

На правах рукописи

**Ященок Алексей Михайлович**

**НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ  
ДОСТАВКИ И ДЕТЕКТИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

03.01.02 — Биофизика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Саратов – 2016

Работа выполнена на кафедре физики полупроводников и в лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского»

**Научный консультант:** **Горин Дмитрий Александрович**, доктор химических наук, доцент

**Официальные оппоненты:** **Баграташвили Виктор Николаевич**, доктор физико-математических наук, профессор, зав. лабораторией лазерной химии и биологии «Института проблем лазерных и информационных технологий РАН»

**Курочкин Илья Николаевич**, доктор химических наук, профессор, директор ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии Наук»

**Вайнер Юрий Григорьевич**, доктор физико-математических наук, профессор, зав. лабораторией электронных спектров молекул «Института спектроскопии РАН»

**Ведущая организация:** ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН»

Защита диссертации состоится «24» января 2017 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.243.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», по адресу 410012, Саратов, ул. Университетская, д. 40, корпус III, аудитория 34.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и на сайте <http://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-05/doktorskaya-dissertaciya-yashchenka-alekseya>

Автореферат размещен на сайте ВАК

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета доктор  
физико-математических наук,  
профессор

Павлов Алексей Николаевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Развитие персонализированной медицины, направленное на повышение эффективности диагностики и качества лечения [1], неразрывно связано с разработкой функциональных нано- и микроструктур и систем на их основе [2]. Предполагается, что посредством таких функциональных систем будет осуществляться не только доставка и высвобождение биологически активных веществ, но и эффективный контроль окружающего пространства и визуализация систем в организме. Сравнительно недавно такое направление получило название тераностики. Значительные успехи в тераностике были достигнуты при использовании искусственных носителей, таких как, металлические наночастицы, липосомы, мицеллы, и полимерные нано- и микроферы. Однако существует ряд проблем, решение которых будет способствовать эффективному применению искусственных носителей в биологии и медицине. К ним относятся:

- экранирование биологически активных препаратов от действия иммунной системы;
- доставка и высвобождение биологически активных препаратов: в заданный момент или пролонгированное;
- распознавание патологических областей и их зондирование разрабатываемыми носителями;
- биосовместимость разработанных систем;
- визуализация носителей в организме и мониторинг патологических областей после проведения терапии.

Использование методов самоорганизации для построения функциональных систем является весьма перспективным. Среди методов самоорганизации следует выделить метод последовательной адсорбции (ПА) [3]. С точки зрения выбора способов инкапсулирования веществ и спектра материалов (полимеры, флуоресцентные метки, квантовые точки, металлические наночастицы, биомолекулы) метод ПА является универсальным для построения функциональных нано- и микроструктур [4]. Структуры «ядро-оболочка» и микрокапсулы, физико-химическими свойствами которых можно управлять внешними воздействиями, например, химическим, физическим или биологическим [5], являются наиболее яркими представителями функциональных систем, получаемых методом ПА. Для управления свойствами таких структур наиболее перспективным является оптическое излучение, главным образом, благодаря широкому спектральному диапазону, возможности совмещения с другими методами и построения портативных систем, неинвазивности и возможности изучения интактных биологических объектов в окне прозрачности биотканей [6]. Благодаря высокой чувствительности и спектральной избирательности метод гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) является мощным аналитическим инструментом, который нашел

применение для физических и технологических приложений. Наряду с этим предпринимаются попытки использования метода ГКР для биологических и медицинских приложений. Однако несмотря на существенный прогресс, сделанный за минувшие десятилетия, в этом направлении имеется ряд проблем, относящихся к адекватности и точности определения коэффициента усиления сигнала ГКР, воспроизводимости и стабильности сигнала ГКР, стабильности структур ГКР и их токсичности, затратам на создание структур ГКР.

**Целью работы** являлись разработка и оптимизация новых подходов построения структур «ядро-оболочка» и микрокапсул, оболочка которых чувствительна к внешнему воздействию с целью их одновременного использования для инкапсулирования, доставки и высвобождения биологически активных веществ, а также в качестве сенсоров ГКР.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи исследования:

1. Разработать подход для построения многокомпонентных носителей методом последовательной адсорбции с целью инкапсулирования нескольких биологически активных компонентов и проведения ферментативной реакции в объеме носителей.
2. Экспериментально исследовать влияние количества полиэлектролитных слоев, типа полиэлектролита и их последовательности в структуре оболочек микрокапсул на скорость разложения биodeградируемых микрокапсул при действии протеолитического фермента.
3. Провести инкапсулирование терапевтического фермента в объем биоразлагаемых полиэлектролитных микрокапсул и экспериментально исследовать протеолитическую и температурную стабильность фермента, а также выживаемость лейкозных клеток при их взаимодействии с полученными микрокапсулами.
4. Разработать подходы построения сенсоров ГКР на основе микрочастиц карбоната кальция, диоксида кремния и биосовместимых нетканых нановолокон хитозана и экспериментально исследовать применение полученных структур в качестве систем обнаружения биологически активных веществ методом ГКР, контрастных агентов для фотоакустической спектроскопии и других биофизических приложений.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Возможна одновременная инкапсуляция низко- и высокомолекулярных веществ в индивидуальные многокомпонентные носители, причем внутренний объем носителей можно использовать в качестве микрореакторов для проведения ферментативной реакции.
2. Время ферментативного разложения микрокапсул, оболочка которых сформирована из биоразлагаемых полиэлектролитов может быть увеличено от получаса до нескольких часов за

счет увеличения числа биоразлагаемых полиэлектролитных слоев или за счет включения недеградируемых синтетических полиэлектролитов в структуру оболочек микрокапсул.

3. Капсуляция терапевтического фермента L-аспарагиназы в биodeградируемые микрокапсулы приводит к увеличению протеолитической и температурной стабильности фермента при 37 °С, что способствует сохранению активности фермента *in vivo* при терапии острого лимфобластного лейкоза.

4. Модификация пористых микрочастиц карбоната кальция и пористых нетканых нановолокон хитозана наночастицами золота с контролируемым распределением наночастиц на поверхности и в объеме этих структур обеспечивает условия для обнаружения глюкозы без использования специальных меток.

5. Включение одностенных углеродных нанотрубок в структуру сенсора ГКР позволяет визуализировать его по характерной интенсивности КР сигнала одностенных углеродных нанотрубок и создает условие для получения областей с локальным максимумом ЭМ поля, что увеличивает отношение сигнал-шум при определении биомолекул внутри индивидуальной живой клетки методом ГКР. Предложенный подход может быть использован при создании платформ ГКР на любых неорганических микрочастицах.

6. Использование наноагрегатора в виде наночастиц золота и нанотермометра из одностенных углеродных нанотрубок в индивидуальных микроносителях позволяет проводить определение нагрева структур на их основе, измеряя Стоксово и Антистоксово КР одностенных углеродных нанотрубок.

7. Микрокапсулы, оболочка которых состоит из одностенных углеродных нанотрубок и наночастиц золота, эффективны в качестве контрастных агентов для фотоакустической спектроскопии и их визуализации в крови с интенсивностью фотоакустического сигнала, превышающей интенсивность фотоакустического сигнала, генерируемого средой.

### **Научная новизна**

1. Предложен подход к получению многокомпонентных носителей, состоящих из наноносителей, адсорбированных на микроносители методом полиионной самосборки. Показано, что концентрация нано- и микроносителей, ионная сила растворов полиэлектролитов и материал «ядра» для микроносителей влияют на агрегацию многокомпонентных носителей и концентрацию наноносителей на поверхности микроносителей. С помощью предложенного способа были сформированы микрореакторы типа липосомы/пористые микрочастицы

карбоната кальция, ферментативная реакция в которых инициирована после разрушения липосом ультразвуком мощностью 50 мВт/см<sup>2</sup> (35 кГц). Установлено влияние наличия пористых микрочастиц карбоната кальция в структуре многокомпонентных носителей на их стабильность и на кинетику ферментативной реакции в объеме носителей.

2. Показана эффективность использования диализа для растворения микрочастиц карбоната кальция, загруженных терапевтическим ферментом небактериальной природы типа L-аспарагиназа. Установлено, что концентрация растворителя этилендиаминтетрауксусной кислоты не более 20 мМ является оптимальной для сохранения полной терапевтической активности L-аспарагиназы в объеме микрокапсул, оболочка которых сформирована из биоразлагаемых полиэлектролитов. Проведена инкапсуляция L-аспарагиназы в микрокапсулы с разным числом биоразлагаемых полиэлектролитов в структуре оболочек микрокапсул, с сохранением полной каталитической активности и улучшенной биохимической стабильностью фермента. Установлено, что на скорость разложения оболочек микрокапсул, состоящих из биоразлагаемых полиэлектролитов типа полиаргинин/полиаспаргин, оказывает влияние число полиэлектролитных слоев в структуре оболочки, наличие и порядок недеградируемых синтетических полиэлектролитов и концентрация протеолитического фермента.

3. Предложен подход для создания платформ ГКР на основе нетканых биосовместимых нановолокон хитозана. Установлена зависимость концентрации золотохлористоводородной кислоты на заполнение и распределение наночастиц золота в структуре нановолокон. Показано, что разработанные платформы ГКР эффективны для обнаружения глюкозы без использования специальных меток с относительным стандартным отклонением сигнала КР не более 25 %.

4. Разработаны новые платформы ГКР типа пористые микрочастицы карбоната кальция/наночастицы золота и микрочастицы диоксида кремния/одностенные углеродные нанотрубки/наночастицы золота. Показана и раскрыта роль включения одностенных углеродных нанотрубок в структуру платформ ГКР и их взаимодействия с наночастицами золота, что позволяет получать области с локальным максимумом ЭМ поля и проводить отображение платформ ГКР по характерной линии КР. Показана возможность определения нагрева таких структур измеряя Стоксово и Антистоксово КР от одностенных углеродных нанотрубок и определены предельные плотности мощности лазерного излучения для сохранения целостности структуры ГКР.

5. Получены микрокапсулы с одностенными углеродными нанотрубками и наночастицами золота в структуре оболочек. Показана возможность использовать такие микрокапсулы в качестве контрастных агентов для фотоакустической спектроскопии и проведена их *in vitro* визуализация в воде и в крови.

## Практическая значимость работы

Практическая значимость работы заключается в усовершенствовании наноструктурированных функциональных систем для целей тераностики. Использование результатов работы может послужить практической базой для создания функциональных носителей, в которых объем будет использован для загрузки биологически активных веществ, в то время как оболочка будет выполнять роль чувствительного элемента. В частности, способ построения многокомпонентных носителей может лечь в основу капсулирования низко- и высокомолекулярных, гидрофильных/гидрофобных веществ одновременно в один носитель. Кроме того, такие многокомпонентные системы могут найти практическое применение в качестве микрореакторов химических и биохимических реакций. Исследование сохранения протеолитической и температурной активности терапевтического фермента, его капсулирование и высвобождение из биodeградируемых микрокапсул будет способствовать усовершенствованию терапии онкологических заболеваний.

Предложенная серия подходов к получению структур ГКР может стать базой для создания воспроизводимых и стабильных сенсоров ГКР и для обнаружения веществ без использования специальных меток. В частности, платформа ГКР на основе биосовместимых нетканых нановолокон хитозана может лечь в основу для создания имплантируемых сенсоров, например, для мониторинга процесса регенерации в организме. Сочетание одностенных углеродных нанотрубок и наночастиц золота в структуре оболочек микроносителей является весьма актуальным для визуализации носителей в живых клетках и сильно рассеивающих средах. Результаты нагрева структур с оболочкой из одностенных углеродных нанотрубок и наночастиц золота лазерным излучением, послужит базой для реализации лазерной гипертермии, фотоиндуцированного высвобождения веществ из объема микроносителей и лазерной трансфекции веществ через биологические мембраны, а также для теоретического и экспериментального изучения нагрева металлических наночастиц и превращения лазерного излучения в тепло в наноструктурированных объектах.

Диссертационная работа выполнена при поддержке следующих научных фондов:

Стипендия российско-немецкой программы German Academic Exchange Service (DAAD), проект «Multicomponent nanocomposite microcontainers with remote control properties», Referat 325 A/09/03626, (Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces, Golm-Potsdam, Germany);

Стипендия фонда Александра фон Гумбольдта (Alexander von Humboldt Scholarship), проект «Label-free single molecule detection based on Raman scattering on self-assembled gold nanoparticles», (Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces, Golm-Potsdam, Germany);

Грант Правительства Российской Федерации №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации (*исполнитель*);

Грант Евросоюза, программа IRSES(PI) (International Research Staff Exchange Scheme) FP7 - «Люди» (Marie Curie Actions) 2013, «Dual - Imaging Nano/Microsized Theranostics (against cancer), DNaMIT», (the Marie Curie project PIRSES-GA-2013-612673) (*исполнитель*);

Грант РФФИ №15-29-01172 офи\_м, «Платформы гигантского комбинационного рассеяния на основе неорганических пористых частиц, декорированных плазмонно-резонансными наночастицами, как сенсорные системы для внутриклеточных исследований» (*ответственный исполнитель*).

**Степень достоверности** полученных результатов обеспечивается применением современных методов исследования, таких как просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, оптическая конфокальная микроскопия, оптическая спектроскопия, использованием традиционных методик анализа полученных данных и воспроизводимостью результатов. Основные результаты работы прошли оценку независимых рецензентов с последующим опубликованием в высокорейтинговых международных научных журналах (Adv. Funct. Mater IF – 11.8, ACS Nano IF – 12.8, Angewandte Chemie IF – 11.6, Small IF – 8.6, Biomacromolecules IF – 5.7, ACS Applied Materials and Interfaces IF – 6.7). Полученные результаты находятся в соответствии с результатами других авторов, работающих в области нанотехнологий, материаловедения, спектроскопии комбинационного рассеяния света и гигантского комбинационного рассеяния света, биофотоники и их применения в медицине для решения задач диагностики и терапии.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы были представлены на научных семинарах, научных школах, всероссийских и международных конференциях, из них 13 устных докладов на конференциях и научных школах (5 приглашенных), в том числе:

Saratov Fall Meeting – SFM'15, Saratov, 2015; 8th International Conference on Materials for Advanced Technologies of the Materials Society of Singapore and 16th IUMRS - International Conference in Asia together with 4th Photonics Conference 2015 (ICMAT2015 & IUMRS-ICA2015, Suntec Singapore, 28.06. – 03.07.2015; 6th International Conference «NANOPARTICLES, NANOSTRUCTURED COATINGS AND MICROCONTAINERS: TECHNOLOGY, PROPERTIES,

APPLICATIONS» Saratov, Russia, 21. – 24.06.2015; “Breaking Frontiers: Submicron Structures in Physics and Biology”, 50th Zakopane School of Physics, Zakopane, Krakow, Poland, 18. – 23.06.2015; Technology Platform Microencapsulation 4th Phase 2014-2015, Potsdam-Golm, Germany 21.05.2014; SupraNano Self-Assembly, Paris, France 06. - 07.06.2013; IV International Workshop on “Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications”, Golm, Germany 06. - 09.05.2013; Imagenano 2013, Bilbao, Spain 23. - 26.04.2013; Deutsches BioSensor Symposium, Wildau Berlin, Germany 10. - 13.03.2013; Network Meeting of the Alexander von Humboldt Foundation, Karlsruhe 28. - 30.11.2012; German-Russian Conference on Fundamentals and Applications of Nanoscience at Free University Berlin 19. - 21.05.2012; 25th Meeting of the European Colloid and Interfaces Society, Berlin, Germany 05. - 09.09.2011; 2nd International School “Nanomaterials and Nanotechnologies in Living System. Safety and Nanomedicine” Moscow, Russia 19. - 24.09.2011; 1st International Summer School “Nanomaterials and Nanotechnology in Living Systems” at Moscow Region, Russia 29.06. – 04.07.2009; International workshop on nanobiotechnologies, Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia, 11.2006; Industry Nanosystems and Materials: Materials conference at Moscow, Russia 10.2006.

### **Личный вклад**

Большая часть экспериментальных результатов была получена лично соискателем, а также совместно с коллегами научных групп в рамках сотрудничества при выполнении совместных проектов. Вклад соискателя заключался в теоретическом обосновании проблемы, постановке и решении основных задач исследования, получении образцов и проведении экспериментальных работ, интерпретации полученных результатов, обосновании их практического применения, а также систематизации, написании и публикации статей. Результаты, опубликованные в статьях [1, 2, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 22, 24, 25], были получены в сотрудничестве с исследовательскими группами (Enzyme Biochemistry Group, Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany; Department of Interfaces, Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces, Potsdam, Germany; Department of Molecular Biotechnology, Center for Nano-Biophotonics, Ghent University, Ghent, Belgium; Biophysics, School of Engineering and Sciences, Jacobs University of Bremen, Bremen, Germany; Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва, Россия; Fachbereich Physik, Philipps University of Marburg, Marburg, Germany), где соискатель выполнял экспериментальную работу, анализ данных и подготовку результатов к публикации. Также вместе с коллегами были подготовлены к публикации следующие обзорные статьи по тематике, относящейся к данной работе [1, 13, 16, 23, 28]. В серии ранних работ [30, 31, 32, 33] соискатель выполнял экспериментальную работу, анализ полученных результатов и подготовку материалов к публикации.

## Публикации

По материалам диссертации опубликовано 42 научные работы, в том числе 33 статьи в изданиях, включенных в перечень рекомендованных ВАК, 7 статей в сборниках научных трудов, 2 учебно-методических пособия.

## Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованных источников (604 наименования), приложения и списка сокращений. Диссертация изложена на 274 страницах, содержит 97 рисунков и 4 таблицы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована её цель и основные задачи, описаны научная новизна и практическая значимость работы, приведены основные положения и результаты, выносимые на защиту, описано краткое содержание, структура и объем диссертации, апробация работы и личный вклад автора.

В **Главе 1** приведен аналитический обзор литературы. Рассмотрены многофункциональные микрочастицы и микрокапсулы на их основе для создания универсальных систем доставки биологически активных препаратов и сенсорных структур. Благодаря универсальности метода последовательной адсорбции стала возможной модификация поверхности коллоидных частиц и получение микрокапсул на основе биологических объектов (эритроциты, эхиноциты), неорганических, органических и полимерных материалов. Описаны основные методы капсулирования веществ в объем микрочастиц и микрокапсул, в том числе за счет изменения условий микроокружения (рН, ионная сила, температура), в которой находятся микрокапсулы, а также способы высвобождения молекул из объема микрокапсул внешними воздействиями (рН, ионная сила, воздействие ультразвука, лазерное излучение, ферментативное разложение). Рассмотрены перспективные направления использования микрочастиц и микрокапсул для биомедицинских приложений, в частности для внутриклеточного транспорта биоактивных молекул (пептиды, ферменты, ДНК) в иммунологии, для изучения активности нейронов и стволовых клеток, для *in vivo* терапии онкологических заболеваний, для защиты от коррозии, для медицинской диагностики, для модификации наночастиц и дистанционного измерения локальной температуры в структурах на основе плазмонно-резонансных наночастиц. Предполагается, что для следующих применений микрочастиц и микрокапсул в области живых систем необходимо оптимизировать методы капсулирования и высвобождения биологически активных препаратов, разработать подходы для создания многофункциональных носителей, с помощью которых откроются новые возможности, например, загрузка нескольких веществ в

один носитель или проведение эффективного контроля окружающего пространства и визуализация систем в организме. Одним из решений видится использование поверхности носителей в качестве сенсора ГКР и, соответственно, получение информации об изменениях вблизи поверхности сенсора.

В **Главе 2** рассмотрены существующие методы создания высокоэффективных и высокочувствительных структур ГКР. Обсуждаются основные направления их использования для биомедицинских приложений, а именно для внутриклеточного обнаружения молекул, взаимодействия антибиотиков с ДНК в культуре клеток, мониторинга изменения pH внутриклеточного пространства при эндоцитозе наночастиц, распознавания конформационных изменений молекул внутри клетки мембранных белков, визуализации поверхности клеточной мембраны, *in vivo* детектирования глюкозы, распознавания клеток злокачественных опухолей и идентификации микроорганизмов (бактерий). Для применения сенсоров ГКР в биодиагностике, в особенности в живых системах, необходимо создание высокочувствительных, воспроизводимых, стабильных, нетоксичных и недорогих платформ ГКР. Одним из перспективных направлений получения структур ГКР с требуемыми свойствами, является использование двух- и трехмерных неорганических структур в совокупности с методами, позволяющими проводить модификацию их поверхности плазмонно-резонансными наночастицами.

В **Главе 3** впервые продемонстрирован подход для капсулирования низко- и высокомолекулярных веществ в индивидуальные многокомпонентные микроносители. Формирование многокомпонентных носителей достигнуто за счет электростатического взаимодействия между противоположно заряженными полиэлектролитными оболочками наночастиц и микроносителей при их смешивании. Установлено, что пористость носителей, ионная сила и концентрация нано- и микроносителей оказывают влияние на степень заполнения и на агрегацию многокомпонентных носителей. Сформированы многокомпонентные носители на основе микрочастиц карбоната кальция с пероксидазой в объеме микрочастиц и липосом, содержащих субстрат Amplex Red. Ультразвуковое воздействие на данные многокомпонентные носители с мощностью  $50 \text{ мВт/см}^2$  (35 кГц) приводит к разрушению липосом и выходу молекул субстрата, которые реагируют с молекулами фермента в объеме микрочастиц карбоната кальция (Рис. 1). В серии контрольных экспериментов было установлено, что разрушение липосом происходит в месте контакта липидной мембраны со слоем полиэлектролита. При этом гидрофобность липидного слоя вызывает нуклеацию радикалов с низким порогом кавитации, что в конечном итоге приводит к разрушению липосом и выходу молекул субстрата. Локализация фермента в порах микрочастиц карбоната кальция замедляет время протекания ферментативной реакции в многокомпонентных носителях на их основе по сравнению с

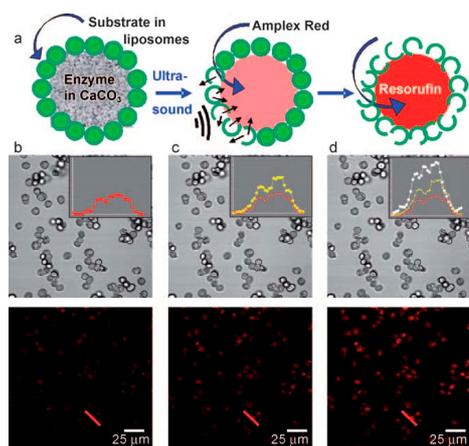


Рис. 1. а) Схема, иллюстрирующая многокомпонентные носители на основе пористых микрочастиц карбоната кальция, разрушение липосом ультразвуком, и формирование резорфина в объеме микрочастиц. Изображения носителей, полученные методом конфокальной сканирующей флуоресцентной микроскопии в просвечивающем (средний ряд) и флуоресцентном режиме (нижний ряд) после воздействия ультразвука и добавления  $H_2O_2$  в разные интервалы времени (b) 1 мин, (c) 10 мин, и (d) 15 мин. Интенсивность флуоресценции резорфина в разные интервалы времени показана на вставках

аналогичной реакцией в многокомпонентных микрокапсулах, где фермент не локализован в порах (Рис. 2). Важно, что интенсивность ультразвука, необходимая для вскрытия липосом, находится в диапазоне интенсивностей, разрешенной для использования в медицине ( $0.08 - 8 \text{ Вт/см}^2$ ). Предложенный подход является очень важным шагом на пути одновременного капсулирования, доставки и высвобождения низко- и высокомолекулярных (гидрофобных/гидрофильных) веществ в индивидуальном носителе, а также для использования такой структуры в качестве микрореактора биохимических реакций. Для применения мультикомпонентных носителей *in vivo* необходимо выполнить соответствующую оптимизацию, например, увеличение стабильности липосом, контролируемое заполнение наноносителей, содержащих разные биологически активные вещества, контролируемое отделение наноносителей [7].

В Главе 4 проведено исследование влияния числа биоразлагаемых полиэлектролитных слоев, наличия и порядка синтетических полиэлектролитов в оболочках микрокапсул, а также концентрации протеолитического фермента (проназы) на время разложения оболочек микрокапсул [7,8]. Установлено, что увеличение полиэлектролитных пар биоразлагаемых слоев полиаргинин/полиглутаминовая кислота в структуре оболочек микрокапсул с 4 до 8 приводит к увеличению времени ферментативного разложения микрокапсул до получаса (Рис. 3, 4) [8]. Включение пары недеградируемых полиэлектролитов и их порядок увеличивает время ферментативного разложения микрокапсул от одного часа до полного сохранения структуры оболочек, соответственно (Рисунки 3, 4). На время разложения биodeградируемых оболочек

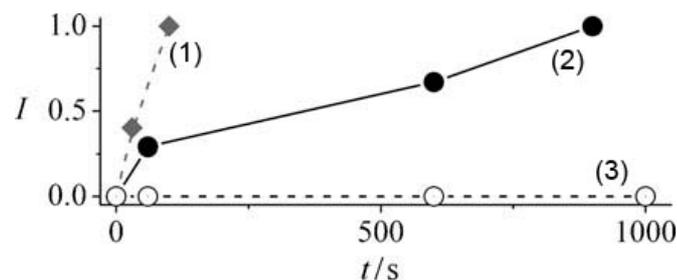


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресцентного сигнала продукта ферментативной реакции резорфина от времени после воздействия ультразвука на многокомпонентные носители на основе полиэлектролитных микрокапсул (1) и микрочастиц карбоната кальция (2). Аналогичная зависимость без воздействия ультразвука (3). Содержание фермента в микрочастицах и микрокапсулах одинаково, принимая во внимание некоторые потери фермента при формировании микрокапсул.

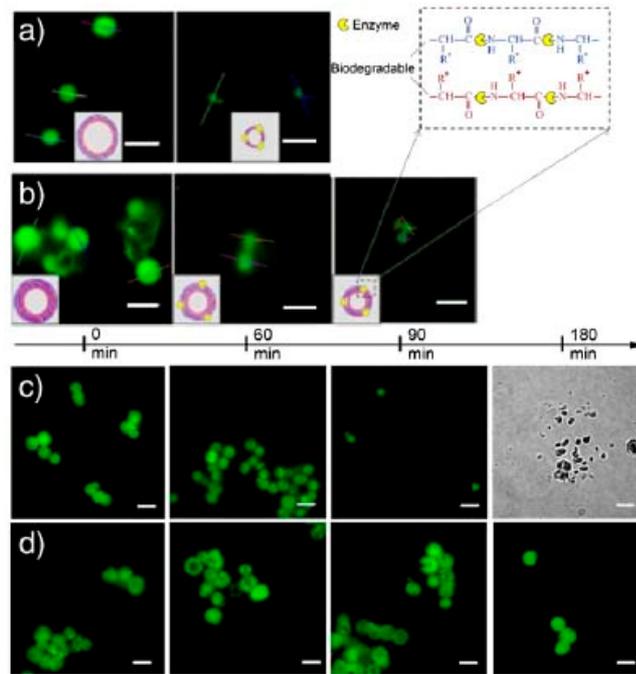


Рис. 3. Изображения биodeградируемых микрокапсул, полученные методом конфокальной сканирующей лазерной микроскопии во флуоресцентном режиме. Изображения (a) - микрокапсулы, состоящие из четырех бислоев (pArg/pGlu)<sub>4</sub> с флуоресцентно-меченным FITC-Dextran в объеме микрокапсул до и после 60 минут инкубации в растворе проназы; (b) микрокапсулы, состоящие из восьми бислоев (pArg/pGlu)<sub>8</sub> до (0 минут) и после 60 и 90 минут инкубации в растворе проназы; (c) - (PAH/PSS)(pArg/pGlu)<sub>3</sub>, и (d) - (pArg/pGlu)<sub>3</sub>(PAH/PSS) микрокапсулы до инкубации (0 минут) и после 60, 90 и 180 минут инкубации, соответственно. Масштабный отрезок соответствует 5 микрометрам. Статистика выполнена для 100 микрокапсул.

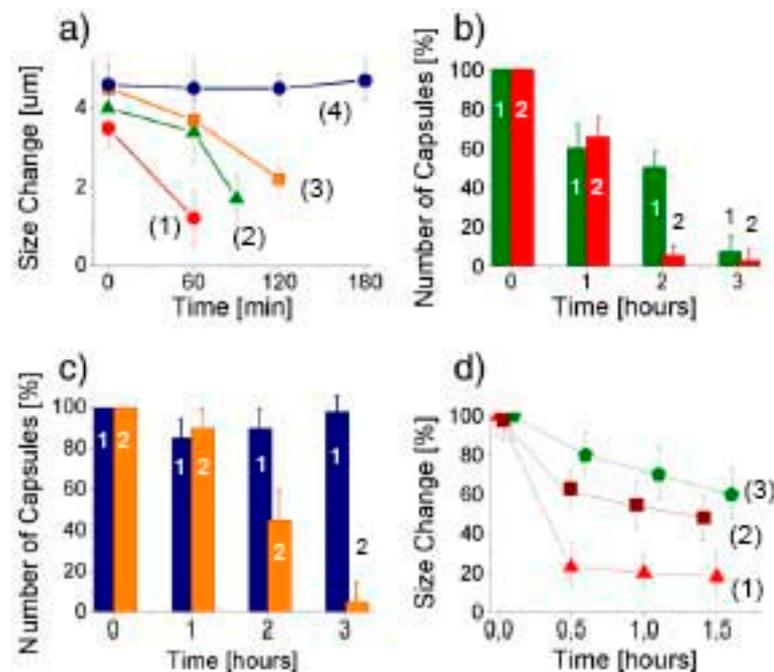


Рис. 4. а) Зависимость среднего размера микрокапсул, имеющих структуру оболочки (pArg/pGlu)<sub>4</sub> – (1), (pArg/pGlu)<sub>8</sub> – (2), (PAH/PSS)(pArg/pGlu)<sub>3</sub> – (3), (pArg/pGlu)<sub>3</sub>(PAH/PSS) – (4), от времени инкубации в водном растворе проназы (1 мг/мл). Зависимость среднего размера микрокапсул б) (pArg/pGlu)<sub>4</sub> (столбцы 1) (pArg/pGlu)<sub>8</sub> (столбцы 2), в) (PAH/PSS)(pArg/pGlu)<sub>3</sub> (столбцы 2) и (pArg/pGlu)<sub>3</sub>(PAH/PSS) (столбцы 1). Данные на (d) получены в экспериментах *in-situ* для микрокапсул (pArg/pGlu)<sub>4</sub> (1) и (pArg/pGlu)<sub>8</sub> (3) в водном растворе проназы (1 мг/мл), (pArg/pGlu)<sub>4</sub> (2) в водном растворе проназы (5 мг/мл). Статистика получена для 30 капсул в 3 экспериментах.

микрокапсул также оказывает влияние концентрация проназы, с увеличением которой время разложения снижается. Управляемое разрушение оболочек микрокапсул, которые сформированы из биodeградируемых полиэлектролитов, открывает возможности пролонгированного высвобождения биологически активных веществ после их доставки в патогенную область организма. При этом необходимо, чтобы время разложения носителей составляло минуты, часы и даже дни [9]. Управление разложением оболочек микрокапсул при действии ферментов может стать альтернативой другим способам разрушения оболочек, например, лазерному или ультразвуковому воздействиям, применение которых связано с потерями излучения и необходимостью использования высоких доз излучения в живых системах. Несмотря на полученные результаты исследование ферментативного разложения оболочек микрокапсул проводилось *in vitro* и лишь одна работа была проведена *in vivo* [10]. В связи с этим представляется необходимым развитие подхода биологического разложения оболочек микрокапсул для контролируемого выхода биологически активных веществ в живых системах. С задачей контролируемого разложения оболочек микрокапсул биологическим воздействием тесно связана задача сохранения капсулированного вещества. Как и в случае высвобождения капсулированного вещества из объема микрокапсул полиэлектролитная оболочка играет очень важное значение. Поэтому оптимизация формирования структуры оболочек микрокапсул с целью сохранения основных функций биологически активных веществ является весьма актуальной. В данной работе проведено капсулирование фермента L-аспарагиназы в микрочастицы карбоната кальция с последующим формированием оболочек микрокапсул из биodeградируемых полиэлектролитных слоев. L-аспарагиназа представляет собой терапевтический фермент, который одобрен для лечения лейкемии управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration (FDA), США). Активность L-аспарагиназы после ее введения в организм может снижаться в результате активации антител, действия ферментов трипсина и тромбина [11, 12], поэтому экранирование L-аспарагиназы от действия иммунной системы с помощью микрокапсул выглядит перспективным. В качестве терапевтического фермента был выбран дрожжевой фермент ScASNaseI, который не содержит глутаминазу и имеет идентичные каталитические свойства к аспарагину, как и фермент, который выделяют из бактерий кишечной палочки (*E. coli*). Фермент выделяемый из дрожжей перспективен для использования в качестве антиракового препарата с низким побочным эффектом, что обычно характерно для бактериальных ферментов. Зависимость активности свободного фермента ScASNaseI и капсулированного в микрокапсулы от времени инкубации в растворе трипсина при 37 °C приведена на рисунке 5. Как видно 100% активность фермента, находящегося в объеме микрокапсул, сохраняется в течение первого часа инкубации, после чего происходит линейное

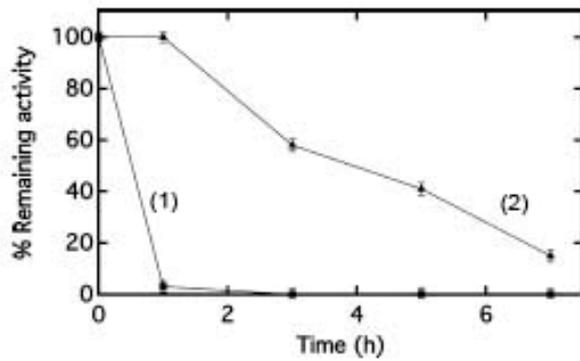


Рис. 5. Зависимость остаточной активности фермента ScASNaseI в свободном виде (1) и капсулированного в биodeградируемые микрокапсулы (2) от времени инкубации с трипсином при 37 °С. Измерение активности проводилось каждые 2 часа для двух независимых экспериментов.

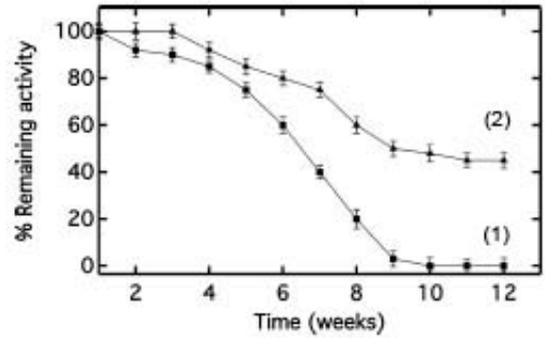


Рис. 6. Зависимость остаточной активности фермента ScASNaseI в свободном виде (1) и капсулированного в биodeградируемые микрокапсулы (2) от времени инкубации при 4 °С в отсутствие стабилизаторов. Остаточная активность измерялась в течение 3 месяцев. Результаты получены для трех образцов при одинаковых условиях приготовления микрокапсул.

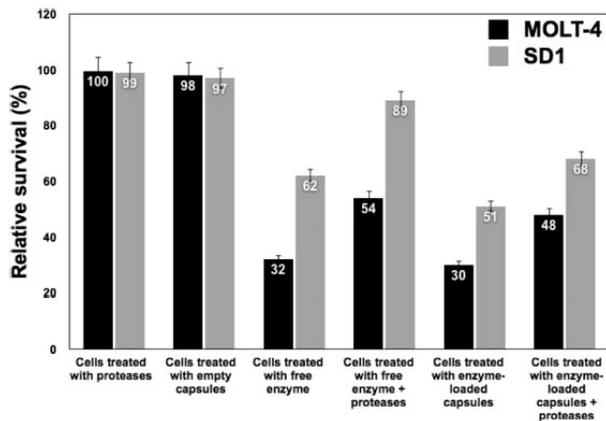


Рис. 7. Диаграмма выживаемости лейкозных клеток MOLT-4 и SD1, которые были подвержены действию фермента ScASNaseI в свободном виде и капсулированного в микрокапсулы. Развитие клеток было оценено как относительная выживаемость (%) в сравнении с клетками, которые не подвергались действию фермента. Результаты проведены для трех независимых экспериментов.

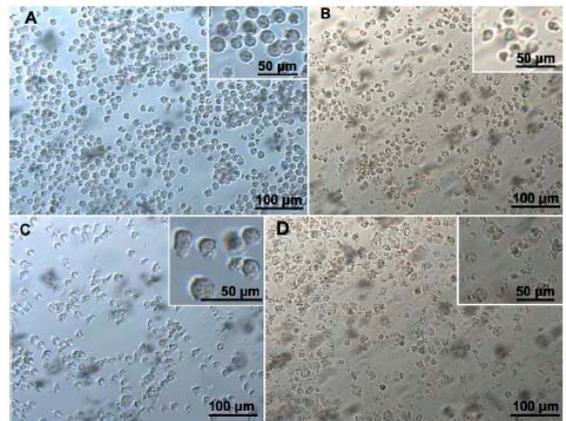


Рис. 8. Изображения лейкозных клеток MOLT-4 и SD1 до (A, C) и после инкубации с микрокапсулами, содержащими фермент ScASNaseI (B, D). Изображения (A, C) получены непосредственно перед инкубацией с микрокапсулами (t=0), изображения (B, D), получены после 72 часов инкубации с микрокапсулами.

снижение до 20% после 7 часов инкубации. Оболочки микрокапсул также способствует сохранению 50% активности фермента после инкубации в течение 12 недель в отсутствие стабилизаторов при 4 °С (Рис. 6). В то время как фермент в свободном виде теряет полную активность уже после 9 недель при аналогичных условиях. Для изучения эффективности действия фермента ScASNaseI в свободном виде и капсулированного в биodeградируемые микрокапсулы был проведен ряд экспериментов с использованием двух колоний лейкозных клеток MOLT-4 и SD1.

В качестве контроля аналогичные эксперименты были поставлены с использованием бактериального фермента EcASNaseII. Установлено, что инкубация клеток MOLT-4 и SD1 со свободным и капсулированным в микрокапсулы ферментом ScASNaseI в течение 72 часов

вызывает задержку их развития с последующей гибелью клеток (Рис. 7, 8). Взаимодействие клеток MOLT-4 и SD1 со свободным ферментом в присутствии трипсина и тромбина не приводит к существенной задержке развития клеток, указывая на снижение активности ScASNaseI протеазами. В противоположность этому, при инкубации клеток с микрокапсулами, содержащими фермент ScASNaseI в присутствии протеаз, развитие SD1 клеток было аналогично воздействию свободного фермента без протеаз, в то время как MOLT-4 клетки были менее подвержены действию терапевтического фермента.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно заключить, что происходит увеличение биохимической стабильности фермента L-аспарагиназы и его устойчивости в физиологических условиях при действии протеаз за счет капсулирования в биodeградируемые полиэлектролитные микрокапсулы. Показано, что микрокапсулы позволяют сохранить каталитические свойства фермента ScASNaseI и EcASNaseII ( $k_{cat}/K_M$   $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  для ScASNaseI, и  $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  для EcASNaseII), по сравнению с тем случаем, когда ферменты находятся в свободном состоянии. Полученные результаты могут стать основой для оптимизации терапии лейкемии терапевтическими ферментами, например, L-аспарагиназой. Несмотря на положительные результаты, полученные в ходе экспериментов *in vitro*, необходимо провести фармакодинамические и фармакокинетические исследования, также исследование новых терапевтических ферментов человеческой природы [13], которые потенциально могут заменить бактериальные и дрожжевые ферменты.

В **Главе 5** продемонстрированы подходы для получения структур ГКР на основе коллоидных наночастиц, а также на поверхности пористых материалов и их использование для регистрации ГКР спектров мембраны эритроцитов, мониторинга химических реакций и обнаружения биологически активных веществ. Для изучения живых систем перспективным является регистрация спектров ГКР от собственных молекул клетки, находящихся на плазматической мембране. Данная концепция основана на взаимодействии коллоидных наночастиц с мембраной клетки, при этом возможна регистрация сигнала от собственных молекул клетки, находящихся под мембраной. Впервые применение этого подхода было показано в 2009 году группой Н.А. Браже [14]. Стратегия регистрации спектров ГКР от собственных молекул эритроцитов, находящихся в структуре плазматической мембраны с использованием золотых наночастиц была использована в настоящей работе. Для этого суспензия эритроцитов была смешана с агрегатами золотых наночастиц. Агрегаты были получены добавлением равного объема 150 мМ водного раствора хлорида натрия к водному коллоиду золотых наночастиц. Практически немедленно происходит изменение цвета раствора с красного на сине-фиолетовый, что говорит о формировании агрегатов и смещении пика плазмонного резонанса в ближнюю ИК область. С формированием агрегатов происходит



деформационные колебания полярной группы ОРО на  $1083\text{ см}^{-1}$  и деформационные колебания (растяжение) СС на  $1109\text{ см}^{-1}$ , также присутствуют на спектрах. Несколько пиков белков присутствуют на спектрах:  $1109\text{ см}^{-1}$  – деформационные колебания (растяжение) групп СС и СN, в то время как линия  $1450\text{ см}^{-1}$  соответствуют деформационному колебанию группы  $\text{CH}_2$ . Пик с центром около  $873\text{ см}^{-1}$  виден на всех спектрах и характерен для деформации связи СОН в структуре глицерина. Принимая во внимание положительный заряд поверхности золотых наночастиц, основное взаимодействие между наночастицами и мембраной эритроцитов – электростатическое (Рис. 9). Известно, что гликокаликс состоит из нескольких молекул, включая полисахариды, гликопротеины, гликолипиды и протеогликаны [16]. При этом отрицательно заряженная часть представлена сиаловой кислотой в структуре олигосахаридных цепочках гликопротеинов и гликолипидов [17]. Взаимодействие наночастиц с полярными группами также возможно, в основном через фосфатидилхолин и сфингомиелин, которые являются основными компонентами внешнего липидного слоя [18]. Отрицательно заряженные липиды, такие как фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол в основном находятся внутри мембраны и поэтому не могут взаимодействовать с агрегатами наночастиц золота. Помимо электростатического взаимодействия нельзя исключать межмолекулярное (Ван-дер-ваальсовы силы) и гидрофобное связывание, например, в результате экранирования электростатических сил в физиологических условиях (ионная сила). Проведенные эксперименты открывают возможности не только для регистрации спектров ГКР мембраны клеток и их конформационных изменений, но также будут полезны для оптической трансфекции наночастиц и молекул во внутриклеточное пространство индивидуальных живых клеток [19].

Предложена структура ГКР для *in situ* мониторинга химической реакции, в которой молекулы 4-нитротиофенола связаны тиольными группами с золотой наноболочкой, сформированной на поверхности микрочастиц диоксида кремния. В результате этого молекулы ориентированы вертикально на золотых наноболочках, при этом нитрогруппы молекул обращены наружу. Такая конфигурация способствует прямому взаимодействию нитро-групп с химически активными золотыми нанозвездами в присутствии борогидрида натрия ( $\text{NaBH}_4$ ), после их добавления к суспензии микрочастиц. Наблюдение за трансформацией молекулы 4-нитротиофенола в 4-аминотиофенол проводилось путем регистрации спектров ГКР в различные интервалы времени (Рис. 10). На спектрах можно видеть появление нового пика с центром около  $1592\text{ см}^{-1}$ , который характерен для колебания фенольного кольца в молекуле 4-аминотиофенола. Кроме того, колебания нитрогруппы  $\text{NO}_2$  с центром  $1337\text{ см}^{-1}$  отсутствует на спектрах после 40 минут от начала реакции (Рис. 10). Отсутствие на спектрах колебаний азокомпонентов, свидетельствует о мономолекулярном характере реакции. Следует указать, что каталитическая реакция не может быть реализована отдельно как на золотых нанозвездах, так и

золотых наноболочках. Несмотря на довольно высокое усиление сигнала КР от коллоидных растворов, структуры ГКР на их основе имеют некоторые недостатки, например, низкую стабильность сигнала ГКР во времени и в пространстве. Применительно к живым системам такие ГКР структуры являются в некоторой степени токсичными и могут приводить к осмотическому шоку. Кроме того, создание функциональных структур на основе коллоидных наночастиц является технологически трудоемким процессом. В связи с этим в ряде работ было предложено использовать материалы, имеющих пористую морфологию (трехмерные структуры). Основное преимущество таких структур – это развитая поверхность для формирования областей с локальным максимумом электромагнитного поля («горячие точки») и адсорбции детектируемых молекул. Привлекательностью трехмерных структур является возможность усиления веществ с малым сечением комбинационного рассеяния и неспецифическое обнаружение (label-free) веществ в очень низких концентрациях. В связи с этим были разработаны структуры ГКР на основе пористых материалов, в частности, пористых микрочастиц карбоната кальция и биосовместимых нетканых нановолокон хитозана, полученных методом электроформования. Показано, что количество и распределение золотых наночастиц, и, соответственно, областей с локальным максимумом электромагнитного поля, в структурах можно контролировать за счет варьирования циклов адсорбции наночастиц или за счет концентрации прекурсора. На основе контрольных экспериментов обнаружено, что использование развитой поверхности микрочастиц карбоната кальция ( $9 \text{ м}^2/\text{г}$ , диаметр пор 30 – 50 нм) эффективно для формирования областей с локальным максимумом электромагнитного поля и при обнаружении глюкозы и бычьего сывороточного альбумина методом ГКР, по сравнению с микрочастицами диоксида кремния, имеющих малую площадь поверхности ( $10^{-5} \text{ м}^2/\text{г}$ ).

Вторым материалом, который использовался в настоящей работе были биосовместимые нетканые нановолокна хитозана. Количество и распределение золотых наночастиц в структуре нановолокон хитозана контролировали за счет изменения концентрации золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК), используемой в качестве источника ионов металла (Рис. 11). Было проведено обнаружение ГКР 2-нафтальентиола на поверхности нановолокон с концентрацией ниже чем  $10^{-12} \text{ М}$ . Средний коэффициент усиления для 400 точек при картировании КР образца составил  $2.9 \times 10^5$  ( $SD 0.9 \times 10^5$ ). Проведено обнаружение родамина 6Ж и глюкозы структурами ГКР на основе нетканых нановолокон хитозана с золотыми наночастицами (Рис. 12). Линии КР цитрата натрия с центром около  $810 \text{ см}^{-1}$ ,  $842 \text{ см}^{-1}$ ,  $952 \text{ см}^{-1}$ ,  $1046 \text{ см}^{-1}$ ,  $1095 \text{ см}^{-1}$  и  $1412 \text{ см}^{-1}$  были учтены при анализе ГКР спектров родамина 6Ж и глюкозы.

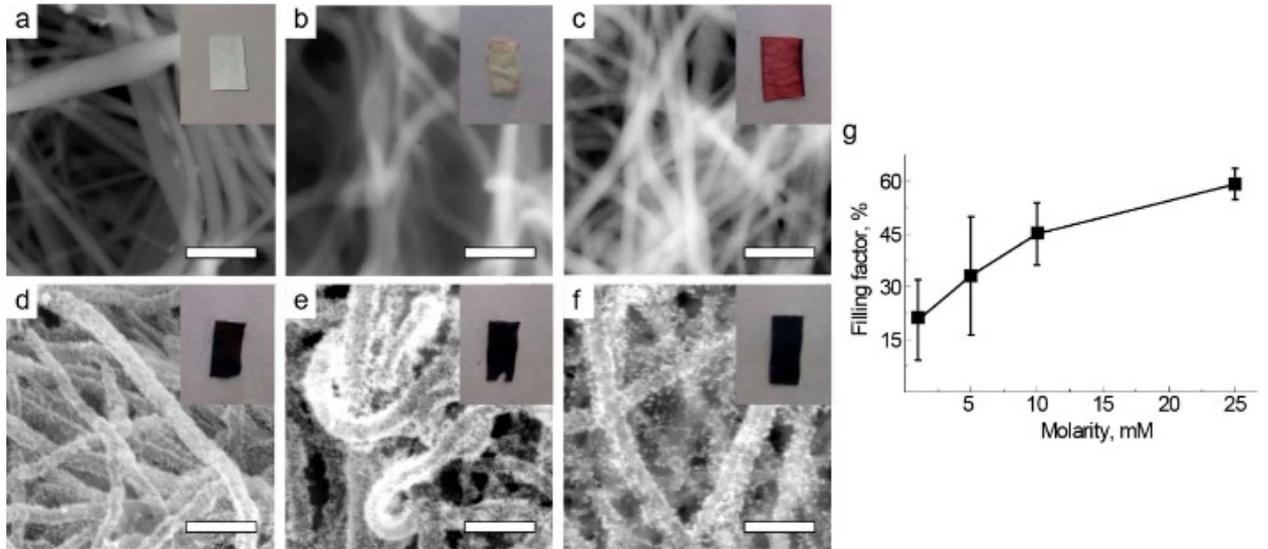


Рис. 11. Изображения нановолокон хитозана до (a) и после формирования наночастиц золота при концентрациях ЗХВК 0.5 мМ (b), 1 мМ (c), 5 мМ (d), 10 мМ (e), и 25 мМ (f), полученные методом сканирующей электронной микроскопии. (g) Зависимость фактора заполнения наночастиц золота в структуре нановолокон от молярной концентрации ЗХВК. СЭМ изображения получены в режиме обратно-отраженных электронов. Вставки на СЭМ изображениях соответствуют фотографиям нановолокон. Масштабный отрезок равен 500 нм.

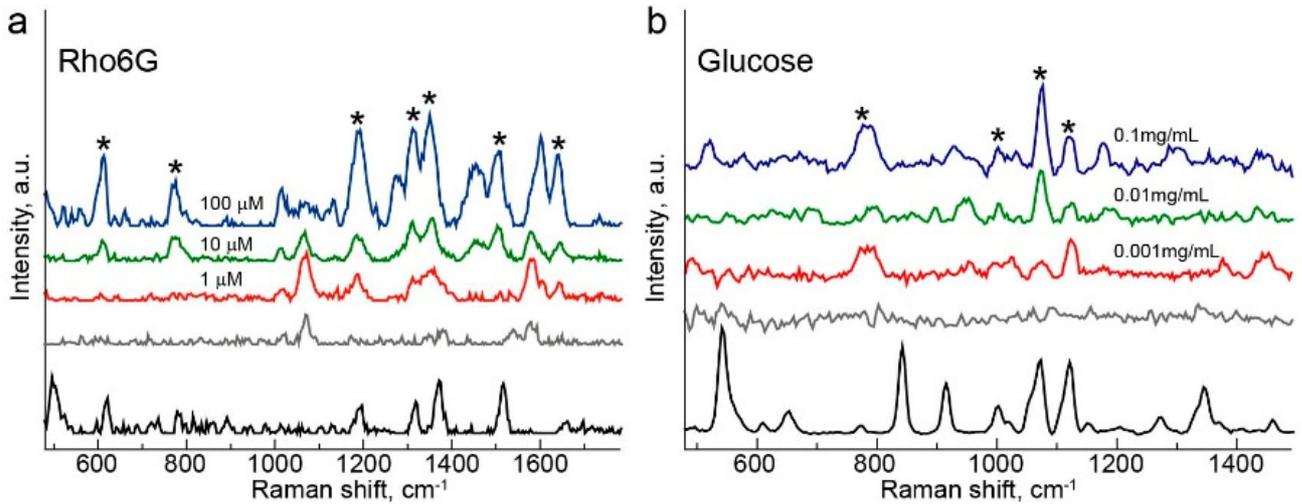


Рис. 12. Спектры ГРП родамина 6Ж (a) и глюкозы (b) с различной концентрацией аналитов. Звезды соответствуют пикам родамина 6Ж и глюкозы. Серый спектр - спектр КР хитозана. Все спектры ГРП получены на длине волны 785 нм (10 мВт для родамина 6Ж и 0.5 мВт для глюкозы) с временем накопления сигнала 3 секунды. Спектры КР родамина 6Ж (водный раствор 1 мМ) и глюкозы (кристаллы) получены на длине волны 785 нм (20 мВт) со временем накопления 10 секунд (нижние спектры).

Пики ГКР родамина 6Ж в диапазоне от  $600\text{ см}^{-1}$  и  $1700\text{ см}^{-1}$  соответствуют деформационным колебаниям (изгиб) группы С-Н. При этом линии с центром около  $1314\text{ см}^{-1}$ ,  $1360\text{ см}^{-1}$ ,  $1510\text{ см}^{-1}$  и  $1642\text{ см}^{-1}$  соответствуют деформационным колебаниям (растяжение) ароматической связи С-С, сдвинуты относительно нормального сигнала КР родамина 6Ж. Наблюдаемый сдвиг может быть объяснен связыванием молекул родамина 6Ж с поверхностью наночастиц золота, в результате чего может изменяться величина колебания связи С-С. С другой стороны, сдвиг может быть вызван повторным поглощением Стоксового рассеяния, в особенности при высокой концентрации аналита (100 мкМ, Рис. 12). Как видно из спектров ГКР глюкозы основные линии сосредоточены в диапазоне от  $700\text{ см}^{-1}$  до  $1200\text{ см}^{-1}$ . Центр пика около  $775\text{ см}^{-1}$  отвечает за деформационные колебания (изгиб) связи  $\text{O}_5\text{-C}_1\text{-O}_1$ ,  $1001\text{ см}^{-1}$  – колебания связи  $\text{CH}_2$ ,  $1075\text{ см}^{-1}$  и  $1120\text{ см}^{-1}$  соответствуют деформационным колебаниям (растяжение) связи С-ОН и (изгиб) связи С-О-Н. Проведенный анализ показал, что лишь две линии с центром около  $775\text{ см}^{-1}$  и  $1175\text{ см}^{-1}$  имеют незначительный сдвиг по сравнению с нормальным сигналом КР глюкозы. Предел обнаружения глюкозы структурами ГКР на основе нетканых мембран хитозана составил  $0.001\text{ мг/мл}$ . Следует указать, что достоверное обнаружение необходимо проводить в диапазоне физиологических концентраций глюкозы  $0.1 - 4.5\text{ мг/мл}$  ( $0.56\text{ мМ} - 25\text{ мМ}$ ). При этом содержание глюкозы в крови здорового человека варьируется от  $0.77\text{ мг/мл}$  до  $0.99\text{ мг/мл}$ , в то время как при заболевании сахарным диабетом концентрация глюкозы превышает  $0.99\text{ мг/мл}$ . Для оценки точности определения и воспроизводимости обнаружения родамина 6Ж и глюкозы было проведена серия экспериментов, в которых спектры ГКР были записаны с различных участков на образце. После чего было определено относительное стандартное отклонение основных интенсивностей линий ГКР. Величина относительного стандартного отклонения основных пиков родамина 6Ж не превышает 30%. Для глюкозы значение относительного стандартного отклонения линий с центром около  $775\text{ см}^{-1}$  и  $1175\text{ см}^{-1}$  при концентрации глюкозы  $0.1\text{ мг/мл}$  составило  $\sim 25\%$ . В настоящее время стандартом точности определения глюкозы различными сенсорами является диаграмма ошибки Кларка (Clarke Error Grid Analysis), которая позволяет оценить эффективность сенсора глюкозы для физиологических концентраций [20]. В работах по определению глюкозы структурами ГКР, значительный прогресс в которых был достигнут группой возглавляемой профессором Р.П. Ван Дюном (R.P. Van Duynе) сообщается о точности определения глюкозы *in vitro*  $\sim 91\%$  [21].

В **Главе 6** разработаны структуры на основе микрочастиц диоксида кремния и наноструктурированной оболочки из одностенных углеродных нанотрубок и наночастиц золота в качестве универсальной платформы для обнаружения биологически активных веществ методом ГКР, метки КР, получения микрокапсул и контрастных агентов для фотоакустической

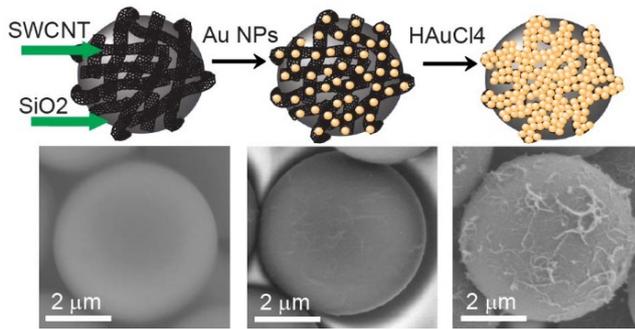


Рис. 13. Схема получения наноструктурированной оболочки из одностенных углеродных нанотрубок и золотых наночастиц на поверхности микрочастиц диоксида кремния методом последовательной адсорбции (верхний ряд). Изображения микрочастиц диоксида кремния на каждой стадии формирования наноструктурированной оболочки, полученные методом сканирующей электронной микроскопии (нижний ряд).

спектроскопии. Поверхность микрочастиц диоксида кремния была модифицирована одностенными углеродными трубками (ОУНТ) и золотыми наночастицами как показано на рисунке 13. Нанесение ОУНТ приводит к увеличению неоднородности на поверхности микрочастиц (увеличение шероховатости) с образованием сетки из углеродных нанотрубок [22]. Осаждение золотых наночастиц из водного раствора на сетку из углеродных нанотрубок и их последующее неэлектролитическое восстановление приводит увеличению контраста на СЭМ изображениях. Этот факт свидетельствует об успешном связывании золотых наночастиц с поверхностью ОУНТ. Для оценки эффективности полученных структур было проведено измерения интенсивностей КР одностенных углеродных нанотрубок до и после осаждения золотых наночастиц (Рис. 14). Найдено, что интенсивность основной линии (G-линии) ОУНТ с центром около  $1594 \text{ cm}^{-1}$  увеличивается в 60 раз после осаждения золотых наночастиц по сравнению с образцами до осаждения наночастиц. Сканирование образцов позволило качественно оценить однородность сигнала ГКР в наноструктурированных оболочках микрочастиц. Распределение сигнала на карте ГКР соответствует сигналу углеродных трубок. Интересно, что сигнал ГКР G-линии можно регистрировать при довольно низких интенсивностях лазерного излучения вплоть до  $\sim 0.1 \text{ мкВт}$ , что сравнимо с интенсивностью солнечного света (Рис. 14). Использование ОУНТ в структуре оболочек обеспечивает необходимую шероховатость и формирование областей локального максимума электромагнитного поля после неэлектролитического восстановления золота, что приводит к значительному увеличению сигнала ГКР [23]. Для записи оптического поглощения аналогичные

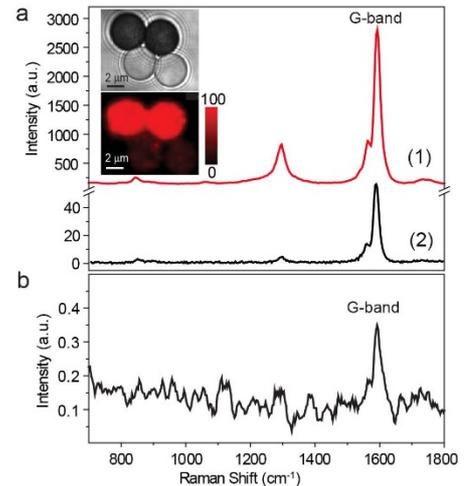


Рис. 14. Спектры ГКР микрочастиц диоксида кремния с наноструктурированными оболочками из ОУНТ (спектр 2) после нанесения золотых наночастиц (спектр 1). На вставке приведено изображение микрофотографии и карта ГКР ( $1530 - 1630 \text{ cm}^{-1}$ ) тех же частиц с распределением сигнала ГКР G-линии ОУНТ. Спектры получены при мощности лазера  $0.1 \text{ мВт}$ . (b) Спектр ГКР микрочастиц, содержащих ОУНТ и наночастицы золота при мощности лазера  $0.1 \text{ мкВт}$ . Все спектры регистрировались на длине волны  $785 \text{ нм}$ .

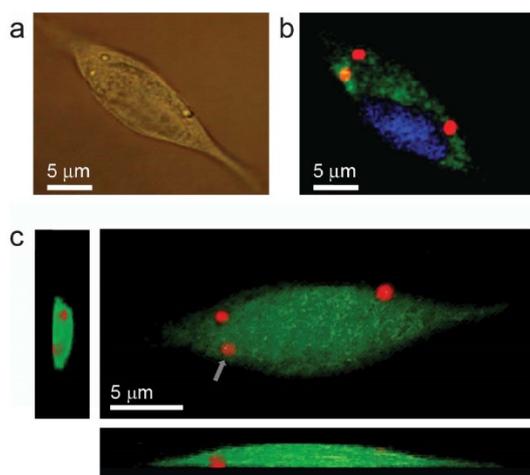


Рис. 15. Оптическое изображение клетки после ее фиксации параформальдегидом со структурами ГКР внутри, введенными методом электропорации (а), двумерное (b) и трехмерное изображения идентичной клетки, полученные методом конфокальной КР микроскопии. Цветовой код соответствует спектральным колебаниям биомолекул и компонентов наноструктурированных оболочек структур ГКР (зеленый – цитоплазма (деформационные колебания группы С-Н), синий - ядро, и красный – ОУНТ (G-линия)). (с). Изображения КР получены на длине волны 532 нм со временем накопления сигнала 0.1 сек.

композиции наноструктурированных оболочек были получены на стеклянных подложках. Обнаружен сдвиг пика поглощения в ближнюю ИК область и его уширение. Для демонстрации визуализации подобных структур ГКР в живых системах были проведены эксперименты на клетках соединительной ткани – фибробластах. Структуры ГКР были введены внутрь клеток методом электропорации. Проведено сканирование КР клеток со структурами ГКР внутри, которое позволило спектрально наблюдать распределение сигнала КР не только от клеточных компонентов – ядра и внутриклеточного матрикса (синий и зеленый цвет), но также визуализировать структуры ГКР по характерному колебанию G-линии ОУНТ (красный цвет) (Рис. 15). Кроме двумерного сканирования было проведено картирование по глубине (вдоль оси z), что позволило построить трехмерную реконструкцию интенсивностей КР внутриклеточного матрикса клетки и структур ГКР. Это, в свою очередь, стало доказательством того, что структуры ГКР действительно находились внутри клеток.

После проведения сканирования КР фиксированных клеток аналогичные эксперименты были поставлены на живых клетках со структурами ГКР (Рис. 16). Как и в случае фиксированных клеток, цветовой код на карте КР соответствует нерезонансным интенсивностям КР ядра и внутриклеточного пространства (синий - ядро, зеленый - цитозоль, желтый - каротиноиды). При сканировании КР использована длина волны 532 нм и мощность излучения 0.1 мВт, которая оказалась достаточной для получения распределения КР сигнала клеточных компонентов и структур ГКР. Однако, используемая длина волны (532 нм) и

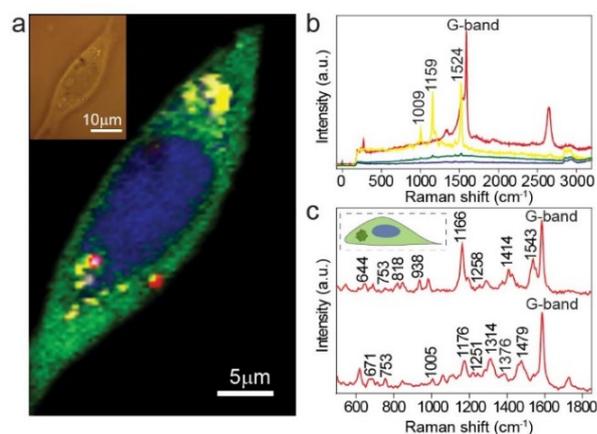


Рис. 16. Изображение живой клетки со структурами ГКР внутри, полученное методом конфокальной КР микроскопии (а). Сканирование КР получено на длине волны 532 нм со временем накопления сигнала 0.1 сек. Цветовой код представляет собой линейную комбинацию среднего сигнала КР и основные колебания связей в клеточных компонентах (зеленый – цитоплазма, синий - ядро, желтый – каротиноиды, красный – структуры ГКР) (b). На вставке показано оптическое изображение клетки. Спектры ГКР внутриклеточного пространства, полученные с двух структур ГКР (с).

мощность оказались не эффективны для достоверного обнаружения биологически активных веществ внутри клетки структурами ГКР. При этом увеличение мощности излучения приводило с одной стороны к разрушению структур ГКР, с другой - к необратимым изменениям в клетках и порой к их гибели. Для снижения влияния лазерного излучения на клетки является оптимальным увеличение длины волны (ближняя ИК область) как с точки зрения получения максимального сигнала («окно прозрачности» биотканей), так и для получения достоверного сигнала ГКР биологически активных веществ внутри клетки от структур ГКР. Метка КР в виде одностенных углеродных нанотрубок в оболочках микрочастиц позволяет легко спектрально распознавать структуры ГКР внутри живых клеток (Рис. 16, красный спектр). Кроме того, использование длины волны 785 нм позволило значительно увеличить сигнала КР и проводить обнаружение биологических молекул, находящихся вблизи локальных максимумов электромагнитного поля в наноструктурированных оболочках. Анализ линий на спектрах ГКР выявил колебания связей биологических молекул во внутриклеточном пространстве живых клеток. В частности, структуры ГКР, которые находились в цитозоле, усиливали сигнал КР белков и липидов - линии с центром около  $644\text{ см}^{-1}$  (деформационные колебания (кручение) группы C-C тирозина),  $753\text{ см}^{-1}$  (деформационные колебания (растяжение) связей в триптофане),  $1005\text{ см}^{-1}$  (фенилаланин),  $1258\text{ см}^{-1}$  (амид III),  $1543\text{ см}^{-1}$  (амид II) и  $1166\text{ см}^{-1}$  (изгиб группы C-H) (Рис. 16). На спектре ГКР также регистрировались линии нуклеиновых кислот ДНК/РНК с центром около  $1176\text{ см}^{-1}$  и  $1251\text{ см}^{-1}$  (цитозин, гуанин),  $1376\text{ см}^{-1}$  (колебания ароматического кольца). Введение структур ГКР во внутриклеточное пространство значительно увеличивает отношение сигнал-шум (SNR) биологических молекул с  $\sim 5$  для нерезонансного сигнала КР (Рис. 16, синий и зеленый спектры) до  $\sim 100$  для сигнала ГКР. С увеличением SNR стало возможным проводить регистрацию сигнала ГКР биологических молекул внутри живых клеток при низких интенсивностях лазерного излучения и малом времени накопления сигнала, что практически исключает влияние лазерного излучения на жизнеспособность живых клеток и значительно снижает время получения сигнала ГКР. Необходимо также отметить, что для введения структур ГКР внутрь живых клеток был использован метод электропорации. Данный метод был успешно апробирован для введения микрокапсул в живые клетки и может быть применен к широкому классу клеток без нарушения метаболизма и функции живых клеток. Следует также заметить, что не только введение структур ГКР и их последующее нахождение во внутриклеточном пространстве, но также и воздействие лазерного излучения не оказывает негативного эффекта на жизнеспособность клеток, которая оценивалась наблюдением за делением клеток и тестом на выживаемость в случае спонтанного поглощения. Наноструктурированные оболочки из одностенных углеродных нанотрубок и золотых наночастиц могут быть нагреты лазером с длиной волны 532 и 785 нм.

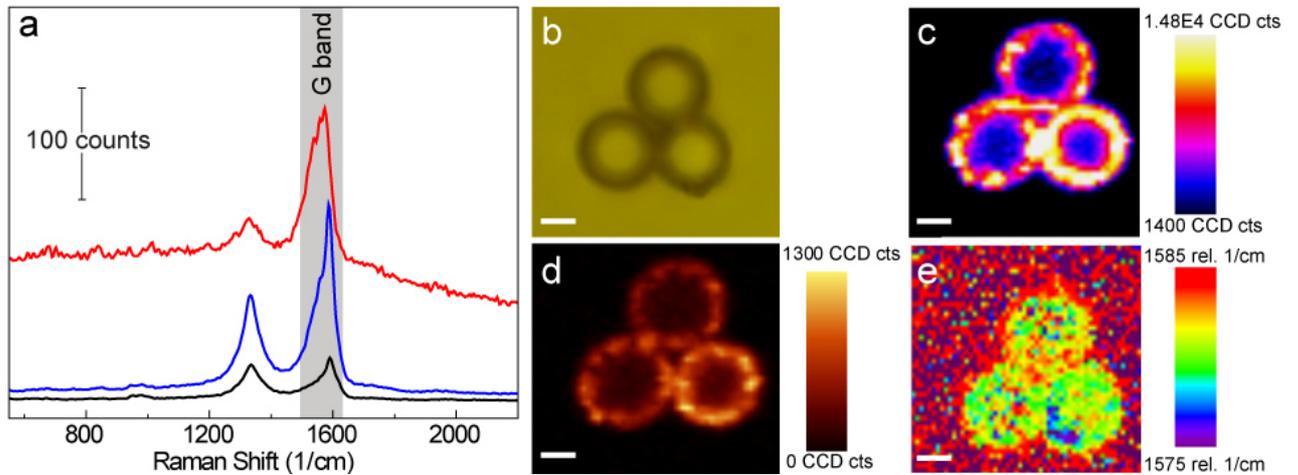


Рис. 17. (a) Спектры КР микрочастиц с наноструктурированной оболочкой из ОУНТ (черный спектр); ОУНТ/золотые наночастицы (синий спектр); ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического восстановления золота (красный спектр). Все спектры регистрировались на длине волны 532 нм при мощности 4 мВт ( $12.7 \times 10^4$  Вт  $\text{см}^{-2}$ ) и временем накопления сигнала 5 секунд. (b) Оптическое изображение микрочастиц с наноструктурированной оболочкой из ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического осаждения; (d) карта сигнала КР; (c, e) карта КР сдвига интенсивности G-линии в интервале 1400-1660  $\text{см}^{-1}$ . Масштабные отрезки на всех изображениях соответствуют 2 мкм.

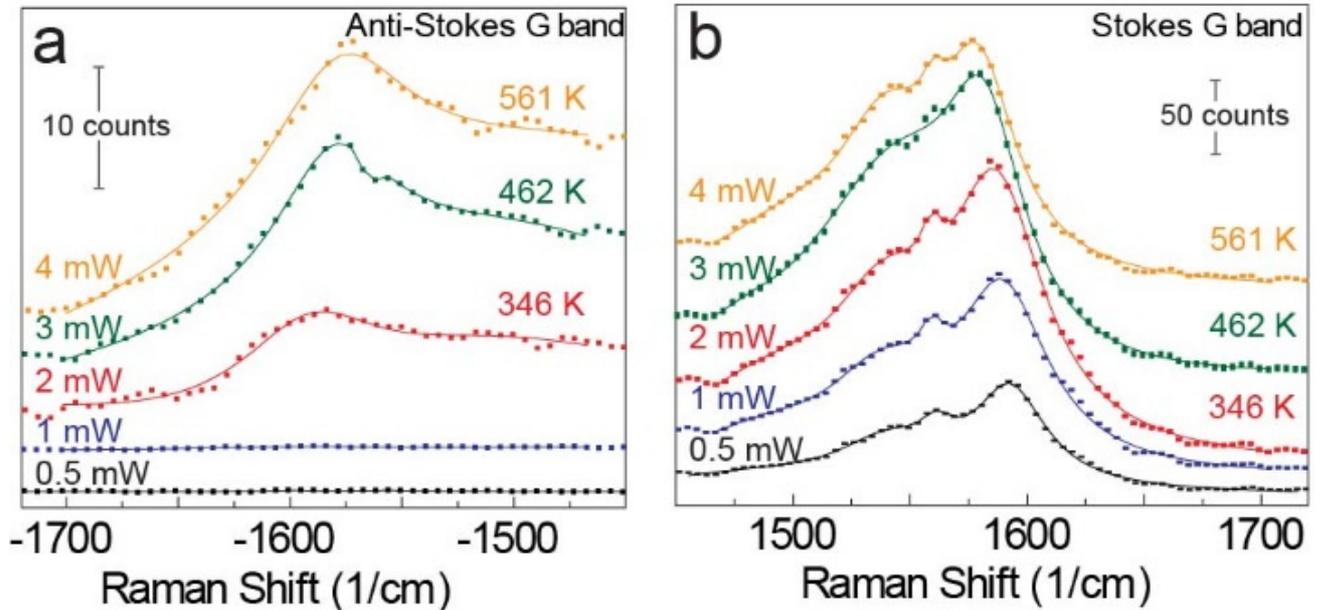


Рис. 18. Стоксово и Антистоксово КР основной линии ОУНТ в структуре оболочек ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического восстановления золота при различной мощности лазера. Спектры регистрировались на длине волны 532 нм при мощности 4 мВт ( $12.7 \times 10^4$  Вт  $\text{см}^{-2}$ ) со временем накопления сигнала 5 секунд. Значения эффективной температуры приведены сверху каждой кривой.

На рисунке 17 приведены спектры КР микрочастиц диоксида кремния с различной композицией наноструктурированной оболочки. Обнаружен сдвиг основной линии ОУНТ (G-линии) в сторону малых волновых чисел для наноструктурированных оболочек из ОУНТ и золотых наночастиц, подвергнутых неэлектролитическому восстановлению золота (длина волны 532 нм, плотность мощности  $12.7 \times 10^4$  Вт/см<sup>2</sup>). Наблюдаемый сдвиг основного пика колебаний ОУНТ свидетельствует об их нагреве. Максимальный сдвиг положения пика для таких оболочек на  $16$  см<sup>-1</sup> (спектральное разрешение прибора, на котором проводилось измерение  $2$  см<sup>-1</sup>). Вместе с тем положение G-линии на спектрах КР микрочастиц, оболочки которых не содержали золотые наночастицы или не подвергались неэлектролитическому восстановлению золота, оставалось неизменным при аналогичной плотности мощности лазерного излучения. Картирование нескольких микрочастиц со структурой оболочки из ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического осаждения позволило получить информацию о равномерном распределении интенсивности КР основной линии ОУНТ, а также о равномерном сдвиге G-линии при воздействии лазера (Рис 18). Это также указывает на однородное распределение углеродных нанотрубок и золотых наночастиц в структуре оболочек микрочастиц диоксида кремния. Для оценки нагрева наноструктурированных оболочек при воздействии лазерного излучения разной плотности мощности было проведено измерение Стоксового и Антистоксового КР одностенных углеродных нанотрубок. Зависимость Стоксового и Антистоксового КР G-линии одностенных углеродных нанотрубок от плотности мощности лазерного излучения показана на рисунке 18. Полученные данные были использованы для расчёта эффективной температуры (заселение верхних уровней) в соответствии с формулой:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left( \frac{\nu_0 + \nu_G}{\nu_0 - \nu_G} \right)^4 \exp\left( -\frac{\hbar \nu_G}{k_B T_G} \right) \quad (1)$$

где  $\nu_0$  - частота возбуждения (длина волны излучения),  $\nu_G$  – частота фононов G-линии,  $\hbar$  и  $k_B$  – постоянные Планка и Больцмана, соответственно. Энергия фотонов принималась равной 2.33 эВ. Можно видеть, что, Антистоксово КР для образцов после неэлектролитического осаждения золота наблюдается при плотности мощности лазерного излучения выше  $6.4 \times 10^4$  Вт/см<sup>2</sup>, что соответствует эффективной температуре 346 К (Рис. 18). Увеличение плотности мощности  $12.7 \times 10^4$  Вт/см<sup>2</sup> приводит к повышению температуры до 561 К. Вместе с тем для наноструктурированных оболочек, состоящих только из одностенных углеродных нанотрубок, Антистоксово КР отсутствует при аналогичных плотностях мощности. Для таких оболочек, Антистоксово КР G-линии наблюдалась только при плотности мощности выше  $63.7 \times 10^4$  Вт/см<sup>2</sup>, что соответствует температуре 343 К. Для сравнения, аналогичное значение эффективной

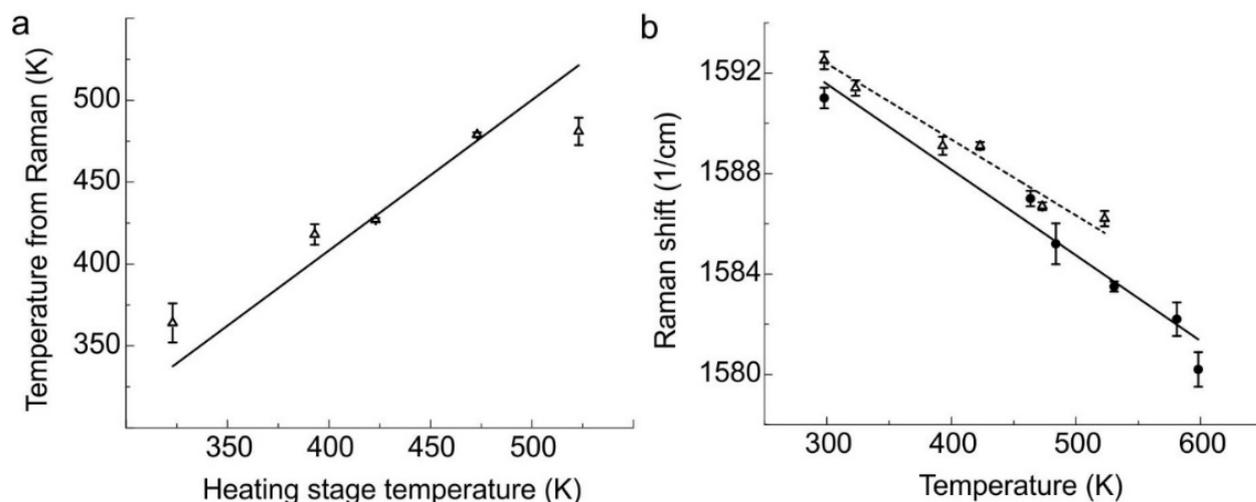


Рис. 19. (a) Зависимость эффективной температуры наноструктурированной оболочки из ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического восстановления от температуры нагревательной платформы Linkam THMS600; (b) Зависимость положения G-линии ОУНТ от нагрева лазером с длиной волны 785 нм (сферы) и от температуры нагревательной платформы Linkam THMS600 (треугольники).

температуры было получено для оболочек из ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического осаждения при плотности мощности  $6.4 \times 10^4$  Вт/см<sup>2</sup>. Интересно, что наноструктурированные оболочки, содержащие ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического восстановления золота, могут быть нагреты лазером с длиной волны 785 нм при плотности мощности выше 8 Вт/см<sup>2</sup>. Увеличение плотности мощности излучения для таких оболочек увеличивает эффективную температуру, в то время как уменьшение ведет к понижению эффективной температуры, при этом появляется гистерезис. Гистерезис для таких оболочек исчезал после повторного цикла увеличение/уменьшение плотности мощности лазерного излучения, что, вероятно, связано с дефектами в структуре ОУНТ. С другой стороны, гистерезис может быть вызван изменением локализованного плазмонного резонанса золотых наночастиц с ростом температуры. Нагрев структуры может приводить к обесцвечиванию локализованного плазмонного резонанса с уширением спектра поглощения, что связано с увеличением электрон-фононного рассеяния при более высоких температурах. Кроме того, молекулы 4-диметиламинопиридина в качестве стабилизатора наночастиц золота и молекулы полистиролсульфоната на поверхности ОУНТ могут вносить вклад в гистерезис вследствие тепловой изоляции наночастиц золота. Также можно предположить деградацию молекул 4-диметиламинопиридина (температура плавления 110 – 113 °С) и полистиролсульфоната (температура плавления 152 °С) и их последующее разрушение при воздействии лазерного излучения с высокими плотностями мощности. В результате чего может происходить плавление и разрушение стабилизаторов, показатель преломления которых может изменяться от  $\sim 1.39$  (полистиролсульфонат) до 1.0 (воздух), что в свою очередь приводит к уменьшению оптического поглощения золотых наночастиц.

Для калибровки эффективной температуры, рассчитанной по формуле 1, были проведен ступенчатый нагрев наноструктурированных оболочек на нагревательной платформе (Linkam THMS600). На рисунке 19 приведены значения эффективной температуры при нагреве структур лазером и на нагревательной платформе. Найдено соответствие значений эффективной температуры между нагревом лазером и на нагревательной платформе, при этом разрешение оценки температуры составило 5-40 К.

Впервые показано, что полиэлектролитные микрокапсулы с наноструктурированной оболочкой из ОУНТ/золотые наночастицы могут быть использованы в качестве контрастных агентов для фотоакустической визуализации. Поскольку оболочка микрокапсул могут быть допирована различными материалами, чувствительными к внешнему воздействию, а объем может быть использован для капсулирования биологически активных веществ (**глава 4**), они перспективны для создания систем тераностики. Процедура получения оболочек аналогична формированию представленных структур «ядро-оболочка», при этом микрочастицы диоксида кремния растворяли в 0.3 М водном растворе фтороводородной кислоты. На рисунке 20 представлены спектры фотоакустического сигнала водной суспензии оболочек микрокапсул с различной структурой, находящихся в водной среде. Можно видеть, что наноструктурированные оболочки, содержащие ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического восстановления золота, имеют высокую интенсивность фотоакустического сигнала с центром около 700 нм, при этом интенсивность наблюдается вплоть до 900 нм. Следует заметить, что аналогичная структура оболочек в отсутствие углеродных нанотрубок имеет похожий фотоакустический спектр. Наличие только углеродных нанотрубок в оболочках не вносит значительного вклада в интенсивность фотоакустического сигнала, и полученный спектр идентичен спектру воды. Таким образом, основной вклад в генерацию фотоакустического сигнала от наноструктурированных оболочек вносят золотые наночастицы. Это связано с высоким коэффициентом поглощения в ближней ИК области для золотых наночастиц ( $40 \text{ нм} - 7.66 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) или золотых наностержней ( $15 \text{ нм} \times 52 \text{ нм} - 1.4 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) по сравнению с коэффициентом для нанотрубок ( $6.2 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Можно также предположить, что количество углеродных нанотрубок (14 пкМ) в оболочках недостаточно для генерации фотоакустического сигнала. В последующих экспериментах были использованы только наноструктурированные оболочки из углеродных нанотрубок и золотых наночастиц, фотоакустические спектры которых в суспензии крови приведены на рисунке 20. Для исключения влияния количества носителей на фотоакустический сигнал, концентрация структур «ядро-оболочка» и микрокапсул составила  $5.1 \times 10^5$  и  $12 \times 10^5$ , соответственно. Фотоакустическая интенсивность от структур «ядро-оболочка» и микрокапсул в разбавленной суспензии крови имеет максимум интенсивности с центром около 700 нм.

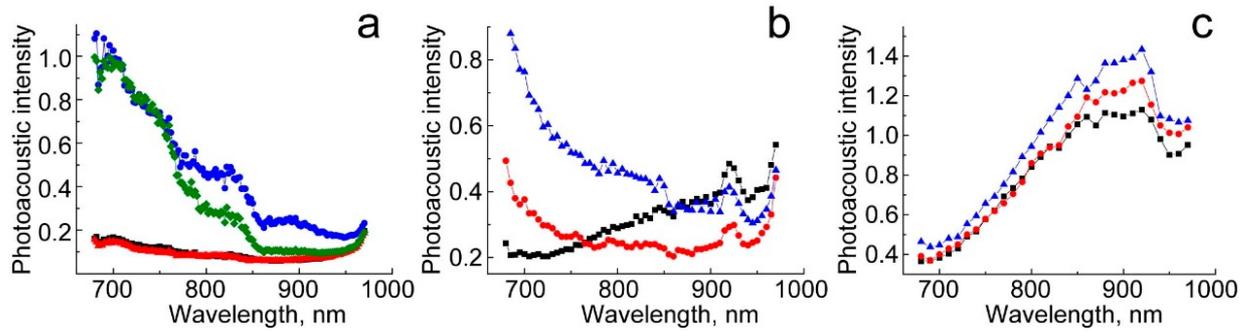


Рис. 20. (a) Спектры интенсивности фотоакустического сигнала структур «ядро-оболочка», содержащих ОУНТ (красные треугольники), золотые наночастицы (зеленые ромбы), и ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического восстановления золота (синие сферы) в воде. (b) Спектры интенсивности фотоакустического сигнала структур «ядро-оболочка», содержащих ОУНТ/золотые наночастицы после неэлектролитического восстановления золота (красные сферы) и микрокапсул на их основе (синие треугольники) в разбавленной крови (1:100) и (c) неразбавленной крови. Интенсивность фотоакустического сигнала от жидкостей показана черными квадратами.

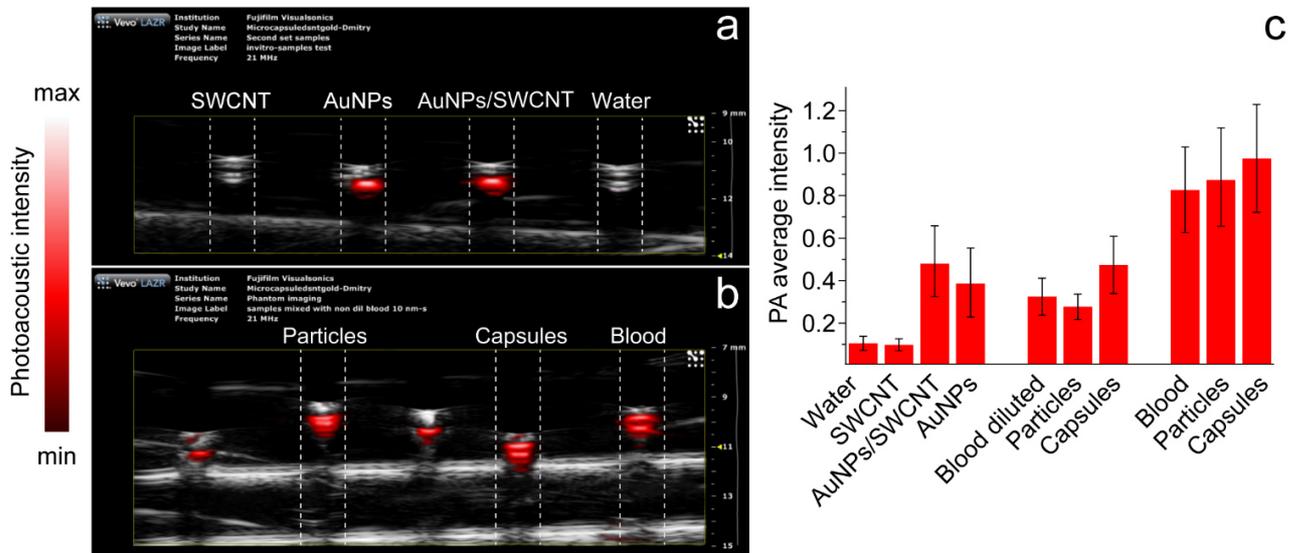


Рис. 21. Двумерные изображения интенсивности фотоакустического сигнала структур «ядро-оболочка», содержащих в структуре оболочек ОУНТ, золотые наночастицы и ОУНТ/золотые наночастицы в воде (a). Двумерные изображения интенсивности фотоакустического сигнала структур «ядро-оболочка», содержащих в структуре оболочек ОУНТ/золотые наночастицы и микрокапсул на их основе в крови (b). Черно-серый фон соответствует стенкам капилляра, в то время как красный цвет соответствует фотоакустическому сигналу от образцов. Штриховой линией показаны границы капилляра. (c) Средняя интенсивность фотоакустического сигнала структур «ядро-оболочка» и микрокапсул в воде, разбавленной (1:100) и неразбавленной крови.

Однако, затем сигнал уменьшается, начиная с 765 нм для структур «ядро-оболочка», и начиная с 869 нм для микрокапсул, соответственно. В образцах, которые были смешаны с неразбавленной кровью интенсивность фотоакустического сигнала вновь выше с центром около 700 нм для микрокапсул, в то время как для структур «ядро-оболочка» интенсивность сигнала идентична сигналу, генерируемому кровью. При этом, спектр интенсивности суспензии крови аналогичен оптическому спектру поглощения окисленного гемоглобина, который имеет поглощение между 750 нм и 1000 нм. Двумерное изображение интенсивности фотоакустического сигнала структур «ядро-оболочка» и микрокапсул, находящихся в фантомной ячейке в соответствующих растворах, и их средние интенсивности фотоакустического сигнала показаны на рисунке 21. Обнаружено, что средняя интенсивность сигнала микрокапсул выше интенсивности структур «ядро-оболочка», находящихся в воде или крови. Большая интенсивность фотоакустического сигнала микрокапсул, возможно, обусловлена полой структурой носителей, отсутствием неорганического «ядра», на которых помещена наноструктурированная оболочка. Взаимодействуя с лазерным излучением, наноструктурированная оболочка может обратимо деформироваться (растяжение/сжатие), что приводит к генерации акустических волн. Предполагается, что деформация оболочек будет заметнее в случае микрокапсул, не содержащих твердое «ядро», в то время как структуры «ядро-оболочка» будут менее подвержены деформации. Как было показано в работе Короловича [24], ультразвук высокой частоты (1.2 МГц) может вызывает максимальную деформацию микрокапсул с наночастицами оксида цинка в структуре оболочек. Можно также предположить, что лазерное излучение генерирует ультразвуковые волны, которые соответствуют собственной частоте колебаний микрокапсул, что может вносить вклад в фотоакустический сигнал. Очень важной характеристикой наноструктурированных систем в качестве контрастных агентов для фотоакустики является высокая отражательная способность акустических волн. Для этого необходимо, чтобы система поглощала лазерное излучение, которое затем может переходить в тепловую энергию. Наноструктурированные оболочки ОУНТ/золотые наночастицы способны нагреваться при их облучении лазером с длиной волны 532 и 785 нм [25]. При этом оболочки эффективно поглощают лазерное излучение, которое затем трансформируется в тепло, регистрируемое методом КР. Критерием для эффективного преобразования лазерного излучения в тепло является формирование пузырьков. Ранее было показано, что порог формирования пузырьков значительно ниже для золотых наностержней и золотых нанооболочек по сравнению с золотыми наночастицами и углеродными нанотрубками [26]. Принимая во внимание характеристику наноструктурированных оболочек микрокапсул методами ПЭМ и СЭМ, которая во много совпадает со структурой золотых нанооболочек (100-200 нм), можно

предположить, что созданные микрокапсулы имеют низкий порог генерации пузырьков и, соответственно, демонстрируют высокую интенсивность фотоакустического сигнала.

В **Заключении** сформулированы основные результаты и выводы работы.

### **Основные результаты и выводы**

1. Предложен подход к формированию многокомпонентных носителей за счет электростатического взаимодействия между внешними слоями полиэлектролитов в структуре оболочек нано- и микроносителей. Проведено исследование влияния материала микроносителя, ионной силы, и концентрации нано- и микроносителей на степень заполнения и на агрегацию многокомпонентных носителей. Предложенный подход позволил провести капсулирование субстрата и фермента в один носитель и использовать объем многокомпонентных носителей в качестве микрореактора ферментативной реакции. Запуск ферментативной реакции в объеме носителей осуществлен после разрушения липосом ультразвуком с плотностью мощности, разрешенной для использования в медицине. Установлено, что для разрушения липосом необходим градиент плотности вокруг липидной мембраны, что обусловлено наличием гидрофобного слоя, где происходит нуклеация пузырьков с низким порогом кавитации. Обнаружено увеличение времени протекания ферментативной реакции в объеме микрочастиц карбоната кальция по сравнению с аналогичной реакцией в объеме полых микрокапсул. Предложенный подход будет эффективен для формирования многокомпонентных носителей с возможностью капсулирования низко- и высокомолекулярных (гидрофобных/гидрофильных) веществ в один носитель, а также для проведения биохимических реакций в ограниченном объеме.
2. Проведено экспериментальное исследование влияния числа биоразлагаемых полиэлектролитных слоев, наличия недеградируемых синтетических полиэлектролитов в оболочках микрокапсул, и концентрации фермента на время разложения микрокапсул при действии протеолитического фермента проназы. Установлено, что разложение оболочек микрокапсул замедляется при увеличении количества биоразлагаемых полиэлектролитных слоев и при включении недеградируемых синтетических полиэлектролитов в структуру оболочки. Вместе с тем увеличение концентрации проназы приводит к уменьшению времени разложения полипептидов в структуре оболочек микрокапсул. Полученные результаты будут полезны для создания биоразлагаемых оболочек микрокапсул для создания носителей с контролируемым высвобождением капсулированных веществ.
3. Предложен подход растворения «ядер» карбоната кальция путем диализа в растворе ЭДТА, который позволяет сохранять полную активность L-аспарагиназы. Использование дрожжевого фермента ScASNaseI, не содержащего глутаминазу, проявляет идентичные каталитические свойства к аспаргину, что и фермент, выделенный из бактерий кишечной палочки (*E. coli*).

Фермент выделяемый из дрожжей перспективен с точки зрения использования в качестве антиракового препарата с низким побочным эффектом, что характерно при использовании бактериальных ферментов. Для увеличения активности фермента ScASNaseI в крови проведено капсулирование фермента в биоразлагаемые микрокапсулы, что позволило сохранить активность и биохимическую стабильность фермента. Показано, что ScASNaseI как в свободном виде, так и капсулированный в микрокапсулы, приводит к задержке деления клеток MOLT-4 и SD1 после 72 часов инкубирования. Установлено, что инкубация клеток с ферментом в свободном виде и в присутствии трипсина или тромбина не приводит к задержке развития клеток, что указывает на инактивацию ScASNaseI протеазами. Однако инкубация клеток с микрокапсулами, содержащими ScASNaseI и протеазой оказывает аналогичное действие на развитие клеток SD1 что и в случае фермента в свободном виде и в отсутствии протеазы. Предполагается, что капсулированный фермент будет устойчив к действию протеаз не только *in vitro*, но и *in vivo*. Таким образом, капсулирование терапевтических ферментов в биоразлагаемые микрокапсулы можно рассматривать как одно из возможных решений для сохранения функций фермента и экранирования его от иммунной системы организма.

4. Разработана платформа ГКР типа золотые наноболочки на микрочастицах диоксида кремния, в которой молекулы 4-нитротиофенола ориентированы вертикально, таким образом, нитрогруппы могут непосредственно взаимодействовать с каталитически активными золотыми нанозвездами. Проведен мониторинг каталитического восстановления молекул 4-нитротиофенола до 4-аминотиофенола в режиме реального времени. Установлено, что сдвиг колебаний нитрогрупп на спектрах ГКР в сторону коротких волновых чисел и отсутствие на спектрах колебаний азокомпонентов свидетельствует о мономолекулярном характере реакции.

5. Показано, что агрегаты золотых наночастиц могут быть получены при смешивании равных объемов коллоидного раствора золотых наночастиц и натрий-фосфатного буфера или 150 мМ водного раствора хлорида натрия. Агрегация золотых наночастиц является эффективным подходом для формирования областей локального максимума электромагнитного поля, то есть «горячих точек». Анализ спектров ГКР позволил установить взаимодействие агрегатов золотых наночастиц с плазматической мембраной эритроцитов, в частности с молекулами гликокаликса, которые встроены в билипидный слой мембраны, а также с липидным слоем мембраны. Полученные результаты демонстрируют перспективы использования метода ГКР для экспериментального исследования состояния собственных молекул, находящихся в структуре плазматической мембраны клеток и их конформационных изменений.

6. Разработан подход к формированию структур ГКР на основе пористых материалов, в частности, пористых микрочастиц карбоната кальция и биосовместимых нетканых нановолокон хитозана, полученных методом электроформования. Показано, что количество и распределение

золотых наночастиц в структуре карбонатных «ядер» и нановолокон хитозана может контролироваться за счет варьирования циклов адсорбции наночастиц золота или за счет концентрации прекурсора. Проведена оценка эффективности структур ГКР на основе нетканых нановолокон, среднее значение коэффициента усиления которых составило  $2 \times 10^5$  для 86% точек на образце. Проведено неспецифическое обнаружение родамина 6Ж и глюкозы с относительным стандартным отклонением сигнала ГКР, не превышающим 30 % и 25 %, соответственно. На основе контрольных экспериментов обнаружено, что пористая структура микрочастиц карбоната кальция оказывается предпочтительной как для получения областей с локальным максимумом электромагнитного поля при адсорбции золотых наночастиц в структуру «ядер», так и для неспецифического обнаружения биологически активных веществ.

7. Разработана платформа ГКР на основе микрочастиц диоксида кремния с наноструктурированной оболочкой ОУНТ/золотые наночастицы. Наличие ОУНТ в структуре оболочек создает необходимый рельеф поверхности для формирования областей с локальным максимумом электромагнитного поля («горячие точки»), которые позволяют усиливать сигнал КР в 20 раз от биологических молекул внутри живой клетки. Кроме того, ОУНТ являются характерной меткой КР, позволяя визуализировать платформы ГКР, регистрируя сигнал КР ОУНТ даже при экстремально низких мощностях лазера – 0.01 мкВт. Данный подход может быть адаптирован для любой неорганической частицы.

8. Продемонстрирован нагрев наноструктурированных оболочек ОУНТ/золотые наночастицы лазерным излучением двух длин волн, 532 нм и 785 нм, различной плотности мощности. Проведено экспериментальное определение эффективной температуры наноструктурированных оболочек на основе измерения Стоксового и Антистоксового рассеяния ОУНТ. Отличительной особенностью наноструктурированных оболочек является наличие наноагрегатора - золотых наночастиц и нанотермометра - одностенных углеродных нанотрубок. На основе сравнительных экспериментов нагрева наноструктурированных оболочек лазерным излучением различной плотности мощности и с использованием стандартного нагревательного столика получено разрешение определения температуры методом КР, которое находится в диапазоне от 5 К до 40 К.

9. Впервые показана визуализация наноструктурированных оболочек микрокапсул ОУНТ/золотые наночастицы в воде и в крови методом фотоакустической спектроскопии. Найдено, что интенсивность фотоакустического сигнала микрокапсул выше интенсивности носителей до растворения «ядра» диоксида кремния, что обусловлено большей эластичностью наноструктурированной оболочки в отсутствие «ядра». Интенсивность фотоакустического сигнала от микрокапсул в крови в 2 раза выше, чем интенсивность фотоакустического сигнала,

генерируемого кровью. Предполагается, что фотоакустическая визуализация микрокапсул будет востребована для неинвазивного наблюдения за носителями и их распределением *in vivo*.

10. Осуществлена одновременная доставка модельного вещества декстрана внутрь живой клетки фибробласта человека с помощью микрокапсул, высвобождение декстранов путем воздействия лазера на оболочки микрокапсул и обнаружение декстранов во внутриклеточном пространстве микрочипами на основе нитрида кремния, модифицированными золотыми наночастицами методом ГКР в ближней ИК области с малыми временами накопления сигнала ГКР.

#### **Список литературы, цитируемой в автореферате:**

- [1] T. R. Egnew, "Suffering, meaning, and healing: Challenges of contemporary medicine," *Annals of Family Medicine*, vol. 7, no. 2. pp. 170–175, 2009.
- [2] P. S. Weiss, "What can nano do?," *ACS Nano*, vol. 7, no. 11, pp. 9507–8, Nov. 2013.
- [3] G. Decher and J. B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials: Second Edition*, vol. 1–2. 2012.
- [4] A. G. Skirtach, A. M. Yashchenok, and H. Möhwald, "Encapsulation, release and applications of LbL polyelectrolyte multilayer capsules," *Chem. Commun.*, vol. 47, p. 12736, 2011.
- [5] M. Delcea, H. Mohwald, and A. G. Skirtach, "Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 9. pp. 730–747, 2011.
- [6] S. Schlücker, "SERS microscopy: Nanoparticle probes and biomedical applications," *ChemPhysChem*, vol. 10, no. 9–10. pp. 1344–1354, 2009.
- [7] Марченко Ирина Валерьевна, Модификация полиэлектролитных капсул наночастицами серебра и молекулами красителей и перенос энергии фотовозбуждения в этих системах, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук," Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2011.
- [8] I. Marchenko, A. Yashchenok, T. Borodina, T. Bukreeva, M. Konrad, H. Möhwald, and A. Skirtach, "Controlled enzyme-catalyzed degradation of polymeric capsules templated on CaCO<sub>3</sub>: Influence of the number of LbL layers, conditions of degradation, and disassembly of multicompartments," *J. Control. Release*, vol. 162, no. 3, pp. 599–605, 2012.
- [9] V. Vergaro, F. Scarlino, C. Bellomo, R. Rinaldi, D. Vergara, M. Maffia, F. Baldassarre, G. Giannelli, X. Zhang, Y. M. Lvov, and S. Leporatti, "Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 9. pp. 847–864, 2011.
- [10] S. De Koker, B. G. De Geest, C. Cuvelier, L. Ferdinande, W. Deckers, W. E. Hennink, S. De Smedt, and N. Mertens, "In vivo cellular uptake, degradation, and biocompatibility of

- polyelectrolyte microcapsules,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 17, no. 18, pp. 3754–3763, 2007.
- [11] O. S. Sakr and G. Borchard, “Encapsulation of enzymes in layer-by-layer (LbL) structures: Latest advances and applications,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 7, pp. 2117–2135, 2013.
- [12] A. Najer, D. Wu, D. Vasquez, C. G. Palivan, and W. Meier, “Polymer nanocompartments in broad-spectrum medical applications.,” *Nanomedicine (Lond.)*, vol. 8, no. 3, pp. 425–47, 2013.
- [13] Y. Su, C. S. Karamitros, J. Nomme, T. McSorley, M. Konrad, and A. Lavie, “Free glycine accelerates the autolytic activation of human asparaginase,” *Chem. Biol.*, vol. 20, no. 4, pp. 533–540, 2013.
- [14] N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, O. G. Luneva, N. Y. Bryzgalova, E. Y. Parshina, O. V. Sosnovtseva, and G. V. Maksimov, “New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy,” *Biophys. J.*, vol. 97, no. 12, pp. 3206–3214, 2009.
- [15] M. Salomao, X. Zhang, Y. Yang, S. Lee, J. H. Hartwig, J. A. Chasis, N. Mohandas, and X. An, “Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, pp. 8026–8031, 2008.
- [16] S. Roseman, “Reflections on Glycobiology,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 45, pp. 41527–41542, Nov. 2001.
- [17] E. Donath and D. Gingell, “A sharp cell surface conformational transition at low ionic strength changes the nature of the adhesion of enzyme-treated red blood cells to a hydrocarbon interface.,” *J. Cell Sci.*, vol. 63, pp. 113–24, Sep. 1983.
- [18] S. Keller, W. Pitcher, W. Huestis, and H. McConnell, “Red Blood Cell Lipids Form Immiscible Liquids,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 81, no. 22, pp. 5019–5022, 1998.
- [19] M. Delcea, N. Sternberg, A. M. Yashchenok, R. Georgieva, H. Bäuml, H. Möhwald, and A. G. Skirtach, “Nanoplasmonics for Dual-Molecule Release through Nanopores in the Membrane of Red Blood Cells,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 5, pp. 4169–4180, May 2012.
- [20] W. L. Clarke, D. Cox, L. A. Gonder-Frederick, W. Carter, and S. L. Pohl, “Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose,” *Diabetes Care*, vol. 10, no. 5, pp. 622–628, 1987.
- [21] D. A. Stuart, C. R. Yonzon, X. Zhang, O. Lyandres, N. C. Shah, M. R. Glucksberg, J. T. Walsh, and R. P. Van Duyne, “Glucose sensing using near-infrared surface-enhanced raman spectroscopy: Gold surfaces, 10-day stability, and improved accuracy,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 13, pp. 4013–4019, 2005.
- [22] A. M. Yashchenok, D. N. Bratashov, D. A. Gorin, M. V. Lomova, A. M. Pavlov, A. V. Sapelkin, B. S. Shim, G. B. Khomutov, N. A. Kotov, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, and A. G. Skirtach, “Carbon Nanotubes on Polymeric Microcapsules: Free-Standing Structures and Point-Wise Laser Openings,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 18, pp. 3136–3142, Sep. 2010.

- [23] A. Yashchenok, A. Masic, D. Gorin, B. S. Shim, N. a. Kotov, P. Fratzl, H. Möhwald, and A. Skirtach, “Nanoengineered Colloidal Probes for Raman-based Detection of Biomolecules inside Living Cells,” *Small*, vol. 9, no. 3, pp. 351–356, Feb. 2013.
- [24] V. F. Korolovych, O. A. Grishina, O. A. Inozemtseva, A. V. Selifonov, D. N. Bratashov, S. G. Suchkov, L. A. Bulavin, O. E. Glukhova, G. B. Sukhorukov, and D. A. Gorin, “Impact of high-frequency ultrasound on nanocomposite microcapsules: in silico and in situ visualization,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 4, pp. 2389–2397, 2016.
- [25] A. Yashchenok, A. Masic, D. Gorin, O. Inozemtseva, B. S. Shim, N. Kotov, A. Skirtach, and H. Möhwald, “Optical Heating and Temperature Determination of Core-Shell Gold Nanoparticles and Single-Walled Carbon Nanotube Microparticles,” *Small*, vol. 11, no. 11, pp. 1320–1327, 2015.
- [26] J.-W. Kim, E. I. Galanzha, E. V Shashkov, H.-M. Moon, and V. P. Zharov, “Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 10, pp. 688–94, 2009.

**Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. E.S. Prikhozhdenko, V.S. Atkin, B.V. Parakhonskiy, I.A. Rybkin, A. Lapanje, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin, A.M. Yashchenok New post-processing method of preparing nanofibrous SERS substrates with a high density of silver nanoparticles *RSC Adv.*, 2016, 6, 84505–84511.
2. B.V. Parakhonskiy, A.M. Yashchenok, H. Möhwald, D. Volodkin, A.G. Skirtach Release from polyelectrolyte multilayer capsules in solution and on polymeric surfaces *Advanced Materials Interfaces* 2016, 10.1002/admi.201600273.
3. S. Donatan, A. Yashchenok, N. Khan, B. Parakhonskiy, M. Cocquyt, B. Pinchasik, D. Khalek, H. Möhwald, M. Konrad, A. Skirtach, Loading Capacity versus Enzyme Activity in Anisotropic and Spherical Calcium Carbonate Microparticles, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016 DOI: acsami.6b03492.
4. A.M. Yashchenok, J. Jose, P. Trochet, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin Multifunctional polyelectrolyte microcapsules as a contrast agent for photoacoustic imaging in blood *J. Biophotonics* 2016, DOI 10.1002/jbio.201500293
5. E. Lengert, A. Yashchenok, V. Atkin, A. Lapanje, D.A. Gorin, G. Sukhorukov, B. Parakhonskiy Hollow Silver Alginate Microspheres for Drug Delivery and Surface Enhanced Raman Scattering Detection *RSC Adv.* 2016, 6, 20447-20452, DOI: 10.1039/C6RA02019D
6. E.S. Prikhozhdenko, E.V. Lengert, B.V. Parakhonskiy, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, A.M. Yashchenok Biocompatible Chitosan Nanofibers Functionalized with Silver Nanoparticles for SERS Based Detection *ACTA PHYSICA POLONICA A* 2016

7. B. Parakhonskiy, M. V Zyuzin, A. Yashchenok, S. Carregal-Romero, J. Rejman, H. Möhwald, W.J. Parak, A.G. Skirtach The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO<sub>3</sub> particles on their uptake by cells *J Nanobiotechnol* 2015, 13, 53, DOI 10.1186/s12951-015-0111-7
8. Stetciura, I.Y., Yashchenok, A., Masic, A., Lyubin, E.V., Inozemtseva, O.A., Drozdova, M.G., Markvichova, E.A., Khlebtsov, B.N., Fedyanin, A.A., Sukhorukov, G.B., Gorin, D.A., Volodkin, D. Composite SERS-based satellites navigated by optical tweezers for single cell analysis *Analyst* 2015, 140, 4981-4986., DOI: 10.1039/C5AN00392J.
9. A.N. Severyukhina, B.V. Parakhonskiy, E.S. Prikhozhenko, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, H. Moehwald, A.M. Yashchenok Nanoplasmonic Chitosan Nanofibers as Effective SERS Substrate for Detection of Small Molecules *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 15466-15473.
10. Cui, Q., Yashchenok, A., Lia, L., Möhwald, H., Bargheer, M. Mechanistic study on reduction reaction of nitro compoundscatalyzed by gold nanoparticles using in situ SERS monitoring. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2015, 470, 108-113.
11. Yashchenok, A., Masic, A., Gorin, D., Inozemtseva, O., Shim, B.S., Kotov, N., Skirtach, A., Möhwald, H. Optical Heating and Temperature Determination of Core–Shell Gold Nanoparticles and Single-Walled Carbon Nanotube Microparticles. *Small* 2015, 11, 1320-1327.
12. Parakhonskiy, B.V., Yashchenok, A.M., Donatan, S., Volodkin, D.V., Tessarolo, F., Antolini, R., Möhwald, H., Skirtach, A.G. Macromolecule loading into spherical, elliptical, star-like and cubic calcium carbonate carriers. *ChemPhysChem*. 2014, 15, 2817-2822.
13. Parakhonskiy, B.V., Svenskaya, Yu.I., Yashchenok, A.M., Fattah, H.A., Inozemtseva, O.A., Tessarolo, F., Antolini, R., Gorin, D.A. Size controlled hydroxyapatite and calcium carbonate particles: synthesis and their application as templates for SERS platform. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014, 118, 243–248.
14. Parakhonskiy B.V., Yashchenok, A., Konrad, M., Skirtach, A.G. Colloidal Micro- and Nano-Particles as Templates for Polyelectrolyte Multilayer Capsules. *Advances in Colloid and Interface Science* 2014, 207, 253-264.
15. Cui, Q., Yashchenok, A.M., Zhang, L., Li, L., Masic, A., Wienskol, G., Möhwald, H., Bargheer, M. Fabrication of Bifunctional Gold/Gelatin Hybrid Nanocomposites and Their Application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 1999-2002.
16. P. Wuytens, B. Parakhonskiy, A. Yashchenok, M. Winterhalter, A. Skirtach Pharmacological aspects of release from microcapsules - from polymeric multilayers to lipid membranes *Current Opinion in Pharmacology* 2014, 18:129-140.
17. Karamitros, C.S., Yashchenok, A.M., Möhwald, H., Skirtach, A.G., M. Konrad Preserving catalytic activity and enhancing biochemical stability of the therapeutic enzyme asparaginase by

- biocompatible multilayered polyelectrolyte microcapsules. *Biomacromolecules* 2013, 14, 4398-4406.
18. Yashchenok, A., Parakhonskiy, B., Donatan, S., Kohler, D., Skirtach, A., Möhwald H. Polyelectrolyte multilayer microcapsules templated on spherical, elliptical and square calcium carbonate particles. *J. Mater. Chem. B* 2013, 1, 1223-1228.
  19. Yashchenok, A., Masic, A., Gorin, D., Shim, B.S., Kotov, N.A., Fratzl, P., Möhwald, H., Skirtach A. Nanoengineered Colloidal Probes for Raman-based Detection of Biomolecules inside Living Cells. *Small* 2013, 9, 351-356.
  20. Yashchenok, A.M., Borisova, D., Parakhonskiy, B.V., Masic, A., Pinchasik, B.E., Möhwald, H., and Skirtach, A.G. Nanoplasmonic smooth silica versus porous calcium carbonate bead biosensors for detection of biomarkers. *Annalen der Physik Special Issue: Plasmonic Sensors* 2012, 524, 723-732.
  21. Marchenko, I., Yashchenok, A., Borodina, T., Bukreeva, T., Konrad, M., Möhwald, H., Skirtach, A. Controlled enzyme-catalyzed degradation of polymeric capsules templated on CaCO<sub>3</sub>: Influence of the number of LbL layers, conditions of degradation, and disassembly of multicompartments. *Journal of Controlled Release* 2012, 162, 599-605.
  22. Delcea, M., Sternberg, N., Yashchenok, A.M., Georgieva, R., Bäuml, H., Möhwald, H., Skirtach, A.G. Nanoplasmonics for Dual Molecule Release through Nanopores in the Membrane of Red Blood Cells. *ACSNano* 2012, 6, 4169-4180.
  23. Skirtach A.G., Yashchenok A.M., Möhwald H. Encapsulation, release and applications of LbL polyelectrolyte multilayer capsules. *Chem. Commun.* 2011, 47, 12736-12746.
  24. Bratashov D.N., Masic A., Yashchenok A.M., Bedard M.F., Inozemtseva O.A., Gorin D.A., Basova T., Sievers T.K., Sukhorukov G.B., Winterhalter M., Möhwald H., Skirtach A.G. Raman imaging and photo-degradation study of phthalocyanine containing microcapsules and coated particles. *Journal of Raman Spectroscopy* 2011, 42, 1901-1907.
  25. Delcea, M., Madaboosi N., Yashchenok A., Subedi P., Volodkin D., De Geest B., Möhwald H., Skirtach A. Anisotropic multicompartment micro- and nano-capsules produced via embedding into biocompatible PLL/HA films. *Chem Commun.* 2011, 47, 2098-2100.
  26. Marchenko I., Yashchenok A., German S., Inozemtseva O., Gorin D., Bukreeva T., Möhwald H., Skirtach A. Polyelectrolytes: Influence on Evaporative Self-Assembly of Particles and Assembly of Multilayers with Polymers, Nanoparticles and Carbon Nanotubes *Polymers* 2010, 2, 690-708.
  27. Yashchenok A.M., Delcea M., Videnova K., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M., Konrad M., Möhwald H., Skirtach A.G. Enzyme Reaction in the Pores of CaCO<sub>3</sub> Particles upon Ultrasound Disruption of Attached Substrate-Filled Liposomes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 8116-8120.

28. Delcea, M., Yashchenok, A., Videnova, K., Kreft, O., Möhwald, H., Skirtach, A.G. Multicompartmental Micro- and Nanocapsules: Hierarchy and Applications in Biosciences. *Macromol. Biosc.* 2010, 10, 465-474.
29. Yashchenok, A.M., Bratashov, D.N., Gorin, D.A., Lomova, M.V., Pavlov, A.M., Sapelkin, A.V., Shim, B.S., Khomutov, G.B., Kotov, N.A., Sukhorukov, G.B., Möhwald, H., Skirtach, A.G. Carbon Nanotubes on Polymeric Microcapsules: Free-Standing Structures and Point-wise Laser Opening. *Adv. Func. Mater.* 2010, 20, 3136-3142.
30. А.В. Садовой, Д.Н. Браташов, Ященко А.М., Ю.И. Свенская, Г.Б. Сухоруков, Д.А. Горин Стабилизация водной эмульсии жидкого кристалла методом последовательной адсорбции полиэлектролитов и наночастиц магнетита Письма в ЖТФ. – 2010. – Т. 36. - В. 2. – С. 87-94.
31. Ященко А.М., О.А. Иноземцева, Д.А. Горин Нанокompозитные микрокапсулы, содержащие наночастицы коллоидного золота и магнетита: формирование и характеристика Российские нанотехнологиию. – 2009. – Т. 4. – В 5-6. – С. 85-88.
32. Gorin, D.A., Yashchenok, A.M., Inozemtseva, O.A., Khlebtsov, B.N. Size effect of gold colloid nanoparticles onto physical parameters of nanocomposite microcapsules. *Colloid Journal* 2009, 71, 3, 422-429.
33. Gorin, D.A., Portnov, S.A., Inozemtseva, O.A., Luklinska, Z., Yashchenok, A.M., Pavlov, A.M., Skirtach, A.G., Sukhorukov, G.B. Magnetic/gold nanoparticle functionalized biocompatible microcapsules with sensitivity to laser irradiation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008, 10, 6899-905.

*Публикации в сборниках статей*

34. P.C. Wuytens, A. M. Yashchenok, A. Subramanian, A. G. Skirtach, R. Baets Gold Nanoparticle Coated Silicon Nitride chips for Intracellular Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Optics InfoBase Conference Papers, CLEO, 2014, STh4H.7
35. P.C. Wuytens, A.M. Yashchenok, A.Z. Subramaniana, A.G.Skirtach, R. Baets Micron-sized dielectric chips with gold nanostructures for intracellular label-free SERS, Symposium IEEE Photonics Society Benelux, 2014, 67-70.
36. A. Yashchenok, D. Gorin, A. Masic, A. Skirtach, H. Mohwald Structure, Optical and Electrical Properties of the LbL Nanocomposite Multilayers onto Planar and Spherical Templates, SupraNano Self-Assembly, Paris, France, p. 16.
37. A. Yashchenok Laser induced changes of thin shells composed of gold nanoparticles and carbon nanotubes for application in bioscience TNTJapan 2014 January 29 – 31, Tokyo Big Sight, Tokyo, Japan.
38. A.M. Yashchenok, D.A. Gorin, D.O. Grigorev, Yu.A. Koksharov, A.A. Serdobincev, A.A. Neveshkin, M.V. Lomova, G.B. Khomutov, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald Nanocomposite

planar films of polyelectrolyte/iron oxide nanoparticles /, Saratov Fall Meeting 2006: Nanostructures and nanoparticles: fabrication, properties, and applications Ed by D.A. Zimnyakov // Proc. SPIE – 2006. –V. 6536. –P.50-58.

39. A. Yashchenok, A. Masic, D. Gorin, B. Parakhonskiy, H. Möhwald, A. Skirtach Layer-by-Layer assembly of nanocomposite colloidal probes for Raman based detection of biomolecules, Imagenano 2013, Bilbao, Spain, p. 385.
40. A. Yashchenok Calcium carbonate microparticles synthesis, multicompartmentalization, and enzyme-catalyzed reaction, German-Russian Conference on Fundamentals and Applications of Nanoscience at Free University Berlin, p. 91.

*Учебно-методические пособия*

41. Климов Б.Н., Штыков С.Н., Глуховской Е.Г., Невешкин А.А., Портнов С.А., Ященко А.М., Иноземцева О. А., Карагайчев А.Л., Румянцева С.С. Физико-химия наноструктурированных материалов: Руководство к лабораторному практикуму. (учебно – методическое пособие). ООО Принт-клуб: Саратов, –2008. –97 с. (ISBN 978-5-98116-005-97/9).
42. Климов Б.Н., Штыков С.Н., Горин Д.А., Иноземцева О.А., Глуховской Е.Г., Ященко А.М., Колесникова Т.А. Физико-химия наноструктурированных материалов // Учебное пособие для студентов факультета нано- и биомедицинских технологий Саратов. гос. ун-та. Под ред. Б.Н. Климова и Штыкова С.Н. – Саратов: Изд-во «Новый ветер». –2009. –217 с. (ISBN 978-5-98116-089-9).