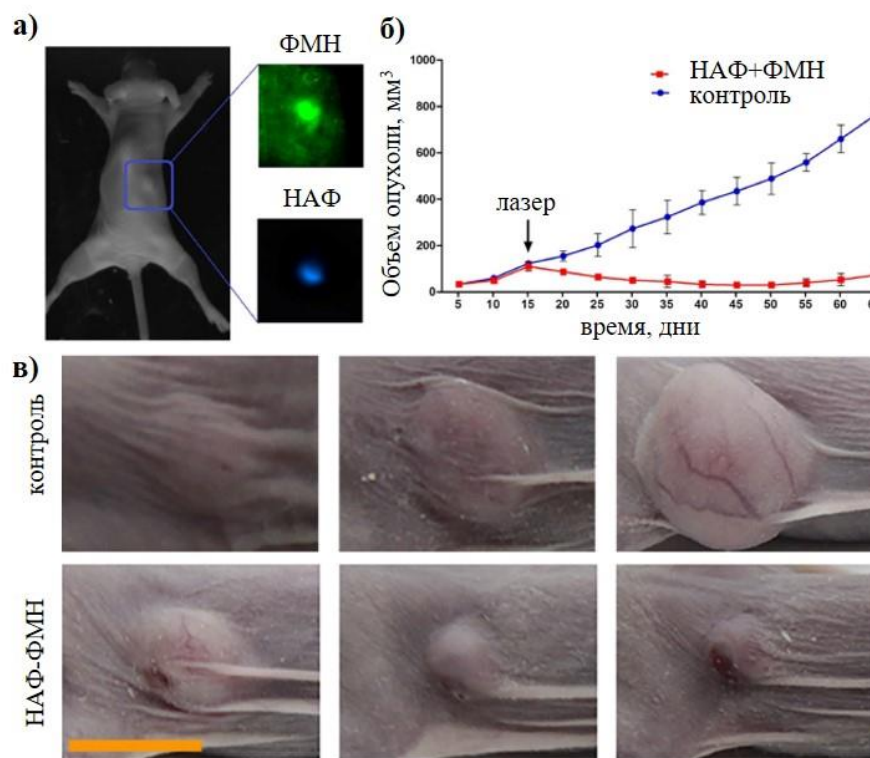


Рисунок 26. Изображение мыши с подкожным ксенографтом опухоли SK-BR-3 через 15 дней после имплантации; на вставке: увеличенные изображения для демонстрации флуоресценции ФМН и НАФ в опухоли с контрастностью 2 и 30 (а); Изменение размера опухоли SK-BR-3 в контрольном эксперименте (без облучения) и после лечения ФДТ (б); Светлопольные изображения области опухоли SK-BR-3, полученные после 975 нм-лазерного облучения через «15», 25 и 50 дней и изображения соответствующих контролей. Шкала 10 мм (в).

Таким образом, ФДТ, реализованная посредством перитуморального введения НАФ-ФМН с последующим воздействием лазера с длиной волны 975 нм, продемонстрировала влияние на торможение роста опухоли SK-BR-3, сопровождающиеся патоморфологическими изменениями ткани опухоли. Представленные наноструктуры имеют большие потенциальные возможности для создания новой фотоактивируемой платформы для тераностики. В более широкой перспективе эта работа представляет новый подход к запуску фотобиологических процессов на сантиметровой глубине в живой биологической ткани.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что осадительная полимеризация акролеина в водно-щелочной среде, а также его радикальная безэмульгаторная сополимеризация со стиролом являются простыми, воспроизводимыми, универсальными способами получения коллоидно-стабильных микрочастиц на основе одного мономера в широком диапазоне диаметров (0.15-2 мкм) с узким

- распределением по размерам, содержащих на поверхности функциональные группы;
2. Продемонстрирована возможность управления коллоидными и химическими свойствами полиакролеиновых микрочастиц путем введения второго мономера, органических красителей, аминов, проведением реакции радикальной сшивки, что определяет получение микрочастиц с широким спектром свойств и создание на их основе микроструктур с биологически активными молекулами, стимул-чувствительными полимерами, неорганическими наночастицами;
 3. Найдено, что использование микроструктур в реакции ингибирования латексной агглютинации с визуальной регистрацией результатов позволяет детектировать гаптены (показано на примере определения гербицида 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты с пределом обнаружения 0,25 нг/мл), а также спектрофотометрически исследовать кинетические закономерности протекания реакции латексной агглютинации;
 4. Получены микроструктуры на основе гибридных частиц, допированных КТ (после синтеза) и конъюгированных с антителами, которые могут выступать в качестве биореагентов в реакции латексной агглютинации, а также эффективных визуализирующих меток клеточных рецепторов, что продемонстрировано на примере маркирования рецептора HER-2neu на поверхности клеток SKOV-3;
 5. Показано, что введение КТ в состав полиэлектролитных комплексов на поверхности микрочастиц лежит в основе дизайна микроструктур с рН-чувствительной флуоресценцией, которые могут быть использованы в качестве оптического сенсора для определения Cu^{2+} с пределом обнаружения 15 нМ;
 6. Получены микроструктуры с термочувствительной флуоресценцией путем включения КТ в слой стимул-чувствительного полимера (поли-N-винилкапролактама) на поверхности микрочастиц, что дало возможность проводить мониторинг изменения температуры в микрообъеме с точностью до 0.1°C ;
 7. Показано, что оригинальная методика включения НАФ в полиакролеиновые микрочастицы на стадии синтеза позволяет исследовать биораспределение полученных микроструктур в *in vivo* экспериментах;
 8. Метод модификации НАФ путем замены растворителя лег в основу получения набора наноразмерных гидрофилизированных коллоидно-стабильных частиц с различной функциональностью и низкой цитотоксичностью;

9. Найдено, что наноструктуры на основе НАФ, модифицированных амфифильным полимером, с белком барстаром в качестве компонента высокоаффинного модуля барназа-барстар позволяют визуализировать рецепторы на поверхности раковых клеток, при этом флуоресцентный сигнал детектируется через 1.6 мм- слой фантома биоткани;
10. При создании оболочки из полиэтиленгликоля на поверхности гидрофилизированных НАФ зарегистрировано увеличение времени их циркуляции в кровеносной системе до 1 часа, что привело к эффективному накоплению НАФ в опухоли и позволило визуализировать ее границы.
11. Продемонстрировано, что наноструктуры НАФ с эндогенным фотосенсибилизатором рибофлавином, в которых реализуется резонансная передача энергии при возбуждении ИК-светом, являются тераностическими агентами: визуализируют опухоль и вызывают ее деградацию под действием ИК-излучения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Венер Т.И., Турчинский М.Ф., Кнорре Д.Г., **Генералова А.Н.**, Лукин Ю.В., Щербо С.Н., Туркин С.И., Зубов В.П. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот с использованием окрашенных латексов // *Биоорганическая химия*.–1990.–т. 16.–№ 3.–с. 424-426.
2. Lukin Yu.V., **Generalova A.N.**, Tyrtyshev T.V., Eremin S.A. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by noninstrumental latex immunoassay // *Immunochemical Technology for Environmental Applications. ACS Symposium Series 657* (Ed.:Diana S.Aga, E.M.Thurman) Am. Chem. Soc., Washington,–1997.–Chapter 8.–p. 97-105.
3. Lukin Yu.V., Pavlova I.S., **Generalova A.N.**, Zubov V.P., Zhorov O.V., Martsev S.P. Immunoreagent based on polymer dispersions for immunochemical assays // *J. of Mol. Recognition*.–1998.–V. 11.–p. 185-187.
4. **Генералова А.Н.**, Буряков А.Н., Лукин Ю.В., Зубов В.П. Турбидиметрические исследования реакции латексной агглютинации при определении 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты // *Биоорганическая химия*.–2000.–т. 26.–с. 478-483.
5. Zaitsev S.Yu., **Generalova A.N.**, Marchenko S. B., Makievski A.V., Krägel J., Miller R. Influence of polymeric non-ionic surfactants on the surface tension of styrene and on the styrene polymerization process // *Colloids Surf A: Phys. Eng. Aspects*.–2004.–V. 239.–p. 145-149.
6. Zaitsev S.Yu., Marchenko S.B, **Generalova A.N.**, Gritskova I.A. Modelling of polymer-surfactant interfacial layers of latex particles by monolayer technique // *Progress in Colloid and Polymer Sci*.–2004.–V. 288.–p. 1-5.
7. Капустин Д.В., Вихров А.А., Горохова И.В., **Генералова А.Н.**, Калязина О.В., Мурзабекова Т.Г., Зубов В.П. Многокомпонентные термочувствительные системы для биокатализа // *Изв. Ак. наук. Сер. химическая*.–2005.–№ 2.–с.443-448.
8. **Generalova A.**, Marchenko S., Gorokhova I., Miller R., Gurevich I., Tsarkova M., Maksimov V., Zaitsev S. Advantages of interfacial tensiometry for studying the interactions of biologically active compounds // *Colloids Surf. A: Phys. Eng. Aspects*.–2007.–V. 298.–№ 1-2.–p. 88-93.

9. Гаврилова Н.Ф., Свиридов В.В., Яковлева И.В., Гальвидис И.А., Лукин Ю.В., **Генералова А.Н.**, Определение дифтерийного токсина и анатоксина в реакции латекс-агглютинации с использованием моноклонального диагностикума // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.*—2007.—№ 4.—с. 46-50.
10. Зубов В.П., Капустин Д.В., **Генералова А.Н.**, Ягудаева Е.Ю., Вихров А.А., Сизова С.В., Муйдинов М.Р. Модификация твердых материалов полимерными нанослоями, как способ получения новых биоматериалов // *Высокомолек. Соед., Сер. А.*—2007.—т. 49.—№12.—с.1-21.
11. **Генералова А.Н.**, Сизова С.В., Гонцова М.С., Баранов А.В, Артемьев М.В., Клинов Д.В., Мочалов К.Е., Набиев И.Р., Зубов В.П., Олейников В.А. Синтез субмикронных сополимерных (акролеин/стирол) микросфер, содержащих флуоресцентные полупроводниковые CdSe/ZnS нанокристаллы // *Рос. Нанотехнологии.*—2007.—т. 2.—№ 7.-8.—с.144-154.
12. Бызова Н.А., Свиридов В.В., Гаврилова Н.Ф., Распопова Е.Н., Яковлева И.В., **Генералова А.Н.**, Лукин Ю.В., Черкасова В.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.. Иммунохроматографическая и латекс-агглютинационная системы детекции дифтерийного токсина // *Биорг. Химия.*—2009.—V. 35.—р. 533-541.
13. **Generalova A.N.**, Sizova S.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Artemyev M.V., Spemath L., Kamyshny A., Magdassi Sh. Highly fluorescent ethyl cellulose nanoparticles containing embedded semiconductor nanocrystals // *Colloids and Surf. A: Physicochem. and Eng. Aspects.*—2009.—V. 342.—р. 59-64.
14. Свиридов В.В., Гаврилова Н.Ф., Бызова Н.А., Распопова Е.Н., Яковлева И.В., **Генералова А.Н.**, Лукин Ю.В., Черкасова В.В., Жердев А.В, Дзантиев Б.Б., Определение токсикогенных свойств коринебактерий дифтерии в латекс-агглютинационном и иммунохроматографическом анализе // *Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней.*—2009.—№ 9.—с. 385-390.
15. **Generalova A.N.**, Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M., Submicron polymer particles containing fluorescent semiconductor nanocrystals CdSe/ZnS for bioassays // *Nanomedicine.*—2011.—V. 6.—№ 2.—р.195-209.
16. **Generalova A.N.**, Zarifullina M.M., Lankina E.V., Sizova S.V., Artemyev M.V., Zubov V.P., Oleinikov V.A., Optical sensing quantum dot-labeled polyacrolein particles prepared by layer-by-layer deposition technique // *J. of Colloid and Interface Science.*—2011.—V. 357.—р. 265-272.
17. **Генералова А.Н.**, Зубов В.П., Мочалов К.Е., Здобнова Т.А., Сизова С.В., Деев С.М., Петров Р.В., Биоаналитические флуоресцентные реагенты на основе полиакролеинсодержащих частиц, наполненных полупроводниковыми CdSe/ZnS-нанокристаллами // *Док. Академии Наук.*—2011.—т. 439.—№ 1.—с. 122–125.
18. **Generalova A.N.**, Oleinikov V.A., Sukhanova A., Artemyev M.V., Zubov V.P., Nabiev I. Biosensing with thermosensitive fluorescent quantum dot-containing polymer particles // *Proceedings SPIE. 8460, Biosensing and Nanomedicine.*—2012.—V 84600Y.
19. **Generalova A.N.**, Oleinikov V.A., Sukhanova A., Artemyev M.V., Zubov V.P., Nabiev I. Quantum dot-containing polymer particles with thermosensitive fluorescence // *Biosensor and Bioelectronics.*—2013.—V. 39.—р. 187-193.
20. Oleinikov V.A., Sukhanova A., **Generalova A.N.**, Sizova S.V., Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Artemyev M.A., Nabiev I. Nanoprobes on the basis of semiconductor nanocrystals for bioassays and biosensing // *FEBS Journal: 280.*—2013.—Special Issue 1.—р. 275.

21. Grebenik E.A., Nadort A., **Generalova A.N.**, Nechaev A.V., Sreenivasan V.K.A., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., Zubov V.P., Klinov D.V., Panchenko V.Y., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes // *J. of Biomedical Optics.*–2013.–V. 18.–p. 076004-(1-10).
22. Гребенник Е.А., **Генералова А.Н.**, Нечаев А.В., Хайдуков Е.В., Миронова К.Е., Стрёмовский О.А., Лебедев О.И., Звягин А.В., Деев С.М., Специфическая визуализация опухолевых клеток с помощью антистоксовых нанофосфоров // *Acta Naturae.*–2014.–т.6.–№ 4.–с. 51-57.
23. Guller A.E., **Generalova A.N.**, Petersen E.V., Nechaev A.V., Trusova I.A., Landyshev N.N., Nadort A., Grebenik E.A., Deyev S.M., Shekhter A.B., A.V. Zvyagin. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells // *Nano Research.*–2015.–V. 8.–p. 1546-1562.
24. Хайдуков Е.В., Рочева В.В., Миронова К.Е., **Генералова А.Н.**, Нечаев А.В., Семчишен В.А., Панченко В.Я. Биосовместимые апконвертирующие чернила для скрытой антиконтрафактной защиты // *Рос. нанотехнологии.*–2015.–т. 10.–с. 87-90.
25. **Generalova A.N.**, Kochneva I.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Guller A.E., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A.V., Deyev S.M. Submicron polyacrolein particles in situ embedded with upconversion nanoparticles for bioassay // *Nanoscale.*–2015.–V. 7.–p. 1709-1717.
26. **Генералова А.Н.**, Зубов В.П., Дисперсии многофункциональных микросфер на основе полиакролеина для создания биоаналитических и визуализирующих реагентов // *Высокомолекулярные соединения.*–2016.–т. 58.–№ 4.–p. 277-305.
27. Sizova S., **Generalova A.**, Tretyak M., Mochalov K., Samokhvalov P., Nabiev I., Oleinikov V., Submicron QDs-containing particles as nano-thermosensors // *Materials Today: Proceedings.*–2016.–V. 3.–p. 617-621.
28. **Generalova A.N.**, Rocheva V.V., Nechaev A.V., Khochenkov D.A., Sholina N.V., Semchishen V.A., Zubov V.P., Koroleva A.V., Chichkov B.N., Khaydukov E.V. PEG-modified upconversion nanoparticles for in vivo optical imaging of tumors // *RSC Advances.*–2016.–V. 6.–p. 30089-97.
29. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshin E.V., Ponomareva N.V., Yudin A.V., **Generalova A.N.**, Deyev S.M., Mukhina I.V., Semyanov A.V., Zvyagin, A.V. Cytotoxic effects of upconversion nanoparticles in primary hippocampal cultures // *RSC Advances.*–2016.–V. 6.–№ 40.–p. 33656-65.
30. Рочева В.В., Шолина Н.В., Деревяшкин С.П., **Генералова А.Н.**, Нечаев А.В., Хоченков Д.А., Семчишен В.А., Хайдуков Е.В., Степанова Е.В., Панченко В.Я. Люминесцентная диагностика опухолей с применением апконвертирующих наночастиц // *Альманах клинической медицины.*–2016.–V. 44.–p. 12-18.
31. Рочева В.В., Хоченков Д.А., **Генералова А.Н.**, Нечаев А.В., Семчишен В.А., Степанова Е.В., Соколов В.И., Хайдуков Е.В., Панченко В.Я. Апконвертирующие наноконструкции для прямой визуализации опухоли с использованием ближнего инфракрасного излучения // *Изв. РАН, Сер. физическая.*–2016.–т. 80.–№ 4.–с. 513-517.
32. Khaydukov E.V., Mironova K.E., Semchishen V.A., **Generalova A.N.**, Nechaev A.V., Khochenkov D.A., Stepanova E.V., Lebedev O.I., Zvyagin A.V., Deyev S.M., Panchenko V.Ya. Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment // *Sci. Reports.*–2016.–V. 6.–p. 35103.

33. Guller A., Nadort A., **Generalova A.**, Kornienko I. Petersen E., Qian Y., Goldys E., Shekhter A., Zvyagin A., Onion-like surface design of upconverting nanophosphors modified with polyethylenimine: Shielding toxicity versus keeping brightness? // *Proceedings of SPIE, The International Society of Optical Engineering*.–2016.–p. 100132Q.
34. Mitroshina E.V. Mishchenko T.A., Vedunova M.V., Yudintsev A.V. **Generalova A.N.**, Nechaev A.V., Deyev S.M., Mukhina I.V., Zvyagin, A.V. The influence of different types of upconversion nanoparticles surface coating on neurotoxicity // *Sovremennye Tehnologii v Medicine*.–2016.–V. 4.–p. 133-141.
35. **Генералова А.Н.**, Зубов В.П., Хайдуков Е.В., Нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией на пути в медицину // *Природа*.–2016.–№ 11,–с. 24-32.
36. Savelyev A.G., Bardakova K.N., Khaydukov E.V., **Generalova A.N.**, Popov, V.K., Chichkov B.N., Semchishen, V.A. Flavin mononucleotide photoinitiated cross-linking of hydrogels: Polymer concentration threshold of strengthening // *J. of Photochem. and Photobiology A: Chemistry*.–2017.–V. 341,–p. 108-114.
37. **Generalova A.N.**, Chichkov B.N., Khaydukov E.V. Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques // *Adv. in Colloid and Interface Sci.*–2017.–V. 245.–p. 1-19.
38. Mironova K.E.; Khochenkov D.A, **Generalova A.N.**, Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. Ultraviolet phototoxicity of upconversion nanoparticles illuminated with near-infrared light // *Nanoscale*.–2017.–V. 9.–p. 14921-14928.
39. Rocheva V.V., Koroleva A.V., Savelyev A.G., Khaydukov K.V., **Generalova A.N.**, Nechaev A.V., Guller A.E., Semchishen V.A., Chichkov B.N., Khaydukov E.V. High-resolution 3D photopolymerization assisted by upconversion nanoparticles for rapid prototyping applications // *Sci. Reports*.–2018.–V. 8.–p. 366.
40. **Generalova A.N.**, Zubov V.P., Design of polymer particle dispersions (latexes) in the course of radical heterophase polymerization for biomedical applications // *Colloids Surf B Biointerfaces*.–2018.–V. 166.–p. 303-322.
41. Guller A.E., Nadort A., **Generalova A.N.**, Khaydukov E.V., Nechaev A.V., Kornienko I.A., Petersen E.V., Liang L., Shekhter A.B., Qian Y., Goldys E.M., Zvyagin A.V. Rational surface design of upconversion nanoparticles with polyethylenimine coating for biomedical applications: better safe than brighter? // *ACS Biomater. Sci. Eng.*–2018.–V. 4.–p. 3143-3153.
43. **Генералова А.Н.**, Ашарчук И.М., Зубов В.П. Мультифункциональные полимерные дисперсии для биомедицинских исследований, полученные в процессе гетерофазной полимеризации // *Изв. РАН. Сер. химическая*.–2018.–№ 10.–p. 1759-1780.
44. Khaydukov E., Rocheva V., Savelyev A., Khaydukov K., Asharchuk I., Nechaev A., Khochenkov D., Sochilina A., Semchishen V., **Generalova A.** Emerging upconversion nanoparticles for industry and biomedical application // *EPJ Web of Conference, Hole burning and single molecule*.–2018.–V. 190.–p. 03005.
45. **Generalova A.**, Mironova K., Sholina N., Rocheva V., Nechaev A., Grebenik E., Guller A., Zvyagin A., Deyev S., Zubov V., Khaydukov E. On the way from diagnostics to theranostics // *EPJ Web of Conference, Hole burning and single molecule*.–2018.–V. 190.–p. 03005.
46. Demina P.A., Khaydukov E.V., Sholina N.V., Rocheva V.V., Khochenkov D.A, Akasov R.A., **Generalova A.N.** Upconversion nanoparticles with anti-Stokes luminescence as bioimaging agents // *EPJ Web of Conference, Hole burning and single molecule*.–2018.–V. 190.–p. 04005.

47. Demina P., Scholina N., Khochenkov D., Asharchuk I., Rocheva V., Chichkov B., **Generalova A.**, Khaydukov E. Multimodal magnetic-luminescent nanocomplexes based on upconversion nanoparticles for theranostics // *FEBS Open Bio.*–2018.–V. 8.–p. 181-182.
48. Mironova K., Koroleva A., Aparin I., Shipunova V., Khochenkov D., **Generalova A.**, Chichkov B., Deyev S., Khaydukov E. UV-emitting upconversion nanoparticles for the treatment of estrogen-dependent tumors // *FEBS Open Bio.*–2018.–V. 8.–p. 274.
49. Рочева В.В., Савельев А.Г., Нечаев А.В., **Генералова А.Н.**, Семчишен В.А., Звягин А.В., Хайдуков Е.В., Трехмерная люминесцентная томографическая визуализация биотканей // *Оптика и спектроскопия.*–2019.–т. 126,–№ 1,–с. 87-90.

Патенты

50. Ерохин Е.П., Гальцева Г.В., Тартаковский И.С., Прозоровский С.В., Радченко О.В., Мисуренко М.К., Лукин Ю.В., **Генералова А.Н.**, Зубов В.П., и др. Способ получения антигенного диагностикума.–1989.–А.с. № 1596747.
51. **Генералова А.Н.**, Суханова Т.В., Сизова С.В., Манохина В.В., Мочалов К. Е., Олейников В.А., Набиев И.Р. Способ формирования многофункциональных микросфер.–2014.–Патент RU 2532559С1.
52. **Генералова А.Н.**, Деев С.М., Звягин А.В., Зубов В.П., Хайдуков Е.В., Способ получения функционализированных визуализирующих агентов с антистоксовой фотолюминесценцией на основе полиакролеиновых дисперсий.–2016.–Патент RU № 2014149101

Глава в монографии

53. Хайдуков Е.В., Семчишен В.А., Семиногов В.Н., Соколов В.И., Гуллер А.В., Шехтер А.Б., Нечаев А.В., Звягин А.В., Миронова К.С., **Генералова А.Н.**, Звягин А.В., Панченко В.Я. Перспективы применений апконвертирующих нанофосфоров для задач тераностики // *Современные лазерно-информационные технологии*, Коллективная монография под ред. академика В.Я. Панченко и профессора Ф.В. Лебедева.–М.–Интерконтакт Наука.–2015.–с. 630-645.