

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)

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант:
профессор, доктор химических наук
В.П. Зубов

Москва-2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
Введение.....	12
I.1. Полимерные микрочастицы и микроструктуры	
на их основе.....	14
I.1.1. Природа полимера и дисперсионная среда.....	18
I.1.1.1. Акролеин и особенности его полимеризации.....	19
I.1.2. Способы гетерофазной полимеризации и диаметры частиц	21
I.1.3. Коллоидная стабильность дисперсий полимерных частиц.....	32
I.1.4. Функциональность полимерных частиц.....	36
I.1.5. Гибридные органо-неорганические полимерные частицы.....	41
I.1.6. Применение дисперсий ПЧ в биотехнологии и биомедицине.....	46
I.2. Неорганические наночастицы и наноструктуры на их основе.....	52
I.2.1. Полупроводниковые нанокристаллы.....	54
I.2.1.1. Оптические свойства КТ.....	55
I.2.1.2. Синтез КТ.....	57
I.2.1.3. Гидрофилизация КТ.....	58
I.2.1.4. Применение КТ в биомедицинских исследованиях.....	62
I.2.2. Наночастицы с антистоксовой флуоресценцией.....	65
I.2.2.1. Оптические свойства НАФ	66
I.2.2.2. Синтез НАФ.....	70
I.2.2.3. Гидрофилизация НАФ.....	72
I.2.2.4. Применение НАФ в биомедицинских исследованиях.....	75
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	82
II.1. Материалы.....	82
II.2. Методы исследования.....	83
III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	110
III.1. Микроструктуры на основе полимерных частиц.....	111
III.1.1. Получение полимерных частиц методом гетерофазной полимеризации.....	112
III.1.1.1. Синтез полимерных частиц методом осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде (M1).....	112
- Синтез полиакролеиновых частиц в присутствии красителя.....	115
- Синтез полиакролеиновых частиц в присутствии аминосоединений.....	119
III.1.1.2. Синтез частиц методом безэмульгаторной радикальной полимеризации акролеина со стиролом (M2).....	125
III.1.2. Микроструктуры на основе частиц, содержащих органические метки.....	129
III.1.2.1. Реакция латексной агглютинации.....	129
III.1.2.2. Реакция ингибирования латексной агглютинации для определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты.....	132

Ш.1.2.3. Реакция латексной агглютинации со спектрофотометрической детекцией результатов для определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты.....	136
Ш.1.3. Микроструктуры на основе органо-неорганических частиц.....	140
Ш.1.3.1. Получение гибридных частиц с квантовыми точками (КТ) путем их введения в полимерную матрицу.....	141
- <i>Применение микроструктур на основе гибридных частиц с КТ в биоанализах на основе иммунохимических реакций.....</i>	<i>146</i>
Ш.1.3.2. Гибридные микроструктуры со стимул-зависимой флуоресценцией.....	150
- <i>Микроструктуры с рН-чувствительной флуоресценцией.....</i>	<i>150</i>
- <i>Оптические биосенсоры для определения ионов меди на основе микроструктур с рН-чувствительной флуоресценцией.....</i>	<i>156</i>
- <i>Микроструктуры с термочувствительной флуоресценцией.....</i>	<i>158</i>
- <i>Применение микроструктур с термочувствительной флуоресценцией в биоанализе.....</i>	<i>163</i>
Ш.1.3.3. Гибридные полимерные частицы, содержащие апконвертирующие нанофосфоры.....	166
- <i>Применение гибридных НАФ-содержащих частиц для биовизуализации in vivo.....</i>	<i>173</i>
Ш.2. Наноструктуры на основе апконвертирующих нанофосфоров (НАФ)	
Ш.2.1. Биофункционализация НАФ с использованием метода замены растворителя.....	177
Ш.2.1.1. Цитотоксические свойства биофункционализированных НАФ.....	181
Ш.2.2. Визуализация клеточных рецепторов с использованием наноструктур на основе НАФ	183
Ш.2.2.1. Биофункционализация НАФ с использованием амфифильных полимеров.....	183
Ш.2.2.2. Специфическая визуализация клеточных рецепторов с использованием НАФ-ПМАО.....	187
- <i>Моделирование визуализации раковой опухоли при участии наноструктур НАФ.....</i>	<i>189</i>
Ш.2.3. Оптическая визуализация раковой опухоли in vivo.....	191
Ш.2.3.1. Получение ПЭГ-содержащих наноструктур НАФ.....	191
Ш.2.3.2. Визуализация раковой опухоли при пассивной доставке наноструктур.....	197
Ш.2.4. Фотодинамическая терапия с использованием наноструктур на основе НАФ.....	201
IV. ВЫВОДЫ.....	215
БЛАГОДАРНОСТИ.....	217
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	219

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НЧ	- наночастицы
ПЧ	- полимерные частицы
МЧ	- магнитные частицы
М1	- полимерные частицы, полученные методом осадительной полимеризации акролеина
М2	- полимерные частицы, полученные безэмульгаторной радикальной сополимеризацией акролеина со стиролом
А	- акролеин
Ст	- стирол
CV	- коэффициент вариации
ПАВ	- поверхностно-активное вещество
КРП	- контролируемая радикальная полимеризация
УФ	- ультрафиолетовый спектральный диапазон
ИК	- инфракрасный спектральный диапазон
Ат	- антитела
с	- спэйсер
БСА	- бычий сывороточный альбумин
2,4D	-2,4-дихлорфеноксисукусная кислота
2,4D-OVA	- агглютинатор на основе 2,4-D и овальбумина
2,4D-РАА	- агглютинатор на основе 2,4-D и полиакриламида
КТ	- полупроводниковые нанокристаллы или квантовые точки
НАФ	- апконвертирующие нанофосфоры
КК	- коэффициент апконверсии
АФК	- активные формы кислорода
FRET	- эффект Ферстеровской резонансной передачи энергии (Föster resonance energy transfer)
EPR	- эффект увеличенной проницаемости и удержания (Enhanced permeability and retention)
QY	- квантовый выход (quantum yield)
НКТР	- нижняя критическая температура растворения
ПВК	- поли-N-винилкапролактам
АИБН	- азо-изо-бутиронитрил
ПСС	- полистиролсульфонат натрия
ПЛ	- поли-L-лизин
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
ПЭК	- полиэлектролитный комплекс
ПЭ	- полиэлектролит
Р6G	- родамин 6G
РИЛА	- реакция ингибирования латексной агглютинации
РЛА	- реакция латексной агглютинации
ТМАГ	- гидроксид тетраметиламмония
ТОФО	- триоктилфосфин оксид

ПЭИ	- полиэтиленимин
РМАО	- чередующийся сополимер октадецена и малеинового ангидрида
ПЛЛ	- полилактид
ПЛГ	- сополимер лактида с гликолидом
ПЭГ-ДГЭ	- диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля
ПЭМ	- просвечивающая электронная микроскопия
4D5scFv	- рекомбинантные миниантитела
HER2/neu	- рецептор раковых клеток
SKOV-3, SK-BR-3	- линии опухолевых клеток
LLC	- рак легкого Льюиса
ФДТ	- фотодинамическая терапия
ФМН	- флавиномононуклеотид

ВВЕДЕНИЕ

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 привлечений 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 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 реализовано за счет применения 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 после синтеза. 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. Продемонстрировано, что наноструктуры НАФ с эндогенным фотосенсибилизатором рибофлавином, в которых реализуется резонансная передача энергии при возбуждении ИК-светом, являются тераностическими агентами.

Практическая значимость

Получены микроструктуры 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 микроструктур 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 микроструктур 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).

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Введение

Интеграция частиц дисперсий микро- и наноразмерного диапазона в биотехнологию и биомедицину оказывает большое влияние на разработку новых материалов, устройств, методов анализа, диагностики и лечения, позволяет повышать чувствительность, селективность и специфичность существующих методов. [1]. Частицы являются важным инструментом для решения задач тераностики, представляющей новый подход, который подразумевает создание мультифункциональных биореагентов, объединяющих в себе диагностические и терапевтические свойства. Большое разнообразие частиц органической и неорганической природы, демонстрирующих самые разнообразные свойства, начиная от широкого варьирования размеров до уникальных фотофизических, химических и технологических характеристик, ведет к ускорению перехода к персонализированной медицине [2].

Одной из особенностей применения частиц является возможность миниатюризации формата анализов. Это позволяет проводить исследования в малом объеме, с минимальным расходом реагентов при заметно низкой цене. Кроме того, наличие большой площади поверхности делает возможным проведение и значительно повышает эффективность гетерогенных анализов при уменьшении их продолжительности, сохранении чувствительности и специфичности [3]. Начиная с 50-х годов прошлого столетия для решения этих задач успешно применяли полимерные частицы [4]. Современный уровень развития биотехнологии и биомедицины выдвигает новые задачи, которые могут быть решены с использованием наночастиц, имеющих диаметр <100 нм. Особенно актуальны такие наночастицы для детекции отдельных молекул, в *in vivo* исследованиях, при создании средств доставки лекарств. [5,6] Однако сложности при получении полимерных частиц из нанометрового диапазона и при работе с ними привели к поиску альтернативы. Одним из путей решения этой проблемы стало использование методов супрамолекулярной химии для создания наночастиц, таких как мицеллы, липосомы, дендримеры, соединения включения, которые подробно описаны в литературе [7] (в данной работе не рассматриваются). В качестве других перспективных наночастиц успешно себя зарекомендовали неорганические наночастицы, имеющие самую разную природу (оксиды металлов, частицы благородных металлов, квантовые точки и т.д.), которая лежит в основе их уникальных фотофизических и химических свойств [8], что определяет востребованность этих наночастиц в нанобиотехнологии.

Прогресс в области нанотехнологий направлен не только на миниатюризацию, но также создание сложных структурированных систем, которые строятся по принципу «снизу вверх» (англ. bottom-up), т.е. из индивидуальных частиц с последующим усложнением системы. Структурирование решает вопросы не только геометрического построения, но и взаимного расположения составляющих компонентов с четко идентифицируемой функциональностью. Например, при создании частиц, участвующих в биоанализе на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии, необходимо, чтобы расстояние между донором и акцептором составляло не более 10 нм, а на поверхности находились биофункциональные молекулы. К сложноорганизованным структурам относятся комплексы частиц с биологически активными молекулами, функциональными полимерами, комплексы частиц из органических и неорганических компонентов. [9] Такие структуры могут обладать целым набором особых свойств, нехарактерных для индивидуальных частиц, что позволяет разрабатывать новые методы биоанализа, диагностики, тераностики, решать задачи биовизуализации, регенеративной медицины, фармакологии. [10]

Добиться разнообразия частиц и структур на их основе удастся благодаря активно развивающимся подходам к получению органических полимерных частиц, а также последним достижениям в области получения неорганических наночастиц. В данном «Обзоре литературы» будет рассмотрен один из наиболее широко используемых методов получения дисперсий полимерных частиц - метод гетерофазной полимеризации. Этот метод имеет большие возможности для получения полимерных частиц в широком диапазоне размеров, с различной функциональностью, морфологией, содержащих различные метки, в том числе неорганические наночастицы. Неорганические частицы будут представлены полупроводниковыми нанокристаллами (так называемыми квантовыми точками) и нанокристаллами с антистоксовой флуоресценцией (также известными, как апконвертирующие наночастицы). Оба типа наночастиц обладают уникальными фотолюминесцентными свойствами и имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными флуоресцентными метками, что определяет их перспективность для применения в бионанотехнологии.

I.1. ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ И МИКРОСТРУКТУРЫ НА ИХ ОСНОВЕ

С середины XX века дисперсии полимерных частиц (ПЧ), также известные как «латексы», применяют в различных областях науки и техники, например, в качестве калибровочных эталонов в электронной и оптической микроскопии, для определения размеров пор фильтров и биологических мембран, в качестве модельных коллоидных систем для изучения их реологии, стабильности, седиментации и т.д. [11,12] Дисперсии ПЧ представляют собой коллоидные системы, в которых полимер диспергирован в жидкой дисперсионной среде в виде стабильных индивидуальных частиц. В настоящее время ПЧ, в основном субмикронного размера, нашли новые приложения в наукоемких областях, в частности, в биологии и биомедицине. Применение дисперсий ПЧ в этих исследованиях связано с такими свойствами, как высокоразвитая поверхность, возможность получения частиц в широком диапазоне диаметров (10 нм-1 мм) и узким распределением по размерам, с различной морфологией, функциональностью, которые легко можно регулировать в процессе синтеза. Кроме того, реализация потенциальных возможностей для формирования органо-неорганических частиц, так называемых гибридных, и получение конъюгатов с биологически активными молекулами значительно расширяет область их применения. [13][14] Частицы также используют как элементы конструктора, которые могут быть модифицированы различными природными и синтетическими полимерами с целью получения материалов с новыми особыми свойствами.

Опыт использования дисперсий ПЧ в различных исследованиях (от идентификации биомаркеров, появляющихся в организме при заболеваниях различной этиологии, [15] мониторинга метаболического синдрома, [16] сепарации и очистки биологических объектов [17] до геномных технологий [18]) показал возможность проведения эффективных, специфичных анализов с высокой чувствительностью, воспроизводимостью в малом объеме проб при относительно низкой цене. Широкий диапазон областей применения дисперсий ПЧ, прежде всего, обусловлен потребностью уйти от больших централизованных клинических лабораторий и проводить исследования быстро, малозатратно, эффективно. [19] Кроме того, анализы с использованием ПЧ обычно имеют высокую скорость, что дает возможность, например, сократить время принятия решения и улучшить протокол лечения пациентов. Еще одно преимущество дисперсий ПЧ заключается в том, что они открывают возможность для преодоления ограничений традиционных анализов и позволяют сделать новый шаг в создании реагентов для биомедицинских приложений. Так, исследования, которые были неосуществимы всего несколько лет назад, например, обнаружение ДНК в низкой концентрации невооруженным

глазом, [20] мониторинг биоаналитов *in vivo* [21] стали возможны благодаря применению ПЧ. [22]

Таким образом, важным направлением в биомедицине и нанобиотехнологии является синтез полимерных дисперсий с комплексом особых свойств. Такие дисперсии в отличие от крупнотоннажных, применение которых связано с природой полимера (например, для получения резин, резино-технических изделий, различных конструкций, покрытий и т.д.), производятся в малом объеме и требуют тщательного контроля не только полимерной составляющей частиц, но и их формы, размера, распределения по размерам, морфологии, свойств поверхности и др. [23] В **Таблице 1** приведены основные параметры, которые следует учитывать при дизайне ПЧ, и методы анализа, позволяющие их контролировать.

Таблица 1.1.

Основные контролируемые параметры при дизайне ПЧ для медико-биологических исследований [14].

Параметры	Метод	Комментарии
Форма частиц	электронная микроскопия	сферическая, овальная, двухсферная, т.д.
Диаметр частиц и их распределение по размерам	электронная и световая микроскопия, динамическое светорассеяние, др.	10 нм-1 мм
Морфология частиц	электронная микроскопия, ЯМР, АСМ, ДСК	полимерные частицы типа «ядро-оболочка», «малинообразная», пористая, полая и др.
Природа поверхности	электронная микроскопия, рентгеновская спектроскопия, АСМ и др.	«гладкая» или с экспонированными в объем полимерными цепями
Поверхностный потенциал	электрофорез, кондуктометрия, потенциометрия.	наличие сильных или слабых кислотных групп, положительный или отрицательный заряд амфотерных систем
Коллоидная стабильность по отношению к электролитам, температуре, рН	спектрофотометрия, динамическое светорассеяние, турбидиметрия, нефелометрия.	порог быстрой коагуляции (концентрация, температура, др.
Функциональность		
Реакционноспособные поверхностные группы	химические реакции, спектрофотометрия, флуориметрия	карбокисильные, альдегидные, amino-, тио-, эпокси-группы, др.

Чувствительность к внешнему окружению (рН, температура, ионная сила, др.)	динамическое светорассеяние, спектрофотометрия, электрофорез	стимул-чувствительные полимеры
Цвет, флуоресценция	спектрофотометрия, флуориметрия, конфокальная микроскопия	красители, флуоресцентные красители
Биодеградируемость	спектрофотометрия, хроматография	полиэферы, например, полилактиды.
Низкая сорбция белков	в <i>in vivo</i> экспериментах	полиэтиленгликоли, бетаины
Гибридные частицы		
Магнитные свойства	магнитометр, исследование магнитных свойств	оксиды Fe, Co, Ni
Люминесценция	флуориметрия, конфокальная микроскопия	квантовые точки, апконвертирующие нанокристаллы, соли редкоземельных металлов
Оптические свойства	спектрофотометрия, рефрактометрия	оксиды Ti, Zn, Al, Si, наночастицы Ag, Au, Pt, Cu
Механические свойства	трибологические исследования при получении покрытий и пленок	оксиды Ti, Zn, Al, Si
Электрические свойства	исследование электрических свойств при получении покрытий и пленок.	оксиды Ti, Zn, Al, Si, электропроводящие полимеры полианилин, политиофен, полипиррол и др.

Дисперсии ПЧ могут быть сформированы из полимеров природного происхождения, таких как хитозан, альгинат, декстран, и др. [24], а также из предварительно полученных синтетических полимеров. [25,26] Способы получения таких дисперсий и исследование их свойств подробно освещены в литературе. [27] В данном обзоре основное внимание будет уделено синтезу дисперсий ПЧ путем радикальной гетерофазной полимеризации мономеров с последующей модификацией частиц.

Гетерофазная полимеризация является одним из основных способов синтеза дисперсий ПЧ и представляет собой процесс в двухфазной системе, в которой начальный мономер и/или образующийся полимер присутствуют в виде тонкой дисперсии в дисперсионной среде. Важным компонентом полимеризационной системы является инициатор полимеризации, который растворим в мономере или дисперсионной среде, при этом в процессе синтеза он может находиться в растущих полимерных частицах. В синтезе

дисперсий ПЧ также участвуют поверхностно-активные вещества (ПАВ) для эмульгирования мономера и/или для стабилизации капель мономера и частиц синтезируемого полимера. Кроме того, в зависимости от задач в реакционную систему могут быть добавлены соединения для ограничения роста цепи, передатчики цепи, регуляторы молекулярной массы, сшивающие агенты и т.д. Использование комбинации вышеуказанных компонентов в эмпирически скорректированных условиях позволяет получать частицы полимера в диапазоне диаметров от 10 нм до 1-2 мм. [14,28] К настоящему времени разработаны различные методы проведения гетерофазной полимеризации, исследованы механизмы протекания реакций и свойства получаемых частиц, что нашло отражение в большом количестве работ, опубликованных по этой теме. [29–31]

В данном обзоре представлена сложная, очень многогранная и тесная связь между выбором способа получения дисперсий ПЧ, многочисленными параметрами, определяющими свойства частиц, и методами управления этими параметрами для получения дисперсий частиц с требуемыми характеристиками. Гетерофазная полимеризация рассмотрена, как подход к дизайну мультифункциональных ПЧ для медико-биологических и биотехнологических исследований. Проанализированы свойства мономеров, в том числе акролеина, и представлена сравнительная характеристика различных методов гетерофазной полимеризации, которые задают диаметры получаемых ПЧ и их распределение по размерам. Рассмотрены возможности управления свойствами поверхности, такими как гидрофильность и гидрофобность, адсорбция ПАВ, «гладкость» поверхности или наличие полимерных цепей, экспонированных в дисперсионную среду, и др. Уделено внимание контролю коллоидной стабильности, заряду поверхности, а также возможности получения частиц с различной функциональностью, в том числе определяемой стимул-чувствительными полимерами на поверхности. Продемонстрированы подходы к введению неорганических наночастиц в объем и на поверхность ПЧ, что является важным этапом при формировании гибридных частиц. Представлена возможность управления этими процессами на стадии синтеза и после получения дисперсий ПЧ. Кроме того, освещены подходы к созданию биореагентов на основе ПЧ, приведены примеры их участия в гомогенных, гетерогенных анализах и анализах, основанных на маркировании клеток, а также рассмотрены дальнейшие перспективы их использования. [14]

1.1.1. Природа полимера и дисперсионная среда

Гетерофазная полимеризация позволяет получать полимерные дисперсии практически из любых мономеров. В общем, любой полимер, получаемый в гомогенных условиях, может быть синтезирован в гетерогенной системе, при этом важным требованием является выбор дисперсионной среды. Прежде всего, она должна быть жидкой при температуре, по крайней мере, синтеза, химически инертной, не растворять полимер, а также иметь хорошие теплообменные свойства. Наиболее часто в качестве дисперсионной среды используют воду, и в этом случае система представляет собой эмульсию «масло в воде», а при использовании органической среды процесс протекает в обратной эмульсии, которую называют «вода в масле».[29]

В настоящее время существует большой набор различных виниловых мономеров, которые способны полимеризоваться по радикальному механизму, при этом температура стеклования ($T_{ст}$) получаемых полимеров позволяет ожидать формирование частиц на основе полимеров, находящихся в стеклообразном или высокоэластичном состоянии. $T_{ст}$ определяет структурированную морфологию в композитных полимерных частицах, [32] которая может служить критерием выбора подходящего мономера. Кроме того, высокая $T_{ст}$ свидетельствует об устойчивости к внешнему давлению, а низкая $T_{ст}$ позволяет сформировать пленку на поверхности биосенсора.[33]

В биоисследованиях успешно себя зарекомендовали дисперсии ПЧ на основе полистирола, поскольку способы получения этих дисперсий хорошо отработаны, частицы тщательно изучены и охарактеризованы.[34,35] К этому следует добавить, что плотность полистирола близка к 1 ($1,05 \text{ г/см}^3$), что позволяет эффективно диспергировать полимер в водной среде. Высокая $T_{ст}$ полистирола определяет способность частиц выдерживать механические нагрузки и избегать коалесценции, что является важным параметром при использовании в микрофлюидике.[36] Гидрофобные свойства поверхности позволяют адсорбировать биомолекулы для получения биоаналитических реагентов.[15] Регулировать свойства полимера в составе частиц можно путем проведения сополимеризации двух и более мономеров или в процессе затравочной полимеризации, что приводит к изменению функциональности поверхности, диаметра, морфологии, значения $T_{ст}$, и др.

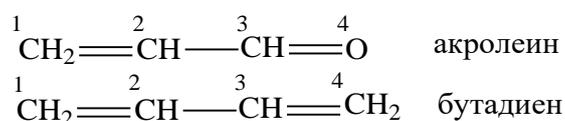
В последнее десятилетие большое внимание привлекают ДПЧ на основе гидрофильных полимеров, в основном, благодаря наличию стимул-чувствительных свойств, например, термо- и рН-чувствительность. При получении таких частиц необходимо проводить реакцию сшивки для поддержания сферической формы в водной

среде. Примерами гидрофильных ПЧ могут служить частицы на основе поли-N-изопропилакриламида, поли-N-винилкапролактама, полиэтиленгликоля, и т.д.[27]

I.1.1.1. Акролеин и особенности его полимеризации

Акролеин привлекает большое внимание в качестве исходного мономера, поскольку легко вступает в реакции полимеризации и сополимеризации по различным механизмам, в результате которых получают частицы с реакционноспособными альдегидными группами на поверхности, легко взаимодействующие с аминогруппами биологически активных молекул. Как известно из литературы [37], частицы полиакролеина, по сравнению, например, с частицами полистирола, обладают более рыхлой структурой, что позволяет легко вводить как органические молекулы, так и неорганические наночастицы. Кроме того, макромолекулы полиакролеина также имеют высокое сродство к большинству водорастворимых органических красителей. Эти свойства определяют возможность получения интенсивно окрашенных и флуоресцентных полиакролеиновых частиц. [38]

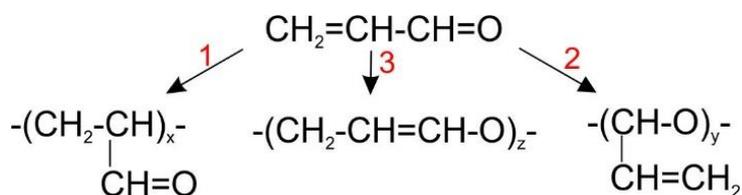
Акролеин является α,β -ненасыщенным альдегидом с системой сопряженных связей и может рассматриваться как формальный аналог бутадиена:



В некоторых реакциях он ведет себя как сопряженный диен, т.е. может вступать в реакции, как по карбонильной, так и по винильной группе. При каталитическом гидрировании акролеина в зависимости от типа катализатора и условий реакции образуются аллиловый спирт, пропионовый альдегид или пропиловый спирт. При его взаимодействии с гидроксиламином, семикарбазидом, гидразином или фенилгидразином в реакцию вступает как альдегидная, так и винильная группа. В то же время в реакции со спиртами в зависимости от условий может участвовать либо одна, либо обе функциональные группы акролеина с образованием ацеталей, алкоксипропионовых альдегидов или их ацеталей. Сопряжение карбонильной группы с двойной связью обуславливает высокую реакционную способность акролеина по отношению к нуклеофилам, при этом присоединение идет по β -атому углерода. Эти реакции показывают разнообразие реакционных возможностей акролеина. [39]

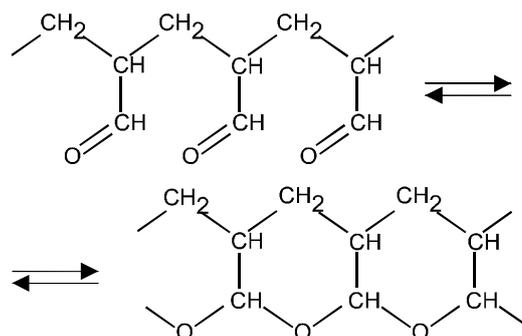
После удаления стабилизаторов, используемых при хранении акролеина, происходит спонтанная полимеризация, которую можно заметить по образованию бесцветного осадка. Следует отметить, что крайне высокая склонность к полимеризации

наиболее характерное свойство акролеина. Двойные связи акролеина значительно различаются по реакционной способности, поэтому повторяющиеся звенья макромолекул могут иметь разное строение (схема) [13].



Полимеризация акролеина может проходить по различным механизмам: радикальному (инициаторы: перекиси, алифатические азосоединения, окислительно-восстановительные системы), катионному (инициаторы: эфират трехфтористого бора, четыреххлористое олово, треххлористый алюминий, четыреххлористый титан), анионному (инициаторы: нафталиновый комплекс натрия, трифенилметил натрия, бензофенон калия, щелочи, алкоголяты щелочных металлов, комплексы гидридов щелочных металлов, фосфины, пиперидин) [37].

Бифункциональность акролеина определяет сложный механизм формирования полимерных цепей, при котором структура макромолекул представляет собой комбинацию фрагментов. Полиакролеин, полученный в присутствии ионных инициаторов, имеет в своем составе различные структурные звенья, которые являются результатом 1,2-присоединения по винильной группе (1), присоединения по карбонильной группе (2) или смешанного 1,4-присоединения (3) (схема). Радикальный процесс полимеризация протекает в основном по винильной группе. В работе [40] показали, что соотношение звеньев $x:y$ может изменяться от 1:4 для ионной полимеризации до 7:1 для полимеров, синтезированных по радикальному механизму. Несмотря на преимущественное участие двойных связей в радикальной полимеризации, это не приводит к значительному увеличению функциональных альдегидных групп на поверхности частиц, поскольку они существуют в равновесии с полуацетальными изомерами. Ниже приведена схема образования полуацетальных структур полиакролеина. Вероятно, наличие таких структур является одной из причин образования полиакролеина, практически не растворимого в обычных растворителях. Водорастворимый продукт, гидрат полиакролеина, может быть получен при добавлении бисульфита натрия. [41]



Водные дисперсии полиакролеиновых частиц получают радикальной полимеризацией (под действием вещественных инициаторов [42], γ -излучения [40], окислительно-восстановительных систем [39]) или анионной осадительной полимеризацией [43].

1.1.2. Способы гетерофазной полимеризации и диаметры частиц

Диаметр частиц и их узкое распределение по размерам (коэффициент вариации <10%) являются одними из важных параметров, которые необходимо контролировать в зависимости от дальнейшего применения ПЧ. Так, при реакции латексной агглютинации в планшете с детектированием результатов невооруженным глазом используют частицы с диаметром более 1,5 мкм, тогда как инструментальная детекция реакции агглютинации требует применения частиц с диаметром менее 0,3 мкм. [15] Управление размерами частиц обычно осуществляется в процессе синтеза путем выбора способа проведения гетерофазной полимеризации. Подходы к формированию и диапазон диаметров частиц в зависимости от способа полимеризации детально описаны в литературе в работах [28–30,44]. В данном обзоре будут кратко представлены различные способы проведения гетерофазной полимеризации, такие как эмульсионная, миниэмульсионная, микроэмульсионная, суспензионная, дисперсионная и осадительная полимеризации (**Рис. 1.1**). Эти способы отличаются:

1. начальным состоянием полимеризационной смеси;
2. кинетикой полимеризации;
3. механизмом формирования частиц;
4. формой и размером частиц дисперсий, получаемых в результате синтеза;

На **Рис. 1.1** схематически показан (для различных способов в системе «масло в воде») механизм образования частиц при гомогенной нуклеации частиц или из капель мономера, диапазон размеров частиц, молекулярная масса, а также начальное состояние реакционной

смеси. Например, в эмульсионной полимеризации мономер нерастворим в водной дисперсионной среде, а ПАВ и инициатор - растворимы. Полимеризация, протекающая по механизму нуклеации, приводит к образованию частиц в диапазоне диаметров 50-300 нм с молекулярной массой $\sim 10^6$. Возможность использования реагентов как растворимых, так и нерастворимых в дисперсионной среде (например, инициатор в миниэмульсионной полимеризации) показана в виде розово-синей ячейки. Полимеризация, которая может протекать как в водной, так и в органической среде, показана в виде желто-розовой ячейки [26]. Обзор методов полимеризации изложен далее.

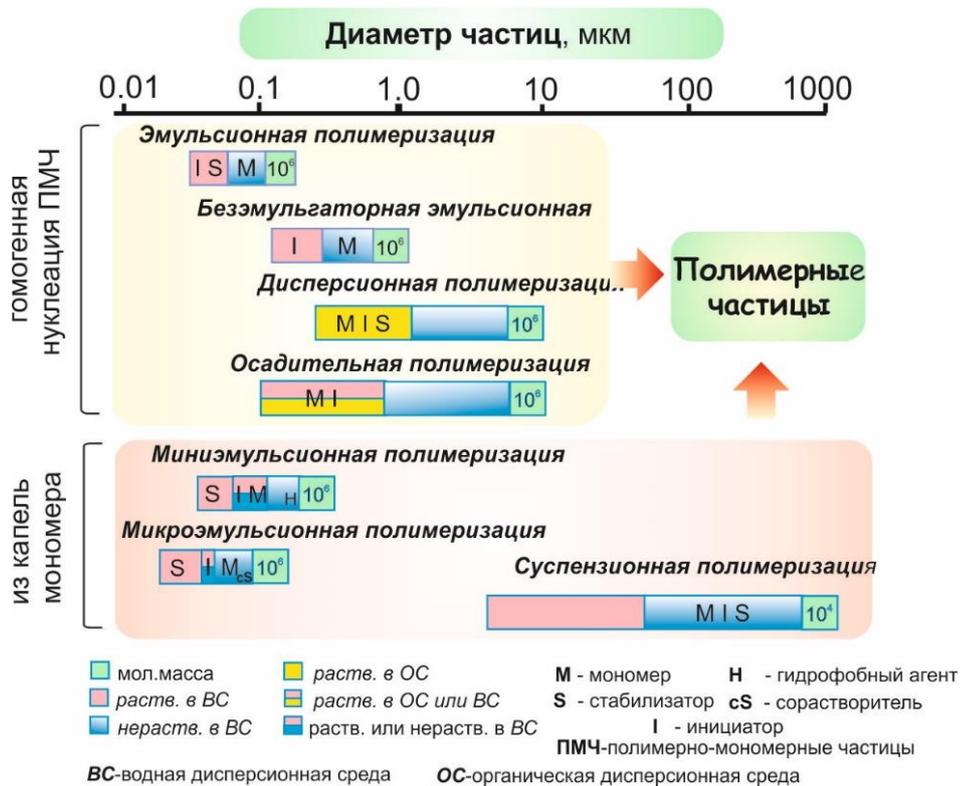


Рисунок I.1. Схема образования частиц в различных способах гетерофазной полимеризации. [26]

Суспензионная полимеризация. При проведении суспензионной полимеризации (Рис. I.2а) используют мономер и инициатор, нерастворимые в дисперсионной среде, и растворимый в мономере инициатор. Фазу мономера с помощью перемешивающего устройства и стабилизатора (суспендирующего агента) диспергируют в дисперсионной среде в виде капель мономера и инициируют полимеризацию, обычно, при температуре 20-100°C. Процесс полимеризации, как правило, протекает до 100% конверсии. В этих условиях капли мономера превращаются непосредственно в ПЧ, практически без изменения диаметра. [45] Кинетические закономерности суспензионной полимеризации

аналогичны процессам при полимеризации в массе или в растворной полимеризации, в зависимости от наличия растворителя в каплях мономера. Таким образом, индивидуальные капли мономера могут рассматриваться как «микрореакторы».

Важной характеристикой частиц, синтезированных суспензионной полимеризацией, является морфология поверхности и объема, которая зависит от степени растворения, набухания или осаждения полимера в мономере. В случае растворения (или набухания) полимера в мономерной смеси ПЧ имеют «гладкую» поверхность и относительно равномерное распределение полимера в объеме частицы. Примерами могут служить частицы на основе полистирола и полиметилметакрилата. В случае таких полимеров, как поливинилхлорид или полиакрилонитрил, нерастворимых в собственном мономере, получают шероховатые и пористые частицы.

Диаметр частиц, синтезируемых в процессе суспензионной полимеризации, находится в диапазоне 5 мкм-10 мм с относительно низкой молекулярной массой (10^4 - 10^5). Средний диаметр мономерных капель (и, соответственно, полимерных частиц) легко контролируется скоростью перемешивания, соотношением фаз мономер/вода, концентрацией стабилизатора, вязкостью обеих фаз. [14,46] Важным направлением развития методов гетерофазной полимеризации является использование инновационных *микрофлюидных* устройств. В частности, при проведении суспензионной полимеризации такие устройства позволяют создавать однородные капли мономера с диаметрами в диапазоне 5-250 мкм и обеспечивают контролируемое введение инициатора в зону полимеризации. В результате получают монодисперсные частицы, у которых можно точно контролировать форму, анизотропию, пористость, морфологию.[47] Как правило, в микрофлюидных устройствах фаза мономера, подлежащая диспергированию, подается потоком в микроканал, где им управляют путем изменения давления. Вторая несмешивающаяся жидкость подается независимым потоком через индивидуальный микроканал. При встрече двух потоков образуется «палец» из дисперсной фазы, параметры течения которого определяются геометрией места соединения потоков и их скоростью. В результате межфазная поверхность деформируется, и капля отрывается от «пальца» дисперсной фазы, что приводит к образованию эмульсии. Sugiura и соавт. в работе [48] продемонстрировали синтез поливинилбензолных частиц с узким распределением по размерам путем микрофлюидного эмульгирования с последующей полимеризацией при температуре при участии перекиси бензоила в качестве инициатора. Размеры полученных ПЧ находились в диапазоне 5–10 мкм (CV 5%) в зависимости от размера капель эмульгированного мономера.

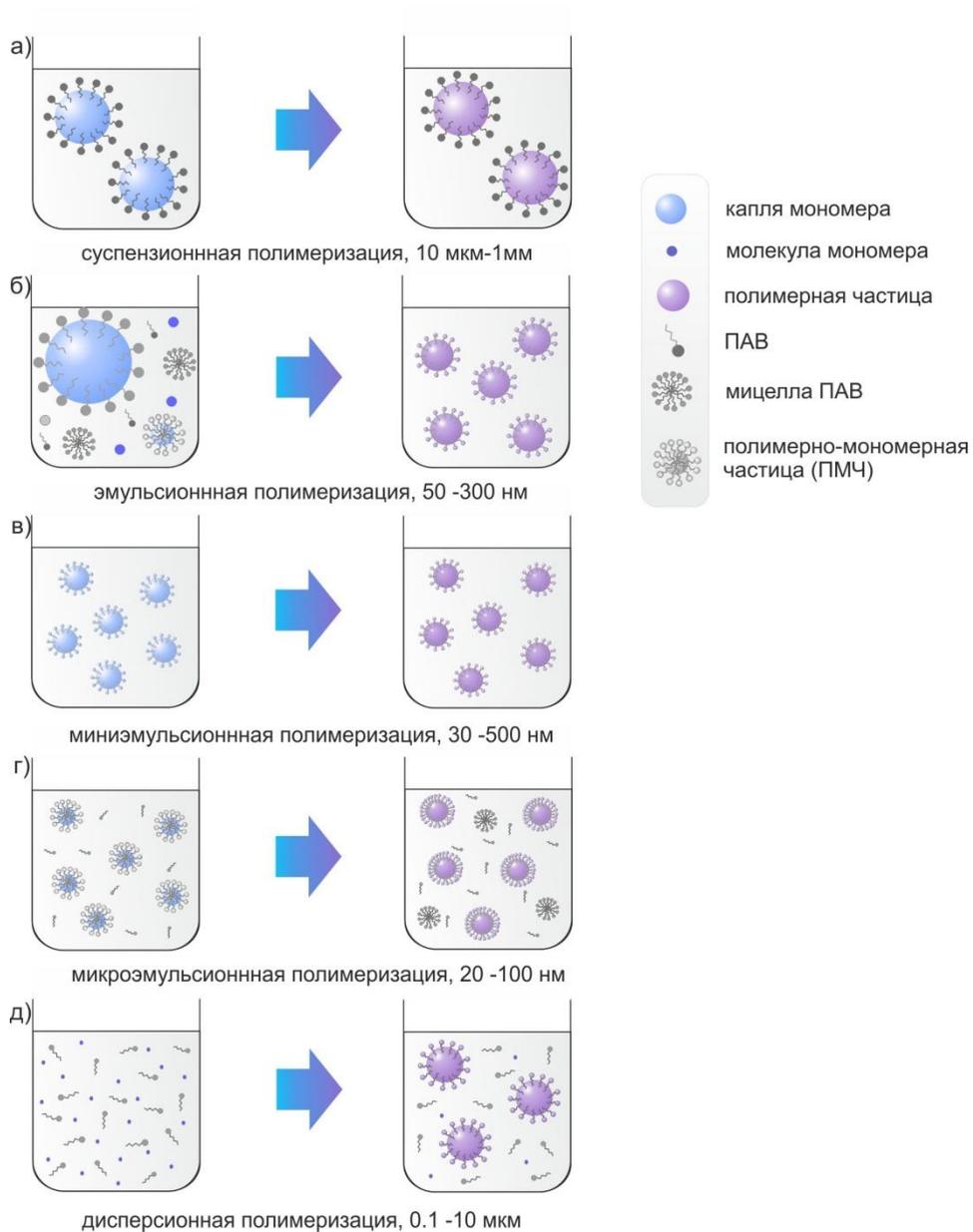


Рисунок I.2. Подходы к формированию полимерных частиц и диапазоны диаметров для различных способов гетерофазной полимеризации [14].

Эмульсионная полимеризация. Качественное описание процесса эмульсионной полимеризации было представлено Harkins W.D. [49], а первая основная теория, которая наиболее точно описывает процессы для системы, где полимер хорошо растворим в собственном мономере, была разработана Smith W.V. и Ewart R.W.[50]. В классической эмульсионной полимеризации (**Рис. I.2б**) используют мономер, не растворимый (или плохо растворимый) в дисперсионной среде. Инициатор обычно растворим в дисперсионной

среде, но не в мономере. Начальная стадия эмульсионной полимеризации включает эмульгирование мономера в дисперсионной среде и стабилизацию с помощью ПАВ. Теория эмульсионной полимеризации мономеров предусматривает наличие эмульгатора в количествах выше критической концентрации мицеллообразования. [50] При этих условиях мономер в реакционной среде присутствует как в виде капель (1-10 мкм или больше), так и в виде мономера, солюбизированного в мицеллах ПАВ (5-10 нм в зависимости от природы и концентрации ПАВ), а также в виде небольшого процента молекулярно-растворенного мономера. Кроме того, в системе могут присутствовать мицеллы эмульгатора.[51] Исходная эмульсия термодинамически нестабильна, хотя конечный продукт является коллоидно- и термодинамически стабильным.

Инициатор растворяется только в дисперсионной среде, поэтому в ней находится начальная зона полимеризации. После достижения критической длины макрорадикалы, образованные в дисперсионной среде, адсорбируются мицеллами с солюбилизованным мономером или исходными мицеллами ПАВ. [28] В результате получают полимерно-мономерные частицы (ПМЧ), в которых происходит дальнейшая полимеризация.

Классическая модель нуклеации не подходит для описания образования частиц, в отсутствие мицелл, а также для частично растворимых в воде мономеров (например, винилацетата). Fitch R. [52] и Gilbert R. [53] предложили модель гомогенной нуклеации, которая качественно и количественно описала процесс полимеризации. При концентрации ПАВ ниже КММ радикалы инициатора реагируют в водной фазе с растворенным мономером с образованием растущих олигомерных макрорадикалов. После достижения критической степени полимеризации макрорадикалы становятся «нерастворимыми» и осаждаются в виде частиц. Образующиеся частицы являются гидрофобными и могут набухать в мономере с образованием ПМЧ, в которых происходит последующая полимеризация.

Полученные частицы имеют размеры в диапазоне 50-300 нм. Важными факторами, определяющими размер, являются концентрации эмульгатора, инициатора, молекулярно-растворенного в дисперсионной среде мономера, число частиц, скорость перемешивания, температура полимеризации. [53,54] Диффузионно-контролируемый характер образования частиц при эмульсионной полимеризации затрудняет управление формированием частиц и коллоидной стабильностью во время синтеза. Поэтому предпочтительно использовать термодинамически стабильные дисперсии и концепцию «микрореактора», где частицы полимера получают не из вновь образованных ПМЧ, а из исходных капель мономера. Эта

концепция была реализована в микроэмульсионной и частично миниэмульсионной полимеризациях.

Миниэмульсионная полимеризация. В случае миниэмульсионной полимеризации (Рис. 1.2в) процесс проводят в миниэмульсиях, состоящих из мономерной фазы, дисперсионной среды, эмульгатора и осмотического гидрофобного агента из ряда высших предельных углеводов или спиртов. Миниэмульсии получают за счет сильного механического воздействия при использовании ультразвуковых установок или гомогенизаторов высокого давления, что позволяет формировать стабильные капли мономера в диапазоне диаметров 30-500 нм. [55,56] При этом в системе отсутствуют свободные мицеллы эмульгатора, что обеспечивает зарождение полимерных цепей в каплях мономера и не требует диффузии мономера через водную среду. Этот подход позволяет проводить полимеризацию как хорошо растворимых мономеров, так и мономеров, практически совсем не растворимых в водной среде. Миниэмульсии не являются полностью термодинамически стабильными системами и время их жизни составляет от нескольких часов до нескольких дней, что связано с обратимым переходом мономера в дисперсионную среду. Для ограничения выхода мономера наряду с эмульгатором используют гидрофобный осмотический агент из ряда высших предельных углеводов или спиртов, например гексадекан. [57] Осмотический агент препятствует перетеканию мономера из мелких капель в крупные за счет возникновения осмотического давления внутри капель.

На первой стадии полимеризации готовят миниэмульсию путем гомогенизации исходной системы при использовании сильного механического воздействия. Затем проводят полимеризацию в миниэмульсии с преимущественным использованием маслорастворимых инициаторов, например 2,2'-азо-*бис*-2,4-диметилвалеронитрила. В результате получают ПЧ с практически тем же диаметром частиц, как и капли мономера. [58] В миниэмульсионной полимеризации капли мономера могут рассматриваться как «микрореакторы», что позволяет включать в них биоактивные вещества, красители, неорганические наночастицы, использовать для проведения реакций, приводящих к получению как новых типов, так и функционализированных частиц. Например, частицы могут быть получены в присутствии биосовместимых и нетоксичных ПАВ, определяющих их использование в различных биомедицинских приложениях. В качестве таких ПАВ используют фосфатидилхолин, холиевую кислоту, хитозан. [59]

Микроэмульсионная полимеризация. Метод микроэмульсионной полимеризации (Рис. 1.2г) дает возможность синтезировать дисперсии частиц с размерами в нанометровом

диапазоне (30-100 нм). Важной особенностью таких дисперсий, является превосходная коллоидная стабильность: частицы не седиментируют и сохраняют свои размеры в течение нескольких лет. [60,61] Данную полимеризацию проводят в микроэмульсиях с диаметром микрокапель меньше 10 нм, которые представляют собой термодинамически стабильные, оптически прозрачные дисперсии, полученные в присутствии ПАВ и со-растворителя, в качестве которого обычно используют короткоцепочечные спирты (бутанол или гексанол).[62]

Образование микроэмульсии происходит в результате спонтанного процесса благодаря высоким концентрациям ПАВ (10-15% масс.), которые обеспечивают низкое поверхностное натяжение и энтропийный фактор стабилизации. Молекулы со-растворителя локализуются в межфазном слое частиц между молекулами ПАВ, оказывая влияние на подвижность слоя таким образом, что его кривизна может быть модифицирована. Подвижность контролируется изменением соотношений ПАВ/со-растворитель или мономер/вода. В результате может наблюдаться инверсия фаз микроэмульсионной системы, например, переход из системы «масло в воде» в «вода в масле». [26]

В процессе полимеризации радикалы инициатора входят в микрокапли мономера из дисперсионной среды (для водорастворимого инициатора) или генерируются в микрокаплях (для маслорастворимых инициаторов), образуя ПМЧ. Рост ПМЧ происходит за счет диффузии мономера из неактивных микрокапель через дисперсионную среду или за счет коалесценции соседних капель. В результате наблюдается увеличение числа частиц в процессе полимеризации и формирование полимерных частиц большего диаметра по сравнению с микрокаплями. Диаметр частиц можно контролировать путем изменения концентрации мономера, ПАВ, со-растворителя, инициатора, введением сомономеров. Одним из недостатков микроэмульсионной полимеризации является низкое содержание мономера в микрокаплях и большое содержание ПАВ. [63]

Дисперсионная полимеризация (Рис. 1.2д) позволяет получать частицы в микронном диапазоне (0.1-10 мкм), используя мономер и инициатор, растворимые в дисперсионной среде. На начальной стадии реакционная смесь гомогенна и процесс иницирования происходит в дисперсионной среде. В ходе полимеризации радикалы инициатора реагируют с молекулами мономера с образованием олигомерных макрорадикалов, которые при достижении критической длины цепи осаждаются в виде частиц. Затем эти частицы продолжают расти путем захвата других макрорадикалов или полимеризации мономеров в набухших частицах. Количество частиц определяется стадией

инициирования и не изменяется в процессе полимеризации, но увеличивается размер частиц. Зона полимеризации расположена преимущественно внутри отдельных частиц. Рост частиц прекращается после расхода всего мономера и адсорбции стабилизатора в виде плотного покрытия. В результате получают ПЧ, набухшие в дисперсионной среде и/ или мономере. Концентрация мономера обычно высока и может достигать 40 % об. [64] Полимеризация обычно протекает в среде органических растворителей при добавлении ПАВ, действие которых основано на создании стерического барьера (например, цетилового спирта). Наиболее широко используют дисперсионную полимеризацию стирола и метилметакрилата в среде алифатических углеводородов или C_1 - C_5 спиртов. [65]

Дисперсионная полимеризация характеризуется образованием высокомолекулярного полимера при высокой скорости процесса, которая, как правило, не зависит ни от размера частиц, ни от их числа. Наблюдаемые закономерности определяются тем, что уже при малых конверсиях полимеризационный процесс смещается из раствора в объем образующихся частиц. Относительно низкая скорость адсорбции мономера частицами и высокая внутренняя вязкость в частицах даже на ранних стадиях обеспечивают возможность существования в одной частице нескольких радикалов. Таким образом, увеличение скорости дисперсионной полимеризации, в отличие от эмульсионной, связано не с изоляцией радикалов в отдельных частицах, а только со снижением скорости обрыва цепи за счет гель-эффекта, который реализуется таким же образом, как и при полимеризации в массе. [66]

На диаметр ПЧ в дисперсионной полимеризации влияет температура, концентрация мономера и инициатора, тип и концентрация стабилизатора, а также растворяющая способность дисперсионной среды. Сильное влияние природы дисперсионной среды можно продемонстрировать на примере полимеризации стирола, в которой получают частицы с диаметром 1,8 м, 2,8 м и 5,2 мкм в метаноле, этаноле и бутаноле, соответственно. [67]

Осадительная полимеризация. Метод осадительной полимеризации используют для синтеза частиц микронного диаметра (0.1-10 мкм). Начальная стадия этой полимеризации, также как и дисперсионной, протекает в гомогенных условиях, но частицы не набухают в дисперсионной среде и их формирование идет, в основном, путем осаждения макромолекул. Инициирование и рост цепи протекают в гомогенных условиях без добавления стабилизатора. После стадии инициирования количество частиц остается постоянным. Частицы образуются за счет реакции сшивки олигомеров (с или без сшивающих агентов) и выпадают в осадок из гомогенного раствора. Затем эти частицы

продолжают расти за счет захвата других частиц, вновь образованных олигомеров или путем адсорбции и полимеризации мономеров, обеспечивая образование частиц большого диаметра с высокой полидисперсностью. [68] Примером осадительной полимеризации является синтез частиц поли(N-трет-бутилакриламида) в воде. [69]

Основные различия между дисперсионной и осадительной полимеризациями заключаются в различной растворяющей способности дисперсионной среды по отношению к полимеру и отсутствию стабилизатора в процессе синтеза. При осадительной полимеризации необходимы низкие концентрации исходного мономера (2–5%), подходящий сшивающий агент и практически Θ -условия (растворитель, температура). Концентрация мономера, степень сшивки, концентрация инициатора являются важными факторами, определяющими размер частиц при осадительной полимеризации. Также необходимо контролировать осаждение образующихся олигомеров на частицы для получения унимодального распределения по размерам и однородной морфологии. [70]

Снижение полидисперсности может быть достигнуто за счет формирования в процессе синтеза олигомеров, обладающих поверхностно-активными свойствами и способных стабилизировать полимерные частицы. Li и соавт. в [68] продемонстрировали получение моодисперсных, плотно сшитых частиц на основе полидивинилбензола в ацетонитриле. В начале полимеризации формировались линейные и разветвленные олигомеры. Рост цепи происходил за счет адсорбции мономера, инициатора и олигомеров, что сопровождалось реакцией сшивки и приводило к формированию крупных частиц. Осаждение олигомера на поверхности способствовало дальнейшему росту частиц, в результате чего получали практически моодисперсные частицы с диаметром 3,37 мкм.

Другие способы гетерофазной полимеризации

Сополимеризация. При полимеризации одного мономера (гомополимеризация) морфология частиц определяется свойствами получаемого полимера, но использование дисперсий ПЧ в биомедицинских исследованиях ставят задачи получения частиц с более широким спектром свойств (например, с сегментами твердого и мягкого полимеров, гидрофобного и более гидрофильного полимеров, с биосовместимой, нетоксичной поверхностью и др.). Такие частицы могут быть получены путем сополимеризации двух или более мономеров. Процесс сополимеризации включает те же стадии, что и гомополимеризация: инициирование, рост цепи, обрыв и передача цепи, но описание этих стадий значительно усложняется. Для установления связи между составом сополимера и исходной смеси мономеров принимают, что сополимеризация идет при квазистационарных условиях, реакционная способность растущих активных центров не зависит от длины цепи

(принцип Флори), мономеры расходятся только на стадии роста цепи. Избирательность реакций роста характеризуют константы сополимеризации (r), или относительные активности мономеров. Они представляют собой отношения констант скоростей присоединения к данному активному центру «своего» и «чужого» мономеров. Константы r зависят от химической природы сомономеров и механизма реакции. Для каждой пары мономеров r имеют свои собственные значения: от нуля (преобладает чередование звеньев в процессе роста цепи) и до величин, значительно превышающих единицу (при обогащении цепи одним из мономерных звеньев). [71] Состав сополимера при глубоких степенях превращения в общем случае отличается от состава мономерной смеси, поскольку последний в ходе процесса изменяется: содержание более активного мономера уменьшается, а менее активного – растет, поэтому для расчета суммарного состава сополимера необходимо использовать уравнение сополимеризации в интегральной форме.[71]

Контролируемая радикальная полимеризация. Несмотря на большие возможности гетерофазной радикальной полимеризации, существует сложность получения полимеров с заданным молекулярно-массовым распределением, а также продуктов с новой структурой. Эти ограничения связаны с неконтролируемым обрывом цепи в процессе синтеза. Решением данной проблемы стало открытие методологии «живой» или *контролируемой радикальной полимеризации (КРП)*. Этот термин впервые был предложен в 1987 году.[72] Способы проведения контролируемой радикальной полимеризации могут быть разделены в зависимости от механизма на: 1) процессы с обратимой рекомбинацией-диссоциацией радикалов; 2) процессы, сопровождающиеся переносом атома. В обоих случаях стоит задача замены необратимого бимолекулярного обрыва цепи обратимой реакцией роста радикалов с частицами, переводящими цепи в неактивное состояние, таким образом, что макромолекулярные радикалы участвуют в последовательных циклах рекомбинации-диссоциации. В результате рекомбинации на конце полимерной цепи образуется лабильная концевая группа, способная в определенных условиях (под действием температуры или другого реагента) отрываться с образованием радикала (диссоциация), который продолжает рост полимерной цепи. Процесс повторяющейся рекомбинации («спящее состояние») и диссоциации полимерной цепи обеспечивает ступенчатый рост всех цепей в ходе полимеризации.[73]

В последние 20 лет методы КРП активно используются в гетерофазной полимеризации, прежде всего, суспензионной [74] и миниэмульсионной [75]. Это связано с возможностью проведения полимеризации в объеме частицы, рассматривая ее как

«микрореактор», и отсутствием необходимости диффузионно-контролируемой доставки мономера из водной среды. [14]

Затравочная полимеризация и композитные полимерные частицы. Различные способы гетерофазной полимеризации, представленные выше, включают стадии зарождения частиц и их дальнейшего роста, в результате которых получают полимерные частицы. Однако на начальной стадии в исходную реакцию систему могут быть добавлены предварительно полученные частицы, так называемые затравочные, вместо их формирования *in situ*. В этом случае реализуется затравочная полимеризация, которая требует тщательного подбора условий, таких как число затравочных частиц, концентрация инициатора и стабилизатора, чтобы избежать образования новых частиц. Второй мономер может быть добавлен к полимеризационной системе, содержащей затравочные частицы, тремя способами: 1) в процессе динамического набухания, когда полимеризацию проводят после набухания затравочных частиц во втором мономере; 2) непосредственно в реакционный объем с затравочными частицами; 3) медленно, по каплям в течение длительного времени. [28] В настоящее время затравочная полимеризация широко используется как для исследования кинетических закономерностей, [53] так и для получения гибридных частиц, [76] моодисперсных частиц большого диаметра [77] и различной морфологии. [78]

Метод затравочной полимеризации активно используют для получения *композитных частиц* со структурированной морфологией, где присутствуют две или более несовместимые полимерные фазы, которые имеют сильное влияние на свойства частиц. Морфология частиц определяется многими параметрами и условиями полимеризации, например, растворимостью мономеров в воде, типом, количеством и способом введения мономера, ПАВ, инициатора, передатчика цепи, сшивающего агента, совместимостью и полярностью получаемых полимеров, вязкостью дисперсионной среды, межфазным натяжением на границе полимер-полимер и полимер-дисперсионная среда, температурой. [14] Для моделирования морфологии требуется комплексный подход, учитывающий многочисленные факторы, но пока еще не разработано единой теории, описывающей формирование композитных частиц. По одной из теорий [79], из полимерных цепей, полученных в процессе полимеризации второго мономера и несовместимых с цепями затравочного полимера, образуются кластеры, что приводит к фазовому разделению. Равновесная морфология достигается, когда полимерные цепи диффундируют в кластеры и кластеры начинают мигрировать для снижения свободной энергии Гиббса. Случай равновесной морфологии реализуется при низкой вязкости в частице и значительной

несовместимости полимеров. Миграция кластеров определяется балансом между силами Ван-дер-Ваальса, броуновским движением и силами преодоления вязкости. В результате можно получить следующие структуры: ядро/оболочка (полистирол/поливинилацетат), обращенная ядро/оболочка (полиметилметакрилат/ полистирол), окклюзионная (полистирол/полиметилметакрилат), полусферическая (полиметилметакрилат/полистирол), «малинообразная» (полистирол/ полиакрилонитрил), полая (полиакриловая кислота/полистирол) (Рис. I.3). В скобках приведены примеры полимерных композиций. [14]

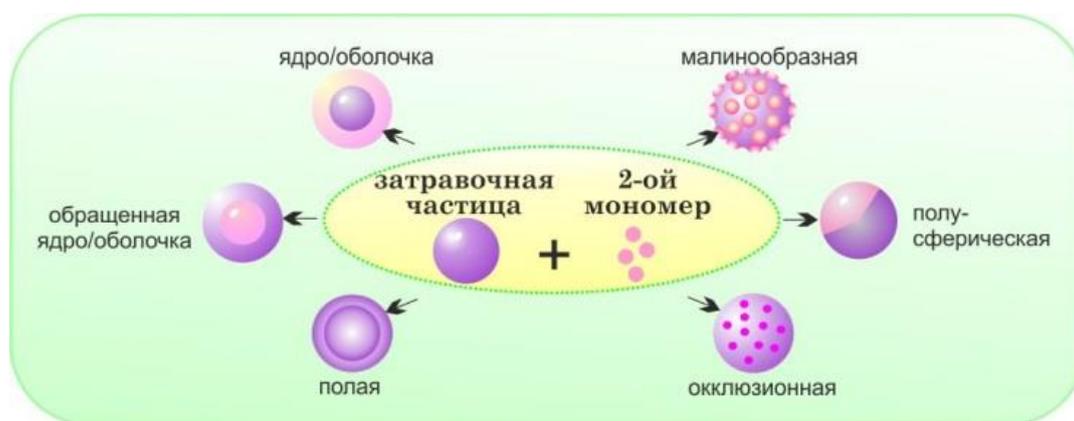


Рисунок I.3. Примеры композитных частиц с различной морфологией.

Получение разнообразных композиционных частиц значительно расширяет область применения частиц и микроструктур на их основе, что позволяет создавать новые эффективные биореагенты.

I.1.3. Коллоидная стабильность дисперсий полимерных частиц

Дисперсии ПЧ являются коллоидными, термодинамически неустойчивыми системами, и необходимо поддерживать их стабильность за счет создания эффективного энергетического барьера, препятствующего флокуляции частиц. Этот барьер по своей природе может быть электростатическим и/или стерическим. Требование коллоидной стабильности особенно актуально при использовании дисперсий ПЧ в биомедицинских исследованиях, где частицы находятся в жестких условиях, связанных с наличием электролитов, биомолекул, сдвиговых деформаций, в условиях среды с высокой ионной силой и повышенной температуры.

Свойства межфазной поверхности определяют такие компоненты полимеризационной системы, как инициатор, гидрофильный мономер, и, прежде всего, стабилизатор, который помимо участия в стадии зарождения частиц в некоторых способах

гетерофазной полимеризации, играет решающую роль в формировании коллоидно-устойчивых дисперсий ПЧ. [80]

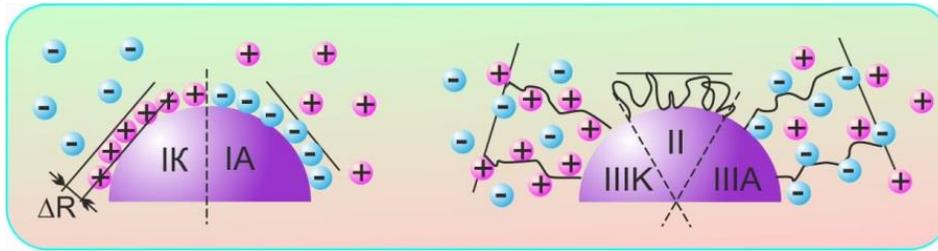


Рисунок I.4. Схема моделей межфазной поверхности полимерных частиц.

Межфазная поверхность, модель которой представлена на Рис. I.4 (линии в каждой секции показывают толщину межфазного слоя ΔR), характеризуется знаком и концентрацией заряда, а также толщиной межфазного слоя в дисперсионной среде. Свойства межфазной поверхности, связанные с противодействием силам притяжения Ван-дер-Ваальса, определяют стабильность частиц. Это может быть электростатическая стабилизация частиц, которая реализуется в случае использования анионных (часть IA) и катионных (часть IK) ПАВ, и стерическая стабилизация в случае применения неионных ПАВ (часть II). В некоторых случаях эффективна электростатическая стабилизация, которая может наблюдаться при использовании анионных (IIIA) или катионных (IIIK) полиэлектролитов. Каждый тип стабилизации имеет свои преимущества и недостатки, поэтому для получения дисперсий ПЧ, агрегативно-устойчивых в условиях проведения биологических исследований, необходимо сбалансированное использование всех способов стабилизации. [14] Подробное обсуждение вопросов стабилизации дисперсий ПЧ можно найти в обзорах [81,82]. Здесь будут рассмотрены только основные подходы к выбору стабилизаторов полимерных частиц.

Стабилизатор должен быть, прежде всего, лиофильной молекулой, которая может адсорбироваться или ковалентно связываться с поверхностью частиц. Традиционный способ электростатической стабилизации состоит в использовании низкомолекулярных ионных ПАВ, таких как алкилсульфаты (например, додецилсульфат натрия), алкилсульфонаты и соединения алкиламмония (например, цетилтриметиламмоний бромид). Следует отметить, что ионные стабилизаторы более эффективны, чем неионные. Однако при электростатической стабилизации происходит значительное снижение стабильности частиц в случае добавления электролитов, связанное со сжатием двойного электрического слоя у поверхности и экспоненциальным снижением дзета-потенциала поверхности. Использование неионных ПАВ со стерическим стабилизационным эффектом

позволяет сохранять стабильность дисперсий в среде с высокой ионной силой. Увеличение молекулярной массы стерического стабилизатора препятствует его десорбции с поверхности частиц, что является вкладом в кинетический фактор коллоидной стабилизации. Соединение свойств двух типов стабилизации наблюдается в присутствии электростерических соединений, особенно, в случае применения сильных полиэлектролитов (например, полисульфонатов), заряд которых, а следовательно, стабилизирующий эффект не зависит от pH. [14]

В последнее время большое внимание привлекают амфифильные полимерные и блок-сополимерные стабилизаторы. [83] Молекула такого стабилизатора содержит в своем составе гидрофобные и гидрофильные полимерные сегменты. Важным физико-химическим свойством является способность таких молекул экспонировать гидрофильные сегменты в полярное окружение, а гидрофобные – в липофильную фазу, что приводит к снижению поверхностного натяжения, т.е. полимер выступает в качестве ПАВ. [84] Такие ПАВ характеризуются низким пенообразованием, хорошей химической и механической стабильностью, улучшают реологические свойства частиц. В качестве амфифильных ПАВ могут выступать природные соединения, такие как гликопротеины, липополисахариды, алкил- и алкиларильные производные полисахаридов, и т.д. [82] Среди синтетических амфифильных блок-сополимеров широкое применение находят сополимеры полиалкенгликолей. Роль гидрофильных сегментов в них практически всегда выполняют полиэтиленгликоли, а в качестве гидрофобных блоков обычно используют полиакрилаты. Широкое распространение получили также следующие гидрофобные блоки: поли-2-диметиламиноэтилметакрилат [85], полипропиленгликоль [82], полибутиленгликоль [86] и др. Полимерные ПАВ обладают большим сродством к межфазной поверхности, что приводит к их концентрированию у этой поверхности. Следствием такого поведения является эффективность действия при низких концентрациях и нечувствительность к добавлению электролитов, изменениям температуры и др.

Важная роль ПАВ в формировании межфазной поверхности ставит задачи создания новых, более эффективных поверхностно-активных соединений. Примером решения этой задачи является разработка нового типа ПАВ, который носит название гемини (англ. gemini), представляющий собой молекулу из двух гидрофобных цепей (обычно порядка 12 атомов C), соединенных спэйсером (**Рис. I.5a**). Синтезированы также несимметричные ПАВ, различающиеся длиной гидрофобной цепи или типом полярных групп. Отличительным свойством данных ПАВ является то, что они обладают значительно более низкой концентрацией, при которой происходит снижение поверхностного натяжения и

формирование мицелл по сравнению с «мономерными» ПАВ. Гемини-ПАВ формируют очень плотную упаковку на границе раздела фаз благодаря возможности расположения гидрофобных фрагментов на поверхности без образования петель в случае, если количество С атомов не больше 12. [87]

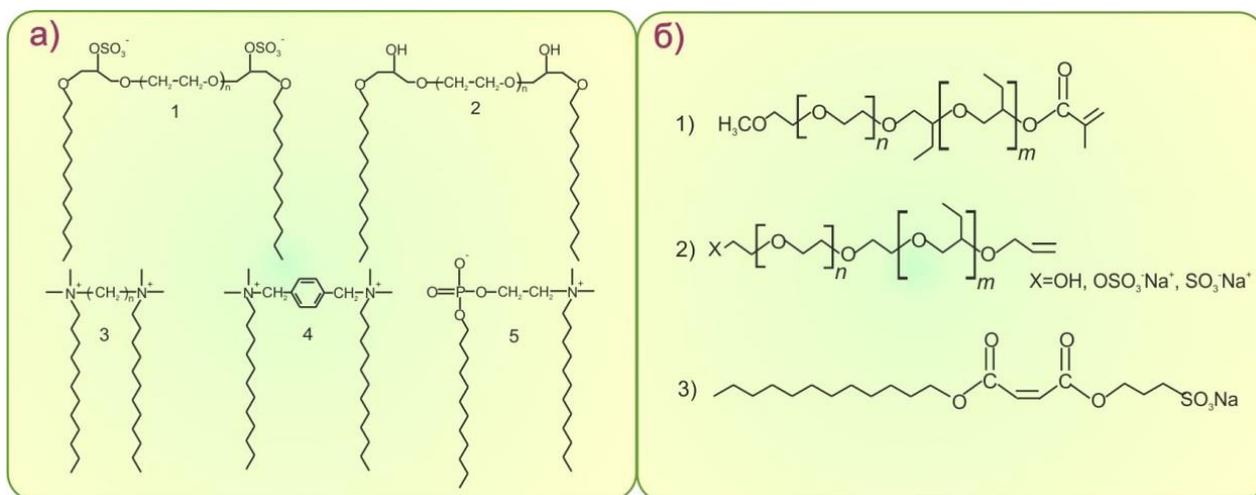


Рисунок I.5. Структуры гемини-ПАВ: 1 и 2- анионное и неионное ПАВ; 3 и 4-катионные ПАВ, различающиеся типом мостика; 5-гетеродимерные ПАВ, имеющие различные полярные группы (а); Примеры реакционноспособных ПАВ: 1) сложный эфир метакрилата и метилированного блок-сополимера этиленоксида и бутиленоксида; 2) аллилированный блок-сополимер этиленоксида и бутиленоксида с различными концевыми группами; 3) монододецилмоносульфопропилмалеат (б).

В процессе получения и хранения полимерных частиц ПАВ могут десорбироваться с поверхности под действием среды с высокой ионной силой, замораживания, вытеснения другими молекулами, т.д. Одним из путей решения проблемы десорбции является использование реакционноспособных ПАВ, способных участвовать в полимеризации, выполняя роль или сомономера (англ. surfmer), или инициатора (inisurf), или передатчика цепи (transurf) с поверхностно-активными свойствами. [88] Винильные группы могут присутствовать как в ионной, так и в гидрофобной или гидрофильной частях молекулы (Рис. I.5б). Замена традиционных ПАВ на реакционноспособные позволяет повысить коллоидную стабильность, особенно в отношении замораживания и добавления органических растворителей. [88] Особый интерес представляют производные малеиновой кислоты, поскольку при обычной температуре они не способны к гомополимеризации. Эта особенность позволяет обеспечить их равномерное распределение на поверхности частиц за счет преимущественной полимеризации с целевыми мономерами. [89]

1.1.4. Функциональность полимерных частиц

Для большинства биомедицинских исследований ПЧ должны обладать функциональностью, которая может быть получена как в процессе синтеза, так и в результате проведения реакций на предварительно синтезированных частицах. Функционализированные частицы находят широкое применение в биотехнологии и биомедицине. Они могут играть роль носителя для биоактивных молекул, маркеров биоспецифических реакций, быть частью биосенсоров, а также выступать в качестве визуализирующих агентов *in vivo*. В этом разделе мы продемонстрируем основные функциональные возможности ПЧ и подходы к их формированию.

1. *Гидрофобная поверхность.* Гидрофобная поверхность у частиц может рассматриваться как функциональность, позволяющая адсорбировать биомолекулы за счет гидрофобных взаимодействий. Это простой и универсальный метод, получивший широкое распространение в процессе получения биореагентов, особенно при использовании ПЧ на основе полистирола. Однако в этом случае предъявляются особые требования к отсутствию примесей и, прежде всего, ПАВ, которые могут конкурировать с целевыми молекулами за место на поверхности частиц. [90]

2. *Реакционноспособные группы.* Самой востребованной функциональностью, которая позволяет проводить необратимую, контролируруемую иммобилизацию биомолекул, является наличие реакционноспособных групп на поверхности частиц. Группы могут быть введены за счет использования соответствующих инициаторов, стабилизаторов или функциональных мономеров. Последний метод является самым распространенным благодаря доступности и большому разнообразию мономеров: акриловые и метакриловые кислоты (-COOH), аминоэтилметакрилат (-NH₂), хлорметилстирол (-CH₂Cl), п-формилстирол, акролеин (-CHO), гидроксиэтилметакрилат (-OH), глицидилметакрилат (эпоксигруппа) и др. [91] Кроме того, может быть проведена химическая модификация уже присутствующих на поверхности групп. [23]

Для использования в биоанализе функциональные группы должны располагаться на поверхности и быть доступными для биомолекул, но при проведении одностадийной гетерофазной полимеризации функционального мономера большая часть групп находится в объеме частицы. Поэтому наиболее перспективным методом для синтеза частиц с поверхностными функциональными группами является затравочная полимеризация с формированием структуры ядро/оболочка, где оболочка получена из полимера с функциональными группами. Для синтеза дисперсий с размерами частиц из микронного диапазона, преимущественно диапазона 0.8-3 мкм, подходящим способом представляется

дисперсионная полимеризация. Например, полистирольные частицы с гидроксильными, эпоксидными, карбоксильными, аминогруппами получают дисперсионной сополимеризацией стирола и функционального сомономера в полярной среде. [92]

3. *Стимул-чувствительная поверхность.* Функциональность ПЧ может выражаться в изменении свойств под действием внешних факторов, таких как pH, температура, ионная сила, электрическое поле, световое излучение и др., благодаря наличию стимул-чувствительных полимеров в составе или на поверхности частиц, которые обратимо реагируют на изменение условий окружения. При внешнем воздействии микроструктура данных полимеров быстро и обратимо изменяется, что обусловлено фазовыми переходами, происходящими по кооперативному механизму с изменением удельного объема макромолекул. [93,94]

Большое внимание привлекают pH-чувствительные полимеры благодаря возможности определять pH среды в живых системах в случае биомедицинского применения *in vitro* и *in vivo*. Специфический градиент pH присутствует в аномальных тканях (например, в опухолях и при воспалении) и внутриклеточном микроокружении (например, в кислых органеллах, таких как эндосомы и лизосомы). [95,96] В последнее десятилетие были разработаны и синтезированы различные типы pH-чувствительных полимеров, которые реагируют на изменение pH в зависимости от pK_a благодаря присутствию группы слабой кислоты или слабого основания, способных к ионизации. [97,98] В незаряженном состоянии эти полимерные материалы находятся в сколлапсированном состоянии, а ионизация вызывает их набухание из-за электростатического отталкивания одноименно заряженных звеньев и “распирающего” осмотического давления противоионов. Таким образом, полимеры с pH-чувствительными свойствами, в основном, подвергаются обратимому изменению растворимости в водном растворе в ответ на изменение pH. К таким полимерам могут быть отнесены белки, у которых меняется протонирование в зависимости от pH (выше или ниже pI). [99] Среди синтетических полимеров находят применение полиэлектролиты, полиакриловая кислота, поли (N-алкиламида), поли (N-алкилакриламида), блоксополимеры на основе третичного амина и метакрилата и др. [100]

Термочувствительные свойства полимеров связаны с изменением конформации полимерной цепи, что определяется изменением степени сольватации цепей в зависимости от температуры. В случае таких полимеров с ростом температуры уменьшается сольватная оболочка, что приводит к выпадению их в осадок при достижении нижней критической температуры растворения (НКТР). Температурная зависимость сольватации обеспечивает

возможность управления свойствами поверхности частиц после ее модификации термочувствительными полимерами. [100] Примерами таких полимеров являются поли(N-изопропилакриламид) [101], поли(N, N-диэтилакриламид) [102], поли(N-винилкапролактан), поли(2-гидроксиэтилвиниловый эфир), поли(2-изопропил-2-оксазолины), поли(4-гидроксибутилвиниловый эфир) [103]. ПЧ, модифицированные термочувствительными полимерами, могут быть получены осадительной полимеризацией алкилакриламидов, например, N-изопропилакриламида, в присутствии сшивающего агента, в результате которой получают частицы с полимерными цепями на поверхности, экспонированными в дисперсионную среду. [104] Полученная полимерная оболочка способна реагировать на изменения температуры благодаря конформационным изменениям полимерных цепей, связанным с дегидратацией при достижении НКТР. Однако в этом случае затруднено получение разделенных индивидуальных цепей на поверхности.

4. Функциональность, полученная за счет прививочной полимеризации.

Перспективным методом получения функциональных ПЧ является прививочная полимеризация, приводящая к закреплению на поверхности частиц одного конца полимерных цепей, экспонированных в дисперсионную среду (англ. hair particles). Существуют три подхода, которые позволяют это осуществить. При первом подходе проводят реакцию концевых групп линейных полимерных молекул с функциональными группами на поверхности предварительно синтезированных частиц. Этот метод прививочной полимеризации называется «прививка на» (англ. “grafting-to”). Например, такая прививка реализована при получении полистирольных частиц с сополимером N-акрилоилморфолина с N-акрилоксисукцинимидом на поверхности. [105] Недостатком этого подхода является низкая плотность покрытия из линейных полимеров. Второй подход основан на «прививке от» (англ. “grafting from”), при котором рост полимерных цепей идет от поверхности частиц, что может быть осуществлено при использовании методов контролируемой радикальной полимеризации. Широкие возможности для контроля и регулирования процесса полимеризации делают этот метод наиболее привлекательным при получении частиц с требуемой функциональностью. Плотность полимерных цепей на поверхности можно регулировать за счет изменения количества сайтов прививки и получать структуры от частично покрытых, так называемых «грибообразных», до плотно упакованных, таких как «щетki». [106] Примером такого подхода является полимеризация N-изопропилакриламида на частицах, полученных из поливинилбензилхлорида. [107]

Третьим подходом является гетерофазная полимеризация с использованием амфифильных полимеров или реакционноспособных ПАВ (см. п. I.1.3).

5. *Функциональность, полученная за счет адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов.* За функциональность ПЧ может отвечать заряженная поверхность, которую получают последовательной адсорбцией противоположно заряженных полиэлектролитов (англ. layer-by layer technique, LbL), приводящей к созданию полиэлектролитных комплексов (ПЭК).[108] Этот метод дает возможность за счет электростатических взаимодействий формировать на поверхности частиц оболочку заданного состава, требуемой структуры и толщины. Кроме того, на формирование ПЭК на поверхности частиц оказывает влияние не только заряд полиэлектролитов и поверхности частиц, но и конформация макромолекул, длина цепи, плотность распределения зарядов, рН и ионная сила дисперсионной среды. Влияние этих факторов было подробно описано в целом ряде работ [109–111]. Например, в изоэлектрической точке макромолекулы свернуты в плотный клубок и имеют минимальную гибкость и число сегментов. Ионизация приводит к разворачиванию цепей полимерной молекулы (за счет электростатического отталкивания одноименно заряженных фрагментов цепи), и, следовательно, к разрыхлению макромолекулярных глобул, что приводит к увеличению диаметра частиц.

Метод адсорбции полиэлектролитов является простым методом самосборки без использования сложных химических реакций и позволяет покрывать частицы различного размера, формы, морфологии одним или несколькими слоями полиэлектролитов, варьируя заряд поверхности частиц. Кроме того, полиэлектролит внешнего слоя может содержать функциональные группы для создания ковалентной связи с биомолекулами или сам являться белковой молекулой, определяющей биологические функции частиц. Простота включения неорганических частиц, таких как магнетит, TiO_2 , SiO_2 , квантовые точки и т.д., в состав ПЭК является преимуществом данного метода при создании гибридных полимерных частиц, о которых речь идет в следующем разделе.[13]

Наиболее широкое применение для формирования ПЭК на поверхности микрочастиц нашли различные комбинации синтетических полиэлектролитов. [112] Роль полианионов могут выполнять сильные полиэлектролиты, такие как полистиролсульфонат натрия (ПСС), поливинилсульфоновая кислота, полифосфат натрия, полиакрилат натрия, а также слабые полиэлектролиты, такие как полиакриловая кислота [113]. В качестве поликатионов могут выступать полиамины с различными заместителями при атоме азота, например, полиаллиламин гидрохлорид, полиэтиленимин (ПЭИ), полидиаллилдиметиламмония хлорид и т.д. [114]

В качестве компонентов ПЭК используют природные полиэлектролиты, например, белковые молекулы, чья амфотерная природа позволяет их применять в качестве либо поликатионов, либо полианионов в зависимости от значения pH. [115] Кроме того, различные природные и синтетические поли- и олигосахариды, имеющие в своей структуре функциональные группы, способные к ионизации в водном растворе, такие как аминок-, карбокси- и сульфопроизводные метилцеллюлозы, хитозана, декстрана, гепарина. [113] могут входить в состав ПЭК.

6. *Функциональность, полученная за счет введения красителей.* Большинство биоаналитических методов требует использования окрашенных и/или флуоресцентных ПЧ. Такая функциональность может быть получена за счет введения водо- или маслорастворимых органических красителей в предварительно полученные частицы путем инкапсуляции или за счет ковалентных/нековалентных взаимодействий с поверхностью. [17] Многие из органических красителей помимо окрашивания частиц также придают им флуоресцентные свойства. Инкапсуляция может протекать за счет диффузии раствора красителя в полимерную матрицу в процессе ее набухания в органическом растворителе и последующего его испарения. Также возможно образование химической связи с поверхностью при использовании красителей и частиц с реакционноспособными группами. Кроме того, краситель можно адсорбировать на поверхность частиц, включать в более гидрофильную оболочку в структурах ядро/оболочка, вводить в состав ПЭК на поверхности частиц или покрывать поверхность окрашенным полимером (например, FITC-декстран). [116][117] Существуют способы введения красителей в процессе эмульсионной радикальной сополимеризации ненасыщенных мономеров с полимеризующимися красителями, такими как азо- или антрахиноновые красители 2,4,5-трихлоро-4-(N-этил-N-акрилоилгидроксиэтил)-аминоазобензол, 2,4-дихлоро-4'-(N-этил-N-акрилоилгидроксиэтил)-аминоазобензол, 1-амино-(4-мезидиноантрахинон-2-сульфоуксусная кислота), а также с красителями, содержащими винильные группы (стильбен). [117]

7. *Функциональность для in vivo исследований.* Дисперсии ПЧ нашли применение в *in vivo* исследованиях для изучения биораспределения, токсичности, доставки лекарств, в том числе для визуализации опухолей благодаря накоплению частиц, связанному с особенностями сосудов опухоли, такими как их повышенная проницаемость и удержание введенных частиц (англ. EPR-effect). [118] Для этих исследований функциональные свойства определяются биосовместимой, нетоксичной поверхностью, на которую не сорбируются белки крови в процессе циркуляции частиц в организме. Наиболее успешно себя зарекомендовал ПЭГ, который является гидрофильным, нетоксичным, неиммуногенным

полимером, а также характеризуется низкими сорбционными свойствами в отношении белковых молекул. Поэтому активно разрабатываются способы получения частиц с цепями ПЭГ на поверхности. Прежде всего, такие частицы получают с использованием методов контролируемой радикальной полимеризации. Так, в работе Ху и соавт. [119] сообщается о методе эмульсионной полимеризации стирола с использованием КРП-инициатора на основе ПЭГ. Stoffelbach и соавт. [120] описали миниэмульсионную полимеризацию стирола, бутилметакрилата в присутствии блок-сополимера ПЭГ с полистиролом, полученного методом КРП.

I.1.5. Гибридные органо-неорганические полимерные частицы

Одним из особых видов функционализированных ПЧ являются гибридные частицы. В соответствии с разделом номенклатуры ИЮПАК "Терминология полимеров и полимеризационных процессов в дисперсных системах" гибридными частицами полимерных дисперсий (латексными частицами) являются частицы, содержащие высокомолекулярный полимер и алкидные олигомеры, или частицы, которые содержат как органическую, так и неорганическую фазы. [121] В данном обзоре будут рассмотрены гибридные частицы, объединяющие органические и неорганические материалы, которые в последние годы привлекают особенно пристальное внимание. Наноразмерные неорганические частицы (НЧ) характеризуются уникальными электрическими, магнитными, оптическими и другими свойствами, а создание композиций с полимерами на их основе позволяет получать новые материалы с особыми свойствами. [122] Полимеры со своей стороны также дают возможность регулировать свойства НЧ (например, нивелировать дефекты поверхности полупроводниковых нанокристаллов, что повышает интенсивность флуоресценции), [123] придавать им дополнительную функциональность, предохранять от воздействия окружающей среды. Среди наиболее активно используемых неорганических наночастиц следует выделить оксиды Fe, Co, Ni, Ti, Si, наночастицы Ag, Au, Pt, полупроводниковые нанокристаллы, углеродные нанотрубки, комплексы редкоземельных металлов, наночастицы с антистоксовой флуоресценцией. [14]

Существует три подхода для получения гибридных полимерных частиц (**Рис. I.6**):

1. контролируемая ассоциация органических и неорганических наночастиц методом гетерокоагуляции;
2. инкапсуляция в процессе полимеризации мономеров в присутствии неорганических наночастиц;

3. совместная реакция полимерных частиц и неорганических прекурсоров, приводящая к получению гибридных частиц.

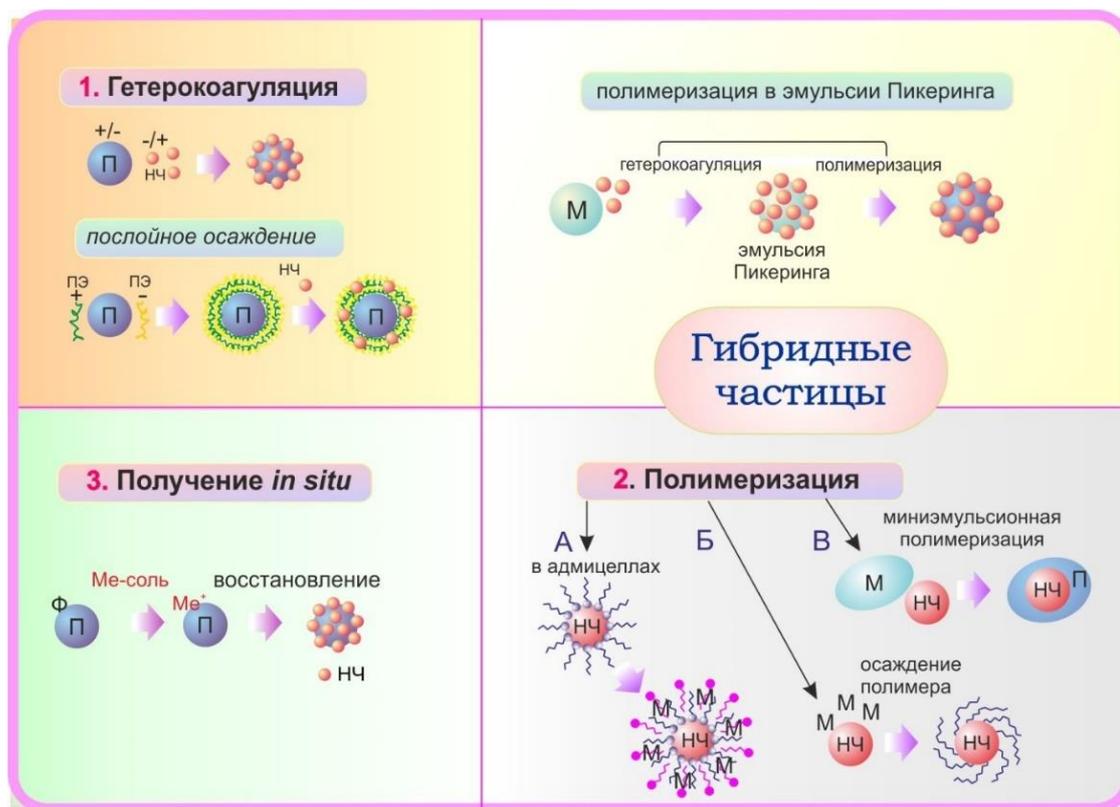


Рисунок I.6. Подходы для получения дисперсий гибридных полимерных частиц.

Подход 1. Основной движущей силой гетерокоагуляции, в результате которой происходит адсорбция неорганических на полимерные частицы или наоборот, является электростатическое притяжение, действие которого объясняется теорией Дерягина-Ландау-Вервея-Овербека (ДЛВО). [124] В этом случае частицы должны иметь противоположные заряды. Необходимо также учитывать влияние сил отталкивания со стороны уже адсорбированных частиц, что является причиной формирования только монослоя частиц на поверхности. Используя данный подход, Hansen и соавт. [125] адсорбировали отрицательно заряженные карбоксилированные частицы полиметилметакрилата (40 нм) на неорганические частицы гематита и оксида алюминия.

Одним из вариантов гетерокоагуляции за счет электростатического притяжения является адсорбция неорганических частиц в составе ПЭК на поверхности полимерных частиц. В этом случае количество неорганических частиц можно легко контролировать количеством последовательных циклов адсорбции и получать покрытие, отличное от монослоя. [14] Гетерокоагуляция частиц также может быть результатом гидрофобных

взаимодействий, приводящих к образованию агрегатов в воде, вызванному стремлением снизить межфазное натяжение между гидрофобным соединением и водой. Hong и соавт. [126] получили полистирольные частицы, частично покрытые тонким слоем золотых частиц (композиция «полусфера»), предварительно модифицированных октадекантиолом для придания гидрофобных свойств. На свободную от золота часть частиц были иммобилизованы олигонуклеотиды и при добавлении электролита наблюдали переходы от отдельных частиц к кластерам, а затем к нитям из частиц. Процесс гетерокоагуляции может также протекать за счет действия водородных связей, π - π взаимодействий, а также при биоспецифических взаимодействиях, таких как антиген/антитело, биотин/стрептавидин и др. [127]

Подход 2. Условием инкапсуляции НЧ при полимеризации мономеров в присутствии неорганических наночастиц является нерастворимость полимера в воде. Наиболее ярко свойства неорганических частиц наблюдаются при их равномерном распределении или включении одной частицы в полимерную матрицу. Поэтому важным фактором получения гибридных частиц является эффективное диспергирование частиц в дисперсионной среде на начальной стадии и поддержание коллоидной стабильности в процессе полимеризации. Можно выделить три основных способа получения гибридных частиц (**Рис. I.6**) [14]:

А. Формирование адмицелл (адсорбционных бислоев) на поверхности неорганических частиц, в которые поступает мономер и протекает полимеризация. Для эффективного включения НЧ необходимо снизить межфазное натяжение между частицей и мономером. Обычно для этого создают гидрофобную область, расположенную в бислое ПАВ, одним из компонентов которого является ПАВ на поверхности НЧ, используемое в процессе их получения или гидрофобизации и обеспечивающее диспергирование в неполярных растворителях. Добавление второго ПАВ приводит к формированию бислоя на поверхности НЧ, а гидрофобная область между двумя ПАВ позволяет сольубилизовать мономер и проводить полимеризацию вблизи поверхности. [128] В этом случае реализуется, так называемый, адмицеллярный механизм полимеризации. Впервые такой подход был использован Meguro и коллегами [129] для инкапсуляции оксида железа и диоксида титана в процессе эмульсионной полимеризации стирола в бислое, полученном при участии додецилсульфата натрия.

Б. Осаждение на поверхность неорганических частиц полимерных цепей в процессе их полимеризации. Chaimberg и соавт. в работе [130] впервые сообщили об инкапсулировании НЧ за счет полимеризации мономеров и последующего осаждения полимерных цепей на

поверхность частиц. Прививочную полимеризацию поли-N-винилпирролидона на поверхность НЧ диоксида кремния проводили после модификации непористой поверхности НЧ винилтриэтоксисиланом в ксилоле и диспергировании в водном растворе винилпирролидона. Полимеризация, проводимая в присутствии инициатора, пероксида водорода, приводила к осаждению полимерных молекул на поверхность и инкапсулированию НЧ.

Это способ также может быть реализован, например, в процессе эмульсионной полимеризации, которую использовали при создании гибридных частиц с оксидом железа.[131] Для получения водной дисперсии НЧ их стабилизировали метакриловой кислотой, затем адсорбировали катионный инициатор гидрохлорид 2,2'-азо-бис-метилпропионамидина и проводили полимеризацию с преимущественным формированием полимера на поверхности. Полученные полимер-модифицированные частицы оксида железа агрегировали и формировали частицы с «малинообразной» морфологией.

В. Получение полимеров из капель мономера, содержащих неорганические частицы (метод миниэмульсионной полимеризации). Важным способом инкапсуляции НЧ является миниэмульсионная полимеризация, в которой зарождение ПЧ происходит в каплях мономеров с диспергированными НЧ. Такой способ позволяет эффективно инкапсулировать НЧ и получать гибридные частицы в диапазоне размера капель. Однако для равномерного распределения гидрофильных НЧ в каплях мономера их необходимо гидрофобизовать, что обычно реализуется при адсорбции на поверхности НЧ амфифильного мономера или стабилизатора.[132] Кроме того, формирование прочной связи синтезируемого полимера с НЧ может быть осуществлено после модификации поверхности НЧ соединениями с реакционноспособными двойными связями. [133] Например, эффективная инкапсуляция НЧ Fe_3O_4 , Au и CdTe была продемонстрирована Yang и соавт.[134] при переводе НЧ из водной в органическую фазу с использованием водного раствора реакционноспособного ПАВ и ко-эмульгатора. Последующее диспергирование в стироле, содержащем инициатор 2,2'-азо-бис-изобутиронитрил, и проведение полимеризации привело к формированию полимерных частиц (3 мкм) с равномерным распределением НЧ по объему частицы [14].

Объединение подходов 1 и 2. Рассмотренные два подхода по получению гибридных частиц, гетерокоагуляция и полимеризация в присутствии НЧ, могут быть объединены. Такой объединенный способ реализуется при проведении полимеризации в эмульсиях Пикеринга, которые представляют собой капли эмульсии, например, мономера, стабилизированные коллоидными частицами (**Рис. I.6**). Движущей силой адсорбции НЧ на

межфазной границе жидкость-жидкость является их частичная смачиваемость обеими жидкими фазами. Тип формируемой эмульсии (прямая или обратная) зависит от краевого угла смачивания между твердой частицей и межфазной поверхностью. Важным достоинством эмульсий Пикеринга, по сравнению с эмульсиями, стабилизированными ПАВ, является их более высокая агрегативная стабильность за счет «связанных» монослоев коллоидных частиц, создающих механические и стерические барьеры [14]. «Связанные» означает плотное покрытие поверхности капли частицами, между которыми действуют силы притяжения,[135] а также отсутствует десорбция с поверхности.[127]

При таком комбинированном подходе синтез гибридных частиц состоит в получении стабильных эмульсий Пикеринга из исходного мономера, а затем проведение полимеризации. Одним из часто используемых методов является суспензионная полимеризация, например, стирола и различных сомономеров в присутствии частиц гидроксипатита,[136] магнетита,[137] квантовых точек.[138] Использование методов миниэмульсионной полимеризации позволяет получать гибридные частицы меньшего диаметра и контролируемой морфологии.[139] Так, Fortuna и соавт. [140] сообщают о синтезе ПЧ с унимодальным распределением по размерам (209 нм) методом миниэмульсионной полимеризации стирола, инициируемой 2,2'-азо-бис-2,4-диметилвалеронитрилом, используя для стабилизации капель мономера НЧ диоксида кремния (12.5 нм) [14].

Подход 3. Формирование гибридных частиц может быть реализовано в процессе совместной реакции органических и неорганических прекурсоров. В частности, металлические и полупроводниковые частицы, а также оксиды металлов получают *in situ* на поверхности или в объеме полимерной частицы, используемой в качестве матрицы. Например, прекурсоры в виде солей металлов адсорбируют на поверхность матрицы в процессе реакций ионного обмена или комплексообразования.[141][142] Для реализации этого подхода сначала получают полимерную матрицу, которая должна иметь функциональность, отвечающую за высокую аффинность связи с металлическими прекурсорами. Такие функциональные группы, как карбоксильные, гидроксильные, тиольные, амино-, пиридиновые и цианогруппы, позволяют сорбировать соли металлов, которые в результате воздействия восстанавливающих агентов становятся нейтральными коллоидными частицами. НЧ также могут быть получены из прекурсоров путем гидролиза [143], термического разложения [144].

Wen и соавт. [145] методом безэмульгаторной эмульсионной полимеризации синтезировали частицы «ядро/оболочка» на основе сополимера полистирола с поли-N-

винилпиридином, выступающие в качестве матрицы для синтеза НЧ палладия, золота или серебра. Благодаря наличию пиридиновых групп, способных координировать различные ионы переходных металлов [146], на поверхность матриц сорбировали PdCl_2 , HAuCl_4 , AgNO_3 , которые затем восстанавливали при участии NaBH_4 . В результате получали гибридные частицы, содержащие во внешней оболочке частицы Pd, Au или Ag, в соответствии с добавленными солями. Таким образом, данный подход позволяет проводить селективную нуклеацию и контролируемый рост НЧ на поверхности или в объеме полимерной матрицы, которые не снижают коллоидной устойчивости дисперсий ПЧ. [14]

I.1.6. Применение дисперсий ПЧ в биотехнологии и биомедицине

Впервые биоанализ с использованием дисперсий ПЧ был реализован J.Singer в 1956 г для определения ревматоидного фактора.[4] В основе этого анализа лежала реакция латексной агглютинации, при которой к дисперсии полимерных частиц, конъюгированных с антителами, добавляли антиген и наблюдали агрегацию (агглютинацию) частиц за счет протекания биоспецифической реакции [147] (**Таблица I.2**). Дальнейшее развитие метода латексной агглютинации позволило разработать анализы для определения более ста различных заболеваний, вызываемых бактериями, вирусами, микобактериями.

Дисперсии ПЧ находят все более широкое применение для разработки анализов, позволяющих определять наличие или концентрацию биологически значимых аналитов (например, антител, ферментов, ДНК и т.д.).[148] В настоящее время ПЧ используют в качестве носителей биомолекул, маркеров, позволяющих облегчить *in vitro* и *in vivo* визуализацию и количественно оценить результаты биоспецифических реакций, а также в составе биосенсоров. Эти реакции основаны на высокоаффинном взаимодействии стереоспецифически комплементарных молекул, таких как «антиген-антитело», «биотин-стрептавидин», «углевод-лектин», «иммуноглобулин-белок А», «рецепторный белок-транспортный белок», «гость-хозяин», «комплементарные поли- и олигоуклеотид» и др. [149] В общем случае детектирование и измерение сигнала от частиц-маркеров в свободной фракции или в комплексе с аналитом позволяют идентифицировать и определять количество аналита [14].

Существует широкий спектр различных биоприложений, связанных с применением дисперсий ПЧ, таких как клеточная и молекулярная биология, энзимология, иммунология, диагностика, *in vitro* и *in vivo* визуализация, биосепарация, доставка лекарственных средств, скрининговые исследования и мониторинг функций на уровне живого организма.

Дисперсии ПЧ также активно применяются в ветеринарии, оценке качества продуктов питания, мониторинге состояния окружающей среды, терапии.[22]

Необходимым условием использования ПЧ в большинстве биоанализов является узкое распределение по размерам при заданном диаметре частиц; коллоидная и химическая устойчивость в условиях медико-биологических исследований; функциональность, обеспечивающая присоединение биолигандов, формирование и усиление сигнала при биоспецифических взаимодействиях. [149]

Важным этапом на пути применения полимерных частиц в качестве биореагентов является получение их конъюгатов с биомолекулами. Конъюгация может быть осуществлена за счет адсорбции или через образование ковалентной связи. В первом случае конъюгат «полимерная частица-биомолекула» получают, прежде всего, за счет адсорбции, движущей силой которой являются гидрофобные взаимодействия. Этот способ реализуется при адсорбции гидрофобных лигандов, таких как, например, иммуноглобулины, на гидрофобную поверхность частиц, например, полистирольных.[15] Адсорбция также может протекать за счет электростатических взаимодействий, ярко выраженных при функционализации частиц слоями полиэлектролитов, что позволяет иммобилизовать биомолекулы, а также проводить секвенирование одноцепочечной ДНК с низким неспецифическим связыванием.[150] Адсорбция биомолекул стимул-чувствительными полимерами на поверхности частиц дает возможность получать реагенты, реагирующие на изменения окружающей среды, например, высвобождать лекарственные средства при изменении температуры.[151] Адсорбция является простым способом получения конъюгатов, однако в этом случае сложно управлять ориентацией биомолекул и получать оптимальное расположение сайтов для связывания аналитов на поверхности полимерных частиц. [152] Кроме того, наблюдается десорбция биомолекул в дисперсионную среду при хранении.

Получение конъюгатов за счет образования ковалентной связи возможно при наличии функциональных групп на поверхности полимерных частиц или на цепях привитых полимеров, экспонированных в дисперсионную среду. Ковалентное связывание обеспечивает необходимую ориентацию биомолекул при использовании рациональных химических способов создания связи между функциональными группами, позволяет регулировать плотность иммобилизованных биомолекул, препятствует десорбции при очистке и в процессе хранения.[152]

Анализы с участием дисперсий ПЧ могут быть условно классифицированы по способу проведения, как гомогенный, гетерогенный и анализ, основанный на

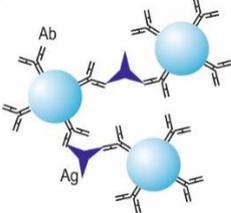
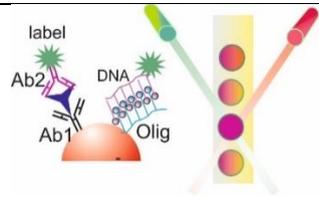
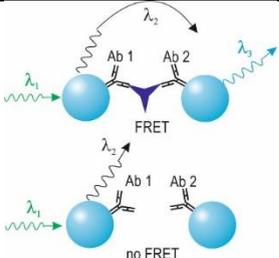
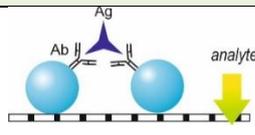
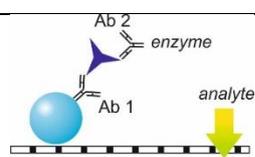
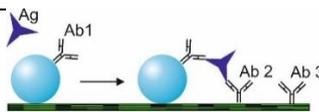
маркировании.[19] В гомогенном анализе конъюгаты частиц и анализируемый образец смешивают, инкубируют и анализируют без выделения продукта реакции из реакционной смеси. Преимуществами такого способа являются высокие скорости протекания биоспецифических реакций, простота формата анализа и детекции результатов, как невооруженным глазом, так и доступными инструментальными методами. Эти преимущества связаны с небольшим количеством стадий, малыми объемами, незначительными потерями продукта при постановке анализа и невысокой ценой. Гомогенный анализ является оптимальным форматом для проведения высокопроизводительных скрининговых исследований и диагностических анализов. В основном для этого вида анализа используют окрашенные и флуоресцентные ПЧ, а также гибридные частицы, наполненные квантовыми точками, апконвертирующими наночастицами, комплексами редкоземельных металлов (Таблица I.2) [14].

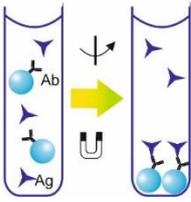
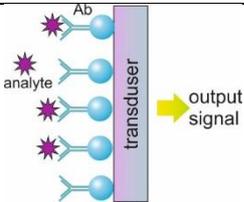
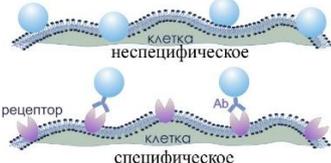
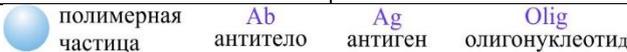
В некоторых случаях ограничением гомогенного анализа является наличие высокого сигнала фона, влияние которого можно уменьшить за счет управления концентрацией полимерных частиц в пределах, позволяющих без снижения скорости реакции проводить анализ с высокой чувствительностью.[153]

Гетерогенный анализ обычно является двухстадийным процессом, в котором присутствует стадия отделения связанных аналитов от свободных за счет осаждения, фильтрации, центрифугирования, хроматографии и др. Этот формат сложнее и требует больше времени для получения результатов, чем в случае гомогенного анализа.[154] Однако гетерогенный анализ является более чувствительным методом, поскольку присутствует стадия удаления непрореагировавших компонентов и, следовательно, наблюдается заметное снижение фонового сигнала. В качестве примеров гетерогенных анализов можно привести следующие методы, адаптированные к использованию ПЧ: иммунофильтрация, твердофазный иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, флуороиммуноанализ, магнитная сепарация биообъектов, разделение центрифугированием и фильтрацией, выделение ДНК при участии магнитных частиц, секвенирование, 2D и 3D биосенсоры и др. (Таблица I.2). В этих видах анализа активно используются окрашенные и флуоресцентные частицы, а в сепарационных методах большую популярность получили частицы, обладающие магнитными свойствами.

Таблица. I.2.

Иллюстрация гомогенных, гетерогенных биоанализов и анализов, основанных на маркировании клеток, с участием ПЧ. Адаптировано из [26]

Метод	Схема	Формат	Детекция
Гомогенный анализ			
Реакция латексной агглютинации		Частицы агрегируют в присутствии аналита. Проводят на стекле. В планшете, в пробирке.	Невооруженным глазом, спектрофотометрически, турбидиметрия, нефелометрия, подсчет частиц.
Цитофлуориметрический мультиплексный анализ		Двухлучевая детекция кодированных частиц. Проводят в планшете.	Мультипараметрическая проточная цитометрия (Luminex), Определение до 300 аналитов.
На основе Ферстеровской резонансной передачи энергии (FRET)		Детекция флуоресценции частиц на длине волны λ_3 . Проводят в объеме кюветы.	Флуориметрия.
Гетерогенный анализ			
Имунофильтрация		Образование окрашенного зонтика из частиц на фильтре.	Невооруженным глазом, фотометрия.
Твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA)		Сигнал (окрашивание) от фермента. Проводят на фильтре, в планшете.	Фотометрия.
Имунохроматография (тест-полоски)		Формирование полосы в присутствии аналита.	Невооруженным глазом, флуориметрия

Биосепарация		Разделение частиц после инкубации с аналитом центрифугированием, с помощью магнита, фильтра.	Флуориметрия, спектрофотометрия.
2D-биосенсор		Преобразование сигнала в результате реакции с аналитом частиц, адсорбированных на стекле, металле, полимере.	Выходной сигнал: изменение поглощения, проводимости, флуоресценции, определение протона, пероксида водорода
Маркирование клеток			
Визуализация рецепторов и маркирование клеток		Детекция флуоресцентного сигнала в кювете, в планшете	Конфокальная микроскопия, проточная цитометрия
			

Высокая чувствительность (определение до 10^{-18} моль аналита) при относительно быстром протекании процесса (до 3 часов) может быть достигнута в случае мультиплексного гетерогенного метода анализа, в котором задействованы два типа частиц (**Рис. 1.7**). Одни частицы представляли собой функционализированные магнитные частицы (МЧ, 2.8 мкм), содержащие на поверхности адресные молекулы к аналиту (например, антитела, олигонуклеотиды, аптамеры). В качестве других частиц выступали частицы коллоидного золота (Au-НЧ, 4 нм) с другим агентом распознавания, который может формировать сэндвич-структуру с МЧ через аналит, а также содержали одноцепочечные олигонуклеотиды с тиольными группами.[155] В анализе могут участвовать до ста Au-НЧ, кодированных этими олионуклеотидами. После инкубации двух типов частиц с анализируемым образцом формируются сэндвич-структуры, которые отделяют с помощью магнитного поля от непрореагировавших Au-НЧ. Затем добавляют дитиотреитол для удаления непрореагировавших кодирующих олигонуклеотидов, которые идентифицируют на микрочипе с помощью сканера [156] или *in situ*, если олигонуклеотиды содержат маркер (например, флуорофор, хемилюминесцентный зонд, краситель или окислительно-восстановительный компонент).[157]

Анализ, основанный на маркировании и визуализации клеток и биотканей, играет важную роль в медико-биологических исследованиях, поскольку позволяет проводить неинвазивную раннюю *in vitro* и *in vivo* диагностику, наблюдение и терапию, в частности, раковых опухолей.[158] ПЧ могут выступать как в качестве неспецифических контрастирующих агентов для окрашивания клеток за счет эндоцитоза, так и для направленной доставки к целевым клеткам. Специфичность маркирования обеспечивается выбором мишени на поверхности клетки, оптимально подходящей для каждого конкретного случая, и соответствующей адресной молекулы. В качестве специфичных мишеней для диагностики чаще всего используют рецепторную часть сигнальных белков на мембране клеток (Таблица I.2).

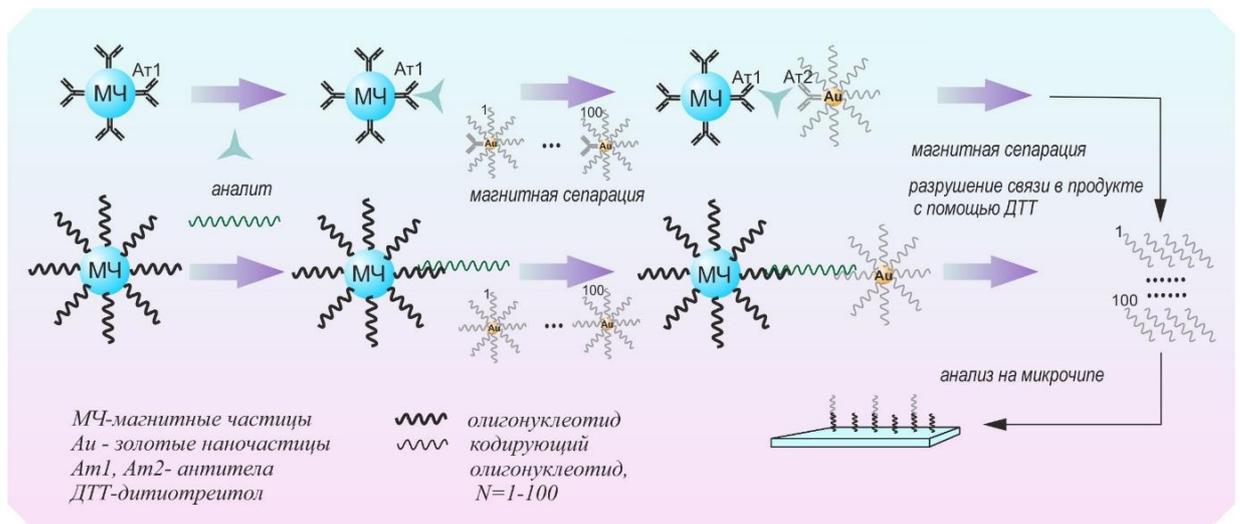


Рисунок I.7. Схема мультиплексного гетерогенного анализа для определения белков и нуклеиновых кислот с использованием ПЧ.

В последнее время достигнуты значительные успехи в применении дисперсий ПЧ для изучения биораспределения, токсичности и целевой доставки лекарственных средств *in vivo*. Механизм доставки ПЧ может быть пассивным, при котором аккумуляция частиц происходит за счет структурных особенностей тканей, и активным, когда для адресной доставки присоединяют адресные молекулы, которые связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток патологических тканей.

Новые форматы биоанализов, разработанные в последнее десятилетие, позволили повысить чувствительность, селективность, снизить затраты и время на их проведение.[159] Открытие новых биомаркеров и новый уровень понимания молекулярных основ болезненных состояний также явились толчком к созданию новых методов. Однако

многие метаболические, дегенеративные, злокачественные и инфекционные заболевания не могут быть выявлены с использованием одного маркера, поэтому актуальным является создание полимерных частиц для проведения мультиплексного анализа. Это может быть реализовано путем использования окрашенных [160], флуоресцентных [161], гибридных [162] полимерных частиц с различной функциональностью, а также частиц с лекарственными средствами.[163]

I.2. Неорганические наночастицы и наноструктуры на их основе

К наноматериалам согласно определению, принятому в нанотехнологии, относятся объекты, которые имеют одно или несколько измерений в нанометровом диапазоне (<100 нм) и демонстрируют новые особые свойства, отличные от свойств основного материала. В последние годы синтез, исследование свойств и применение наночастиц являются одними из наиболее важных разделов нанобиотехнологии. Пристальное внимание исследователей к наночастицам обусловлено значительными изменениями в физико-химических свойствах материала при переходе от микрочастиц к наночастицам. Наиболее важными характеристиками частиц из нанометрового диапазона, среди множества других, являются следующие: 1. малый размер частиц, который приводит к увеличению отношения площади поверхности к объему и, как следствие, к появлению квантовых эффектов; 2. преобладание поверхностных атомов над атомами в объеме в результате увеличения площади поверхности. Эти свойства наночастиц определяют их принципиальное отличие от базового материала и делают их чувствительными к действию света, магнитного или электрического полей [164].

Наноразмерные частицы различного состава и физико-химических свойств (неорганические соли и оксиды, металлы, полупроводники и т.д), а также имеющие разнообразную форму (сферы, стержни, шестиугольники, треугольники и т.д.) являются платформой для создания таких новых продуктов с усовершенствованными качествами, как средства доставки лекарств, имплантаты, биосенсоры, диагностические и тераностические структуры, визуализирующие и магнитные метки, агенты для биосепарации, устройства для электроники и оптоэлектроники и др. [165]. В настоящее время большое внимание уделяют использованию неорганических наночастиц в биомедицинских исследованиях. Полупроводниковые квантовые точки коммерчески доступны и являются перспективной альтернативой микрочастицам с флуоресцентной меткой, а наночастицы оксида железа одобрены для использования в магнитно-резонансной томографии человека в качестве

контрастирующих меток [166]. Большой интерес в биомедицинских исследованиях представляют плазмонные наночастицы, которые имеют ряд преимуществ благодаря наличию полосы локализованного поверхностного плазмонного резонанса в УФ-видимой и ближней ИК-областях спектра [167]. Частота плазмонного резонанса непосредственно связана с размером и формой частиц, а также чрезвычайно чувствительна к незначительным изменениям в физико-химических свойствах, например, к изменению расстоянию между наночастицами [168]. В некоторых случаях регистрируется настолько существенный сдвиг в плазмонной частоте, связанный с размером, что для регистрации изменения цвета дисперсии наночастиц не требуется специального оборудования. Наиболее сильный плазмонный эффект проявляют наночастицы Ag и Au, которые нашли разнообразное применение в бионанотехнологии [169].

Синтез НЧ является сложным процессом и существует большое количество разнообразных методов для получения различных видов наночастиц и практически невозможно обобщить все методы синтеза, доступные в настоящее время. Подходы к синтезу НЧ могут быть разделены на две категории: «сверху-вниз» (англ. “top-down”) и «снизу-вверх» (англ. “bottom-up”). В случае подхода «сверху-вниз» первоначально традиционными методами получают материал, который затем обрабатывают с использованием механических (например, измельчение) и оптических (например, лазерная абляция) устройств. [170,171] Подход «снизу-вверх» основан на свойстве молекул формировать супрамолекулярные структуры. Для этого проводят химический синтез, осаждение из паров, используют метод самосборки или коагуляции, и др. [172][173] Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки, однако, подход «снизу-вверх» позволяет получать наночастицы меньшего размера при эффективном контроле всех параметров системы и минимальных затратах энергии по сравнению с подходом «сверху-вниз». Перспективным направлением является комбинация двух подходов, например, в случае наночастиц со структурой «ядро-оболочка» используют подход «сверху-вниз» для получения ядра, а покрывают их оболочкой с помощью методов подхода «снизу-вверх» для точного контроля толщины и равномерного формирования оболочки.

Неорганические наночастицы структуры «ядро-оболочка» привлекают большое внимание исследователей, поскольку они могут представлять свойства, которые невозможно реализовать в наночастицах, полученных из одного материала. Свойствами наночастиц «ядро-оболочка» можно управлять, меняя материал ядра и/или оболочки, а также варьируя их соотношение. Оболочка позволяет предохранить от воздействия окружающей среды свободные излучающие центры на поверхности ядра, повысить

термостабильность, диспергируемость, внести новую функциональность, и др. Такой подход ведет к значительному расширению спектра свойств наночастиц, что позволяет их использовать для решения самых разнообразных задач нанотехнологии. [174]

Большое количество исследований в нанобиотехнологии основано на детекции люминесцентного сигнала и, прежде всего, флуоресценции, которая возникает под действием оптического излучения. Флуоресцентные методы являются одними из самых чувствительных и превосходят методы детектирования, которые базируются на поглощении света или использовании радиоактивных меток. [175] Для реализации преимуществ этих методов при решении задач биотехнологии и биомедицины следует использовать флуоресцентные метки, которые характеризуются высокой чувствительностью, флотабильностью, нетоксичностью, биосовместимостью и минимальными размерами для получения информации с максимальным пространственным разрешением. Метки должны иметь высокий квантовый выход и функционализированную поверхность, а также сохранять химическую, физическую и коллоидную устойчивость в процессе биореакций. [176] Сегодня в качестве таких флуоресцентных меток нашли широкое применение такие НЧ, как полупроводниковые нанокристаллы, также известные как квантовые точки, и нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией, так называемые апконвертирующие нанофосфоры. Описание свойств данных наночастиц представлено в следующих главах.

1.2.1. Полупроводниковые нанокристаллы

Перспективными флуоресцентными наночастицами являются полупроводниковые нанокристаллы, так называемые квантовые точки (КТ, *англ.* quantum dots, QDs), обладающие уникальными оптическими и физико-химическими свойствами. Традиционно используемые флуорофоры (органические красители и флуоресцентные белки) имеют целый ряд ограничений и, прежде всего, связанных с низкой устойчивостью к фотовыцветанию, незначительной спектральной разницей в длинах волн возбуждения и эмиссии.

Квантовые точки (КТ) являются нанокристаллами, состоящими из полупроводниковых материалов на основе комбинации элементов из II и VI групп периодической таблицы (например, CdSe, CdS, ZnSe). Реже используют КТ из комбинации элементов III и V групп (например, InAs, InSb, GaAs). Термин «точка» характеризует малые размеры этих нанокристаллов (до 10 нм), которые обычно не превосходят радиус экситона Бора. В результате свойства вещества начинают определяться не только его химическим

составом, но и, преимущественно, размером наночастиц. Это определяет уникальные оптические и физико-химические свойства КТ, выгодно отличающие их от традиционных флуорофоров [177].

I.2.1.1. Оптические свойства КТ

Оптические свойства КТ связаны с взаимодействием электронов и дырок с их локальным окружением. Возбуждение нанокристаллов фотонами с энергией больше ширины запрещенной зоны вызывает движение электронов к зоне проводимости, при этом дырка остается в валентной зоне полупроводника, а рекомбинация электрона и дырки приводит к излучению. Связанное состояние электрона и дырки представляет собой экситон, характерный размер которого определяют, как радиус Бора. При уменьшении размера КТ ниже радиуса Бора появляется ограничение движения экситона в нанокристалле [178], что вызывает изменение в оптических и электронных свойствах КТ по сравнению с материалом в массе. В частности, уровни энергии в зоне проводимости и валентности становятся дискретными. В результате свойства КТ определяются степенью ограничения движения экситона и, следовательно, напрямую зависят от размера нанокристаллов, т.е. реализуется эффект наноразмерного квантования. [179] По мере усиления ограничения возрастает разница энергий между валентной и проводящей зонами, что, соответственно, влияет на энергию излучаемых фотонов, поэтому можно управлять оптическими свойствами КТ путем выбора материала и размера нанокристаллов. [180]

Таким образом, в зависимости от размера и состава можно получать КТ с пиком флуоресценции в диапазоне от УФ- до ИК-области (**Рис. I.8**). В частности, нанокристаллы CdS и ZnSe флуоресцируют в УФ-видимом спектральном диапазоне. [181] Эмиссия нанокристаллов CdSe разных размеров регистрируется практически во всем видимом диапазоне, а КТ состава InP или InAs флуоресцируют в ИК диапазоне. [182]

КТ обладают высоким коэффициентом молярной экстинкции (в 10–100 раз больше, чем у органических красителей), который составляет порядка 10^5 — 10^6 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ для КТ из CdSe и зависит от размера частиц и длины волны возбуждения. [183] Это значение существенно больше, чем у органических красителей. Таким образом, флуоресценция единичной КТ с оболочкой ZnS, оказывается примерно в 20 раз интенсивнее, чем флуоресценция органических красителей при фотостабильности, превышающей стабильность органических красителей в 100—3000 раз. [181]

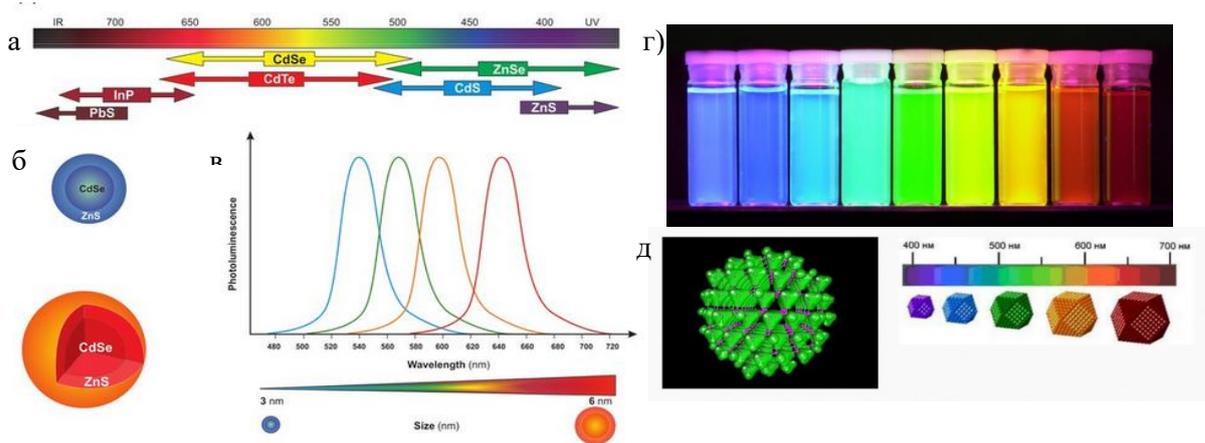


Рисунок 1.8. Спектральный диапазон флуоресценции КТ различного состава (**а**); схематическое представление структуры ядро/оболочка КТ состава CdSe/ZnS (**б**); спектры флуоресценции КТ в зависимости от размера частиц (**в**) и флуоресценция дисперсий CdSe/ZnS (**г**), размер КТ увеличивается от ~ 2 нм до ~ 6 нм (слева направо); схематическое представление нанокристалла КТ (**д**) [181].

Обычно в кристаллической структуре или на поверхности присутствуют дефекты, на которых происходит тушение флуоресценции (англ. trap), поскольку электроны и дырки могут рекомбинировать из-за этих дефектов, что приводит к сдвигу максимума флуоресценции. [184] С уменьшением размера КТ увеличивается процент атомов, расположенных на поверхности. Например, 30% атомов у нанокристаллов CdSe с размером ~ 6 нм находятся на поверхности КТ (**Рис. 1.8д**), а в случае КТ CdSe с размером 2 нм - 90% атомов. [185] Структура поверхности и наличие дефектов существенно влияют на флуоресцентные свойства КТ, поэтому необходимо контролировать обработку поверхности для получения интенсивно флуоресцирующих КТ. Эффективность флуоресценции КТ определяется квантовым выходом (англ., quantum yield, QY), который представляет отношение между количеством испускаемых и поглощенных фотонов. Для большинства КТ значения QY обычно составляют 10%-30%. Одним из путей повышения квантового выхода является создание структуры ядро/оболочка, в которых оболочка получена также из полупроводникового материала, например, CdSe(ядро)/ZnS (оболочка). В этом случае удастся предохранить КТ от фотоокисления, повысить оптическую активность и квантовый выход до 50-90%. [186][187]

Кроме того, КТ обладают широким пиком поглощения, значительной спектральной разницей между максимумами поглощения и флуоресценции, узким и симметричным максимумом флуоресценции (ширина пика на полувысоте составляет ~25–40 нм). На положение пика флуоресценции, как было представлено выше, влияет размер ядра, что

определяет возможность создания широкого набора различных КТ, флуоресцирующих в диапазоне спектра от УФ до ИК. Следует отметить, что широкий пик возбуждения, характерный для КТ, позволяет возбуждать смесь различных КТ светом одной длины волны, сильно удаленной (>100 нм) от пиков их флуоресценции. [188] Эти особенности КТ определяют возможность разработки мультиплексных методов для идентификации различных биологических объектов по сравнению с другими красителями. [189]

1.2.1.2. Синтез КТ

Синтез наиболее исследованной группы КТ (из элементов группы II–VI периодической системы) подробно изложен в обзорах [190,191]. Длина волны пика флуоресценции находится в строгой зависимости от размера нанокристаллов, поэтому важно синтезировать КТ заданного диаметра с узким распределением по размерам. Это является сложной задачей, на решение которой были направлены усилия исследователей в последнее десятилетие. Большинство методов основано на контролируемой реакции осаждения из прекурсоров КТ, а также на синтезах в условиях ограниченной геометрии. Данные методы позволили получать КТ с необходимыми фотофизическими и коллоидными свойствами.

Однако качественный скачок в синтезе КТ произошел в связи с разработкой Murray и соавт. [183] методов на основе металлоорганического синтеза. КТ общей формулы CdE ($E=S, Se, Te$) получали пиролизом металлоорганических реагентов в кипящем координационном растворителе. По этой методике диметилкадмий и селеновую пудру, растворенные в триалкилфосфин бутиле, вводят в триоктилфосфиноксид (ТОФО) при $340\text{—}360^\circ\text{C}$, что приводит к формированию зародышей нанокристаллов. Адсорбция молекул растворителя на поверхности зародышей обеспечивает осаждение и рост нанокристаллов. Коллоидная устойчивость обеспечивается присутствием на поверхности нанокристаллов стабилизатора ТОФО. При такой процедуре реализуется однородное зарождение нанокристаллов с последующим медленным ростом и отжигом. В результате получали КТ с совершенной кристаллической структурой и узким распределением по размерам. Однако КТ имели относительно низкий квантовый выход флуоресценции, для повышения которого была разработана методика пассивации поверхности с использованием органических лигандов, а также разработана технология получения оболочки из полупроводникового материала для структур «ядро-оболочка». [183]

После отработки условий синтеза КТ высокого качества усилия исследователей сфокусировались на совершенствовании их функциональных и флуоресцентных свойств с

использованием методов поверхностной химии. КТ обладают большой площадью поверхности, что приводит к коллоидной нестабильности, поэтому необходима стабилизация поверхности подходящими лигандами. Выбор лиганда имеет решающее значение, поскольку он взаимодействует с поверхностью КТ, что влияет на их флуоресцентные свойства. В некоторых случаях трудно контролировать количество лиганда на поверхности КТ и стабильность полученного покрытия. [192] Кроме того, гидрофобная природа поверхностных лигандов также является проблемой для использования КТ во многих приложениях. Например, синтез КТ с высоким QY в основном проводится при повышенных температурах в присутствии ТОФО в качестве стабилизирующего лиганда. [193] В результате получают КТ, покрытые гидрофобными молекулами ТОФО, которые растворимы только в неполярных растворителях. Однако применение в биотехнологии и биомедицине находят КТ, диспергируемые в водной среде и стабильные в определенном диапазоне рН. Это требует разработки методов гидрофилизации поверхности КТ, позволяющих получать водные коллоидно-устойчивые пробы КТ при сохранении их фотофизических свойств.

1.2.1.3. Гидрофилизация КТ

Гидрофилизация поверхности КТ решает задачи не только получения КТ, стабильных в водной среде при сохранении их оптических свойств, но и обеспечивает их функциональность, биосовместимость, неиммуногенность при использовании *in vivo*. В литературе представлено большое количество работ, посвященных методам гидрофилизации КТ, стабилизированных гидрофобными молекулами. [194–196] Можно выделить три основных подхода к гидрофилизации нанокристаллов (**Рис. 1.9**): 1. путем замещения лиганда ТОФО на поверхности КТ бифункциональными молекулами; 2. за счет гидрофобных взаимодействий между молекулами ТОФО и гидрофобными участками дифильных молекул; 3. путем включения КТ в полимерные частицы.

1 подход, основанный на замещении лиганда ТОФО на поверхности КТ бифункциональными молекулами.

Метод основан на удалении с поверхности КТ стабилизатора ТОФО и замене его на бифункциональные молекулы, которые содержат тиольные или фосфиновые группы, способные формировать связи с атомами цинка или серы на поверхности КТ, например: меркаптоуксусная кислота [197], меркаптопропионовая кислота [192], цистеин, цистеамин [198], дитиотреитол [199], липоевая кислота [200], олигомерные фосфины [201] и т.п. В качестве замещающих молекул могут также выступать SH-производные этиленгликоля,

SH-содержащие ДНК, белки или пептиды. [202–204] Данный подход позволяет получать гидрофилизированные КТ, содержащие на поверхности функциональные группы, которые необходимы для создания конъюгатов с биомолекулами и биополимерами за счет образования ковалентной связи. Такой подход является относительно простой процедурой, не требующей использования сложного оборудования. Однако в этом случае пробы КТ обладают недостаточной коллоидной стабильностью, что вызвано динамическим характером связи (S-S и/или Zn-S) бифункциональных молекул с поверхностью КТ. В растворе также всегда присутствует заметное количество десорбированных молекул-заместителей, поскольку прочность связи Me-SH или Me-фосфин недостаточно высока в отличие от связи Au-SH (-40 кДж/М). При таком подходе КТ часто подвержены гидролизу и окислению оболочки ZnS, что приводит к разрушению нанокристалла и тушению флуоресценции. [205]

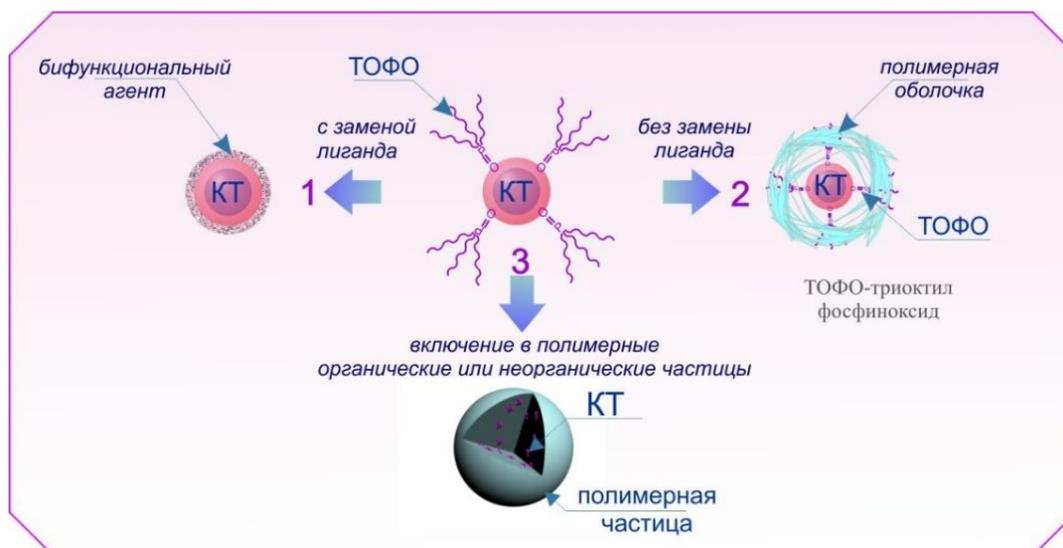


Рисунок I.9. Схема гидрофилизации квантовых точек.

Повышение стабильности гидрофилизированных КТ можно достичь путем создания дополнительного полимерного покрытия. После гидрофилизации КТ имеют дзета-потенциал поверхности, определяемый использованной бифункциональной молекулой. Наличие заряда на поверхности позволяет сформировать еще одно полимерное покрытие, например, за счет адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов, в числе которых могут быть и белковые молекулы, выполняющие адресную функцию в различных видах биоанализа. Поливалентный характер связывания полиэлектролитов с поверхностью

КТ, а также дополнительная защитная функция полимерного слоя делает этот метод весьма перспективным для получения гидрофильных проб КТ. [206].

Данный подход для получения гидрофильных КТ может быть также реализован за счет солюбилизации КТ мицеллами поверхностно-активных веществ (ПАВ). Для этого обычно используют традиционные ПАВ, например, додецилсульфат натрия, Triton X100, цетилтриметиламмоний бромид, фосфолипиды и др. [207] Основным преимуществом этого метода является простота в его реализации, однако, многие биологические эксперименты проходят при участии ПАВ, что приводит к разрушению мицелл и агрегации КТ.

2 подход, основанный на гидрофобных взаимодействиях между молекулами ТОФО и гидрофобными цепями дифильных полимерных молекул.

В данном подходе гидрофобные взаимодействия между лигандом на поверхности КТ и алкильными цепями амфифильного полимера приводят к образованию прочной гидрофильной оболочки вокруг КТ. В этом случае модификацию проводят без удаления лиганда-стабилизатора, поэтому нанокристалл не подвергается воздействию растворителей, которые могут приводить к дефектам на поверхности КТ и, как следствие, снижать флуоресценцию. Кроме того, на поверхности удастся получить плотное полимерное покрытие, которое противостоит гидролизу и ферментативной деградации. [208]

Полимерные цепи могут содержать несколько гидрофобных звеньев, что обуславливает многоточечные взаимодействия с органическими лигандами на поверхности КТ. В результате формируется более прочная связь, чем с обычными ПАВ. Кроме того, данный подход позволяет получать КТ с широким набором функциональных групп благодаря большому разнообразию амфифильных полимеров. [209]

Простым вариантом гидрофилизации при участии амфифильного полимера является включение КТ в мицеллы, полученные из амфифильного сополимера полиэтиленгликоля (ПЭГ) с фосфолипидом. [207] Гидрофобная фосфолипидная часть молекулы взаимодействует с поверхностью КТ, а гидрофильные цепи ПЭГ отвечают за коллоидные и функциональные свойства КТ в водной среде. Гидрофильная часть может включать аминогруппу для получения конъюгатов с биомолекулами, а также биотин, аптамер для адресной доставки наночастиц. Такой подход позволяет получать КТ с диаметром 15 нм, потенциально расширяющий доступ к биологическим мишеням и межклеточным компартментам. [210]

Для гидрофилизации КТ используют также длинноцепочечные амфифильные полимеры. [210] Так, амфифильный привитой сополимер полиакриловой кислоты и

октиламина получали методом карбодиимидной активации и применяли его для гидрофилизации КТ. В результате были получены дисперсии КТ с функциональными карбоксильными группами на поверхности. Для повышения стабильности на поверхность такой структуры иммобилизовали ПЭГ с концевыми аминогруппами.

В работе [208] КТ модифицировали амфифильным триблок-сополимером с высокой молекулярной массой, состоящим из полибутилакрилата (гидрофобная цепь), полиэтилакрилата (гидрофобная цепь) и полиметакриловой кислоты (гидрофильная цепь). Затем на полимерную оболочку прививали макромолекулы ПЭГ для повышения диспергируемости в воде и повышения биосовместимости. Показали, что на 4-5 цепей сополимера оболочки привиты 5–6 цепей ПЭГ, а не задействованные в прививке 400-500 карбоксильных групп могут быть использованы для конъюгации с биомолекулами. В результате получены гидрофильные коллоидно-стабильные функционализированные пробы КТ без потери фотофизических свойств.

3 подход, основанный на включении КТ в полимерные частицы.

Включение КТ в полимерные микросферы является перспективным подходом, который позволяет получать интенсивно флуоресцирующие частицы благодаря большой концентрации КТ в каждой частице. Кроме того, полимерное окружение КТ в частицах защищает их от тушения флуоресценции, фотовыцветания, воздействия внешней среды. [205] В литературе представлены различные стратегии включения КТ как в объем полимерных частиц, так и на поверхность:

- введение КТ в процессе набухания полимерных частиц в растворителе с последующим его испарением. [211,212]

КТ с различным диаметром, как представлено в работе [211], вводили в полистирольные частицы после их предварительного набухания в смеси растворителей толуол/этанол. В результате получен набор частиц с диаметром 1.2 мкм, флуоресцирующих в диапазоне спектра от зеленого до красного.

- включение КТ в полиэлектролитные комплексы в процессе их послойного осаждения на поверхность полимерных частиц. [108,213] В работе [108] на поверхности частиц полистирола с диаметром 0.9 мкм создавали многослойную структуру из полиэлектролитов, в которую вводили КТ CdTe с формированием внешнего слоя из анти-иммуноглобулина G (анти-IgG). Продемонстрировано формирование равномерного интенсивно флуоресцирующего покрытия после каждого цикла адсорбции КТ.

- создание структур с полимерными частицами за счет гетерокоагуляции, в основе которой лежат электростатические, гидрофобные, биоспецифические взаимодействия [214,215] (см. I.1.5);
- включение нанокристаллов в процессе синтеза органических (например, полистирольных) и неорганических полимерных частиц (например, на основе диоксида кремния). [216–218]

При получении органических полимерных частиц в процессе миниэмульсионной полимеризации стирола КТ вводят в исходные мономерные капли, что позволяет избежать транспорта КТ через водную среду, где происходит их потеря, и синтезировать интенсивно флуоресцирующие полимерные частицы.[217]

Получение неорганических полимерных частиц с КТ проводили в несколько стадий [216]: приготовление мицелл с ПАВ, создание первого слоя диоксида кремния из гидрофобного н-октилтриэтоксисилана в процессе его конденсации; формирование второго слоя диоксида кремния контролируемой толщины из амфифильного триэтоксивинилсилана с возможностью введения лекарств; функционализация путем формирования оболочки диоксида кремния из третьего гидрофильного [3-(2-аминоэтиламино) пропил]–триметоксисилана, что позволяет получить NH₂-группы на поверхности. Затем поверхность модифицировали карбоксильными производными ПЭГ и использовали такие кремнийорганические КТ в качестве средств доставки лекарств.

Включение КТ в объем или на поверхность ПЧ позволяет решить основные проблемы их применения в биологии: изоляцию нанокристаллов от влияния внешнего окружения, гидрофилизацию и ковалентное присоединение к ним биологических молекул. Кроме того, формирование фотостабильных ПЧ, флуоресцирующих требуемым цветом при возбуждении одним источником излучения, лежит в основе их применения в проточной цитофлуориметрии. Возможность введения в каждую частицу заданного количества КТ с различной флуоресценцией позволяет реализовать принцип многоцветного спектрального кодирования.

I.2.1.4. Применение КТ в биомедицинских исследованиях

Для применения КТ в качестве биореагентов необходимо создание их конъюгатов с адресными биомолекулами. Конъюгаты могут быть получены за счет адсорбции или через образование ковалентной связи, используя подходы, описанные для полимерных частиц (см. I.1.6). Фотостабильность КТ и уникальные оптические свойства, которые зависят

исключительно от диаметра, определяют их многоплановое применение в различных видах биоанализа и решения задач биовизуализации.

Диагностика in vitro. Одной из самых распространенных областей применения КТ является разработка иммунодиагностических тест-систем, которые позволяют проводить определение сразу нескольких аналитов. Например, в работе [219] представлен сэндвич-анализ для детекции как стафилококкового энтеротоксина В (возбудитель пищевого отравления), так и небольшой молекулы 2,4,6-тринитротолуола (взрывчатое вещества) с использованием специфичных антител, адсорбированных на лунках 96-луночного микропланшета. Конъюгаты КТ с вторичными антителами, полученные с использованием адаптерного белка, успешно применяли для выявления этих двух типов аналитов при проведении флуороиммуноанализа. В другой работе [220] показана возможность одновременной детекции четырех токсинов в сэндвич-ИФА, используя четыре типа КТ с излучением в диапазоне 510-610 нм при возбуждении светом с одной длиной волны. К сожалению, пока не удается осуществить количественную оценку результатов.

Большое значение приобретает использование КТ для визуализации онкомаркеров, которые гиперэкспрессируют опухолевые клетки. Детекция и количественная оценка онкомаркеров необходимы для ранней диагностики и терапии опухолей. [221] К настоящему времени в литературе представлены сообщения о создании адресных конъюгатов КТ для визуализации клеток клинически значимых опухолей человека: карциномы простаты [208], аденокарциномы молочной железы [222], карциномы поджелудочной железы [223], глиобластомы мозга [224] и др

Изменчивость опухолевых клеток в ответ на воздействие лекарственных препаратов ставит задачу одновременной визуализации сразу нескольких поверхностных онкомаркеров. Уникальные оптические свойства КТ, определяющие возможность использования КТ для мультиплексной визуализации, были продемонстрированы на примере определения пяти типов рецепторов клеток опухоли молочной железы человека. Показано, что результаты тестов для одновременной визуализации рецепторов ER, PR, EGFR, mTOR и HER 2/neu при участии КТ, имеющих различные пики эмиссии, хорошо коррелирует с результатами традиционных анализов, таких как иммуногистохимия, Вестерн-блоттинг и флуоресцентная гибридизация *in situ*. Использование КТ значительно сокращает время и при этом снижает стоимость анализа. [225]

КТ использовали для постановки иммуногистохимического анализа, на основе которого оценивают морфологию, получая изображения фиксированных срезов тканей, например, базально-клеточной карциномы человека [205], опухоли молочной железы. [226]

Найдено, что на основе КТ можно создавать агенты для количественного и чувствительного обнаружения экспрессии поверхностных раковых маркеров, в частности онкомаркера HER 2/неу. Высокая фотостабильность препаратов, окрашенных КТ, которые сохраняют интенсивность флуоресценции в течение 9–75 дней, является основным преимуществом при использовании КТ. [227]

Высокая фотостабильность и яркость КТ делает их также перспективными агентами для визуализации процессов, происходящих в клетках. [228] Особый интерес представляет исследование местонахождения и динамики движения мембранных белков, что необходимо для понимания таких процессов, как хемотаксис, межклеточная и внутриклеточная передача сигналов. КТ, конъюгированные с адресными молекулами, успешно использовали для визуализации динамических процессов, связанных с рецепторами глицина [229] и γ -аминомасляной кислоты [230] в культуре клеток нейронов.

Анализ на основе передачи энергии. Разработан высокочувствительный биоанализ на основе Ферстеровской безызлучательной резонансной передачи энергии (англ. FRET) между донором и акцептором. Данный вид анализ позволяет проводить исследования на уровне единичных молекул. В качестве водорастворимого донора использовали КТ CdTe, излучающие на длине волны 532 нм и конъюгированные с IgG мыши, а в качестве акцептора – КТ CdSe/ZnS, излучающие при 632-нм и конъюгированные с антимышиными IgG. Использовали метод капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией. Биоспецифическая реакция между IgG и анти-IgG приводила к сближению обоих типов КТ так, что происходила передача энергии от донора к акцептору в результате резонанса между энергетическими уровнями (FRET). Найдено, что сепарация продуктов реакции донора с акцептором методом электрофореза существенно повышает эффективность FRET (38,56–69,58%) по сравнению с измерением сигнала неразделенных продуктов (12,77–52,37%). Кроме того, разделение иммунокомплексов повышает специфичность анализа, что наряду с высокой эффективностью делает FRET-анализ с разделением продуктов более чувствительным. Эта новая технология на основе FRET может быть легко распространена на другие системы с использованием КТ и применяться для исследования конформации биомолекул. [230]

Визуализация in vivo. Применение КТ в качестве флуорофоров на уровне целого организма вызывает ряд трудностей, прежде всего, связанные со значительным оптическим поглощением биоткани, а также автофлуоресценцией в зеленом спектральном диапазоне. Поэтому перспективными для визуализации *in vivo* являются КТ, флуоресцирующие в ближнем ИК-диапазоне (700–800 нм), что позволяет повысить яркость получаемого

сигнала и снизить фон. Визуализация опухолевой ткани в живом организме при внутривенном введении КТ возможно благодаря их накоплению по двум механизмам: 1) пассивному, определяемому свойствами поверхности КТ и 2) активному, осуществляемому благодаря адресным агентам. [208]

При пассивной доставке КТ избирательно накапливаются в опухолевой ткани благодаря эффекту повышенной проницаемости и удерживания (англ. EPR-эффект – *enhanced permeability and retention*), представленному выше (см. I.1.4). В этом случае широкое применение нашли КТ, покрытые ПЭГ и характеризующиеся минимальным уровнем неспецифического связывания с белками и клетками крови. [208]

Для активной доставки КТ к опухолям получают конъюгаты с адресными молекулами для специфического взаимодействия с рецепторами на поверхности опухолевых клеток. Впервые в работе [231] было продемонстрировано избирательное накопление в солидной опухоли после внутривенного введения конъюгатов КТ с адресными пептидами, специфичными к различным типам опухолей. В работе [232] исследовали накопление КТ CdSe/ZnS, модифицированных тиогликолевой кислотой и конъюгированных с мышиными моноклональными анти-AFP-антителами, при адресной доставке к рецептору алфа-фетопротейну (англ. AFP) клеток карциномы печени линии HCCLM6. Использование таргетной доставки КТ в сочетании с современными оптическими методами позволяет визуализировать не только солидные опухоли, но и метастазы в органах [233], в костной ткани [234], а также выявлять микрометастазы на ранних стадиях заболевания [235].

С одной стороны, результаты работ по прижизненной визуализации опухолей показали, что использование КТ для визуализации *in vivo* сопряжено с определенными трудностями, вызванными попаданием большого количества КТ в органы ретикулоэндотелиальной системы, неполным выведением из организма и недостаточно эффективным излучением в глубине биоткани. С другой стороны, отсутствие фотовыцветания, высокий квантовый выход, а также большое сечение поглощения позволяют использовать КТ как визуализирующие агенты для изучения патологически измененных тканей на моделях животных. При участии КТ в отличие от традиционных флуорофоров может быть реализована мультиплексная детекция маркеров, мониторинг молекулярных процессов в реальном времени и получать изображения новообразований.

I.2.2. Наночастицы с антистоксовой флуоресценцией

Возбуждение флуоресценции органических и неорганических флуорофоров, традиционно используемых в биологии, источниками видимого или УФ-света имеет ряд ограничений: небольшая глубина проникновения света в ткани, возможность повреждения биоткани при долговременном облучении и значительном сигнале фона, который связан с флуоресценцией самих биологических тканей (автофлуоресценцией) в УФ-области. Поэтому актуальной задачей представляется поиск новых флуорофоров с минимальным неспецифическим сигналом фона и возможностью получения неинвазивных изображений из глубины биоткани. Этим требованиям отвечают нанокристаллы с антистоксовой фотолюминесценцией, также известные как апконвертирующие нанофосфоры (НАФ), которые являются перспективной платформой для решения задач оптического биоимиджинга и тераностики [236].

I.2.2.1. Оптические свойства НАФ

В данных нанофосфорах реализуется эффект апконверсии (англ. upconversion), заключающийся в преобразовании низкоэнергетического излучения из ближнего ИК-диапазона в УФ-, видимый и ближний ИК-свет с более высокой энергией за счет протекания нелинейных многофотонных процессов. [237] Фотолюминесценция НАФ не подчиняется правилу Стокса, но это не приводит к нарушению закона сохранения энергии, поскольку происходят коллективные процессы ее перераспределения. Длина волны возбуждения из ближнего ИК-диапазона (970-980 нм) и, частично, пик флуоресценции попадают в так называемое «окно прозрачности» биологической ткани (от 650 до 1300 нм), где реализуется глубокое проникновение света в биоткань с минимальным поглощением и рассеянием. Феномен апконверсии приводит к уникальным возможностям визуализации с помощью НАФ, включая минимальное фотоповреждение живых организмов, низкую фоновую флуоресценцию, высокое отношение сигнал/шум, [238] высокое пространственное разрешение [239] в сравнении с обычными флуоресцентными метками. Кроме того, НАФ обладают высокой фотостабильностью, низкой цитотоксичностью и химической стабильностью при изменении условий окружающей среды, таких как pH, температура. [240,241]

Как правило, НАФ состоят из неорганической кристаллической матрицы-хозяина, допированной ионами трехвалентных лантаноидов (Ln^{3+}), обычно Yb^{3+} , Er^{3+} или Tm^{3+} (**Рис. I.10а**). Ионы, поглощающие свет возбуждения, называются сенсбилизаторами, а ионы, излучающие свет, называются активаторами. Сенсбилизатор эффективно поглощает ИК-

фотон и переходит из основного в возбужденное метастабильное состояние. Затем происходит безызлучательный резонансный перенос энергии между сенсбилизатором и ионом второго типа, активатором. Природа матрицы, концентрация ионов Ln^{3+} в матрице, перекрытие спектров сенсбилизатора и активатора определяют эффективность переноса энергии. [242]

Наиболее эффективным сенсбилизатором является ион Yb^{3+} благодаря большому сечению поглощения в ближней ИК-области при длине волны 975 нм ($\sigma_{\text{полгл.}} \sim 10^{-21} \text{ см}^2$). Активатор выбирают из ионов, обладающих лестничными метастабильными уровнями энергии, такими как Er^{3+} , Tm^{3+} , Ho^{3+} и Nd^{3+} . Многократный безызлучательный перенос энергии от возбужденного сенсбилизатора к активатору и/или поглощение ИК-фотонов приводит к заселению состояний ионов активатора с более высокой энергией, чем энергия возбуждающего ИК-фотона. В результате излучательной релаксации из этих состояний возникает антистоксовая флуоресценция. Каждый лантанид-ион имеет свой собственный набор энергетических уровней, что приводит к отчетливым пикам излучения в широком диапазоне от ИК- до УФ-спектральной области. [242] На **Рис. 1.10в,г** показана диаграмма уровней энергии и основные люминесцентные линии НАФ, допированных Yb^{3+} и Er^{3+} или Tm^{3+} . Такой способ генерации флуоресценции позволяет получать НАФ с различными пиками флуоресценции, которые определяются выбором лантанид-ионов или их комбинации.

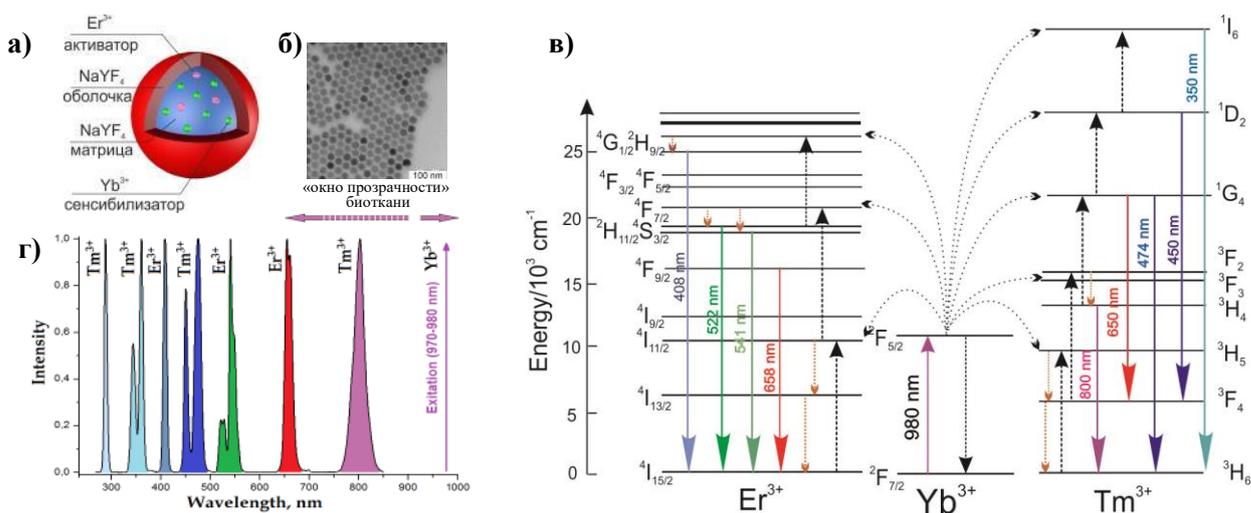


Рисунок 1.10. Схематическое изображение структуры НАФ (а); ПЭМ изображение НАФ (б); Преобразование энергии поглощенного фотона в НАФ происходит посредством сложных многоступенчатых процессов, которые показаны на для $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ или $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$. Ион Yb^{3+} поглощает фотон с длиной волны 980 нм и переходит в возбужденное состояние $^2F_{5/2}$; затем он эффективно передает свою энергию соседнему Er^{3+}

в состоянии $^4I_{11/2}$, поскольку энергии этих двух состояний очень близки. После этого от другого возбужденного Yb^{3+} происходит дополнительная передача энергии к Er^{3+} для его перехода до более высокого уровня $^4F_{7/2}$ и т.д. После быстрой безызлучательной релаксации к одному из трех состояний с несколько меньшей энергией ($^2H_{11/2}$, $^4S_{3/2}$ или $^4F_{9/2}$) возбужденный Er^{3+} испускает один фотон (на длинах волн 408, 522, 541 или 658 нм, соответственно), чья энергия выше энергии возбуждающих фотонов [243] (в); Линии излучения в спектрах НАФ $NaYF_4: Yb^{3+}/Er^{3+}$ и $NaYF_4: Yb^{3+}/Tm^{3+}$ (г).

Пространственное расположение сенсibilизатора и активатора определяет материал и структура матрицы, которая играет важную роль в апконверсии. Матрица должна быть оптически прозрачной для света на длинах волн возбуждения и флуоресценции. Кристаллическая решетка матрицы должна обеспечивать асимметричное внутрикристаллическое поле и иметь низкие энергии фононов. [244][245] С одной стороны, отсутствие фононов высоких энергий уменьшает эффекты нежелательной безызлучательной релаксации, с другой стороны, фононы должны обладать достаточной энергией, чтобы способствовать энергетическому согласованию нерезонансных переходов между возбужденным сенсibilизатором и активатором. [240] В настоящее время существует большое разнообразие материалов для получения матрицы, которые позволяют создавать новые типы НАФ. В качестве матрицы наиболее активно применяют гексагональную β -фазу тетрафтороиттриата натрия (β - $NaYF_4$), которая обладает широкой энергетической запрещенной зоной ~ 8 эВ. [246] К преимуществам матрицы $NaYF_4$ относятся очень низкая энергия фононов, а также наличие максимума полосы фононных колебаний на длине волны 750 нм [246].

На данный момент наиболее изученными апконвертирующими нанофосфорами являются системы на основе β - $NaYF_4: Yb^{3+}/Er^{3+}$ и β - $NaYF_4: Yb^{3+}/Tm^{3+}$, которые нашли разнообразное применение, особенно, в качестве эффективных флуоресцентных зондов для визуализации биообъектов *in vivo*. [247]

Размер частиц интенсивно флуоресцирующих НАФ обычно больше размера других обычных флуорофоров, что ограничивает их применение в биовизуализации *in vivo*. Существуют трудности в получении НАФ малых размеров, обладающих интенсивной флуоресценцией в водных растворах или биологических буферах. Воуер с соавт. в работе [248] показали, что коэффициент апконверсии β - $NaYF_4: Yb^{3+}/Er^{3+}$ с размерами от 10 до 100 нм составляет 0,005–0,3%. Это требует для достижения необходимой интенсивности флуоресценции более высокой мощности возбуждения, что может сопровождаться неблагоприятными побочными эффектами, которые повреждают биоткань.

Эффективность флуоресценции НАФ, преимущественно, определяется свойствами поверхности нанокристалла НАФ. Воздействие на ионы лантанидов факторов тушения, связанных с поверхностными дефектами, деформациями решетки, лигандами и растворителем, приводит к снижению квантового выхода. [247] Был разработан ряд подходов для повышения эффективности эмиссии в процессах апконверсии: 1) подбор материала и/или состава композиции матрицы-хозяина; 2) синтез структур «ядро-оболочка»; 3) дизайн мультиплексных нанофосфоров для усиления флуоресценции.

1. Одной из наиболее перспективных НАФ-матриц, как было показано выше, является NaYF_4 , но получение нанокристаллов с размером менее 10 нм с интенсивной флуоресценцией на их основе встречает большие трудности, поскольку увеличивается число поверхностных дефектов при уменьшении размера. Эту проблему удается преодолеть и синтезировать яркие НАФ малого размера, используя в качестве матрицы другие фториды, например: $\text{Na}_x\text{ScF}_{3+x}$ [249], NaYbF_4 [250], KGdF_4 [251], CaF_2 [252], SrF_2 [253], NaLuF_4 [254] and BaLuF_5 [255]. Изменение матрицы может быть также осуществлено путем ее легирования примесями (такими, как щелочные, щелочноземельные ионы, Gd^{3+} , Ti^{4+} , Mn^{2+} и т.д.). Так, Wang и соавт. [256] продемонстрировали, что легирование ионами Gd^{3+} матрицы NaYF_4 позволяет контролировать фазу и размер нанокристалла таким образом, что частицы малого размера с гексагональной фазой формируются в процессе синтеза гораздо быстрее. Ион Gd^{3+} был выбран для легирования NaYF_4 , поскольку больший ионный радиус Gd^{3+} по сравнению с Y^{3+} способствует значительному искажению электронного облака, что определяет предпочтительное получение гексагональной фазы. Другим способом изменения состава матрицы является создание наноструктур с плазмонными наночастицами Ag или Au. Известно [257], что плазмонные наночастицы эффективно усиливают флуоресценцию окружающих флуорофоров, фокусируя электрическое поле в нанобъеме. Lu и соавт. в работе [258] показали, что поверхностный плазмон воздействует на три различных физических процесса, связанных с апконверсией: поглощение сенсibilизаторами, последовательную передачу энергии от двух сенсibilизаторов к активатору и эмиссию активатора. Оптимальное усиление флуоресценции наблюдалось в наноструктурах «ядро-оболочка» $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{SiO}_2/\text{Ag}$ на расстоянии 10 нм между матрицей и наночастицами Ag, имеющими два различных диаметра (15 и 30 нм). [259]

2. В последнее время наиболее активно используемым подходом для повышения квантового выхода НАФ является, как и в случае квантовых точек, создание структуры «ядро-оболочка» с достаточной толщиной оболочки, которая может

существенно нивелировать дефекты поверхности даже при малом размере частиц, что препятствует тушению флуоресценции. Состав оболочки может быть таким же, как и у матрицы, и в этом случае она является пассивной оболочкой, которая предохраняет ионы-допанты от тушителей, воздействующих на поверхность. [260] У НАФ со структурой «ядро--оболочка» $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}@\text{NaYF}_4$ и диаметром 30 нм получен абсолютный квантовый выход в 3 раза выше (достигал 0,3% при возбуждении светом на длине волны 980 нм с мощностью 150 Вт/см²), чем у наночастиц того же размера и состава, но без оболочки. [248] Структуры могут быть получены с активной оболочкой, содержащей ионы-допанты, обеспечивая возможность разделения областей поглощения, перехода и излучения в различных местах нанокристалла, что позволяет контролировать эффекты концентрационного тушения и/или взаимного релаксационного взаимодействия. [118,261] Кроме того, ионы Ln^{3+} оболочки усиливают флуоресценцию за счет взаимодействия с лантанидами, расположенными в ядре. Ding и соавт. в работе [262] продемонстрировали 100-кратное увеличение интенсивности флуоресценции в НАФ со структурой «ядро/ активная флуоресцентная оболочка/ активная оболочка» $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}@\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}$.

3. Настройка цвета излучения НАФ имеет особое значение для мультиплексной биовизуализации. Управлять цветом флуоресценции НАФ можно с помощью различных соотношений матрица/активатор [263], контроля концентрации допантов [264], использования резонансного переноса энергии между НАФ и красителями [265] или квантовыми точками [266]. Однако эти методы ограничены существующей системой дизайна НАФ, и остается проблема разработки общей стратегии управления цветом флуоресценции НАФ в широком спектральном диапазоне.

1.2.2.2. Синтез НАФ

Для реализации химических и оптических свойств НАФ, необходимых для их применения в биомедицине, решающее значение имеет разработка стратегий синтеза НАФ с контролируемым составом, размером, а также с требуемой кристаллической фазой.

Метод термического разложения. По этому методу НАФ получают из металлоорганических соединений, используемых в качестве прекурсоров, которые разлагаются в высококипящих растворителях в присутствии ПАВ. Наиболее активное применение в качестве прекурсоров нашли трифторацетаты лантанидов. Термическое разложение проходит в среде октадецена в присутствии стабилизаторов, таких как, олеиновая кислота, олеиламин или триоктилфосфин оксид, которые, как правило, содержат

функциональную группу для координации лантанида на поверхности образующихся нанокристаллов и длинную углеводородную цепь для предотвращения их агрегации. Зарождение НАФ происходит мгновенно благодаря высокой скорости разложения прекурсоров, что определяет узкое распределение НАФ по размерам. Данный метод позволяет синтезировать НАФ с уникальными физико-химическими свойствами при тщательном подборе таких условий процесса, как природа растворителя, концентрация прекурсора и стабилизатора, температура реакции. [267]

Однако, несмотря на перспективность метода термического разложения для получения высококачественных НАФ, синтез проводят в жестких условиях: безводная среда, продолжительное время и высокая температура реакции. Кроме того, при термическом разложении металлосодержащих трифторацетатов образуются побочные токсичные фторсодержащие и оксифторсодержащие соединения.

Метод «созревания» НАФ по Оствальду. При получении НАФ на основе метода «созревания» формирование частиц происходит за счет захвата мелких частиц более крупными и их роста, что приводит к уменьшению площади поверхности частиц и образованию более энергетически выгодной системы.

Стратегия синтеза состоит в формировании аморфных частиц NaYF_4 малого диаметра при комнатной температуре с последующим ростом при повышенной температуре (300°C) за счет «созревания» по Оствальду. Управление процессом «созревания» осуществляют путем контроля температуры и времени реакции. В результате получают НАФ, преимущественно, с гексагональной кристаллической фазой и узким распределением по размерам. Данный метод часто используют для синтеза НАФ со структурой «ядро-оболочка» благодаря возможности точного контроля толщины оболочки за счет стехиометрического регулирования количества частиц-зародышей. Этот подход по сравнению с методом термического разложения позволяет проводить синтез относительно быстро, без образования токсичных побочных продуктов, используя более простой протокол. [268]

Поскольку для зарождения частиц требуется больше времени, чем при термическом разложении, то получается структура кристалла НАФ с меньшим количеством дефектов и, соответственно, с высоким квантовым выходом.

Гидро(ольво)термический метод. Данный метод основан на реакциях разложения трифторацетатов лантанидов, протекающих в герметичных условиях при высоком давлении и температуре. При проведении типичного гидро(ольво)термического синтеза смешивают прекурсоры, растворители и поверхностно-активные вещества, содержащие

функциональные группы, а затем нагревают в специальном реакционном сосуде. ПАВ выступают в качестве хелатирующих агентов катионов, которые регулируют концентрацию этих катионов [269], что необходимо для контроля размера, морфологии и формирования кристаллической фазы. Преимуществами этого метода по сравнению с другими является возможность получения необходимых кристаллических структур НАФ при более низких температурах и проведение различных реакций в процессе синтеза. К недостаткам метода относится необходимость использования специальных реакционных сосудов и отсутствие возможности наблюдения за ростом частиц. [270]

Представленные три метода являются основными способами получения НАФ, при которых формируются наночастицы в диапазоне диаметров 20-200 нм. Однако пока не проведено сравнительных исследований о зависимости флуоресцентных свойств от метода получения НАФ.

1.2.2.3. Гидрофилизация НАФ

НАФ с узким распределением по размерам в основном синтезируют в органических растворителях при участии гидрофобных лигандов, таких как олеиновая кислота, олеиламин, октадецен. Таким образом, НАФ после синтеза являются гидрофобными наночастицами, которые можно диспергировать только в неполярных органических растворителях, что ограничивает их биомедицинское применение. Поэтому для получения биофункционализированных коллоидно- и химически стабильных в широком диапазоне pH водных дисперсий без изменения оптических свойств необходимо проводить гидрофилизацию поверхности НАФ.

В настоящее время существует большое количество методов гидрофилизации НАФ. Однако все эти методы основаны на трех основных подходах, представленных на **Рис. 1.11**: (1) путем замены лиганда-стабилизатора на бифункциональные молекулы; (2) в процессе модификации поверхности без удаления лиганда-стабилизатора; или (3) в органические или неорганические частицы. Подробную информацию о биофункционализации наночастиц можно найти в целом ряде обзоров [240,241,247,271,272].

Подход 1. В подходе, основанном на замене лиганда, используют бифункциональные гидрофильные органические и/или полимерные молекулы, способные заменять гидрофобные лиганды-стабилизаторы на поверхности НАФ и экспонировать гидрофильные участки в водную фазу, обеспечивая гидрофильность НАФ. (**Рис. 1.11**, подход 1). Наиболее широкое применение в качестве бифункциональных молекул нашли: полиакриловая кислота [273], фосфат полиэтиленгликоля [274], меркаптопропионовая

кислота [275], адипиновая кислота [276], меркаптоянтарная кислота [277], гиалуроновая кислота [278] и т.д. В результате получают образцы модифицированных НАФ, сохраняющих коллоидную стабильность в водных растворах в течение длительного времени. Однако использование неорганической кислоты, щелочи или спиртов для удаления лигандов-стабилизаторов может частично повредить поверхность НАФ и, следовательно, уменьшить интенсивность флуоресценции. [279]

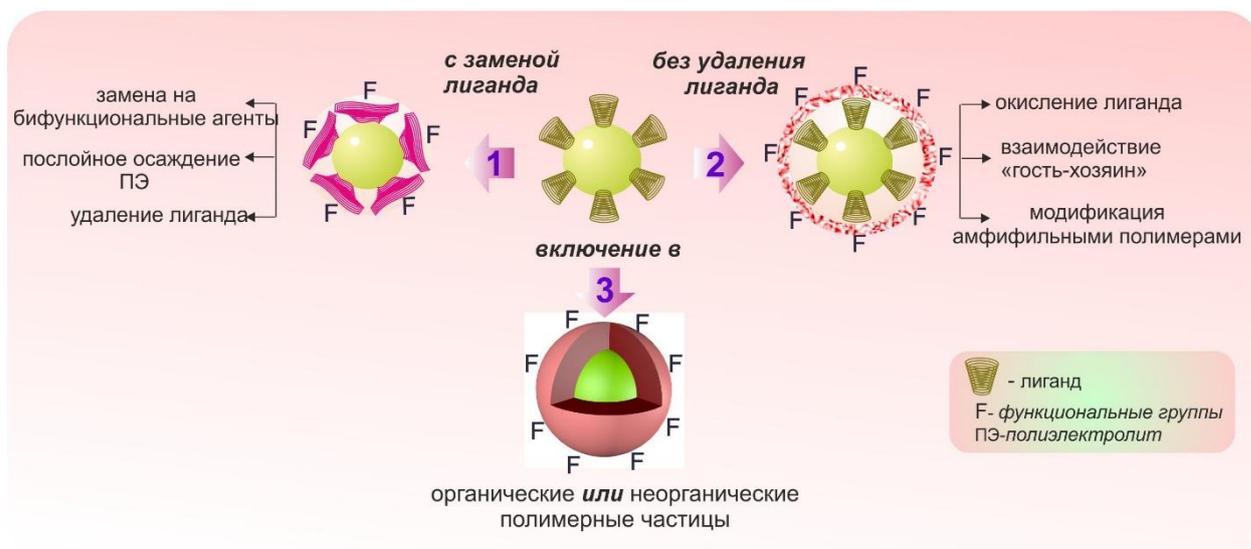


Рисунок I.11. Схема гидрофилизации НАФ.

Одним из вариантов этого подхода является удаление лигандов-стабилизаторов без замены на другую молекулу. [280] Полученные НАФ без лигандов могут давать водные дисперсии, стабильные только в течение короткого периода времени. Неэкранированные ионы металлов на поверхности НАФ обладают сильной координирующей способностью, что позволяет получать конъюгаты с адресными биомолекулами путем формирования координационной связи непосредственно между их функциональными группами, такими как $-COOH$, $-NH_2$, $-OH$, и поверхностными ионами.

Другой вариант гидрофилизации методом замены лиганда может быть проведен за счет последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхности НАФ (аналогично подходу, представленному в п. I.1.4). Этот метод имеет преимущество при получении образцов НАФ с требуемым поверхностным зарядом, контролируемой толщиной полимерного покрытия и содержащих необходимые функциональные группы. [281]

Подход 2. Модификация поверхности НАФ без удаления лиганда-стабилизатора является одним из широко распространенных методов гидрофилизации, поскольку его

проводят без использования агрессивных реагентов, лиганд остается на поверхности, что позволяет сохранить флуоресцентные свойства практически без изменений. Для такой модификации активно используют амфифильные полимеры, гидрофобные фрагменты которых взаимодействуют с гидрофобным стабилизатором на поверхности НАФ. Гидрофильная часть амфифильного полимера, экспонированная в водную среду, обеспечивает коллоидную стабильность в условиях биологического окружения и содержит необходимые функциональные группы для присоединения адресных биомолекул (**Рис. I.11**, подход 2). [282] Наиболее часто используют следующие амфифильные полимеры: сополимер малеинового ангидрида и октадецена [282], плуроник F127 [283], блок-сополимеры полиэтиленгликоля и полимолочной кислоты [284], полиэтиленгликоля и поликапролактона [285], триблок-сополимеры полиэтиленгликоля и сополимера молочной и гликолевой кислот [286] и т.д.

Этот подход может быть реализован путем окисления лиганда-стабилизатора и присоединения функциональной молекулы. Например, проводят окисление двойной связи C=C лиганда (олеиновой кислоты) с помощью реагента Лемье-фон-Рудлоффа, что приводит к образованию гидрофильной азелаиновой кислоты. [287] Используют также 3-хлорпероксибензойную кислоту для введения эпоксидных групп по двойной связи олеиновой кислоты и последующей реакции с метилметоксиполиэтиленгликолем. [288] Окисление не оказывает явного отрицательного влияния на морфологию, состав или люминесцентные свойства НАФ. Однако этот подход ограничен длительным временем реакции и низким выходом.

Модификация без удаления лигандов также может быть реализована путем самосборки по типу «гость-хозяин», что является простым, быстрым и эффективным методом модификации поверхности НАФ. [289] При самосборке молекулы хозяина (например, полость циклодекстрина) принимают молекулы гостя (например, двойную связь C=C олеиновой кислоты), обеспечивая как гидрофилизацию, так и формирование гидрофобной области для включения гидрофобных молекул (например, красителей, лекарств).

Подход 3. Включение в неорганические частицы (**Рис. I.11**, подход 3) за счет образования оболочки из диоксида кремния осуществляется путем солюбилизации НАФ (без лиганда) обратными мицеллами ПАВ (например, Igepal CO-520) и тетраэтоксисилана (TEOS) в неполярном растворителе. [290] Гидрофильная полость обратных мицелл служит нанореактором для роста кремнеземной оболочки при гидролизе TEOS. Размер мицелл выбирают так, чтобы инкапсулировать только один нанокристалл НАФ. Известно, что

диоксид кремния является высокостабильным, биосовместимым, нетоксичным, оптически прозрачным соединением и может содержать функциональные группы. Кроме того, слой пористого кремнезема не только обеспечивает диспергируемость в воде и биосовместимость НАФ, но также позволяет вводить лекарство, краситель, НЧ или фотосенсибилизатор, которые необходимы для решения задач биомедицины. Для создания на поверхности НАФ оболочки из диоксида кремния также используют метод Стобера. [290]

Одним из перспективных способов инкапсулирования НАФ в полимерные частицы является фотополимеризация, активируемая ближним ИК-светом. Процесс инициирования полимеризации осуществляется за счет возбуждения фотоинициатора излучением НАФ в видимой области спектра при их возбуждении ИК-светом. Xiao и соавт. [291] впервые продемонстрировали фотополимеризацию полиэтиленгликольдиакрилата и N-винилпирролидона в присутствии НАФ и эозина Y в качестве фотоинициатора. Зеленую спектральную полосу флуоресценции НАФ использовали для активации фотополимеризации, поскольку присутствовало перекрытие спектров флуоресценции НАФ и спектров поглощения эозина Y. В результате получены биосовместимые полимерные частицы, в которые были инкапсулированы НАФ. Полимерная матрица надежно защищала НАФ от воздействия окружающей среды и облегчала включение лекарств, однако их размеры в диапазоне 3-10 мкм не удовлетворяли требованиям для их применения *in vivo*. Таким образом, разработка фотополимеризации, активируемой ИК-светом, является очень перспективным направлением для гидрофилизации НАФ, но требует совершенствования метода проведения.

1.2.2.4. Применение НАФ в биомедицинских исследованиях

Уникальные оптические свойства НАФ определяют их большой потенциал для применения в гомогенных и гетерогенных биоанализах [292][293] для регистрации температурного профиля в клетках [294], в качестве биосенсоров молекул газа [295], в микроскопии со сверхвысоким разрешением [296] и многих других областях [247][297]. В данном обзоре будут рассмотрены приложения НАФ в области визуализации и терапии.

На сегодняшний день биовизуализация по флуоресцентному сигналу стала важным инструментом в биологических исследованиях, поскольку может быть использована для ранней диагностики и терапии тяжелых заболеваний. Возбуждение НАФ светом из «окна оптической прозрачности» биологических тканей в спектральном диапазоне 650–1300 нм,

отсутствие фоновой автофлуоресценции и низкое фотоповреждение тканей делают НАФ очень перспективными метками для биовизуализации. [298]

Визуализация клеток in vitro. В последнее время НАФ активно используют для визуализации клеток как в качестве неспецифических контрастирующих агентов для окрашивания клеток за счет эндоцитоза, так и для адресной доставки к опухолевым клеткам. Конъюгаты с адресными молекулами могут быть получены, используя методы, описанные для полимерных частиц (см. I.1.6).

Первое сообщение о применении НАФ для визуализации клеток по флуоресцентному сигналу было опубликовано Ни и соавт в 2008 году [298]. Авторы продемонстрировали на линии клеток KB, что НАФ, покрытые ПЭГ, обеспечивают безфоновую визуализацию и позволяют регистрировать их последующий захват клетками. НАФ применяли для неспецифичной визуализации различных типов клеток посредством клеточного эндоцитоза: стволовые клетки BMSC [299], клетки HeLa [300], клетки мезотелиомы мыши AB12 [301], клетки рака печени Huh-7 [302], клетки рака мочевого пузыря MB49 [303] и др. В этом случае важную роль играют свойства поверхности НАФ. Например, наибольшую степень захвата кератиноцитами HaCaT имели НАФ без полимерного покрытия. Полимерное покрытие, такое как полилактид, позволило получить НАФ с отрицательным дзета-потенциалом поверхности, что способствовало их эффективному захвату клетками. [304]

Адресную визуализацию опухолевых клеток проводили с использованием конъюгатов НАФ с биомолекулами для специфического распознавания рецепторов на поверхности клеток. Chatterjee и соавт. [305] впервые применили конъюгаты НАФ, гидрофилизированных при участии полиэтиленimina, с фолиевой кислотой. Фолиевая кислота на поверхности НАФ является специфической молекулой для клеток аденокарциномы HT29 и карциномы яичника человека OVCAR3, экспрессирующих аномально высокие уровни фолатных рецепторов на поверхности. В настоящее время используют большое разнообразие адресных биомолекул, конъюгированных с НАФ, например: кроличьи анти-CEA8-антитела для визуализации антигена CEA на клетках HeLa [306], анти-Claudin-4 антитела для нацеливания на рецептор на раковых клетках поджелудочной железы человека [307], пептид L-аргинин, глицин и L-аспарагиновая кислота (RGD-пептид) для визуализации интегрина $\alpha\beta3$, гиперэкспрессируемого на клетках U87MG глиобластомы человека [308], и др. НАФ, как сообщают в литературе [304], проявляют низкую цитотоксичность для широкого спектра клеточных линий.

Визуализация in vivo. За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в применении НАФ для изучения биораспределения, токсичности и доставки в опухоли лабораторных животных *in vivo*. Визуализация на уровне организма связана с ослаблением флуоресцентного сигнала, вызванного увеличением толщины ткани, и с трудностями доставки НЧ в клетки-мишени и ткани.

При доставке НАФ в опухоль животных они должны преодолеть ряд структурных и физиологических барьеров, таких как иммунный барьер и метаболическая деградация. Кроме того, НАФ могут проникать в нецелевые органы и ткани организма (печень, почки, селезенка, легкие и т. д.) и накапливаться там, уменьшая контраст сигнала и увеличивая вероятность токсических эффектов. Накопление НАФ в опухолевой ткани для дальнейшей его визуализации при внутривенном введении возможно благодаря двум механизмам: пассивному (см. п. I.14) или активному.

Преимущества использования НАФ для визуализации опухоли лабораторных животных при возбуждении ИК-светом впервые были описаны Chatterjee и соавт. [305]. При внутривенном введении НАФ у мышей регистрировали флуоресцентный сигнал при возбуждении светом на длине волны 980 нм с очень низкой автофлуоресценцией, высокой чувствительностью обнаружения и отсутствием фотоповреждений в живом организме.

Степень накопления НАФ в опухолевой ткани при пассивной доставке зависит от нескольких факторов: диаметра частиц, поверхностного заряда и природы полимерной оболочки. Предпочтительно, использовать НЧ с размерами в диапазоне 10-150 нм и покрытые полимером с минимальным уровнем неспецифического связывания белков крови. По мнению многих исследователей [309], наиболее перспективным полимерным материалом для покрытия НЧ является ПЭГ, который представляет собой гидрофильный, нетоксичный и неиммуногенный полимер, имеющий низкий уровень адсорбции белковых молекул.

Модификация НАФ молекулами ПЭГ может быть проведена как путем замены лиганда-стабилизатора на линейные цепи ПЭГ, содержащие концевые -COOH группы, так и при использовании блок-сополимеров с ПЭГ-звеньями. Cheng и соавт. [310] сравнили чувствительность *in vivo* визуализации при участии НАФ, модифицированных конъюгатом ПЭГ с блок-сополимером октиламина с полиакриловой кислотой (ОА-ПАА-ПЭГ), и КТ с такой же модификацией. Показано, что флуоресцентный сигнал от НАФ, введенных в область спины мышей, на порядок выше, чем сигнал от КТ. [311]

Активный механизм доставки НАФ в опухоль, так называемая адресная доставка, осуществляется посредством взаимодействий лиганд-рецептор. Конъюгация для введения

на поверхность НАФ биомолекул, специфичных к рецептору клеток, является важным этапом в адресной доставке. Несмотря на то, что большое количество адресных молекул активно используется в *in vitro* экспериментах, визуализация *in vivo* ограничивается экспериментами с НАФ, конъюгированными с фолиевой кислотой или RGD-пептидом.

Известно, что фолиевая кислота является высокоаффинным лигандом для фолатных рецепторов, гиперэкспрессируемых клетками раковых линий, например, HeLa и KB. [308] Xiong и соавт. [312] получали конъюгаты НАФ, модифицированных б-аминогексановой кислотой, с фолиевой кислотой, и вводили подкожно бестимусным мышам с перевитыми ксенографтами опухоли из HeLa-клеток. Через 24 часа в опухоли наблюдали сильный флуоресцентный сигнал на длине волны 650 нм, а в опухоли контрольных мышей, которым вводили НАФ без адресной молекулы (фолиевой кислоты), флуоресценция практически отсутствовала.

Пептид RGD обладает высокой аффинностью к интегринам $\alpha\beta_3$, который играет существенную роль в ангиогенезе опухоли. Xiong и соавт. [308] использовали конъюгаты НАФ с RGD-пептидом для адресной визуализации опухоли, перевитой мышам из клеток U87MG глиобластомы человека, гиперэкспрессирующих интегрин $\alpha\beta_3$. Через 1 час после инъекции регистрировали флуоресцентный сигнал в целевой опухоли, который сохранялся в течение 24 часов. Кроме того, было получено большое значение отношения сигнал/шум (~24) между опухолью и фоном, которое обычно невозможно получить при пассивной визуализации опухоли.

Доставка лекарств. Уникальные оптические свойства и разнообразие поверхностных свойств, которые позволяют получать гибридные наноструктуры, делают НАФ весьма перспективными носителями для доставки лекарств. НАФ могут быть легко получены с унимодальным распределением по размерам и большой площадью поверхности, необходимой для эффективного включения фармацевтических препаратов и адресных молекул. [313] В литературе сообщается о двух основных подходах к введению лекарств: 1) инкапсуляция за счет гидрофобных взаимодействий; 2) осаждение в мезопористых оболочках диоксида кремния.

Согласно первому подходу лекарства включают за счет гидрофобных взаимодействий с лигандами на поверхности НАФ. В работе [314] на поверхности НАФ формировали гидрофобную область из лиганда-стабилизатора и гидрофобной части молекулы ПЭГ-модифицированного амфифильного сополимера малеинового ангидрида и октадецена. В эту область вводили противораковое лекарственное средство, такое как доксорубин, высвобождение которого контролировали путем изменения pH. В кислой

среде опухолевых клеток возможно контролируемое высвобождения доксорубина из таких наноструктур НАФ.

При втором подходе лекарства вводили в оболочку из мезопористого диоксида кремния на поверхности НАФ. Например, модельный препарат ибупрофен эффективно инкапсулировали в мезопористую оболочку на поверхности НАФ [315] благодаря высокой удельной поверхности и большому объему пор. Количество ибупрофена контролировали по изменению толщины оболочки SiO_2 . Кроме того, при введении в оболочку ибупрофен значительно тушил флуоресценцию за счет передачи энергии между лекарством и НАФ, поскольку ибупрофен обладает высокой вибрационной энергией. Процесс высвобождения лекарственного средства контролировали по восстановлению интенсивности флуоресценции.

Фотодинамическая терапия. Фотодинамическая терапия (ФДТ) - это клиническое лечение опухолей с использованием активных форм кислорода (АФК), [316] генерируемых фотосенсибилизатором, который возбуждается внешним источником света. ФДТ является неинвазивным, быстрым методом, который можно применять локально. ФДТ обычно включает три компонента: фотосенсибилизатор, источник света и кислород в патологической ткани. АФК могут эффективно убивать раковые клетки, разрушая клеточные компартменты и вызывая апоптоз или некроз клеток. Однако ФДТ ограничена глубиной проникновения света, необходимой для активации фотосенсибилизатора.

Перспективными носителями, выступающими в качестве донора энергии для фотосенсибилизаторов, являются НАФ, возбуждаемые светом из ближней ИК-области. В работе [317] использовали НАФ, покрытые оболочкой из диоксида кремния, в которую инкапсулировали фотосенсибилизатор трис(2,2'-бипиридин) рутения (II) $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$. Данный фотосенсибилизатор имеет максимум поглощения на длине волны 450 нм, который перекрывается с синим пиком излучения Tm^{3+} при возбуждении светом с длиной волны 980 нм. Таким образом, излучение НАФ служило источником возбуждения $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, что сопровождалось генерацией синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, который детектировали с помощью коммерческого реагента.

Первое применение ФДТ *in vivo* на основе НАФ продемонстрировали Wang и соавт. [318] путем включения фотосенсибилизатора хлорина е6 (Ce6) в покрытие на поверхности НАФ на основе ПЭГ-модифицированного амфифильного полимера. Заметная регрессия опухоли наблюдалась после 30-минутной инкубации НАФ-Ce6, введенных интратуморально в опухоль рака молочной железы 4T1 мышей BABL/C, и лазерного облучения на длине волны 980 нм.

В другой работе Сui и соавт. [319] получили гидрофильные наноструктуры НАФ с биodeградируемым покрытием на основе N-сукцинил-N'-октилхитозана, включающие фотосенсибилизатор фталоцианин цинка (ZnPc) за счет гидрофобных взаимодействий с производными хитозана. Выраженный противоопухолевый эффект НАФ-ZnPc, введенных внутримышечно, по отношению к саркоме мышей S180, наблюдали через 15 минут при облучении светом на длине волны 980 нм.

Использование наноструктур НАФ с адресными лигандами приводит к их накоплению в опухоли благодаря специфическому взаимодействию с рецепторами раковой клетки. В работе [320] впервые продемонстрировали адресную ФДТ *in vivo* с использованием ПЭГ-модифицированных НАФ, содержащих два фотосенсибилизатора ZnPc и MC540 (мероцианин 540) и конъюгированных с фолиевой кислотой. Мышам с опухолями меланомы B16-F0 внутривенно вводили наноструктуры и через 4 часа облучали лазером с длиной волны 980 нм. Регистрировали значительное снижение роста опухоли по сравнению с ростом опухоли у контрольных мышей (без облучения).

Несмотря на продемонстрированные преимущества, накопление НАФ в опухолях пока недостаточно высоко, поскольку наночастицы накапливаются в органах ретикуло-эндотелиальной системы, таких как селезенка, печень, почки, легкие, что на данном этапе исследований, связанных с НАФ, ограничивает их применение в ФДТ *in vivo*.

Таким образом, применение НАФ для оптической визуализации и тераностики, имеют целый ряд преимуществ, включая высокую чувствительность, низкую стоимость, мониторинг в реальном времени и безопасность, а также возбуждение флуоресценции и эмиссия в ближней ИК-области определяют возможность детекции сигнала в глубоких слоях биоткани.

В качестве заключения можно отметить, что существует большое разнообразие методов получения дисперсий полимерных микрочастиц, отличающихся формой, размерами, морфологией, межфазной поверхностью, функциональностью, в том числе обусловленной присутствием неорганических наночастиц. Однако в настоящее время не представлено универсального подхода, позволяющего на базе одного мономера, получать набор коллоидно-стабильных полимерных частиц в широком диапазоне диаметров с узким распределением по размерам, которые могут обладать целой линейкой свойств, таких как, яркая окраска, интенсивный флуоресцентный сигнал, наличие реакционноспособных групп или стимул-чувствительной поверхности и др. В настоящей работе будет представлена разработка такого подхода, в котором на основании одного метода полимеризации

(осадительной полимеризации) одного мономера (акролеина) и его сополимеризации со стиролом получены полимерные частицы и микроструктуры на их основе с новыми, особыми свойствами, которые ведут к преодолению ограничений традиционных биомедицинских анализов. Рассматривая современное состояние в области создания наноструктур на основе флуоресцентных неорганических апконвертирующих нанокристаллов, следует отметить, что несмотря на большое разнообразие подходов, существует необходимость в «настройке» методов модификации под конкретный вид исследования. В настоящей работе предложен универсальный способ, легко адаптируемый для получения набора биосовместимых, нетоксичных наноструктур с высоким коэффициентом апконверсии, сохраняющих коллоидную и химическую стабильность в буферных системах, которые отвечают требованиям, необходимым для их применения в различных медико-биологических анализах.

ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

II.1. Материалы

Акролеин, технический продукт фирмы «Fluka», трижды перегоняли при атмосферном давлении. Использовали фракцию, кипящую при 52°C, $\rho_4^{20} = 0,806 \text{ г/см}^3$, $n_D^{20} = 1,43$. [39]

Стирол, технический продукт фирмы «Fluka», очищали от стабилизатора 5%-ым водным раствором гидроксида натрия, промывали водой до нейтральной реакции, сушили над прокаленным хлористым калием и дважды перегоняли под вакуумом. Использовали фракцию, кипящую при 51°C (2,1 кПа), $\rho_4^{20} = 0,906 \text{ г/см}^3$, $n_D^{20} = 1,54$. [321]

В работе использовали следующие реактивы отечественного производства (категории «хч» и «осч»): рибофлавин мононуклеотид (Фармстандарт), агароза, азид натрия, формалин, этиловый спирт, метиловый спирт, соляная кислота, лимонная кислота, ортофосфорная кислота, гидроксид натрия хлорид кальция, хлорид калия, хлорид натрия, хлорид магния, хлорид никеля, хлорид меди, хлорид цинка, хлорид бария, хлорид кобальта, карбонат и гидрокарбонат натрия, сульфат аммония, глицин, мочеви́на, пероксид водорода персульфат калия, фосфорно-молибденовая кислота (ЛабТех и РеаХим);

2,2-азо-*бис*-изобутиронитрил, дигидрофосфат натрия, гидрофосфат натрия, хлорид натрия, борная кислота, тетраборат натрия, боргидрид натрия, *p*-нитрофенилгидразин, гидроксид тетраметиламмония, полистиролсульфонат натрия (М.м. 75000), *N*-винилкапролактан, поли(*D,L*-лактид) (М.м. 18000), сополимер лактида с гликолидом (М.м.15000), декстран сульфат натрия (М.м.100000), поли-*N*-винилпирролидон (М.м.25000) («Merck») применяли без дополнительной очистки.

Желатин, поли-*L*-лизин (М.м. 120000) фирмы «Fluka» использовали без дополнительной очистки.

Родамин 6G, родамин В, кристаллический фиолетовый, додецилсульфат натрия, Triton X-100, Tween-20, этаноламин, этилендиамин, гексаметилендиамин, *p*-фенилендиамин, чередующийся сополимер малеинового ангидрида и октадецена (М.м. 30000), овальбумин, бычий сывороточный альбумин, 6-аминокапроновая кислота, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид·HCl, полиэтиленимин (М.в. 25000), *N*-гидроксисульфосукцинимид фирмы («Serva») использовали без дополнительной очистки.

Tris-гидроксиметиламинометан фирмы (Reanal, Венгрия) использовали без дополнительной очистки

Аммиак, 25% водный раствор, применяли марки «хч», без дополнительной очистки.

2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D), родственные 2,4-D соединения марки «ч» применяли без дополнительной очистки.

2,4-D, конъюгированная с полиакриламидом, (агглютинатор 2,4-D-ПАА) получена в лаборатории «Химии углеводов» ИБХ РАН.

Моноклональные антитела к 2,4-D получены из гибридомы клона 4/E2/G2 и любезно предоставлены проф. С.Н. Ереминым, химический факультет МГУ, Москва.

Анти-*Y. Pestis* моноклональные антитела мышей (клон F-19) и *Y. Pestis* F1-антиген любезно предоставлены проф. П.Г. Свешниковым, Исследовательский Центр Молекулярной диагностики и терапии, Москва

Полупроводниковые нанокристаллы CdSe/ZnS структуры ядро/оболочка, стабилизированные триоктилфосфиноксидом (ТОФО), диаметром 3.5 нм ($\lambda_{эм}=546$ нм), 4.2 нм ($\lambda_{эм}=558$ нм) и 6 нм ($\lambda_{эм}=610$ нм) были любезно предоставлены проф. М.В. Артемьевым, Белорусский институт физико-химических проблем.

Апконвертирующие нанофосфоры $NaYF_4:Yb^{3+}/Er^{3+}$ или $NaYF_4:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ (НАФ) структуры ядро/оболочка, стабилизированные олеиновой кислотой, в диапазоне диаметров 40-95 нм были синтезированы и любезно предоставлены доц. Нечаевым А.В., МИРЭА, Москва.

Растворители: диметилформамид ($T_{кип}=153.2$ °C), хлороформ ($T_{кип}=61.2$ °C), метанол ($T_{кип}=64,7$ °C), этанол ($T_{кип}=78.4$ °C), пропанол-2 ($T_{кип}=82,4$ °C), пропанол-1 ($T_{кип}=97,4$ °C), ацетон ($T_{кип}=56,1$ °C), гексан ($T_{кип}=68,0$ °C) очищали по стандартным методикам. Использовали бидистиллированную воду.

II.2. Методы исследования

1. Синтез полиакролеиновых дисперсий методом осадительной полимеризации в водно-щелочной среде (M1). Дисперсии полиакролеиновых частиц получали в трехгорлой круглодонной колбе, снабженной механической мешалкой. Для поддержания необходимой температуры использовали водяную баню, температура которой поддерживали на уровне 70 ± 1 °C (для стадии радикальной сшивки). На стадии осадительной полимеризации акролеина в дисперсионную среду (воду) добавляли свежеперегнанный акролеин до достижения соотношения фаз мономер-вода, 1:20 об., затем по каплям при перемешивании вводили 0,2 н раствор гидроксида натрия до достижения pH 11.

При получении полимерных частиц в присутствии красителей (на примере родамина 6G) в дисперсионную среду добавляли водный раствор красителя в диапазоне концентраций 0,04-0,6% мас. в расчете на мономер до введения мономера.

Спектры поглощения водных растворов красителей в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-3} М измеряли на спектрофотометре «Specord M-40» (Германия). Спектры поглощения полимерных дисперсий, содержащих красители, в концентрации ~0,01% мас. измеряли на спектрофотометре «Hitachi 557» (Япония). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре «Jobin Ivon».

При осадительной полимеризации в присутствии аминов водные растворы аммиака, этилендиамина, гексаметилендиамина, фенилендиамина в диапазоне концентраций 0,05-0,3% мас. в расчете на мономер вводили в систему, содержащую акролеин. Полимеризацию проводили в течение трех часов при перемешивании при комнатной температуре.

За скоростью полимеризации следили методом гравиметрии по стандартной методике.[321] Изменение диаметра частиц дисперсии в процессе синтеза регистрировали путем отбора проб через определенные промежутки времени и обрыва роста цепи с помощью 0,1% соляной кислоты, взятой в эквимольном количестве к массе частиц, полученном в предыдущем измерении, и определяли размер частиц. Измерения проводили в трех повторах (n=3).

На стадии радикальной сшивки к 5% дисперсии, полученной осадительной полимеризацией, добавляли водный раствор персульфата калия в количестве 2% мас. в расчете на полимер. После 30 мин продувки инертным газом для удаления кислорода, ингибирующего радикальный процесс, систему нагревали до 70⁰С и проводили реакцию при этой температуре и перемешивании в атмосфере азота в течение 2 ч.

2. Синтез сополимерных дисперсий методом безэмульгаторной радикальной полимеризации. Полимеризацию проводили в водной среде при соотношении мономеров акролеин : стирол, 1:1, 5:1, 10:1 (моль) в трехгорлой круглодонной колбе, снабженной механической мешалкой. Для поддержания необходимой температуры использовали водяную баню, температуру которой поддерживали на уровне $70 \pm 1^{\circ}\text{C}$. В качестве инициатора использовали персульфат калия в концентрации 0,5% мас. в расчете на мономеры. Стирол гомогенизировали в дисперсионной среде при соотношении мономеры : вода, 1:10, об./об., затем при перемешивании добавляли акролеин, инициатор и реакционную смесь нагревали до 70⁰С. Полимеризацию проводили в атмосфере азота при перемешивании в течение 12 ч. За скоростью полимеризации следили методом гравиметрии по стандартной методике.[321] Изменение диаметра частиц дисперсии в процессе синтеза

регистрировали путем отбора проб через определенные промежутки времени. Измерения проводили в трех повторах ($n=3$).

3. Очистка полимерных дисперсий. Очистку полимерных дисперсий от непрореагировавших компонентов проводили методом центрифугирования, используя трехкратную промывку дистиллированной водой. Частицы, имеющие диаметр больше 1 мкм, осаждали при 3000 об/мин на центрифуге «Sigma-404» (Германия), а в случае частиц меньшего диаметра использовали центрифугу “Eppendorf MiniSpin” для осаждения частиц на скорости от 3000 до 13400 об/мин. Надосадочную жидкость заменяли на дистиллированную воду и редиспергировали осадок. Для определения концентрации очищенной суспензии использовали гравиметрический метод анализа, проводимый по стандартной методике. [321]

4. Определение концентрации олигомеров в надосадочной жидкости. Определение олигомерных продуктов проводили на спектрофотометре «Beckman DU-70» при длине волны 273 нм [322], в кювете сравнения находилась вода. Для анализа использовали надосадочную жидкость после центрифугирования полиакролеиновых суспензий. Результаты, полученные в оптических единицах, были пересчитаны на массу олигомера. Расчет проводили с использованием калибровочного графика, представляющего зависимость оптического поглощения от концентрации олигомера, построенной на основе предварительно полученных данных по измерению поглощения образцов олигомеров известной концентрации. Образцы олигомера для калибровки были получены из надосадочной жидкости после центрифугирования полимерных дисперсий, поскольку олигомеры не осаждаются при используемой скорости вращения ротора. Образцы высушивали ($n=3$), взвешивали и растворяли в воде в диапазоне концентраций 0,01-1 мг/мл. Измерение оптической плотности данных образцов проводили в тех же условиях, что и исследуемые пробы.

5. Измерение размеров и дзета-потенциала частиц полимерной суспензии и наночастиц. Распределение частиц полимерной суспензии по размерам оценивали на многоугловом анализаторе субмикронных частиц «Coulter N4 MD» (Франция). Рабочий интервал измерения от 3 до 3000 нм, время измерений 2-4 мин. Измерения проводили в автоматическом режиме под углом 90 по стандартной методике. Средний диаметр частиц ($n=3$), среднее квадратичное отклонение и коэффициент вариации определяли, используя компьютерную программу Contin (разработчик фирма Coulter).

Распределение наночастиц по размерам и дзета-потенциал всех частиц оценивали на анализаторе частиц «Brookhaven Corporation Instruments T90Plus». Рабочий интервал

измерения от 1 до 6000 нм, время измерений 5 мин. Измерения проводили в автоматическом режиме по стандартной методике.

6. Измерение концентрации альдегидных групп на поверхности полимерных частиц. Для анализа содержания активных альдегидных групп проводили инкубацию дисперсий с *n*-нитрофенилгидразином (НФГ) в фосфатном буфере с pH 5.3 [323]. При этом протекала следующая реакция:



Для построения калибровочной кривой: 4 мг НФГ растворяли в 5 мл этанола-ректификата, к полученному раствору добавляли 95 мл фосфатного буфера. Спектрофотометрически на приборе «Beckman DU-70» (Германия) определяли оптическое поглощение растворов НФГ различной концентрации, против фосфатного буфера (pH 5.3) при длине волны 392 нм. По полученным результатам строили калибровочную кривую. Анализ исследуемых образцов проводили путем смешивания 1 мл раствора НФГ и 100 мкл 5% дисперсии полимера в двух пробирках. Далее первый образец центрифугировали и измеряли величину оптического поглощения надосадочной жидкости при длине волны 392 нм. Вторую пробу анализировали после инкубации при постоянном перемешивании в течение 6 часов. С помощью калибровочной кривой определяли начальную и конечную концентрации НФГ в пробах по измеренным величинам оптического поглощения. Расчет содержания поверхностных альдегидных групп производили по формуле:

$$C_{\text{АГ}} = (C_0 - C_k) V_p 10^6 / (V_l C_l M)^{-1}$$

где: C_0 - начальная концентрация НФГ в пробе, мг/мл;

C_k - конечная концентрация НФГ в пробе после инкубации, мг/мл;

V_l - объем анализируемой суспензии, мл;

V_p - общий объем раствора, мл;

C_l - начальная концентрация суспензии, мг/мл;

M - молекулярная масса НФГ, мг/ммоль.

7. Измерение количества красителя, включенного в полимерные частицы. Для определения количества красителя, включенного в полимерные частицы, на спектрофотометре «Beckman DU-70» (Германия) измеряли поглощение красителя в надосадочной жидкости после центрифугирования дисперсий. Далее по калибровочному графику, представляющему зависимость оптической плотности водного раствора от концентрации красителя, определяли концентрацию красителя, не включенного в частицы

полимерных дисперсий ($n=3$). Количество включенного красителя рассчитывали с учетом разбавления, концентраций не включенного и добавленного красителя по формуле:

$$X=1-M_n/M_v,$$

где, X - количество включенного красителя, % мас.,

M_n - количество красителя, не включенного в полимер (мг); рассчитывается по результатам анализа надосадочной жидкости с использованием калибровочного графика (a , мг/мл) и объема надосадочной жидкости (V мл): $M_n=axV$,

M_v - количество добавленного красителя (мг).

8. Окрашивание частиц полиакролеиновых дисперсий после синтеза и обработка фосфорно-молибденовой кислотой. Для окрашивания полиакролеиновых частиц после синтеза к 100 мл 1% мас. дисперсии, предварительно очищенной методом центрифугирования, добавляли 100 мл 0,5% раствора красителя с 4%-ым раствором додецилсульфата натрия. После перемешивания в течение 15 мин, смесь выдерживали на водяной бане при 70°C в течение 1 ч., а затем оставляли на сутки при комнатной температуре. Окрашенную полимерную дисперсию трижды очищали от не включенного красителя с помощью центрифугирования.

С целью снижения вымывания красителя из окрашенных частиц проводили инкубацию дисперсий с фосфорно-молибденовой кислотой (ФМК) в течение 3-х суток при 4°C путем замены надосадочной жидкости 100 мл 5% дисперсии на 100 мл 0.01% раствора кислоты. Далее трижды очищали от непрореагировавших компонентов в цикле центрифугирование/редиспергирование в воде.

9. Исследование спектрально-флуоресцентных свойства микро- и наночастиц. Спектры поглощения водных растворов красителей снимали на спектрофотометре «Beckman DU-70» (Германия), а полиакролеиновых суспензий **M1** – на спектрофотометре «Hitachi 557» (Япония). Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре фирмы «Jobin Ivon» (Япония). Интенсивность флуоресценции микросфер измеряли с помощью цитофлуориметра «Epic V» (фирма Coultronics, Франция).

Флуоресцентные свойства КТ, гибридных частиц **M2**, наполненных КТ в процессе набухания, а также частиц **M1** и **M2**, содержащих КТ в слоях стимул-чувствительных полимеров на поверхности частиц исследовали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-551.

10. Исследование агрегативной устойчивости микро- и наночастиц в электролитах. Агрегативную устойчивость частиц в растворах электролитов исследовали

в модельном растворе NaCl, поскольку 0.15M NaCl является физиологическим раствором, представляющий собой основной компонент плазмы крови, тканевых и межтканевых жидкостей. Анализ проводили путем смешивания равных объемов дисперсии с концентрацией 0.1 % мас. и раствора хлорида натрия на стеклянной пластинке с последующей визуальной регистрацией образующихся агломератов частиц. Для испытаний использовали растворы NaCl в диапазоне концентраций: 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.15 и 0.07 M. Учет результатов проводили через 5 мин после смешивания дисперсии и раствора соли. В случае агрегативно неустойчивой системы частицы образуют творожистый осадок. Стабильные дисперсии формируют гомогенную систему.

11. Получение агглютинаторов для проведения реакции латексной агглютинации. Агглютинатор 2,4-D-OVA получали на химфаке МГУ по методике, описанной в работе [324], путем взаимодействия гаптена 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-D) с овальбумином (OVA) в присутствии карбодиимида и N-гидроксисукцинимиды (метод активированных эфиров). Получено молярное соотношение гаптен-овальбумин, 10:1.

Синтетические агглютинаторы 2,4-D-РАА на основе полиакриламида (РАА) были получены в лаборатории углеводов под рук. Бовина Н.В. (ИБХ РАН) конденсацией гаптена 2,4-D с поли(4-нитрофенилакрилатом). Поли(4-нитрофенилакрилат) получали полимеризацией 4-нитрофенилакрилата в присутствии 2,2'-азо-*бис*-изобутиронитрила в сухом бензоле. 2,4-D для введения в реакцию конденсации модифицировали гексаметилендиаминовым спейсером. Реакцию модификации проводили в сухом диметилформамиде в присутствии триэтиламина по методике [325]. Содержание 2,4-D в образцах составляло 2.5, 5, 10 мол.%. Полимеры имели молекулярную массу 40-400 кДа.

12. Получение микроструктур (конъюгатов) полимерных частиц с антителами к 2,4-D. Микроструктуры с антителами к 2,4-D получали двумя способами: а) путем ковалентного связывания антител и поверхностных альдегидных групп микрочастиц; б) путем ковалентного связывания антител со спейсером, 6-аминокапроновой кислотой (с), прикрепленным к поверхности микрочастиц.

а) Для ковалентного связывания антител с альдегидными группами к 0,1 мл 5% окрашенной дисперсии **М1** в 0.4 мл 0.1M Na-боратного буфера (рН 8,2) (ББ) добавляли препарат 20 – 200 мкл антител (0.35 мкг/мл в 0.1M фосфатно-солевом буфере (PBS), рН 7.4), и инкубировали на водяной бане 30 мин при 56°. Для блокировки непрореагировавших альдегидных групп к дисперсии микроструктур добавляли 4 мл ББ с OVA (10 мг/мл). После инкубации в течении 10 мин при комнатной температуре реакцию смесь трижды

отмывали от избытка антител центрифугированием и затем редиспергировали в 5 мл ББ с OVA (10 мг/мл). Для исследований использовали 0.1% дисперсию микроструктур.

б) Модификацию поверхности для связывания антител через спейсер проводили следующим образом: 1 мл 5% дисперсии **M2** по каплям добавляли к 3 мл 3% водного раствора. pH суспензии доводили до 9 с помощью 0,1 н NaOH, затем реакционную смесь перемешивали в течение 32 ч. при комнатной температуре. Этаноламин (0,2 мл) добавляли для блокировки свободных альдегидных групп и перемешивали в течение ночи при 4°C. Затем суспензию инкубировали с боргидридом натрия (0,05 г) в течение 4 ч. и трижды отмывали в цикле центрифугирование/редиспергирование. [326]

Микроструктуры частиц **M2**, модифицированных спейсером, с антителами получали в процессе карбодиимидной активации карбоксильных групп. Для формирования ковалентной связи 0,125 мл 5% мас. модифицированной дисперсии **M2** осаждали на центрифуге при 10000 об/мин и ресуспендировали в 0,125 мл 0.5% раствора 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида·HCl в 0.1М фосфатном буфере (pH 5,2). После перемешивания в течение 15 мин при 4°C частицы переводили в 0,2 мл ББ (pH 8,2), содержащего 200-400 мкл антител против 2,4-D (0.35мкг/мл в 0.1М PBS pH 7.4). Смесь выдерживали 1 ч при комнатной температуре при перемешивании, затем добавляли 0,01 мл 0,1 М раствора глицина для остановки реакции. Конъюгаты трижды отмывали ББ с 10 мг/мл OVA центрифугированием и после последней отмывки ресуспендировали в 5 мл ББ. Для исследований использовали 0.1% дисперсию микроструктур.

13. Прямая реакция (РЛА) и реакция ингибирования (РИЛА) латексной агглютинации. Для постановки РЛА и РИЛА использовали 96-луночные микропланшеты с U-образным дном лунок. Реакцию проводили в Na-боратном буфере pH 8,2 с 0,2% OVA (ББ-OVA). Раствор антигена (агглютинатора) с исходной концентрацией 0,2 мкг/мл титровали в микропланшете с шагом 2 по 25 мкл в каждой лунке, оставляя 2 последние лунки ряда титрования только с буфером, как нулевой контроль. Затем во все лунки добавляли по 25 мкл микроструктур **M1**, планшет встряхивали и оставляли в покое при комнатной температуре. Реакцию учитывали через 1,5 ч. При положительной реакции на дне лунки формировался окрашенный агглютинат в виде перевернутого зонтика, а при отрицательной – осадок в виде точки. Минимальную определяемую концентрацию агглютинатора детектировали по последней лунке с положительной реакцией, «зонтик» которой соответствовал значению «++», принятому в реакции оседания эритроцитов.

При постановке РИЛА сначала готовили рабочее разведение агглютинатора, в 2-5 раз превышающее его минимальную определяемую концентрацию, полученную в РЛА.

Раствор 2,4-D титровали в планшете с шагом 2 по 12.5 мкл в каждой лунке. Затем в каждую лунку добавляли по 12.5 мкл рабочего разведения агглютинатора и по 25 мкл микроструктур **M1**. Через 1,5 ч. регистрировали результаты реакции: образование в лунке осадка в виде точки (соответствует негативному результату РЛА) оценивали как положительную РИЛА. Формирование «зонтиков» свидетельствовало о негативной РИЛА.

14. Спектрофотометрический метод исследования реакции латексной агглютинации. Турбидиметрический метод исследования реакции латексной агглютинации позволяет изучать её кинетические закономерности. Наблюдение за процессом агрегации микроструктур, инициированного добавлением агглютинатора, проводили на спектрофотометре «Ultrospec» (ЛКВ, Швеция) при длине волны 600 нм. Через 5 сек после перемешивания 0.2 мл микроструктур **M2** и 660-755 мкл 0.1М Na-боратного буфера (рН 8.2) добавляли 45-140 мкл агглютинаторов (1 мкг/мл в воде) и начинали спектрофотометрическое наблюдение за процессом, которое продолжалось в течение 600 сек. Скорость реакции агглютинации ($\Delta A/\text{мин}$) определяли по тангенсу угла наклона прямолинейного участка кривой, фиксирующей увеличение относительного оптического поглощения. Значение предельного поглощения ΔA_{max} определяли как разность начального поглощения образца и максимального значения, полученного при реакции агглютинации. Аналогично проводили реакцию ингибирования со свободным гаптенем 2,4-D. Предварительно при комнатной температуре смешивали 0.2 мл микроструктур **M2** и 5-50 мкл раствора 2,4-D в воде (1 мкг/мл) в 600-695 мкл 0,1М ББ, рН 8.2, и через 10 мин после добавления 1 мкг/мл водных растворов агглютинаторов (150 мкл 2,4-D-OVA и 100 мкл 2,4-D-ПАА, со степенью замещения 2.5% мол.) спектрофотометрически следили за протеканием реакции.

15. Включение квантовых точек (КТ) в частицы сополимерных дисперсий M2 в процессе их набухания в растворителе. Для включения КТ в сополимерные частицы дисперсий **M2** на первом этапе выбирали растворители, подходящие для набухания в них частиц. Использовали метанол, этанол, пропанол, пропанол-2, бутанол, тетрагидрофуран, ацетон, гексан, хлороформ, диметилсульфоксид и их смеси с соотношениями 1: 1, 2: 1, 5: 1 и 10: 1. После инкубации сополимерных частиц в растворителях измеряли размер частиц (растворитель не должен приводить к уменьшению размера, образованию агрегатов и неограниченному набуханию), проверяли агрегативную устойчивость в электролите (стабильная дисперсия оставалась гомогенной в растворе электролита, а в нестабильной - формировались агрегаты в виде творожистого осадка).

Квантовые точки диспергировали в хлороформе и после удаления избытка триоктилфосфиноксида (ТОФО) с поверхности КТ их переводили в спирты из списка растворителей для полимерных частиц, затем КТ добавляли к дисперсии частиц **M2** после их набухания. Высокая интенсивность флуоресценции, узкое распределение по размерам, увеличение диаметра частиц не более 30% и коллоидная стабильность определили выбор смеси растворителей пропанол-2 : хлороформ, 10:1 для процедуры набухания сополимерных частиц **M2**.

Более детальная методика представлена далее. 2 мл пропанола-2 добавляли к 0,2 мл 5 % мас. дисперсии сополимерных частиц, смесь обрабатывали ультразвуком три раза по 2 мин и центрифугировали в течение 5 мин, осадок диспергировали в 2 мл пропанола-2 и 0,2 мл хлороформа. Полученную дисперсию инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Для удаления стабилизатора ТОФО, используемого в синтезе КТ, 2 мг КТ диспергировали в хлороформе и осаждали с метанолом (соотношение 1: 3). Очищенные КТ диспергировали в 2 мл пропанола-2 и добавляли к дисперсии полимерных частиц в смеси пропанол-2 : хлороформ, 10:1 после их набухания. Смесь интенсивно перемешивали, обрабатывали ультразвуком в течение 2 минут и перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре (эту процедуру повторяли три раза) в течение 2 ч. Затем систему центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 минут, осадок диспергировали в воде (эту процедуру повторяли пять раз, чтобы удалить свободные КТ) и диспергировали в 0,2 мл воды. Для удаления растворителя полученные полиакролеин-содержащие частицы, наполненные КТ, диализовали против воды в течение 2 суток при 4°C. Измеряли флуоресценцию полученных дисперсий и корректировали интенсивность с учетом разведения в процессе включения КТ.

16. Получение микроструктур полимерных частиц M2, содержащих КТ, с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Аликвоту (0,125 мл) 5% мас. полимерной дисперсии M2, содержащей КТ, инкубировали с БСА (концентрация 0,5–4 мг на 1 г полимера) в 0,1 М ББ рН 8.2 при 56°C на водяной бане в течение 30 минут. Для блокировки непрореагировавших альдегидных групп добавляли 0,5 мл раствора глицина (10 мг/мл) в 0,1 М ББ, рН 8.2. Затем реакцию смесь промывали три раза в цикле центрифугирование/диспергирование для удаления избытка белка и диспергировали в 5 мл ББ. Концентрацию несвязанного БСА в надосадочной жидкости измеряли с использованием метода Брэдфордом спектрофотометрически на длине волны $\lambda=595$ нм. Количество иммобилизованного белка рассчитывали, как разницу между количеством добавленного и несвязанного белка.

17. Получение микроструктур полимерных частиц M2, содержащих КТ, с антителами F-19. Антитела F-19 (1–20 мкг антител на 1 г полимера) добавляли к 0,125 мл 5% мас. полимерной дисперсии, содержащей КТ, в 0,4 мл 0,1 М ББ, рН 8,2 и инкубировали при 56°C на водяной бане в течение 30 мин. Для блокировки непрореагировавших альдегидных групп добавляли 4 мл ББ с БСА (10 мг/мл). Затем реакционную смесь промывали три раза центрифугированием для удаления избытка антител и диспергировали в 5 мл ББ с БСА (10 мг/мл). Для дальнейшего анализа использовали 0,1% дисперсию.

18. РЛА в планшете для определения F-1 антигена. Реакцию латексной агглютинации проводили в микротитрационном планшете с U-образным дном лунок в 0,1 М ББ, рН 8,2. Раствор антигена F-1 бактерии *Y. pestis* с начальной концентрацией 0,12 мкг/мл титровали в микропланшете с шагом 2 по 25 мкл в каждой лунке, оставляя 2 последние лунки ряда титрования только с буфером, как нулевой контроль. Затем добавляли по 25 мкл микроструктур на основе частиц M2 с антителами F-19, интенсивно встряхивали и выдерживали при комнатной температуре. Результаты агглютинации регистрировали через 3 часа в ультрафиолетовом свете. При положительной реакции на дне лунки формировался флуоресцентный агглютинат в виде перевернутого зонтика, а при отрицательной – осадок в виде точки.

19. Экспрессия и очистка миниантител 4D5scFv. Миниантитела были получены и охарактеризованы в лаборатории молекулярной иммунологии под рук. Деева С.М. (ИБХ РАН). Для наработки биомассы, содержащей антитела 4D5scFv с His5-меткой на С-конце, клетки *E. coli* штамма SB536 трансформировали плазмидой pIG6-4D5. Полученные трансформированные клетки выращивали в среде YTPS (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 45 мМ K₂HPO₄, 5 мМ KH₂PO₄, 0,1 М NaCl и 100 мг / мл ампициллин) с 2 мМ MgCl₂, экспрессию 4D5 scFv индуцировали с помощью 1 мМ изопропилгалктопиранозид при OD₆₀₀ = 0,6. Экспрессию проводили в течение 4 ч при 27°C [327]. Периплазматические белки из собранных бактерий были экстрагированы 0,5 мг/мл лизоцимом в Трис-буфере рН 7,8 при перемешивании на льду в течение 40 мин. Экстракт осветляли центрифугированием и добавляли 10% глицерин, 0,25М NaCl и 20 мМ имидазол. рН доводили до 7,8 при 4° С. Экстракт очищали методом металл-аффинной хроматографии в нативных условиях на колонке «HisTrap FF 1мл» (GE Healthcare), содержащей Ni²⁺-NTA сефарозу, согласно инструкциям производителя. После этого колонку промывали 20 мл Трис-буфером и элюировали целевой белок раствором имидазола (0–0,2 М), приготовленным на том же буфере при скорости потока жидкости 0.1 мл/мин.

20. Получение микроструктур полимерных частиц M2, содержащих КТ, с антителами 4D5 scFv. Антитела 4D5 scFv (1,5 и 6,8 мкг антитела на 1 г полимера) в 0,2 мл 0,1 М ББ, рН 8,2 добавляли к 25 мкл 5% мас. дисперсии M2, содержащей КТ, и инкубировали при 4°C в течение 15 ч. Для блокировки непрореагировавших альдегидных групп добавляли 1 мл ББ с БСА (10 мг/мл). Затем реакцию смесь три раза центрифугировали для удаления избыток scFv 4D5 и диспергировали в 1 мл ББ с БСА (10 мг/мл). Для дальнейших исследований использовали 0,1% дисперсия частиц.

21. Иммунофлуоресцентная визуализация клеточных рецепторов HER2/неу. Клетки рака яичников человека SKOV-3 (НТВ 77, АТСС) в концентрации 2×10^3 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты (Corning, США), содержащие среду RPMI-1640 с 10% эмбриональной сывороткой теленка и 2 мМ l-глутамином, плотность на лунку и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение ночи. Микроструктуры с 4D5scFv диспергировали в PBS, рН 7,4 с 10 мМ CaCl₂, 10 мМ MgCl₂, 1% эмбриональной сыворотки теленка и 0,01% азид натрия. Нефиксированные живые клетки осторожно дважды промывали PBS, рН 7,4. Затем клетки инкубировали на льду с 100 мкл 0,1% мас. дисперсией микроструктур в течение 40 мин. После инкубации клетки промывали PBS, рН 7,4 для удаления несвязанных микроструктур. В контрольных экспериментах клетки инкубировали с дисперсией микроструктур с альбумином (использовали тот же протокол, что для конъюгации с 4D5scFv). Для получения более контрастного изображения к клеткам за 5 мин до окончания инкубации добавляли 1 мкл (10 мг/л) красителя акридинового оранжевого. Изображения клеток были получены в реальном времени с использованием инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 с объективом 40 × и AxioCam HRC и CCD-камерой (Zeiss, Германия). Флуоресценцию КТ и акридинового оранжевого возбуждали ртутной лампой в качестве источника света на длине волны 450–490 нм и 332–382 нм, соответственно. Флуоресцентные изображения были получены с использованием соответствующих фильтров: 575–640 нм для КТ и 515–700 нм для акридинового оранжевого.

22. Модификация КТ для включения в полиэлектролитные слои на поверхности частиц M1. С поверхности КТ (0,06 мг) диаметром 3,5 нм (максимум излучения 550 нм) или 6 нм (максимум излучения 610 нм) удаляли избыток стабилизатора ТОФО путем диспергирования в хлороформе и осаждения в метаноле. Процедуру повторяли три раза. Затем по каплям добавляли раствор гидроксида тетраметиламмония (ТМАГ) (5 мг) в 0,2 мл H₂O к дисперсии КТ в хлороформе и две несмешивающихся фазы тщательно встряхивали для реализации перехода КТ в водную фазу, затем удаляли

хлороформ испарением. Для удаления избытка ТМАГ в водной фазе КТ трижды промывали водой в последовательных циклах центрифугирования/редиспергирования. Затем добавляли полистиролсульфонат натрия (ПСС) (0,1% 0,1 мл) в качестве стабилизатора модифицированных КТ. Данная модификация позволяла наносить КТ в составе полиэлектролитного комплекса на поверхность частиц в методе последовательной адсорбции полиэлектролитов.

23. Метод послойного осаждения полиэлектролитов на поверхности частиц дисперсии М1 (англ. layer-by-layer technique, LbL). Получение рН-чувствительных микроструктур. В качестве носителя для нанесения слоев полиэлектролитов (ПЭ) использовали частицы дисперсии М1 с диаметром 1,2 мкм, полученные в присутствии 0.2% аммиака в расчете на мономер. Первый ПЭК на отрицательно заряженной поверхности частиц (0,2 мл 0,1% мас.) был получен последовательной адсорбцией положительно заряженного полиэлектролита поли-L-лизина (ПЛЛ) и отрицательно заряженного ПСС из растворов 1 мг/мл в 0,15 М NaCl. Дисперсии М1 инкубировали с каждым ПЭ при комнатной температуре при перемешивании в течение 10 мин, затем избыток ПЭ удаляли водой в циклах центрифугирования/редиспергирования. После формирования 2-х ПЭК адсорбировали ПЛЛ (положительный заряд) и добавляли 0,1 мл КТ, модифицированные ПСС (отрицательный заряд) в 0,1 М ББ, рН 8,2. Через 30 мин инкубации в тех же условиях, избыток КТ удаляли тремя циклами центрифугирования/редиспергирования в воде. Для нанесения последующих ПЭК и КТ применяли те же экспериментальные условия. В случае частиц с внешним слоем из БСА, желатина или трипсина белок адсорбировали в концентрациях от 0,1 до 0,8 мг/г полимера в 0,1М ББ, рН 8,2 при комнатной температуре в течение 2 ч. Избыток БСА удаляли тремя циклами центрифугирования/редиспергирования в воде. Концентрацию несвязанного белка БСА в надосадочной жидкости определяли по методу Брэдфорда при $\lambda=595$ нм.

24. Исследование флуоресцентных свойств микроструктур с КТ в зависимости от рН. Влияние рН среды на флуоресцентные свойства микроструктур дисперсий М1 исследовали в 0,1М Na-фосфатных буферах с рН 7,4 и 5,3; и в 0,1М Na-боратном буфере с рН 8.2. Аликвоту 25 мкл 0,1% мас. дисперсии микроструктур, приготовленной методом осаждения и содержащих КТ, центрифугировали, затем надосадочную жидкость заменяли на буфер с соответствующим рН, и добавляли в кювету к 1мл того же буфера, перемешивали и через 10 минут измеряли на спектрофлуориметре Shimadzu RF-551. Для исследования обратимого характера зависимости флуоресцентных свойств от рН дисперсии осаждали на центрифуге, осадок редиспергировали в воде, выдерживали при

комнатной температуре при перемешивании в течение 0.5 ч, затем снимали спектры флуоресценции.

25. Определение ионов двухвалентных металлов. Измерения проводили в 0,1М ББ буфере с рН 8,2. Аликвоту 25 мкл 0,1% мас. дисперсии микроструктур **M1**, полученных методом осаждения и содержащих КТ, добавляли в кювету, содержащую 1 мл буфера, и измерили флуоресценцию. Исходный раствор соли металла (CuCl_2 , ZnCl_2 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2) добавляли в концентрации от 1 до 100 мкл с учетом разбавления, затем добавляли от 1 до 100 мкл после 100-кратного разбавления раствора соли. После каждого добавления соли содержимое кюветы тщательно перемешивали и измеряли на спектрофлуориметра через 10 минут.

26. Затравочная радикальная полимеризация N-винилкапролактама. Получение термочувствительных частиц. Мономер N-винилкапролактама (0.5 мг/мл) добавляли при перемешивании к 1 мл (смесь вода-пропанол-2 : 20: 1) 1% мас. дисперсии **M2**, частицы которой выступали в качестве затравочных, в соотношениях М2:ВК: 1: 0,1; 1:0,2; 1:0,5; 1:1 или 1:1,5 (мас./мас.). Затем добавляли инициатор азо-бис-изобутиронитрил (AIBN) (0,2% мас. в расчете на ВК), смесь перемешивали и инкубировали при 4°C в течение 12 ч для адсорбции мономера и инициатора частицами, что обеспечивало преимущественный рост полимерных цепей поли-N-винилкапролактама (ПВК) от поверхности. Затем смесь продували инертным газом (азотом), помещали в термостатируемый шейкер при 65°C и выдерживали в течение 1, 2 или 3 часов для реализации процесса полимеризации.

27. Измерение гидродинамического радиуса частиц (R) при нагревании/охлаждении термодисперсий M2. Измерение проводили методом динамического светорассеяния на субмикронном анализаторе частиц coulterN4-MD. 5 мкл 1% мас. дисперсии добавляли к 3 мл воды в кювете. Диаметр частиц анализировали при температуре от 20°C до 45°C с шагом 5 °C с выдерживанием образцов при каждом значении температуры в течение 3 мин и перемешиванием перед измерением. Оценку диаметров при охлаждении проводили по тому же протоколу.

28. Включение КТ в слои термочувствительного полимера на поверхности частиц M2. Растворители для набухания ПВК на поверхности микрочастиц с целью последующего включения КТ были выбраны из воды, метанола, этанола, пропанола, пропанол-2, бутанола и их смесей при соотношениях 1: 1, 5: 1 и 10: 1. Необходимо, чтобы растворитель не приводил к растворению частиц, не вызывал их агрегацию.

С поверхности КТ (0,2 мг) удаляли избыток ТОФО при их растворении в хлороформе и осаждении метанолом (соотношение хлороформ: метанола, 1: 3) с последующим центрифугированием. Осадок КТ диспергировали в 1 мл пропанол-2 и добавляли к 0,5 мл 1% мас. дисперсии в смеси вода: пропанол-2 при соотношении 20: 1, которую обрабатывали ультразвуком в течение 2 минут, перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Эту процедуру повторяли трижды в течение 2ч. Затем отмывали от непрореагировавших КТ в циклах центрифугирование/редиспергирование в воде при 13400 об/мин в течение 10 минут. Затем осадок диспергировали в 0.5 мл воды. Для удаления растворителя (пропанол-2) термочувствительные дисперсии М2 диализовали против воды.

29. Имобилизация БСА на поверхность термочувствительных частиц М2.

Аликвоту (0,125 мл) 1% мас. дисперсии, содержащей КТ, инкубировали с БСА в диапазоне концентраций 1,6–15 мг/г полимера в 0,1 М ББ рН8,2 при температуре 20° С в течение 2 ч. и на водяной бане при 40°С в течение 0,5; 1 или 2 часов. Дисперсию трижды очищали от непрореагировавших компонентов в цикле центрифугирование/редиспергирование в воде. Затем осадок диспергировали в 1 мл 0,1 М ББ рН 8.2. Концентрацию несвязанного БСА определяли в надосадочной жидкости по методу Брэдфорда на длине волны 595 нм. Концентрацию иммобилизованного БСА рассчитывали, как разницу между добавленным количеством БСА и свободным БСА в объеме.

30. Получение апконвертирующих нанофосфоров НАФ $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ или $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ (НАФ). Нанофосфоры были синтезированы и любезно предоставлены Нечаевым А.В., МИРЭА. В общем виде синтез НАФ, допированных ионами Tm^{3+} , основан на координационной стабилизации солей металлов иттрия, иттербия и тулия в растворе олеиновой кислоты, которую проводят при нагревании в бескислородной атмосфере. Смесь Y_2O_3 (0,794 ммоль), Yb_2O_3 (0,2 ммоль), Tm_2O_3 (0,06 ммоль) диспергируют в 10 мл 70% трифторуксусной кислоты и осторожно кипятят с обратным холодильником до прозрачного состояния (≈ 6 ч), затем охлаждают до комнатной температуры, выпаривают и осадок сушат в вакууме (0,1 Торр) в течение 1 часа. Затем эту трифторацетатную смесь и трифторацетат натрия (2 ммоль) добавляют к 10 мл олеиновой кислоты в трехгорлую колбу, снабженную термометром, и перемешивают на магнитной мешалке. Раствор нагревают до 120°С и перемешивают под вакуумом в течение 30 мин для дегазации и удаления воды. Затем смесь постепенно нагревают со скоростью 20°С/мин до 320°С и выдерживают при этой температуре в течение 30 мин в атмосфере аргона. Для охлаждения смеси до комнатной температуры добавляют 150 мл пропанола-2, смесь центрифугируют при 6000 об/мин в течение 20 мин. Полученные нанокристаллы очищают от непрореагировавших

компонентов путем добавления абсолютного этанола, сушат и растворяют в 10 мл олеиновой кислоты и 10 мл 1-октадецена. Добавляют трифторацетат иттрия (предварительно приготовленный из 0,5 мМ Y_2O_3 и 5 мл 70% трифторуксусной кислоты) и трифторацетат натрия (1 ммоль), смесь нагревают до 120 оС и перемешивают в вакууме в течение 30 мин. Затем смесь нагревают до 305°С, инкубируют в течение 15 минут в атмосфере аргона и охлаждают до комнатной температуры. В результате получают наночастицы со структурой ядро/оболочка, которые очищают центрифугирование при 6000 об/мин в течение 20 мин. Продуктом синтеза являются гидрофобные монодисперсные наночастицы, диспергированные в неполярных органических растворителях, таких как гексан и хлороформ.

31. Осадительная полимеризация акролеина в присутствии апконвертирующих наночастиц (НАФ). Полимеризацию акролеина в присутствии НАФ проводили по методике осадительной полимеризации в водно-щелочной среде с рядом модификаций. Сначала НАФ гидрофилизировали при участии ТМАГ. Для этого НАФ (20 мг/мл в хлороформе) в количестве 10, 25, 50, 100 или 150 мкл добавляли по каплям к 1 мл 1% водного раствора ТМАН и получали две несмешивающиеся фазы, которые тщательно встряхивали и обрабатывали ультразвуком до полного испарения хлороформа и получения прозрачных образцов. Таким образом, НАФ были переведены в водную среду. Затем 0,2 мл свежеперегнанного акролеина при перемешивании добавляли в реакционный сосуд, содержащий воду при соотношении мономер : вода, 1:20 об./об. Дисперсию НАФ с ТМАГ заданной концентрации, которая выступала в качестве инициатора, добавляли по каплям при перемешивании в реакционный объем. Полимеризацию проводили при перемешивании при комнатной температуре в течение 3ч, что приводило к формированию частиц нерастворимого полимера. Затем реакционную смесь дегазировали в течение 30 минут путем продувки азота и добавляли радикальный инициатор $K_2S_2O_8$ (2% мас. в расчете на полимер) для проведения реакции сшивки по непрореагировавшим двойным связям с целью повышения коллоидно-химической стабильности полимерных частиц. Реакционную смесь перемешивали при 70°С в атмосфере азота в течение 3 часов. Полимеризацию проводили со всеми концентрациями НАФ.

Для получения изображений с просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) НАФ и частицы полиакролеина, содержащие НАФ, разбавляли гексаном и водой, соответственно. Затем обрабатывали ультразвуком и наносили по каплям на медную сетку с покрытием из 0,3% пиолоформа. После сушки сеток в эксикаторе в течение ночи при комнатной

температуре были получены изображения с помощью просвечивающего микроскопа Philips CM10 TEM (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

Для исследования образцов НАФ, модифицированных ТМАГ перед проведением полимеризации, методом ИК-Фурье спектроскопии, их трижды очищали водой в трех циклах (центрифугирование при 13400 об/мин в течение 10 мин/редиспергирование в воде). Затем осадок высушивали на воздухе. Также был приготовлен еще один образец НАФ-ТМАГ, который также очищали в трех циклах, но вместо воды использовали смесь вода-акролеин (1:20, об./об.) при 0°C, чтобы избежать образования олигомеров. Осадок также сушили на воздухе. Третьим образцом для записи ИК-спектров были полиакролеиновые частицы, содержащие НАФ, которые после очистки высушивали с использованием Savant SpeedVac Concentrator (Франция). Сухие образцы НАФ тщательно измельчали, смешивали с KBr и прессовали таблетки, которые использовали для записи ИК-спектров с использованием ИК-спектрофотометра Varian 3100, США.

Исследование поверхностно-активных свойств олигомеров акролеина проводили с помощью подхода, представленного в [328], с использованием тензометрического метода «висячей» капли.

32 Эксперименты по прижизненной визуализации биораспределения частиц дисперсий М1, содержащих НАФ, в организме лабораторных животных (мышей).

Эксперименты проводили на мышах BALB/c весом 20–25 г для исследования биораспределения микрочастиц при внутривенном введении. Исследование проводилось с разрешения Комитета по этике Первого Московского государственного медицинского института им. И.М. Сеченова. Для анестезии использовали смесь Zoletil (5,0 мг/кг) и 10 мкл 2% раствора Рометара. Анестезия действовала до конца эксперимента с дополнительным количеством Zoletil (0,1 мл, т.е. 5,0 мг/кг), если было необходимо. Мех вокруг груди, живота и спины животных удаляли для уменьшения рассеяния фотолюминесцентного сигнала и его локализации с максимальной точностью. Затем каждой мышке через хвостовую вену вводили 100 мкл 0,5% мас. дисперсии М1-НАФ (1мг/кг) (n = 10) в PBS, pH 7,2. Для оценки распределения флуоресцентного сигнала М1-НАФ в организме животных их помещали в эпилюминесцентную систему оптической визуализации сразу после инъекции. Сигнал детектировали либо со стороны брюшной стенки, либо со стороны спины. Мышей выводили из эксперимента через 2 ч после введения М1-НАФ с использованием метода передозировки наркотиков и выполняли вскрытие. Сердце, легкие, печень, селезенку, почки иссекали и фиксировали в 10% нейтральном формалине в буфере в течение 48 ч. После фиксации вырезанные органы были обезвожены в градиенте этанола, залиты в

парафин и приготовлены срезы 5-ти мкм-толщины для гистологических и фотолюминесцентных микроскопических исследований. Срезы для гистологических исследований окрашивали гематоксилином и эозином по стандартному протоколу и исследовали, используя световой микроскоп Olympus BX51 (Olympus Optical, Япония), оснащенный цифровой камерой SDU-252 (Спецтелетехника, Россия). Срезы для измерения флуоресценции ФЛ не окрашивали и помещали в полистирол.

Эпилюминесцентная визуализирующая система. В лаборатории лазерной биомедицины под рук. Хайдукова Е.В., ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН была создана оптическая визуализирующая система для исследования распределения флуоресцентного сигнала в малых животных при внутривенном введении флуоресцентных меток. Система работает в эпилюминесцентном режиме, т.е. источник, возбуждающий флуоресценцию, и приемник, детектирующий сигнал флуоресценции, находятся по одну сторону от исследуемого объекта. Прибор оборудован растровым сканирующим лазерным источником излучения. Схема установки приведена в главе «Результаты и обсуждение». Луч от непрерывного полупроводникового лазера на длине волны 975 нм сканирует исследуемый объект. Сканирование реализовано с применением стандартной сканирующей головки с зеркалами на гальванических драйверах Miniscan-07 фирмы Raylase (Германия). Детектирование флуоресцентного сигнала НАФ осуществляется EMCCD-камерой с электронным умножением Falcon фирмы Raptor (Ирландия), оснащенной объективом с F-числом, равным 0.95. Перед объективом устанавливали интерференционные светофильтры, отсекающие излучение возбуждающего лазера. Мощность в лазерном луче была ограничена на уровне 0.7 Вт/см^2 . Экспериментально показано, что данная плотность мощности излучения не вызывает ожогов кожных покровов у малых животных [329].

33. Метод замены растворителя для модификации апконвертирующих нанофосфоров (НАФ). Модификацию НАФ для получения водных дисперсий биосовместимых биофункционализированных реагентов проводили на основе метода замены растворителя. Готовили дисперсию НАФ и раствор полимера в хлороформе, затем их смешивали и выдерживали в среде растворителя при перемешивании в течение часа для адсорбции полимерных молекул на поверхности НАФ. Затем медленно, по каплям смесь вводили в водную среду при интенсивном перемешивании и озвучивании, что позволяло сформировать полимерное покрытие на поверхности НАФ.

Модификация НАФ с использованием гидроксида тетраметиламмония (ТМАГ). ТМАГ является низкомолекулярным соединением, которое способствует фазовому переходу из органической в водную фазу без создания полимерного покрытия, т.е. НАФ,

модифицированные ТМАГ могут рассматриваться как исходные («голые») НЧ в водной фазе. В воде ТМАГ диссоциирует с образованием ОН-ионов, что позволяет частично удалить остатки олеиновой кислоты с поверхности НАФ, которая выступает в качестве стабилизатора в процессе синтеза НАФ. Используя метод замены растворителя, получали гидрофилизированные пробы НАФ по следующей методике. 40 мкл дисперсии НАФ (20 мг/мл) в хлороформе добавляли по каплям к 1 мл 1% водного раствора ТМАГ при перемешивании и ультразвуковой обработке. После добавления всей порции НАФ водную дисперсию инкубировали в ультразвуковой ванне при 60°C до полного испарения хлороформа. Для удаления избытка ТМАГ дисперсии очищали в процессе трех циклов центрифугирования при 13400 об/мин в течение 10 минут/редиспергирования в воде. Затем осадок диспергировали в 1 мл воды или PBS pH 7.0.

Модификация НАФ чередующимся амфифильным сополимером малеинового ангидрида и октадецена (ПМАО). Модификация поверхности НАФ происходит за счет гидрофобных взаимодействий молекул олеиновой кислоты и гидрофобного хвоста ПМАО (октадецена). 0.1 мл раствора чередующегося сополимера малеинового ангидрида и 1-октадецена (8 мг/мл) в хлороформе добавляли к 0,05 мл дисперсии НАФ (20 мг/мл) в хлороформе. Выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 5 минут и перемешивали в течение 60 мин при комнатной температуре. Для повышения прочности полимерного покрытия при хранении и в буферных растворах с высокой ионной силой использовали сшивающий агент 1,6-диаминогексан, который за счет реакции аминогруппы с ангидридом сополимера позволяет получить поперечно-сшитую структуру полимерной оболочки. Однако при формировании такой оболочки необходимо учитывать тот факт, что не все ангидридные группы должны быть задействованы в реакции, поскольку в дальнейшем планируется использовать модифицированные НАФ для иммобилизации биолигандов и необходимо иметь карбоксильные группы на поверхности НАФ, которые появляются в результате гидролиза ангидридных групп при переводе в воду. Для этого добавляли 5 мкл раствора сшивающего агента 1,6-диаминогексана (3 мг/мл) в хлороформе и дважды повторяли процедуру ультразвуковой обработки (5 мин) с последующим перемешиванием в течение 30 мин. Затем в 1 мл буфера PBS pH 7.0 по каплям добавляли полученную дисперсию при интенсивном перемешивании и ультразвуковой обработке, перемешивали при комнатной температуре в течение 0.5 часа. Растворитель удаляли испарением. Затем очищали в трех циклах центрифугирования/редиспергирования при 13400 об/мин, осадок диспергировали в 1 мл воды или буфера PBS (pH 7.0).

Модификация НАФ полиэтиленгликолем, поли(D, L-лактидом), сополимером лактида с гликолидом. Для модификации НАФ данными полимерами использовали ту же методику, что и при покрытии ПМАО, но с некоторыми изменениями. К 0,05 мл дисперсии НАФ (20 мг/мл) в хлороформе добавляли к 0,1 мл (15 мг/мл) полиэтиленгликоля (ПЭГ), или 0,15 мл (10 мг/мл) поли (D, L-лактида) (ПЛА) или 0,15 мл (10 мг/мл) сополимера лактида с гликолидом (ПЛГ). Смесь перемешивали, обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем смесь по каплям добавляли к 1 мл воды, или буферу PBS (pH 7,2), или Na-боратному буферу (pH 8,2) при энергичном перемешивании и обработке ультразвуком. После добавления всей порции НАФ водную дисперсию инкубировали в ультразвуковой ванне при 60°C до полного испарения хлороформа. Для удаления избытка полимеров дисперсии очищали в процессе трех циклов центрифугирования при 13400 об/мин в течение 10 минут/редиспергирования в воде. Затем осадок диспергировали в 1 мл воды или PBS pH 7.0.

Создание второго полимерного слоя на ПЭГ-модифицированной поверхности НАФ.

Второй полимерный слой получали из Na-соли декстрансульфата за счет электростатического взаимодействия с положительно заряженной поверхностью НАФ-ПЭГ. 0,4 мл водного раствора Na-соли декстрансульфата (1 мг/мл) добавляли к 0,2 мл НАФ (1 мг/мл), модифицированных ПЭГ. Смесь обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Для удаления избытка полимеров дисперсии очищали в процессе трех циклов центрифугирования при 13400 об/мин в течение 10 минут/редиспергирования в воде. Затем осадок диспергировали в 0,2 мл воды или PBS pH 7.0.

Диаметр модифицированных НАФ измеряли на субмикронном анализаторе частиц Coulter N4-MD (Coultronics, Франция). Дзета-потенциал измеряли на анализаторе частиц Brookhaven Corporation Instruments T90Plus (Brookhaven, США). Спектры апконверсионной фотолюминесценции снимали на калиброванном спектрометре с дифракционной решеткой (Ocean Optics, Нидерланды), где свет возбуждения доставлялся волоконным диодным лазером (978 нм, CXCH-Photonics, Китай) с фильтром коротких частот 842 нм (Semrock, США).

34. Определение цитотоксичности поверхностно-модифицированных НАФ в МТТ-

тесте. Определение цитотоксичности образцов НАФ проводили совместно с лабораторией клеточных и молекулярных технологий МФТИ. Кератиноциты человека клеточной линии HaCaT, дермальные фибробласты человека, полученные из кожи пациента после эстетической пластики брюшной полости, были любезно предоставлены проф.

Н.Онищенко (Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова, Москва).

Кератиноциты HaCaT (~50000 клеток на лунку) или фибробласты (~2000 на лунку) высевали в 96-луночные планшеты (Greiner CELLSTAR®) и инкубировали в течение 24 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем поверхностно-модифицированные НАФ после обработки ультразвуком в концентрации 62,5 или 125 мкг/мл, разведенные в 100 мкл культуральной среды, добавляли в лунки и инкубировали в течение 24 ч. Конечный объем в каждой лунке составил 200 мкл. Интактные клетки с равными объемами культуральной среды использовали в качестве контроля. Затем проводили колориметрический анализ МТТ, как описано Мосманом в [330] с некоторыми модификациями. Среду с НАФ удаляли, культуры клеток в планшете трижды промывали PBS (pH 7.0), заменяли свежей средой, добавляли 20 мкл/лунку 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромида (МТТ-реагент) (конечная концентрация 0,5 мг/мл). Инкубировали в течение 4 часов для осаждения нерастворимых пурпурных кристаллов формазана, образованных за счет действия митохондриальной сукцинатдегидрогеназы жизнеспособных клеток. Затем аккуратно собирали надосадочную жидкость, в каждую лунку к осадку добавляли 100 мкл диметилсульфоксида и оставляли в темноте при комнатной температуре до полного растворения. Поглощение раствора МТТ-реагента измеряли на многолуночном фотометре UNIPLAN (Пикон Лтд, Россия) при длине волны 540 нм по сравнению с контрольной культурой. Полученная оптическая плотность пропорциональна жизнеспособности клеток, на основании которой рассчитывают выживаемость клеток, как отношение к оптической плотности контрольных образцов.

35. Визуализация захвата клетками поверхностно-модифицированных НАФ.

Модифицированные образцы НАФ в концентрации 125 мкг/мл инкубировали с кератиноцитами HaCaT при 37°C при 5% CO₂ в течение 48 ч. После трех отмывок PBS (pH 7.0) клетки фиксировали в 4% формальдегиде и сверху помещали покровные стекла. Клетки без инкубации с НАФ служили контролем. Для визуализации захвата и определения локализации НАФ в клетках использовали лазерно-сканирующую конфокальную микроскопию с лазерным источником с длиной волны возбуждения флуоресценции 975 нм: Olympus, Fluoview FV1200, США), оснащенный лазером 975 нм (Leo Photonics, Китай) и низкочастотным фильтром сигнала флуоресценции (DM 405/473).

36. Получение наноструктур НАФ в виде конъюгата НАФ-ПМАО с барстаром.

Для получения наноструктур на основе НАФ, модифицированных ПМАО (НАФ-ПМАО), с барстаром (ингибитор барназы, М.м. 10.2 кДа) активировали карбоксильные группы на

поверхности НАФ, которые получены в результате гидролиза ангидридных групп ПМАО. Активацию НАФ-ПМАО проводили в избытке 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимид (сульфо-NHS) при соотношении НАФ:EDC: сульфо-NHS=1:3:2 в фосфатном буфере, pH 5.3 на льду при перемешивании в течение 15 мин. Затем НЧ отмывали от непрореагировавших компонентов центрифугированием, осадок редиспергировали в PBS pH 7.0, добавляли барстар в соотношении НАФ:барстар, 20:1 и инкубировали при 4°C при перемешивании. Непрореагировавшие молекулы барстара удаляли в трех циклах центрифугирования и повторного редиспергирования в 0.2 мл PBS (pH 7.0).

37. Измерение коэффициента апконверсии НАФ-ПМАО ($\eta_{ап}$). Измерения проводили в процессе совместной работы с группой Звягина А.В. (Macquarie University, Австралия). Коэффициент апконверсии измеряли с помощью откалиброванной интегрирующей сферы, как описано в [331]. В общем случае, интегрирующая сфера пространственно объединяет весь пучок света, таким образом, что абсолютные значения поглощения и излучения могут быть измерены независимо от рассеяния света частицами. НАФ-ПМАО в виде порошка помещали в специально изготовленный держатель для образцов на выходном отверстии интегрирующей сферы и возбуждали лазерным излучением с длиной волны 978 нм при помощи многомодового оптического волокна. Измеряли мощность излучения ($P_{эм.}$) и мощность поглощения ($P_{погл.}$) в большом диапазоне интенсивностей возбуждения, используя соответствующие фильтры и фотодиод, размещенный перпендикулярно выходу из порта сферы. $\eta_{ап}$ рассчитывали согласно определению, как $P_{эм.}/P_{погл.}$ [Вт/Вт].

38. Специфическая визуализация раковых клеток. Визуализацию клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 проводили за счет специфической реакции рецептора HER2/neu с наноструктурами НАФ-ПМАО-барстар ($d_{НАФ}=45$ нм). В качестве контроля использовали клетки яичника китайского хомячка CHO-K1. Эксперимент проводили совместно с лабораторией молекулярной иммунологии под рук. Деева С.М. (ИБХ РАН). Клетки высевали на 8-луночные стекла с концентрацией $\sim 3 \times 10^4$ клеток/мл. После 24 ч культивирования при 37°C в CO₂-инкубаторе (с 5% CO₂) клетки инактивировали 1% формальдегидом для предотвращения неспецифической интернализации НАФ-ПМАО-барстар. Для предотвращения неспецифического связывания со стеклом-подложкой образец инкубировали с блокирующим агентом (1% БСА в PBS pH 7.0) в течение 1 часа. Раствор 300 мкл (3мкг) конъюгата миниантител scFv4D5 с барназой (0,1% БСА, 0,1% Tween-20 в PBS pH7.0) добавляли для взаимодействия миниантител

scFv4D5 с рецептором HER2/neu и введения подмодуля (барназа) с целью формирования модуля барназа/барстар. После 1 ч инкубации клетки промывали PBS, добавляли 300 мкл второго подмодуля в виде конъюгата НАФ-ПМАО-барстар (100 мкг/мл) и инкубировали в течение 30 мин для завершения образования комплекса НАФ-ПМАО-барстар : барназа-scFv4D5 ($K_d \sim 10^{-14}$ М комплекса барназа:барстар). Затем клетки несколько раз промывали PBS pH 7.0 для удаления несвязанных НЧ, фиксировали в 4% формальдегиде в PBS и накрывали покровным стеклом. Клеточную линию СНО-К1 использовали в качестве отрицательного контроля для доказательства специфичности связывания наноструктур с поверхностью раковых клеток, а не за счет физической адсорбции конъюгатов scFv4D5-барназа.

39. Получение фантома. Водный раствор агарозы (1,5%) (Promega, Испания) смешивали с красителями (Magenta (Royal Talens, Голландия) и black Indian ink (Winsor & Newton, Великобритания)) и субмикронными частицами TiO_2 [1 мг/мл (Sigma-Aldrich, Германия)] для моделирования рассеивания ткани молочной железы [332]. Тонкие однородные плоские фантомные слои готовили, заливая теплый раствор агарозы со всеми компонентами между двумя стеклянными пластинами на расстоянии 0,4, 0,8 и 1,4 мм.

40. Получение наноструктур НАФ с покрытием из полиэтиленгликоля (ПЭГ). На поверхности НАФ, модифицированных ПМАО, создавали оболочку из ПЭГ в процессе реакции сшивки при участии диглицидилового эфира ПЭГ (ПЭГ-ДГЭ). Использовали ПЭГ-ДГЭ с М.м. 500. Водную дисперсию НАФ-ПМАО, содержащую 0,8 мг НАФ центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 минут. Осадок диспергировали в 1 мл буфера PBS (pH 7,0) и добавляли 10 или 40 мл 1,5% водного раствора ПЭГ-ДГЭ, что соответствовало 0.1% или 0.6% ПЭГ в расчете на наночастицы, соответственно. Смесь перемешивали, обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут, затем перемешивали в течение 1 часа при 95°C. Для удаления непрореагировавших компонентов образцы очищали в трех циклах центрифугирования (10 мин 13400 об/мин)/редиспергирования в PBS (pH 7,0). Осадок диспергировали в 0,8 мл буфера PBS (pH 7,0).

41. Определение белка в сыворотке крови после инкубации с ПЭГ-модифицированными НАФ. 100 мкл (0,1%) модифицированных НАФ, а именно НАФ-ПМАО, НАФ-ПМАО с 0,1% ПЭГ-ДГЭ и НАФ-ПМАО с 0,6% ПЭГ-ДГЭ в PBS (pH 7,0) добавляли к 500 мкл сыворотки мыши (10-кратно разведенной в PBS), тщательно перемешивали, обрабатывали ультразвуком и перемешивали при 37°C в течение 1 часа. В качестве контроля использовали сыворотку мыши, в которую не добавляли пробы НАФ. Затем центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 мин и определяли концентрацию

сывороточных белков, которые не адсорбировались на поверхности модифицированных НАФ, спектрофотометрически по методу Брэдфорда при длине волны 595 нм.

42. Анализ образцов крови с использованием антистоксовый флуоресцентного микроскопа. Образцы крови анализировали с использованием антистоксового флуоресцентного микроскопа, специально разработанного в лаборатории лазерной биомедицины под рук. Хайдукова Е.В., ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Инвертированный флуоресцентный микроскоп (Motic, Китай) был оснащен полупроводниковым CW лазером с длиной волны излучения 975 нм (ATC-SD, Россия) и охлаждающей камерой sCMOS (Photonic Science, Великобритания). Образцы крови анализировали при мощности облучения лазером 30 Вт/см². Время экспозиции камеры составляло 30 с при максимальном усилении. Интерференционные фильтры и дихроичное зеркало (Semrock, США) использованы для разделения сигналов фотолюминесценции и возбуждения.

43. Анализ цитотоксичности ПЭГ-модифицированных НАФ. Оценку цитотоксичности проводили на фибробластах кожи человека в среде Маккоя (Life Technologies), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (Thermo Scienti®™). Клетки культивировали до 80% плотности монослоя и собирали с помощью раствора Versen (PanEco). Затем суспензию клеток в культуральной среде поровну разделили на четыре экспериментальные группы по 10⁵ клеток, к трем из которых добавляли 150 мкл 0,1% ПЭГ-модифицированных НАФ. Дальнейшую инкубацию клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. После инкубации клетки промывали PBS pH 7,0, ресуспендировали в 100 мкл PBS и окрашивали йодидом пропидия (ИП). Жизнеспособность клеток анализировали на проточном цитометре (BD Accuri C6). Процент некротических клеток оценивали на основе гистограмм, полученных с использованием программного обеспечения BD Accuri C6.

44. Оценка времени кровообращения ПЭГ-модифицированных НАФ. 150 мкл 0,1% НАФ, модифицированных ПМАО, ПМАО с 0,1 мг/мл ПЭГ-ДГЭ, ПМАО с 0,6 мг/мл ПЭГ-ДГЭ, в PBS (pH 7,0), вводили внутривенно в ретроорбитальный синус мышей Balb/c (средний вес 23 г). На этом этапе не наблюдалось острых аллергических реакций и не было зарегистрировано смертельных исходов. Забор крови проводили из хвостовой вены в интервале от 1 до 180 мин после внутривенной инъекции. Образцы анализировали с использованием антистоксового флуоресцентного микроскопа. Получали изображения четырех областей из случайной выборки, на которых подсчитывали количество НАФ. Данные были получены от 15 мышей.

45. Модель опухоли и пассивная доставка НАФ к опухоли. Прижизненная оптическая визуализация опухоли с помощью НАФ была продемонстрирована на перевитой мышам модели солидной карциномы легкого Льюиса (англ. LLC, ATCC, CRL-1642™). Работа проводилась совместно с лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого онкогенеза под рук. Хоченкова Д.А. (РОНЦ им. Н.Н. Блохина). 0,2 мл LLC клеточной суспензии в DMEM (Gibco) с концентрацией 2×10^6 клеток инокулированы подкожно в правый бок мышей BDF1 (C57Bl/6 – DBA / 2; самцы 5–6 недель, получены из лаборатории животноводческого центра «Столбовой»). Данные были получены от 15 мышей (5 мышей для каждой пробы НАФ). 150 мкл 0,1% НАФ в PBS (pH 7,0), модифицированных ПМАО, ПМАО с 0,1 мг/мл ПЭГ-ДГЭ, ПМАО с 0,6 мг/мл ПЭГ-ДГЭ вводили мышам внутривенно через ретроорбитальный синус, когда объем опухоли достигал 200 мм³. Размер опухоли был одинаков для каждой экспериментальной группы животных. Мышей анестезировали внутрибрюшинно, используя смесь Zoletil (5,0 мг/кг) и 10 мкл 2% раствора Rometar (0,2 мл на мышь), которую вводили за 5 минут до инъекции. На этом этапе острые аллергические реакции или гибель мышей не наблюдались. Участок опухоли был освобожден от мехового покрова до визуализации. Распределение флуоресцентного сигнала наблюдали *in vivo* (с боковой стороны или со спины) и *ex vivo* (из солидной опухоли) с использованием специально разработанной системы визуализации (см. методику 32). Изображения с эпилюминесцентной системы были получены в интервале от 1 до 180 минут после инъекции пробы НАФ. Для визуализации опухоли *ex vivo* мышей выводили из эксперимента с использованием передозировки лекарственного средства через 2 ч после инъекции НАФ и вырезали опухоли.

Экспериментальные животные содержались при контролируемых условиях окружающей среды (постоянная температура, влажность, 12-часовой цикл темного света) и свободном доступе к воде и пище. Все эксперименты на животных проводили согласно правилам, утвержденным Этическим комитетом в области исследований на животных Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина.

46. Анализ цитотоксичности флавинмононуклеотида (ФМН) при облучении синим светом. Анализ проводили на линии клеток аденокарциномы молочной железы SKBR-3 и клетках яичника китайского хомячка CHO-K1 клеток с использованием МТТ-теста. Клетки ($\sim 5 \times 10^4$ /мл) высевали в 96-луночные планшеты в 0,15 мл культуральной среды и через 24 ч обрабатывали рибофлавином в темноте в концентрациях 0, 10 и 30 мкМ. Среду удаляли через 90 минут и клетки дважды промывали PBS (pH 7.0). Добавляли 0,15 мл PBS и облучали светом на длине волны 365 нм в течение 10 минут при мощности облучения

7 мВт/см². Затем удаляли PBS и добавляли среду. После 72-часовой инкубации добавляли 100 мкл МТТ-реагент (с конечной концентрацией 0,5 мг/мл). Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО, и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре для микропланшетов (Awareness Technology Inc., США) на длине волны 540 нм.

Для визуализации клеток после инкубации с ФМН использовали клетки SK-BR-3 и CHO-K1, которые выращивали в 96-луночной планшете в течение ночи и инкубировали в культуральной среде с добавлением 30 мкМ ФМН. Через 90 минут клетки промывали PBS (рН 7.0) и облучали светом на длине волны 365 нм в дозе 4,2 Дж/см². Фазово-контрастные изображения были получены на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axiovert 200 (Zeiss, Германия) через 2 часа после облучения.

47. Исследование основного механизма цитотоксичности фотоактивированного ФМН. Для определения основного механизма, ответственного за гибель клеток SK-BR-3, анализировали активность каспазы-3 в образцах клеток после облучения светом и контролях. Клетки SK-BR-3 высевали на 4-луночные культуральные слайды (BD Falcon), в концентрации 5×10^4 /мл и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. Затем клетки инкубировали с 30 мкМ ФМН в течение 90 минут и облучали светом на длине волны 450 нм в течение 10 минут. Положительный (40 мкМ этопозида, который является ингибитором топоизомеразы II, выступающей в качестве активного промотора апоптоза) и отрицательный контроли готовили в соответствии с протоколами, описанными в п.45. Анализ каспазы-3 проводили путем иммуноцитохимического окрашивания через 6, 12 и 24 ч после обработки клеток. Предметные стекла с клетками промывали один раз в PBS (рН 7.0), затем фиксировали этанолом и ацетоном, инкубировали с блокирующим раствором (Dako). Для повышения проницаемости клеточных мембран использовали 0,1 М цитратный буфер с 0,1% Triton-X100 в течение 5 мин на льду. Затем клетки маркировали конъюгатом ФИТЦ с моноклональными антителами к активированной каспазе-3 (BD) при комнатной температуре в темноте в течение 60 мин. После инкубации клетки дважды промывали в PBS и окрашивали красителем Hoechst 33258 (Sigma), а затем анализировали с помощью InCell Analyzer 6000 (GE Healthcare).

48. Оценка захвата ФМН клетками методом проточной цитометрии. Работу проводили совместно с лабораторией молекулярной иммунологии под рук. Деева С.М., ИБХ РАН. Способность накапливать ФМН тестировали на трех клеточных линиях: клетках яичника китайского хомячка (CHO) (Российская коллекция клеточных культур), аденокарциноме молочной железы человека SK-BR-3 (НТВ-30™; АТСС) и первичных фибробластах кожи человека, где последние клетки можно рассматривать как модель не

иммортиализованных клеток. Использование линий клеток животных в качестве отрицательных контролей для экспериментов по связыванию рецепторов является приемлемым и широко практикуется. Дополнительным аргументом в пользу СНО в качестве отрицательного контроля является то, что он представляет собой высокоагрессивную линию раковых клеток с ожидаемой высокой скоростью метаболизма и, следовательно, высоким уровнем поглощения ФМН. Клетки инкубировали в течение 90 мин в культуральной среде (McCoys 5A, NuClone, США), которая содержала ~ 0,5 мкМ (контроль), 2 мкМ и 30 мкМ раствора ФМН. Клетки дважды промывали PBS при 4°C и анализировали на проточном цитометре (проточный цитометр Accuri C6, BD, Оксфорд, Великобритания). Интенсивность флуоресценции ФМН выражали как медиану интенсивности флуоресценции $\sim 10^5$ клеток. Интенсивность флуоресценции в тестируемых клетках для снижения влияния эндогенного рибофлавина и его производных нормализовали по отношению к контрольным клеткам, демонстрирующим измеримый сигнал флуоресценции рибофлавина.

49. Демонстрация эффекта фототоксичности наноструктуры НАФ-ФМН.

Клетки SK-BR-3 высевали в 96-луночный планшет с плотностью $\sim 5 \times 10^4$ клеток/мл среды и инкубировали в течение ночи. Затем к клеткам добавляли НАФ-ТМАГ в концентрации 1 мкг/мл, инкубировали в течение 10 минут, промывали PBS (pH 7.0). Раствор 100 мкМ ФМН и 2 мкМ йодида пропидия, растворенного в PBS, добавляли к клеткам в темноте и получали первое изображение клеток (нулевая точка). Для исключения фотоактивации ФМН использовали зеленый фильтр. Затем клетки облучали лазером на длине волны 975 нм в дозе 600 Дж/см². Второе изображение получали после облучения.

50. Оценка противоопухолевой активности НАФ-ФМН. Оценку проводили на иммунодефицитных мышах Balb/c Nude с ксенографтом опухоли из клеток SK-BR-3 совместно с лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого онкогенеза под рук. Хоченкова Д.А. РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки SK-BR-3 (ATCC HTB-30) культивировали в среде RPMI-1640, содержащий 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 ед / мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. После обработки трипсином клетки собирали, осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в стерильной среде DMEM. Затем клетки SK-BR-3 ($\sim 2,0 \times 10^6$ клеток в 200 мкл DMEM) имплантировали подкожно в правый бок мышей. Объем опухоли оценивали стандартным методом калибровки и рассчитывали по следующей формуле: $V = (\text{длина} \times (\text{ширина})^2) / 2$, принимая, что опухоль имеет форму полуэллипсоида. Противоопухолевую активность НАФ-ФМН определяли путем оценки скорости ингибирования роста опухоли (TGI%), рассчитанную

по формуле: $[TGI\%] = (TG_{\text{control}} - TG_{\text{test}}) / TG_{\text{control}} \times 100\%$, где TG_{control} - рост контрольной опухоли; TG_{test} -рост тестируемой опухоли.

Для проведения гистологических исследований образцы ксенографтов опухолей фиксировали в 4% растворе формальдегида в PBS (pH7.0) в течение 24 ч, заливали парафином и делали срезы толщиной по 5 мкм. Срезы депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных направлений биотехнологии являются исследования, связанные с применением частиц дисперсий, которые находят приложение, начиная от решения фундаментальных биологических задач до проведения клинической терапии. Частицы используют как элементы конструктора, которые могут быть модифицированы различными природными и синтетическими полимерами, наполнены органическими красителями, неорганическими наночастицами, лекарственными веществами с целью получения материалов с новыми особыми свойствами. [13] Частицы, как представлено на схеме, обычно выступают в качестве маркеров биоспецифических реакций, таких как «антиген/антитело», «фермент/субстрат», «олиго-/полинуклеотид», «гость/хозяин» и др. Служат носителями биологически активных молекул, способных вступать в биоспецифические реакции, или лекарственных препаратов для доставки в организм пациентов. Частицы также нашли применение в качестве сенсоров, которые реагируют на акт биоспецифических взаимодействий или изменение условий в реакционном объеме преобразованием выходного сигнала (например, тушение флуоресценции).[15,42] Объединение частиц с биологически значимыми молекулами, функциональными полимерами или неорганическими компонентами можно рассматривать, как формирование микро- и наноструктур, выступающих в качестве биореагентов (схема).



Основными требованиями для использования полимерных частиц в составе структур являются: узкое распределение по размерам при заданном диаметре частиц; коллоидная и химическая устойчивость в условиях медико-биологических исследований; высокая стабильность при хранении, функционализированная поверхность, обеспечивающая присоединение биомолекул или полимеров, а также возможность введения различных меток (хромофорных, флуоресцентных, магнитных). В данной работе будет рассмотрена методология создания микро- и наноструктур для решения различных задач нанобиотехнологии с участием двух типов частиц: 1 полимерных микрочастиц (ПЧ), полученных методом гетерофазной полимеризации; 2. полимерсодержащих неорганических наночастиц (НЧ).

III.1. Микроструктуры на основе полимерных частиц

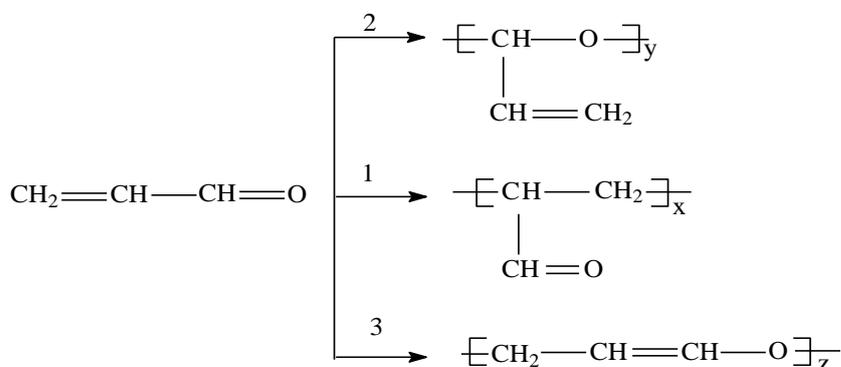
Для разработки подходов к получению микроструктур на основе ПЧ необходимо учитывать, что каждый анализ предъявляет особые требования к используемым частицам. Например, частицы должны иметь интенсивную окраску и диаметр не меньше 1.5 мкм для их применения в реакции латексной агглютинации с визуальной детекцией результатов, а при инструментальной детекции - необходим высокий показатель преломления частиц при диаметре менее 0.3 мкм. Современные методы гетерофазной полимеризации предлагают большое разнообразие способов получения полимерных дисперсий, таких как суспензионная, эмульсионная, миниэмульсионная, микроэмульсионная, осадительная, дисперсионная. Разработка способа полимеризации требует от исследователя кропотливой работы, сначала, при выборе компонентов исходной смеси (выбор мономеров, инициатора, стабилизатора, регулятора и т.д.), а затем по подбору условий получения частиц требуемого размера и формы в зависимости от механизма формирования частиц и кинетики полимеризации, их стабилизации в процессе и после синтеза. Только после тщательного исследования процесса полимеризации удастся синтезировать полимерные частицы, удовлетворяющие требованиям разрабатываемого биоанализа (см. «Обзор литературы»). Вышесказанное вызывает необходимость разработки универсальных, простых, воспроизводимых, легко управляемых способов синтеза частиц, которые могут быть использованы в различных видах анализа, при необходимости, проводя только модификацию поверхности по известным протоколам. В данной работе таким способом является осадительная анионная полимеризация акролеина, которая представлена, как способ **М1**. Расширение спектра свойств частиц достигали, используя безэмульгаторную

радикальную сополимеризацию акролеина со стиролом - способ **M2**. В результате применения этих подходов получены микрочастицы, содержащие органические метки, а также созданы гибридные микроструктуры, состоящие из органических и неорганических частиц.

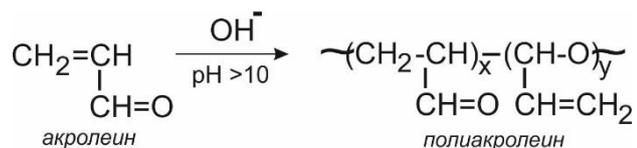
III.1.1. Получение полимерных частиц методом гетерофазной полимеризации

III.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, способный вступать в реакцию полимеризации по различным механизмам благодаря его структурным особенностям (см. «Обзор литературы»). Анализ литературных данных и проведенные исследования показали, что полимерные дисперсии на основе акролеина в наибольшей степени удовлетворяют требованиям биоанализа. Акролеин проявляет себя как сопряженный диен, т.е. реакция может проходить как по карбонильной, так и по винильной группе. В отличие от бутадиена двойные связи акролеина сильно различаются по реакционной способности, поэтому существует несколько вариантов построения макромолекулы. [39]



В зависимости от природы инициатора формируется полимерная цепь с преобладанием звеньев, имеющих структуру 1, 2 или 3. Водные дисперсии полиакролеиновых частиц получают различными способами гетерофазной полимеризации, среди которых выделяют анионную осадительную полимеризацию в водно-щелочной среде, где в состав исходной реакционной смеси входят только мономер и инициатор. В данной работе выбран этот способ синтеза, протекающий по схеме и, согласно литературным данным [40], который позволяет получить соотношение звеньев $x = 1:2$:



Полимеризация протекает без использования оборудования повышенной опасности (источник γ -излучения) и не требует присутствия эмульгатора в реакционном объеме. Кроме того, такой способ проведения полимеризации отличает высокая чувствительность к добавлению различных ионов, что позволяет направленно регулировать свойства частиц дисперсий. В результате формируются полимерные частицы с набором требуемых свойств, содержащих на поверхности реакционноспособные альдегидные группы.

Осадительную полимеризацию акролеина проводили в водной среде при 20°C, добавляя при перемешивании 0.1 н раствор щелочи до достижения pH=10. Поскольку акролеин частично растворим в воде (20 % об.), а полиакролеиновые частицы не растворимы, то формирование частиц в процессе осадительной полимеризации происходила, как представлено на **Рис. III.1**, при условии, что концентрация мономера в исходной смеси составляла 4%.

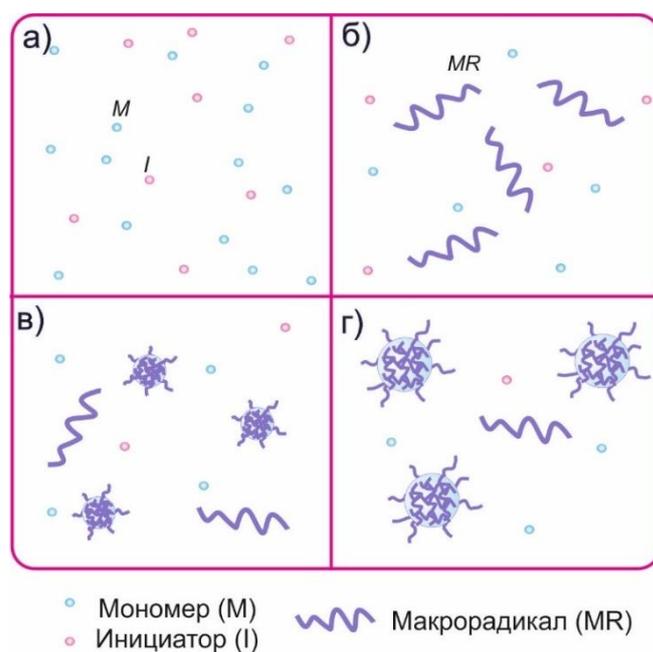


Рисунок III.1. Схема образования частиц в процессе осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде. Показано исходное состояние реакционной смеси (**а**), образование макрорадикалов (**б**), зарождение полимерных частиц (**в**), рост частиц (**г**).

На основании механизма осадительной полимеризации, описанном в литературе [26], можно представить процесс формирования частиц из исходной реакционной смеси, которая содержит дисперсионную среду (воду) и растворенный мономер (акролеин), следующим образом. Полимеризация начинается при добавлении щелочи в качестве инициатора, активирующего рост цепи растворенного акролеина (**Рис. III.1а**). При достижении критической длины цепи растворимость полимера в воде уменьшается, система становится нестабильной, и цепи агрегируют с образованием частиц, которые играют роль зародышей (**Рис. III.1б,в**). Стабильность этих затравочных частиц поддерживается за счет адсорбции водорастворимых олигомеров акролеина, образующихся из растворенного в дисперсионной среде мономера. После исчерпания акролеина в водной фазе вновь образованные олигомеры могут диффундировать в частицы или адсорбироваться на их поверхности. Зоной полимеризации становятся затравочные частицы, где протекает полимеризация до полного превращения мономера (**Рис. III.1г**). [13]

Исследование кинетики осадительной полимеризации акролеина на начальных стадиях реакции показало, что образование частиц начинается сразу после добавления в систему инициатора (щелочи). Наиболее интенсивный рост диаметра полимерных глобул происходит в течение первых 5 мин полимеризации и заканчивается в узком временном интервале (**Рис. III.2б**). В дальнейшем наблюдается лишь незначительное увеличение диаметра, приводящее к образованию частиц с узким распределением по размерам. При таком способе полимеризации получают полиакролеиновые частицы с диаметром 0,65 мкм, концентрацией альдегидных групп 35 мкмоль/г полимера и выходом полиакролеина ~40% (**Рис. III.2**). В процессе хранения наблюдается диффузия олигомерных продуктов, которые детектируются в надосадочной жидкости, в среднем, в концентрации ~0.25 мг/мл (**Таблица 1**).

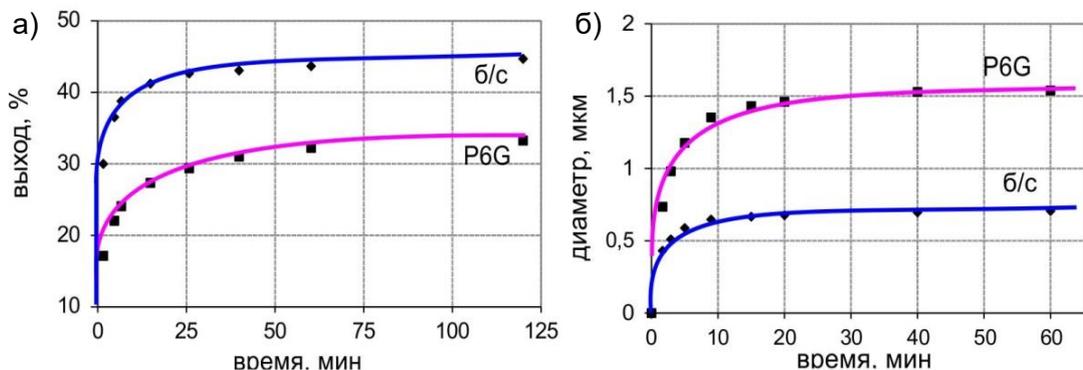


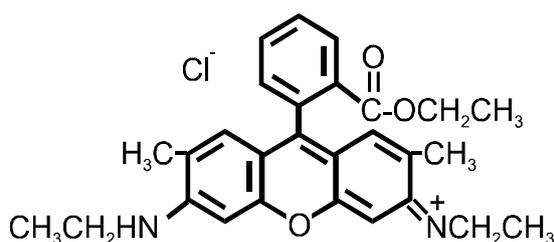
Рисунок III.2. Зависимость выхода полимера (**а**) и размера частиц (**б**) от времени полимеризации без красителя (**б/с**) и с красителем родамином бG (0.33 мас. % в расчете на мономер) (P6G) ($n=3$, $cv<10\%$)

Из литературы известно [23], что в полиакролеиновых дисперсиях всегда содержится некоторое количество олигомерного продукта, наличие которого обусловлено особенностями механизма осадительной полимеризации. Олигомеры могут как адсорбироваться на поверхности и выступать в качестве стабилизаторов частиц, так и проникать в полимерную матрицу. С течением времени такие олигомерные молекулы могут диффундировать из объема на поверхность частиц, а затем в дисперсионную среду, что приводит к заметному изменению свойств при хранении. Существуют различные подходы, которые позволяют повысить коллоидную, химическую стабильность и управлять свойствами частиц. В качестве таких подходов в работе будут рассмотрены: введение красителя, проведение реакции сшивки по радикальному механизму и при участии аминов.

Синтез полиакролеиновых частиц в присутствии красителя.

Существует целый ряд анализов с детекцией результатов невооруженным глазом, в которых необходимо использовать окрашенные полимерные частицы. В работе [43] было показано, что полиакролеин обладает высоким сродством к ксантоновым красителям, что позволяет получать частицы разных цветов. Для этого использовали водорастворимые красители, которые благодаря диссоциации в водной среде оказывали влияние, как на протекание полимеризации, так и на свойства получаемых частиц. Однако не было проведено систематического исследования по оценке роли красителя при полимеризации акролеина, что позволило бы направленно управлять свойствами частиц.

При выборе красителя необходимо учитывать, что его хромофорные группы, которые будут определять интенсивность окрашивания частиц, должны располагаться вблизи поверхности. Это может быть реализовано в случае, если краситель содержит гидрофобную часть, совместимую с полимером, и гидрофильные группы, ориентированные в дисперсионную среду (воду) и удерживающие краситель на поверхности, препятствуя уходу молекул красителя в объем полимерной частицы [13]. Для этих целей наиболее перспективны ксантоновые красители, в частности, аминоксантоновый краситель родамин 6G (Р6G) (**Рис. III.3**), диссоциирующий в водной среде с образованием цветного катиона [333]. Этот краситель также проявляет флуоресцентные свойства, и может быть использован для синтеза не только окрашенных, но и флуоресцентных полиакролеиновых частиц.



Водный раствор родамина 6G	$\lambda_{\text{погл.}}$	$\lambda_{\text{фл.}}$	$\lambda_{\text{возб.фл.}}$
	526	558	533

Рисунок III.3. Краситель родамин 6G (Р6G) и спектральные характеристики его водного раствора: максимум поглощения ($\lambda_{\text{погл.}}$), максимум флуоресценции ($\lambda_{\text{фл.}}$) и длина волны возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{возб.фл.}}$).

На первом этапе изучали оптические и флуоресцентные характеристики водного раствора красителя в зависимости от концентрации. Значительные изменения в спектрах поглощения были зафиксированы, начиная с концентрации 10^{-4} М, что, вероятно, связано с образованием ассоциатов молекул красителя. При концентрации 10^{-3} М полоса поглощения неассоциированных молекул Р6G (526 нм) становилась менее интенсивной по сравнению с полосой поглощения ассоциатов (499 нм). Увеличение концентрации красителя также приводило и к падению относительного квантового выхода флуоресценции (более чем в два раза при концентрации 10^{-3} М по сравнению с концентрацией 10^{-5} М при $\lambda_{\text{возб.}}=533$ нм), что, вероятно, связано с безызлучательным процессом передачи энергии, приводящим к снижению интенсивности флуоресценции ассоциированных молекул [334]. Таким образом, для получения интенсивно окрашенных полимерных частиц необходимо учитывать уменьшение поглощения и тушение флуоресценции при повышении концентрации красителя.

Для синтеза окрашенных полиакролеиновых микросфер использовали метод анионной осадительной полимеризации акролеина в присутствии красителя Р6G, разработанный в лаборатории «Полимеры для биологии» ИБХ РАН. Повышение химической стабильности частиц достигали за счет проведения реакции радикальной сшивки при 70°C в атмосфере инертного газа с участием водорастворимого инициатора персульфата калия ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Реакция сшивки может быть реализована благодаря присутствию непрореагировавших двойных связей, поскольку полимеризация протекает по нескольким механизмам и один из возможных – это путь 2 (схема). Кроме того, реакция сшивки позволяет увеличить коллоидную и химическую стабильность полиакролеиновых частиц не только в процессе синтеза, но и при их дальнейшем использовании в биоанализе.

При добавлении красителя Р6G в водную фазу на стадии осадительной полимеризации регистрировали увеличение размера частиц по сравнению с размером частиц, полученных без красителя (**Рис. III.26**). Повышение концентрации Р6G с 0.04 до 0.6% мас. в расчете на мономер приводило к росту диаметра частиц (**Рис. III.4a**) (коэффициент вариации $\sim 10\%$) и интенсивному розовому окрашиванию дисперсий. Наблюдаемые эффекты при повышении концентрации красителя в реакционной системе, связаны, вероятно, с адсорбцией его катионов, которые дестабилизировали формирующиеся отрицательно заряженные частицы полиакролеина, что приводило к их агрегации и, как результат, к увеличению диаметра. При этом катионы красителя также оказывали влияние на скорость полимеризации, поскольку их положительный заряд затруднял подход к поверхности и диффузию олигомеров в полимерную матрицу. В присутствии Р6G скорость, определяемая как тангенс угла наклона стационарного участка на графике «выход полимера-время», была ниже скорости полимеризации, проводимой без красителя (**Рис. III.2a**). Выход полимера падал с увеличением концентрации Р6G (**Рис. III.4б**), что, по-видимому, связано с дезактивацией активных (анионных) центров полимеризации катионами красителя и повышением роли реакций ограничения цепи. Кроме того, повышалась химическая стабильность ПЧ, синтезированных в присутствии красителя, что выражалось в уменьшении олигомерных продуктов в надосадочной жидкости в процессе очистки дисперсий центрифугированием (**Таблица III.1**).

Таблица III.1

Концентрация олигомера в надосадочной жидкости после центрифугирования

Дисперсия	Концентрация олигомера (мг/мл.)			
	<i>циклы очистки</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4 (через месяц)</i>
Без красителя	0.25	0.24	0.23	0.24
Р6G, I стадия	0.21	0.21	0.19	0.20
Р6G, II стадия	0.16	0.13	0.13	0.10

Следует отметить, что после проведения реакции радикальной сшивки количество олигомеров в надосадочной жидкости уменьшалось почти в 2 раза, увеличивался выход полимера и диаметр микросфер (**Рис. III.4**). Такой эффект, вероятно, обусловлен участием в радикальной полимеризации непрореагировавших двойных связей олигомеров и полиакролеина, что приводит к ограничению диффузии олигомеров из полимерной матрицы и, как результат, повышает химическую стабильность ПЧ и препятствует их разрушению. Все дисперсии, полученные при различных концентрациях Р6G, сохраняли

коллоидную стабильность в физиологическом растворе (0.15 М NaCl) и при хранении (в течение 2 лет).

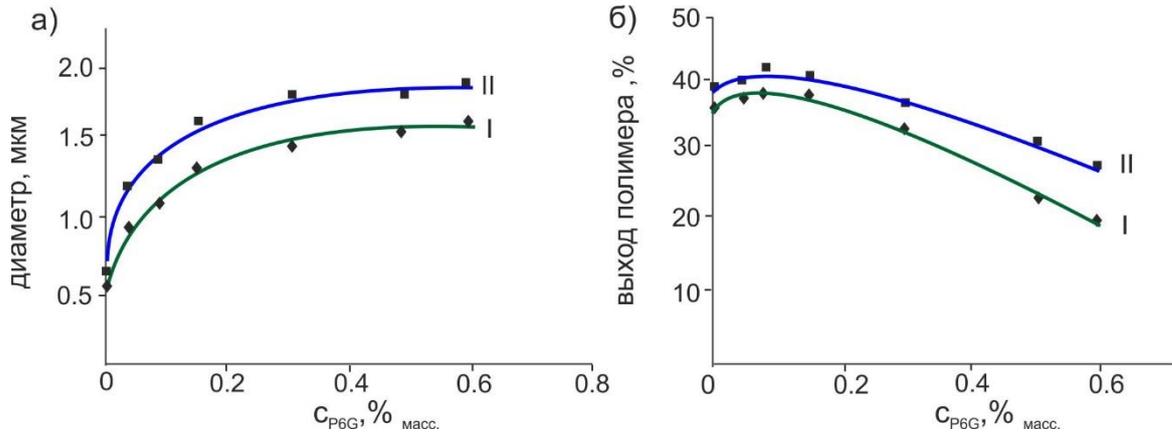


Рисунок III.4. Зависимость диаметра частиц полиакролеиновой дисперсии **M1** (а) и выхода полимера (б) от концентрации Р6G на стадии осадительной полимеризации (I) и стадии радикальной сшивки (II) ($n=3$, $cv < 10\%$).

С увеличением концентрации красителя возрастала интенсивность окраски полученных дисперсий, краситель практически полностью включался в частицы и не диффундировал в дисперсионную среду в процессе очистки центрифугированием и при хранении. Спектры поглощения и флуоресценции дисперсий частиц сходны по форме со спектрами водных растворов красителей. Однако наблюдался сдвиг пиков поглощения дисперсий в длинноволновую область на 10 нм (пик $\lambda_{\text{погл.}}$ отмечен при 536 нм вместо пика при 526 нм, характерного для раствора красителя) и спектры флуоресценции были смещены в красную область спектра (**Рис. III.5**). При увеличении концентрации введенного красителя происходило усиление полосы поглощения ассоциатов в области 499 нм и сильный сдвиг максимума излучения с 558 нм до 578 нм. Такие же изменения наблюдались при ассоциации молекул Р6G в водном растворе. Относительный квантовый выход флуоресценции при повышении концентрации красителя до 0,33% мас. возрастал, а затем падал примерно в два раза, что свидетельствует об отсутствии процессов концентрационного тушения флуоресценции до этой концентрации Р6G. [149]

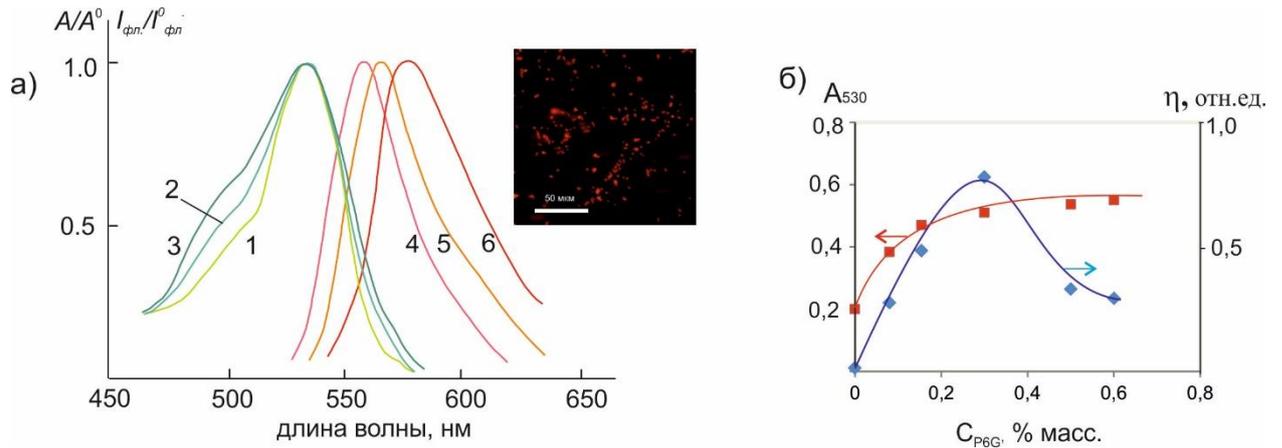


Рисунок III.5. Зависимость нормированных спектров поглощения (1-3) и флуоресценции (4-6) от концентрации P6G (% мас. в расч. на мономер): 0.15 (1,4); 0.33 (2,5); 0.6 (3,6); на вставке – флуоресцентная микрофотография полиакролеиновых микросфер, полученная при возбуждении светом с $\lambda_{\text{возб.}}=533$ нм. (а); Зависимость пика поглощения ПЧ на длине волны 536 нм (A) и относительного квантового выхода флуоресценции (η) полиакролеиновой дисперсии от концентрации P6G (б).

Таким образом, осадительная полимеризация акролеина в водно-щелочной среде, проводимая в присутствии органического красителя, является эффективным способом получения интенсивно окрашенных, флуоресцентных частиц в диапазоне диаметров 1.2-2 мкм, отвечающих основным требованиям, необходимым для их применения в биомедицинских исследованиях.

Синтез полиакролеиновых частиц в присутствии аминов

Синтез ПЧ в присутствии красителя является очень перспективным методом, но существует необходимость исследования процесса полимеризации для каждого нового красителя. Одним из подходов для разработки универсального процесса получения окрашенных частиц методом осадительной полимеризацией акролеина является введение красителя в сформированные ПЧ. Для повышения коллоидной и химической стабильности частиц в процессе одностадийного метода осадительной полимеризацией, на начальном этапе полимеризации вводили амины, такие как аммиак, гидрат гидразина, этилендиамин, фенилендиамин. Амины, обладая основными свойствами, вероятно, с одной стороны, за счет диссоциации позволяют сдвинуть равновесие в сторону образования более активных в полимеризации свободных ионов по сравнению с контактными ионными парами, а, следовательно, повысить эффективность инициирования [335]. С другой стороны, эти

соединения способны вступать в реакцию с альдегидными группами, что приводит к образованию межмолекулярных связей [335], которые увеличивают химическую и агрегативную устойчивость частиц дисперсий.

Были получены полиакролеиновые частицы в присутствии различных аминов (см. «Экспериментальная часть»), взятых в диапазоне концентраций 0,05-0,3% мас. в расчете на мономер, и исследованы свойства полученных частиц. Найдено, что полимеризация идет до высоких конверсий, при этом выход полимера составляет 60-90%, в зависимости от природы используемого амина, причем наименьший выход полимера отмечен у дисперсий, полученных в присутствии этилендиамина (60-70%), а наибольший – при добавлении фенилендиамина (80-90%). Традиционный способ получения полиакролеиновых дисперсий (без добавления аминов) позволяет достичь только 40%-ого выхода полимера (Рис. III.6). В случае с этилендиамином прослеживается обратная закономерность, т.е. с ростом концентрации конверсия мономера уменьшается до 61%. Из литературы известно [336], что фенилендиамин обладает минимальной, а этилендиамин максимальной константой основности (Таблица III.2), т.е. в присутствии этилендиамина концентрация OH^- максимальна. Увеличение концентрации гидроксил-ионов, с одной стороны, повышает эффективность инициирования за счет образования свободных ионов, а, с другой, сдвигает равновесие в сторону протекания реакции по альдегидной группе акролеина без роста полимерной цепи. В результате выход полимера снижается по сравнению с выходом, полученным в присутствии фенилендиамина, который не оказывает такого сильного влияния на инициирование полимеризации.

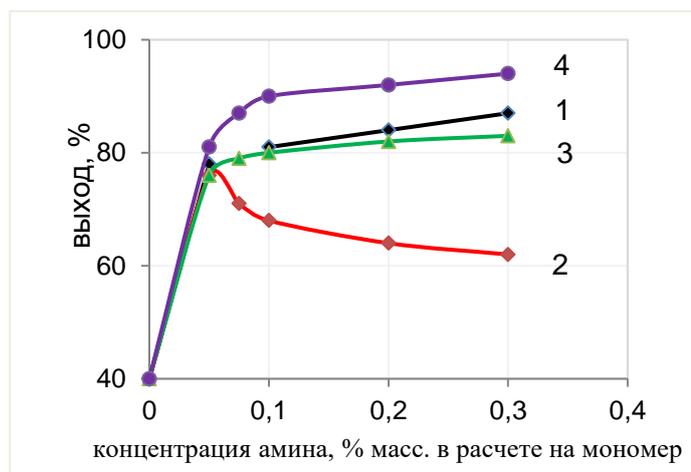


Рисунок III.6. Выход полимера в зависимости от добавленного амина: 1 – аммиак; 2 – этилендиамин; 3 – гидразингидрат; 4 – фенилендиамин ($n=3$, $cv < 10\%$).

Таблица III.2.

Константы основности аминов

Аминосоединение	$K_{осн}$
Этилендиамин	$1.2 \cdot 10^{-4}$
Аммиака гидрат	$1.74 \cdot 10^{-5}$
Гидразин	$1.7 \cdot 10^{-7}$
Фенилендиамин	$1.1 \cdot 10^{-8}$

Исследование осадительной полимеризации акролеина на начальных стадиях реакции, показало, что во всех случаях образование частиц начинается сразу после добавления в систему инициатора (щелочи) и заканчивается в узком временном интервале (в течение 30 минут). В дальнейшем происходит лишь незначительное увеличение диаметра сформированных полимерных частиц, приводящее к образованию практически монодисперсных микросфер (Рис. III.7). Во всех случаях с увеличением концентрации амина в реакционном объеме от 0.05% до 0.3% мас. в расчете на мономер диаметр частиц возрастал. Максимальный диаметр частиц был получен при участии этилендиамина в концентрации 0.2% мас. в расчете на мономер, а минимальный диаметр отмечен у частиц, полученных в присутствии фенилендиамина (0.05% мас.).

Вероятно, при участии этилендиамина (0.2% мас.) в системе зарождается большое количество частиц и при такой развитой поверхности недостаточно противоионов для их стабилизации. Это приводит к коалесценции (слипанию) формирующихся частиц, и, как следствие, к максимальному диаметру, но характеризующихся наименьшей коллоидной стабильностью, т.е. ПЧ этих дисперсий не агрегируют только в 0,25 М растворе NaCl и ниже. Частицы, полученные в присутствии других аминов, во всем диапазоне концентраций не агрегировали в 2М NaCl. $K_{осн}$ аммиака и гидразина занимают среднее положение между $K_{осн}$ вышеописанных соединений, что, вероятно, приводит к образованию частиц, диаметр которых находится между максимальным и минимальным значениями. Гидразин имеет неограниченную растворимость в воде и высокую $K_{осн.}$, что приводит к образованию крупных частиц с диаметром 1,5 мкм (0.3% мас.). В случае аммиака следует отметить, что, несмотря на высокую растворимость в воде и $K_{осн.}$, превышающую $K_{осн.}$ гидразина, частицы имеют практически такой же диаметр, как и в случае использования гидразина (0.3% мас.). Это, вероятно, связано с образованием меньшего количества OH^- , влияющих на реакцию иницирования, так как известно, что в воде в основном присутствует гидрат аммиака $NH_3 \cdot H_2O$.

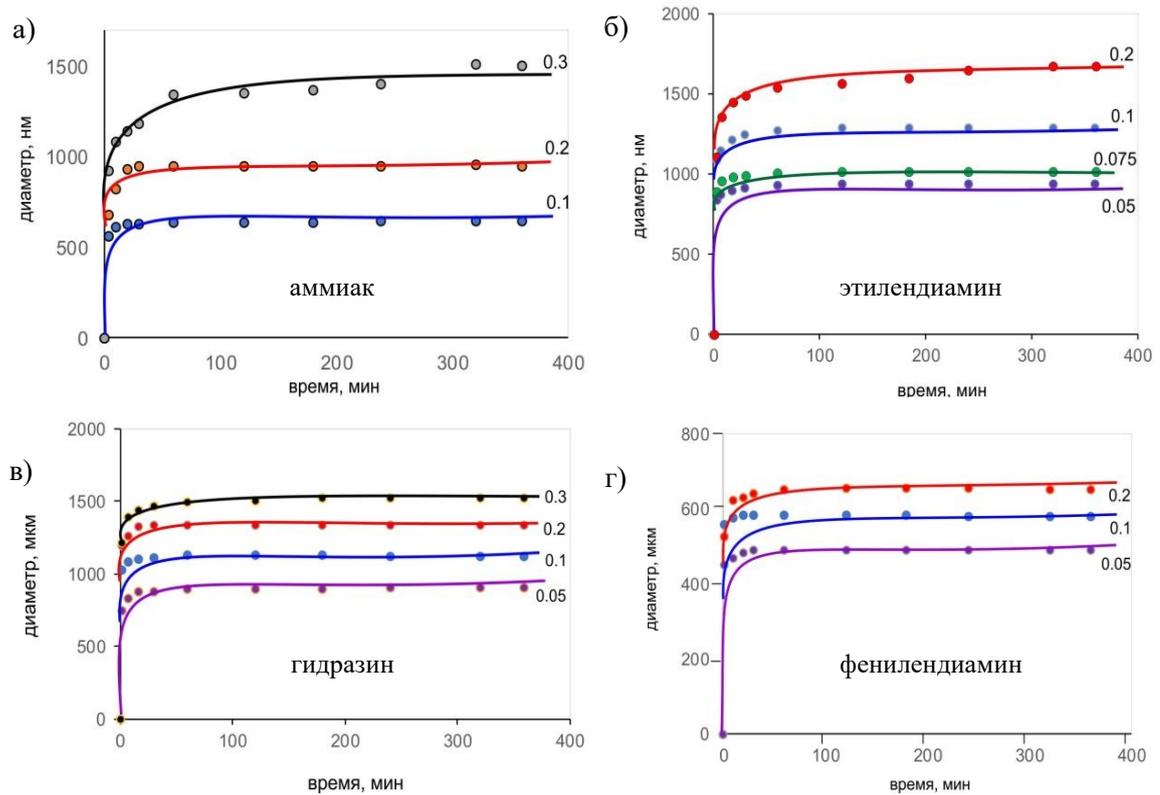


Рисунок III.7. Зависимость диаметра частиц полиакролеиновой дисперсии **M1** от концентрации аммиака (0.1-0.3% мас.) (**а**); этилендиамина (0.05-0.2% мас.) (**б**); гидразин гидрата (0.05-0.3% мас.) (**в**); фенилендиамина (0.05-0.2% мас.) (**г**) на стадии осадительной полимеризации. ($n=3$, $cv<10\%$).

При спектрофотометрическом определении количества вымываемого из дисперсии олигомерного продукта по методике, представленной в «Экспериментальной части», найдено, что при одной и той же концентрации различных аминов наименьшее количество олигомера в надосадочной жидкости детектировали в дисперсии, полученной с участием этилендиамина, что свидетельствует о формировании наиболее химически стабильных частиц (**Таблица III.3**). Это, вероятно, связано с реакцией между альдегидными группами акролеина и аминогруппами амина. Этилендиамин может рассматриваться, как классический сшивающий агент благодаря наличию двух аминогрупп. Такого эффективного действия не наблюдается в случае использования фенилендиамина, что может быть объяснено стерическими затруднениями.

Таблица. III.3

Концентрация олигомера в надосадочной жидкости

Амин	Количество олигомера, мг/мл				
	Концентрация амина, % мас. в расчете на мономер				
	0.3	0.2	0.1	0.075	0.05
Аммиак	0.09	0.15	0.18	-	-
Этилендиамин	-	0.10	0.16	0.20	0.21
Гидразингидрат	-	0.18	0.20	-	0.25
Фенилендиамин	-	0.21	0.21	-	0.33

Полученные результаты подтверждены данными по растворению полиакролеиновых частиц в этаноле. При увеличении концентрации амина от 0.05% до 0.3% мас. растворимость всех образцов, за исключением дисперсии, полученной с участием фенилендиамина, падает (Таблица III.4). Следует отметить, что растворимость ПЧ падает с увеличением концентрации аммиака и этилендиамина в системе. Это свидетельствует о повышении степени сшивки ПЧ. Изменение концентрации гидразина практически не влияло на растворимость, а следовательно, на степень сшивки частиц.

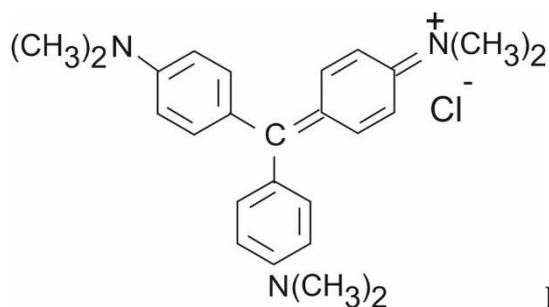
Таблица. III.4

Растворимость полиакролеиновых частиц в этаноле

Амин	Доля растворенного полимера; % мас.				
	Концентрация амина; % мас. в расчете на мономер				
	0.3	0.2	0.1	0.075	0.05
Аммиак	3.8	7.5	14.1	-	-
Этилендиамин	-	2.2	10.6	18.0	25.1
Гидразин	-	28.4	35.3	-	43.00
Фенилендиамин	-	10.6	10.1	-	11.0

Таким образом, найдено, что степень диссоциации аминов влияет на реакцию инициирования полимеризации акролеина в водно-щелочной среде и позволяет получать частицы заданного диаметра и требуемой коллоидной устойчивости. Проведенные исследования показали, что полиакролеиновые частицы **M1**, полученные в присутствии аммиака (0.2% и 0.3% мас. в расчете на мономер) и этилендиамина (0.1% и 0.2% мас. в расчете на мономер), являются коллоидно-устойчивыми дисперсиями (стабильны в 0.25 М NaCl) с диаметром частиц 1.0-1.5 мкм, которые характеризуются химической стабильностью (растворимость в этаноле меньше 5%) и стабильностью при хранении (концентрация олигомера в надосадочной жидкости меньше 0.2 мг/мл). Данные частицы наиболее полно удовлетворяют требованиям их использования в биоанализе.

Для получения окрашенных образцов использовали водорастворимые ксантеновые красители родамин 6G и кристаллический фиолетовый (КФ).



Кристаллический фиолетовый, $\lambda_{\text{полгл.}}$ 590 нм

В частицы красители включали за счет адсорбции. К очищенным после синтеза дисперсиям и разбавленным до 1% добавляли растворы красителей, после 15 мин перемешивания при комнатной температуре образцы инкубировали при 70°C в течение 1 часа. Количество включенного красителя оценивали спектрофотометрически по измерению невключенного красителя в надосадочной жидкости (**Рис. III.8a**). С целью снижения десорбции красителя предварительно окрашенные микросферы инкубировали с фосфорномолибденовой кислотой $H_7[PMo_{12}O_{42}]$ (ФМК), которая образует комплексы с красителем. В этой реакции происходит замещение 4 атомов водорода кислоты на катионы красителя, что приводит к образованию соединения, нерастворимого в воде [337]. Образование комплекса ФМК с кристаллическим фиолетовым на поверхности полиакролеиновых частиц, вероятно, затрудняет дрейф красителя с поверхности частиц. Раствор ФМК добавляли к окрашенным дисперсиям и перемешивали в течение суток при комнатной температуре. Данная процедура позволила повысить количество включаемого в частицы красителя, в среднем, на 10% для всех образцов (**Рис. III.8a**).

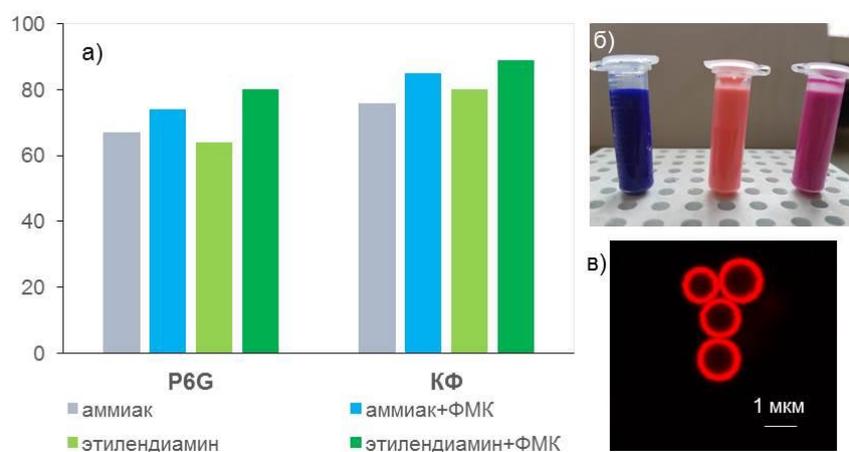


Рисунок III.8. Включение красителей (%) родамина 6G (Р6G) и кристаллического фиолетового (КФ) после синтеза полиакролеиновых частиц в присутствии аммиака и этилендиамина, а также после их обработки фосфорно-молибденовой кислотой (ФМК) (**a**);

изображение дисперсий, окрашенных КФ, Р6G и родамином С (**б**); изображение с конфокального микроскопа полиакролеиновых частиц, полученных в присутствии аммиака и окрашенных родамином С (**в**).

Краситель преимущественно включался в приповерхностный слой полимерных частиц (**Рис. III.8в**), что обеспечивало интенсивное окрашивание и флуоресценцию при невысоких концентрациях используемого красителя. Таким образом, получены интенсивно окрашенные после синтеза частицы **М1**, полученные методом осадительной полимеризации акролеина в присутствии аминов, которые отвечают требованиям их использования в биоанализе.

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

Существует ряд трудностей при получении агрегативно устойчивых частиц полиакролеина с диаметром 100–300 нм, что вызвано особенностями полимеризации акролеина (см. «Обзор литературы»). Одним из способов расширения свойств частиц является введение сомономера в состав реакционной смеси и проведение реакции сополимеризации. В качестве сомономера большой потенциал имеет стирол, поскольку его свойства хорошо изучены и тщательно исследованы закономерности полимеризации. Кроме того, по сравнению с полиакролеином полистирол имеет более высокий показатель преломления $n_D^{20} = 1.59$, который обеспечивает интенсивное рассеяние света, и более низкую плотность полимера $\rho^{20} = 1.05 \text{ г/см}^3$ [39], что повышает седиментационную устойчивость дисперсий. Эти параметры играют важную роль при создании микроструктур для анализов с инструментальной детекцией результатов. Стоит также отметить, что стирольные звенья в составе полимерной цепи выполняют изолирующую функцию и препятствуют образованию полуацетальных структур, характерных для гомополимеризации акролеина [40], тем самым увеличивая концентрацию реакционноспособных альдегидных групп на поверхности частиц.

Одним из методов синтеза является радикальная безэмульгаторная сополимеризация в присутствии инициатора $K_2S_2O_8$, которую проводили при мольном соотношении мономеров в исходной реакционной смеси акролеин:стирол: 1:1, 5:1, 10:1. В результате сополимеризации практически нерастворимого в воде стирола (0.05%) и акролеина, частично растворимого в воде (20% об.), синтезированы дисперсии сополимерных частиц. Частицы формируются из исходной смеси (включает дисперсионную среду (воду), капли

мономера стирола и молекулярно-растворенные мономеры стирол и акролеин) после добавления персульфата калия, инициирующего рост цепи растворенных мономеров (**Рис. III.9а**). При достижении критической длины цепи растворимость сополимера в воде уменьшается, система становится нестабильной, и цепи агрегируют с образованием частиц, которые играют роль зародышей (**Рис. III.9б**). Стабильность затравочных частиц поддерживается благодаря адсорбции водорастворимых олигомеров, образующихся из растворенных мономеров. Исчерпание стирола в водной фазе вызывает его диффузию из капель мономера в полимерно-мономерные частицы, а также образование новых олигомеров, которые могут диффундировать в частицы или адсорбироваться на их поверхности. Зоной полимеризации становятся полимерно-мономерные частицы, где протекает полимеризация до полного исчерпания мономера (**Рис. III.9в,г**).

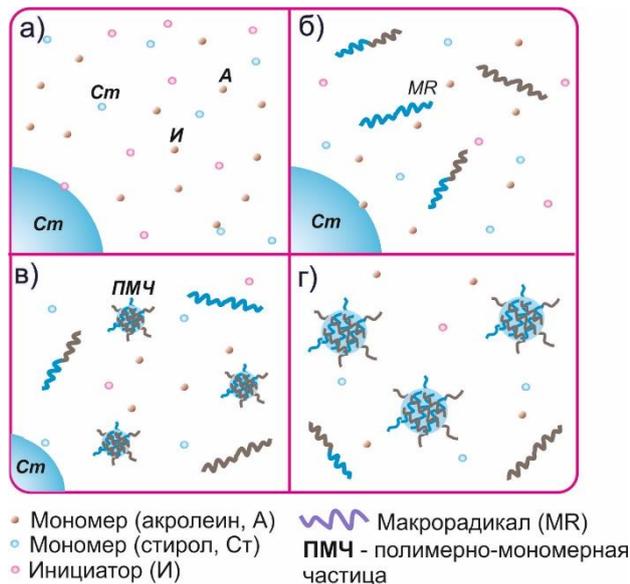


Рисунок III.9. Схема образования частиц в процессе безэмульгаторной радикальной сополимеризации акролеина со стиролом. Показано исходное состояние реакционной смеси (**а**), образование макрорадикалов из акролеина и стирола (**б**), зарождение полимерно-мономерных частиц (**в**), рост частиц (**г**).

Данная сополимеризация является диффузионно-контролируемым процессом, что отражается в снижении скорости полимеризации по сравнению с осадительной полимеризацией акролеина. На **Рис. III.10А** представлены зависимости конверсия-время, которые имеют характерную S-образную форму с участками, соответствующими стадии формирования частиц, стационарному участку с постоянной скоростью полимеризации, и заключительной стадии, протекающей с уменьшением скорости процесса, что определяется снижением концентрации мономера в полимерно-мономерных частицах. Следует

отметить, что с увеличением концентрации акролеина в мономерной смеси (соотношение акролеин : стирол, 10:1) возрастает скорость полимеризации и конверсия, которая в этом случае составляет $\approx 70\%$.

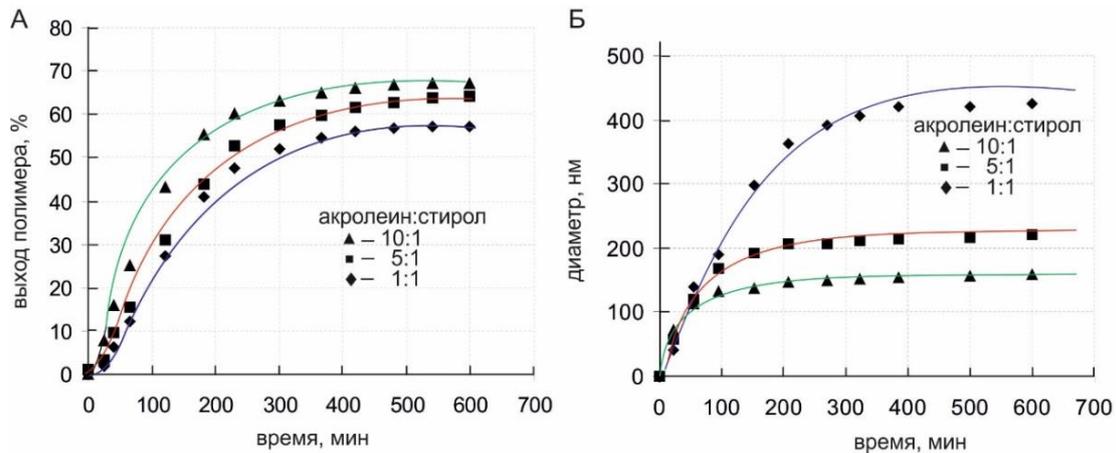


Рисунок III.10. Зависимость выхода полимера (А) и диаметра микросфер М2 (Б) от времени полимеризации. ($n=3$, $cv<10\%$)

Увеличение содержания акролеина в реакционной смеси приводит к возрастанию скорости роста диаметра и снижению диаметра частиц дисперсии (**Рис. III.10Б**). При соотношении 10:1 отмечена и более рыхлая структура частиц полимерной дисперсии, чем в случае соотношения мономеров 1:1 (**Рис. III.11**).

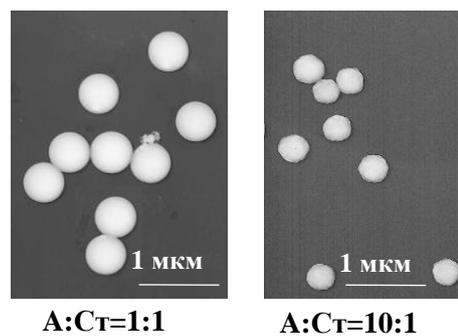


Рисунок III.11. ПЭМ изображения сополимерных микросфер, полученных при соотношении акролеин:стирол 1:1 (А:Ст=1:1) и 10:1 (А:Ст=10:1).

Наличие звеньев полистирола подтверждено ИК-спектроскопией. В спектрах сополимерных частиц появляется интенсивная полоса при длине волны 760 см^{-1} , которая свидетельствует о наличии ароматического кольца. С увеличением концентрации стирола в мономерной смеси наблюдается уменьшение пика на длине волны 1050 см^{-1} ,

относящегося к полуацетальным структурам акролеина, а также практически исчезает пик на длине волны 1650, характерный для связи C=C акролеина. В области 1550-1590 см^{-1} присутствует триплет, относящийся к валентным колебаниям двойных связей, характерных для ароматических колец полистирола (**Рис. III.12**).

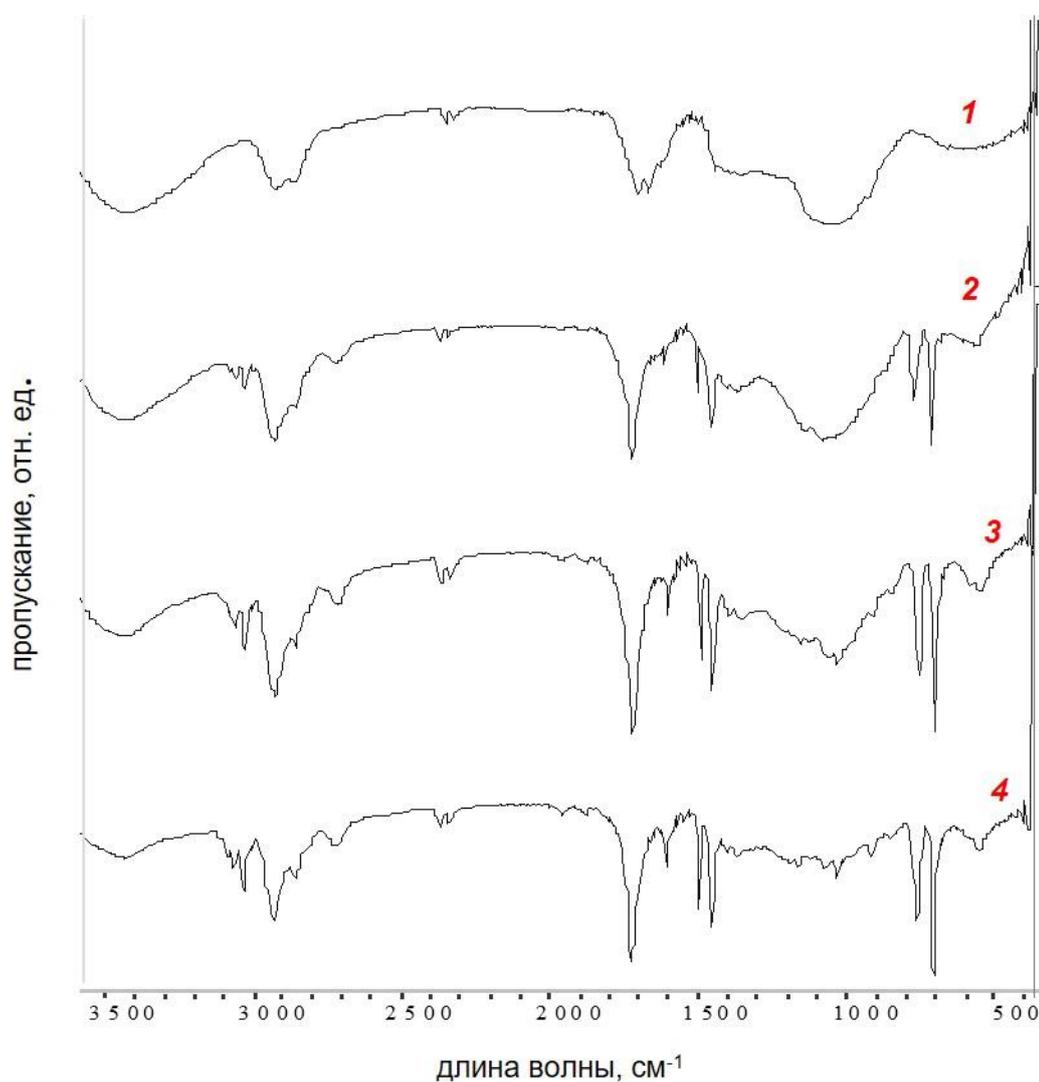


Рисунок III.12. ИК-Фурье спектры частиц полиакролеина (1), сополимерных частиц при соотношении акролеин : стирол 10:1 (2); 5:1 (3); 1:1 (4).

Характеристики полученных частиц приведены в **Таблице III.5**. Как видно, диаметры сополимерных частиц меньше, чем при осадительной полимеризации акролеина, и они укладываются в диапазон значений, требуемых для исследований с инструментальной детекцией результатов.

Таблица III.5

Характеристика частиц на основе сополимера акролеина со стиролом

Мольное соотношение акролеин/стирол	Диаметр, нм	[СОН], мкМ/м ²	[олигомер], мг/мл в супернатанте	Стабильность в 0.2 М NaCl
1:1	520±18	2.63	0.031	стабильна
5:1	250±11	1.25	0.035	стабильна
10:1	150±7	1.08	0.045	стабильна

Кроме того, частицы содержат альдегидные группы, характеризуются высокой коллоидной и химической стабильностью и могут найти применение в качестве микроструктур, используемых в различных биомедицинских исследованиях.

III.1.2. Микроструктуры на основе частиц, содержащих органические метки

III.1.2.1. Реакция латексной агглютинации

В последние годы широкое распространение получили иммунохимические методы анализа, среди которых большое внимание уделяется инструментальным методам, таким как иммуноферментный, радиоиммуноанализ и др. Для проведения этих анализов требуются хорошо оснащенные лаборатории и высокая квалификация персонала. Однако в некоторых случаях анализы, например, для контроля загрязнений окружающей среды различными гербицидами, необходимо осуществлять в полевых условиях, не имея специального оборудования и обученного персонала. В этом случае требуются простые, недорогие тесты с визуальной детекцией результатов, обладающие в то же время высокой чувствительностью и надежностью. [13]

Одним из таких методов является реакция агглютинации, в которой белки, выступая в качестве поливалентных антигенов, взаимодействуют с антителами с образованием иммунных комплексов, или агглютинатов.[15] Использование конъюгатов ПЧ с антителами, которые могут быть рассмотрены, как микроструктуры, позволяет значительно упростить учет результатов реакции агглютинации, которая в этом случае называется реакцией латексной агглютинации (РЛА).[46] Схема реакции показана на Рис. III.13.

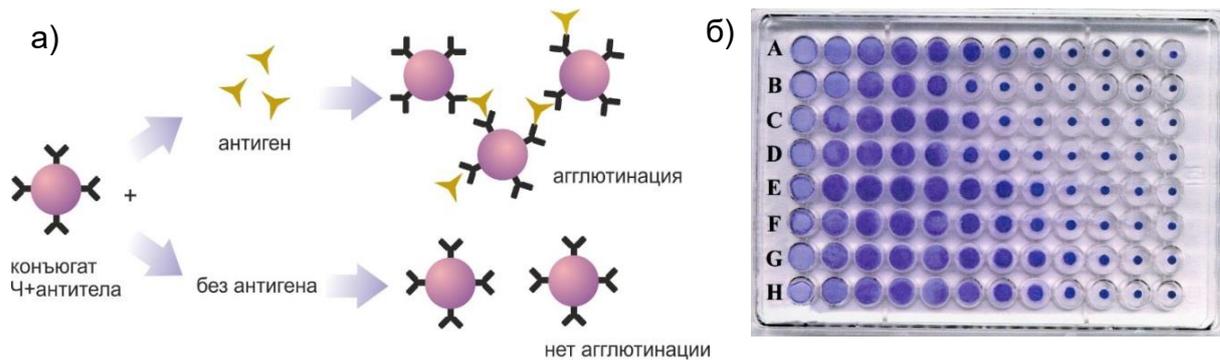


Рисунок III.13. Схема реакции латексной агглютинации (РЛА) с микроструктурами, представляющими конъюгаты полимерных частиц с антителами (а); микротитрационный вариант РЛА, реакция представлена в горизонтальных рядах, где в первой лунке внесена максимальная концентрация антигена, в последующих лунках в 2 раза меньше (раститровка), две последние лунки- контроль (б).

Одним из вариантов проведения РЛА является постановка реакции в 96-ти луночном планшете с последующей визуальной регистрацией результатов. В этом случае необходимо, чтобы полимерные частицы отвечали всем требованиям для использования дисперсий в биоанализе, указанным в начале главы. Частицы также должны иметь диаметр не менее 1.5 мкм и относительно высокую плотность полимера, что обеспечивает формирование агглютинационной картины через 1.5-2 ч (Рис. III.13б), а также контрастный цвет для облегчения учета результатов реакции. При положительной реакции с анализом на дне лунки образуется окрашенный агглютинат в виде «зонтика», а при отрицательной - формируется точка.

В данной работе использовали окрашенные частицы, полученные на основе разработанного способа синтеза полиакролеиновых частиц в процессе осадительной полимеризации (М1), используя два подхода: 1. с участием красителя на стадии синтеза; 2. при введении красителя после синтеза с участием аминов. Для проведения РЛА готовили микроструктуры (конъюгаты) полиакролеиновых частиц с антителами за счет реакции альдегидных групп с аминогруппами антител, представленной на схеме (Рис. III.14):

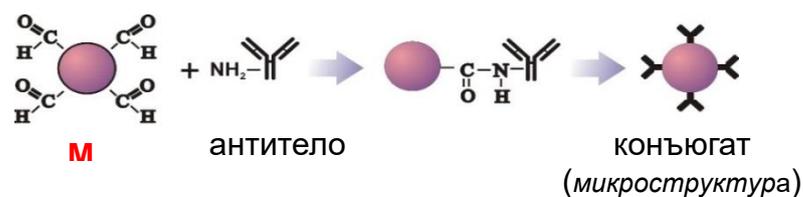


Рисунок III.14. Схема получения микроструктур на основе полиакролеиновых микрочастиц М1.

Затем ставили РЛА для определения соответствующего анализита по методике, представленной в «Экспериментальной части». В Таблице III.6 представлены примеры тест-систем для определения различных анализитов, разработанных на основе частиц М1, при сотрудничестве с рядом научных организаций.

Таблица III.6

Тест-системы, разработанные на основе полиакролеиновых частиц М1

дисперсия	анализ	аналит	предел детекции	сотрудничество	ссылка
М1 +краситель, введенный на стадии синтеза (Р6G)	РИЛА	групп- специфические полисахариды S.pyogenes	0.05 нг/мл	ИБХ	[338]
	Иммунора- диометричес- кий	ферритин	$7 \cdot 10^{-12}$ М	ИБХ, Институт биоорганической химии, Беларусь	[338]
	РЛА	антитела к антигенам: <i>фр. чумного микроба, липополисахарид ы клет. стенки туляримии протективный анген сибирской язвы холерный токсин аденовирус</i>	титр:	НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи	[339]
			<i>1:512.</i>		
			<i>1:512</i>		
			<i>1:512.</i>		
			<i>1:64</i>		
	РЛА	НВs-антиген	50-100 нг/мл	НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского	[340]
	РЛА	микобактерии <i>M.smegmatis</i> <i>M.avium</i> <i>Tuberculosis</i>	титр	«Диагностические системы», Н.Новгород*	[341]
			<i>1:128</i>		
<i>1:64</i>					
Гибридизац ионный анализ на мембране	ДНК фага λ	<i>0.3 нг</i>	ИБХ	[342]	
М1+ краситель, введенный после синтеза (КФ)	РЛА	дифтерийный токсин	3.0-4.0 нг/мл	НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН	[343] [344]
	РИЛА	гербициды (2,4- D, атразин, симазин)	0.25 нг/мл 2,4-D	ИБХ, МГУ	[345]
	РЛА	антитела к липополи- сахаридам клеточной	титр:	ГНЦ институт иммунологии	[346]

		стенки условно-патогенных бактерий			
		<i>E. coli</i>	1:128		
		<i>P. aeruginosa</i>	1:64		
		<i>P. mirabilis</i>	1:64		
		<i>S. aureus</i>	1:128		
		<i>K. pneumoniae</i>	1:64		
		<i>Salmonella enteritidis</i>	1:256		
		<i>Salmonella minnesota</i>	1:128		
РЛА	антитела к тиреоглобулину	титр 1:512	НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РАМН	[347]	

РЛА - реакция латексной агглютинации, РИЛА - реакция ингибирования латексной агглютинации, *-ПЧ были переданы для получения тест-систем.

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

В данной работе разработан анализ на основе агглютинации частиц М1 в формате реакции ингибирования латексной агглютинации (РИЛА), которую используют для определения моновалентных антигенов (гаптен). В РИЛА реализуется конкурентная реакция свободного гаптена и гаптена, конъюгированного с носителем (Рис. III.15), поскольку при взаимодействии гаптен с антителами не образуются агглютинаты.

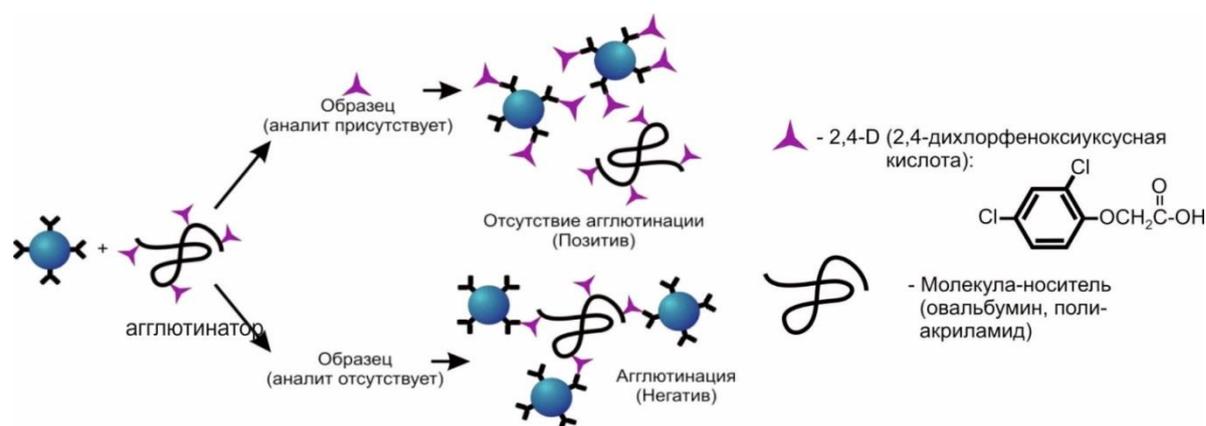


Рисунок III.15. Схема реакции ингибирования латексной агглютинации.

Анализ на основе РИЛА разработан для определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D), который активно используют в сельском хозяйстве в качестве препарата против двудольных широколистных сорняков на посевах зерновых, лугах и газонах. 2,4-D является гаптен и для его определения в РИЛА

используют микроструктуры с антителами, поливалентный антиген (агглютинатор) и сам гаптен (ингибитор).

Для получения микроструктур использовали частицы **M1**, синтезированные в присутствии 0.2% NH_3 с введением красителя КФ после синтеза и последующей обработкой фосфорно-молибденовой кислотой. На **M1** иммобилизовали моноклональные антитела против 2,4-D (клон E2/G2) [345] за счет реакции между альдегидными группами частиц и аминогруппами антител (микроструктура M1-Ат). В качестве агглютинатора использовали гаптен (2,4-D), конъюгированный с молекулой-носителем, в качестве которой выступал глобулярный белок овальбумин (OVA) или синтетический полимер полиакриламид (ПАА). При постановке РЛА агглютинатор взаимодействовал с антителами, иммобилизованными на полимерных частицах, что приводило к их специфической агрегации.

На первом этапе разработки метода анализа получали M1-Ат при участии антител в диапазоне концентраций от 1 до 7 мкг/мг полимера и определяли активность микроструктур в прямой РЛА с агглютинатором 2,4-D-OVA. Минимальную детектируемую концентрацию 2,4-D-OVA определяли по последней лунке с положительной реакцией. Повышение концентрации антител до 5 мкг/мг полимера позволило снизить определяемую концентрацию 2,4-D-OVA с 25 нг/мл до 3 нг/мл. Однако выше 5 мкг/мг полимера наблюдалась частичная флокуляция M1-Ат, что явилось основанием использовать в дальнейших исследованиях M1-Ат с концентрацией Ат 5 мкг/мг полимера [149].

Следующим этапом был подбор оптимальных условий РИЛА для определения рабочей концентрации агглютинатора 2,4-D-OVA (степень замещения 2,4-D 10%) в диапазоне 100–1.6 нг/мл (**Таблица III.7**). Отсутствие реакции агглютинации в лунке через 1.5 ч (точка) оценивали как положительную РИЛА. Уменьшение концентрации агглютинатора приводило к снижению минимальной детектируемой концентрации 2,4-D до 0.16 нг/мл. За предел обнаружения в данном анализе принимали минимальную детектируемую концентрацию 2,4-D при рабочей концентрации агглютинатора 2,4-D-OVA. Рабочей является концентрация, которая, как минимум, в 3 раза превосходит минимальную определяемую концентрацию 2,4-D-OVA в РЛА (3 нг/мл), и в данной РИЛА она составляла 12.5 нг/мл. Таким образом, пределом обнаружения 2,4-D в данном анализе является 0.62 нг/мл (ПДК 2,4-D в воде водных объектов согласно ГН 2.1.5.1315-03 составляет 0.5 мкг/мл).

Таблица III.7.

Результаты определения 2,4-D в реакции ингибирования латексной агглютинации с участием агглютинатора 2,4-D-OVA [149].

[2,4-D-OVA], нг/мл	[2,4-D] (нг/мл)						
	5.0	2.5	1.25	0.62	0.31	0.16	0
100.00	1+	2+	3+	3+	3+	3+	3+
50.00	+/-	1+	2+	3+	3+	3+	3+
25.00	-	+/-	1+	2+	3+	3+	3+
12.50	-	-	+/-	1+	2+	3+	3+
6.25	-	-	-	+/-	1+	2+	3+
3.12	-	-	-	-	+/-	1+	2+
1.60	-	-	-	-	-	+/-	1+
буфер	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: (-) или (+/-) – негативная агглютинация конъюгата 1; 1+, 2+, 3+ – положительная агглютинация конъюгата 1; 1+ – конечная точка реакции агглютинации.

Предел обнаружения в РИЛА зависит от концентрации агглютинатора, при этом уменьшение концентрации ведет к снижению минимальной определяемой концентрации гаптена. На концентрацию агглютинатора влияет природа, молекулярная масса молекулы-носителя, а также содержание гаптена в агглютинаторе. При использовании природных носителей, например, белков, таких как овальбумин, сложно контролировать эти параметры. Получение химически инертных неиммуногенных агглютинаторов с контролируемым содержанием гаптена и определенной молекулярной массы может быть реализовано при использовании в качестве молекул-носителей синтетических полимеров, например полиакриламида (ПАА).[345]

В работе использовали синтетические агглютинаторы 2,4-D-ПАА с содержанием гаптена в молекуле полиакриламида от 2.5 до 25% мол. и молекулярной массой ПАА в диапазоне 40-400 кДа. Данные агглютинаторы прежде всего проверяли в РЛА с микроструктурами на основе частиц **M1**, которые использовали в реакции с 2,4-D-OVA. В **Таблице III.8** представлены максимальное и минимальное значения концентрации агглютинаторов, полученные в РЛА. За минимальную принимали концентрацию агглютинатора, при которой детектировали агглютинацию (1+).

Таблица III.8

Результаты РЛА на основе микроструктур М1-Аг при участии агглютинаторов

Агглютинатор	Степень замещения гаптена, %	Молекулярная масса, кДа	Определяемая концентрация (нг/мл)	
			Max	Min
2,4-D-ПАА	2.5	40	50.0	0.01
	5	40	50.0	0.02
	10	40	50.0	0.02
	25	40	100.0	0.02
	10	80	200	0.04
	10	400	200	0.04
2,4-D-OVA	10	40	Нет	3.0

При использовании 2,4-D-ПАА с теми же параметрами, что и у 2,4-D-OVA, минимальная определяемая концентрация (0.02 нг/мл) была на 2 порядка ниже по сравнению с концентрацией 2,4-D-OVA (3.0 нг/мл). Кроме того, в реакции с 2,4-D-ПАА отмечена прозона (ложноотрицательная реакция, которая наблюдается при значительном превышении количества анализата в растворе по сравнению с концентрацией антител, иммобилизованных на частицы) при концентрации выше 50 или 100 нг/мл. Этим определяется появление верхнего предела детекции 2,4-D-ПАА, который отсутствовал для агглютинатора 2,4-D-OVA, поскольку прозоны не наблюдалось до концентрации 1 мкг/мл. Минимальная определяемая концентрация агглютинатора незначительно зависела от содержания гаптена в агглютинаторе (Таблица III.8) [149].

Затем исследовали влияние 2,4-D-ПАА (10% замещения, М.м.40 кДа) на определение минимальной концентрации 2,4-D в РИЛА также, как и при определении рабочей концентрации 2,4-D-OVA. Агглютинатор 2,4-D-ПАА титровали с 1.0 до 0.03 нг/мл, при этом наблюдалось снижение детектируемой концентрации 2,4-D с 2.0 до 0.06 нг/мл. За рабочую концентрацию агглютинатора в этой реакции принимали 0.12 нг/мл, которая более, чем в 3 раза превышала минимальную определяемую концентрацию 2,4-D-ПАА в РЛА (0.02 нг/мл) (Таблица III.8). При данной концентрации 2,4-D-ПАА детектировали до 0,25 нг/мл 2,4-D. Таким образом, РИЛА с участием агглютинатора на основе полиакриламида, по сравнению с агглютинатором на основе овальбумина, демонстрирует более высокую чувствительность метода РИЛА. Кроме того, преимуществом использования агглютинатора на основе синтетического полимера является более низкая концентрация в реакции, что делает анализ более экономичным.

Специфичность РИЛА оценивали в перекрестных реакциях со структурно-родственными соединениями 2,4-D (Таблица III.9). Минимальные значения, полученные в перекрестных реакциях, как минимум, на порядок превосходили минимальную определяемую концентрацию 2,4-D в РИЛА при участии 2,4-D-OVA. Это подтверждает высокую специфичность разработанного анализа РИЛА для определения 2,4-D с использованием микроструктур на основе частиц М1 [149].

Таблица III.9

Результаты РИЛА при участии М1-Аг со структурно-родственными соединениями 2,4-D

Соединение	Минимальная определяемая концентрация (нг/мл)
2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	0.6
2-(2,4-дихлорфенокси)пропионовая кислота	25.0
4-(2,4-дихлорфенокси)масляная кислота	25.0
4-хлор-о-толилоксиуксусная кислота	8.0
2-(4-хлор-о-толилокси)пропионовая кислота	16.0
4-(4-хлор-о-толилокси)масляная кислота	125.0
2-хлорфеноксиуксусная кислота	500.0
4-хлорфеноксиуксусная кислота	125.0
2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота	8.0

Полученные результаты по чувствительности и специфичности определения 2,4-D хорошо согласуются с данными иммуноферментного анализа, в котором минимальная определяемая концентрация гербицида составила 0.8 нг/мл при участии тех же антител. [348]

Таким образом, окрашенные ПЧ, полученные методом осадительной полимеризации М1, являются перспективными маркерами-носителями в микроструктурах, применяемых в РИЛА, представляющей собой неинструментальный, чувствительный, простой одностадийный метод анализа, пригодный для скрининговых исследований. Данный биоаналитический метод позволяет определять до 0,25 нг/мл 2,4-D в воде в присутствии агглютинатора на основе синтетического полимера.

III.1.2.3. Реакция латексной агглютинации со спектрофотометрической детекцией результатов для определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты

Использование инструментальных методов для учета результатов реакции латексной агглютинации позволяет количественно определять содержание аналита в анализируемом образце. Одним из таких методов является спектрофотометрическое

титрование, которое дает возможность исследовать процесс агглютинации частиц по изменению поглощения образца. [326] Основная особенность этого метода состоит в том, что он позволяет регистрировать специфическую агглютинацию частиц через требуемые интервалы времени сразу после введения агглютинирующего агента, а не только по окончании реакции. В ходе данного анализа определяют важнейшие характеристиками системы - скорость реакции и предельное значение оптического поглощения, которые дают возможность оптимизировать условия проведения реакций. [13]

Анализ обычно проводят в объеме кюветы, что требует использования полимерных частиц, не только отвечающих всем необходимым требованиям для проведения биоанализа, но и седиментационно-устойчивых, с высоким показателем преломления. Низкая плотность полимерных частиц повышает седиментационную устойчивость дисперсии, а высокий показатель преломления частиц обеспечивает более сильное рассеяние света, и, следовательно, высокую интенсивность сигнала. [349] Кроме того, микроструктуры на основе частиц должны давать значительное изменение величины оптического поглощения в процессе реакции и высокую воспроизводимость результатов анализа. [350] Известно, что наиболее интенсивно рассеивают свет частицы с диаметром, приблизительно равным длине волны падающего света. В связи с этим начальный диаметр частиц для спектрофотометрических исследований выбирают из диапазона размеров, где они слабо рассеивают свет. В процессе агглютинации диаметр частиц увеличивается, что приводит к интенсивному рассеянию света. Таким образом, диаметр частиц должен составлять 100–300 нм для проведения анализа при длине волны падающего света 600 нм. Выбор такой длины волны обусловлен наиболее значительным изменением в значениях оптического поглощения. [351]

Известные коммерческие образцы полимерных микросфер относительно дороги и не всегда отвечают требованиям данного метода. Поэтому остается актуальной задача, связанная с синтезом новых частиц, обладающих вышеперечисленными свойствами. Полиакролеиновые частицы имеют низкий показатель преломления ($n_D^{20}=1,41$) и высокую плотность ($\rho^{20}=1,37$ г/см³). [39] Это затрудняет инструментальную детекцию агглютинации и снижает седиментационную стабильность исследуемой системы. Следует также отметить, что способы получения полиакролеиновых частиц с диаметром 100–300 нм трудоемки и малоэффективны. Перечисленные недостатки отсутствуют у частиц на основе сополимера акролеина со стиролом, полученных методом безмульгаторной радикальной полимеризации (M2), представленном в п. III.1.1.2.

Разработан метод определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на основе реакции ингибирования латексной агглютинации со спектрофотометрической детекцией результатов. Для получения микроструктур использовали частицы **M2** ($d=0.15$ мкм), полученные сополимеризацией при мольном соотношении акролеин:стирол=10:1, которые отвечают всем вышеуказанным требованиям. В реакции участвовали те же агглютинаторы на основе овальбумина и синтетического водорастворимого полимера полиакриламида, как и в п. **III.1.2.2**. В качестве гаптена использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту. Микроструктуры (конъюгаты) получали либо прямой реакцией поверхностных альдегидных групп с антителами по их первичным аминогруппам (**M2-Ат**), либо при участии спейсера 6-аминокапроновой кислоты (**M2-с-Ат**). [149]

Микроструктуры не агрегировали и не седиментировали при выбранных условиях реакции и при отсутствии в системе агглютинатора в течение 600 сек, что является необходимым условием при проведении РЛА со спектрофотометрической детекцией результатов. Затем изучали прямую реакцию латексной агглютинации при участии **M2-Ат** с концентрацией антител 10–25 мкг/мг полимера и агглютинатора 2,4-D-OVA (90 нг/мл) (**Рис. III.16а**). После добавления агглютинатора к реакционной системе наблюдали увеличение оптического поглощения в течение 200 сек с дальнейшим выходом на плато (ΔA_{max}), которое не изменялось до конца эксперимента. Скорость изменения оптического поглощения дисперсии (тангенс угла наклона прямолинейного участка) в начале реакции и предельное значение ΔA_{max} возрастали с увеличением концентрации иммобилизованных антител. Максимальное значение ΔA_{max} , равное 0.5, получено для **M2-с-Ат** с наибольшей концентрацией антител (25 мкг/мг полимера). В случае микроструктур, полученных без спейсера, введение агглютинатора практически не влияло на значение оптического поглощения образца (**Рис. III.16а**, кривая 4), что указывает на отсутствие взаимодействия **M2-Ат** с агглютинатором, вызванное, вероятно, стерическими затруднениями. Увеличение концентрации антител до 20 мкг/мг полимера в микроструктурах **M2-Ат** без спейсера приводило к спонтанной агрегации частиц.

Исследование влияние концентрации агглютинатора на протекание РЛА (**Рис. III.16б**) показало, что увеличение концентрации агглютинатора и количества иммобилизованных на частицы антител повышает скорость реакции. Максимальные значения скорости и ΔA_{max} зафиксированы при добавлении 2,4-D-OVA (140 нг/мл) к микроструктуре **M2-с-Ат** (25 мкг/мг полимера).

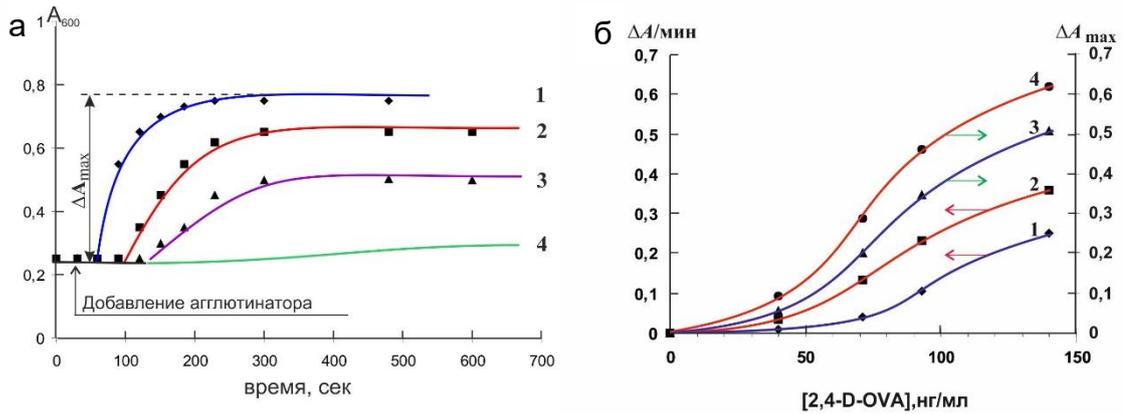


Рисунок III.16. Зависимость оптического поглощения A_{600} от времени при реакции латексной агглютинации между M2-с-Ат и 2,4-D-OVA (90 нг/мл). Концентрация антител 25 (1), 15 (2), 10 (3) мкг/мг полимера и 15 (4) мкг/мг полимера для M2-Ат (без спейсера) (а); Зависимости скорости изменения оптического поглощения $\Delta A/\text{мин}$ и ΔA_{max} от концентрации агглютинатора. Концентрация антител 15 (1, 3) и 25 (2, 4) мкг/г полимера (б) ($n=3$, $cv < 10\%$).

Для синтетических агглютинаторов 2,4-D-ПАА (90 нг/мл) с различной степенью замещения 2,4-D (2,5-10 % мол.) были сняты зависимости оптического поглощения от времени, аналогичные приведенным выше для агглютинатора 2,4-D-OVA. При добавлении агглютинаторов к M2-с-Ат (15 и 25 мкг/мг полимера) отмечено увеличение значений $\Delta A/\text{мин}$ и ΔA_{max} при повышении концентрации иммобилизованных антител (Рис. III.17а). [149]

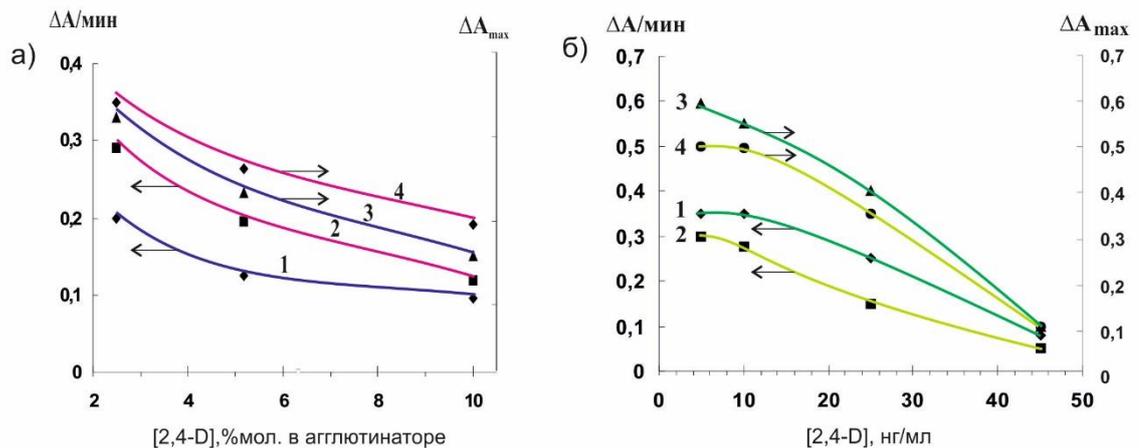


Рисунок III.17.- Зависимость $\Delta A/\text{мин}$ (1,2) и ΔA_{max} (3,4) от степени замещения 2,4-D в агглютинаторе 2,4-D-ПАА для M2-с-Ат с концентрацией антител 15 (1, 3) и 25 (2, 4) мкг/мг полимера (а); Зависимость скорости реакции ингибирования латексной агглютинации $\Delta A/\text{мин}$ (1,2) и ΔA_{max} (3,4) от концентрации свободного 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., 90 нг/мл) (6) ($n=3, cv<10\%$).

Следует отметить, что для всех микроструктур в реакции с 2,4-D-ПАА при степени замещения 2,5 % мол. 2,4-D получены более высокие скорости реакции $\Delta A/\text{мин}$, чем с 2,4-D-OVA (90 нг/мл), но значения ΔA_{max} ниже (Рис. III.17а). Увеличение степени замещения 2,4-D в агглютинаторе до 10 % мол. приводило к замедлению реакции почти в два раза, при этом ΔA_{max} падала с 0,34 до 0,2 при наибольшей концентрации Ат (25 мкг/мг полимера) в микроструктуре М2-с-Ат, для которой характерны более высокие скорости и предельное значение оптического поглощения, чем при концентрации Ат 15 мкг/мг полимера.

Реакцию ингибирования с целью определения гаптена 2,4-D проводили при участии агглютинаторов, имеющих оптимальные показатели в РЛА с М2-с-Ат (25 мкг/мл): 2,4-D-OVA (140 нг/мл) и 2,4-D-ПАА (2,5% замещения, 90 нг/мл). М2-с-Ат смешивали со свободным 2,4-D, выдерживали при комнатной температуре, затем добавляли агглютинатор и регистрировали изменение оптического поглощения. 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. III.17б). [149][352]

Таким образом, проведенные исследования показали, что спектрофотометрия является простым и быстрым методом при изучении кинетики реакции латексной агглютинации.

III.1.3. Микроструктуры на основе органо-неорганических частиц

В последние годы особое внимание привлекают гибридные частицы, состоящие из органических и неорганических материалов. С одной стороны, наноразмерные неорганические частицы (НЧ) характеризуются уникальными электрическими, магнитными, оптическими и др. свойствами. С другой стороны, полимеры также участвуют в управлении свойствами НЧ, например, нивелируют дефекты поверхности НЧ, придают дополнительную функциональность, предохраняют от воздействия окружающей среды. Таким образом, создание композиций НЧ с полимерными частицами позволяет получать новые материалы с особыми свойствами. [26][122]

Наиболее перспективными НЧ для решения задач биотехнологии и биомедицины являются фотолуминесцентные наночастицы, которые наряду со специфическими

индивидуальными свойствами характеризуются интенсивным сигналом флуоресценции, уникальными 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). В «Обзоре литературы» подробно рассмотрены свойства данных НЧ. Следует только отметить, что оба типа НЧ синтезируют в среде органических растворителей, поэтому существует сложность получения коллоидно-устойчивых водных суспензий НЧ. Кроме того, отсутствие биофункциональной поверхности существенно ограничивает их применение в биоприложениях, поэтому актуальной задачей является разработка способов модификации поверхности НЧ. Одним из путей создания биосовместимых реагентов на основе КТ является их адсорбция на поверхность или включение в полимерную матрицу частиц дисперсий.

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

Существуют различные способы получения гибридных частиц, включающих КТ и ПЧ. Одним из перспективных методов является включение КТ в полимерную матрицу, которое может быть реализовано как в процессе синтеза, так и путем введения в уже сформированные полимерные частицы. Несмотря на привлекательность получения органо-неорганических частиц на стадии синтеза, это является сложным, многоступенчатым и трудоемким процессом. Кроме того, при проведении полимеризации в присутствии КТ не удается получить достаточно коллоидно-стабильные, интенсивно флуоресцирующие частицы, а также сложно контролировать их свойства и размеры. Поэтому в данной работе для формирования гибридных частиц использовали метод введения КТ в готовые ПЧ после их набухания в смеси органических растворителей.

Использовали квантовые точки со структурой ядро/оболочка CdSe/ZnS, стабилизированные в процессе синтеза триоктилфосфиноксидом (ТОФО), которые были получены по методике, описанной в работе. [353] 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 с длиной волны 480 нм ($\lambda_{возб.}$).

Для введения гидрофобных частиц в сформированные полимерные частицы необходимо повышать сродство между НЧ и полимером. Для этого проводили набухание частиц в растворителе, который, как и концентрацию вводимых КТ, выбирали из

предположения, что все квантовые точки должны быть инкапсулированы и равномерно распределены по объему ПЧ без изменения свойств их поверхности. Известно, что при включении гидрофобной метки необходимо использовать растворитель с низкой растворимостью в воде, приводящий к набуханию частиц полимера. [354] Был протестирован ряд растворителей и их смесей при различном соотношении, как описано в «Экспериментальной части». После инкубации полимерных частиц в растворителях измеряли размер частиц (растворитель не должен приводить к уменьшению размера, формированию агрегатов и неограниченному набуханию) и проверяли коллоидную стабильность (в случае стабильных частиц наблюдалась гомогенная суспензия, а в случае нестабильных частиц формировались агрегаты). Квантовые точки суспендировали в хлороформе, удаляли избыток ТОФО путем интенсивного смешивания с метанолом с последующим центрифугированием, затем переводили в растворители и их смеси из списка, использованных для полимерных частиц, затем КТ вводили в набухшие ПЧ. Интенсивный флуоресцентный сигнал, узкое распределение по размерам, увеличение диаметра частиц менее, чем на 30% и коллоидная стабильность позволили выбрать смесь растворителей пропанол-2 : хлороформ при соотношении 10:1 для включения КТ в полимерные частицы.

КТ вводили в полиакролеин-содержащие частицы, полученные в процессе полимеризации **M1** и **M2**. Получены коллоидно- и химически стабильные ПЧ с высокой интенсивностью флуоресценции, близкой к интенсивности флуоресценции исходных КТ, подготовленных для инкапсуляции (**Рис. III.18a, 19a**). Следует отметить, что при хранении отмечено усиление флуоресценции, которое, вероятно, связано со структурными изменениями полимерных цепей в полимерной матрице, вызванной процедурой набухания. Известно, что при удалении избытка стабилизатора ТОФО оболочка ZnS может быть повреждена растворителем, в результате чего появляются поверхностные излучающие состояния нанокристалла квантовых точек, которые вызывают тушение флуоресценции. При введении КТ в полимерную матрицу вокруг них образуется полимерная оболочка, которая, вероятно, устраняет каналы тушения флуоресценции на поверхности КТ, т.е. наблюдается эффект пассивации поверхности КТ. [355] Формирование оболочки происходит во времени, что связано с постепенными конформационными изменениями полимерных цепей при полном удалении растворителя из объема частицы. В результате через месяц наблюдалось повышение интенсивности флуоресценции. [356] Этот процесс можно рассматривать как «созревание» частиц, который обычно продолжался в течение месяца.

Предполагали, что самая высокая интенсивность флуоресценции будет получена у полиакролеиновых частиц **M1** благодаря более «рыхлой» структуре по сравнению с сополимерными частицами **M2**, что облегчает включение КТ. Однако максимальной флуоресценцией обладали частицы **M2**, синтезируемые при соотношении акролеин:стирол, 1:1 (**Рис. III.18а**).

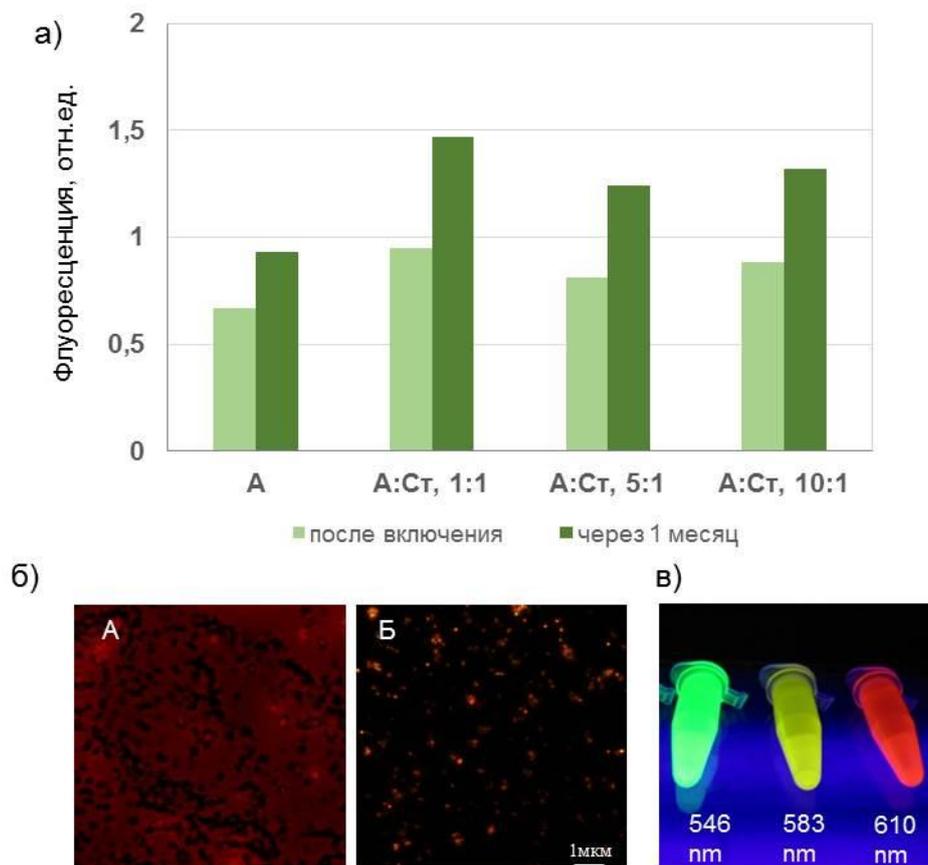


Рисунок III.18. Нормированная интенсивность флуоресценции частиц к интенсивности свободных КТ на примере включения КТ с $\lambda_{эм} = 546$ нм в частицы **M1** (осадительная полимеризация акролеина, **A**), частицы **M2** на основе сополимера акролеин-стирол, **A:Ст,1:1** и **A:Ст, 10:1** (**а**); Флуоресцентные изображения полимерных частиц после включения КТ в частицы **M1** (**A**) и сополимерные частицы **M2** (акролеин-стирол, 10:1) (**Б**) (× 100) (**б**). Флуоресцентное изображение дисперсий полимерных частиц, наполненных КТ с разной эмиссией (**в**).

Для получения дополнительной информации о флуоресцентных свойствах частиц использовали флуоресцентную лазерную микроскопию. После нанесения частиц на кремниевые подложки и высушивания флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и мощностью не более 0.01 мВт. Как видно (**Рис. III.18б**, изображение **A**), для частиц **M1** с включенными КТ зафиксирована неспецифическая фоновая флуоресценция в местах, свободных от частиц. Вероятно, в процессе включения КТ в частицы **M1**

происходит захват КТ олигомерными молекулами, которые сопровождают процесс синтеза полиакролеина и могут дрейфовать из объема частицы в дисперсионную среду. В результате десорбции олигомеров с КТ из частиц снижается интенсивность флуоресценции и наблюдается фон. Поэтому дальнейшее исследование свойств частиц М1-КТ не проводили.

Отметим, что сополимерные частицы М2 с КТ выгодно отличались от М1, поскольку у всех частиц отсутствовала фоновая флуоресценция участков подложки, свободных от частиц (Рис. III.186, изображение Б). Это свидетельствует о практически полном включении КТ в частицы, которое не сопровождается десорбцией олигомеров, содержащих КТ, в дисперсионную среду. [355]

Отмечено смещение максимума излучения КТ, включенных в сополимерные частицы М2, в синюю область спектра на 4–18 нм в зависимости от состава полимера и параметров КТ (Рис. III.196). Наибольший сдвиг по сравнению с исходными КТ зарегистрирован для частиц, полученных при соотношении акролеин : стирол = 1:1 и КТ с $\lambda_{эм} = 583$ нм. Положение и ширина максимума флуоресценции инкапсулированных КТ не изменялись в течение года. Кроме того, при введении КТ наблюдалось незначительное снижение интенсивности флуоресценции, которая возрастала в течение месяца (Рис. III.19а).

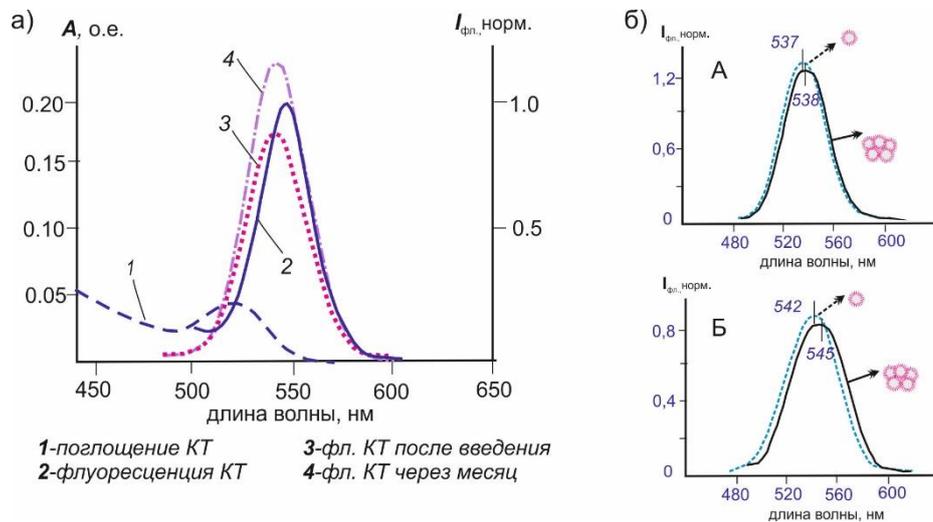


Рисунок III.19. Спектры поглощения и флуоресценции КТ с $\lambda_{эм} = 546$ нм, нормализованные спектры флуоресценции КТ сразу и через месяц после включения в полимерные частицы М2 при соотношении акролеин: стирол, 1:1 (а); Спектры флуоресценции агрегатов и отдельных частиц М2, содержащих КТ (диаметр 2.7 нм, $\lambda_{эм} = 546$ нм), полученных при соотношении акролеин: стирол 1:1 (А) и 10:1 (Б).

Смещение максимума эмиссии КТ, вероятно, не связано с изменением диэлектрической проницаемости окружающей среды или уменьшением расстояния между КТ, поскольку это приводит к усилению взаимодействия между ними [212] и, как следствие, к уширению пика эмиссии КТ и его смещению в красную область. [357][358] Наиболее вероятной причиной смещения максимума флуоресценции является реорганизация поверхности КТ, связанная с постепенным формированием полимерной оболочки. В результате происходит пассивация поверхности КТ и подавление каналов тушения флуоресценции. [356] Необходимо отметить, что время затухания флуоресценции КТ в полимерных частицах превышает время затухания в водном растворе (**Таблица III.10**). Это означает, что интенсивность флуоресценции КТ в полимерной матрице выше, чем в растворе. [355]

Таблица III.10.

Флуоресцентные свойства водной суспензии КТ (диаметр 2.7 нм, максимум поглощения при длине волны 525 нм) и полимерных частиц **M2**, содержащих КТ.

	КТ в хлороформе	Водная суспензия КТ	Частицы M2 при соотношении мономеров акролеин:стирол	
			1:1	10:1
Максимум флуоресценции ($\lambda_{эм}$), нм	546	546	537	542
Среднее время затухания флуоресценции, нс	19	11.1	18.9	12.8

Исследование флуоресценции отдельных частиц и их агрегатов, высаженных на кремниевую подложку, показало, что агрегация приводит к незначительному смещению пика флуоресценции в красную область. Например, при соотношении мономеров акролеин : стирол, 10:1 величина смещения максимальна и составляет 2–4 нм (**Рис. III.19б** график Б), а при соотношении 1:1 – не превышает 2 нм (**Рис. III.19б**, график А). Эти данные и отсутствие уширения пика флуоресценции указывают на то, что КТ глубоко проникают в полимерные частицы. В результате наблюдается либо незначительный, либо вовсе отсутствует перенос энергии между КТ, включенными в разные частицы. [355]

Таким образом, получены гибридные органо-неорганические частицы на основе сополимеров акролеина со стиролом **M2**, содержащие КТ. 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

Высокая интенсивность флуоресценции, уникальная фотостабильность, возможность в широких пределах варьировать цвет флуоресценции при использовании одного источника возбуждения определяют перспективы применения частиц **M2** с включенными КТ в биотехнологии и биомедицине. Условием применения полученных частиц в этих приложениях является возможность создания микроструктур с биофункциональными молекулами.

Для оценки свойств гибридных частиц при их использовании в качестве носителей биомолекул в составе микроструктур, прежде всего, необходимо исследовать характер взаимодействия частиц с биомолекулами, которые в большинстве случаев имеют белковую природу. Формирование ковалентной связи частица-биомолекула происходит благодаря взаимодействию поверхностных альдегидных групп сополимерных частиц **M2** и первичных аминогрупп биомолекул через образование основания Шиффа. Известно [37], что полиакролеин-содержащие частицы не являются пористыми, поэтому только альдегидные группы на поверхности могут участвовать в реакции с аминогруппами биомолекул. Условия и эффективность данной реакции оценивали по взаимодействию частиц с модельным белком бычьим сывороточным альбумином (БСА), добавленным к дисперсии частиц в диапазоне концентраций 0,5-4 мг на 1 г полимера.

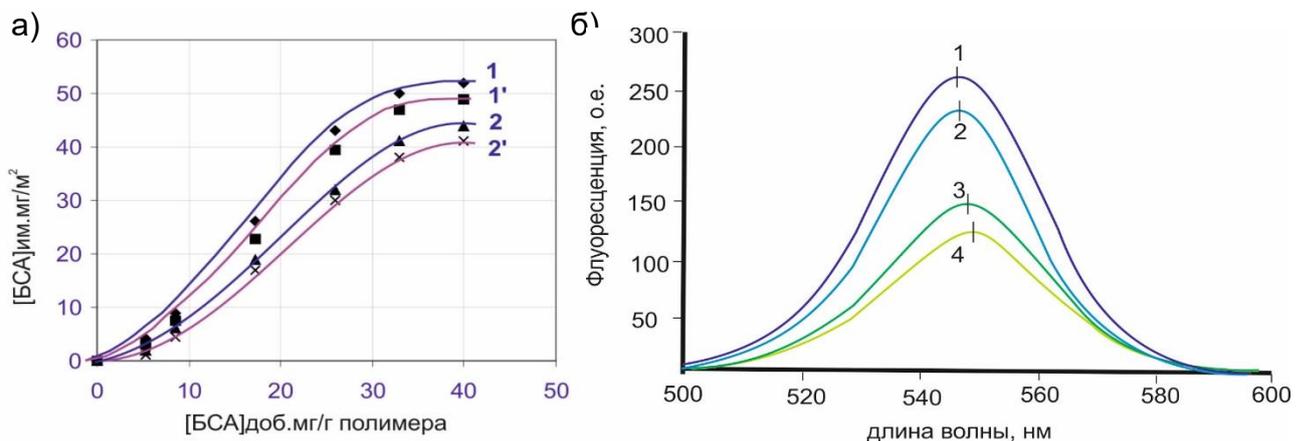


Рисунок 3.20. Концентрация иммобилизованного БСА на частицах полимера в зависимости от добавленного БСА в Na-боратном буфере, pH 8,2 для частиц **M2** с акролеин:стирол, 1:1 (1) и **M2** с акролеин:стирол, 10: 1 (2); те же частицы, содержащие КТ ($\lambda_{эм}=546$ нм) (1') и (2'), соответственно (а); Спектры флуоресценции частиц **M2** с акролеин:стирол, 1:1, содержащие КТ ($\lambda_{эм}=546$ нм) в воде (1) и их конъюгаты с антителами анти-*Y.pestis* в различных буферах: Na-боратный буфер, pH 8,2 (2), Na-фосфатный буфер, pH 7,2 (3) и PBS, pH 7,2 (4) (б).

Найдено, что количество присоединенного белка возрастает с увеличением концентрации добавленного белка, пока не достигается плато (**Рис. III.20а**). Плато, вероятно, соответствует ситуации, когда прикрепленный белок полностью покрывает поверхность частиц и отсутствует вакантное место для избыточного количества белковых молекул. Следует отметить, что при добавлении одинакового количества белка концентрация иммобилизованного белка после инкубации выше для частиц с более низким содержанием полиакролеина, т.е. в данном случае для частиц **M2**, полученных при соотношении акролеин:стирол, 1:1 (**Рис. III.20а**). Этот эффект можно объяснить многоточечным характером взаимодействия белковых молекул с альдегидными группами акролеина на поверхности частиц. На начальном этапе молекулы белка располагаются на поверхности частиц с максимальным контактом и формированием многоточечных взаимодействий, что может вызывать денатурацию молекулы белка. В результате площадь поверхности, занимаемая белком, увеличивается. При повышении содержания полиакролеина в составе сополимерных частиц возрастает количество точек взаимодействия (т.е. увеличивается площадь контакта), что ограничивает иммобилизацию белка в больших концентрациях. Важно отметить, что включение КТ в ПЧ, практически, не влияет на характер процесса иммобилизации белка, что указывает на отсутствие существенных изменений в свойствах поверхности частиц. [359]

Важным фактором эффективной иммобилизации биомолекул при создании микроструктур является буферная система, в которой проводят реакцию. Буфер выбирают исходя из необходимости сохранения коллоидной стабильности дисперсий ПЧ, а также учитывая изоэлектрическую точку (pI) белковых молекул, поскольку присоединение проходит легче в среде со значением pH, близким к pI белка. [37] Исследовали влияние различных буферов (Na-фосфатный буфер, pH 7,2; PBS, pH 7,2; Na-боратный буфер, pH 8,2) на флуоресцентные свойства частиц **M2** (акролеин-стирол, 1:1), содержащих КТ с $\lambda_{эм.} = 546$ нм, при иммобилизации антител F-19 (10 мкг на 1 г полимера, pI $\approx 7,5$) к антигену F-1 *Y.pestis*. При проведении конъюгации частиц с антителами в Na-боратном буфере, pH 8,2 интенсивность флуоресценции практически не изменялась, а в других буферах - была почти в два раза ниже (**Рис. III.20б**). Кроме того, в Na-боратном буфере не наблюдалось сдвига пика эмиссии в красную область, в отличие от других буферов. Следовательно, Na-боратный буфер, pH 8,2. является предпочтительной средой для иммобилизации F-19 антител на частицы **M2**, допированные КТ. [355]

Проведенные исследования позволили получить микроstructures на основе частиц **M2** и проиллюстрировать их применение в реакции латексной агглютинации и для визуализации клеточных рецепторов, как представлено на схеме (Рис. III.21).[359]

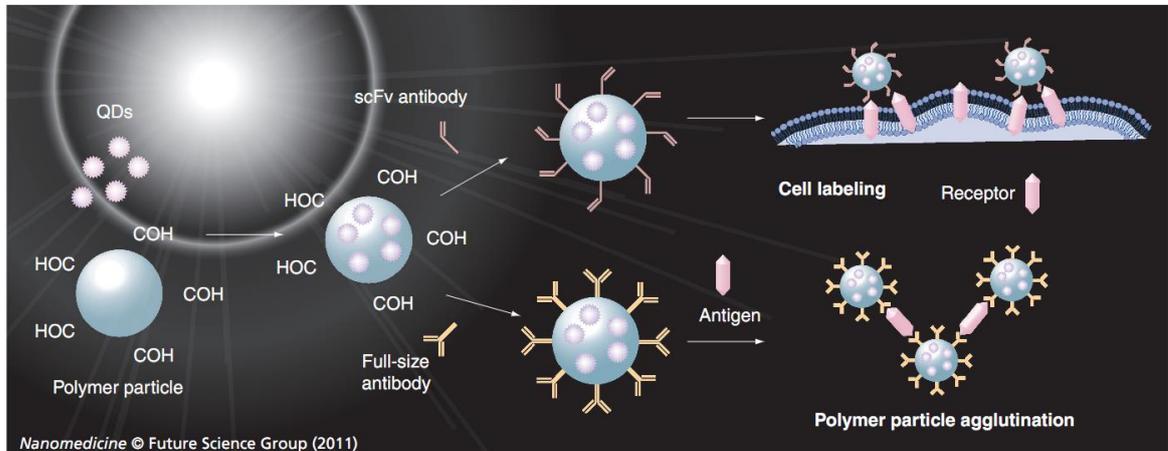


Рисунок III.21. Схема реакции агглютинации и визуализации клеточных рецепторов с использованием частиц сополимерных **M2**, наполненных КТ.[359]

Для простого, чувствительного метода иммуноанализа, каким является реакция латексной агглютинации, проводимая в 96-луночных микропланшетах с U-образным дном, предпочтительно использовать ПЧ с диаметром более 0,5 мкм. Этим требованиям отвечают частицы **M2** (акролеин-стирол, 1:1), содержащие КТ с $\lambda_{эм.} = 583$ нм. Микроstructures получали путем формирования ковалентной связи между альдегидными группами частиц и аминогруппами полноразмерных антител F-19 к антигену F-1 *Y.pestis* в Na-боратном буфере, pH 8,2. Концентрация добавленных антител составляла от 1 до 20 мкг на 1 г полимера. Реакцию с антигеном F-1 проводили, как описано в п. III.2.1, и через 3 часа учитывали результаты при облучении УФ-светом (Рис. III.22). В качестве негативного контроля использовали нормальную кроличью сыворотку.

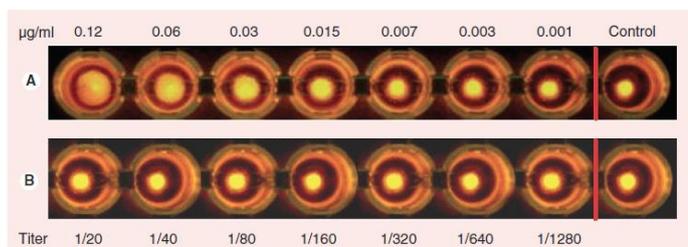


Рисунок III.22. Реакция латексной агглютинации (УФ-изображение). (А) Положительная реакция агглютинации. В лунке: конъюгаты частиц **M2** при соотношении акролеин-стирол, 1: 1), содержащие КТ ($\lambda_{эм.} = 583$ нм) с антителами против *Y. pestis* (6 мкг/г полимера) и антигеном *Y. pestis* (в первой лунке 0,12 мкг/мл). (В) Отрицательная реакция агглютинации.

В лунке: конъюгаты частиц M2 при соотношении акролеин-стирол, 1: 1, содержащие КТ ($\lambda_{эм.} = 583$ нм), с антителами против *Y. pestis* и нормальная кроличья сыворотка (в первой лунке разведение 1:20).

Минимальная определяемая концентрация антигена в данном анализе составила 15 нг/мл (при концентрации антител F1 6 мкг/г полимера), которая незначительно превышает концентрацию антигена, детектируемую в иммуноферментном анализе (~ 5 нг / мл). [360] Однако реакция латексной агглютинации с использованием гибридных частиц проходит быстрее (одностадийный процесс, время анализа 2 -3 ч.) и является менее трудоемкой процедурой. Таким образом, показана перспективность использования микроструктур с полноразмерными антителами на основе частиц сополимера акролеина со стиролом **M2**, содержащих КТ, для визуализации иммунохимических биоспецифических реакций.

В анализе, основанном на визуализации клеточных рецепторов, необходимо использовать частицы, которые легко отличить от других объектов на поверхности клетки. Кроме того, диаметр частиц не должен превышать 0.25 мкм при четко регистрируемом сигнале и коллоидной стабильности в процессе подготовки образцов. [15] Данным требованиям соответствуют частицы **M2**, синтезированные при соотношении акролеин:стирол, 10:1, содержащие КТ с $\lambda_{эм.} = 610$ нм, и имеющие диаметр 0.15 мкм. На основе данных частиц были получены микроструктуры путем конъюгации с мини-антителами 4D5scFv для мечения онкомаркера HER2/neu, гиперэкспрессируемого целым рядом опухолевых клеток (например, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака желудка). [361]

Полимерные частицы можно легко конъюгировать с одноцепочечными антителами формата scFv, представляющими собой единый полипептид, в котором переменные домены легких и тяжелых цепей иммуноглобулина соединены при помощи пептидного линкера. Такие антитела сохраняют специфичность и эффективность соответствующих полноразмерных антител, но в отличие от них имеют небольшой размер, легко нарабатываются в бактериальных продуцентах и высоко стабильны. [359] Однако scFv являются моновалентными антителами, что считается их существенным недостатком, который можно устранить путем конъюгации с частицами. Такой подход обеспечивает многоточечное связывание с рецепторами клеточной мембраны и позволяет использовать полученные микроструктуры для визуализации рецепторов *in vitro*. [362]

Полученными микроструктурами с различными концентрациями миниантител (1,5 и 6,8 мкг на 1г полимера) обрабатывали HER2/neu-положительные клетки аденокарциномы

яичника человека SKOV-3. В результате наблюдали характерную флуоресценцию клеток, которая коррелировала с концентрацией иммобилизованных антител (**Рис. III.23**).

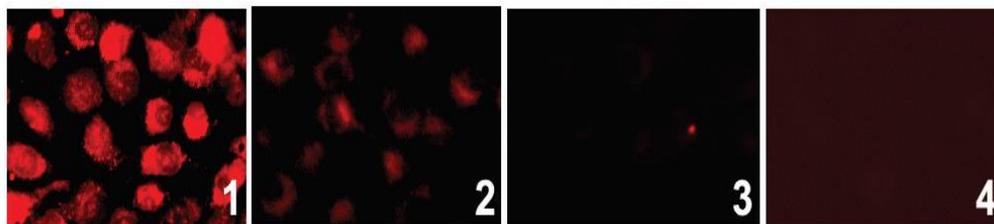


Рисунок III.23. Флуоресцентные микрофотографии клеток SKOV-3, меченные частицами **M2** (акролеин:стирол, 10:1), содержащими КТ ($\lambda_{эм} = 610$ нм) и конъюгированными с рекомбинантными антителами 4D5scFv с концентрациями: 6,8 мкг/г полимера (**1**); 1,5 мкг/г полимера (**2**). Отрицательный контроль: клетки SKOV-3, меченные частицами **M2** (акролеин:стирол, 10:1), содержащими КТ ($\lambda_{эм} = 610$ нм) и конъюгированными с овальбумином (**3**); контрольные клетки HeLa, экспрессирующие недетектируемое количество рецептора HER2/neu (**4**).

При инкубации клеток SKOV-3 с микроструктурами на основе гибридных частиц **M2**, конъюгированных с овальбумином (6,8 мкг/г полимера) (**Рис. III.23, 3**), а также после обработки клеток HeLa с недетектируемым количеством HER2/neu микроструктурами с 4D5scFv, флуоресцентного сигнала от клеток зарегистрировано не было (**Рис. III.23, 4**). Это свидетельствует о специфичности реакции микроструктур, содержащих антитела 4D5scFv, с рецептором клеточной мембраны HER2/neu. [359]

Таким образом, получены гибридные микроструктуры, содержащие на поверхности миниантитела, способные к многоточечному связыванию с антигеном клеточной поверхности (например, рецептором HER2/neu). Это позволяет использовать полимерные частицы в качестве «скаффолдов» миниантител, которые имеют большие перспективы для решения задач биовизуализации.

III.1.3.2. Гибридные микроструктуры со стимул-зависимой флуоресценцией

Микроструктуры с рН-чувствительной флуоресценцией

Одним из подходов для получения биосовместимых проб КТ является создание гибридных частиц за счет адсорбции КТ на поверхности полимерных частиц. Это может быть реализовано при контролируемой ассоциации органических ПЧ и неорганических НЧ, так называемой гетерокоагуляции. [14] Основной движущей силой гетерокоагуляции, является электростатическое притяжение. В этом случае частицы должны иметь противоположные заряды. Необходимо также учитывать влияние сил отталкивания со

стороны уже адсорбированных НЧ, что является причиной формирования только монослоя частиц на поверхности. Одним из вариантов гетерокоагуляции за счет электростатического притяжения является адсорбция НЧ в составе полиэлектролитного комплекса (ПЭК) на поверхности ПЧ (англ. layer-by-layer technique, LbL). В этом случае количество неорганических частиц можно легко контролировать количеством последовательных циклов адсорбции и получать покрытие, отличное от монослоя (см. «Обзор литературы»). Кроме того, этот метод не требует сложных химических реакций, а основан на процессе самосборки, позволяет легко получить биофункционализированную поверхность. Таким образом, использование данного метода дает возможность приготовить микроструктуры, содержащие КТ в непосредственной близости к поверхности, что позволяет регистрировать изменение флуоресценции при незначительном изменении условий окружения, таких как pH.

В данной работе микроструктуры с функциональными полимерами и КТ получали на основе частиц **М1**, синтезированных методом осадительной полимеризации акролеина в присутствии 0.2% NH_3 . Частицы имели диаметр 1.1 мкм и концентрацию альдегидных групп 2.7 мкм/м². Как известно, альдегидные группы могут вступать в реакцию Канниццаро с образованием гидроксильной и карбоксильной групп. [40] Частичное протекание этой реакции на поверхности частиц определяет появление отрицательного дзета-потенциала, значение которого составляло -28,9 мВ. Отрицательный заряд поверхности и наличие поверхностных альдегидных групп позволяет осаждать на поверхность в качестве первого слоя полиэлектролит поли-L-лизин (ПЛ) с изменением заряда на положительное значение +23,5 мВ. Следующий, отрицательно заряженный слой, формировали из Na-соли полистиролсульфоната (ПСС). Таким образом были нанесены два первых ПЭК (ПЛ/ПСС) и слой из ПЛ. Этот подход позволил получить однородную, положительно заряженную поверхность, необходимую для дальнейшей адсорбции КТ. Схема на **Рис. III.24** демонстрирует стратегию осаждения ПЭК и КТ. [363]

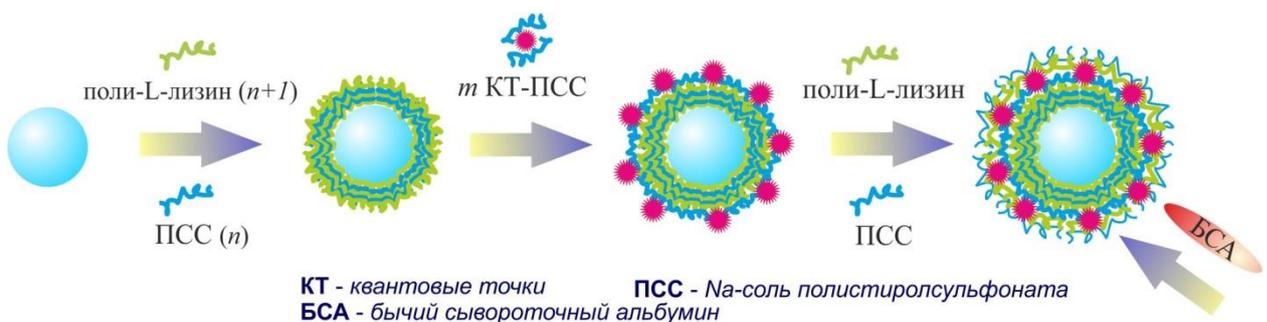


Рисунок III.24. Схема получения полиакролеиновых частиц **М1**, содержащих КТ, методом последовательной адсорбции полиэлектролитов.

Для включения КТ в ПЭК необходимо повысить сродство между полиэлектролитами и гидрофобными КТ, а также гидрофилизировать их таким образом, чтобы заряд КТ приводил к электростатическим взаимодействиям с полиэлектролитами. Для этих целей использовали гидроксид тетраметиламмония (ТМАГ), который способствует переводу НЧ из органической в водную среду. [364] Реакция частичного удаления стабилизатора ТОФО с поверхности КТ при участии ТМАГ приводила к образованию отрицательно заряженных КТ. В **Таблице III.11** приведены оптические и коллоидные характеристики гидрофилизированных КТ.

Таблице III.11.

Оптические и коллоидные характеристики гидрофилизированных КТ (гидрофобные КТ-ТОФО в хлороформе: $\lambda_{эм} = 550$ нм, $\lambda_{погл} = 525$ нм, $d = 3,5$ нм).

	$\lambda_{эм}$, нм	$\lambda_{погл.}$, нм	Интенсивность флуоресценции, о.е.	Диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ
КТ-ТМАГ	554	525	25,3	$7 \pm 0,7$	-10
КТ-ТМАГ-ПСС	555	523	59,8	$5 \pm 0,3$	-24

Максимум эмиссии КТ в результате гидрофизации был смещен в красную область спектра примерно на 4 нм, при этом полуширина пика практически не претерпела изменений (**Таблица III.11, Рис. III.25а**). Относительно небольшие изменения в положении пика эмиссии и отсутствие агрегатов позволяют считать, что смещение связано с изменением свойств среды при гидрофизации. [365] Однако недостаточная коллоидная устойчивость КТ в водной среде требовала дополнительной стабилизации. С этой целью использовали ПСС, который выполнял роль не только стабилизатора, но и слоя полиэлектролита, адсорбируемого на поверхность ПЧ. После добавления ПСС наблюдалось изменение положения максимума эмиссии, а также пик поглощения КТ-ТМАГ-ПСС смещался в синюю область на 2 нм (**Таблица III.11**). Эти сдвиги отмечены во всех реакциях по замене стабилизатора, указывающих на образование новых структур. [195]

Участие ПСС в качестве стабилизатора приводило к повышению интенсивности флуоресценции, что, вероятно, связано с пассивацией поверхности КТ. Полуширина максимума флуоресценции составляла 27 нм, что соответствует узкому распределению КТ по размерам (**Рис. III.25а**). Следует отметить, что КТ, гидрофилизированные при участии ТМАГ и стабилизированные ПСС, сохраняли коллоидную устойчивость в течение месяца. Стабилизация с помощью ПСС позволила ввести гидрофилизированные КТ в положительно заряженный слой полиэлектролита на поверхности частиц **М1**. В результате были получены

интенсивно флуоресцирующие ПЧ (**Рис. III.26**). 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 квантовыми точками в одном ПЭК (**Рис. III.25б**).

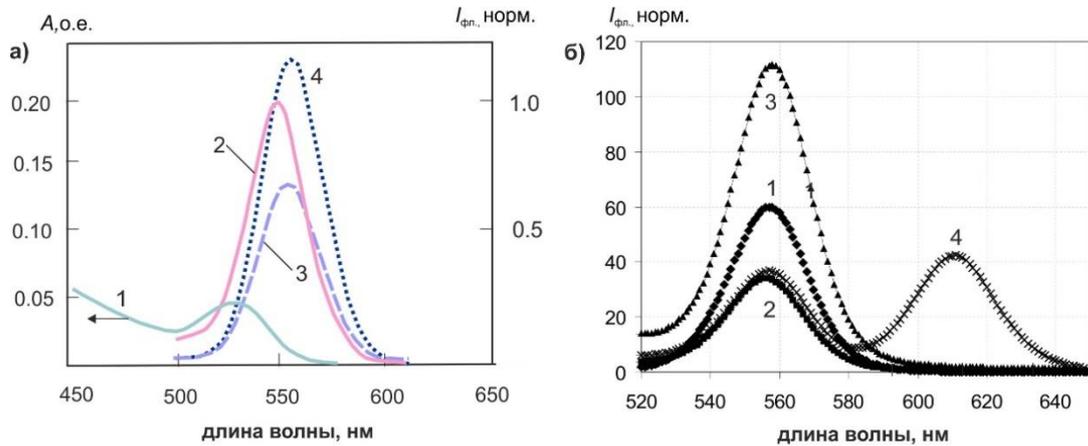


Рисунок III.25. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) КТ ($\lambda_{эм} = 550$ нм) в хлороформе, спектры флуоресценции КТ, модифицированных ТМАГ (3), а также ТМАГ и ПСС (4) (а); спектры флуоресценции КТ ($\lambda_{эм} = 550$ нм) с ТМАГ (1), частиц **М1**, содержащих КТ в одном (2) и в двух слоях полиэлектролита (3), а также частиц **М1**, содержащих КТ с $\lambda_{эм} = 550$ и 610 нм в различных слоях полиэлектролита (4) (б).

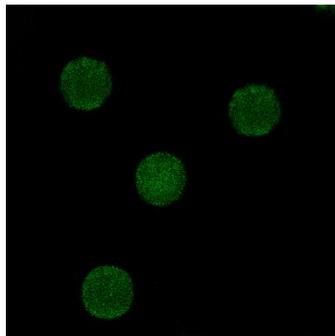


Рисунок III.26. Флуоресцентное изображение с конфокального микроскопа полимерных частиц **М1**, содержащих КТ в полиэлектролитных слоях.

Метод послойной адсорбции также позволяет создавать полимерные частицы с многоцветной флуоресценцией. Получены частицы **М1**, содержащие КТ с $\lambda_{эм} = 610$ и 550 нм в третьем и в четвертом слоях полиэлектролита в соотношении 1:1, соответственно. В этом случае флуоресцентный сигнал характеризовался узкими пиками, высота которых была практически пропорциональна количеству введенных КТ (**Рис. III.25б**).

Внешний полиэлектролитный слой определяет необходимые функциональные свойства ПЧ для их применения в биоанализе. Например, этот слой может быть образован молекулами белков или полипептидов, и они будут определять свойства ПЧ. Известно, что молекулы белка – слабые полиэлектролиты с характерной изоэлектрической точкой pI . Степень ионизации слабых полиэлектролитов очень чувствительна к изменению pH , в то время как сильные полиэлектролиты остаются полностью заряженными независимо от pH . [13] На образование комплекса белок–полиэлектролит влияет заряд белка, конформация и гибкость цепи белка, плотность заряда и конформация цепи полиэлектролита. [366] На примерах различных белков было показано, что внешняя оболочка, которая формируется за счет комплексообразования полианиона ПСС и белка, определяет интенсивность флуоресценции полимерных частиц (**Таблица III.12**). Характер этого взаимодействия влияет на пассивацию поверхности квантовых точек и, как следствие, на интенсивность флуоресценции.

Таблица III.12.

Влияние различных белков и полипептида на интенсивность флуоресценции частиц **M1**, содержащих КТ в слоях полиэлектролитов на поверхности.

Белок	pI	Мм, кДа	Отн. изменение флуоресценции.
-	-	-	1
БСА	4.9	67	2.1
желатин	4.8	60	1.2
трипсин	10.8	24	1.1
Полипептид	pK_a		
poly-L-lysine	10.5	120	1.5

Стоит отметить, что не только электростатические взаимодействия и масса белка (например, БСА и желатин имеют одинаковый pI и молекулярную массу), но и молекулярные параметры (такие как конформация, гибкость цепи, которые существенно зависят от линейной плотности заряда цепи) оказывают влияние на образование комплекса белок-полиэлектролит и, следовательно, на интенсивность флуоресценции. [366]

Из литературы известно [367][368], что при повышении pH возрастает интенсивность флуоресценции КТ, при этом значительное влияние на эту зависимость оказывают молекулы, модифицирующие поверхность КТ. Исследованы флуоресцентные свойства КТ после их гидрофиллизации при участии ТМАГ и ПСС, а также частиц **M1**, содержащих КТ, в зависимости от изменения pH на каждой стадии подготовки.

Найдено, что флуоресценция, как индивидуальных гидрофильных КТ, так и КТ, включенных в слои полиэлектролитов на поверхности частиц, чувствительна к рН в диапазоне 5,3-8,2 (**Рис. III.27**) с максимальной интенсивностью флуоресценции при рН 8,2. Наибольшее тушение флуоресценции КТ-ТМАГ наблюдалось при рН 7,4, а при стабилизации ПСС этот эффект наблюдался при рН 5,3. Включение КТ-ТМАГ-ПСС в ПЭК на поверхности частиц **М1** приводило к максимальному снижению флуоресценции при рН 7,4, а при формировании внешнего слоя из БСА на поверхности этих частиц максимальное тушение было отмечено при рН 5,3. Кроме того, разница между сигналами флуоресценции при различных рН увеличилась после всех модификаций.

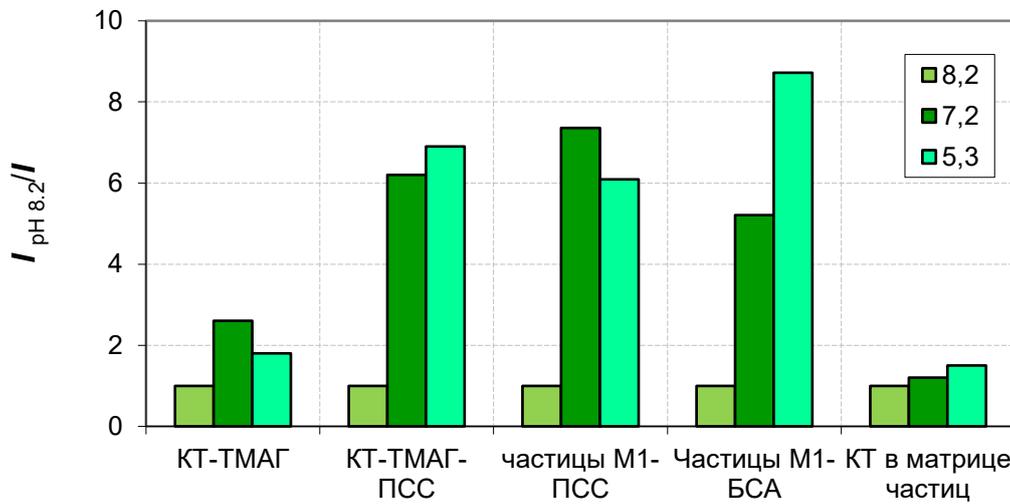


Рисунок III.27. Относительное изменение интенсивности флуоресценции КТ и частиц **М1**, содержащих КТ, на каждой стадии подготовки, представленное как отношение $I_{\text{pH } 8.2}/I$, где $I_{\text{pH } 8.2}$ – интенсивность флуоресценции при рН 8,2, I – интенсивность флуоресценции при текущем рН.

Изменение флуоресценции модифицированных КТ, вероятно, может быть объяснено пассивацией их поверхности. В данной работе полиэлектролиты рассматривали как пассивирующие агенты КТ, поэтому любые изменения конформации влияли на интенсивность флуоресценции КТ. Известно, что конформация сильного полиэлектролита зависит от рН, поскольку противоположно заряженные ионы (например, ионы буферной соли) экранируют электростатические взаимодействия в молекуле. [369] Таким образом, в случае КТ-ТМАГ-ПСС сильное взаимодействие ТМАГ-ПСС и, следовательно, более компактная структура ПСС формировалась при низком рН 5,3 (**Рис. III.27**). Эта компактная структура приводила к дефектам при пассивации поверхности КТ и, следовательно, наблюдалось значительное тушение флуоресценции. При включении модифицированных

КТ в ПЭК на поверхности частиц **М1** взаимодействие слоя поли-L-лизина и ПСС изменяло конформацию ПСС, что влияло на пассивацию КТ, и максимальное тушение флуоресценции наблюдалось при рН 7.4. В случае использования БСА в качестве внешнего слоя формировался комплекс с ПСС, который характеризовался более сильными электростатическими взаимодействиями при низком рН. Следствием этого явилось образование комплекса ПСС-БСА с компактной структурой. Эта компактизация, вероятно, ухудшила пассивацию КТ, что снизило интенсивность флуоресценции при рН 5.3. Следует отметить, что флуоресценция полимерных частиц, содержащих БСА в качестве внешнего слоя, обратимо восстанавливалась после замены буфера с рН 5,3 на буфер с рН 8,2.

Таким образом, метод последовательной адсорбции полиэлектролитов на поверхность частиц **М1** позволяет ввести КТ в непосредственной близости к поверхности и получить дисперсии частиц, обладающие рН-чувствительной флуоресценцией. Такие частицы имеют большой потенциал для использования в качестве рН-метра на наноуровне, например, для измерения рН в клетке.

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, и, следовательно, вызывают изменение интенсивности флуоресценции КТ. [13]

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 селективностью 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, что продемонстрировано на **Рис. III.28** с концентрацией от 0,1 до 40 мкМ и в **Таблице III.13** с максимальной концентрацией 100 мкМ. Этот эффект, вероятно, объясняется появлением дефектов при пассивации поверхности КТ полиэлектролитами, связанный с образованием комплекса Cu^{2+} -БСА-полианион. [370]

Не было отмечено смещения пиков флуоресценции ни в красную, ни в синюю области спектра для всех использованных катионов. Кроме того, добавление ионов к

полимерным частицам, которые не имели внешнего покрытия из БСА, практически не влияло на флуоресценцию КТ в полиэлектролитных слоях (Таблица III.13).

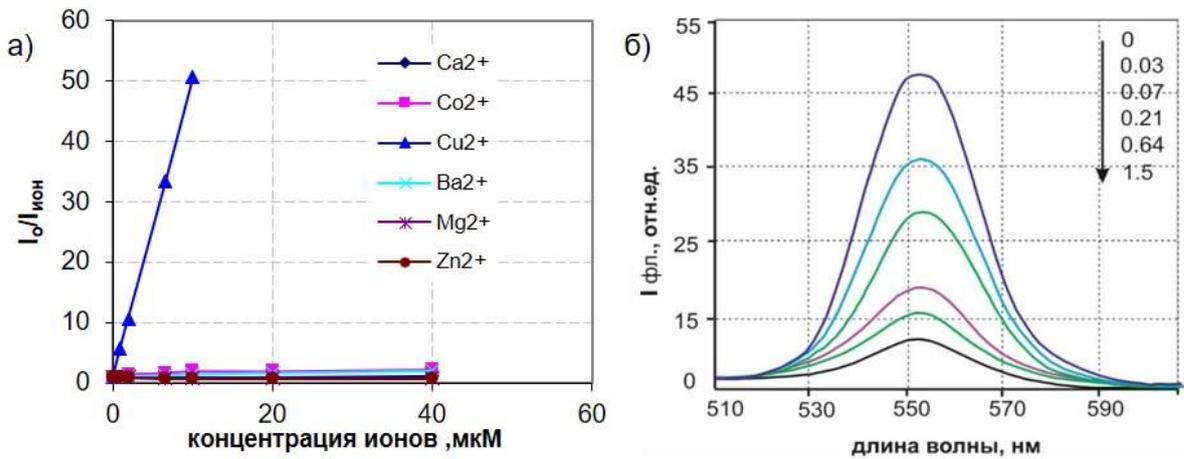


Рисунок III.28. Изменение интенсивности флуоресценции $I_0/I_{\text{ион}}$ (I_0 –интенсивность флуоресценции частиц **M1** с внешним слоем БСА, $I_{\text{ион}}$ –интенсивность флуоресценции тех же частиц после добавления ионов) (а); Интенсивность флуоресценции частиц **M1** с внешним слоем БСА, содержащих на поверхности КТ в ПЭК, при добавлении ионов Cu^{2+} (мкМ) (б).

Таблице III.13.

Изменение интенсивности флуоресценции полимерных частиц без и с БСА после добавления ионов (макс. концентрация), представленная в виде отношения $I_0/I_{\text{ион}}$.

Ион (II),	Концентрация, мкМ	$I_0/I_{\text{ион}}$ частиц с внешним БСА	$I_0/I_{\text{ион}}$ частиц с внешним ПСС
Cu	10	50,6	1.8
Zn	100	0.81	1.32
Ca	100	1.4	1.01
Ba	100	1.2	1.12
Co	100	2.5	1.4
Mg	100	0.85	1.02

На основании полученных результатов разработан биосенсор для количественного определения ионов меди (II) с использованием полимерных частиц **M1**, содержащих во внешнем слое БСА. Как видно из данных, приведенных на **Рис. III.28б**, наличие следовых количеств ионов меди (II) в образце приводило к тушению флуоресценции. Максимум эмиссии значительно уменьшался без сдвига в красную область при повышении концентрации Cu^{2+} , что свидетельствует об отсутствии агрегатов КТ в слоях полиэлектролитов при добавлении ионов меди. Кроме того, не зарегистрировано смещения

максимума эмиссии в синюю область спектра, которое может быть вызвано заменой поверхностных ионов Cd^{2+} ионами Cu^{2+} у КТ. [371] С учетом положения пика эмиссии можно сделать предположение, что тушение флуоресценции является результатом повреждений в пассивации поверхностных состояний КТ.

Предел обнаружения был рассчитан по критерию, представленному в номенклатуре ИЮПАК, как концентрация Cu^{2+} , при которой зарегистрировано максимальное тушение флуоресценции с учетом трех стандартных отклонений (SD) исходного сигнала. Минимальная детектируемая концентрация Cu^{2+} для данной оптической системы составила 15 нМ (SD=1.8), что сопоставимо с результатами, полученными для индивидуальных КТ, модифицированных БСА (10 нМ) [371]

Эффект специфического тушения флуоресценции ионами меди, вероятно, связан с различной аффинностью и способностью молекулы БСА координировать ионы двухвалентных металлов, несмотря на одинаковые заряды. [372] Эти различия влияют на конформацию и гибкость молекулы БСА таким образом, что комплекс БСА– Cu^{2+} по сравнению с комплексами с другими ионами, вероятно, представляет собой более жесткую компактную структуру, которая приводит к разрушению пассивирующего покрытия на поверхности КТ. В результате происходит значительное тушение флуоресценции. Кроме того, в присутствии меди (II) образуется более плотноупакованный комплекс БСА – ПСС, чем в отсутствие ионов этого металла [373], что также вызывает повреждения в пассивирующей оболочке, вызывая более сильное тушение флуоресценции КТ.

Таким образом, микроstructures на основе частиц полиакролеина **M1**, содержащие КТ в ПЭК на поверхности и имеющие БСА в качестве внешнего слоя, могут быть использованы в качестве биосенсора для чувствительного и селективного обнаружения ионов Cu^{2+} .

Микроstructures с термочувствительной флуоресценцией

Точные измерения температуры с высокой степенью разрешения являются одним из основных направлений современных исследований, в которых необходимо учитывать не только размер объекта, но и использовать материалы с новыми физическими свойствами; это связано со значительным изменением всех физико-химических и термодинамических параметров на наноуровне. В этой связи большой интерес представляет получение микроstructures на основе полимерных частиц, чья флуоресценция зависит от температуры окружения. Такие микроstructures могут выступать в качестве биосенсоров для фиксации

изменения температуры по интенсивности флуоресценции при протекании биореакций в нанообъеме.

В данной работе были получены термочувствительные микроstructures в виде дисперсий ПЧ, состоящих из полимерной матрицы, покрытой термочувствительным полимером с включенными КТ. На **Рис. III.29** приведена схема получения микроstructures с термочувствительной флуоресценцией.

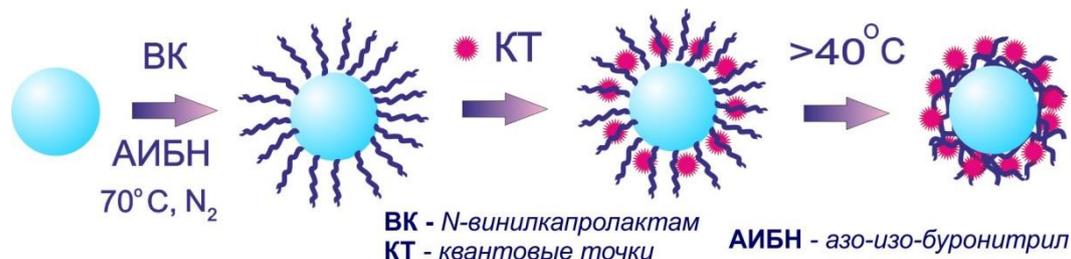
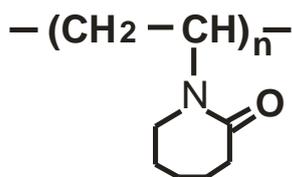


Рисунок III.29. Схема получения термочувствительных полимерных частиц на основе частиц **M2** (акролеин-стирол, 10:1) с термочувствительным полимером поли-*N*-винилкапролактамом на поверхности, в который включены КТ.

Диаметр полимерной частицы в составе микроstructures задавали в процессе полимеризации за счет выбора способа синтеза, варьирования условий и состава исходной реакционной смеси. Интенсивность флуоресценции КТ в таких микроstructures определялась расстоянием между КТ. [374] 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 полимерных клубков. В этих условиях КТ сближались, и в результате происходило тушение флуоресценции. [13]

В качестве полимерной матрицы использовали сополимерные частицы **M2**, синтезированные при мольном соотношении акролеин:стирол, 10:1 ($d=150$ нм).



поли-N-винилкапролактан

Термочувствительную оболочку получали из поли-*N*-винилкапролактама (ПВК), водные растворы которого характеризуются нижней критической температурой растворения в области температур функционирования живых систем (32°C). [375]

Проводили оценку влияния различных факторов, таких как соотношение между затравочными частицами и *N*-винилкапролактамом (ВК) (1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:1, и 1:1,5 мас.),

время полимеризации (1, 2, и 3 часа), природа дисперсионной среды (вода, вода-метанол или вода-пропанол-2), тип инициатора (водорастворимый персульфат калия, маслорастворимый АИБН), для оптимизации условий получения термочувствительной оболочки. В результате модификацию поверхности полимерных микросфер проводили в процессе радикальной затравочной полимеризации мономера N-винилкапролактама после набухания 1% дисперсии частиц **M2** в 0.2% спиртовом растворе инициатора азо-изо-бутиронитрила (АИБН) и мономера (ВК) (**M2**: ВК = 1:0.5). В этом случае была реализована прививочная полимеризация ВК за счет остаточных двойных связей полиакролеина. Данный подход позволяет получать термочувствительные микроstructures практически без образования частиц ПВК в реакционном объеме. [94]

Модификацию сополимерных частиц **M2** ПВК подтверждали данными ИК-Фурье спектроскопии (**Рис. III.30а**, спектр 2), а именно появлением пика при длине волны 1650 см^{-1} , характерного для $-\text{C}=\text{O}$ амидной группы ВК. [376] Полученные микроstructures оставались коллоидно-стабильными в течение года и не агрегировали в электролите (0,15М NaCl). Эта стабильность сохранялась при высоких температурах несмотря на то, что слой ПВК сжимался и гидрофобность микроstructures увеличивалась.

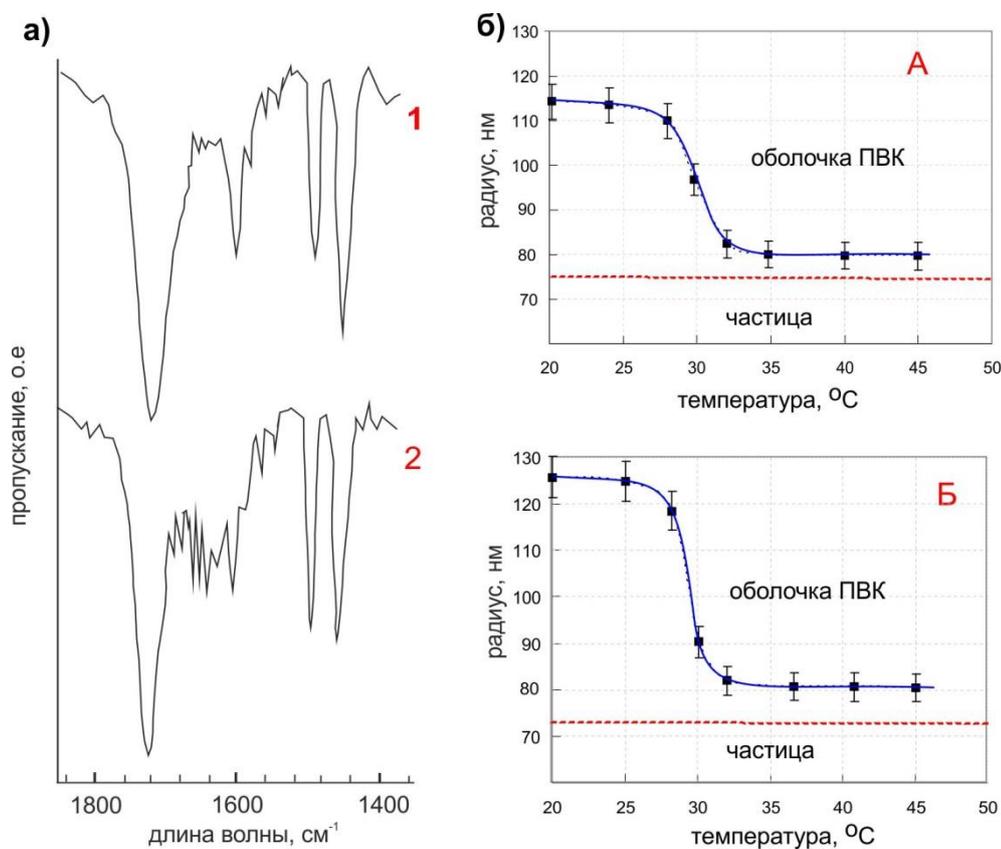


Рисунок III.30. ИК-Фурье спектры полимерных частиц **M2**, полученных при соотношении акролеин:стирол, 10:1 (1) и тех же частиц, модифицированных ПВК (2) (**а**); Температурная

зависимость гидродинамического радиуса термочувствительных микроструктур без КТ (А) и с включенными КТ (Б) (б).

Термочувствительные свойства микроструктур с ПВК оценивали по характеру изменения их гидродинамического радиуса при повышении температуры в диапазоне 20–50°C (Рис. III.30б). При нагревании до 29°C постепенно уменьшался радиус, который значительно изменялся при достижении температуры 32°C (Рис. III.30б, график А). Этот эффект связан со сжатием слоя ПВК при достижении НКТР. [13]

В микроструктуры включали КТ с максимумом эмиссии на длине волны 555 нм в смеси растворителей хлороформ-пропанол-2, 1:20 после удаления стабилизатора ТОФО. В результате этого подхода получены микроструктуры, интенсивно флуоресцирующие в зеленой области спектра. При этом введение КТ практически не повлияло на термочувствительные свойства микроструктур (Рис. III.30б, график Б). Интенсивность флуоресценции термочувствительных микроструктур почти в четыре раза превосходила интенсивность флуоресценции частиц, в которые КТ были включены в процессе набухания частиц в растворителе, которые были получены в п.Ш.1.3.1 (Рис. III.31а). 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 приводило к уменьшению интенсивности флуоресценции термочувствительных микроструктур. Интересен тот факт, что после практически полной седиментации (за 8 часов) нагревание дисперсии приводило к агрегации частиц (Рис. III.31б и в), вызванной повышением гидрофобности их поверхности.

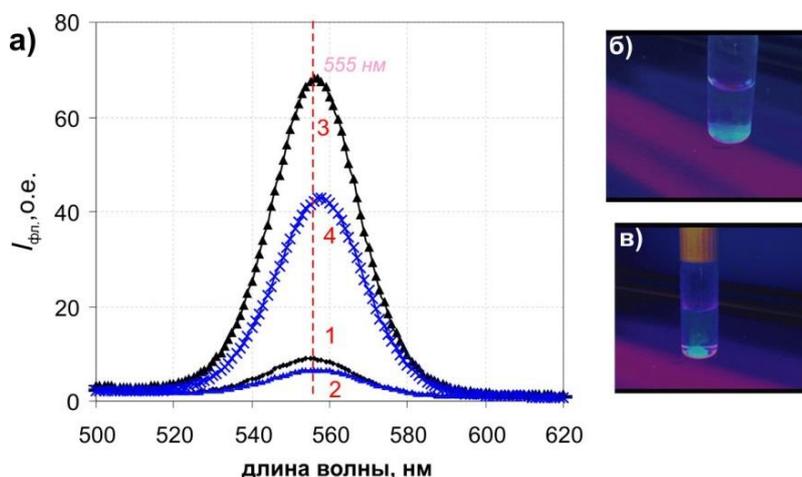


Рисунок III.31. Спектры флуоресценции микроструктур на основе частиц М2 с включенными КТ, немодифицированных ПВК, при 25 (1) и 40°C (2), а также модифицированных ПВК при 25 (3) и 40°C (4) (а); Изображения в УФ-свете дисперсий микроструктур после их седиментации при 25 (б) и 40°C (в) (б).

Флуоресценцию термочувствительных микроструктур исследовали в циклах нагревание–охлаждение в интервале 25–40°С (Рис. III.32 а, б). Изменение флуоресценции имело обратимый характер, демонстрируя незначительное смещение в каждом температурном цикле (20 мин). Рис. III.32в показывает зависимость интенсивности флуоресценции в цикле нагрев-охлаждение от времени, как динамическую характеристику микроструктур. Максимальное снижение интенсивности флуоресценции образца, содержащего 0,1 мг частиц, происходило в течение 5 минут после начала нагревания от 25 до 40° С. Затем флуоресценция оставалась неизменной при 40° С в течение, как минимум, 30 мин. При остывании образца интенсивность восстанавливалась до начального значения в течение 5 минут.

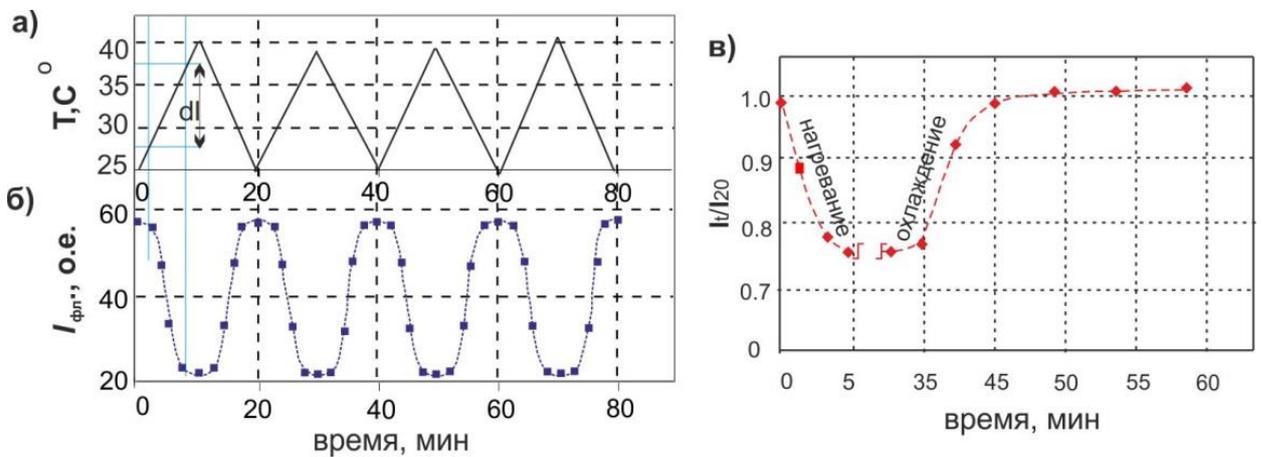


Рисунок III.32. Изменение температуры дисперсии микроструктур в циклах нагревание–охлаждение от 25° до 40°С (а) и соответствующие изменения интенсивности флуоресценции (б); зависимость интенсивности флуоресценции от времени нагревания (40°С) и охлаждения (25°С), представленная в виде отношения текущей интенсивности флуоресценции к начальной при 25 °С (I_{25}) (в).

Обратимость изменения флуоресценции в цикле нагревание–охлаждение, вероятно, связана с конформационными изменениями молекул ПВК. При нагревании происходит дегидратация ПВК, что выражается в сжатии слоя ПВК на поверхности частиц, и, как следствие, приводит к уменьшению их размеров. В этом случае уменьшается расстояние между включенными КТ, что является причиной тушения флуоресценции, поскольку, согласно литературным данным [377], именно расстояние между КТ влияет на флуоресценцию в тонких полимерных пленках, в качестве которой в данном случае выступает слой ПВК на поверхности частиц. Кроме того, максимум флуоресценции смещается в красную область спектра, что также свидетельствует об уменьшении расстояния между КТ и усилении взаимодействия между ними. [378] При охлаждении цепи

ПВК разворачиваются, расстояние между КТ увеличивается и интенсивность флуоресценции возвращается к исходной величине.

Таким образом, микроstructures на основе сополимерных частиц **M2**, покрытых слоем термочувствительного полимера, содержащего КТ, характеризуются обратимой термочувствительной флуоресценцией, что открывает широкие перспективы для использования таких материалов в качестве нанотермометров, например, для изучения температурных характеристик нано- и микробиообъектов [13].

Применение микроstructures с термочувствительной флуоресценцией в биоанализе

Большинство биоаналитических методов проводят при участии конъюгатов частиц с биомолекулами, способными вступать в биоспецифические реакции. Для использования полученных микроstructures в биоанализе, прежде всего, необходимо подобрать условия получения стабильных конъюгатов, сохраняющих свои флуоресцентные и термочувствительные свойства, при иммобилизации белковых молекул (пептидов, ферментов, антител и т.д.) на поверхности частиц. В данном случае иммобилизация может быть осуществлена за счет способности ПВК формировать комплексы с белковыми молекулами посредством образования водородных связей между карбонильной группой ПВК и карбоксильными или аминогруппами белков. [375]

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 микроstructures белком происходило при достижении концентрации БСА 10 мг/г полимера (**Рис.Ш.33а**).

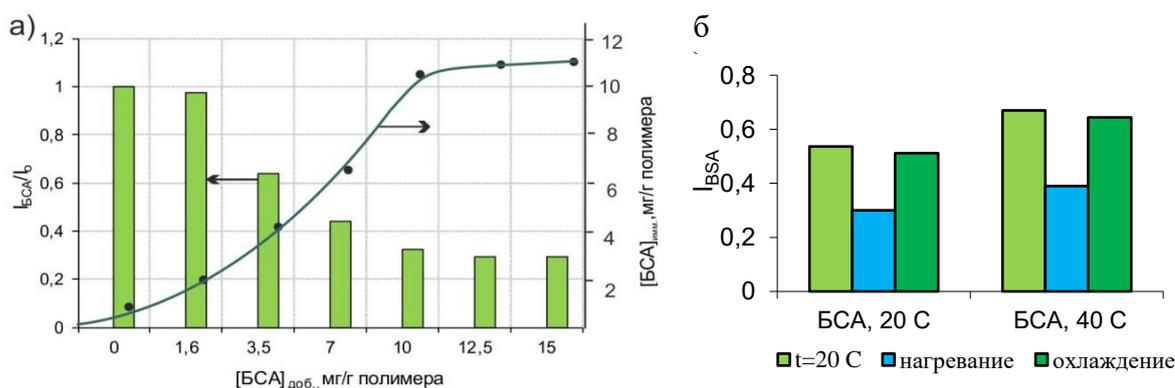


Рисунок Ш.33. Зависимость концентрации БСА, иммобилизованного на микроstructures, и относительной интенсивности флуоресценции от концентрации добавленного БСА (**а**), а также изменение интенсивности флуоресценции микроstructures в цикле нагревание–охлаждение после иммобилизации БСА (**б**). БСА иммобилизовали при 20° или 40° С в

течение 1 ч. I_0 и $I_{\text{БСА}}$ – начальная и текущая (после иммобилизации БСА) интенсивность флуоресценции микроструктур.

Флуоресценция уменьшалась при добавлении БСА в концентрации до 10 мг/г полимера, после которой видимых изменений флуоресценции не наблюдалось (**Рис. III.33а**). По-видимому, до насыщения поверхности микроструктур молекулами БСА происходит образование таких комплексов с ПВК, которые ухудшают пассивацию поверхности КТ. После насыщения поверхности БСА (10 мг/г полимера), конформация комплекса с ПВК и, как следствие, флуоресценция, практически, не изменялась. Кроме того, иммобилизация БСА не оказывала влияния на термочувствительные свойства: при достижении НКТР (32°C) гидродинамический радиус микросфер уменьшался на 45 нм.

Максимальное количество иммобилизованного белка было зарегистрировано после инкубации частиц с белком при 40°C в течение часа, что, вероятно, связано со сжатием слоя ПВК и захватом молекул БСА при нагревании таким образом, что охлаждение и связанное с ним расширение слоя ПВК не приводило к удалению БСА с поверхности микросфер. Флуоресценция падала, однако, это снижение было в 1.5 раза ниже, чем при иммобилизации, проводимой при комнатной температуре (**Рис. III.33б**). После цикла нагревание–охлаждение отмечено практически полное восстановление флуоресценции микроструктур с БСА. Таким образом, оптимальные условия формирования конъюгатов термочувствительных микроструктур с белковыми молекулами позволяют их использовать в различных биоаналитических приложениях.

Микроструктуры на основе частиц **M2** с термочувствительной флуоресценцией применяли для разработки методики мониторинга протекания экзотермических реакций на примере ферментативного гидролиза белка (БСА) в присутствии трипсина (**Рис. III.34а**) и реакции химической сшивки хитозана при участии диглицидилового эфира бутандиола в качестве сшивающего агента в присутствии полиэтиленгликоля (**Рис. III.34б**). Мониторинг проводили флуориметрически при возбуждении светом на длине волны 488 нм, используя **Рис. III.32а** и **б** для сопоставления изменения интенсивности флуоресценции со значением температуры.

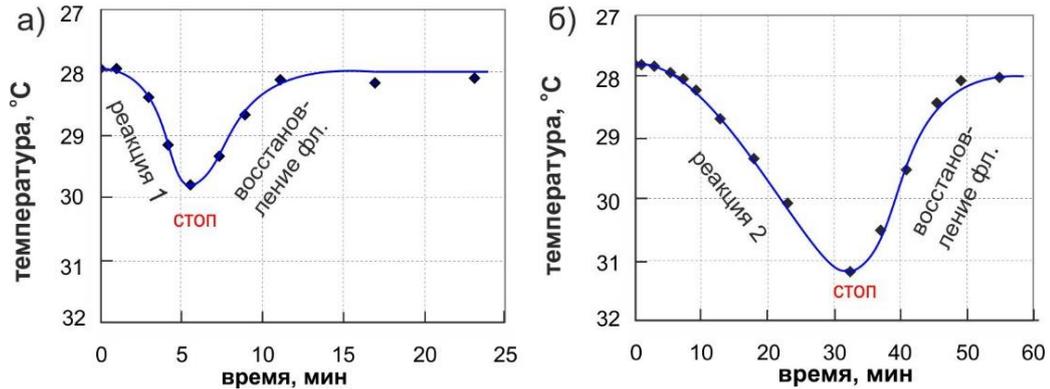


Рисунок III.34. Изменение температуры по данным флуоресценции термочувствительных микроструктур в процессе ферментативного гидролиза БСА (а) и химической сшивки хитозана (б).

При экзотермической реакции ферментативного гидролиза БСА интенсивность флуоресценции микроструктур снижалась в течение 5 мин, что сопровождалось повышением температуры на 2°C. После этого флуоресценция возрастала практически до исходного уровня. Известно, что большинство ферментативных реакций являются экзотермическими и продолжаются в течение 5–10 минут. [379] Таким образом, можно полагать, что наблюдаемое снижение флуоресценции связано с выделением тепла во время реакции, при этом по завершении реакции флуоресценция была почти полностью восстановлена. Реакцию проводили в кварцевой кювете в 2 мл Трис-буфера (pH 7,8), содержащем 0,5 мг/мл БСА и 0,005% дисперсии **M2**. Трипсин добавляли до концентрации 0,01 мг/мл.

Реакция сшивки хитозана имеет большое значение для получения пленок [380], используемых для биомедицинских целей. Качество готовых пленок во многом зависит от точного определения момента завершения реакции сшивки, что позволяет нанести на подложку и получить равномерно сшитую пленку, обладающую требуемыми химико-физическими и механическими свойствами. Реакцию проводили в кварцевой кювете в 2 мл PBS (pH 7,2), содержащего 0,05% хитозана, 0,005% ПЭГ (Мм = 4000 Да) и 0,005% дисперсии **M2**. Диглицидиловый эфир бутандиола добавляли до концентрации 0,05%.

В обоих случаях наблюдали одинаковые закономерности изменения температуры (интенсивности флуоресценции), однако, в случае второй реакции время до момента прекращения уменьшения интенсивности флуоресценции было в два раза больше, и, следовательно, реакционная смесь нагревалась сильнее (**Рис. III.34б**). Это позволило сделать вывод о большем тепловом эффекте второй реакции. После завершения реакции

охлаждение образцов проходило одинаково, что подтверждается одинаковым наклоном на графиках изменения температуры микроструктур (получены на основании измерения флуоресценции по **Рис. III.32а,б**) и ее восстановлением до первоначальных значений. Таким образом показано, что использование полимерных микроструктур с термочувствительной флуоресценцией позволяет детектировать изменение температуры в процессе реакции с точностью до $\sim 0.1^\circ\text{C}$.

III.1.3.3. Гибридные полимерные частицы, содержащие апконвертирующие нанофосфоры

В последнее время большой интерес наряду с КТ вызывают наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией, известные также как апконвертирующие нанофосфоры (НАФ), которые являются перспективными метками для решения задач оптической визуализации тканей в живом организме. В этих НЧ реализуется эффект апконверсии, заключающийся в преобразовании низкоэнергетических фотонов в фотоны более высокой энергии за счет протекания нелинейных оптических процессов. В работе использовали НАФ на основе Na-тетрафторидной матрицы, допированной ионами иттербия и эрбия ($\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$) со средним размером 41 ± 3 нм (**Рис. III.36б**). Для возбуждения флуоресценции НАФ, в отличие от КТ, используют спектрально выгодный источник с длиной волны возбуждения (975 нм) из “окна прозрачности” биоткани, который обеспечивает глубокое проникновение света с минимальным поглощением и рассеянием. [381]

НАФ обычно синтезируют в среде органических растворителей с использованием олеиновой кислоты в качестве стабилизатора. Это определяет гидрофобные свойства НАФ и ограничивает применение в биоанализе. В «Обзоре литературы» представлены различные способы модификации, позволяющие получать коллоидно-стабильные водные дисперсии НАФ с функционализированной поверхностью. Одним из таких способов является включение НАФ в частицы полимерных дисперсий. В литературе отсутствуют сообщения о таком способе, но известно, что его используют для гидрофилизации и функционализации ряда других НЧ, как представлено в данной работе на примере введения КТ в п. III.1.3.1. КТ инкапсулировали в предварительно полученные полимерные частицы после их набухания в соответствующем растворителе. Этот подход обеспечивал получение агрегативно-устойчивых полимерсодержащих водных дисперсий КТ с сохранением их фотофизических свойств. Размер наночастиц НАФ на порядок превосходит размер КТ, что, как показали наши предварительные эксперименты, приводит к стерическим затруднениям

при введении, а также ненадежному закреплению в полимерной матрице, влекущему за собой дрейф НАФ в дисперсионную среду.

Для решения проблемы удержания НАФ в полимерной матрице, предложена новая концепция синтеза, при которой полимеризация инициируется гидрофилизированными НАФ при их введении на стадии синтеза. В результате НАФ формируют связи с полимерной матрицей в процессе полимеризации *in situ*, что дает возможность получить дисперсии гибридных субмикронных ПЧ, содержащих хорошо изолированные от внешнего окружения НАФ, которые способны взаимодействовать с биомолекулами. Для введения НАФ на стадии синтеза необходимо, прежде всего, разработать подход, обеспечивающий сродство НАФ к растущим полимерным цепям и поступление НАФ в зону роста ПЧ.

Разработанный подход представлен на схеме (Рис. III.35). НАФ 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 полимеризации). Для повышения химической стабильности полимерных частиц проводили дополнительную реакцию сшивки с использованием персульфата калия, как описано в п. III.1.1.1 (2-ая стадия полимеризации).



Рисунок III.35. Схема осадительной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде в присутствии НАФ и при участии ТМАГ в качестве гидрофилизующего агента и инициатора полимеризации.

Увеличение химической совместимости 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 [363], благодаря частичному удалению олеиновой кислоты с поверхности НАФ. В процессе синтеза для стабилизации НАФ была использована олеиновая кислота, которая химически адсорбируется за счет формирования координационной связи между СОО-группой кислоты и ионами лантанидов на поверхности НАФ [280]. F. Yan и соавт. [382] сообщают, что частичное удаление олеиновой

кислоты с поверхности (продемонстрировано на НЧ магнетита) уменьшает гидрофобность и позволяет синтезировать полимерные частицы с контролируемым содержанием НЧ. В данной работе для гидрофилизации НАФ за счет частичного удаления олеиновой кислоты использовали ТМАГ. Результаты гидрофилизации подтверждали ИК-Фурье спектроскопией исходного образца НАФ, НАФ, гидрофилизированных при участии ТМАГ, с последующей очисткой образцов водой и раствором вода-этанол (20:1, об.) (Рис. III.36а). Раствор вода-этанол использовали для очистки, поскольку олеиновая кислота практически нерастворима в воде и может оставаться в образцах после водной промывки.

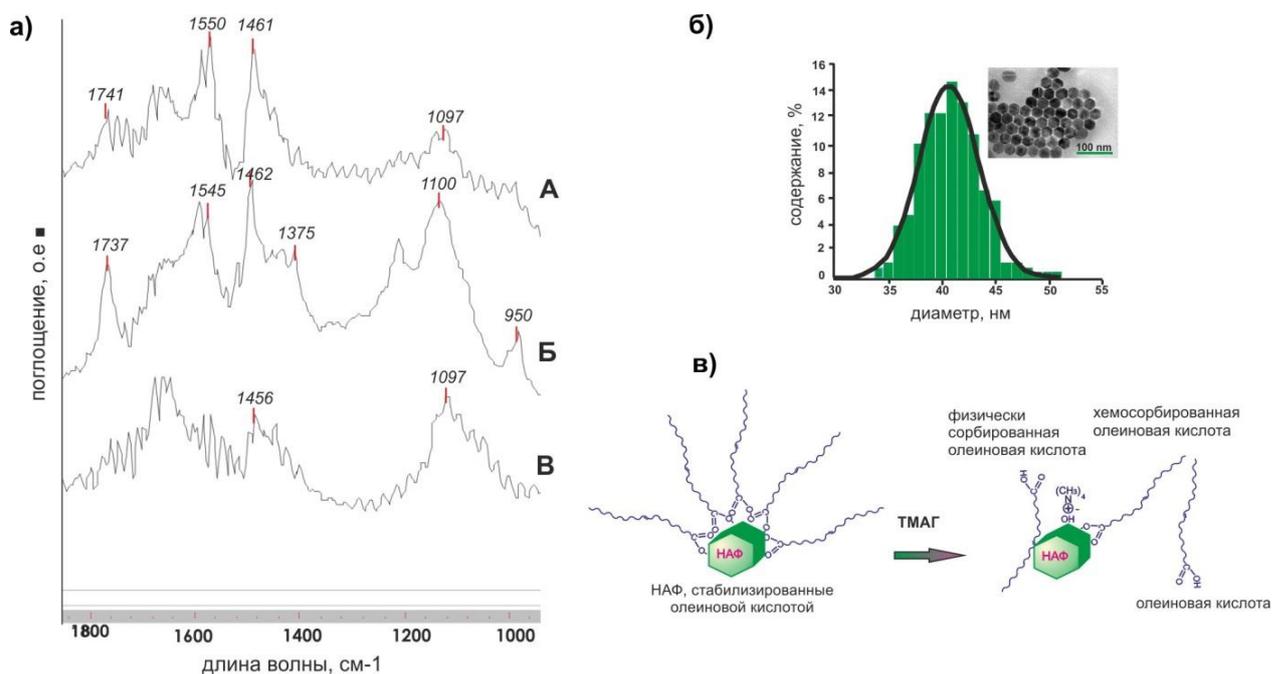


Рисунок III.36. ИК-Фурье спектры образцов НАФ (А), НАФ, гидрофилизированных с помощью гидроксида тетраметиламмония, после очистки дистиллированной водой (Б) и водно-спиртовым раствором (В) (а); гистограмма распределения по размерам и ПЭМ-изображение наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ (б); схема гидрофилизации НАФ с использованием гидроксида тетраметиламмония (в).

В ИК-Фурье спектрах исходного образца НАФ (Рис. III.36а, спектр А) и НАФ, гидрофилизированного с помощью ТМАГ и отмытого водой (спектр Б), совпадают полосы поглощения при 1461 и 1545 см⁻¹, относящиеся к асимметричным и симметричным валентным колебаниям $-\text{COO}-$, соответственно. В спектре Б появляется интенсивная полоса при 1737 см⁻¹, которая относится к группе $-\text{C}=\text{O}$ олеиновой кислоты. Однако эта полоса не регистрируется в гидрофилизированном образце НАФ, для очистки которого использовали водно-спиртовой раствор (спектр В), что свидетельствует об удалении

олеиновой кислоты с поверхности НАФ. Это также подтверждает отсутствие полосы при 1545 см^{-1} и уменьшение интенсивности полосы при 1461 см^{-1} .

На основании полученных данных можно предположить, что взаимодействие НАФ с ТМАГ протекает, как представлено на схеме (**Рис. III.36в**). ТМАГ частично удаляет с поверхности НАФ координационно связанную олеиновую кислоту, что приводит к гидрофилизации поверхности и получению водных дисперсий НАФ, коллоидная стабильность которых поддерживается ионами ТМАГ. Кроме того, гидрофилизированные образцы НАФ содержат остаточные молекулы олеиновой кислоты, которые частично физически адсорбированы на поверхности НАФ за счет действия межмолекулярных сил (сил Ван дер Ваальса, водородных, гидрофобных). Молекулы олеиновой кислоты не удаляются водой из объема, но от них можно очистить пробы, используя водно-органическую смесь.

Найдено, что при использовании ТМАГ в качестве инициатора в осадительной полимеризации без добавления НЧ конверсия акролеина составляла более 90%, в отличие от полимеризации в присутствии щелочи, где выход был 45% (**Рис. III.37а**). Такой эффект, вероятно, вызван формированием нестабильных олигомерных продуктов при использовании ТМАГ, которые практически в полном объеме коллапсируют и осаждаются на формирующиеся ПЧ, что может быть связано с присутствием иона $\text{N}^+(\text{CH}_3)_4$. В результате растет выход высокомолекулярного продукта. В случае использования щелочи образуются более стабильные олигомеры, которые могут оставаться в дисперсионной среде, что приводит к снижению выхода полимера.

Возможность ТМАГ инициировать полимеризацию акролеина использовали для получения гибридных частиц в присутствии НАФ, гидрофилизированных при участии ТМАГ, в диапазоне концентраций НАФ 0,1-1,5 мас.% в расчете на мономер (**Рис. III.37**). Как видно, использование ТМАГ в составе гидрофилизированных НАФ привело к высоким выходам полимера (**Рис. III.37а**), который снижался с увеличением концентрации НАФ. Такая зависимость, вероятно, вызвана снижением концентрации ионов OH^- в дисперсионной среде в связи с их адсорбцией на большей площади поверхности НАФ с ростом их концентрации в реакционной смеси. Адсорбцию гидроксил-ионов подтверждали с использованием ИК-Фурье спектроскопии. На спектре НАФ-ТМАГ (**Рис. III.36а**, спектр Б) появляется полоса при 950 см^{-1} , относящаяся к асимметричному колебанию -C-N [383], которая отсутствует у немодифицированных НАФ (спектр А). Кроме того, пики при длинах волн 1375 и 1100 см^{-1} , характерные для деформационных колебаний -OH подтверждают адсорбцию OH^- на поверхности НАФ. В результате роль гидроксил-ионов,

адсорбированных на НАФ, в качестве катализатора процесса превращения мономера в полимер усиливается (концентрация свободных OH^- уменьшается), а это приводит к стерическим затруднениям и смещению равновесия между ионами в процессе роста цепи и, соответственно, уменьшению выхода полимера.

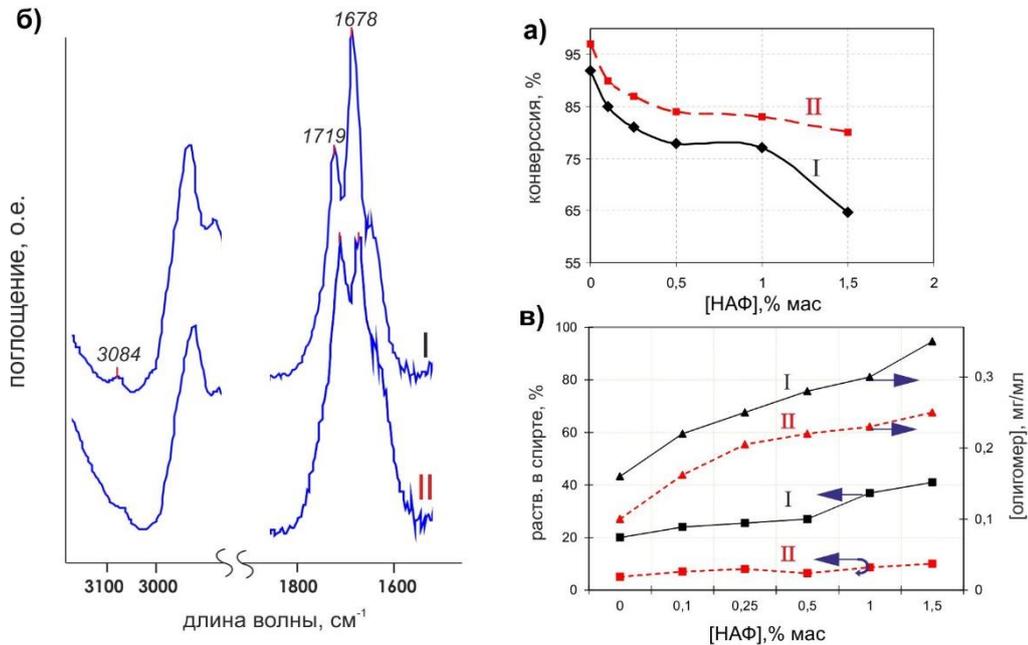


Рисунок 3.37. Выход полиакролеина в зависимости от концентраций НАФ в ходе полимеризации (а); ИК-Фурье спектры частиц полиакролеина после первой и второй стадий полимеризации в присутствии НАФ (б); зависимости растворимости частиц полиакролеина в этаноле и концентрации олигомера в надосадочной жидкости от концентрации НАФ (в). (I – осадительная полимеризация в щелочных условиях; II – реакция радикальной сшивки).

Для повышения химической стабильности гибридных частиц проводили реакцию радикальной сшивки при участии инициатора $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ по непрореагировавшим двойным связям полиакролеина. ИК-Фурье спектры частиц полиакролеина, полученные в присутствии НАФ (Рис. 3.37б), демонстрируют изменение в соотношении интенсивностей пиков: при 1719 см^{-1} , относящегося к связи -C=O альдегидной группы, и при 1678 см^{-1} , соответствующего связи -C=C- после 1-ой и 2-ой стадий процесса. Уменьшение пика при 1678 см^{-1} на спектре II указывает на снижение количества двойных связей в полимерной цепи относительно количества альдегидных групп. Кроме того, на спектре II отсутствует полоса вибрационных колебаний при 3080 см^{-1} , соответствующая связи -HC=CH_2 . [40] Эти результаты подтверждают протекание реакции сшивки по двойным непрореагировавшим связям полиакролеина. Следует отметить, что реакция

сшивки привела к повышению выхода полимера и химической стабильности гибридных полимерных частиц: они стали практически нерастворимыми в спирте, а также уменьшилась концентрация водорастворимых олигомеров, которые являются типичными побочными продуктами при полимеризации акролеина (Рис. III.37в).

Таким образом, двухстадийный метод осадительной полимеризации акролеина М1 в присутствии НАФ позволил получить коллоидно-стабильные в физиологических условиях (0.15 М NaCl) дисперсии гибридных частиц, характеристика которых приведена в Таблице III.14.

Таблица III.14.

Характеристика гибридных полимерных частиц, полученных в присутствии НАФ

Концентрация НАФ, % мас. в расчете на мономер	Диаметр, нм	Выход полимера %	Концентрация альдегидных групп, мкМ/г полимера
0	810	95	31
0,1	520	88	40,8
0,25	418	86,4	43,4
0,5	315	84,5	49,7
1,0	267	84	59,8
1,5	265	80	60,4

В случае использования ТМАГ в качестве инициатора полимеризации без НЧ синтезированы частицы с большим диаметром (Таблица III.14), чем в ходе полимеризации акролеина под действием щелочи ($d=650$ нм). Это может быть связано с зарождением меньшего количества активных центров в случае использования ТМАГ при условии равенства концентраций ТМАГ и щелочи. Поскольку зарождение частиц на ранних стадиях полимеризации связано со степенью гидратации иницирующих ионов, то в присутствии более гидратированного катиона Na^+ [335][280] генерируется большее количество частиц с меньшим размером, чем в случае ТМАГ.

Используя метод динамического светорассеяния, определили, что диаметр частиц уменьшается от 500 до 260 нм при повышении концентрации НАФ (Таблица III.14), при этом 2-ая стадия (сшивки) практически не влияла на диаметр. Такая закономерность, вероятно, обусловлена механизмом формирования полимерных частиц при добавлении НАФ на стадии синтеза. В этом случае синтез может рассматриваться как матричная полимеризация, основанная на специфических взаимодействиях матрицы (НАФ) с растущими полимерными цепями. На ранней стадии полимеризации олигомеры, достигнув

критической длины, адсорбируются на поверхности НАФ. Затем продолжается рост олигомеров от поверхности НАФ за счет поступления мономера из дисперсионной среды. На **Рис. III.38a** представлено ПЭМ-изображение НАФ, инкапсулированных в объем частиц, тем самым подтверждая роль НАФ, выступающих в качестве матрицы, вокруг которой сформирована полимерная оболочка. В результате при увеличении концентрации НАФ уменьшается количество олигомеров на одну НЧ, что приводит к формированию более тонкой полимерной оболочки и, соответственно частиц меньшего диаметра.

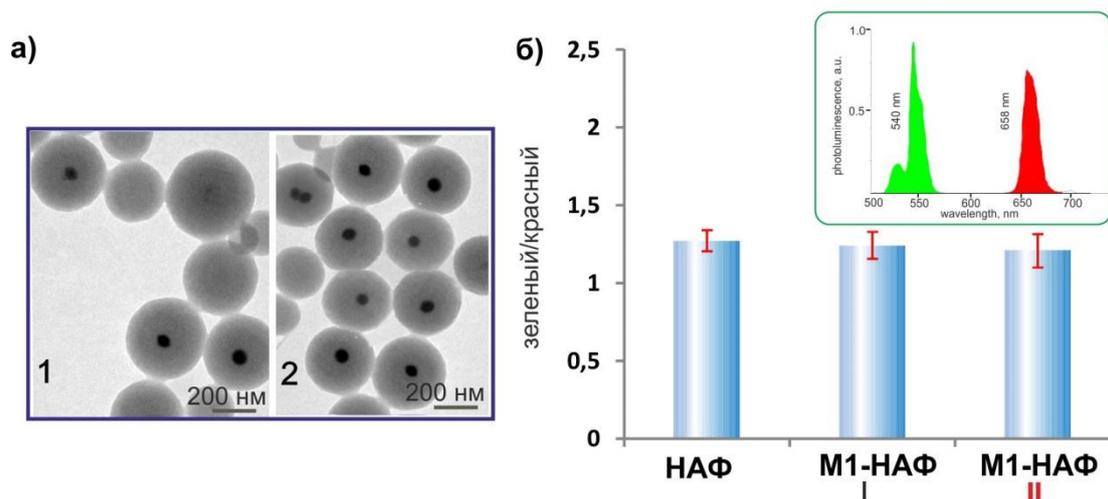


Рисунок III.38. ПЭМ-изображение полиакролеиновых частиц **M1**, полученных в присутствии НАФ: 0.25% мас. (1), 1.5% мас. (2) в расчете на мономер (а); соотношение интенсивностей зеленого и красного максимумов флуоресценции для НАФ и полиакролеиновых микросфер **M1**, содержащих НАФ, после первой (I) и 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).

Показательно, что были получены также полимерные частицы, не содержащие НАФ, доля которых уменьшалась при повышении концентрации НАФ от 0 до 1% мас. (**Рис. III.38a**). При достижении концентрации 1% мас. зафиксированы частицы, содержащие 2 и более наночастицы при сохранении количества ненаполненных частиц **M1**. Вероятно, это связано с тем, что формирование частиц проходит как по механизму матричной, так и осадительной полимеризаций.

Известно, что воздействие окружающей среды приводит к значительному снижению интенсивности фотолуминесценции НАФ. Обнаружение эффекта олеиновой кислоты защищать поверхность и излучающие состояния НАФ от воздействия окружающей среды положило начало их внедрению в различные биоприложения. Гидрофилизация с использованием ТМАГ для частичного удаления молекул олеиновой кислоты с

последующим введением в полимерную матрицу позволила сохранить высокую интенсивность флуоресценции НАФ. В частности, отношение интенсивностей зеленой и красной спектральных полос $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ является чувствительным индикатором изменения флуоресцентных свойств НАФ, вызванных воздействием окружающей среды. [280] Как видно из данных на **Рис. III.386**, соотношение зеленого к красному пику эмиссии НАФ и частиц М1-НАФ на 1-ой и 2-ой стадиях полимеризации для всех концентраций НАФ остается практически неизменным. Можно предположить, что полимерная оболочка нивелирует дефекты поверхности, экранируя поверхностные излучающие состояния, что ведет к пассивации поверхности НАФ.

Исследование интенсивности сигнала флуоресценции на длине волны 545 нм гибридных ПЧ от концентрации НАФ в исходной смеси показало, что существует экстремальная зависимость с максимальной эмиссией при концентрации НАФ 1% мас. в расчете на мономер. Тушение флуоресценции при более высоких концентрациях НАФ может быть связано с образованием агрегатов НАФ в объеме полимерной частицы. В этом случае в области контакта наночастиц в агрегатах формируется полимерное покрытие, которое не может эффективно пассивировать поверхность, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции.

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 оптической биовизуализации.

Применение гибридных НАФ-содержащих полимерных частиц для биовизуализации *in vivo*

Применение дисперсий частиц М1, полученных в присутствии НАФ, продемонстрировано в экспериментах *in vivo* на малых животных (мышях). Предварительно, для оценки цитотоксичности полученных образцов был проведен колориметрический МТТ-тест на иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT, как описано в «Экспериментальной части». Клетки инкубировали с частицами в течение 24 и 120 часов, а в качестве контроля использовали клетки в культуральной среде. Затем добавляли МТТ-реагент и проводили измерение оптического поглощения при 540 нм, которое пропорционально количеству жизнеспособных клеток.

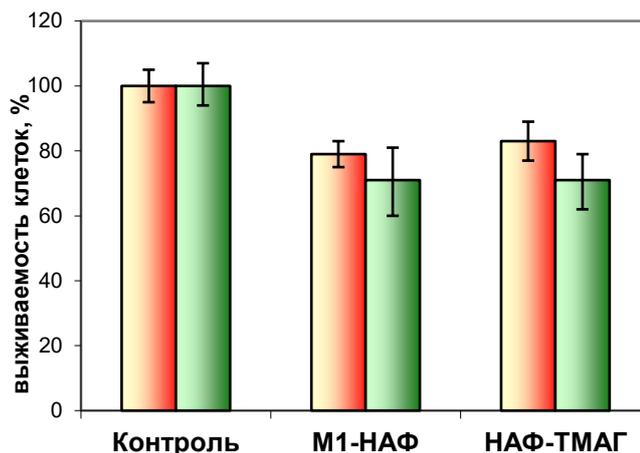


Рисунок III.39. Средняя выживаемость (%) кератиноцитов человека линии HaCaT, инкубированных с частицами полиакролеина, полученными в присутствии НАФ (М1-НАФ) и НАФ, модифицированных ТМАГ (НАФ-ТМАГ), в течение 24 ч (красные столбцы) или 120 ч (зеленые столбцы).

Инкубация кератиноцитов HaCaT с М1-НАФ вызывала, в среднем, снижение жизнеспособности клеток на 20% или 30% после 24 и 120 часов инкубации, соответственно, по сравнению с контролем. Цитотоксичность НАФ, гидрофилизированных при участии ТМАН (может быть оценена как собственная, поскольку не использовали дополнительного покрытия частиц) также была на том же уровне. Это означает отсутствие значительных изменений в жизнеспособности клеток при использовании гидрофилизированных НАФ и полимерных частиц, включающих эти НЧ.

Во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН была создана оптическая визуализирующая система для прижизненной оценки биораспределения флуоресцентных меток в организме малых животных при внутривенном введении. Система работает в эпилюминесцентном режиме, при котором источник, возбуждающий флуоресценцию, и приемник, детектирующий сигнал флуоресценции, расположены по одну сторону от исследуемого объекта (Рис. III.39а). Мощность лазерного луча ограничена на уровне 0.7 Вт/см². Экспериментально показано, что данная плотность мощности лазерного излучения не вызывает ожогов кожных покровов у малых животных.

Для демонстрации закономерностей биораспределения в организме мышей гибридных полимерных частиц М1, полученных в присутствии НАФ, в хвостовую вену вводили 0.1мл (1% мас.) частиц в фосфатно-солевом буфере с рН 7.2. Острых аллергических реакций или интоксикации отмечено не было. Распределение флуоресцентного сигнала регистрировали *in vivo*, а также на выделенных органах после введения частиц. Через 5–10 мин после инъекции флуоресцентный сигнал появлялся

сначала в легких (**Рис. III.39б**), затем он перераспределялся по печени и селезенке, 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 уже через 20 мин после введения в кровеносной системе животных сигнал от частиц не детектировался. Время выведения **M1**-НАФ из организма составляло 10 дней. Сигнал от полиакролеиновых частиц **M1**, не содержащих НАФ, в экспериментах *in vivo* отсутствовал.[13]

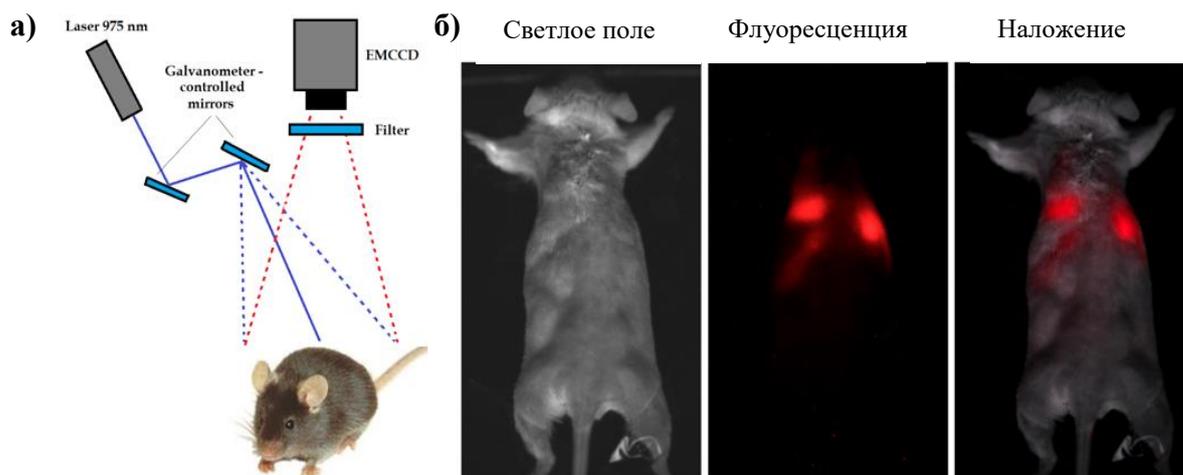
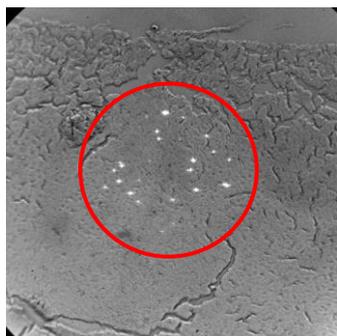


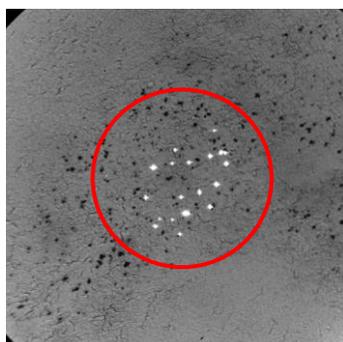
Рисунок III.39. Схематическое изображение эпифлуоресцентной системы визуализации (а); Фотолюминесцентная визуализация *in vivo* живой мыши через 1 час после внутривенного введения частиц **M1** с НАФ. Слева: светлопольное изображение; центр: флуоресцентное изображение; справа: наложение светлопольного и флуоресцентного изображений (б).[384]

По данным гистологических и гистохимических экспериментов на выделенных органах животных с использованием стандартных протоколов существенные патологические изменения в органах животных после введения гибридных частиц отсутствовали. Отмечены лишь незначительные признаки дистрофии и нарушение микроциркуляции. В частности, в печени наблюдали умеренно-выраженную зернистую дистрофию гепатоцитов, расширение сосудов триад; в легких – венозное полнокровие. Патологические изменения в тканях почек и селезенки зарегистрированы не были (**Рис.III.40**).[384].

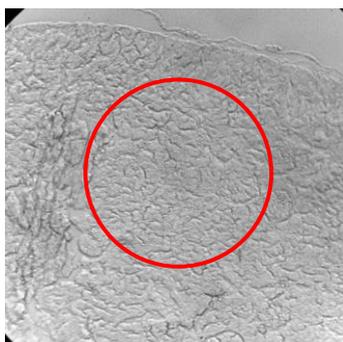
Таким образом, частицы полиакролеина **M1**, наполненные НАФ *in situ*, являются перспективными микроструктурами для флуоресцентной визуализации биораспределения на уровне живого организма.

Флуоресцентный сигнал

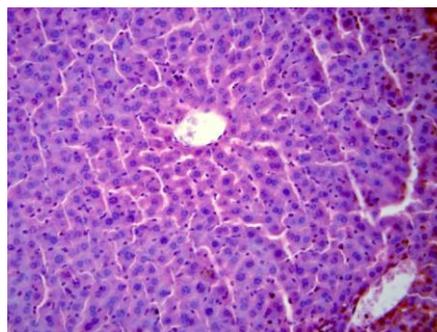
Печень



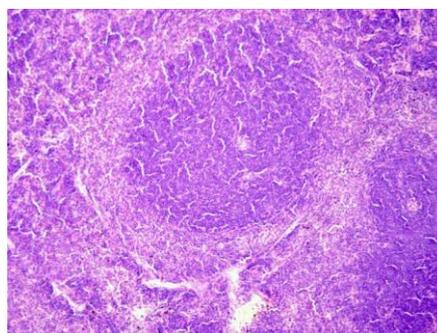
Селезенка



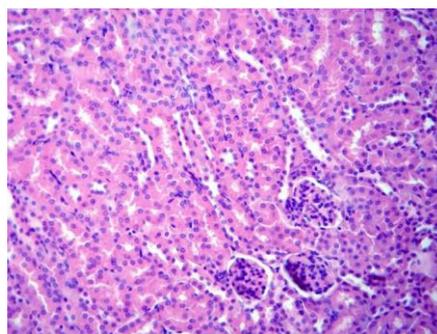
Почки.

Гистология

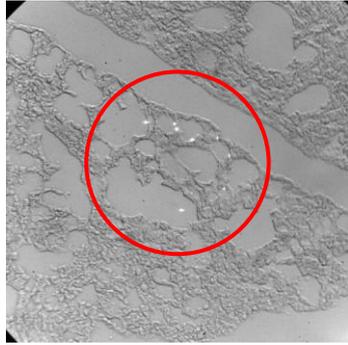
Гепатоциты имеют обычную структуру, без видимых дистрофических изменений. Незначительно увеличено количество купферовских клеток. (ув. 400х).



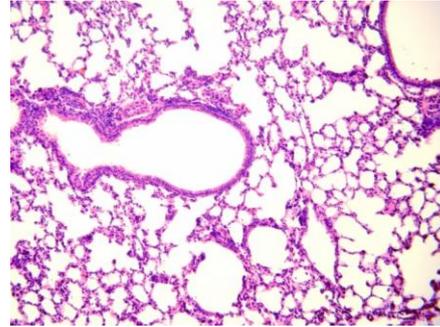
Нормальная структура органа. Видны лимфоидные фолликулы обычной величины и структуры. Нормальное содержание мегакариоцитов. (ув. 200х).



Общая структура почечной ткани нормальная. Эпителий извитых канальцев без признаков дистрофии. Прямые канальцы также не изменены. В мозговом веществе единичные, очень небольшие инфильтраты. (ув. 400х)



Легкие



Ткань, в основном, воздушная, с нормальными размерами альвеол. Встречаются небольшие лимфомакрофагальные инфильтраты с примесью единичных нейтрофилов и плазматических клеток. (ув. 200х).

Рисунок III.40. Флуоресцентный сигнал и гистология срезов органов животных после введения гибридных частиц, содержащих НАФ. Поле зрения микроскопа отмечено красной окружностью.

III.2. Наноструктуры на основе апконвертирующих нанофосфоров (НАФ)

III.2.1. Биофункционализация НАФ с использованием метода замены растворителя

В последние годы пристальное внимание привлекают неорганические наночастицы благодаря их уникальным (механическим, оптическим, электрическим, магнитным, и т.д.) свойствам. Одними из наиболее востребованных в биомедицинских исследованиях являются фотолюминесцентные НЧ, среди которых особое место занимают апконвертирующие нанофосфоры, возбуждаемые светом из ближнего ИК-диапазона (975 нм), что определяет перспективность их использования в *in vivo* исследованиях. В предыдущей главе был рассмотрен подход для получения биосовместимых образцов НАФ путем введения в полимерную матрицу. Однако в этом случае не удастся получить полимерсодержащие пробы НАФ в наноразмерном диапазоне (меньше 100 нм). Это ставит задачу разработки универсального подхода для создания покрытия на поверхности НАФ, которое позволит приготовить биосовместимые, биофункционализованные наночастицы, одно из измерений которых не превосходит 100 нм (**Рис. III.41**). При таком подходе НАФ могут выступать как в качестве визуализирующих меток *in vitro*, так и для *in vivo* диагностики и терапии, которые в совокупности представляют новую область - тераностику.

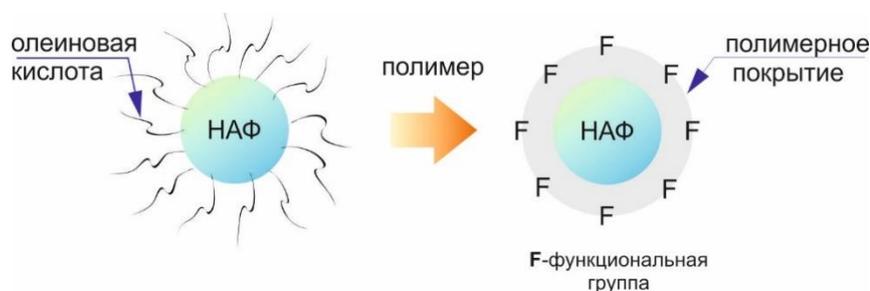


Рисунок III.41. Схема биофункционализации НАФ.

В литературе представлено большое количество работ, посвященных методам гидрофиллизации НАФ, стабилизированных гидрофобными молекулами, из которых можно выделить три основных подхода, представленных в «Обзоре литературы». Использование этих подходов позволяет получить коллоидно-стабильные водные дисперсии НАФ с функционализированной поверхностью, необходимой для создания наноструктур с биолигандами. Однако существует ряд недостатков, например: при удалении лиганда-стабилизатора с поверхности нековалентный характер связи НАФ с бифункциональными соединениями приводит к их десорбции (Рис. I.11, подход 1), а, следовательно, к агрегативной неустойчивости; включение НАФ в оболочку из оксида кремния является сложной и продолжительной процедурой, сопровождающейся неконтролируемым гидролизом и потерей коллоидной стабильности при хранении; ограничен выбор мономеров, совместимых с НАФ, для их включения в полимерные частицы (Рис. I.11, подход 3). Поэтому актуальной проблемой остается коллоидная и химическая устойчивость, неизменность фотофизических свойств НАФ в буферных системах, условиях живого организма и при хранении.

В этой связи большой потенциал имеет подход 2 (Рис. I.11), 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 наночастиц без изменения фотофизических свойств, предохраняет их от воздействия окружающей среды. Кроме того, полимерное покрытие обеспечивает коллоидную и химическую стабильность дисперсий НАФ в процессе модификации и применения для биомедицинских целей. Следует отметить, что, при введении в полимерные микрочастицы, модификация поверхности НАФ, прежде всего, призвана повысить сродство между НАФ и полимерной матрицей. В случае получения наноразмерных полимерсодержащих образцов НАФ,

необходимо создать электростатический и/или стерический барьер на поверхности НЧ, препятствующий их агрегации в воде и буферных растворах.

Это может быть реализовано в процессе модификации НАФ методом замены растворителя при участии как природных, так и синтетических полимеров. Данный метод используют для модификации неорганических НЧ полимерами, нерастворимыми или частично растворимыми в воде. НЧ диспергируют в летучем растворителе (например, хлороформе), смешивают с раствором полимера в том же растворителе (или растворителе, который с ним смешивается). Смесь обрабатывают ультразвуком и выдерживают при перемешивании в течение часа, при этом полимерные цепи адсорбируются на поверхности НЧ. Затем смесь по каплям добавляют в водную среду в условиях постоянного перемешивания и ультразвуковой обработки. Межмолекулярные силы между полимерными цепями приводят к образованию на поверхности НЧ полимерной оболочки, нерастворимой в воде. После выпаривания растворителя получают водную дисперсию наночастиц, модифицированных полимером (**Рис. III.42**).

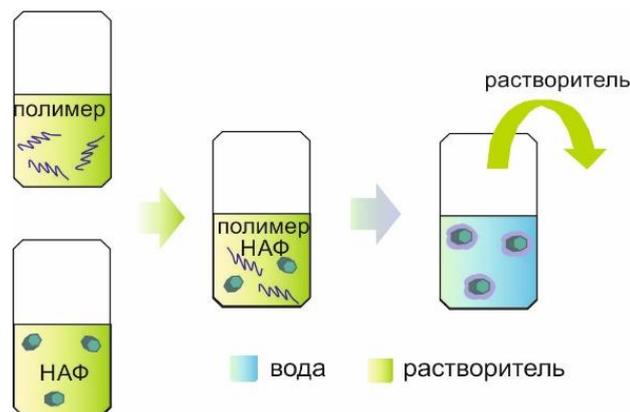


Рисунок III.42. Схема проведения модификации НАФ с использованием метода замены растворителя.

Используя данный универсальный метод модификации, получены водные дисперсии НАФ ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, $d=93$ нм) 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 двухслойным покрытием из ПЭИ (1 слой) и Na-соль сульфата декстрана (ДС) (2 слой). В качестве контроля были выбраны НАФ, гидрофилизированные с использованием ТМАГ по тому же методу модификации, но отсутствие полимерного покрытия позволяло их

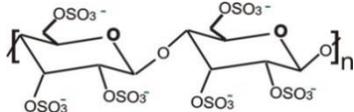
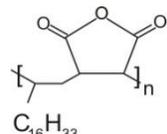
рассматривать, как водные дисперсии исходных НАФ (после синтеза) и оценить собственную цитотоксичность НАФ (Рис. III.43). Принцип гидрофилизации с помощью ТМАГ рассмотрен в предыдущей главе. Характеристики полученных водных дисперсий приведены в Таблице III.15.

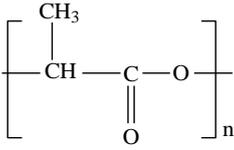
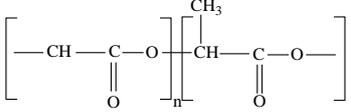


Рисунок III.43. Схема модификации НАФ с использованием различных полимеров.

Таблица III.15

Характеристика модифицированных НАФ.

Модификатор	Сокращение	Формула	Модификация	Диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ
Гидроксид тетраметиламмония	ТМАГ	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	НАФ-ТМАГ	94±8.2	-21.42±2.1
Полиэтиленимин	ПЭИ	$\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH)}_n\text{-}$	НАФ-ПЭИ	160±13.2	42.1±2.5
Na-соль сульфата декстрана	ДС		НАФ-ПЭИ-ДС	169±11.8	-14.85±1.5
Сополимер малеинового ангидрида и октадецена	ПМАО	 C ₁₆ H ₃₃	НАФ-ПМАО	102±9.4	-41.65±3.3

Поли (D, L-лактид)	ПЛЛ		НАФ-ПЛЛ	212±15.6	-40.25±2.5
Сополимер лактида с гликолидом	ПЛГ		НАФ-ПЛГ	251±18.7	-50.33±3.1

III.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 [385][386]. 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. [331]

В данной работе исследование цитотоксических свойств НАФ, гидрофилизированных при участии полимеров, проводили по митохондриальной активности (тест МТТ) и неспецифическому захвату НАФ двумя типами клеток кожи человека: кератиноцитами HaCaT и фибробластами человека. Анализ МТТ ставили после инкубации обоих типов клеток с НАФ, взятыми в концентрациях от 0 (контроль) до 125 мкг/мл в течение 24 часов при 37°C. Основные результаты представлены на **Рис. III.44**.

Эксперименты продемонстрировали, что как НАФ-ТМАГ, так и все НАФ, приготовленные с различными полимерными покрытиями, в диапазоне концентраций от 62,5 до 125 мкг/мл оказывают незначительный цитотоксический эффект на жизнеспособность дермальных фибробластов человека (**Рис. III.44а**). На вторую линию клеток (кератиноциты HaCaT) НАФ оказывали различное воздействие. В случае НАФ без покрытия (НАФ-ТМАГ) не отмечено цитотоксического эффекта для концентрации 62,5 мкг/мл и слабое проявление токсичности для 125 мкг/мл. Наименьшая цитотоксичность отмечена у образцов НАФ, модифицированных ПЛЛ и ПМАО, а существенное снижение выживаемости зарегистрировано в случае использования НАФ-ПЭИ. При использовании ПЛГ в качестве покрытия наблюдалось значительное снижение выживаемости клеток при концентрации 125 мкг/мл, в отличие от НАФ-ПЛЛ, несмотря на схожие структуры полимеров, размер и заряд частиц.

При исследовании захвата НЧ кератиноцитами HaCaT максимальное включение было зафиксировано для НАФ-ТМАГ, но без специфической локализации. Частицы находились в перинуклеарной зоне и вблизи цитоплазматической мембраны (Рис. III.44б, вставка), что может указывать на отсутствие связи с внутриклеточными структурами. Наблюдалась очевидная интернализация у НАФ-ПЛЛ (59%), НАФ-ПЭИ (46%) и НАФ-ПМАО (30%). Остальные образцы модифицированных НАФ включались в клетки в незначительном количестве и их захват кератиноцитами составлял менее 3% (Рис. III.44б).

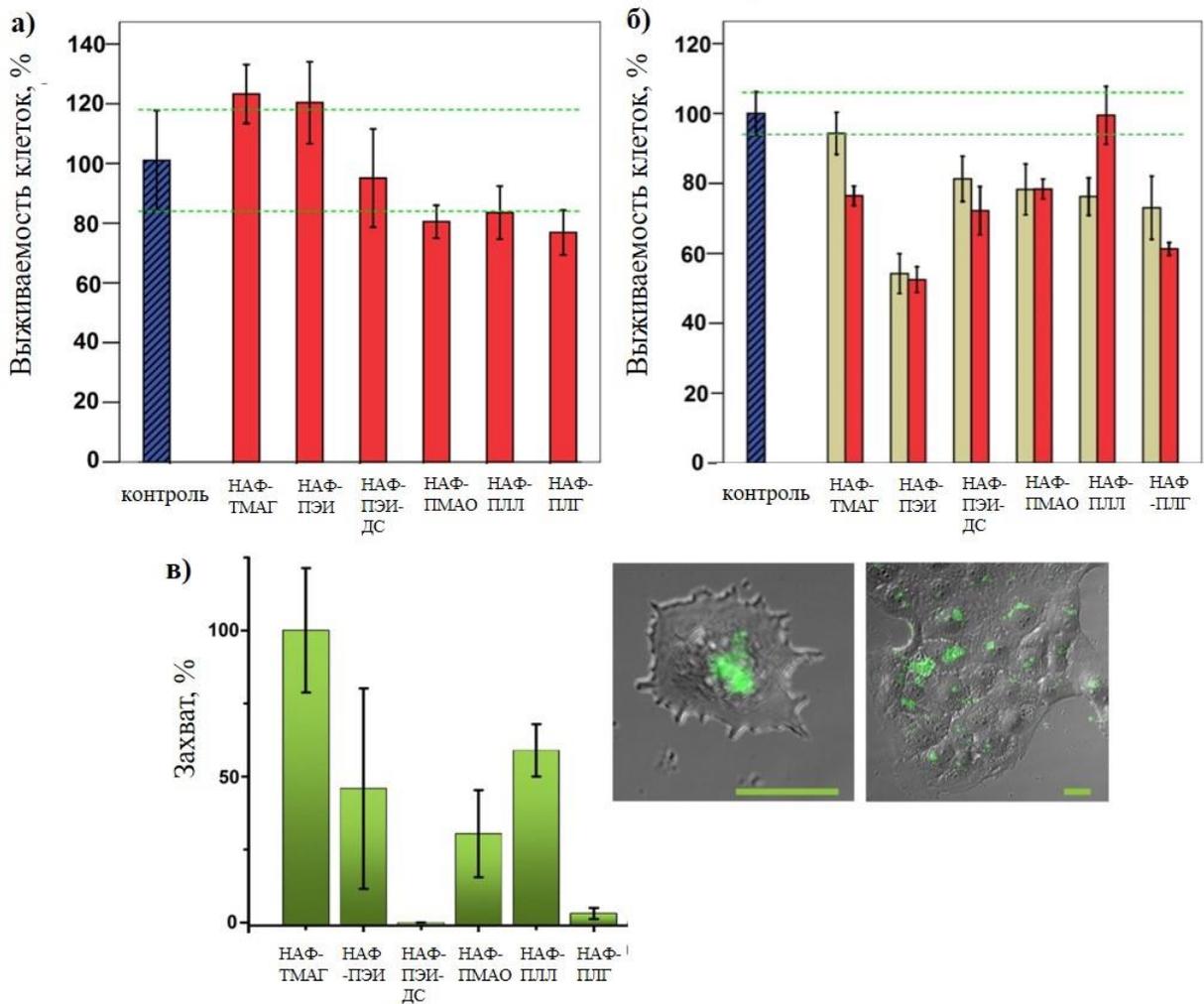


Рисунок III.44. Гистограммы распределения выживаемости дермальных фибробластов человека с [НАФ] 125 мкг/мл (а) и кератиноцитов человека (HaCaT), культивированных с [НАФ] 62,5 (бежевые столбцы) и 125 мкг/мл (красные столбцы) в течение 24 ч. (б); Неспецифический захват образцов НАФ кератиноцитами (HaCaT) через 24 ч после инкубации. Нормированное значение захвата, представленное как средний сигнал интенсивности флуоресценции/площадь, (НАФ-ТМАГ 100%). НАФ использовали в концентрации 125 мкг/мл. Вставка: наложение изображений светлого поля и конфокального флуоресцентного сигнала отдельной клетки и монослоя клеток после

инкубации с НАФ-ТМАГ (**в**). Контроль: клетки без инкубации с НАФ (100%). Зеленые пунктирные линии показывают нижнюю и верхнюю границы CI 95% для среднего значения контрольной группы. [304]

Покрытие поверхности ПЭИ является одним из самых популярных методов биофункционализации поверхности, которое благодаря его положительному заряду [387] способствует включению НЧ в клетки. В то же время ПЭИ проявляет высокую токсичность в отношении клеток [388], хотя в литературе есть сообщения о зависимости этого свойства от молекулярного веса ПЭИ. [389] Для предотвращения катионной цитотоксичности ПЭИ [390] на поверхность положительно заряженных НАФ-ПЭИ адсорбировали отрицательно заряженный ДС. В результате НАФ-ПЭИ-ДС не вызывали снижения количества фибробластов, а жизнеспособность кератиноцитов уменьшалась примерно на 20-30% в зависимости от концентрации. Эта токсичность, очевидно, не связана с их захватом кератиноцитами, который составлял 1,8% от среднего значения захвата НАФ-ТМАГ. Высокий уровень неспецифического включения (по сравнению с НАФ-ТМАГ) в кератиноциты NaCaT практически при отсутствии цитотоксичности отмечен у образцов НАФ-ПЛЛ и НАФ-РМАО.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют большие возможности биофункционализации 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.

III.2.2. Визуализация клеточных рецепторов с использованием наноструктур на основе НАФ

III.2.2.1. Биофункционализация НАФ с использованием амфифильных полимеров

Наиболее перспективными молекулами-модификаторами при использовании метода замены растворителя являются амфифильные полимеры. Такие полимеры состоят из гидрофобных и гидрофильных участков полимерных цепей и 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 ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, $d=115$ нм) происходила за счет гидрофобных

взаимодействий молекул стабилизатора (олеиновой кислоты) и гидрофобных участков ПМАО (октадецена), как представлено на **Рис. III.45**. Для повышения прочности полимерного покрытия при хранении и в буферных растворах с высокой ионной силой использовали сшивающий агент 1,6-диаминогексан, который за счет реакции аминогруппы с ангидридом в цепи сополимера позволяет получать поперечно-сшитую структуру полимерной оболочки. Однако при формировании такой оболочки необходимо учитывать тот факт, что не все ангидридные группы должны быть задействованы в реакции, поскольку в дальнейшем планируется использовать модифицированные НАФ для иммобилизации биомолекул и необходимо иметь карбоксильные группы на поверхности НАФ, которые появляются в результате гидролиза ангидридных групп в водной среде.

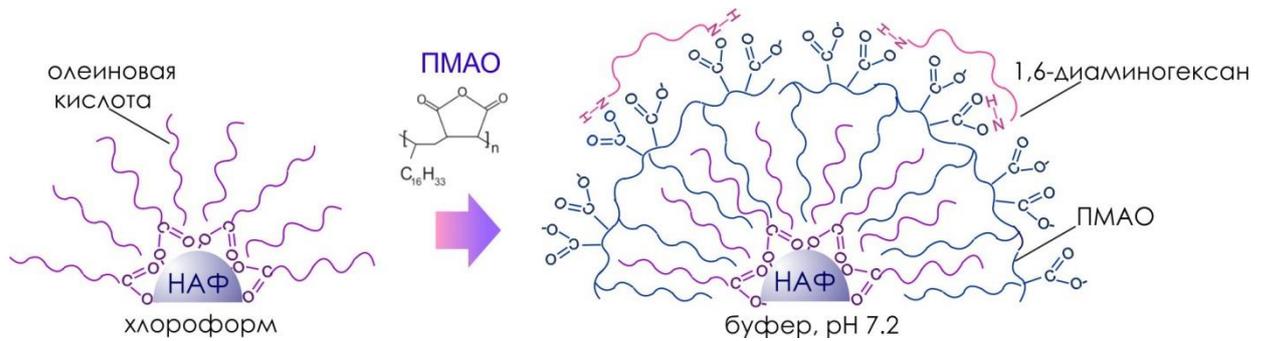


Рисунок III.45. Схема модификации НАФ амфифильным чередующимся сополимером малеинового ангидрида и октадецена (ПМАО).

Прежде всего, оптимизировали соотношение компонентов, которые участвуют в процессе гидрофиллизации, по следующим критериям:

- Возможность получения дисперсии НАФ, легко диспергируемой в водной среде;
- Регистрация интенсивного флуоресцентного сигнала;
- Коллоидная стабильность частиц в буферных растворах и в условиях живого организма;
- Отсутствие гидрофобных немодифицированных НАФ, т.е. НАФ, которые необратимо адсорбировались на стенках пробирки (регистрировали по отсутствию флуоресцентного сигнала от стенок пробирки).

Оптимизировали соотношение НАФ/полимер в органическом растворителе в диапазоне от 1:0.5 до 1:4, соотношение органической (НАФ+полимер) и водной фазы в диапазоне от 1:500 до 1:1500 при переводе в воду, а также выбирали оптимальную органическую среду из ряда растворителей гексан, циклогексан, хлороформ. В результате,

модификацию на основе метода замены растворителя проводили при соотношении НАФ/полимер, 1:4, соотношении НАФ/водная фаза, 1:1000, в качестве растворителя использовали хлороформ (см. «Экспериментальную часть»).

Модификацию поверхности НАФ подтверждали методом ИК-Фурье спектроскопии. Как видно из сравнения спектров (**Рис. III.46а**), после модификации в НАФ-ПМАО исчезают пики при 1858 и 1781 см^{-1} , характерные для кольца малеинового ангидрида ПМАО. При переходе в водную среду в результате гидролиза происходит раскрытие этого кольца и появляются пики: при 1734 см^{-1} , относящийся к валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$, и при 1280 см^{-1} , соответствующий деформационным колебаниям $\text{C}-\text{OH}$ карбоксильной группы. Появление карбоксильной заряженной группы придает коллоидную стабильность водной дисперсии НАФ-ПМАО, что подтверждает равномерное свечение по всему объему (**Рис. III.47а**) и значение дзета-потенциала, которое составило -41,5 мВ. Коллоидная стабильность модифицированных НАФ-ПМАО сохранялась в течение 2 месяцев.

Анализ изображений с просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) (**Рис. III.46б**) показал, что частицы НАФ после синтеза имели размер 120 нм и преимущественно гексагональную форму, которая указывает на наличие бета-фазы кристалла матрицы NaYF_4 . Эта фаза является наиболее эффективной для процесса апконверсии, что определяет высокий коэффициент апконверсии НАФ. В результате модификации (**Рис. III.46в**) молекулы ПМАО формировали на поверхности НАФ супрамолекулярную структуру в виде тонкого слоя низкой электронной плотности практически без изменения диаметра исходных частиц НАФ.

В процессе модификации сохранялась высокая интенсивность флуоресценции НАФ-ПМАО, а также не изменялось соотношение зеленого и красного пиков в спектре НАФ (**Рис. III.386**, вставка). Это свидетельствует о стабильности флуоресцентных свойств НАФ, при действии окружающей среды, как было продемонстрировано в п. III.1.3.3.

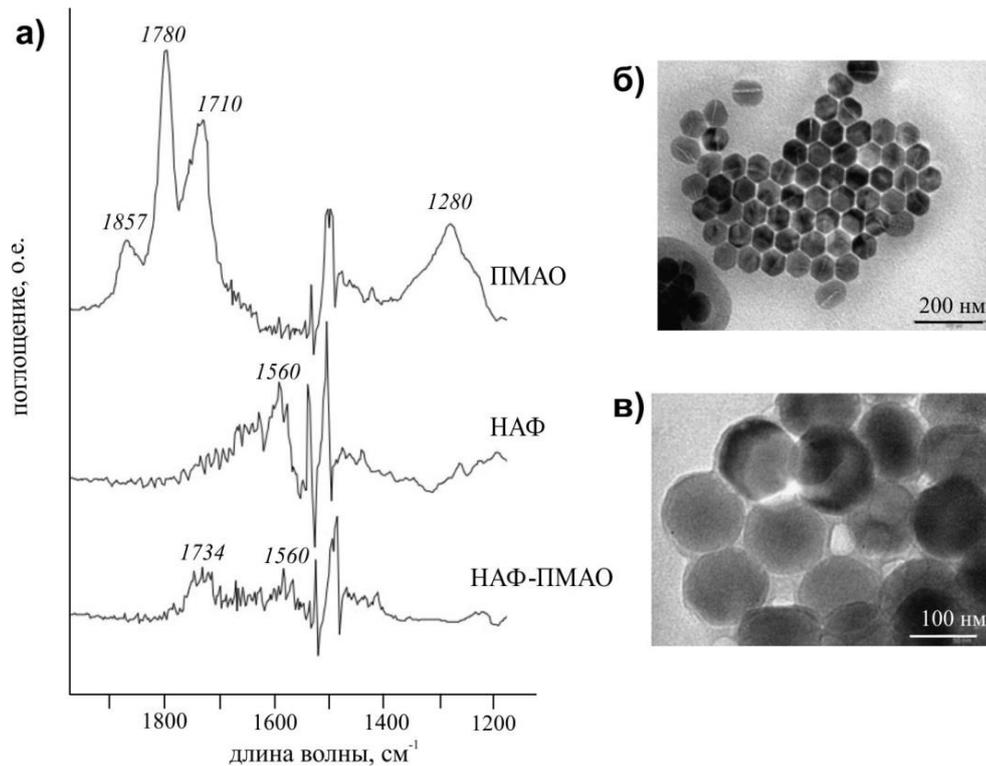


Рисунок III.46. Характеристика НАФ, модифицированных ПМАО. ИК-Фурье спектры полимера ПМАО, НАФ после синтеза и НАФ-ПМАО (а); ПЭМ изображения НАФ после синтеза (б) и ПМАО-модифицированных НАФ (в).

Одним из важных параметров, определяющих интенсивность излучения НАФ, является коэффициент апконверсии ($\eta_{ап}$), который является безразмерной величиной и представляет собой отношение мощности излучения к мощности возбуждения (Вт/Вт). Мощность излучения нелинейно зависит от мощности возбуждаемого света, так как каждый испускаемый фотон является результатом поглощения двух или более фотонов с последующим безызлучательным релаксационным процессом. При высоких значениях мощности возбуждающего света, приближающихся к насыщению, $\eta_{ап}$ достигает плато. Измерение $\eta_{ап}$ в зависимости от возбуждения имеет важное значение для оценки возможности визуализации с помощью НАФ, особенно, в *in vivo* исследованиях. На **Рис. III.476** показано изменение значения $\eta_{ап}$, интегрированное по всему спектру флуоресценции, в зависимости от мощности возбуждения. Следует отметить, что отношение зеленого пика излучения к красному уменьшается при повышении мощности. После 60 Вт/см^2 коэффициент апконверсии выходит на плато и достигает максимального значения 1.2%. Эти данные хорошо согласуются с результатами в 1.2 -2 %, полученными для данного типа немодифицированных НАФ $\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+} / \text{Er}^{3+}$ [331]. Таким образом, покрытие из амфифильного полимера, практически, не влияет на флуоресцентные свойства

наночастиц, снижает восприимчивость к окружающей среде и создает функционализированное покрытие, необходимое для биоприложений.

III.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 ($K_d=10^{-14}$). [391] Бактериальная рибонуклеаза и ее ингибитор барстар представляют собой белковые молекулы с молекулярной массой 12,4 и 10,2 кДа, соответственно, которые стабильны в широком диапазоне pH (от 2 до 12) и температуры (50° и 70° C, соответственно) и имеют концевые группы, доступные для ковалентного связывания при модификации и генетического синтеза. 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 (Рис. III.48а).

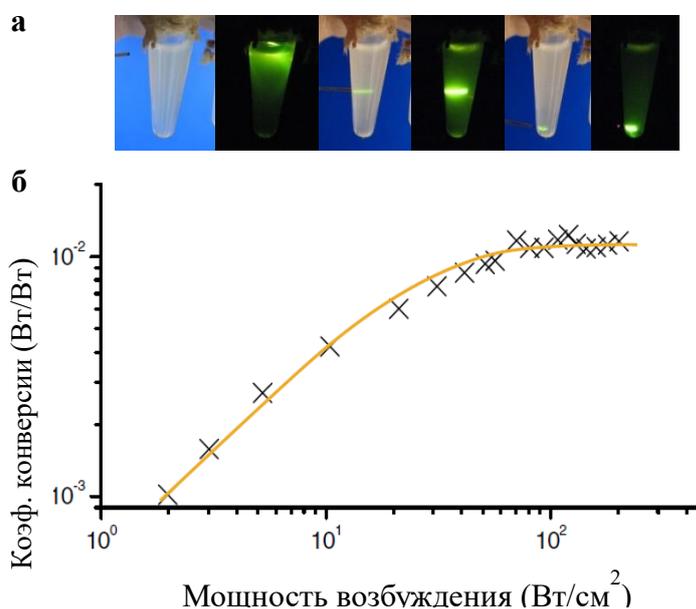


Рисунок III.47. Флуоресцентные изображения, демонстрирующие коллоидную стабильность водных дисперсий НАФ-ПМАО, которую детектируют по всему объему (а); Зависимость коэффициента апконверсии (η_{ap}) от мощности возбуждения (б).

Барстар и конъюгат барназа-scFv4D5 были получены и охарактеризованы как описано в [392]. Барстар-связывающая способность подмодуля барназа-scFv4D5 была

доказана в реакции ингибирования рибонуклеазной активности барназы при участии барстара. Константа аффинности комплекса барназа-scFv4D5 и рецептора HER2/neu была рассчитана и ее значение составило $1,62 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

На поверхность НАФ-ПМАО иммобилизовали барстар (pI 4.6) в качестве компонента модуля, поскольку в условиях реакции он был отрицательно заряженным, в отличие от барназы (pI 8,9), что позволило избежать неспецифической адсорбции белка за счет электростатических взаимодействий. Наноструктуры НАФ-ПМАО с барстаром получали при взаимодействии карбоксильных групп ПМАО на поверхности НАФ и аминогрупп барстара в присутствии водорастворимого карбодимид и сульфо-N-гидроксисукцинимид (Рис. III.48а), как описано в «Экспериментальной части».

Специфическую реакцию визуализации при участии наноструктур НАФ проводили на линии раковых клеток SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы человека), гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu. [393] В качестве отрицательного контроля использовали клетки яичника китайского хомячка 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. III.48а).

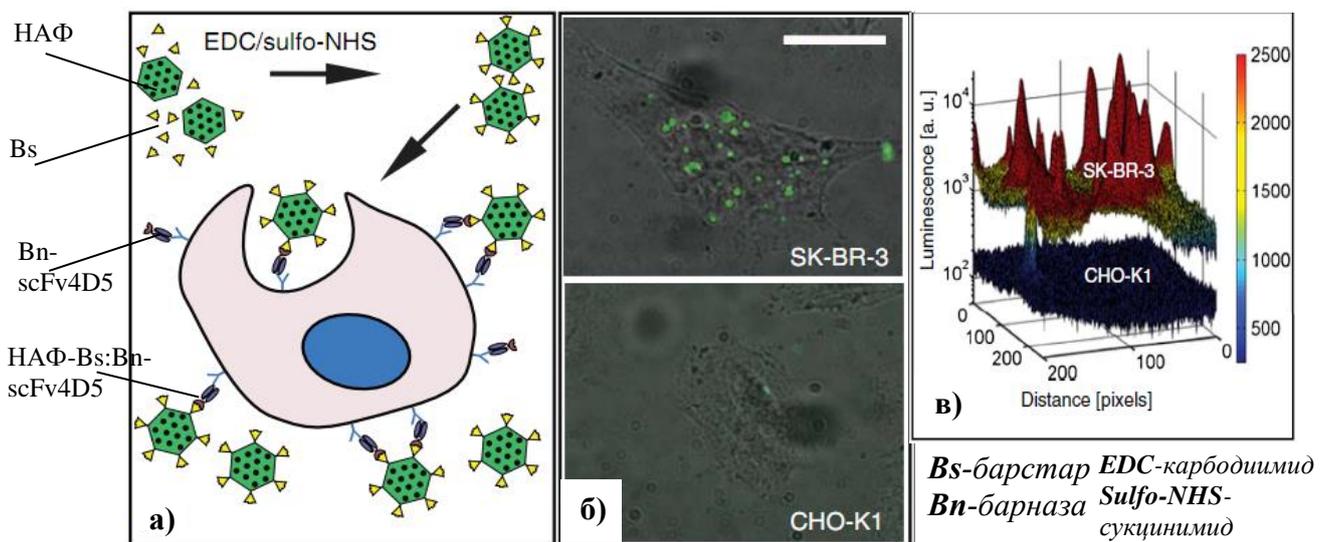


Рисунок III.48. Схема визуализации клеток с помощью модулей наноструктура НАФ-барстар и барназа-scFv4D5 (а); Изображения с эпифлуоресцентного микроскопа линии клеток SK-BR-3, гиперэкспрессирующих HER2/neu, меченных наноструктурой НАФ-барстар и барназа-scFv4D5. Шкала 20 мкм (б); 3-D изображение поверхностного

люминесцентного сигнала, полученного от клеток CHO-K1 и SK-BR-3, инкубированных с НАФ-барстар и барназа-scFv4D5 (**в**). [392]

Анализ изображений клеток, обработанных наноструктурами НАФ-барстар после предварительной инкубации клеток с модулем барназа-scFv4D, с использованием эпилюминесцентной микроскопии при возбуждении 975 нм (см. «Экспериментальную часть») показал, что на клетках SK-BR-3 регистрируется сигнал, почти в 10 раз превосходящий сигнал на контрольных клетках CHO-K1 (**Рис. III.48б**). Количественно визуализацию рецепторов наноконструкциями оценивали по 3-D реконструкции флуоресцентного сигнала, интегрированного по поверхности клетки, с помощью программного обеспечения MATLAB (**Рис. III.48в**). [392] Следует отметить, что эффективная визуализация рецепторов HER2/neu получена на клетках SK-BR-3 за счет специфического взаимодействия одиночных наноструктур НАФ с несколькими дискретными сигналами от кластеров НАФ. 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

Высокий сигнал от наноструктур при маркировании клеток рака молочной железы явился основанием для моделирования визуализации клеток в биоткани. Использование реальных образцов тканей существенно затруднено, что вызвано различиями в спектрах и интенсивности флуоресценции. Различия наблюдаются как между пациентами ввиду физиологических особенностей, так и на различных участках одного и того же органа. Это требует накопления больших объемов экспериментальных данных с забором образца в месте оптического зондирования с последующими гистохимическими исследованиями, что является очень трудоемким процессом. Данную проблему можно решить, используя фантомы биоткани, которые служат моделью оптических свойств реального объекта.

Клетки аденокарциномы находятся в ткани молочной железы человека, поэтому визуализация этих клеток может быть оценена экспериментально путем создания модели ткани молочной железы человека. 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. III.49а**). Используя поглощение гемоглобина (0,002 мМ) и оксигемоглобина (0,011 мМ) в видимой области спектра, а также поглощение воды в ближней ИК-области спектра [394],

рассчитывали поглощение ткани молочной железы. Спектр поглощения ткани молочной железы в видимом и ИК-диапазоне был получен на основании измерений *in vivo*, представленных в литературе. [395]

Выбор агарозного геля в качестве матрицы связан с соизмеримым содержанием воды в геле (~90%) и ткани молочной железы (~60%). Однако преобладание воды в геле привело к завышенным результатам в поглощении фантома (на $0,2 \text{ см}^{-1}$), но это не повлияло на результаты моделирования в рамках данной работы. Поглощение фантома ($\mu_{\text{ф}}$) и ткани молочной железы ($\mu_{\text{тк.}}$), интегрированное по соответствующим длинам волн, имели сходные значения: видимая область: $\mu_{\text{тк.}}=1,35 \text{ см}^{-1}$, $\mu_{\text{ф}}=1,50 \text{ см}^{-1}$; ИК область: $\mu_{\text{тк.}}=0,06 \text{ см}^{-1}$, $\mu_{\text{ф}}=0,06 \text{ см}^{-1}$; при $\lambda_{\text{в.}} 978 \text{ нм}$: $\mu_{\text{тк.}}=0,3 \text{ см}^{-1}$, $\mu_{\text{ф}}=0,5 \text{ см}^{-1}$ (Рис. III.49а).

Для достижения светорассеяния фантома, соответствующего ткани молочной железы, в гель агарозы добавляли субмикронные частицы TiO_2 . 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, связанное с нелинейным характером апконверсии НАФ. Готовили пленки фантомного материала (от 0,4 до 1,4 мм), которые укладывали между объективом эпилюминесцентного микроскопа и образцом клеток, меченым наноструктурами НАФ, приготовленными на стекле.

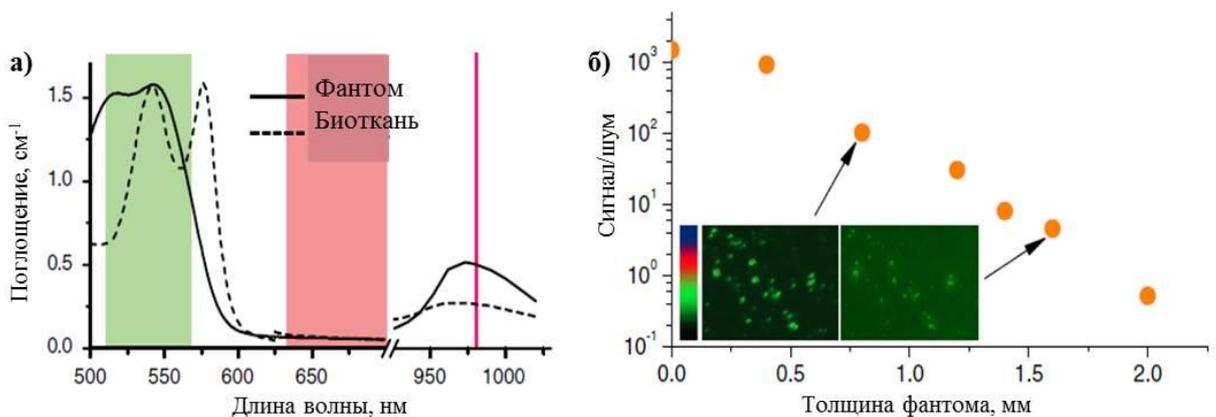


Рисунок III.49. Спектр поглощения фантома, имитирующего оптические свойства ткани молочной железы в спектральном диапазоне возбуждения и флуоресценции НАФ (сплошная линия), и биоткани (пунктирная линия). Флуоресценция НАФ в видимой и ближней ИК-областях спектра показаны в виде окрашенных областей, а также показана линия возбуждения на 975 нм (а); Визуализация клеток SK-BR-3, меченных наноструктурой НАФ, через фантом биоткани при интенсивности возбуждения 100 Вт/см^2 . Соотношение сигнал/шум оценивали, как суммарный сигнал от одной клетки SK-BR-3 к общему сигналу шума. На вставке показано изображение в цвете клеток SK-BR-3 через

фантомные пленки толщиной 0,8 и 1,6 мм, стрелки указывают на соответствующие точки на графике; левая панель: полоса цвета (б). [392]

Анализировали изображение клеток, специфически меченых наноструктурами НАФ, оценивая соотношение сигнал/шум, где шум (в отсутствии автофлуоресценции) складывался из шумов EMCCD камеры, считывания и перезагрузки. Найдено, что глубина визуализации клеток под пленками фантома составила 1,6 мм. Базируясь на результатах предыдущих экспериментов по эффективности регистрации НАФ, исследованию флуоресцентных свойств НАФ, провели оценку количества специфически связанных наноструктур НАФ на одну клетку SK-BR-3. Эта величина составила 2.8×10^4 наноструктур НАФ [408].

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.

III.2.3 Оптическая визуализация раковой опухоли *in vivo*

III.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. Наиболее эффективными флуорофорами для визуализации являются те, у которых длина волны возбуждения флуоресценции лежит в «окне прозрачности» биоткани (600-1300 нм), что приводит к более глубокому проникновению света, снижению рассеяния и фона от автофлуоресценции биоткани, связанной с излучением эндогенных компонентов.

НАФ относятся к таким эффективным флуорофорам и, как было показано в п. III.1.3.3, имеют большие перспективы для изучения биораспределения на уровне живого организма в составе микроструктур. В случае оптической визуализации опухоли в нее необходимо доставить НАФ, при этом они должны преодолеть ряд структурных и физиологических барьеров, таких как иммунный барьер, метаболическую деградацию. Кроме того, НАФ могут попадать в нецелевые органы и ткани организма и там накапливаться, что приводит к снижению контрастности и увеличивает вероятность проявления токсического эффекта. 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) (см. «Обзор литературы»).

Эффективность EPR-эффекта при доставке в опухоль непосредственно связана с временем циркуляции наночастиц в кровеносной системе. Высокая концентрация НАФ в крови требуется для равномерного проникновения в патологическую ткань без выхода НАФ из опухоли, а также для снижения накопления НАФ в ткани в норме. Продолжительность циркуляции НАФ определяется диаметром (в диапазоне 10-150 нм), зарядом (предпочтительно иметь отрицательный), коллоидной стабильностью, а также природой поверхности. Первостепенное значение имеет минимальный уровень неспецифического связывания поверхности НАФ с белками крови. Из литературы известно [309], что такая поверхность может быть организована из полиэтиленгликоля (ПЭГ), который является гидрофильным, нетоксичным и неиммуногенным полимером, а также характеризуется низкими сорбционными свойствами в отношении белковых молекул.

Время циркуляции НАФ в крови, зарегистрированное традиционными фотолюминесцентными методами, обычно составляет 5–10 мин. [396] НАФ с размерами в диапазоне 10–30 нм могут циркулировать в крови до 2–4 часов. [397] Однако такие НАФ характеризуется низким коэффициентом апконверсии, который в значительной мере зависит от диаметра НЧ. Эти НАФ не могут быть обнаружены в кровеносной системе по флуоресценции, а требуют более дорогих и сложных методов визуализации, таких как магнитно-резонансная томография, рентгенография, компьютерная томография и др. [247] Применение этих методов вызывает необходимость использования на стадии синтеза НАФ дополнительных сложных этапов для включения магнитных, радиоактивных и других модальностей.

В данной работе разработан простой метод получения наноструктур НАФ, которые способны длительное время находиться в кровотоке и накапливаться в опухоли. Результат накопления детектировали с помощью оптической визуализирующей системы. Использовали НАФ со структурой «ядро/оболочка», допированные ионами иттербия и тулия ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}@\text{NaYF}_4$) со средним диаметром частиц 75 ± 5 нм и гексагональной кристаллической фазой (**Рис. III.50а**, вставка). Коэффициент апконверсии при мощности возбуждения 1 Вт/см^2 на длине волны 975 нм составлял порядка 2%, что сопоставимо с аналогичными образцами, описанными в литературе. [248]

Для биофункционализации и получения гидрофильных образцов НАФ использовали метод замены растворителя при участии амфифильного сополимера ПМАО, описанный ранее. Для создания НАФ, эффективно циркулирующих в кровотоке, была сформирована

оболочка из ПЭГ-молекул на поверхности частиц. Обычно для получения ПЭГ-модифицированных НЧ используют дорогостоящие функционализированные производные ПЭГ или ПЭГ-содержащие сополимеры, полученные с использованием сложных синтетических процедур. В работе продемонстрирован более простой подход, позволяющий получить «корону» из ПЭГ на поверхности НАФ при участии недорогого, коммерчески доступного сшивающего агента диглицидилового эфира полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ).

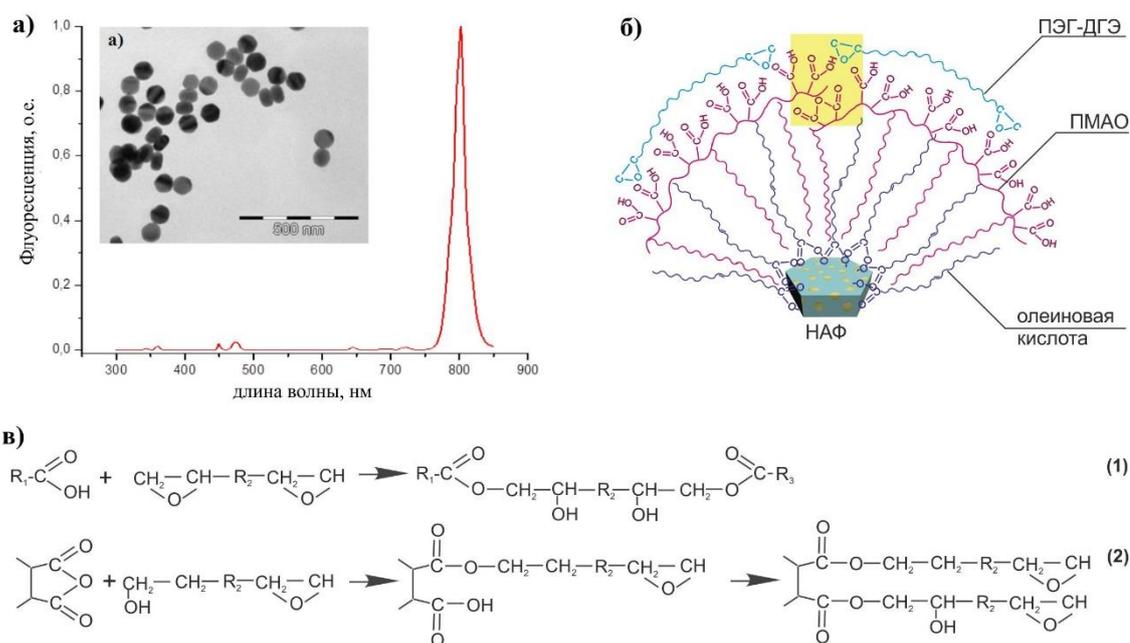


Рисунок III.50. ПЭМ-изображение и нормированный спектр флуоресценции НАФ, возбуждаемый лазером на длине волны 975 нм с мощностью 0,5 Вт/см² (а); схема модификации НАФ с использованием ПМАО и последующей реакцией сшивки при участии ПЭГ-ДГЭ (б); реакция, проводимая на поверхности НАФ, которая на схеме (б) выделена желтым цветом (в).[398]

В работе использовали ПЭГ-ДГЭ с молекулярной массой 500 Да. Предварительные расчеты показали, что расстояние между двумя присоединенными цепями ПЭГ на поверхности наночастицы НАФ (D) может составлять 0.5 и 0.3 нм для концентраций ПЭГ-ДГЭ 0.1 и 0.6 мг/мл, соответственно. D оценивали как $S_{ПЭГ}^{1/2}$, где $S_{ПЭГ}$ (нм²) представляет собой площадь поверхности, которую занимает цепочка ПЭГ на поверхности НАФ. Учитывая, что ПЭГ с массой 500 Да содержит 2.56 сегментов Куна, а размер молекулы полимера составляет 2.9 нм, рассчитали расстояние D, исходя из площади поверхности НАФ. [399] Таким образом, на поверхности НАФ будут находиться частично сложенные

ПЭГ-цепи, равномерно покрывающие поверхность, что позволяет создать «корону», несмотря на низкую молекулярную массу по сравнению с массой, наиболее часто встречающихся в литературе ПЭГ-модификаторов (2000-5000 Да). [400]

После ПМАО-модификации НАФ проводили реакцию сшивки с использованием двух разных концентраций ПЭГ-ДГЭ: 0,1 и 0,6 мг/мл, соответственно. Сшивка проходила за счет реакции между карбоксильной группой ПМАО и эпоксидной группой ПЭГ-ДГЭ (Рис. III.50в, реакция (1)). В результате олигомерные цепи ПЭГ были включены в оболочку на поверхности НАФ. Анализ ИК-Фурье спектров образцов (Рис. III.51а) показал наличие спектральной полосы при 1090 см^{-1} , относящейся к асимметричным деформационным колебаниям эфирной связи -С-О-С- на спектрах 2 и 3. С увеличением концентрации ПЭГ-ДГЭ эти полосы усиливались, что указывает на наличие фрагментов цепи -CH₂-CH₂-О- на поверхности НАФ. Сильная полоса вибрационных колебаний -С=О (при 1735 см^{-1}), практически, одинакова у всех образцов. Пик поглощения при 1580 см^{-1} , соответствующий асимметричным колебаниям -СОО- карбоксильной группы, а также пик при 1418 см^{-1} , отнесенный к -ОН той же группы, увеличиваются при повышении концентрации ПЭГ-ДГЭ. Полоса при 1180 см^{-1} , относящаяся к -С-О-С- сложноэфирной группы, уменьшается с повышением концентрации ПЭГ-ДГЭ. [376]

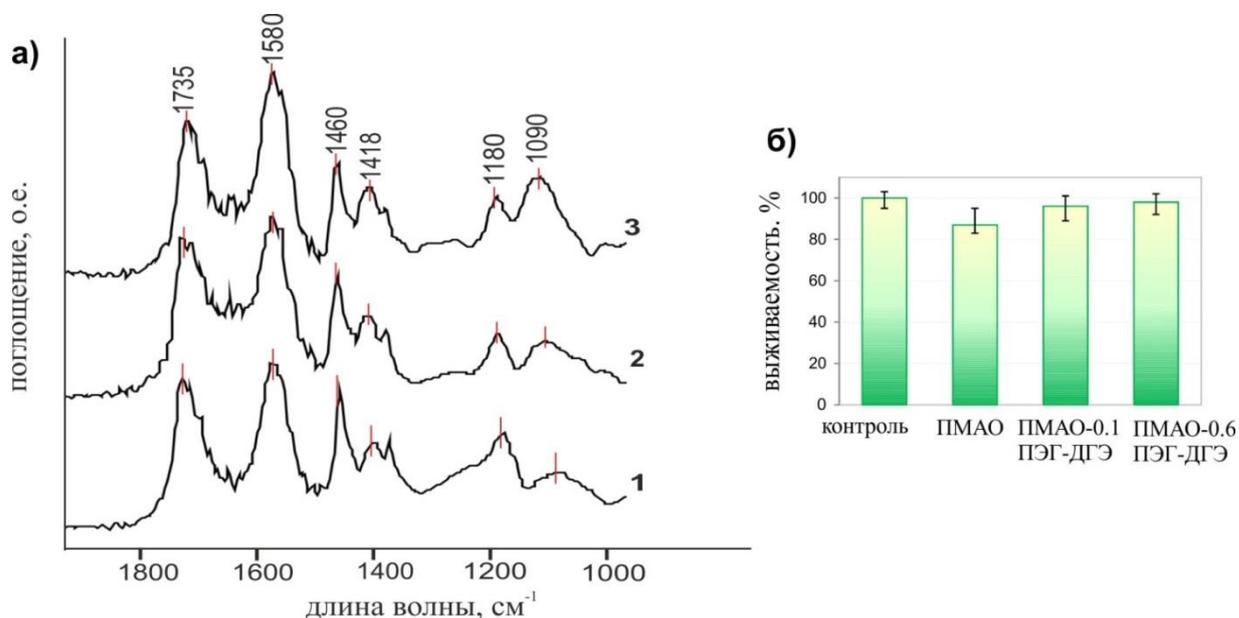


Рисунок III.51. ИК-Фурье спектры НАФ, модифицированных ПМАО (1); ПМАО с 0,1 мг/мл ПЭГ-ДГЭ (2); ПМАО с 0,6 мг/ ПЭГ-ДГЭ (3) (а); Выживаемость дермальных фибробластов по результатам проточной цитометрии (б).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что не только карбоксильные группы принимают участие в реакции сшивки, но также и негидролизованые группы малеинового

ангидрида, скрытые от воды гидрофобными цепями октадецена, поскольку ПЭГ-ДГЭ является более гидрофобным соединением по сравнению с водой. Реакция малеинового ангидрида, входящего в состав цепи ПМАО, с ПЭГ-ДГЭ представлена на **Рис. III.51в** как реакция (2). Она состоит из двух стадий: на первой стадии проходит реакция гидролизованного ПЭГ-ДГЭ (он легко подвергается гидролизу в водном растворе с раскрытием эпоксидного кольца) с образованием карбоксильной группы и сложного эфира; на следующей стадии протекает реакция с эпоксидными группами по такой же схеме, как реакция (1). [401] Таким образом, добавление ПЭГ-ДГЭ приводит к образованию «короны» из ПЭГ-молекул и позволяет регулировать концентрацию карбоксильных групп, которые необходимы для биоконъюгации с направляющими молекулами при адресной доставке, а также поддерживают коллоидную стабильность НАФ за счет электростатического отталкивания.

Увеличение концентрации ПЭГ-ДГЭ приводило к более узкому распределению НАФ по размерам и уменьшению среднего диаметра, что, вероятно, связано с уплотнением полимерной оболочки после реакции сшивки. Стоит отметить, что дзета-потенциал понижался при сшивке (**Рис. III.52а**), несмотря на отсутствие заряда у ПЭГ. Такое снижение дзета-потенциала в зависимости от концентрации ПЭГ-ДГЭ может быть вызвано образованием карбоксильной группы, которая несет отрицательный заряд. Полученные наноструктуры НАФ оставались коллоидно-стабильными в течение более 2 месяцев и не подвергались воздействию электролитов.

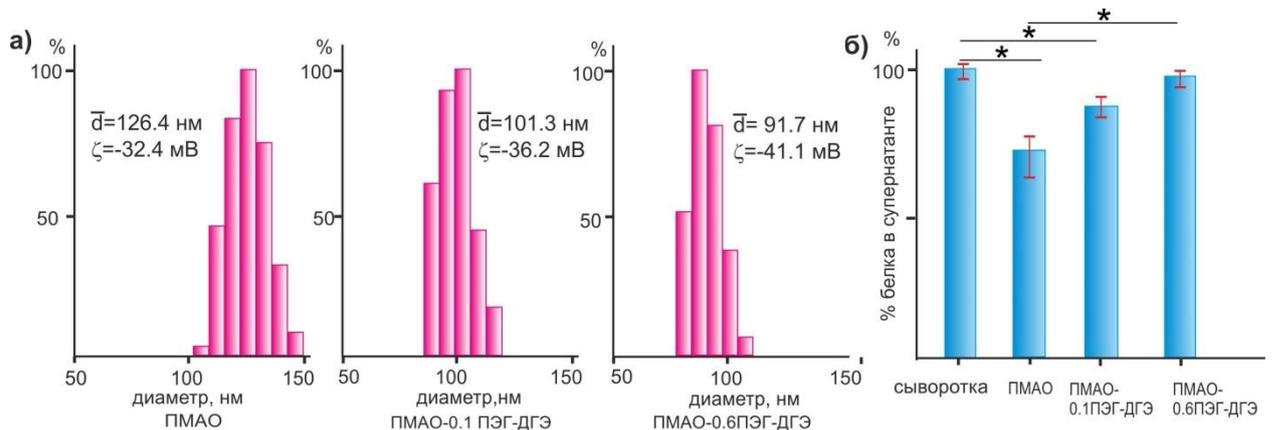


Рисунок III.52. Распределение наночастиц по размеру и дзета-потенциал НАФ, модифицированных с помощью РМАО и РМАО с последующей модификацией ПЭГ-ДГЭ в концентрациях 0,1 и 0,6 мг/мл, буфер PBS (рН 7,0) (**а**); содержание белка (%) в чистой сыворотке и сыворотке (надосадочная жидкость) после инкубации и центрифугирования с НАФ, модифицированными ПМАО и ПМАО с последующей модификацией ПЭГ-ДГЭ в концентрациях 0,1 и 0,6 мг/мл (*: p < 0,05) (**б**). [398]

Спектры флуоресценции наноструктур НАФ, содержащих ПЭГ молекулы на поверхности, не претерпевали изменений в физиологическом диапазоне рН (от 6 до 8) и концентрации хлорида натрия (от 0,01 до 0,5 М).

Важной характеристикой наноструктур является их длительное время циркуляции в крови, которое непосредственно связано с отсутствием или низкой неспецифической адсорбцией белков крови. Для исследования адсорбционной способности и стабильности образцов НАФ в биологических жидкостях 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-ПМАО (без сшивающего агента) по сравнению с чистой сывороткой ($p < 0,05$) (**Рис. III.52б**). В этом случае средний диаметр НАФ-ПМАО увеличивался на 17% (147,2 нм против 126,4 нм) и наблюдалось образование агрегатов (около 4%). Количество белка в супернатантах после инкубации с НАФ-ПМАО, содержащих сшивающий агент ПЭГ-ДГЭ, было выше, чем в образце без агента ($p < 0,05$). Следует отметить, что при увеличении концентрации ПЭГ-ДГЭ концентрация белка в супернатанте возрастала и, следовательно, меньшее количество белка адсорбировалось на поверхности наноструктур. После инкубации в сыворотке распределение частиц НАФ-ПЭГ-ДГЭ по размеру при всех концентрациях сшивающего агента практически не изменялось, и агрегаты не формировались. Увеличение диаметра для НАФ-0,1ПЭГ-ДГЭ составляло 14% (116,3 нм против 101,3 нм) и 11% для НАФ-0,6ПЭГ-ДГЭ (102,1 нм против 91,7 нм). Таким образом, ПЭГ-содержащий сшивающий агент предотвращал адсорбцию белка и обеспечивал стерическую стабилизацию НАФ, модифицированных при участии ПМАО.

Исследование цитотоксичности образцов НАФ 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. Для маркировки поврежденных клеток добавляли маркер целостности клеточной мембраны – йодид пропидия (PI). Неповрежденные мембраны живых клеток непроницаемы для PI, в то время как PI проходит через мембраны поврежденных или мертвых клеток и их ДНК окрашиваются. Найдено, что жизнеспособность фибробластов практически не изменилась при инкубации всех образцов в тестируемой концентрации (**Рис. III.51б**). Следовательно,

использование ПЭГ-ДГЭ для создания «короны» на поверхности НАФ позволяет получать биосовместимые, нетоксичные наноструктуры НАФ, пригодные для биоанализа.

III.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 мышей Balb/c. **Рис. III.53б** иллюстрирует распределение наноструктур НАФ в образцах крови, полученное с использованием антистоксового флуоресцентного микроскопа, разработанного во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника». Уникальные свойства НАФ, такие как возбуждение и эмиссия в окне «прозрачности биоткани», позволяют детектировать интенсивный флуоресцентный сигнал от одиночного нанофосфора в образцах цельной крови. **Рис. III.53а** демонстрирует зависимость количества НАФ в кровеносной системе от времени циркуляции, полученную путем прямого подсчета НАФ на изображениях. Как видно, НАФ-ПМАО без сшивающего агента быстро выводятся из системы кровообращения: почти 15-кратное снижение концентрации за первые 2 минуты.

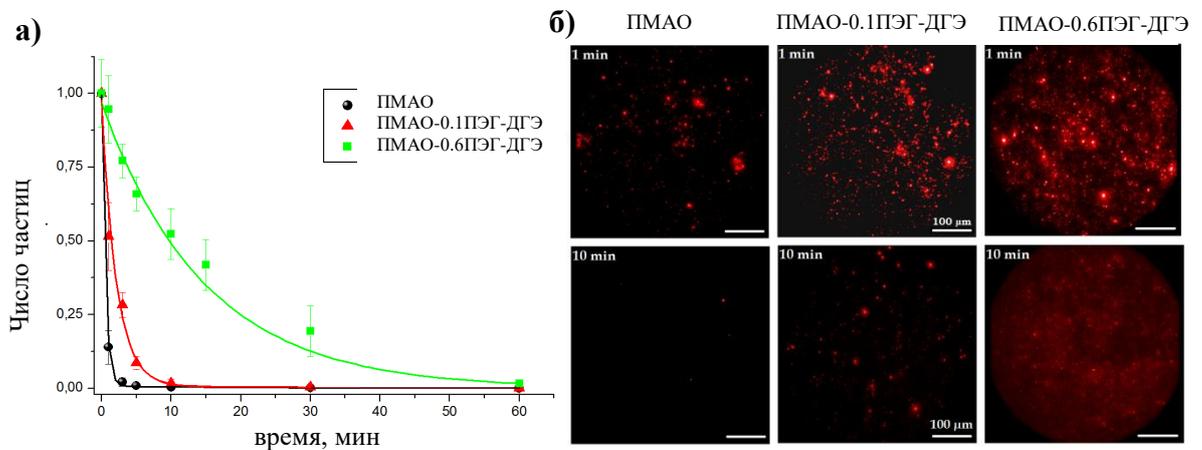


Рисунок III.53. Нормированная зависимость концентрации НАФ, модифицированных ПМАО и ПМАО с добавлением сшивающего агента ПЭГ-ДГЭ в концентрациях 0,1 и 0,6 мг/мл, от времени кровообращения. Данные получены от 15 мышей (5 мышей на образец) **(а)**; Флуоресцентные изображения образцов крови мышей, взятые с интервалами 1 и 10 минут после введения НАФ, модифицированных ПМАО и ПМАО с последующим добавлением сшивающего агента ПЭГ-ДГЭ в концентрациях 0,1 и 0,6 мг/мл **(б)**. [398]

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. III.53a**). Следует отметить, что отдельные наночастицы детектировали в образцах крови в течение всего периода наблюдения (до 180 мин). НЧ обычно удаляются из кровообращения ретикулоэндотелиальной системой - преимущественно клетками Купфера печени и макрофагами селезенки, что приводит к накоплению НЧ в этих органах. [402] Известно, что покрытие из полиэтиленгликоля уменьшает фагоцитоз макрофагами и адсорбцию белков крови, тем самым увеличивая время циркуляции в крови. [403] В наших экспериментах при использовании высокой концентрации (0.6 мг/мл) сшивающего агента на поверхности НЧ формировалась ПЭГ-содержащая оболочка со свойствами, необходимыми для их длительного кровообращения.

Из литературы известно [309], что НЧ с отрицательным зарядом поверхности меньше захватываются клетками и накапливаются в органах по сравнению с положительно заряженными НЧ. В отличие от нейтрально заряженных НЧ отрицательно заряженные практически не агрегируют. В данной работе показано, что создание ПЭГ-«короны», сопровождаемое снижением дзета-потенциала при повышении концентрации ПЭГ-ДГЭ, привело к значительному увеличению времени циркуляции в кровотоке в случае максимально введенной концентрации сшивающего агента.

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 сосудистую сетку опухоли и остаются в ней из-за слабого лимфодренажа, что лежит в основе EPR-эффекта (**Рис. III.54**). Рост опухоли в значительной степени зависит от ангиогенеза: формирование новых кровеносных сосудов происходит из уже существующих для обеспечения растущих потребностей в питательных веществах [404]. В сосудистой системе опухоли отсутствует обычная иерархия и есть аномально разветвленные, неоднородные кровеносные сосуды со слепыми петлями. Одним из следствий этих сосудистых аномалий является неравномерность кровоснабжения опухоли. Опухолевая система кровеносных сосудов в отличие от нормальной обладает высокой проницаемостью благодаря аномальной базальной мембране, низкой адгезии перицитов и характеризуется быстрой пролиферацией эндотелиальных клеток, вызванной производством избытка проангиогенных факторов. Размер просвета опухолевых сосудов варьируется от 100 нм до 1 мкм, что обеспечивает накопление НЧ в опухоли. [405]

Отсутствие лимфодренажа в опухолевой ткани препятствует утечке НЧ, что обеспечивает их долгое пребывание в солидной опухоли. Это свойство опухоли совместно

с проницаемостью кровеносных сосудов в опухоли ответственны за EPR-эффект. Таким образом, EPR-эффект обеспечивает преимущественное накопление НЧ в опухолевой ткани по сравнению с кровью и тканями в норме.

Для оценки распределения наноструктур НАФ в опухоли на основе EPR-эффекта использовали специально разработанную эпилюминесцентную систему визуализации, разработанную во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника». Сигнал от наноструктур анализировали после их внутривенного введения в ретроорбитальный синус мышей с перевитой карциномой легкого Льюиса (LLC) (**Рис. III.55**). [384] Следует отметить, что острой системной токсичности и аллергических реакций зарегистрировано не было.

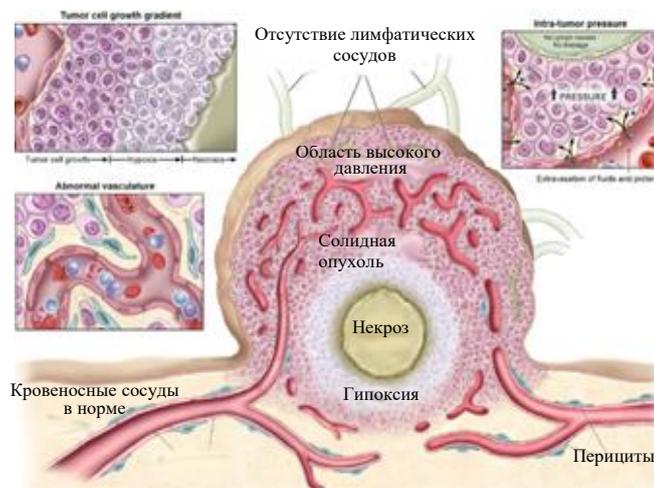


Рисунок III.54. Схематическое изображение солидной опухоли (адаптировано из [406])

В месте инъекции наблюдали быстрое исчезновение сигнала, а через 1 мин флуоресценцию детектировали в опухоли у 15 исследованных животных. Через 2 мин свечение в опухоли уменьшалось, что, вероятно, было связано с перераспределением наноструктур по органам. Флуоресцентный сигнал начинал усиливаться в опухоли по сравнению с другими тканями через 5 мин и достигал максимума через 1 час после инъекции, а затем оставался в опухоли на этом уровне в течение 2 дней. Такой эффект был отмечен у всех наноструктур НАФ. **Рис. III.55** иллюстрирует накопление НАФ–0.6 ПЭГ–ДГЭ в карциноме легкого LLC через 1 ч. после инъекции.

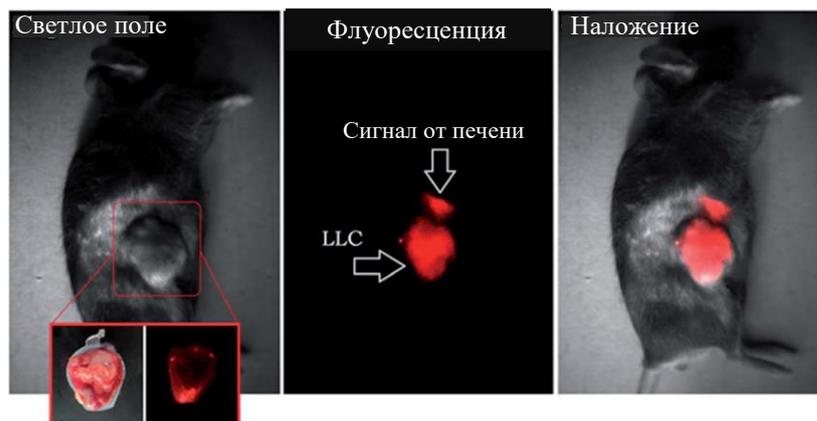


Рисунок III.55. Доставка НАФ–0.6 ПЭГ–ДГЭ в карциному легкого Льюиса (LLC) за счет EPR-эффекта. Изображения *in vivo* сделаны через 1 ч после внутривенного введения. На вставке: эпилюминесцентное изображение среза опухоли *ex vivo*. [398]

Найдено, что наноструктуры в основном накапливаются на периферии опухоли (**Рис. III.55**, 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. III.56**). Для НАФ-РМАО с наибольшей концентрацией ПЭГ–ДГЭ (0,6 мг/мл) получен максимальный сигнал, однородно распределенный в патологической ткани. Диаметр таких наноструктур составляет 91,7 нм (**Рис. III.52а**). Данный размер попадает диапазон диаметров НЧ от 10 до 100 нм, которые, как известно, эффективно проникают и удерживаются в опухоли. Кроме того, данные наноструктуры имеют отрицательный заряд поверхности и содержат ПЭГ-оболочку. Эти характеристики соответствуют требованиям пассивной доставки и накопления в солидной опухоли. [309]

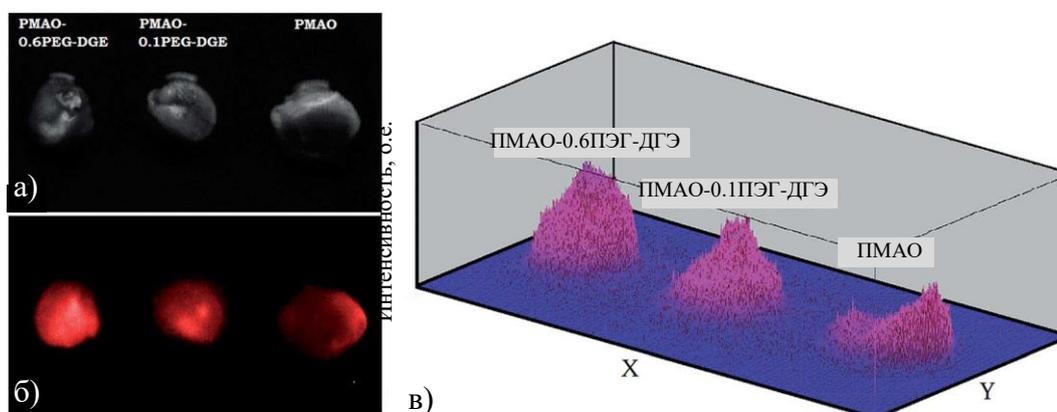


Рисунок III.56. Изображения солидных опухолей у мышей, которым внутривенно вводили НАФ-РМАО, НАФ-РМАО-0.1ПЭГ-ДГЭ и НАФ-РМАО-0.6 ПЭГ-ДГЭ в буфере PBS, pH

7.2, *ex vivo* (а) и эпилюминесцентные (б); 3D-реконструкция эпилюминесцентного сигнала (в).[398]

Биофункционализация методом замены растворителя при использовании амфифильного полимера ПМАО с последующим созданием ПЭГ-«короны» позволяет получать коллоидно-стабильные в водной среде наноструктуры НАФ. Молекулы ПЭГ благодаря их гидрофильности и стерическому отталкиванию существенно снижают неспецифические взаимодействия НАФ–ПМАО с белками сыворотки крови. В результате наблюдается значительное увеличение времени кровообращения наноструктур с ПЭГ до 1 часа, что приводит к эффективной доставке и накоплению НАФ в опухоли за счет EPR-эффекта. Высокая чувствительность детекции наноструктур НАФ-ПЭГ, введенных внутривенно мышам с моделью опухоли LLC, была продемонстрирована с помощью разработанной эпилюминесцентной системы визуализации. [398]

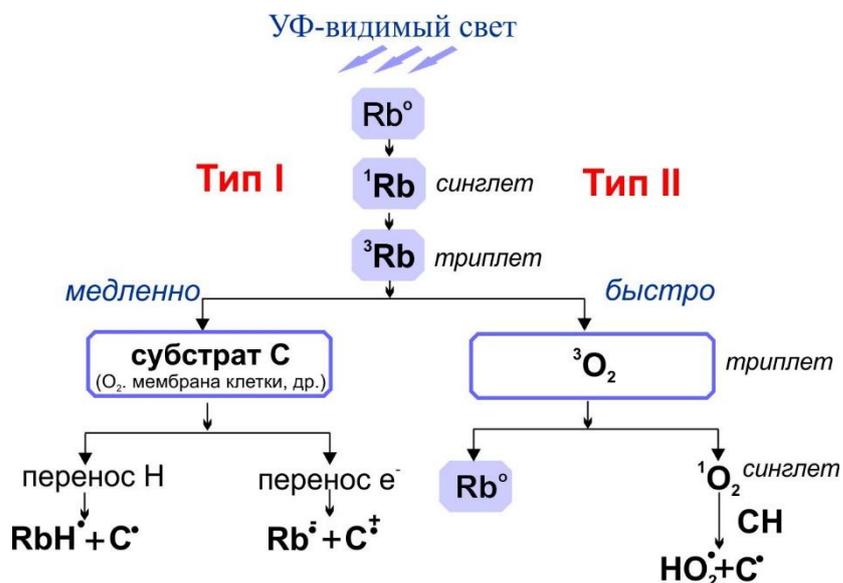
III.2.4. Фотодинамическая терапия с использованием наноструктур на основе НАФ

Одним из современных, перспективных и малоинвазивных методов разрушения раковых опухолей является фотодинамическая терапия (ФДТ), которая оказывает наименьшее воздействие на здоровые ткани, отличается высокой эффективностью при минимальном количестве побочных эффектов и осложнений. ФДТ является методом лечения раковых опухолей под действием света совместно с применением фотосенсибилизаторов, генерирующих активные формы кислорода, которые вызывают гибель злокачественных клеток. В настоящее время активно применяют на практике в качестве фотосенсибилизаторов порфирины, хлорины, бензопорфирины, фталоцианины и нафталоцианины. 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 разработка новых подходов для проведения ФДТ. [407]

Эффективные фотосенсибилизаторы должны иметь крайне низкую токсичность, селективно накапливаться в опухоли по сравнению с нормальной тканью, относительно быстро выводиться из организма, быть гидрофильными для осуществления доставки в опухоль, иметь неизменный состав, высокий квантовый выход в триплетном состоянии, обеспечивающим перенос энергии для образования синглетного кислорода, иметь выраженное поглощение в красной области спектра, поскольку такой свет лучше всего проникает в ткани. [408]

Одним из перспективных соединений для использования в качестве фотосенсибилизатора является рибофлавин, также известный как витамин В2, который имеет эндогенную природу и способен генерировать активные формы кислорода под действием УФ-видимого света. Рибофлавин является основным биохимическим источником флавинов в клетке, образуя флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид, которые играют жизненно важную роль в клеточном метаболизме. Роль флавинов в клетке определяется их способностью к переносу заряда в реакциях окисления/восстановления. При патологических состояниях, включая онкогенез, метаболизм и потребление рибофлавина усиливаются, иногда за счет поступления в другие ткани. В работе [409] показано, что накопление рибофлавина в клетках рака молочной железы человека является специфическим, рецептор-опосредованным и более эффективным, чем в случае широко используемой фолиевой кислоты.

Возбуждение флавинов светом из УФ-видимой спектральной области приводит к образованию либо синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) за счет передачи энергии кислороду из окружающей среды (Тип II, как показано на схеме), либо перекиси водорода и ее производных в процессе радикальной реакции (Тип I) [408]. Эти продукты известны, как активные формы кислорода (АФК). Свойство флавинов генерировать АФК известно давно, что позволяет их использовать для антивирусной и антибактериальной дезинфекции [410], для укрепления ткани роговицы с помощью АФК-индуцированной реакции сшивки коллагена [411]. Кроме того, рибофлавин благодаря фототоксичности подавляет рост солидной опухоли путем ингибирования экспрессии факторов роста опухоли. [412]



Рибофлавин является нетоксичным продуктом и его применение одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. Food and Drug Administration, FDA), 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 инфракрасный (ИК) свет на длине волны 975 нм в свет из УФ-видимого диапазона, необходимый для возбуждения фотосенсибилизатора для проведения ФДТ. [413]

На первом этапе работы исследовали фотофизические и фототоксические свойства рибофлавина в его водорастворимой форме флавиномононуклеотида (ФМН) с использованием клеточных культур и живых лабораторных животных с целью продемонстрировать его возможности для лечения раковых опухолей. Для ФМН характерна широкая полоса поглощения с двумя пиками при 375 и 450 нм, что придает ему характерный желто-оранжевый цвет (**Рис. III.57а**).

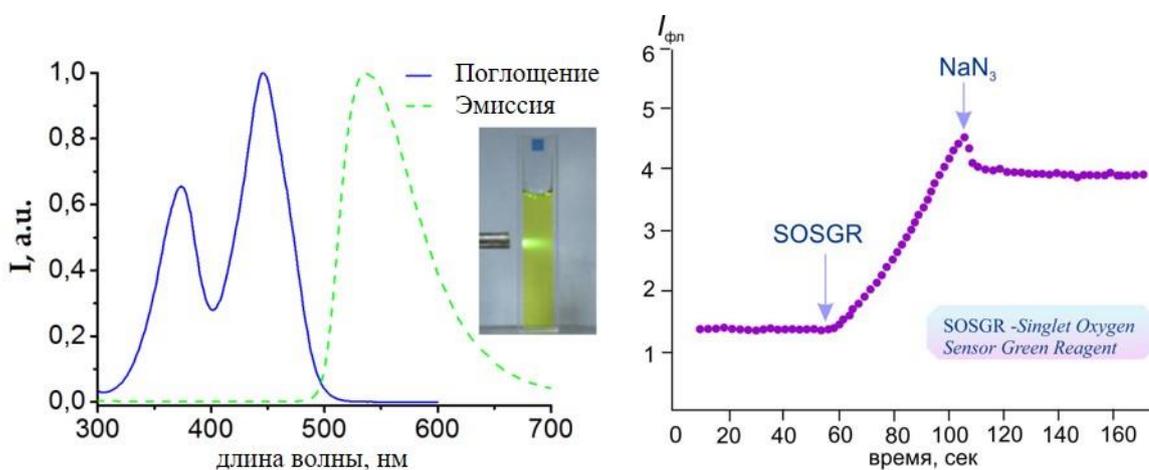


Рисунок III.57. Спектры поглощения и флуоресценции флавиномононуклеотида. На вставке раствор ФМН (**а**); *In vitro* анализ генерации синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) в водном растворе ФМН с концентрацией 100 мкМ с использованием флуоресцентного реагента SOSGR для детекции синглетного кислорода.

Для анализа способности ФМН генерировать синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) в водном растворе *in vitro* использовали коммерческий реагент S36002 Singlet Oxygen Sensor Green Reagent (SOSGR). Наличие в системе синглетного кислорода детектировали по максимуму спектра флуоресценции на длине волны 525 нм при возбуждении светом с длиной волны

405 нм. Данный препарат не чувствителен к пероксиду водорода и другим активным формам кислорода. Как видно (**Рис. III.57б**), флуоресценция SOSG при 525 нм заметно возрастала с течением времени в тестируемом растворе ФМН, что доказывает генерацию $^1\text{O}_2$. Добавление азиды натрия (NaN_3), который является тушителем образования синглетного кислорода, приводило к выходу на плато флуоресцентного сигнала SOSGR, то есть рост сигнала прекращался. Это указывает на ингибирование процесса наработки синглетного кислорода и подтверждает достоверность детекции.

Фотоцитотоксическое действие ФМН реализуется преимущественно за счет фотогенерации $^1\text{O}_2$ [414]. На **Рис. III.58а** показаны результаты МТТ-теста для оценки жизнеспособности клеток линии SK-BR-3 и контрольных клеток CHO после их инкубации с ФМН, циклов промывки и воздействия света с длиной волны 365 нм от светодиода с мощностью 7 мВт/см² в течение 10 мин (см. «Экспериментальную часть»). При концентрации ФМН 30 мкМ в культуральной среде жизнеспособность клеток SK-BR-3 упала до $47 \pm 7\%$ от уровня, зарегистрированного для клеток, необлученных светом. Вероятно, что 30 мкМ ФМН в среде для инкубации клеток (объем среды соответствует объему внеклеточной среды в опухоли), является концентрацией, которая может вызвать гибель клеток аденокарциномы молочной железы без воздействия на окружающие ткани, представленные в эксперименте контрольными клетками CHO. Этот эффект может быть связан с захватом ФМН клетками SK-BR-3, который в 3 и 1,5 раза превышает захват контрольными клетками CHO и фибробластами, соответственно (**Рис. III.58б**). Анализ клеток методом микроскопии через 2 ч. после воздействия света выявил разрушение клеточных мембран клеток SK-BR-3 в виде пузырьков на поверхности поврежденных клеток (**Рис. III.58в**).

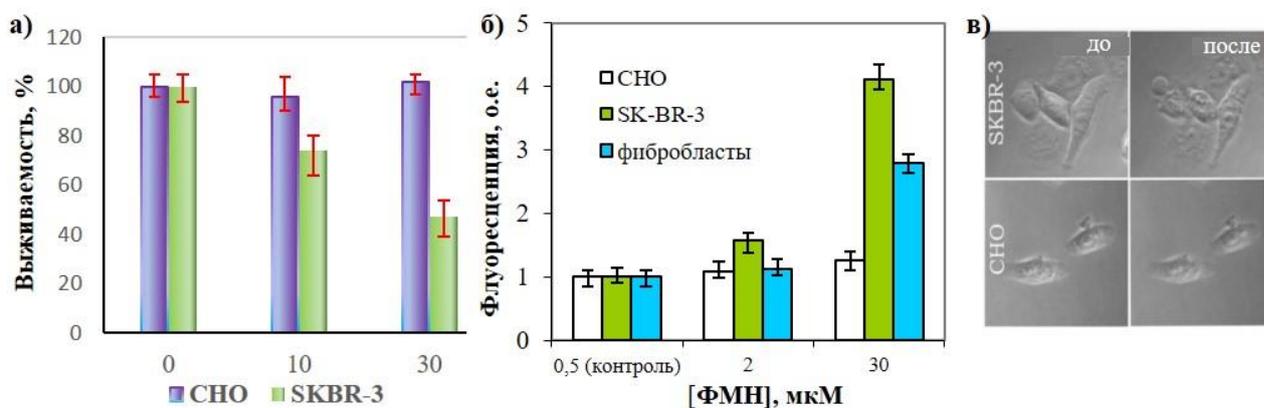


Рисунок III.58. Результаты МТТ-теста клеток после инкубации в течение 90 мин с последующим облучением светом на длине волны 365нм в дозе 4,2Дж/см². [ФМН]: 0, 10,

30 мкМ (а); Интенсивность флуоресценции ФМН при концентрациях ФМН в культуральной среде: 0,5 (контроль), 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 с длиной волны 365 нм (в).

Для определения механизма гибели клеток, предварительно инкубированных с ФМН в течение 6, 12, 24 часов, методом проточной цитофлуориметрии провели анализ активности каспазы-3, свидетельствующей об апоптозе клеток (Рис. III.59). Клетки, предварительно инкубированные с ФМН и облученные светом (процедура ФДТ), показали повышенный уровень активной каспазы-3, сопоставимый с уровнем в клетках положительного контроля, обработанных этопозидом (фотосенсибилизатор, используемый в медицинской практике). В качестве 3-х негативных контролей выступали: клетки, только облученные светом (без ФМН) при длине волны 450 нм в течение 10 минут с мощностью облучения 5,0 Дж/см²; клетки, только инкубированные с ФМН в течение 90 мин (без облучения); необработанные клетки (без ФМН и облучения). Уровень активности каспазы-3 в необработанных клетках был в почти в 2 раза ниже. Анализ результатов показал, что воздействие света 450 нм в сочетании с предварительной инкубацией с ФМН имело значительный цитотоксический эффект на клетки SKBR-3 (Рис. III.59а). Эти данные свидетельствуют, что апоптоз является наиболее вероятным механизмом гибели клеток при ФДТ с участием ФМН в качестве фотосенсибилизатора. На Рис. III.59б приведены изображения с флуоресцентного сканирующего конфокального микроскопа клеток SK-BR-3 через 12 ч после облучения светом с длиной волны 450 нм, меченых с использованием методов иммуоцитохимии. Первичные антитела для мечения были получены против активной

каспазы-3.

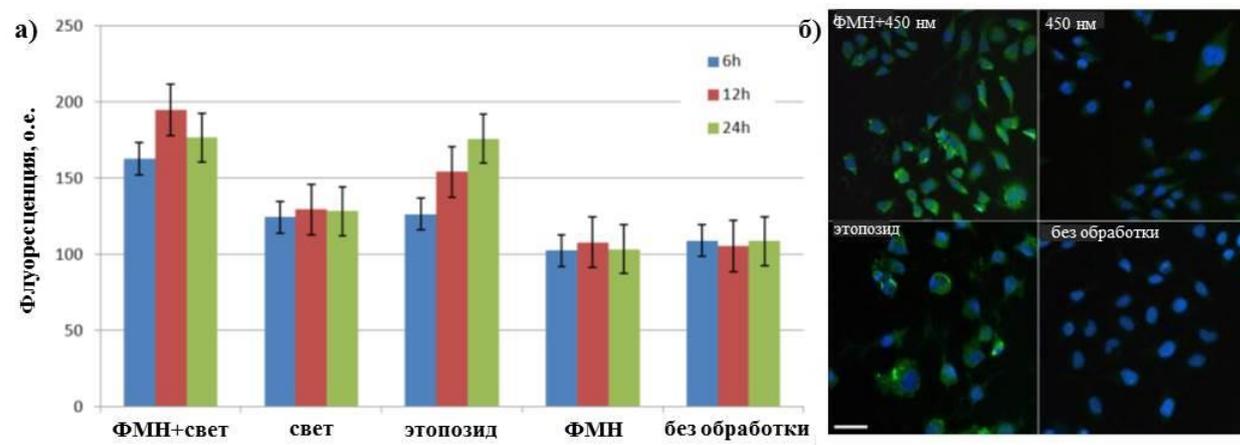


Рисунок III.59. Гистограмма экспрессии активной каспазы-3 в клетках SK-BR-3, предварительно инкубированных с ФМН, с этопозидом 40 мкМ (положительный контроль) и облученных светом с длиной волны 450 нм; облученных только светом 450 нм без ФМН; только инкубированных с ФМН без облучения, необработанных (3 отрицательных контроля) (**а**); Изображения с конфокального микроскопа экспрессии активной каспазы-3 в SK-BR-3 через 12 ч после облучения клеток. Зеленый и синий цвета показывают сигналы флуоресценции от FITC-конъюгированных анти-каспаз-3 моноклональных антител и Hoechst, соответственно, которые демонстрируют активность каспазы-3 и морфологию ядер клеток. Шкала 50 мкм (**б**).

Возможность достижения в опухоли концентрации ФМН, при которой будет наблюдаться фототоксический эффект, продемонстрирована на мышах с перевитым раком легких Льюиса с помощью эпилюминесцентной визуализирующей системы. Через 12 часов после внутривенного введения 3 мг ФМН на умерщвленном животном хирургическим путем экспонировали опухоль и получали флуоресцентные изображения (**Рис. III.60**). В качестве образца сравнения использовали кювету с водным раствором ФМН (30 мкМ). Сигнал флуоресценции от опухоли (показан стрелкой) превысил почти в два раза сигнал от эталонной кюветы с ФМН, т.е. в опухоли можно получить фототоксическую концентрацию ФМН, необходимую для проведения ФДТ. Сравнение сигналов флуоресценции ФМН в биологической ткани и прозрачном растворе 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 [415].

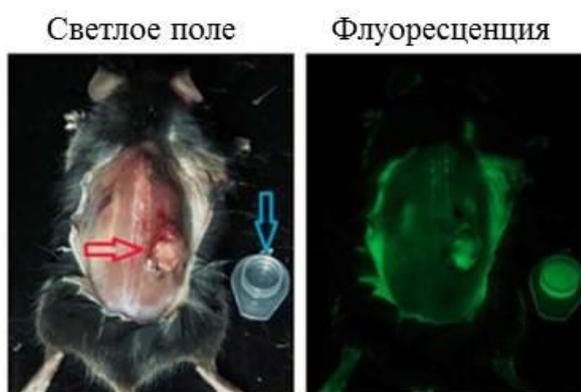


Рисунок III.60. Светлопольное и эпилюминесцентное изображения мышей BDF1 с карциномой легкого Льюиса, привитой на спине (отмечена красной стрелкой). Пластиковая кювета рядом с животным содержит ФМН с концентрацией ≈ 30 мкМ (отмечена синей стрелкой). Эпилюминесцентное изображение получено при возбуждении 450 нм; спектральная полоса регистрации флуоресценции составляла 500–570 нм.

Для проведения ФДТ с участием рибофлавина необходимо доставить ультрафиолетовый свет возбуждения на весь объем раковой опухоли. Этому препятствует сильное поглощение биологической ткани в этом спектральном диапазоне. Например, свет с длиной волны 340 нм проникает на глубину ≈ 60 мкм, достигая самого верхнего жизнеспособного слоя эпидермиса в коже человека. [416] 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. [417].

В данной работе для фотосенсибилизации ФМН использовали НАФ, которые способны к преобразованию ближнего ИК-света в УФ-видимый свет на глубине биоткани не менее сантиметра. С этой целью был оптимизирован состав легирующих компонентов и кинетика реакции при синтезе НАФ для получения эффективной ультрафиолетовой полосы флуоресценции. Получены НАФ со структурой ядро/оболочка ($d=50\pm 7$ нм) с использованием метода термического разложения. В качестве ядра выступала матрица β - NaYF_4 , имеющая гексагональную кристаллическую структуру, допированная ионами Yb^{3+} и Tm^{3+} в молярных отношениях 18% и 0,6%, соответственно; и неактивная кристаллическая оболочка NaYF_4 (**Рис. III.61а,б**): в сокращенном виде $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$. Спектр флуоресценции синтезированных НАФ приведен на **Рис. III.61в**. В результате был получен беспрецедентно высокий коэффициент апконверсии $\eta_{\text{ап}}^{(\text{УФ-синий})}=2,0 \pm 0,2\%$ при мощности возбуждения 50 Вт/см^2 , а интегральное значение коэффициента апконверсии достигало $\eta_{\text{ап}}=9,5\pm 0,2\%$ (**Рис. III.61г**).

Две полосы дублетов в УФ-синем диапазоне спектра фотолуминесценции (**Рис. III.62а**) прямо попадают в полосу поглощения ФМН, что делает возможным создание донорно-акцепторной пары НАФ-ФМН, в которой реализуется резонансная передача энергии (RET). Передача энергии может осуществляться от донора к акцептору, в частности, за счет переноса световой энергии (LRET) через фотоны, что является дальнедействующим процессом. Кроме того, донор может передавать энергию без излучения (Фёрстеровская безызлучательная передача энергии, FRET), что является очень эффективным процессом (измеряется в десятках процентов) при условии, что акцептор, расположен в нанометровой близости (обычно <10 нм), причем вероятность процесса зависит от расстояния, как r^{-6} (r - расстояние между донором и акцептором).

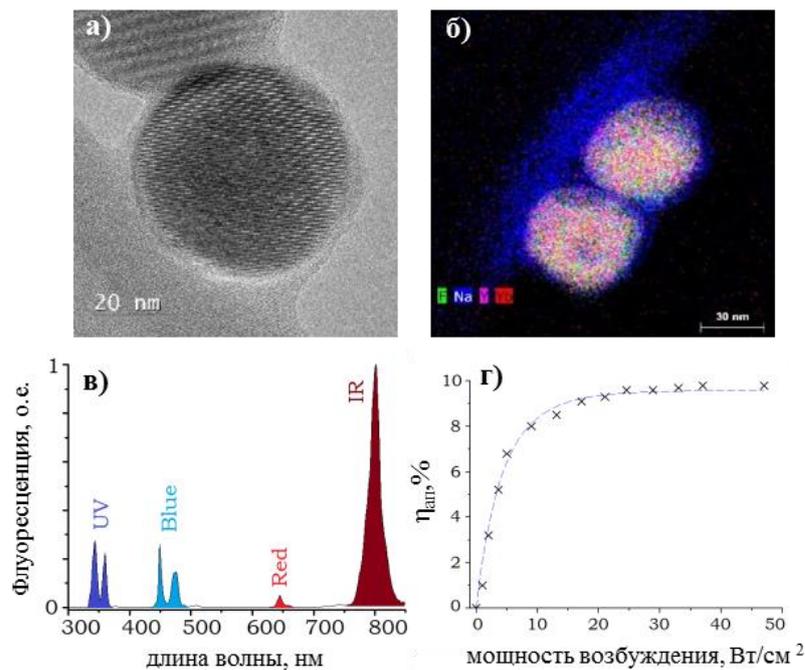


Рисунок III.61. ПЭМ изображение НАФ, отображающее кристаллическую решетку (а) и элементный состав наночастиц (б); Спектр излучения НАФ при возбуждении лазером с длиной волны 975 нм при мощности 50 Вт/см². Представлены сильные ультрафиолетовые и синие спектральные полосы (в); Коэффициент апконверсии НАФ в зависимости от мощности возбуждения при 975 нм, измеренный с использованием калиброванной интегрирующей сферы. Выход на плато был зарегистрирован при ~ 25 Вт/см² (г).

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, что является проблемой, поскольку НАФ имеют структуру ядро/неизлучающая оболочка от 3 до 10 нм, а также полимерное покрытие, экранирующее НАФ от воздействия окружающей среды. Так, наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$, модифицированные амфифильным сополимером малеинового ангидрида и октадецена (ПМАО), характеризовались низкой эффективностью FRET процесса. Хороший выход при безызлучательной передаче энергии от донора к акцептору был получен для наноструктур НАФ-ФМН, в которых НАФ гидрофилизировали методом замены растворителя при участии низкомолекулярного ТМАГ (см. п. III.1.3.3) (Рис. III. 62б). При таком способе модификации происходило частичное удаление олеиновой кислоты с поверхности НАФ без формирования полимерного покрытия. Это создало возможность для получения наноструктур, в которых поверхность НАФ была доступна для небольших молекул ФМН. Для коллоидной стабильности наноструктур НАФ-ТМАГ-ФМН в условиях экспериментов

in vitro и на уровне живого организма добавляли полимерный стабилизатор поли-N-винилпирролидон (ПВП), выполняющий также функцию защитной оболочки.

Для исследования процесса передачи энергии в донорно-акцепторной паре НАФ-ФМН кювету, содержащую водные дисперсии наноструктур, облучали светом с длиной волны 975 нм. Спектры флуоресценции были записаны при концентрациях ФМН 0, 0,17 и 0,34 мг/мл (**Рис. III.62б**). Широкополосный сигнал флуоресценции от 500 до 620 нм указывает на FRET-процесс между НАФ и ФМН. Отмечено значительное снижение интенсивности полос в УФ-синем диапазоне спектра НАФ при 360 нм и 475 нм, что также подтверждает безызлучательную передачу энергии в наноструктуре НАФ-ФМН.

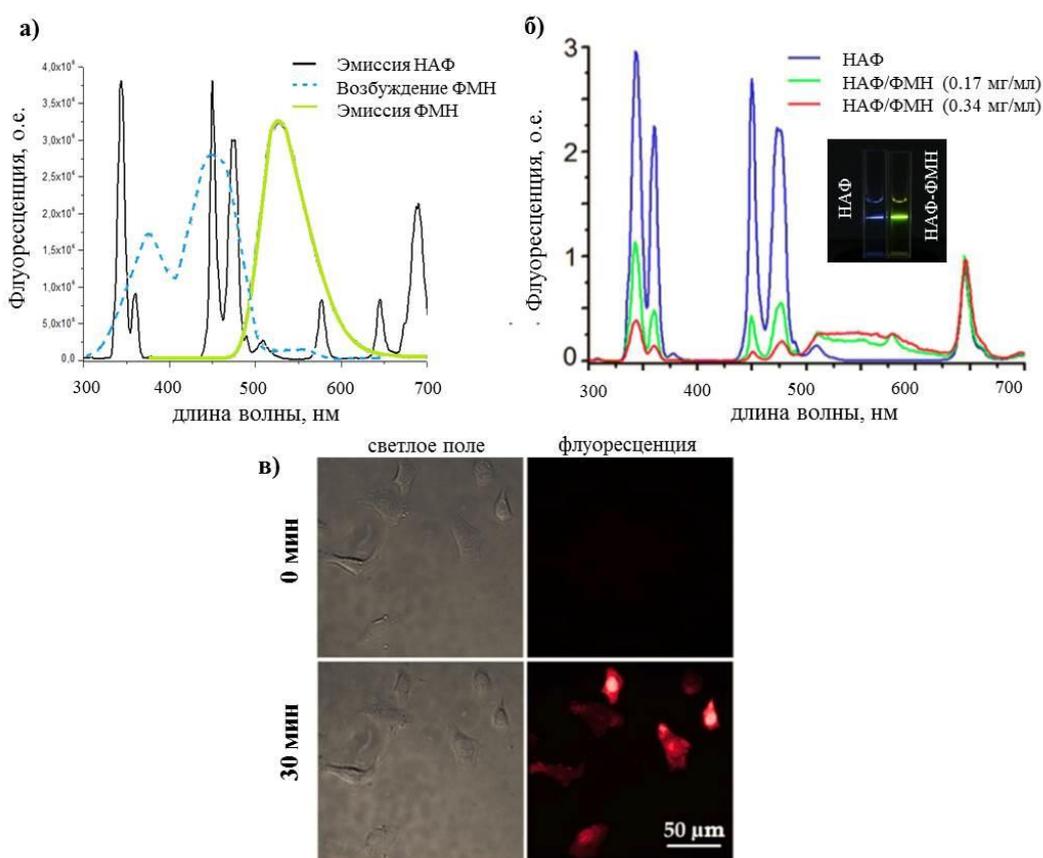


Рисунок III.62. Спектры флуоресценции ФМН и НАФ, спектр поглощения ФМН (**а**); Спектры флуоресценции НАФ и наноструктур НАФ-ТМАГ-ФМН с концентрациями ФМН 0,17 и 0,34 мг/мл при возбуждении светом с длиной волны 975 нм. (**б**); Демонстрация эффекта фототоксичности наноструктур НАФ-ФМН на клетки SK-BR-3 после облучения лазером с длиной волны 975 нм. Светлопольные (слева) и флуоресцентные изображения с йодидом пропидия (справа) до (верхние изображения) и после облучения (нижнее изображение), где появление сигнала от йодида пропидия указывает на разрушение клеточных мембран (**в**).

Фототоксическое действие пары НАФ-ФМН было продемонстрировано на линии клеток SK-BR-3 *in vitro*. Наноструктуры НАФ-ФМН иммобилизовали на плазматической мембране клеток при комнатной температуре, добавляли 100 мкМ ФМН для реализации всех механизмов резонансной передачи энергии, затем облучали светом с длиной волны 975 нм с целью достичь дозы облучения 600 Дж/см². Данный процесс приводил к генерации АФК, вызывающих гибель клеток, которую исследовали с помощью йодида пропидия. Как видно (**Рис. III.62в**), через 30 минут после облучения клетки становились проницаемыми для йодида пропидия, который регистрировали в красном флуоресцентном канале. Появление флуоресценции указывало на то, что гибель клеток произошла в результате АФК-опосредованного разрушения клеточных мембран.

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. Иммунодефицитным мышам Balb/c nu/nu (10 животных) подкожно инокулировали (см. «Экспериментальная часть») клетки SK-BR-3 $\approx 2 \times 10^6$ и выращивали в течение 15 дней до достижения объема опухоли порядка $120 \pm 15 \text{ мм}^3$ (**Рис. III.63а**). 25 мкг наноструктур НАФ-ФМН и 500 мкМ ФМН в буфере PBS, pH 7.2 вводили в окружающие опухоль ткани (перитуморально) и инкубировали в течение 1,5 ч. с последующим облучением. В качестве контроля выступали лабораторные животные, которым перитуморально вводили наноструктуры НАФ-ФМН без светового воздействия. Для ФДТ *in vivo* использовали диодный лазер (АТС-С4000-200-АМФ-975, Россия), работающий при 975 нм в импульсном режиме (длительность импульса 50 мс, частота 8 Гц). Лазерный свет был подключен к оптоволоконному зонду для гибкой доставки в опухоль (**Рис. III.63б**). Мышь закрепляли на пластине с помощью клейкой ленты. Расстояние между опухолью и волокнистым зондом устанавливали таким образом, чтобы ограничить среднюю интенсивность лазера на уровне $\sim 1,5\text{-}2 \text{ Вт/см}^2$ для предотвращения перегрева опухоли и окружающей ткани. Участок опухоли облучали светом с длиной волны 975 нм в режиме сканирования с дозой 900 Дж/см². Температуру опухоли контролировали с помощью инфракрасной камеры FLIR A655sc (FLIR, США) для обеспечения безопасной физиологической температуры (<41°C).

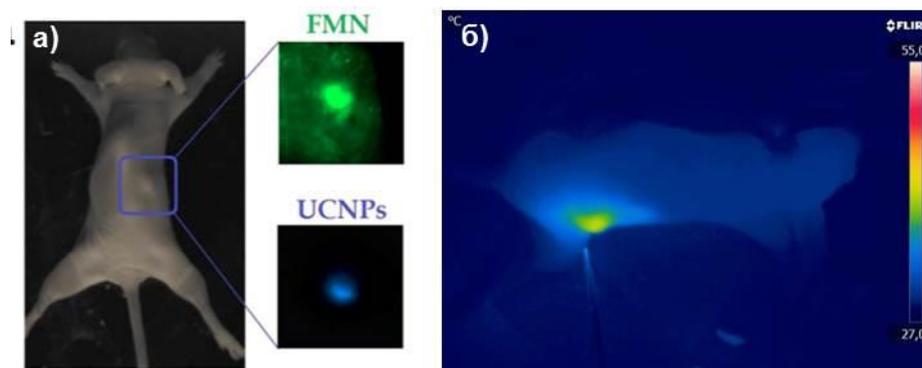


Рисунок III.63. Изображение иммунодефицитной мыши с подкожным ксенографтом опухоли SK-BR-3 через 15 дней после имплантации. Область опухоли выделена синим прямоугольником; на вставке: спектрально-отфильтрованные увеличенные изображения для демонстрации флуоресценции ФМН и НАФ в опухоли с контрастностью 2 и 30, соответственно, демонстрируя преимущество визуализации с помощью НАФ (а); Изображение температурного профиля иммунодефицитной мыши с опухолью SK-BR-3 во время ФДТ при облучении лазером с длиной волны 975 нм (б).

Эффективность ФДТ под действием ближнего ИК-света *in vivo* оценивали путем измерения объема опухоли в течение 50 дней (Рис. III.64а,в). Анализ изменения размера опухоли SK-BR-3 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.

Успешное проведение ФДТ обусловлено участием основных компонентов: НАФ, ФМН и лазерного излучения с длиной волны 975 нм. Исследования показали, что регрессия опухоли была очевидна и статистически значима только при использовании всех трех компонентов (Рис. III.64б). Экспериментально определенная пороговая доза облучения 600 Дж/см² в клеточных экспериментах была увеличена до 900 Дж/см² в экспериментах на животных, чтобы учесть ослабление сигнала, связанное с рассеянием и поглощением живой биологической ткани.

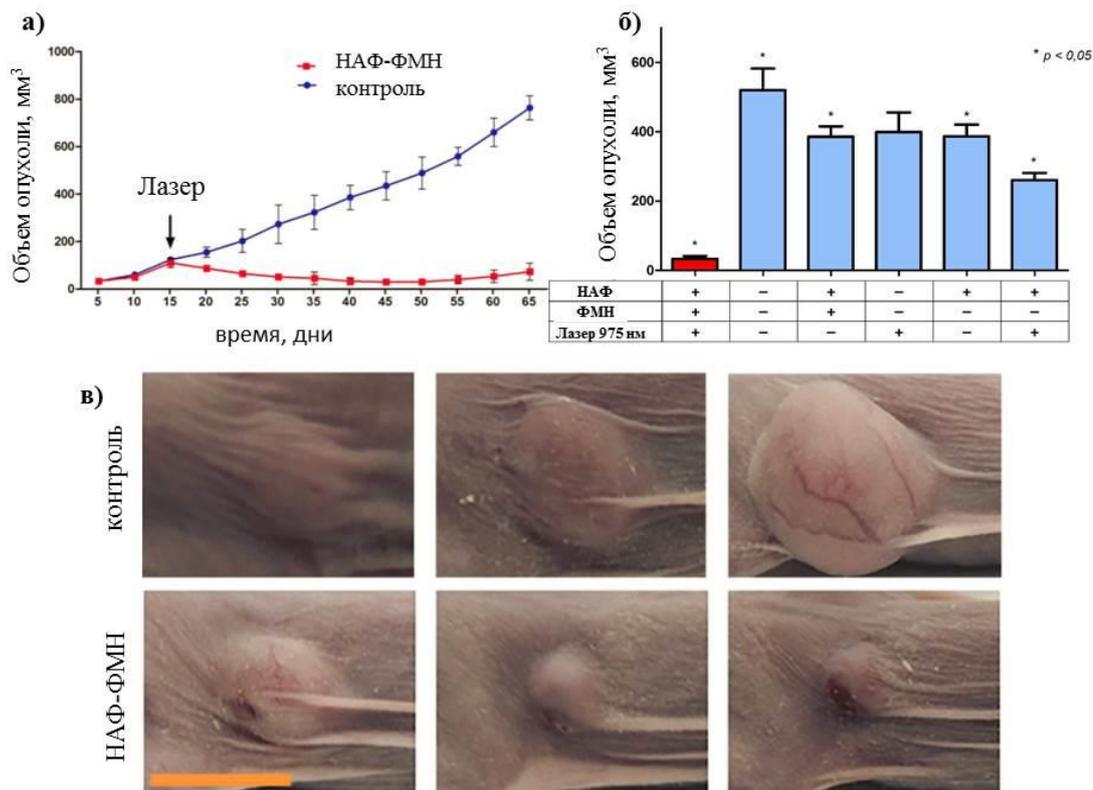


Рисунок III.64. Изменение размера опухоли SK-BR-3 в контрольном эксперименте (без облучения) и после лечения ФДТ (черная стрелка, день 15) (**а**); Гистограмма изменения объема опухоли SK-BR-3 на 25-й день после обработки в сравнении со следующими основными компонентами лечения: НАФ, ФМН и облучение лазером с длиной волны 975 нм в дозе 900 Дж/см². Таблица под гистограммой отображает комбинацию компонентов, где «+», «-» указывают на «использование», «не использование» компонента в процедуре. Статистическая значимость $p < 0,05$ (**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**).

Из литературы известно, что одним из возможных механизмов действия ФДТ является повреждение сосудов опухоли, что приводит к их тромбозу и кровоизлиянию, которые впоследствии вызывают гипоксию опухоли. Для определения механизма протекания ФДТ в предлагаемом подходе через 24 часа после процедуры проводили гистологический анализ срезов опухолевой ткани (**Рис. III.65**). Образцы из контрольной группы животных, которых не облучали, характеризовалась наличием здоровых клеток без патологических изменений. В гистологических срезах животных после обработки светом с длиной волны 975 нм отмечено значительное снижение плотности ядросодержащих клеток. Кроме того, часть области опухоли была заполнена эозинофилами или имела пустое пространство без каких-либо материалов. Кроме того, ФДТ вызывала разрыв кровеносных

сосудов с обширными кровоизлияниями в объеме опухоли, что приводило к удалению значительного количества опухолевых клеток из окрестностей капилляров. ФДТ-индуцированное кровоизлияние и окклюзия капилляров являлись причиной сопутствующих гипоксических явлений в отдаленных участках опухолевой ткани, которые вызывали прекращение ее роста и в конечном итоге ремиссию опухоли.

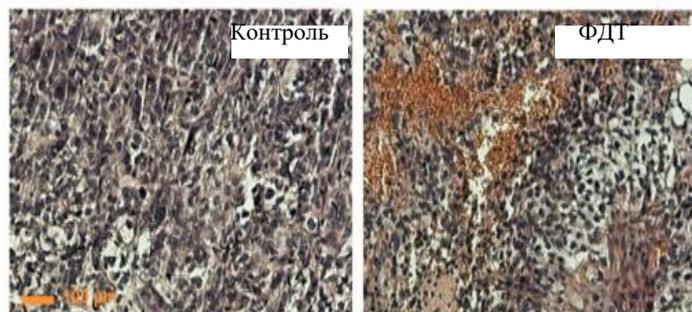


Рисунок III.65. Изображения гистологических срезов опухолевой ткани, окрашенных гематоксилином и эозином, получали через 24 ч. после ФДТ с длиной волны 975 нм. Контроль: НАФ-ФМН вводили перитуморально; ФДТ: НАФ-ФМН вводили перитуморально и облучали лазером с длиной волны 975 нм. Шкала 100 мкм.

Как видим, ФДТ, реализованная посредством перитуморального введения НАФ-ФМН с последующим воздействием лазера с длиной волны 975 нм, продемонстрировала возможность влияния на торможение роста опухоли SK-BR-3, сопровождающиеся патоморфологическими изменениями ткани опухоли.

Таким образом, рибофлавин (витамин В2) под действием облучения может селективно и эффективно уничтожать клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, привитой иммунодефицитным мышам, и приводить к деградации опухоли. Разработанная методика синтеза НАФ с высокой эффективностью преобразования света из ближнего ИК в свет из УФ-синего спектрального диапазона с коэффициентом апконверсии $\eta_{\text{ап}}^{(\text{УФ-синий})} = 2\%$ (интегральный η составлял 9,5%) позволила увеличить глубину обработки в биологической ткани в 10 раз. Биофункционализация НАФ методом замены растворителя при участии низкомолекулярного соединения ТМАГ с последующей стабилизацией полимером ПВП дала возможность получить наноструктуры с ФМН, в которых реализуется резонансная передача энергии благодаря минимальному расстоянию между донором и акцептором. Для фотосенсибилизации ФМН в таких наноструктурах использовали ИК-свет с умеренной интенсивностью и дозах, приемлемых для процедур ФДТ.

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, включая реакции фотоиндуцируемой сшивки скаффолдов, оптогенетические преобразования, репарацию биотканей и другие процессы, управляемые светом.

IV. 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 pH-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 деградации под действием ИК-излучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная диссертационная работа представляет результат коллективного труда, и я хочу поблагодарить всех, кто в ней принимал участие. Прежде всего, искренне благодарю научного консультанта проф., д.х.н. Зубова В.П. за многолетнее плодотворное руководство данной работой. Выражаю глубокую благодарность Ученому секретарю ИБХ РАН, д. физ.-мат. н. Олейникову В.А. за организацию исследований, связанных с квантовыми точками, а также за большую помощь в процессе подготовки диссертации.

Искренне благодарю руководителя лаборатории молекулярной иммунологии (ИБХ РАН) чл.-кор. РАН Деева С.М. за поддержку, обсуждение и помощь в реализации текущих и перспективных проблем и вопросов. Выражаю искреннюю признательность всем сотрудникам данной лаборатории, и прежде всего, Здобновой Т.А и Гребеник Е.А. за эксперименты на клеточных культурах с использованием наночастиц, Мироновой К.Е. за принципиально важные клеточные работы при разработке фотодинамической терапии с участием апконвертирующих нанофосфоров.

Особую благодарность за неоценимую помощь в выполнении работы выражаю руководителю лаборатории лазерной биомедицины, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН Хайдукову Е.В., благодаря энергии и настойчивости которого исследования, связанные с апконвертирующими нанофосфорами вышли на принципиально новый уровень. Благодарю зам. директора Соколова В.И. и выражаю искреннюю признательность всем сотрудникам ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, которые принимали самое активное участие в работе: Семчишину В.А. за научные дискуссии, Рочевой В.В., Савельеву А.Г., Ашарчуку И.М., Хайдукову К.В. за эксперименты по биовизуализации, Григорьеву Ю.В., Каримову Д.Н. за электронную микроскопию образцов, Молчановой С.И. за решение административных вопросов. Большая благодарность Нечаеву А.В. (МИТХТ) за синтез нанофосфоров с уникальными характеристиками. Отдельная благодарность Акасову Р.А. (ИБХ РАН) и сотрудникам РОНЦ им. Блохина Хоченкову Д.А., Шолиной Н.В. за эксперименты на клеточных культурах и животных.

Выражаю глубокую признательность Звягину А.В., который, будучи сотрудником Университета Маккуори (Австралия), инициировал тему, связанную с апконвертирующими нанофосфорами в ИБХ, а также сердечно благодарю сотрудников этого Университета: Гуллер А.В. за поддержку и неоценимую помощь в исследовании

цитотоксических свойств нанофосфоров и Nadort А.-М. за помощь в изучении их оптических характеристик.

Невозможно не упомянуть большой вклад в работу Сизовой С.В (ИБХ РАН), которая начинала работы с квантовыми точками и разработала первые методики по их модификации. Хочу выразить благодарность всем студентам и аспирантам, принимавшим участие в представленных исследованиях, в особенности Сочилиной А.В. и Деминой П.А.

Благодарю своих учителей Грицкову И.А. (зам. зав. кафедры высокомолекулярных соединений, МИТХТ), заложившей базис, который позволил реализовать данную работу, а также Лукина Ю.В. (ИБХ РАН), Авдеева Д.М. (МИТХТ) с которыми были начаты работы по синтезу дисперсий полиакролеиновых частиц.

Благодарю всех настоящих и бывших сотрудников лаборатории полимеров для биологии за многолетнее плодотворное сотрудничество, позволившее выполнить представленную работу: Капустина Д.В., Вихрова А.А., Простякову А.И., Жигис Л.С., Зуеву В.С., Решетова П.Д., Марквичеву Е.А., Разгуляеву О.А., Ягудаеву Е., Селину О.Е., Бурякова А.Н., Зайцева С.Ю., Горохову И.В., Иванова А.Е., Венер Т.И.

Сердечно благодарю своих родных и близких, поддерживавших меня при выполнении этой работы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gómez-Hens A., Fernández-Romero J.M., Aguilar-Caballos M.P. Nanostructures as analytical tools in bioassays // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2008. Vol. 27, № 5. P. 394–406.
2. Seydack M. Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods // *Biosens. Bioelectron.* 2005. Vol. 20, № 12. P. 2454–2469.
3. Tansil N.C., Gao Z. Nanoparticles in biomolecular detection // *Nano Today.* 2006. Vol. 1, № 1. P. 28–37.
4. Singer J.M., Plotz C.M. The latex fixation test // *Am. J. Med.* 1956. Vol. 21, № 6. P. 888–892.
5. Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65, № 1. P. 21–23.
6. Almeida J.P.M. et al. In vivo biodistribution of nanoparticles // *Nanomedicine.* 2011. Vol. 6, № 5. P. 815–835.
7. Mattia E., Otto S. Supramolecular systems chemistry // *Nat. Nanotechnol.* 2015. Vol. 10, № 2. P. 111–119.
8. Kango S. et al. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review // *Prog. Polym. Sci.* 2013. Vol. 38, № 8. P. 1232–1261.
9. Jutz G., Böker A. Bionanoparticles as functional macromolecular building blocks – A new class of nanomaterials // *Polymer (Guildf).* 2011. Vol. 52, № 2. P. 211–232.
10. Kumar A.P. et al. Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization—Trends and future perspectives // *Prog. Polym. Sci.* 2009. Vol. 34, № 6. P. 479–515.
11. Ugelstad J. et al. Preparation and application of monodisperse polymer particles // *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* 2007. Vol. 72, № 1. P. 225–240.
12. Xia Y. et al. Monodispersed Colloidal Spheres: Old Materials with New Applications // *Adv. Mater.* 2000. Vol. 12, № 10. P. 693–713.
13. Generalova A.N., Zubov V.P. Dispersions of polyacrolein-based multifunctional microspheres for the creation of bioanalytical and visualizing reagents // *Polym. Sci. Ser. B.* 2016. Vol. 58, № 4. P. 385–410.
14. Generalova A.N., Asharchuk I.M., Zubov V.P. Multifunctional polymer dispersions for biomedical assays obtained by heterophase radical polymerization // *Russ. Chem. Bull.* 2018. Vol. 67, № 10. P. 1759–1780.
15. Bangs L.B. New developments in particle-based immunoassays: Introduction // *Pure Appl.*

- Chem. / ed. Rembaum A., Tokes Z. Boca Raton: CRC Press, 1996. Vol. 68, № 10. P. 1873–1879.
16. Bajaj A. et al. Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106, № 27. P. 10912–10916.
 17. Arshady R. Microspheres for biomedical applications: preparation of reactive and labelled microspheres // *Biomaterials.* 1993. Vol. 14, № 1. P. 5–15.
 18. Leamon J.H. et al. Methods of Amplifying and Sequencing Nucleic Acids: pat. US 7,323,305 B2 USA. 2008.
 19. Harma H. Particle technologies in diagnostics. Technology. Helsinki: TEKES, 2002.
 20. Samanta A., Medintz I.L. Nanoparticles and DNA – a powerful and growing functional combination in bionanotechnology // *Nanoscale.* 2016. Vol. 8, № 17. P. 9037–9095.
 21. Lendlein A. et al. Polymers in Biomedicine and Electronics // *Macromol. Rapid Commun.* 2010. Vol. 31, № 17. P. 1487–1491.
 22. Horgan A.M. et al. Polymer- and colloid-mediated bioassays, sensors and diagnostics // *Trends Biotechnol.* 2010. Vol. 28, № 9. P. 485–494.
 23. Pichot C., Delair T., Kawaguchi H. Specialty Applications of Latex Polymers // *Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation.* second. Chichester: A.M. van Herk, 2013. P. 283.
 24. Sinha V. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs // *Int. J. Pharm.* 2004. Vol. 274, № 1–2. P. 1–33.
 25. Schmidt C., Boodmeier R. Incorporation of polymeric nanoparticles into solid dosage forms // *J. Control. Rel.* 1999. Vol. 57. P. 115.
 26. Generalova A.N., Zubov V.P. Design of polymer particle dispersions (latexes) in the course of radical heterophase polymerization for biomedical applications // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2018. Vol. 166. P. 303–322.
 27. Peppas N.A., Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue // *Adv. Drug Del. Rev.* 2012. Vol. 64. P. 61–71.
 28. Arshady R. Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey // *Colloid Polym. Sci.* 1992. Vol. 270, № 8. P. 717–732.
 29. Tauer K. Latex particles, in *Colloids and Colloid Assemblies, Synthesis, Modification, Organization and Utilization of Colloid Particles* / ed. Caruso F. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2004. P. 1–45.
 30. Elaissari A. *Colloidal Polymers. Synthesis and Characterization.* New York, USA: Marcel

- Dekker, 2003. 448 p.
31. Fitch R.M. Emulsion Polymerization: I. Mechanisms of Particle Formation. II. Chemistry at the Interface // *Macromolecules* / ed. Benoit H., Rempp P. Pergamon Press, 1982.
 32. Durant Y.G., Carrier R., Sundberg D.C. Mathematical Model for the Emulsion Polymerization Reaction Kinetics of Two Phase Latex Particles // *Polym. React. Eng.* 2003. Vol. 11, № 3. P. 433–455.
 33. Khan M.A., Armes S.P. Conducting Polymer-Coated Latex Particles // *Adv. Mater.* 2000. Vol. 12, № 9. P. 671–674.
 34. Zhachenkov S.V. et al. Features of the emulsion polymerization of styrene under various conditions of preparation of the initial emulsion // *Polym. Sci. U.S.S.R.* 1985. Vol. 27, № 6. P. 1400–1405.
 35. Shragin D.I. et al. Novel Approach to Synthesis of Monodisperse Polymeric Microspheres: Heterophase Polymerization of Styrene and Methyl Methacrylate in Presence of Water-Insoluble Functional PDMSs // *Silicon*. 2015. Vol. 7, № 2. P. 217–227.
 36. Sato K. et al. Integration of an Immunosorbent Assay System: Analysis of Secretory Human Immunoglobulin A on Polystyrene Beads in a Microchip // *Anal. Chem.* 2000. Vol. 72, № 6. P. 1144–1147.
 37. Slomkowski S. Polyacrolein containing microspheres: Synthesis, properties and possible medical applications // *Prog. Polym. Sci.* 1998. Vol. 23, № 5. P. 815–874.
 38. Slomkowski S. et al. X-ray photoelectron spectroscopy as a tool for studies of the surface layer of microspheres. The case of polystyrene and poly(styrene-acrolein) microspheres with attached human serum albumin // *Colloid Polym. Sci.* 2000. Vol. 278, № 9. P. 878–883.
 39. Шульц Р. Полимеризация акролеина. Москва: Мир, 1973.
 40. Rembaum A. et al. Structure and immunological properties of polyacrolein formed by means of ionizing radiation and base catalysis // *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 1984. Vol. 22, № 3. P. 609–621.
 41. Margel S. Characterization and chemistry of polyaldehyde microspheres // *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 1984. Vol. 22, № 11. P. 3521–3533.
 42. Rembaum A., Yen S.P.S., Molday R.S. Synthesis and Reactions of Hydrophilic Functional Microspheres for Immunological Studies // *J. Macromol. Sci. Part A - Chem.* 1979. Vol. 13, № 5. P. 603–632.
 43. Лукин Ю.В., Бахарев В.Н., Заиченко А.С. и др. Полиакролеиновые латексы: синтез, введение наполнителей и механизм формирования // *Докл. АН СССР.* 1985. Vol. 285,

- № 1. P. 159.
44. Urban D., Takamura K. *Polymer Dispersions and their Industrial Applications*. New York, USA: Wiley-VCH Verlag, 2002.
 45. Arshady R., Ledwith A. Suspension polymerisation and its application to the preparation of polymer supports // *React. Polym. Ion Exch. Sorbents*. 1983. Vol. 1, № 3. P. 159–174.
 46. Arshady R. The Synthesis of Polymer Supports // *Adv. Mater.* 1991. Vol. 3, № 4. P. 182–190.
 47. Dendukuri D., Doyle P.S. The Synthesis and Assembly of Polymeric Microparticles Using Microfluidics // *Adv. Mater.* 2009. Vol. 21, № 41. P. 4071–4086.
 48. Sugiura S. et al. Synthesis of Polymeric Microspheres with Narrow Size Distributions Employing Microchannel Emulsification // *Macromol. Rapid Commun.* 2001. Vol. 22, № 10. P. 773–778.
 49. Harkins W.D. A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization 1 // *J. Am. Chem. Soc.* 1947. Vol. 69, № 6. P. 1428–1444.
 50. Smith W. V., Ewart R.H. Kinetics of Emulsion Polymerization // *J. Chem. Phys.* 1948. Vol. 16, № 6. P. 592–599.
 51. Vanderhoff J.W. Mechanism of emulsion polymerization // *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* 2007. Vol. 72, № 1. P. 161–198.
 52. Fitch R.M., Tsai C.H. Particle Formation in Polymer Colloids, III: Prediction of the Number of Particles by a Homogeneous Nucleation Theory // *Polymer Colloids*. Boston, MA: Springer US, 1971. P. 73–102.
 53. Gilbert R.G. *Emulsion polymerization, a mechanistic approach*. London: Academic Press, 1995. 362 p.
 54. Zimehl R., Lagaly G., Ahrens J. Some aspects of polymer colloids I. Preparation and properties of different types of latex particles // *Colloid Polym. Sci.* 1990. Vol. 268, № 10. P. 924–933.
 55. Ugelstad J., El-Aasser M.S., Vanderhoff J.W. Emulsion polymerization: Initiation of polymerization in monomer droplets // *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 1973. Vol. 11, № 8. P. 503–513.
 56. Landfester K. The generation of nanoparticles in miniemulsions // *Adv. Mater.* 2001. Vol. 10. P. 765–768.
 57. Blythe P.J., Sudol E.D., El-Aasser M.S. Recent advances in miniemulsion polymerization // *Macromol. Symp.* 2000. Vol. 150, № 1. P. 179–186.
 58. Landfester K. Polyreactions in miniemulsions // *Macromol. Rapid Comm.* 2001. Vol. 22.

- P. 896–936.
59. Landfester K. Preparation of Polymer and Hybrid Colloids by Miniemulsion for Biomedical Applications // *Colloidal Polymers. Synthesis and Characterization* / ed. Elaissary A. New York, USA: Marcel Dekker, 2003. P. 239–257.
 60. Candau F. Polymerization in microemulsions // *Handbook of Microemulsion Science and Technology* / ed. Kumar P., Mittal K.L. New York, USA: Marcel Dekker, 1999. P. 679–712.
 61. Robb I.D. *Microemulsions* / ed. Robb I.D. New York, USA: Plenum Publishers, 1982.
 62. Myers D. *Surfactant Science and Technology*. 2nd-ed ed. New York, USA: V.C.H. Publishers, 1988.
 63. Tauer K. et al. Evaluation of heterophase polymerizations by means of reaction calorimetry // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 1999. Vol. 153, № 1–3. P. 143–151.
 64. Barrett K.E.J. Dispersion polymerisation in organic media // *Br. Polym. J.* 1973. Vol. 5, № 4. P. 259–271.
 65. Ober C.K., Lok K.P., Hair M.L. Monodispersed, micron-sized polystyrene particles by dispersion polymerization // *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 1985. Vol. 23, № 2. P. 103–108.
 66. Kawaguchi S., Ito K. Dispersion Polymerization // *Polymer Particles. Advances in Polymer Science* / ed. Okubo M. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. P. 299–328.
 67. Almog Y., Reich S., Levy M. Monodisperse polymeric spheres in the micron size range by a single step process // *Br. Polym. J.* 1982. Vol. 14, № 4. P. 131–136.
 68. Li K., Stöver H.D.H. Synthesis of monodisperse poly(divinylbenzene) microspheres // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 1993. Vol. 31, № 13. P. 3257–3263.
 69. Narumi A., Kimura Y., Kawaguchi S. Precipitation polymerization of N-tert-butylacrylamide in water producing monodisperse polymer particles // *Colloid Polym. Sci.* 2012. Vol. 290, № 4. P. 379–384.
 70. Li G.L., Möhwald H., Shchukin D.G. Precipitation polymerization for fabrication of complex core–shell hybrid particles and hollow structures // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42, № 8. P. 3628.
 71. van Herk A.M. Introduction to Radical (Co)Polymerisation // *Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation*. Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013. P. 23–42.
 72. Matyjaszewski K. et al. Gradient copolymers by atom transfer radical copolymerization // *J. Phys. Org. Chem.* 2000. Vol. 13, № 12. P. 775–786.
 73. Charleux B., D’Agosto F., Delaittre G. Preparation of Hybrid Latex Particles and Core–

- Shell Particles Through the Use of Controlled Radical Polymerization Techniques in Aqueous Media / ed. van Herk A., Landfester K. Berlin- Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 128–183.
74. Farcet C., Burguiere C., Charleux B. Controlled Free-Radical Polymerization: A Way to Design Polymer Architecture and Surface Properties of Latex Particles // Colloidal Polymers Synthesis and Characterization / ed. Elaissar A. CRC Press, 2003. P. 41.
 75. Cunningham M.F. Controlled/living radical polymerization in aqueous dispersed systems // Prog. Polym. Sci. 2008. Vol. 33, № 4. P. 365–398.
 76. Cohen B., Wong W.-T., Hargitay B. Magnetically responsive reagent carrier: pat. 180384 USA. Eur Pat., 1986.
 77. Ugelstad J. et al. Preparation and application of new monosized polymer particles // Prog. Polym. Sci. 1992. Vol. 17, № 1. P. 87–161.
 78. Vandezande G., Rudin A. Novel composite latex particles for use in coatings // J. Coat. Technol. 1994. Vol. 66. P. 99–108.
 79. Gonzalez-Ortiz L.J., Asua J.M. Development of Particle Morphology in Emulsion Polymerization. 2. Cluster Dynamics in Reacting Systems // Macromolecules. 1996. Vol. 29, № 1. P. 383–389.
 80. Lovell P.A., El-Aasser M.S. Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers / ed. Lovell P.A., El-Aasser M.S. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997. 802 p.
 81. Piirma I. Polymeric Surfactants // Surfactant science Series 42. New York, USA: Marcell Dekker, 1992. P. 1–16.
 82. Holmberg K. et al. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. Chichester: Wiley & Sons, Ltd., 2002. 545 p.
 83. Rao J.P., Geckeler K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters // Prog. Polym. Sci. 2011. Vol. 36, № 7. P. 887–913.
 84. Cochin D., Laschewsky A., Nallet F. Emulsion Polymerization of Styrene Using Conventional, Polymerizable, and Polymeric Surfactants. A Comparative Study // Macromolecules. 1997. Vol. 30, № 8. P. 2278–2287.
 85. Ni P. et al. Poly(dimethylamino)ethyl Methacrylate for Use as a Surfactant in the Miniemulsion Polymerization of Styrene // Langmuir. 2006. Vol. 22, № 14. P. 6016–6023.
 86. Riess G., Labbe C. Block Copolymers in Emulsion and Dispersion Polymerization // Macromol. Rapid Commun. 2004. Vol. 25, № 2. P. 401–435.
 87. Puig J. et al. Surfactant assisted polymerization methods // Encyclopedia of Surface and Colloid Science. second edi. Taylor & Francis, 2012.

88. Holmberg K. Polymerizable surfactants // *Prog. Org. Coatings*. 1992. Vol. 20, № 3–4. P. 325–337.
89. Montoya-Gorii A. et al. Reactive surfactants in heterophase polymerization. XXIV. Emulsion polymerization of styrene with maleate- and succinate-containing cationic surfactants | This publication is part of a series of publications from the European Union Program `Human Capital an // *Polymer (Guildf)*. 1999. Vol. 40, № 6. P. 1359–1366.
90. Cantarero L.A., Butler J.E., Osborne J.W. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays // *Anal. Biochem*. 1980. Vol. 105, № 1. P. 375–382.
91. Prokopov N.I. et al. Synthesis of monodisperse functional polymeric microspheres for immunoassay // *Russ. Chem. Rev.* 1996. Vol. 65, № 2. P. 167–180.
92. Horak D., Svec F., Frechet J.M.J. Preparation and control of surface properties of monodisperse micrometer size beads by dispersion copolymerization of styrene and butyl methacrylate in polar media // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem*. 1995. Vol. 33, № 14. P. 2329–2338.
93. Kawaguchi S., Yekta A., Winnik M.A. Surface Characterization and Dissociation Properties of Carboxylic Acid Core-Shell Latex Particle by Potentiometric and Conductometric Titration // *J. Colloid Interface Sci*. 1995. Vol. 176, № 2. P. 362–369.
94. Generalova A.N. et al. Quantum dot-containing polymer particles with thermosensitive fluorescence // *Biosens. Bioelectron*. 2013. Vol. 39, № 1. P. 187–193.
95. Lowell B.B., Spiegelman B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis // *Nature*. 2000. Vol. 404, № 6778. P. 652–660.
96. Urano Y. et al. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes // *Nat. Med*. 2009. Vol. 15, № 1. P. 104–109.
97. Lee H. et al. Stimuli-responsive molecular brushes // *Prog. Polym. Sci*. 2010. Vol. 35, № 1–2. P. 24–44.
98. Binauld S., Stenzel M.H. Acid-degradable polymers for drug delivery: a decade of innovation // *Chem. Commun*. 2013. Vol. 49, № 21. P. 2082.
99. Valiaev A. et al. Microcantilever Sensing and Actuation with End-Grafted Stimulus-Responsive Elastin-Like Polypeptides † // *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 1. P. 339–344.
100. Hu J. et al. Stimuli-responsive tertiary amine methacrylate-based block copolymers: Synthesis, supramolecular self-assembly and functional applications // *Prog. Polym. Sci*. 2014. Vol. 39, № 6. P. 1096–1143.
101. Ebara M. et al. Copolymerization of 2-Carboxyisopropylacrylamide with N -

- Isopropylacrylamide Accelerates Cell Detachment from Grafted Surfaces by Reducing Temperature // *Biomacromolecules*. 2003. Vol. 4, № 2. P. 344–349.
102. Platé N.A., Lebedeva T.L., Valuev L.I. Lower Critical Solution Temperature in Aqueous Solutions of N-Alkyl-Substituted Polyacrylamides // *Polym. J.* 1999. Vol. 31, № 1. P. 21–27.
 103. Vihola H. et al. Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam) // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, № 16. P. 3055–3064.
 104. Pelton R.H., Chibante P. Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide // *Colloids and Surfaces*. 1986. Vol. 20, № 3. P. 247–256.
 105. D’Agosto F. et al. Latex particles bearing hydrophilic grafted hairs with controlled chain length and functionality synthesized by reversible addition-fragmentation chain transfer // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2003. Vol. 41, № 9. P. 1188–1195.
 106. Husseman M. et al. Controlled Synthesis of Polymer Brushes by “Living” Free Radical Polymerization Techniques // *Macromolecules*. 1999. Vol. 32, № 5. P. 1424–1431.
 107. Tsuji S., Kawaguchi H. Temperature-Sensitive Hairy Particles Prepared by Living Radical Graft Polymerization // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 6. P. 2449–2455.
 108. Wang D., Rogach A.L., Caruso F. Semiconductor Quantum Dot-Labeled Microsphere Bioconjugates Prepared by Stepwise Self-Assembly // *Nano Lett.* 2002. Vol. 2, № 8. P. 857–861.
 109. Messina R., Holm C., Kremer K. Polyelectrolyte adsorption and multilayering on charged colloidal particles // *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2004. Vol. 42, № 19. P. 3557–3570.
 110. de Vries R., Cohen Stuart M. Theory and simulations of macroion complexation // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 11, № 5. P. 295–301.
 111. Cooper C.L. et al. Polyelectrolyte–protein complexes // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2005. Vol. 10, № 1–2. P. 52–78.
 112. Donath E. et al. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes // *Angew. Chemie Int. Ed.* 1998. Vol. 37, № 16. P. 2201–2205.
 113. Lvov Y. et al. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. Vol. 117, № 22. P. 6117–6123.
 114. Dubas S.T., Schlenoff J.B. Swelling and Smoothing of Polyelectrolyte Multilayers by Salt // *Langmuir*. 2001. Vol. 17, № 25. P. 7725–7727.
 115. Berth G. et al. Polyelectrolyte Complexes and Layer-by-Layer Capsules from Chitosan/Chitosan Sulfate // *Biomacromolecules*. 2002. Vol. 3, № 3. P. 579–590.

116. Weiss C.K., Landfester K. Miniemulsion Polymerization as a Means to Encapsulate Organic and Inorganic Materials // Hybrid Latex Particles. *Advances in Polymer Science* / ed. van Herk A. L.K. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. P. 185–236.
117. Shih Y.-J., El-Aasser M., Vanderhoff J. Colored latexes methods for making same and colored finely divided products: pat. US Pat. 4,487,855 A USA. 1984.
118. Generalova A.N., Chichkov B.N., Khaydukov E.V. Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. Vol. 245. P. 1–19.
119. Xu Z. et al. Monodispersed PEG-b-PSt nanoparticles prepared by atom transfer radical emulsion polymerization under microwave irradiation // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2008. Vol. 46, № 2. P. 481–488.
120. Stoffelbach F. et al. Use of an Amphiphilic Block Copolymer as a Stabilizer and a Macroinitiator in Miniemulsion Polymerization under AGET ATRP Conditions // *Macromolecules.* 2007. Vol. 40, № 25. P. 8813–8816.
121. Slomkowski S. et al. Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011) // *Pure Appl. Chem.* 2011. Vol. 83, № 12. P. 2229–2259.
122. Bourgeat-Lami E. Organic-Inorganic Nanostructured Colloids // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2002. Vol. 2, № 1. P. 1–24.
123. Generalova A.N. et al. Highly fluorescent ethyl cellulose nanoparticles containing embedded semiconductor nanocrystals // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2009.
124. Derjaguin B. V. A theory of the heterocoagulation, interaction and adhesion of dissimilar particles in solutions of electrolytes // *Discuss. Faraday Soc.* 1954. Vol. 18. P. 85.
125. Hansen F.K., Matijevic E. Heterocoagulation. Part 5. Adsorption of a carboxylated polymer latex on monodispersed hydrated metal oxides // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases.* 1980. Vol. 76. P. 1240.
126. Hong L. et al. Clusters of Amphiphilic Colloidal Spheres // *Langmuir.* 2008. Vol. 24, № 3. P. 621–625.
127. Teixeira R.F.A., Bon S.A.F. Physical Methods for the Preparation of Hybrid Nanocomposite Polymer Latex Particles. 2010. P. 19–52.
128. Wooding A., Kilner M., Lambrick D.B. “Stripped” magnetic particles. Applications of the double surfactant layer principle in the preparation of water-based magnetic fluids // *J. Colloid Interface Sci.* 1992. Vol. 149, № 1. P. 98–104.

129. Meguro K. et al. Polymerization of Styrene Adsorbed in Surfactant Adsorbed Bilayer on Pigments // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1986. Vol. 59, № 10. P. 3019–3021.
130. Chaimberg M., Parnas R., Cohen Y. Graft polymerization of polyvinylpyrrolidone onto silica // *J. Appl. Polym. Sci.* 1989. Vol. 37, № 10. P. 2921–2931.
131. Xu Z. et al. Synthesis of raspberry-like magnetic polystyrene microspheres // *Mater. Chem. Phys.* 2007. Vol. 103, № 2–3. P. 494–499.
132. Erdem B. et al. Encapsulation of inorganic particles via miniemulsion polymerization // *Macromol. Symp.* 2000. Vol. 155, № 1. P. 181–198.
133. Diaconu G. et al. Macroinitiator and Macromonomer Modified Montmorillonite for the Synthesis of Acrylic/MMT Nanocomposite Latexes // *Macromolecules.* 2009. Vol. 42, № 9. P. 3316–3325.
134. Yang Y., Tu C., Gao M. A general approach for encapsulating aqueous colloidal particles into polymeric microbeads // *J. Mater. Chem.* 2007. Vol. 17, № 28. P. 2930.
135. Aveyard R., Binks B.P., Clint J.H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 100–102. P. 503–546.
136. Deslandes Y. Morphology of hydroxyapatite as suspension stabilizer in the polymerization of poly(styrene-co-butadiene) // *J. Appl. Polym. Sci.* 1987. Vol. 34, № 6. P. 2249–2257.
137. Wang C. et al. Facile fabrication of nanocomposite microspheres with polymer cores and magnetic shells by Pickering suspension polymerization // *React. Funct. Polym.* 2009. Vol. 69, № 10. P. 750–754.
138. Chen K. et al. Suspension polymerization stabilized by triblock copolymer with CdS nanoparticles // *Polymer (Guildf).* 2008. Vol. 49, № 11. P. 2650–2655.
139. Tiarks F., Landfester K., Antonietti M. Silica Nanoparticles as Surfactants and Fillers for Latexes Made by Miniemulsion Polymerization // *Langmuir.* 2001. Vol. 17, № 19. P. 5775–5780.
140. Fortuna S. et al. Packing Patterns of Silica Nanoparticles on Surfaces of Armored Polystyrene Latex Particles // *Langmuir.* 2009. Vol. 25, № 21. P. 12399–12403.
141. Zhang J., Coombs N., Kumacheva E. A New Approach to Hybrid Nanocomposite Materials with Periodic Structures // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, № 49. P. 14512–14513.
142. Mayer A.B.R., Grebner W., Wannemacher R. Preparation of Silver–Latex Composites // *J. Phys. Chem. B.* 2000. Vol. 104, № 31. P. 7278–7285.
143. Kawahashi N., Persson C., Matijevic E. Zirconium compounds as coatings on polystyrene latex and as hollow spheres // *J. Mater. Chem.* 1991. Vol. 1, № 4. P. 577.
144. Kawahashi N., Shiho H. Copper and copper compounds as coatings on polystyrene particles

- and as hollow spheres // *J. Mater. Chem.* 2000. Vol. 10, № 10. P. 2294–2297.
145. Wen F. et al. Synthesis of Noble Metal Nanoparticles Embedded in the Shell Layer of Core–Shell Poly(styrene-*co*-4-vinylpyridine) Microspheres and Their Application in Catalysis // *Chem. Mater.* 2008. Vol. 20, № 6. P. 2144–2150.
 146. Zheng P. et al. Formation of Gold@Polymer Core/Shell Particles and Gold Particle Clusters on a Template of Thermoresponsive and pH-Responsive Coordination Triblock Copolymer // *Langmuir*. 2006. Vol. 22, № 22. P. 9393–9396.
 147. Paul W.E. *Fundamental Immunology*. 7 edition. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
 148. Colvin M. et al. *Microspheres: Medical and Biological Applications* / ed. Rembaum A., Tokes. Z. Boca Raton: CRC Press, 1988.
 149. Генералова А.Н. Получение биоаналитических реагентов на основе полимерных дисперсий. 2000. дисс. на соискание степени канд. хим. наук р.
 150. Braslavsky I. et al. Sequence information can be obtained from single DNA molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. Vol. 100, № 7. P. 3960–3964.
 151. Siepmann J., Siepmann F. *Microparticles Used as Drug Delivery Systems* // *Smart Colloidal Materials*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. P. 15–21.
 152. Wood W.G., Gadow A. Immobilisation of Antibodies and Antigens on Macro Solid Phases — A Comparison Between Adsorptive and Covalent Binding. A critical study of macro solid phases for use in immunoassay systems, Part I // *Clin. Chem. Lab. Med.* 1983. Vol. 21, № 12. P. 789.
 153. Gribnau T.C.J., Leuvering J.H.W., van Hell H. Particle-labelled immunoassays: A review // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1986. Vol. 376. P. 175–189.
 154. Price C.P., Newman D.J. *Principles and Practice of Immunoassay*. second edi / ed. Price C.P., Newman D.J. Hampshire, UK: Palgrave Macmillan, 2001.
 155. Hill H.D., Mirkin C.A. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 1. P. 324–336.
 156. Taton T.A. Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes // *Science*. 2000. Vol. 289, № 5485. P. 1757–1760.
 157. Oh B.-K. et al. A Fluorophore-Based Bio-Barcode Amplification Assay for Proteins // *Small*. 2006. Vol. 2, № 1. P. 103–108.
 158. Holzapfel V. et al. Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells // *Macromol. Chem. Phys.* 2005. Vol. 206, № 24. P. 2440–2449.

159. Mabey D. et al. Diagnostics for the developing world // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. Vol. 2, № 3. P. 231–240.
160. Pregibon D.C., Toner M., Doyle P.S. Multifunctional Encoded Particles for High-Throughput Biomolecule Analysis // *Science*. 2007. Vol. 315, № 5817. P. 1393–1396.
161. Fournier-Bidoz S. et al. Facile and Rapid One-Step Mass Preparation of Quantum-Dot Barcodes // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2008. Vol. 47, № 30. P. 5577–5581.
162. Cao Y.C. Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection // *Science*. 2002. Vol. 297, № 5586. P. 1536–1540.
163. Saade H. et al. Biocompatible and Biodegradable Ultrafine Nanoparticles of Poly(Methyl Methacrylate-co-Methacrylic Acid) Prepared via Semicontinuous Heterophase Polymerization: Kinetics and Product Characterization // *Int. J. Polym. Sci.* 2016. Vol. 2016. P. 1–8.
164. Ghosh Chaudhuri R., Paria S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications // *Chem. Rev.* 2012. Vol. 112, № 4. P. 2373–2433.
165. Giner-Casares J.J. et al. Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research // *Mater. Today*. 2016. Vol. 19, № 1. P. 19–28.
166. Wang Y.-X.J., Hussain S.M., Krestin G.P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging // *Eur. Radiol.* 2001. Vol. 11, № 11. P. 2319–2331.
167. Garcia M.A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2011. Vol. 44, № 28. P. 283001.
168. Jain P.K., El-Sayed M.A. Plasmonic coupling in noble metal nanostructures // *Chem. Phys. Lett.* 2010. Vol. 487, № 4–6. P. 153–164.
169. Song Y., Wei W., Qu X. Colorimetric Biosensing Using Smart Materials // *Adv. Mater.* 2011. Vol. 23, № 37. P. 4215–4236.
170. Sasikumar R., Arunachalam R.M. Synthesis of nanostructured aluminium matrix composite (AMC) through machining // *Mater. Lett.* 2009. Vol. 63, № 28. P. 2426–2428.
171. Hong L.I., Vilar R.M., Youming W. Laser beam processing of a SiC particulate reinforced 6061 aluminium metal matrix composite // *J. Mater. Sci.* 1997. Vol. 32. P. 5545.
172. Wang Y.Y., Cai K.F., Yao X. Facile synthesis of PbTe nanoparticles and thin films in alkaline aqueous solution at room temperature // *J. Solid State Chem.* 2009. Vol. 182, № 12. P. 3383–3386.
173. Yoo S.-H., Liu L., Park S. Nanoparticle films as a conducting layer for anodic aluminum

- oxide template-assisted nanorod synthesis // *J. Colloid Interface Sci.* 2009. Vol. 339, № 1. P. 183–186.
174. Oldenburg S. et al. Nanoengineering of optical resonances // *Chem. Phys. Lett.* 1998. Vol. 288, № 2–4. P. 243–247.
175. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* / ed. Lakowicz J.R. Boston, MA, MA: Springer US, 2006.
176. Здобнова Т.А., Лебедеико Е.Н., Деев С.М. Квантовые точки для молекулярной диагностики опухоли // *Acta Naturae.* 2011. Vol. 3, № 1. P. 29.
177. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 1. P. 47–52.
178. Brus L.E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state // *J. Chem. Phys.* 1984. Vol. 80, № 9. P. 4403–4409.
179. Efros A.L., Rosen M. The Electronic Structure of Semiconductor Nanocrystals // *Annu. Rev. Mater. Sci.* 2000. Vol. 30, № 1. P. 475–521.
180. Tomczak N. et al. Designer polymer–quantum dot architectures // *Prog. Polym. Sci.* 2009. Vol. 34, № 5. P. 393–430.
181. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине // *Российские нанотехнологии.* 2007. Vol. 2, № 1. P. 160–173.
182. Prieto J.A. et al. Size and strain effects in the E1-like optical transitions of InAs/InP self-assembled quantum dot structures // *Appl. Phys. Lett.* 1999. Vol. 74, № 1. P. 99–101.
183. Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. Vol. 115, № 19. P. 8706–8715.
184. Tomczak N. et al. Designer polymer–quantum dot architectures // *Prog. Polym. Sci.* 2009. Vol. 34, № 5. P. 393–430.
185. Wise F.W. Lead Salt Quantum Dots: the Limit of Strong Quantum Confinement // *Acc. Chem. Res.* 2000. Vol. 33, № 11. P. 773–780.
186. Hines M.A., Guyot-Sionnest P. Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals // *J. Phys. Chem.* 1996. Vol. 100, № 2. P. 468–471.
187. Peng X. et al. Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. Vol. 119, № 30. P. 7019–7029.

188. Dabbousi B.O. et al. (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites // *J. Phys. Chem. B*. 1997. Vol. 101, № 46. P. 9463–9475.
189. Resch-Genger U. et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels // *Nat. Methods*. 2008. Vol. 5, № 9. P. 763–775.
190. Green M., O’Brien P. Recent advances in the preparation of semiconductors as isolated nanometric particles: new routes to quantum dots // *Chem. Commun.* 1999. № 22. P. 2235–2241.
191. Grieve K., Mulvaney P., Grieser F. Synthesis and electronic properties of semiconductor nanoparticles/quantum dots // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000. Vol. 5, № 1–2. P. 168–172.
192. Aldana J., Wang Y.A., Peng X. Photochemical Instability of CdSe Nanocrystals Coated by Hydrophilic Thiols // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123, № 36. P. 8844–8850.
193. Peng X. et al. Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. Vol. 119, № 30. P. 7019–7029.
194. Bruchez Jr. M. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels // *Science* (80-.). 1998. Vol. 281, № 5385. P. 2013–2016.
195. Wang Y. et al. “Pulling” Nanoparticles into Water: Phase Transfer of Oleic Acid Stabilized Monodisperse Nanoparticles into Aqueous Solutions of α -Cyclodextrin // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3, № 11. P. 1555–1559.
196. Gómez D.E., Pastoriza-Santos I., Mulvaney P. Tunable Whispering Gallery Mode Emission from Quantum-Dot-Doped Microspheres // *Small*. 2005. Vol. 1, № 2. P. 238–241.
197. Chan W.C., Nie S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection // *Science*. 1998. Vol. 281, № 5385. P. 2016–2018.
198. Wuister S.F. et al. Highly Luminescent Water-Soluble CdTe Quantum Dots // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3, № 4. P. 503–507.
199. Pathak S. et al. Hydroxylated Quantum Dots as Luminescent Probes for in Situ Hybridization // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123, № 17. P. 4103–4104.
200. Mattoussi H. et al. Self-Assembly of CdSe–ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122, № 49. P. 12142–12150.
201. Kim S., Bawendi M.G. Oligomeric Ligands for Luminescent and Stable Nanocrystal Quantum Dots // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125, № 48. P. 14652–14653.

202. Mitchell G.P., Mirkin C.A., Letsinger R.L. Programmed Assembly of DNA Functionalized Quantum Dots // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. Vol. 121, № 35. P. 8122–8123.
203. Willard D.M. et al. CdSe–ZnS Quantum Dots as Resonance Energy Transfer Donors in a Model Protein–Protein Binding Assay // *Nano Lett.* 2001. Vol. 1, № 9. P. 469–474.
204. Boulmedais F. et al. Water-Soluble Pegylated Quantum Dots: From a Composite Hexagonal Phase to Isolated Micelles // *Langmuir.* 2006. Vol. 22, № 23. P. 9797–9803.
205. Sukhanova A. et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells // *Anal. Biochem.* 2004. Vol. 324, № 1. P. 60–67.
206. Gearheart L., Caswell K.K., Murphy C.J. Recognition of hypermethylated triplet repeats in vitro by cationic nanoparticles // *J. Biomed. Opt.* 2001. Vol. 6, № 2. P. 111.
207. Dubertret B. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles // *Science (80-.).* 2002. Vol. 298, № 5599. P. 1759–1762.
208. Gao X. et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 8. P. 969–976.
209. Yu W.W. et al. Forming Biocompatible and Nonaggregated Nanocrystals in Water Using Amphiphilic Polymers // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129, № 10. P. 2871–2879.
210. Nida D.L. et al. Photostability of quantum dots with amphiphilic polymer-based passivation strategies // *Nanotechnology.* 2008. Vol. 19, № 3. P. 035701.
211. Han M. et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules // *Nat. Biotechnol.* 2001. Vol. 19, № 7. P. 631–635.
212. Stsiapura V. et al. Functionalized nanocrystal-tagged fluorescent polymer beads: synthesis, physicochemical characterization, and immunolabeling application // *Anal. Biochem.* 2004. Vol. 334, № 2. P. 257–265.
213. Gaponik N. et al. Labeling of Biocompatible Polymer Microcapsules with Near-Infrared Emitting Nanocrystals // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3, № 3. P. 369–372.
214. Radtchenko I.L. et al. Core-Shell Structures Formed by the Solvent-Controlled Precipitation of Luminescent CdTe Nanocrystals on Latex Spheres // *Adv. Mater.* 2001. Vol. 13, № 22. P. 1684–1687.
215. Hirai T., Saito T., Komasaawa I. Stabilization of CdS Nanoparticles Immobilized on Thiol-Modified Polystyrene Particles by Encapsulation with Polythiourethane // *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105, № 40. P. 9711–9714.
216. Zhelev Z., Ohba H., Bakalova R. Single Quantum Dot-Micelles Coated with Silica Shell as Potentially Non-Cytotoxic Fluorescent Cell Tracers // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 19. P. 6324–6325.

217. Yang, Zhang Y. Encapsulation of Quantum Nanodots in Polystyrene and Silica Micro-/Nanoparticles // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 14. P. 6071–6073.
218. Joumaa N. et al. Synthesis of Quantum Dot-Tagged Submicrometer Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization // *Langmuir*. 2006. Vol. 22, № 4. P. 1810–1816.
219. Goldman E.R. et al. Conjugation of Luminescent Quantum Dots with Antibodies Using an Engineered Adaptor Protein To Provide New Reagents for Fluoroimmunoassays // *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74, № 4. P. 841–847.
220. Goldman E.R. et al. Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76, № 3. P. 684–688.
221. Xing Y. et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry // *Nat. Protoc.* 2007. Vol. 2, № 5. P. 1152–1165.
222. Tada H. et al. In vivo Real-time Tracking of Single Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody in Tumors of Mice // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, № 3. P. 1138–1144.
223. Yong K.-T. et al. Imaging Pancreatic Cancer Using Bioconjugated InP Quantum Dots // *ACS Nano*. 2009. Vol. 3, № 3. P. 502–510.
224. Cai W. et al. Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects // *Nano Lett.* 2006. Vol. 6, № 4. P. 669–676.
225. Weng K.C. et al. Targeted Tumor Cell Internalization and Imaging of Multifunctional Quantum Dot-Conjugated Immunoliposomes in Vitro and in Vivo // *Nano Lett.* 2008. Vol. 8, № 9. P. 2851–2857.
226. Wu X. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 1. P. 41–46.
227. Chen C. et al. Quantum dots-based immunofluorescence technology for the quantitative determination of HER2 expression in breast cancer // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 15. P. 2912–2918.
228. Dahan M. From analog to digital: exploring cell dynamics with single quantum dots // *Histochem. Cell Biol.* 2006. Vol. 125, № 5. P. 451–456.
229. Dahan M. Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking // *Science*. 2003. Vol. 302, № 5644. P. 442–445.
230. Bouzigues C. et al. Single Quantum Dot Tracking of Membrane Receptors // *Quantum Dots*. New Jersey: Humana Press. P. 81–92.
231. Akerman M.E. et al. Nanocrystal targeting in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, № 20. P. 12617–12621.

232. Yu X. et al. Immunofluorescence detection with quantum dot bioconjugates for hepatoma in vivo // *J. Biomed. Opt.* 2007. Vol. 12, № 1. P. 014008.
233. Chen L.-D. et al. The biocompatibility of quantum dot probes used for the targeted imaging of hepatocellular carcinoma metastasis // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, № 31. P. 4170–4176.
234. Shi C. et al. Visualizing Human Prostate Cancer Cells in Mouse Skeleton Using Bioconjugated Near-infrared Fluorescent Quantum Dots // *Urology*. 2009. Vol. 74, № 2. P. 446–451.
235. Mahmoud W. et al. Emerging applications of fluorescent nanocrystals quantum dots for micrometastases detection // *Proteomics*. 2010. Vol. 10, № 4. P. 700–716.
236. Chen M., Yin M. Design and development of fluorescent nanostructures for bioimaging // *Prog. Polym. Sci.* 2014. Vol. 39, № 2. P. 365–395.
237. Cheng L., Wang C., Liu Z. Upconversion nanoparticles and their composite nanostructures for biomedical imaging and cancer therapy // *Nanoscale*. 2013. Vol. 5, № 1. P. 23–37.
238. Yang D. et al. Current advances in lanthanide ion (Ln 3+)-based upconversion nanomaterials for drug delivery // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol. 44, № 6. P. 1416–1448.
239. Khaydukov E. V et al. Enhanced spatial resolution in optical imaging of biotissues labelled with upconversion nanoparticles using a fibre-optic probe scanning technique // *Laser Phys. Lett.* 2014. Vol. 11, № 9. P. 095602.
240. Gu Z. et al. Recent Advances in Design and Fabrication of Upconversion Nanoparticles and Their Safe Theranostic Applications // *Adv. Mater.* 2013. Vol. 25, № 28. P. 3758–3779.
241. DaCosta M. V. et al. Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: A review // *Anal. Chim. Acta*. 2014. Vol. 832. P. 1–33.
242. Nadort A., Zhao J., Goldys E.M. Lanthanide upconversion luminescence at the nanoscale: fundamentals and optical properties // *Nanoscale*. 2016. Vol. 8, № 27. P. 13099–13130.
243. Park Y. Il et al. Comparative Study of Upconverting Nanoparticles with Various Crystal Structures, Core/Shell Structures, and Surface Characteristics // *J. Phys. Chem. C*. 2013. Vol. 117, № 5. P. 2239–2244.
244. Xu C.T. et al. Upconverting nanoparticles for pre-clinical diffuse optical imaging, microscopy and sensing: Current trends and future challenges // *Laser Photon. Rev.* 2013. Vol. 7, № 5. P. 663–697.
245. Haase M., Schäfer H. Upconverting Nanoparticles // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2011. Vol. 50, № 26. P. 5808–5829.
246. Chong K. et al. Optical properties of Bi³⁺ ions doped in NaYF₄ // *J. Lumin.* 2007. Vol. 122–123. P. 149–151.

247. Chen G. et al. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114, № 10. P. 5161–5214.
248. Boyer J.-C., van Veggel F.C.J.M. Absolute quantum yield measurements of colloidal NaYF₄: Er³⁺, Yb³⁺ upconverting nanoparticles // *Nanoscale*. 2010. Vol. 2, № 8. P. 1417.
249. Teng X. et al. Lanthanide-Doped Na_xScF_{3+x} Nanocrystals: Crystal Structure Evolution and Multicolor Tuning // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 20. P. 8340–8343.
250. Mai H.-X. et al. Highly Efficient Multicolor Up-Conversion Emissions and Their Mechanisms of Monodisperse NaYF₄:Yb,Er Core and Core/Shell-Structured Nanocrystals // *J. Phys. Chem. C*. 2007. Vol. 111, № 37. P. 13721–13729.
251. Shan J., Ju Y. A single-step synthesis and the kinetic mechanism for monodisperse and hexagonal-phase NaYF₄:Yb, Er upconversion nanophosphors // *Nanotechnology*. 2009. Vol. 20, № 27. P. 275603.
252. Wang G., Peng Q., Li Y. Upconversion Luminescence of Monodisperse CaF₂:Yb³⁺/Er³⁺ Nanocrystals // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131, № 40. P. 14200–14201.
253. Quintanilla M. et al. Intense ultraviolet upconversion in water dispersible SrF₂:Tm³⁺, Yb³⁺ nanoparticles: the effect of the environment on light emissions // *J. Mater. Chem. C*. 2015. Vol. 3, № 13. P. 3108–3113.
254. Yang D. et al. One-Step Synthesis of Small-Sized and Water-Soluble NaREF₄ Upconversion Nanoparticles for In Vitro Cell Imaging and Drug Delivery // *Chem. - A Eur. J.* 2013. Vol. 19, № 8. P. 2685–2694.
255. Sarkar S. et al. Sub-5 nm Ln³⁺-doped BaLuF₅ Nanocrystals: A Platform to Realize Upconversion via Interparticle Energy Transfer (IPET) // *Adv. Mater.* 2013. Vol. 25, № 6. P. 856–860.
256. Wang F. et al. Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping // *Nature*. 2010. Vol. 463, № 7284. P. 1061–1065.
257. Lu D. et al. Plasmon Enhancement Mechanism for the Upconversion Processes in NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Nanoparticles: Maxwell versus Förster // *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, № 8. P. 7780–7792.
258. Lu D. et al. Experimental demonstration of plasmon enhanced energy transfer rate in NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ upconversion nanoparticles // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 18894.
259. Yuan P. et al. Plasmon enhanced upconversion luminescence of NaYF₄:Yb,Er@SiO₂@Ag core-shell nanocomposites for cell imaging // *Nanoscale*. 2012. Vol. 4, № 16. P. 5132.
260. Wang Y. et al. Upconversion Luminescence of β-NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺@β-NaYF₄ Core/Shell Nanoparticles: Excitation Power Density and Surface Dependence // *J. Phys.*

- Chem. C. 2009. Vol. 113, № 17. P. 7164–7169.
261. Chen D. et al. Lanthanide dopant-induced formation of uniform sub-10 nm active-core/active-shell nanocrystals with near-infrared to near-infrared dual-modal luminescence // *J. Mater. Chem.* 2012. Vol. 22, № 6. P. 2632–2640.
 262. Ding M. et al. Highly enhanced upconversion luminescence in lanthanide-doped active-core/luminescent-shell/active-shell nanoarchitectures // *J. Mater. Chem. C.* 2016. Vol. 4, № 13. P. 2432–2437.
 263. Auzel F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids // *Chem. Rev.* 2004. Vol. 104, № 1. P. 139–174.
 264. Zhao J. et al. Single-nanocrystal sensitivity achieved by enhanced upconversion luminescence // *Nat. Nanotechnol.* 2013. Vol. 8, № 10. P. 729–734.
 265. Zou W. et al. Broadband dye-sensitized upconversion of near-infrared light // *Nat. Photonics.* 2012. Vol. 6, № 8. P. 560–564.
 266. Chang J. et al. Strong red and NIR emission in NaYF₄:Yb³⁺, Tm³⁺ /QDs nanoheterostructures // *J. Mater. Chem. C.* 2013. Vol. 1, № 6. P. 1168–1173.
 267. Ye X. et al. Morphologically controlled synthesis of colloidal upconversion nanophosphors and their shape-directed self-assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 52. P. 22430–22435.
 268. Qian H.-S., Zhang Y. Synthesis of Hexagonal-Phase Core–Shell NaYF₄ Nanocrystals with Tunable Upconversion Fluorescence // *Langmuir.* 2008. Vol. 24, № 21. P. 12123–12125.
 269. Wang L., Li P., Li Y. Down- and Up-Conversion Luminescent Nanorods // *Adv. Mater.* 2007. Vol. 19, № 20. P. 3304–3307.
 270. Jiang W. et al. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent // *Nat. Nanotechnol.* 2008. Vol. 3, № 3. P. 145–150.
 271. Liu Q., Feng W., Li F. Water-soluble lanthanide upconversion nanophosphors: Synthesis and bioimaging applications in vivo // *Coord. Chem. Rev.* 2014. Vol. 273–274. P. 100–110.
 272. Gnach A., Bednarkiewicz A. Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges // *Nano Today.* 2012. Vol. 7, № 6. P. 532–563.
 273. Chen G. et al. Monodisperse NaYbF₄: Tm³⁺/NaGdF₄ core/shell nanocrystals with near-infrared to near-infrared upconversion photoluminescence and magnetic resonance properties // *Nanoscale.* 2011. Vol. 3, № 5. P. 2003.
 274. Boyer J.C. et al. Surface Modification of Upconverting NaYF₄ Nanoparticles with PEG–Phosphate Ligands for NIR (800 nm) Biolabeling within the Biological Window // *Langmuir.* 2010. Vol. 26, № 2. P. 1157–1164.

275. Nyk M. et al. High Contrast in Vitro and in Vivo Photoluminescence Bioimaging Using Near Infrared to Near Infrared Up-Conversion in Tm³⁺ and Yb³⁺ Doped Fluoride Nanophosphors // *Nano Lett.* 2008. Vol. 8, № 11. P. 3834–3838.
276. Zhang Q. et al. Hexanedioic acid mediated surface–ligand-exchange process for transferring NaYF₄:Yb/Er (or Yb/Tm) up-converting nanoparticles from hydrophobic to hydrophilic // *J. Colloid Interface Sci.* 2009. Vol. 336, № 1. P. 171–175.
277. Mai H.-X. et al. High-Quality Sodium Rare-Earth Fluoride Nanocrystals: Controlled Synthesis and Optical Properties // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 19. P. 6426–6436.
278. Mrazek J. et al. Photo-crosslinked hyaluronic acid coated upconverting nanoparticles // *J. Nanoparticle Res.* 2017. Vol. 19, № 2. P. 44.
279. Xiong L. et al. Long-term in vivo biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors // *Biomaterials.* 2010. Vol. 31, № 27. P. 7078–7085.
280. Bogdan N. et al. Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles // *Nano Lett.* 2011. Vol. 11, № 2. P. 835–840.
281. Bao Y. et al. Layer-by-layer assembly of freestanding thin films with homogeneously distributed upconversion nanocrystals // *J. Mater. Chem.* 2010. Vol. 20, № 38. P. 8356.
282. Jiang G. et al. An Effective Polymer Cross-Linking Strategy To Obtain Stable Dispersions of Upconverting NaYF₄ Nanoparticles in Buffers and Biological Growth Media for Biolabeling Applications // *Langmuir.* 2012. Vol. 28, № 6. P. 3239–3247.
283. Wu Z. et al. A pluronic F127 coating strategy to produce stable up-conversion NaYF₄:Yb,Er(Tm) nanoparticles in culture media for bioimaging // *J. Mater. Chem.* 2012. Vol. 22, № 35. P. 18596.
284. Shan J. et al. Pegylated Composite Nanoparticles Containing Upconverting Phosphors and meso-Tetraphenyl porphine (TPP) for Photodynamic Therapy // *Adv. Funct. Mater.* 2011. Vol. 21, № 13. P. 2488–2495.
285. Zhu Z. et al. Polyelectrolyte Stabilized Drug Nanoparticles via Flash Nanoprecipitation: A Model Study With β -Carotene // *J. Pharm. Sci.* 2010. Vol. 99, № 10. P. 4295–4306.
286. Budijono S.J. et al. Synthesis of Stable Block-Copolymer-Protected NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ Up-Converting Phosphor Nanoparticles // *Chem. Mater.* 2010. Vol. 22, № 2. P. 311–318.
287. Chen Z. et al. Versatile Synthesis Strategy for Carboxylic Acid–functionalized Upconverting Nanophosphors as Biological Labels // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 10. P. 3023–3029.
288. Hu H. et al. Facile Epoxidation Strategy for Producing Amphiphilic Up-Converting Rare-

- Earth Nanophosphors as Biological Labels // *Chem. Mater.* 2008. Vol. 20, № 22. P. 7003–7009.
289. Liu Q. et al. Multifunctional rare-earth self-assembled nanosystem for tri-modal upconversion luminescence /fluorescence /positron emission tomography imaging // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, № 32. P. 8243–8253.
290. Wang L., Zhao W., Tan W. Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications // *Nano Res.* 2008. Vol. 1, № 2. P. 99–115.
291. Xiao Q. et al. Novel multifunctional NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺/PEGDA hybrid microspheres: NIR-light-activated photopolymerization and drug delivery // *Chem. Commun.* 2013. Vol. 49, № 15. P. 1527.
292. Morgan C.G., Mitchell A.C. Prospects for applications of lanthanide-based upconverting surfaces to bioassay and detection // *Biosens. Bioelectron.* 2007. Vol. 22, № 8. P. 1769–1775.
293. Hampl J. et al. Upconverting Phosphor Reporters in Immunochromatographic Assays // *Anal. Biochem.* 2001. Vol. 288, № 2. P. 176–187.
294. Vetrone F. et al. Temperature Sensing Using Fluorescent Nanothermometers // *ACS Nano.* 2010. Vol. 4, № 6. P. 3254–3258.
295. Ali R. et al. Upconverting nanoparticle based optical sensor for carbon dioxide // *Sensors Actuators B Chem.* 2010. Vol. 150, № 1. P. 126–131.
296. Liu Y. et al. Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy // *Nature.* 2017. Vol. 543, № 7644. P. 229–233.
297. Cheng Z., Lin J. Synthesis and Application of Nanohybrids Based on Upconverting Nanoparticles and Polymers // *Macromol. Rapid Commun.* 2015. Vol. 36, № 9. P. 790–827.
298. Park Y. II et al. Upconverting nanoparticles: a versatile platform for wide-field two-photon microscopy and multi-modal in vivo imaging // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol. 44, № 6. P. 1302–1317.
299. Abdul Jalil R., Zhang Y. Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29, № 30. P. 4122–4128.
300. Bai Y. et al. Enhancement of the upconversion photoluminescence intensity in Li⁺ and Er³⁺ codoped Y₂O₃ nanocrystals // *Opt. Commun.* 2008. Vol. 281, № 10. P. 2930–2932.
301. Shan J. et al. Biofunctionalization, cytotoxicity, and cell uptake of lanthanide doped hydrophobically ligated NaYF₄ upconversion nanophosphors // *J. Appl. Phys.* 2008. Vol. 104, № 9. P. 094308.
302. Akiyama H. et al. Application of liposome-encapsulated ceramic phosphors for cancer cell

- imaging under near infrared excitation // *J. Phys. Conf. Ser.* 2010. Vol. 232. P. 012001.
303. Li Z. et al. Facile microemulsion route to coat carbonized glucose on upconversion nanocrystals as high luminescence and biocompatible cell-imaging probes // *Nanotechnology*. 2010. Vol. 21, № 31. P. 315105.
304. Guller A.E. et al. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells // *Nano Res.* 2015. Vol. 8, № 5. P. 1546–1562.
305. Chatterjee D., Rufaihah A., Zhang Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, № 7. P. 937–943.
306. Wang M. et al. Immunolabeling and NIR-Excited Fluorescent Imaging of HeLa Cells by Using NaYF₄:Yb,Er Upconversion Nanoparticles // *ACS Nano*. 2009. Vol. 3, № 6. P. 1580–1586.
307. Kumar R. et al. Combined Optical and MR Bioimaging Using Rare Earth Ion Doped NaYF₄ Nanocrystals // *Adv. Funct. Mater.* 2009. Vol. 19, № 6. P. 853–859.
308. Xiong L. et al. High Contrast Upconversion Luminescence Targeted Imaging in Vivo Using Peptide-Labeled Nanophosphors // *Anal. Chem.* 2009. Vol. 81, № 21. P. 8687–8694.
309. Alexis F. et al. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles // *Mol. Pharm.* 2008. Vol. 5, № 4. P. 505–515.
310. Cheng L. et al. Highly-sensitive multiplexed in vivo imaging using pegylated upconversion nanoparticles // *Nano Res.* 2010. Vol. 3, № 10. P. 722–732.
311. Zhou J., Liu Z., Li F. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41, № 3. P. 1323–1349.
312. Xiong L.Q. et al. Synthesis, characterization, and in vivo targeted imaging of amine-functionalized rare-earth up-converting nanophosphors // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 29. P. 5592–5600.
313. Verma A., Rotello V.M. Surface recognition of biomacromolecules using nanoparticle receptors // *Chem. Commun.* 2005. № 3. P. 303.
314. Wang C., Cheng L., Liu Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy // *Biomaterials*. 2011. Vol. 32, № 4. P. 1110–1120.
315. Kang X. et al. Core–Shell Structured Up-Conversion Luminescent and Mesoporous NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@n SiO₂@m SiO₂ Nanospheres as Carriers for Drug Delivery // *J. Phys. Chem. C*. 2011. Vol. 115, № 32. P. 15801–15811.

316. Manthe R.L. et al. Tumor Ablation and Nanotechnology // *Mol. Pharm.* 2010. Vol. 7, № 6. P. 1880–1898.
317. Guo Y., Kumar M., Zhang P. Nanoparticle-Based Photosensitizers under CW Infrared Excitation // *Chem. Mater.* 2007. Vol. 19, № 25. P. 6071–6072.
318. Wang C. et al. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, № 26. P. 6145–6154.
319. Cui S. et al. Amphiphilic chitosan modified upconversion nanoparticles for in vivo photodynamic therapy induced by near-infrared light // *J. Mater. Chem.* 2012. Vol. 22, № 11. P. 4861.
320. Idris N.M. et al. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers // *Nat. Med.* 2012. Vol. 18, № 10. P. 1580–1585.
321. Рейхсфельд В.О., Еркова Л.Н., Рубан В.Л. Лабораторный практикум по синтетическим каучукам. Москва: Химия, 1976. 226 p.
322. Margel S., Rembaum A. Synthesis and Characterization of Poly(glutaraldehyde). A Potential Reagent for Protein Immobilization and Cell Separation // *Macromolecules.* 1980. Vol. 13, № 1. P. 19–24.
323. Basinska T., Slomkowski S. Polystyrene and Poly(Styrene/Acrolein) Latexes with Immobilized Proteins as a Basis of the Diagnostic Agglutination Test // *Uses of Immobilized Biological Compounds.* Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. P. 453–462.
324. Еремин С.А. et al. Влияние структуры трейсера на чувствительность и специфичность поляризационного флуороиммуноанализа // *Биоорганическая химия.* 1993. Vol. 19. P. 836–844.
325. Bovin N. V. et al. Synthesis of polymeric neoglycoconjugates based on N-substituted polyacrylamides // *Glycoconj. J.* 1993. Vol. 10, № 2. P. 142–151.
326. Kitano H. et al. Direct examination of chemical kinetic laws by visual imagery. 3. Association of latex particles modified with antigens and antibodies // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. Vol. 109, № 25. P. 7608–7612.
327. Knappik A., Plückthun A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding // *Protein Eng. Des. Sel.* 1995. Vol. 8, № 1. P. 81–89.
328. Zaitsev S.Y. et al. Influence of polymeric non-ionic surfactants on the surface tension of styrene and on the styrene polymerization process. 2004. Vol. 239, № 1–3. P. 145–149.
329. Хайдуков Е.В. et al. Оптическая визуализация опухолевых тканей с применением антистоксовых наночастиц // *Вестн. РФФИ.* 2014. Vol. 84, № 4. P. 7.
330. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to

- proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. Vol. 65, № 1–2. P. 55–63.
331. Nadort A. et al. Quantitative Imaging of Single Upconversion Nanoparticles in Biological Tissue // *PLoS One* / ed. Shankar S.S. 2013. Vol. 8, № 5. P. e63292.
332. Bykov A. V. et al. Skin phantoms with realistic vessel structure for OCT measurements / ed. Kinnunen M., Myllylä R. 2010. P. 73760F.
333. Лукин Ю.В. et al. Способ получения полиакролеиновых латексов: pat. А.с. 1565845 СССР. 1990.
334. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. Москва: Наука, 1984.
335. Jenkins A.D., Ledwith A. Reactivity, Mechanism and Structure in Polymer Chemistry / ed. Jenkins A.D., Ledwith A. New York, USA: Wiley & Sons, 1974. 654 p.
336. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. Москва: Наука, 1989. 298 p.
337. Никитина Е.А. Гетерополисоединения. Москва: Химия, 1962. 345 p.
338. Lukin Y.V. V. et al. Immunoreagents based on polymer dispersions for immunochemical assays // *J. Mol. Recognit*. 1998. Vol. 11, № 1–6. P. 185–187.
339. Ерохин Е.П. et al. Способ получения антигенного диагностикума: pat. А.с. №1596747. СССР, 1990.
340. Ерохин Е.П. et al. Способ получения диагностикума HBs-антигена: pat. А.с. №1596768. СССР, 1990.
341. Воробьева З.Г., Лазовская А.Л., Лукин Ю.В. Способ выявления микобактериального антигена: pat. А.с. №1723526. СССР, 1991.
342. Vener T. et al. Nucleic acid hybridization analysis using stained latex particles. // *Bioorganicheskaya Khimiya*. 1990. Vol. 16, № 3. P. 424–426.
343. Гаврилова Н.Ф. et al. Определение дифтерийного токсина и анатоксина в реакции латекс-агглютинации с использованием моноклонального диагностикума // *Журнал микробиологии, эпидемиологии*. 2007. № 4. P. 46–50.
344. Бызова Н. et al. Иммунохроматографическая и латекс-агглютинационная системы детекции дифтерийного токсина // *Биоорган химия*. 2009. Vol. 35, № 4. P. 533–554.
345. Lukin Y.V. V. et al. Detection of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Non-Instrumental Latex Immunoassay. 1997. P. 97–105.
346. Мартынов А.И. et al. Разработка латексных систем для экспресс-диагностики инфекций, вызываемых условно-патогенными бактериями. // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. 1999. Vol. 9. P. 114.
347. Кузьмина Н.С. et al. Определение антител к тиреоглобулину и пероксидазе

- щитовидной железы в сыворотке крови человека в реакции латекс-агглютинации. // Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2005. Vol. 8. P. 19–24.
348. Franek M. et al. Monoclonal Elisa for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid: Characterization of Antibodies and Assay Optimization // J. Agric. Food Chem. 1994. Vol. 42, № 6. P. 1369–1374.
349. Thompson J.C., Craig A.R., Davey C.L. Kinetics and proposed mechanism of the reaction of an immunoinhibition, particle-enhanced immunoassay // Clin. Chem. 1997. Vol. 43. P. 2384.
350. Medcalf E.A. et al. A rapid and robust particle-enhanced turbidimetric immunoassay for serum β 2 microglobulin // J. Immunol. Methods. 1990. Vol. 129, № 1. P. 97–103.
351. Montagne P. et al. Use of microsphere-antibody conjugates in microparticle-enhanced nephelometric immunoassay // Bioconjug. Chem. 1992. Vol. 3, № 6. P. 504–509.
352. Generalova A.N. et al. The turbidimetric study of latex particle agglutination: Assay of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // Russ. J. Bioorganic Chem. 2000. Vol. 26, № 7. P. 490–495.
353. Sukhanova A. et al. Highly Stable Fluorescent Nanocrystals as a Novel Class of Labels for Immunohistochemical Analysis of Paraffin-Embedded Tissue Sections // Lab. Investig. 2002. Vol. 82, № 9. P. 1259–1261.
354. Ugelstad J. et al. Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation // Adv. Colloid Interface Sci. 1980. Vol. 13, № 1–2. P. 101–140.
355. Генералова А.Н., Сизова С.В., Гонцова М. с. Синтез субмикронных сополимерных(акролеин/стирол) микросфер, содержащих флуоресцентные полупроводниковые CdSe/ZnS нанокристаллы // Российские Нанотехнологии. 2007. Vol. 2, № 7. P. 144–154.
356. Galian R.E., Guardia M. de la. The use of quantum dots in organic chemistry // TrAC Trends Anal. Chem. 2009. Vol. 28, № 3. P. 279–291.
357. Sherman R.L., Ford W.T. Semiconductor Nanoparticle/Polystyrene Latex Composite Materials // Langmuir. 2005. Vol. 21, № 11. P. 5218–5222.
358. Yang L. et al. Luminescence 3D-Ordered Porous Materials Composed of CdSe and CdTe Nanocrystals // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109, № 23. P. 11501–11504.
359. Generalova A.N. et al. Submicron polymer particles containing fluorescent semiconductor nanocrystals CdSe/ZnS for bioassays // Nanomedicine. 2011. Vol. 6, № 2. P. 195–209.
360. Cherkasov V.R., Dementjeva, I.G. Generalova A. . . : Fast immunomagneto-metric assay for dangerous pathogen identification. // Int. J. Infect. Dis. 2006. Vol. 10. P. S250.
361. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Multivalency: the hallmark of antibodies used for

- optimization of tumor targeting by design // *BioEssays*. 2008. Vol. 30, № 9. P. 904–918.
362. Nikitin M.P. et al. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 13. P. 5827–5832.
363. Generalova A.N. et al. Optical sensing quantum dot-labeled polyacrolein particles prepared by layer-by-layer deposition technique // *J. Colloid Interface Sci.* 2011. Vol. 357, № 2. P. 265–272.
364. Zhou M. et al. Peptide-Labeled Quantum Dots for Imaging GPCRs in Whole Cells and as Single Molecules // *Bioconjug. Chem.* 2007. Vol. 18, № 2. P. 323–332.
365. Riegler J. et al. Blue shift of CdSe/ZnS nanocrystal-labels upon DNA-hybridization // *J. Nanobiotechnology*. 2008. Vol. 6, № 1. P. 7.
366. Mattison K.W., Dubin P.L., Brittain I.J. Complex Formation between Bovine Serum Albumin and Strong Polyelectrolytes: Effect of Polymer Charge Density // *J. Phys. Chem. B*. 1998. Vol. 102, № 19. P. 3830–3836.
367. Shang Z. Bin, Wang Y., Jin W.J. Triethanolamine-capped CdSe quantum dots as fluorescent sensors for reciprocal recognition of mercury (II) and iodide in aqueous solution // *Talanta*. 2009. Vol. 78, № 2. P. 364–369.
368. Wang J.-H. et al. Photoluminescence enhancement by coupling of ovalbumin and CdTe quantum dots and its application as protein probe // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2007. Vol. 305, № 1–3. P. 48–53.
369. De Bruin S.H. et al. pK change of imidazole groups in bovine serum albumin due to the conformational change at neutral pH // *Biochemistry*. 1971. Vol. 10, № 17. P. 3217–3221.
370. Filenko A. et al. Fluorescence Study of Cu²⁺-Induced Interaction between Albumin and Anionic Polyelectrolytes // *Biomacromolecules*. 2001. Vol. 2, № 1. P. 270–277.
371. Fernández-Argüelles M.T. et al. Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and selective determination of Cu(II) in aqueous solutions by luminescent measurements // *Anal. Chim. Acta*. 2005. Vol. 549, № 1–2. P. 20–25.
372. Sommer-Knudsen J., Bacic A. A micro-scale method for determining relative metal-binding affinities of proteins // *Mol. Biotechnol.* 1997. Vol. 8, № 3. P. 215–218.
373. Filenko A. et al. Fluorescence Study of Cu²⁺-Induced Interaction between Albumin and Anionic Polyelectrolytes // *Biomacromolecules*. 2001. Vol. 2, № 1. P. 270–277.
374. Zaharchenko K.V., Martynov I.L., Chistyakov A.A. Laser-induced luminescence of CdSe/ZnS nanoparticles in solution and condensed phase // *Laser Phys.* 2005. Vol. 15, № 8. P. 1150.
375. Кирш Ю.Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. Москва: Наука,

- 1998.
376. Silverstein R.M., Webster F.. Spectrometric Identification of Organic Compounds,. New York, USA, USA: John Wiley & Sons Ltd, 1998.
377. Song M.-M. et al. Optimization of adsorption conditions of BSA on thermosensitive magnetic composite particles using response surface methodology // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011. Vol. 84, № 2. P. 477–483.
378. Murray C.B., Kagan C.R., Bawendi M.G. Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies // *Annu. Rev. Mater. Sci.* 2000. Vol. 30, № 1. P. 545–610.
379. Laidler K.J., Bunting P.S. The chemical kinetics of enzyme action. London: Oxford University Press, 1973.
380. Lauto A. et al. Self-expandable chitosan stent: design and preparation // *Biomaterials*. 2001. Vol. 22, № 13. P. 1869–1874.
381. Wang F., Liu X. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals // *Chem. Soc. Rev.* 2009. Vol. 38, № 4. P. 976.
382. Yan F. et al. Preparation of Fe₃O₄/polystyrene composite particles from monolayer oleic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles via miniemulsion polymerization // *J. Nanoparticle Res.* 2009. Vol. 11, № 2. P. 289–296.
383. Ouasri A. et al. Vibrational study of (CH₃)₄NSbCl₆ and [(CH₃)₄N]₂SiF₆ // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2002. Vol. 58, № 12. P. 2779–2788.
384. Generalova A.N. et al. Submicron polyacrolein particles in situ embedded with upconversion nanoparticles for bioassay // *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, № 5. P. 1709–1717.
385. Das G.K., Stark D.T., Kennedy I.M. Potential Toxicity of Up-Converting Nanoparticles Encapsulated with a Bilayer Formed by Ligand Attraction // *Langmuir*. 2014. Vol. 30, № 27. P. 8167–8176.
386. Atabaev T.S. et al. Cytotoxicity and cell imaging potentials of submicron color-tunable yttria particles // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2012. P. n/a-n/a.
387. Jin J. et al. Polymer-Coated NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ Upconversion Nanoparticles for Charge-Dependent Cellular Imaging // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 10. P. 7838–7847.
388. Sheftel V.O., Kataeva S.E. Migration of Harmful Chemicals from Polymeric Materials. Moscow: Khimia, 1978.
389. Forrest M.L., Koerber J.T., Pack D.W. A Degradable Polyethylenimine Derivative with Low Toxicity for Highly Efficient Gene Delivery // *Bioconjug. Chem.* 2003. Vol. 14, № 5. P. 934–940.

390. Tiyaboonchai W., Woiszwilllo J., Middaugh C.R. Formulation and characterization of DNA–polyethylenimine–dextran sulfate nanoparticles // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003. Vol. 19, № 4. P. 191–202.
391. Deyev S.M. et al. Design of multivalent complexes using the barnase–barstar module // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 12. P. 1486–1492.
392. Grebenik E.A. et al. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 7. P. 076004.
393. Hynes N.E. et al. Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines // *J. Cell. Biochem.* 1989. Vol. 39, № 2. P. 167–173.
394. Heusmann H. Characterization of female breasts in vivo by time-resolved and spectroscopic measurements in the near infrared spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 1996. Vol. 1, № 4. P. 425.
395. Pifferi A. et al. Spectroscopic time-resolved diffuse reflectance and transmittance measurements of the female breast at different interfiber distances // *J. Biomed. Opt.* 2004. Vol. 9, № 6. P. 1143.
396. Peng J. et al. Polyphosphoric acid capping radioactive/upconverting NaLuF₄:Yb,Tm,153Sm nanoparticles for blood pool imaging in vivo // *Biomaterials.* 2013. Vol. 34, № 37. P. 9535–9544.
397. Cao T. et al. Biodistribution of sub-10 nm PEG-modified radioactive/upconversion nanoparticles // *Biomaterials.* 2013. Vol. 34, № 29. P. 7127–7134.
398. Generalova A.N. et al. PEG-modified upconversion nanoparticles for in vivo optical imaging of tumors // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6, № 36. P. 30089–30097.
399. Poon W.C.K. *Soft Condensed Matter Physics in Molecular and Cell Biology* / ed. Poon W.C.K., Andelman D. CRC Press, 2006.
400. Fang C. et al. In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006. Vol. 27, № 1. P. 27–36.
401. Wang Z. et al. Hot Water-Promoted Ring-Opening of Epoxides and Aziridines by Water and Other Nucleophiles // *J. Org. Chem.* 2008. Vol. 73, № 6. P. 2270–2274.
402. Cole A.J. et al. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, № 26. P. 6291–6301.
403. Moghimi S.M., Murray A.C., Hunter J.C. Long-circulating and target-specific

- nanoparticles: theory to practice // *Pharmacol. Rev.* 2001. Vol. 53. P. 283.
404. Auerbach R., Auerbach W. *Vasculogenesis and Angiogenesis // The New Angiotherapy.* Totowa, NJ: Humana Press, 2002. P. 1–6.
405. Hobbs S.K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. Vol. 95, № 8. P. 4607–4612.
406. Kobayashi H., Watanabe R., Choyke P.L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? // *Theranostics.* 2014. Vol. 4, № 1. P. 81–89.
407. Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2009. Vol. 96, № 1. P. 1–8.
408. Agostinis P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update // *CA. Cancer J. Clin.* 2011. Vol. 61, № 4. P. 250–281.
409. Bareford L.M. et al. Intracellular Processing of Riboflavin in Human Breast Cancer Cells // *Mol. Pharm.* 2008. Vol. 5, № 5. P. 839–848.
410. Ruane P.H. et al. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light // *Transfusion.* 2004. Vol. 44, № 6. P. 877–885.
411. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a–induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // *Am. J. Ophthalmol.* 2003. Vol. 135, № 5. P. 620–627.
412. de Souza Queiroz K.C. et al. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours // *Cancer Lett.* 2007. Vol. 258, № 1. P. 126–134.
413. Wang M. et al. Lanthanide-doped upconversion nanoparticles electrostatically coupled with photosensitizers for near-infrared-triggered photodynamic therapy // *Nanoscale.* 2014. Vol. 6, № 14. P. 8274.
414. Baier J. et al. Singlet Oxygen Generation by UVA Light Exposure of Endogenous Photosensitizers // *Biophys. J.* 2006. Vol. 91, № 4. P. 1452–1459.
415. Pass H.I. Photodynamic Therapy in Oncology: Mechanisms and Clinical Use // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 1993. Vol. 85, № 6. P. 443–456.
416. Meinhardt M. et al. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 4. P. 044030.
417. Tromberg B.J. et al. Non-Invasive In Vivo Characterization of Breast Tumors Using Photon Migration Spectroscopy // *Neoplasia.* 2000. Vol. 2, № 1–2. P. 26–40.