

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС» (НИТУ «МИСИС»)

На правах рукописи

Иванова Анна Валерьевна

Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа в исследовании клеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии

2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель :
кандидат химических наук, доцент
М.А. Абакумов

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1 Световая микроскопия.....	11
1.2 Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения	13
1.2.1 SIM микроскопия	13
1.2.2 STED микроскопия	15
1.2.3 SMLM микроскопия	17
1.3 Электронная микроскопия	19
1.4 Требования, предъявляемые к структуре	25
разрабатываемого зонда	25
1.4.1 Методы получения НЧ	26
1.4.1.1 Метод микроэмульсий	27
1.4.1.2 Полиольный метод	29
1.4.1.3 Золь-гель метод.....	30
1.4.1.4 Гидротермальный метод	31
1.4.1.5 Метод совместного соосаждения.....	33
1.4.1.6 Метод термического разложения.....	34
1.4.1.7 Сравнение методов синтеза	36
1.4.2 Методы стабилизации поверхности наночастиц	37
1.4.2.1 Органические покрытия.....	38
1.4.2.2 Неорганические покрытия	42
1.4.3 Конъюгация наночастиц оксида железа с высокоспецифичными биомолекулами	45
2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБРАЗЦЫ	48
2.1 Материалы для исследований.....	48
2.1.1. Химические реактивы, прекурсоры и вспомогательные материалы.....	48

2.1.2. Культивирование клеточной линии для <i>in vitro</i> экспериментов	49
2.2 Получение образцов и их исследование	50
2.2.1. Синтез образцов МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4 ($M = Mn, Co, Zn$) в ДБЭ с добавлением ОК	50
2.2.2. Синтез образцов МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4 ($M = Mn, Co, Zn$) в БС	51
2.2.3. Модификация поверхности МНЧ 3,4-дигидроксибензилуксусной кислотой (МНЧ@ДФУК)	51
2.2.4. Функционализация поверхности МНЧ-ДФУК аминокарбокси производным ПЭГ (МНЧ@ДФУК@ПЭГ)	52
2.2.5. Функционализация МНЧ-ДФУК-ПЭГ вторичными флуоресцентно меченными антителами Alexa488 (МНЧ@ДФУК@ПЭГ@АТ _{II} Alexa 488)	52
2.2.6. Функционализация МНЧ@ДФУК@ПЭГ вторичными антителами (МНЧ@ДФУК@ПЭГ@АТ _{II})	53
2.3. Методы исследований	53
2.3.1. Определение элементного состава МНЧ	53
2.3.2. Определение концентрации железа в МНЧ	54
2.3.3. Анализ образцов МНЧ методами аналитической ПЭМ	54
2.3.4. Исследование гидродинамического размера МНЧ	55
2.3.5. Рентгенофазовый анализ	55
2.3.6. Магнитные измерения	56
2.3.7. Мёссбауэровская спектроскопия	56
2.3.8. ИК- спектроскопия	56
2.3.9. Определение количества АТ в образце	56
2.4 <i>In vitro</i> исследование образцов МНЧ	57
2.4.1. Непрямой иммунофлуоресцентный анализ МНЧ@ДФУК@ПЭГ@АТ _{II} -Alexa488	57

2.4.2. Протокол подготовки клеток РСЗ для исследования методом ЭМ.....	58
2.4.3. Приготовление ультратонких срезов клеток РСЗ.....	59
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1. Разработка методики синтеза МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4 (M=Mn, Co, Zn) исследование их структуры и физико-химических свойств.....	60
3.1.1 Синтез, структура и исследование физико-химических свойств МНЧ Fe_3O_4	60
3.1.2 Синтез, элементный состав, структура и свойства МНЧ MFe_2O_4 (M=Mn, Co, Zn).....	65
3.2 Функционализация поверхности МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4	86
3.3 Функционализация МНЧ антителами.....	95
3.4 Визуализация локализации полученных МНЧ в составе нанозонда в клетках РСЗ методом ЭМ.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Исследование распределения и взаимодействия биомолекул (белков, ДНК, РНК, и др.) между собой в клетке для различных биохимических применений является актуальной задачей, не решенной в полной мере до сих пор. Традиционными методами локализации биомолекул являются методы флуоресцентной и конфокальной микроскопии разрешающая способность которых ограничена дифракционным пределом и не превышает 200-300 нм. Развитие методов конфокальной микроскопии сверхвысокого разрешения привело к возможности получать изображения объекта с улучшенным разрешением до 20-50 нм, однако даже такое разрешение не позволяет визуализировать большинство биомолекул размер которых составляет от 1 до 20 нм. Получать изображения с разрешением меньше дифракционного предела световой микроскопии стало возможным с появлением ЭМ.

В данной работе впервые предполагается использование метода ПЭМ ЭДСР для визуализации биомолекул с использованием АТ, маркированных МНЧ сложных оксидов железа. Связывание АТ с белковыми антигенами позволит избирательно доставлять МНЧ, содержащие в кристаллической решетке катионы металлов, к исследуемой мишени, тогда как ЭДСР анализ позволит установить их локализацию с точностью до нескольких нм, таким образом, обеспечивая эффективную визуализацию связывания АТ с белковым антигеном с разрешением, превышающим дифракционный предел световой микроскопии. Разрешающая способность ЭМ позволит проводить визуализацию белковых антигенов в составе клеточных структур с разрешением до нескольких нанометров, тогда как уникальные ЭДСР спектры различных металлов, входящих в состав индивидуальных МНЧ позволят осуществлять параллельный анализ нескольких антигенов.

Степень разработанности темы. В отечественной и зарубежной литературе описано достаточно большое количество данных по исследованию и распределению биомолекул в клетке методом ЭМ. Особую известность для визуализации биомолекул приобрел агент «Immunogold». Благодаря высокой электронной плотности золота удается зарегистрировать гипоинтенсивные области, соответствующие местам связывания электронноплотного зонда при проведении ЭМ образца. Также есть возможность использования НЧ золота разного размера, однако такой подход весьма трудоемок и ограничивается двумя исследуемыми мишенями. Поиск новых конъюгатов для одновременной визуализации нескольких внутриклеточных структур методом ПЭМ до сих пор остается актуальным.

Цель и задачи работы. Цель работы – создание конъюгатов МНЧ, на основе сложных оксидов железа с различными двухвалентными катионами металлов, с АТ для визуализации белковых молекул в клеточных структурах методом ПЭМ.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать методики синтеза МНЧ сложных оксидов железа, таких как Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4 , ZnFe_2O_4 с размером < 20 нм, с элементарным соотношением катионов металлов $\text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Zn}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ максимально приближенным к 1:2;
2. Разработать функциональные покрытия, позволяющие получать стабильные коллоидные суспензии МНЧ, несущих функциональные группы для модификации с АТ;
3. Исследовать иммунохимическую активность АТ после конъюгации с модифицированными МНЧ Fe_3O_4 , МНЧ MnFe_2O_4 , МНЧ CoFe_2O_4 , МНЧ ZnFe_2O_4 ;
4. Показать возможность визуализации биомолекул в клеточных структурах с использованием конъюгатов МНЧ с АТ методом ПЭМ.

Научная новизна. Впервые была разработана оригинальная методика синтеза МНЧ MFe_2O_4 ($M=Mn, Co, Zn$) в БС, а также исследовано влияние БС и ДБЭ совместно с ОК на элементный состав получаемых МНЧ.

Показано, что использование молекулДФУК и ПЭГ-СООН для функционализации поверхности МНЧ дает возможность получать стабильные водные коллоидные растворы МНЧ, позволяющие провести конъюгацию с АТ с сохранением их иммунохимической активности.

Показано, что конъюгаты МНЧ с АТ способны связываться с белковыми антигенами в клеточных компартментах и могут быть визуализированы методом ПЭМ. Кроме того впервые был проведен ЭДСР анализ в тандеме с СПЭМ НАADF, который позволил обнаружить с высоким разрешением единичные МНЧ $CoFe_2O_4$, связанные с белковым антигеном в митохондриях, и удалось достоверно идентифицировать катионный состав таких МНЧ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Простота и адаптируемость разработанной экспериментальной методики синтеза по получению МНЧ сложных оксидов железа контролируемого элементного состава в данной диссертационной работе представляет собой практические рекомендации для широкого спектра применений (Патент РФ №2787203, 2022). Разработанный метод визуализации биологических объектов, объединяющий электронную микроскопию с ЭДСР анализом, используя нанозонды на основе МНЧ сложных оксидов железа, позволит детектировать сразу несколько мишеней, где каждый вид атомов можно картировать определенным цветом, увеличивая при этом разрешение до сверхвысоких величин (1-3 нм).

Методология и методы исследований. Методологическая основа диссертации представлена анализом современной научной литературы по изучаемой проблеме и общепринятыми методами проведения лабораторных исследований (экспериментов). В работе использованы следующие основные методы исследования: ПЭМ, СПЭМ, ЭДСР, РФА, мессбауэровская

спектроскопия, ИК-спектроскопия, магнитометрия, АЭС, ДСР, спектрофотометрия, конфокальная микроскопия.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанные методики синтеза МНЧ сложных оксидов железа позволяют получать монодисперсные МНЧ со строго заданным стехиометрическим составом с диаметром от 3 до 10 нм. Стехиометрический состав и размер магнитного ядра можно контролировать путем подбора параметров реакции.

2. Модификация поверхности МНЧ молекуламиДФУК и ПЭГ-СООН обеспечивает агрегативную стабильность конструкции МНЧ в водно-солевых буферах и позволяет закреплять на своей поверхности АТ.

3. Использование карбодиимидного метода для связывания МНЧ с АТ позволяет сохранять иммунохимическую активность АТ в составе разработанного конъюгата, что является ключевым параметром, определяющим их специфичность по отношению к выбранной мишени.

4. Показано, что конъюгаты МНЧ с АТ способны связываться с белковыми антигенами в клеточных структурах и могут быть визуализированы методом ПЭМ.

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором. Вся синтетическая часть работы, ключевые физико-химические исследования, культуральная работа, а также пробоподготовка, получение и исследование ультратонких срезов на ПЭМ была проведена лично автором. Автор лично сформулировал цель и задачи работы, проанализировал весь массив полученных данных, на основании которых сделал соответствующие заключения и соответствующие выводы по проделанной работе.

Степень достоверности и апробации работы. Степень достоверности представленных количественных данных определяется инструментальной погрешностью использованного аналитического оборудования и статистической обработкой полученных результатов.

Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на всероссийских и международных научных конференциях, в числе которых: VII Троицкая конференция с международным участием "Медицинская физика" (ТКМФ-7) (Троицк, Россия, 2020); Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2020» (Москва, Россия, 2020); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2021» (Москва, Россия, 2021); XXIV Международная научная конференция «Новое в магнетизме и магнитных материалах» (Москва, Россия, 2021); Современные тенденции развития функциональных материалов (Сочи, Федеральная территория «Сириус», Россия, 2021); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2022» (Москва, Россия, 2022); IX Всероссийская научная школа-конференция «Химия, физика, биология : пути интеграции» (Москва, Россия, 2022); Современные тенденции развития функциональных материалов. (Сочи, Федеральная территория «Сириус», Россия, 2022); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2023» (Москва, Россия, 2023).

Публикации. По материалам диссертации опубликована 16 печатных работ, в числе которых 1 статья в издании из перечня ВАК, 3 статьи входящие в базы данных научного цитирования Scopus/Web of science, 10 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций, 1 ноу-хау, 1 патент на изобретение.

Связь работы с государственными программами. Результаты работы были получены в рамках грантов Министерства образования и науки РФ № К2-2019-044; Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» № 16101ГУ/2020; РФФИ № 21-1300438.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части, описывающей материалы методики синтеза МНЧ, модификации и функционализации их поверхности и методы их

исследования *in vitro*, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 145 страницах печатного текста, содержит 17 таблиц и 49 рисунков. Список литературы включает 238 источников.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Световая микроскопия

В настоящее время для изучения визуализации взаимодействия макромолекул в клетках широко применяется метод флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентный микроскоп является востребованным инструментом для исследования тонких (от десятых микрона до 5-7 микрон) флуоресцирующих препаратов, окрашенных одним или несколькими флуорофорами, и их детектирования с очень высокой чувствительностью [1]. К тому же флуоресцентная микроскопия является относительно мягким неинвазивным методом визуализации живых клеток в режиме реального времени [2]. В течение последнего десятилетия развитие флуоресцентных белков в качестве молекулярных меток позволило изучать экспрессию генов, их локализацию и функциональную активность белков в живых структурах [3].

Сочетание методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии позволяет исследовать тонкую структуру живых и фиксированных клеток и тканей растительного и животного происхождения в трехмерном пространстве [4]. В настоящее время применение лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и спиннинг-диск конфокальной микроскопии стало незаменимым инструментом для наблюдения внутриклеточных структур и для количественной оценки биохимических процессов в клетках, клеточных мембранах и внеклеточном окружении [5-6].

Главная задача светового микроскопа - дать возможность различить наиболее мелкие детали наблюдаемого объекта. Данное свойство микроскопа определяется разрешающей способностью, или разрешением. Разрешение - это способность оптического прибора воспроизводить изображение близкорасположенных объектов. В 1873 г. Эрнестом Аббе было установлено, что разрешающая способность микроскопа характеризуется неким

предельным значением, обусловленным волновой природой света [7]. Свет от точечного источника (размеры которого значительно меньше длины волны), проходя через оптическую систему, формирует интерференционную картину, в центре которой находится яркий круг, окруженный чередующимися темными и светлыми кольцами (вторичные интерференционные максимумы и минимумы). Яркость колец убывает по мере удаления от центра и на периферии значительно меньше, чем яркость центрального круга (диск Эйри). Именно из таких кругов складывается изображение в оптической микроскопии (Рисунок 1).

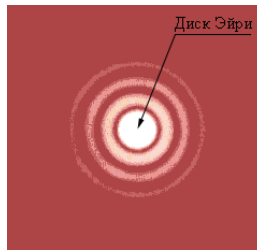


Рисунок 1 – Изображение точечного источника света. Центральный максимум источника - диск Эйри

Размер центрального пятна в диске Эйри зависит от длины волны используемого света и апертурного угла объектива (угол между оптической осью объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив) и может использоваться для оценки разрешающей способности микроскопа. Формальное выражение, представленное Эрнестом Аббе для латерального (X, Y) (1) и аксиального (Z) (2) разрешения оптического микроскопа, имеет следующий вид:

$$\Delta_{x,y} = \lambda / 2N_A \quad (1)$$

$$\Delta_z = \lambda / 2N_A^2 \quad (2)$$

где λ – длина световой волны, N_A - числовая апертура объектива ($N_A = n \cdot \sin \alpha$ n-показатель преломления среды, α - апертурный угол) [8].

Современные методы производства оптики вместе с использованием конфокальной схемы с теоретической точки зрения позволяют получать изображения на самой короткой длине возбуждения - 150 нанометров в аксиальной и 400 нанометров в латеральной плоскости при значении числовой апертуры 1,40. На практике, например, для флуоресцентного зеленого белка, возможно разрешать точки, находящиеся на расстоянии около 200 нм в латеральной области и 500 нм в аксиальной области друг от друга ввиду наличия дифракционного предела, обусловленного физической природой света. Для того чтобы увеличить разрешение переходят к методам исследования структур путем флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения.

1.2 Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения

Выделяют три большие группы методов, позволяющие получить субдифракционные изображения биологического объекта – микроскопия структурированного освещения (SIM - Structured Illumination Microscopy), микроскопия на основе появления спонтанного испускания (STED - Stimulated Emission Depletion Microscopy), локализационная микроскопия единичных молекул (SMLM - Single Molecule Localization Microscopy) [9]. Сверхвысокого разрешения в данных методах можно достичь путем пространственного и/или временного модулирования излучательных переходов между двумя молекулами флуорофора, также за счет сужения функции рассеяния точки, получаемой от большого количества изображений группы флуорофоров, локализованных вблизи друг друга [10].

1.2.1 SIM микроскопия

Основополагающий принцип микроскопии структурированного освещения SIM состоит в том, что данный метод использует дифракционную решетку, которая становится видимой в фокальной плоскости совместно с

объектами, возбужденными структурированным освещением, прошедшим через решетку [11]. При сложении двух систем с наложенной решеткой, сдвинутой одна относительно другой по кругу, возникает узор («муаровый узор»). «Муаровый узор» образуется в местах сгущения, где полосы одной системы попадают в промежутки между полосами другой системы. В данном случае один из объектов является пространственно распределенным флуоресцентным сигналом, а другой структурированной интенсивностью возбуждающего света [12]. Полученные серии изображений и их последующая компьютерная обработка позволяет реконструировать эти изображения, в которых латеральное разрешение увеличено в 2 раза (достигает 100-120 нм). Рисунок 2 демонстрирует концепцию повышения разрешения с использованием высокоразрешающего структурированного освещения.

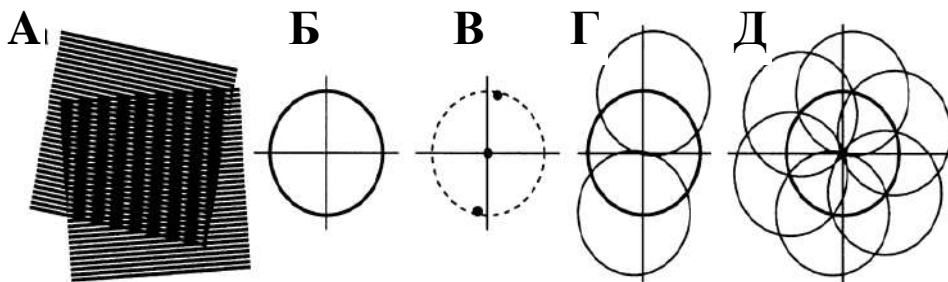


Рисунок 2 – Схема модификации изображения путем микроскопии структурированного освещения (SIM). Механизм описан ниже, в тексте

Повышения разрешающей способности путем микроскопии структурированного освещения происходит по следующему алгоритму: (А). Два линейных изображения накладываются друг на друга, и при этом мы видим «муаровый узор» (толстые, почти вертикальные полосы в области перекрытия). (Б). Круг обозначает наблюдаемую область в «обратном пространстве» (преобразование Фурье) с частотной информацией, определяющей характерные детали объекта, доступные для обычного флуоресцентного микроскопа. (В). Изображение, состоящее из одинаковых черных и белых полос, после преобразования Фурье имеет только три

ненулевых компонента. Один из компонентов находится в начале координат, два других смещены от исходной точки в направлении, которое определяется ориентацией полос. Расстояние между точками пропорционально частоте полос на изображении. (Г). Если объект освещается структурированным светом, возникают «муаровые узоры», увеличивающие пространственные частоты в областях ориентации решетки, и наблюдаемая область содержит новую высокочастотную информацию, которая проявляется в двух областях смещения. (Д). Из последовательности таких изображений с различной ориентацией решетки и сдвигом ее по фазе, информация может быть извлечена из области, которая в два раза превышает частоты обычного изображения, соответственно увеличивает латеральное разрешение в два раза.

Преимуществом метода SIM является достаточно быстрое получение изображений. Образцы готовятся стандартным образом, применяются стандартные флуорофоры, есть возможность использования многоцветного мечения, что делает этот метод применимым для микроскопии живых клеток [13].

С появлением наиболее эффективных методов сверхразрешающей флуоресцентной микроскопии, которые будут описаны ниже, метод SIM отошел на второй план в связи с сравнительно небольшим улучшением разрешения - всего в 2 раза.

1.2.2 STED микроскопия

В 1994 году финским ученым Штеффаном Хеллем был предложен новый тип сканирующего флуоресцентного микроскопа с разрешающей способностью до 35 нм [14]. Данный вид микроскопии получил название STED-микроскопия. Это метод визуализации клеточных структур, основанный на избирательном тушении флуоресценции исследуемого образца при использовании второго возбуждающего STED-лазера с большим

значением длины волны для стимулирования излучательных переходов по границам фокусного пятна. На Рисунок 3 показан принцип действия микроскопа: (А). Источник света (синий) используется для возбуждения флуоресцентного (зеленого) излучения, находящегося в зоне фокуса. STED-лазер (красный) - вынужденное излучение, которое переводит возбужденные молекулы в основное состояние, и спонтанное излучение оказывается погашенным. (Б). Флуоресцентная молекула (черный круг) после поглощения света возбуждения (синий фотон) через короткое время (обычно несколько наносекунд), самопроизвольно испускает флуоресценцию (зеленый фотон), чтобы вернуться в основное состояние. Введение STED-лазера (красный фотон) может быстро стимулировать возбужденную молекулу излучать поглощенную энергию (дополнительный красный фотон) и возвращаться в основное состояние, тем самым гася флуоресценцию (В). Принципиальная схема работы оптического STED микроскопа с фазовым фильтром. В фокальной плоскости формируется пучок лучей (красный) в виде «пончика» с нулевой интенсивностью в центре, перекрывающийся с лучом возбуждения (синий), тем самым обнаруживая флуоресцентное излучение (зеленый) [15].

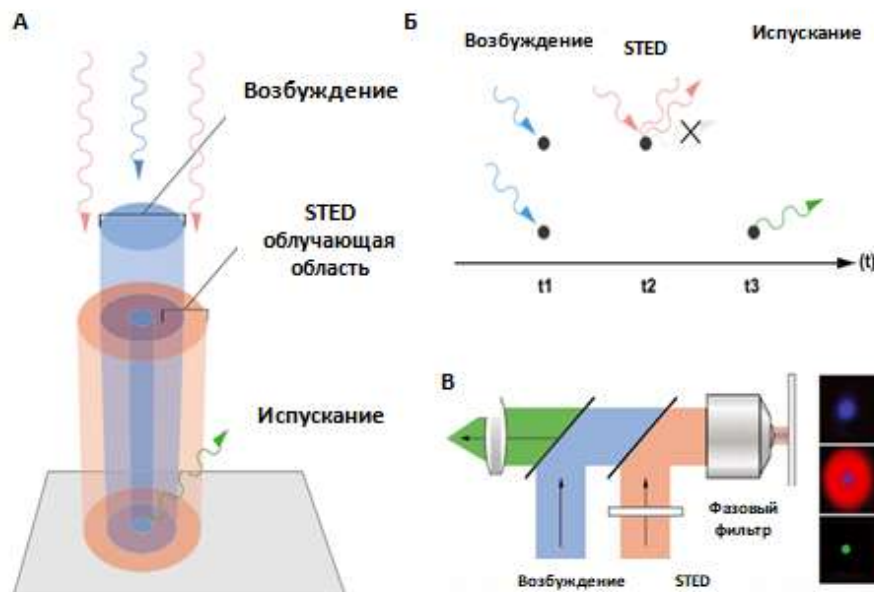


Рисунок 3 – Принцип работы STED микроскопа. Механизм работы подробно описан в тексте

В настоящее время STED-микроскопия нашла широкое применение в исследовании внутриклеточных физиологических процессов на наноуровне в режиме реального времени [16], особенно в области нейробиологии [17]. Были успешно визуализированы с использованием STED микроскопа дендриты (отростки нейронов) в органотипических срезах гиппокампа [18], изучена динамика нейронов в коре головного мозга живой мыши [19], описано сложное перемещение движения везикул, содержащих нейромедиаторы в первичных культурах нейронов крысы [17].

Основной недостаток STED-микроскопии - относительно высокая стоимость системы из-за применения мощных лазеров и очень фотостабильных флуорофоров [20]. Данный вид микроскопии может быть эффективен в основном только для фиксированных образцов [21].

1.2.3 SMLM микроскопия

Настоящим революционным прорывом в увеличении разрешающей способности флуоресцентной микроскопии можно считать PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) [22], STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [23], FPALM (Fluorescence Photo Activation Microscopy) [24] – методы, положившие начало локализационной микроскопии единичных молекул SMLM [25]. Данные методы имеют общую стратегию визуализации, при которой образец подвергается многократному действию возбуждающего лазера, а в каждом акте возбуждается или локализуется небольшая часть флуорофоров. Схема данного метода представлена на Рисунок 4. Небольшое количество флуоресцентных молекул детектируется в каждом кадре. Они должны быть на достаточном расстоянии друг от друга, чтобы дифракционно ограниченные точки не перекрывались. Затем молекулы фотообесцвечиваются и переводятся в состояние, при котором они не испускают фотоны. Центр каждой точки высчитывается. Этот процесс повторяется тысячу раз, чтобы построить изображение,

содержащее локализацию тысячи молекул. В конечном итоге локализации молекул объединяются и отображаются в одном изображении сверхвысокого разрешения [26].

Разрешение изображения, полученного этими методами, зависит от соотношения количества фотонов от отдельного флуорофора к общему фону флуоресценции, и может быть доведено в теории до 1 нм [27].

Среди всех вариантов флуоресцентной микроскопии, методы локализационной микроскопии единичных молекул в меньшей степени применимы для проведения исследований на живых клетках, так как принцип и условия работы SLML плохо сочетаются с клеточной физиологией [27]. На данный момент активно применяются специальные метки (фотоактивируемые флуоресцентные белки, квантовые точки, фотоактивированные флуоресцентные красители и флуорогенные красители), свойства которых можно контролировать светом с учетом фототоксичного УФ облучения.

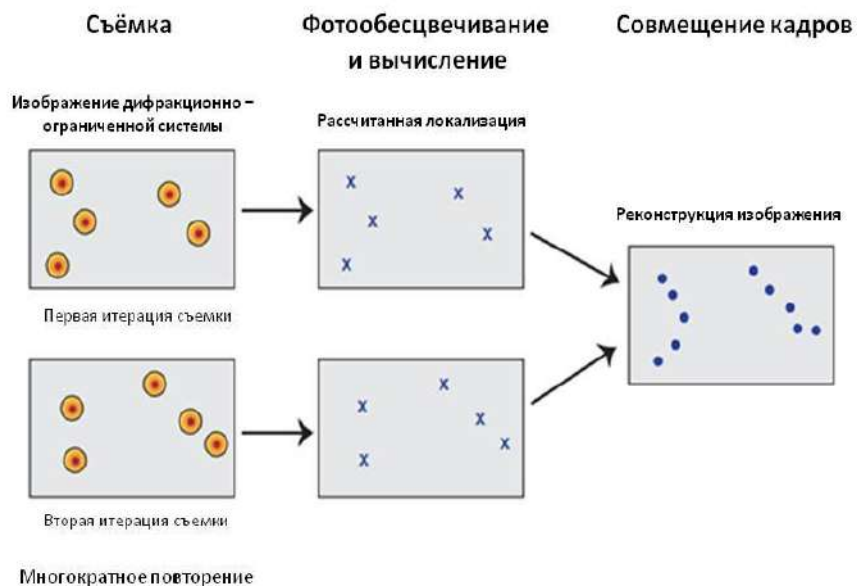


Рисунок 4 – Принцип работы микроскопии единичных молекул SLML

Метод SLML микроскопии улучшает визуализацию внутриклеточных структур с разрешающей способностью в плоскости XY до 20-50 нм и до 50 нм в Z плоскости [28].

На основании всего выше сказанного можно констатировать следующие выводы касательно световой микроскопии: 1) Методы световой микроскопии сравнительно недорогостоящие и нетрудоемкие. 2) Клетки и внутриклеточные структуры рассматриваются в проходящем свете. 3) Разрешающая способность 0,25 мкм (мкм= 10^{-6} м). 4) Можно увидеть микроструктуры: клетки, ядро, митохондрии, хлоропласты. 5) Можно изучать живые клетки. Также стоит отметить, что детальная визуализация многих биологических структур и процессов стоит за пределами возможности. Получать изображения с разрешением меньше дифракционного предела, изучать широкий спектр материалов и структур на наноуровне стало возможным с появлением электронной микроскопии.

1.3 Электронная микроскопия

Современные методы электронной микроскопии (ЭМ) на несколько порядков превосходят разрешение лучших световых микроскопов, позволяют детектировать широкий спектр объектов, начиная от предметов атомного разрешения и заканчивая крупными органеллами (Рисунок 5).

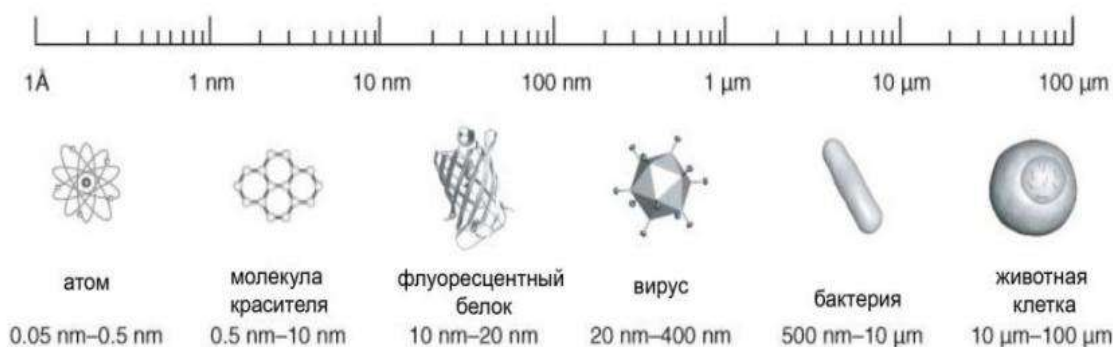


Рисунок 5 – Диапазон объектов, исследуемых электронным микроскопом

Электронная микроскопия играет немаловажную роль в исследовании биологических объектов, молекул, микроорганизмов и фармацевтических препаратов. В настоящее время различают два главных направления электронной микроскопии, обладающих высокой разрешающей

способностью и универсальностью: растровая электронная микроскопия (РЭМ, от англ. Scanning Electron Microscopy, SEM) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ, от англ. Transmission Electron Microscopy, TEM) [29] (Рисунок 6).

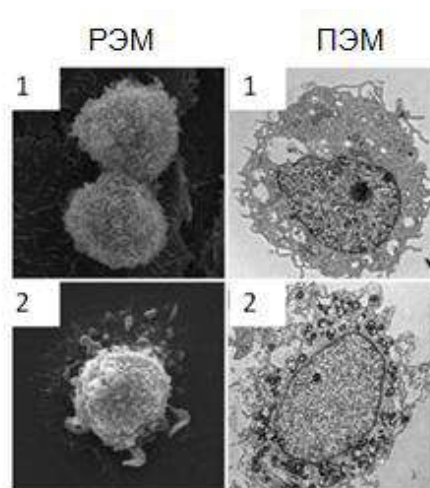


Рисунок 6 – Микрофотографии клеток рака предстательной железы РС3, полученные на РЭМ и ПЭМ

Растровый электронный микроскоп предназначен для изучения и морфологического анализа химического состава, микроструктуры поверхности твердого вещества [30]. ПЭМ используют для исследования внутренней структуры образца, что представляет наибольший интерес в рамках данной работы, поэтому остановимся на данном методе подробнее.

В 1931 году немецким инженером-электриком М. Кноль и немецким химиком Э. Русака был создан первый просвечивающий электронный микроскоп [31]. С тех пор ПЭМ претерпел множество технических усовершенствований и изменений, улучшающих разрешение, облегчающих работу и анализ полученных изображений, однако его принципиальная схема существенно не изменилась (Рисунок 7). В качестве источника электронов выступает электронная пушка. Необходимым условием перемещения электронов в микроскопе является создание глубокого вакуума ($p = 10^{-5}$ - 10^{-6} мм рт ст). Пучок электронов проходит ускоряющую систему, конденсорную

линзу, попадает на образец. Затем собирается объектной линзой и с помощью проекционных линз попадает на люминесцентный экран, который формирует изображение. Получаемое изображение может быть увеличено дополнительно при помощи бинокулярного светового микроскопа. Образцы для просвечивающей электронной микроскопии должны быть тщательно приготовлены и иметь следующие признаки: быть твердыми, сухими, контрастными, устойчивыми к высокому вакууму, электромагнитному излучению, быть тонкими (не более 100 нм) [31].

Возможности ПЭМ не ограничиваются получением изображений. Оснащение просвечивающего микроскопа дополнительными приставками, позволяет получать больше информации об исследуемом объекте. В тандеме с ПЭМ метод ЭДРС и метод СПЭЭ позволяют проводить элементный анализ [32; 33]. Из этого следует, что ПЭМ можно рассматривать как еще более точное информативное средство.

Большую популярность приобрел метод ЭДРС, который в литературе часто упоминается как электронно-зондовый микроанализ (РМА). Данный метод основан на анализе характеристического рентгеновского излучения атомов (в диапазоне энергии до 60 кэВ), возбужденных под действием падающего пучка электронов. ЭДРС позволяет проводить анализ элементов от углерода до урана, но более удобен для химических элементов с большими атомными номерами [34]. При этом атомы с низким атомным весом, такие как углерод, кислород, азот, из которых в основном состоят биологические объекты, обладают маленьким зарядом ядра.

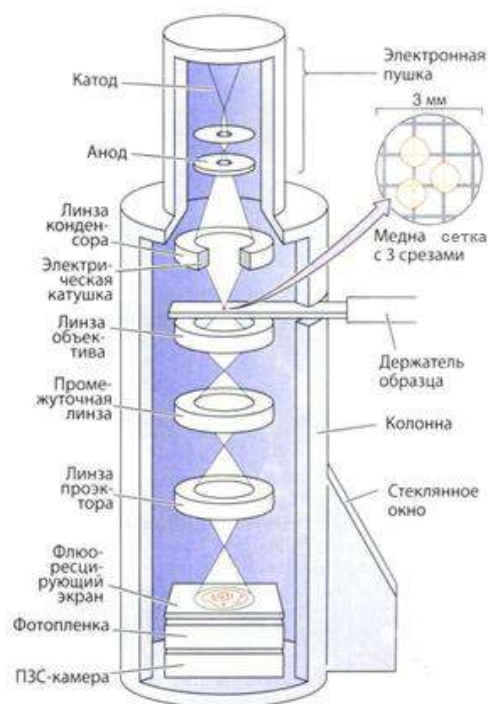


Рисунок 7 – Принципиальная схема ПЭМ

В связи с этим способность этих ядер взаимодействовать с пучком электронов невелика. Именно это обуславливает низкий контраст изображения биологических тканей. Для повышения контрастности изображения биологических объектов их контрастируют с помощью соединений, содержащих атомы металлов, характеризующихся высокой электронной плотностью. Примером применения атомов металлов для решения задач биовизуализации могут служить наночастицы металлов и их соединений, получившим достаточно большое распространение в последнее время. Для придания НЧ свойств высокоспецифичной метки производят их модификацию различными адресными молекулами, такими как антитела, аптамеры, пептиды, малые органические молекулы.

Единственным методом визуализации внутриклеточных структур, который используют в ЭМ, является иммуномечение. Особую известность для визуализации биомолекул в клетке приобрел агент «immunogold» [35]. Данный препарат представляет собой НЧ золота, которые чаще всего конъюгированы с вторичными антителами, сконструированными для специфического связывания с определенным антигеном или клеточным

компонентом. НЧ золота в структуре агента используют из-за высокой электронной плотности, которые позволяют увеличить электронное рассеяние для получения высококонтрастных «темных пятен», косвенно маркирующих интересующие внутриклеточные структуры. Первые работы с использованием системы «immunogold» были посвящены идентификации салмонеллезных антигенов, для изучения своеобразного механизма секреции в *Escherichia coli*, а именно субклеточной локализации основного пневмококкового аутолизина [36]. R. Melo с соавторами [37] применяли систему «immunogold» для визуализации субклеточных сайтов человеческих эозинофильных лейкоцитов, меченных CD63 (мембранный белок, гликопротеин семейства тетраспанинов). Благодаря высокой электронной плотности золота удалось зарегистрировать «темные пятна», соответствующие местам связывания зонда, при проведении просвечивающей электронной микроскопии образца (Рисунок 8).

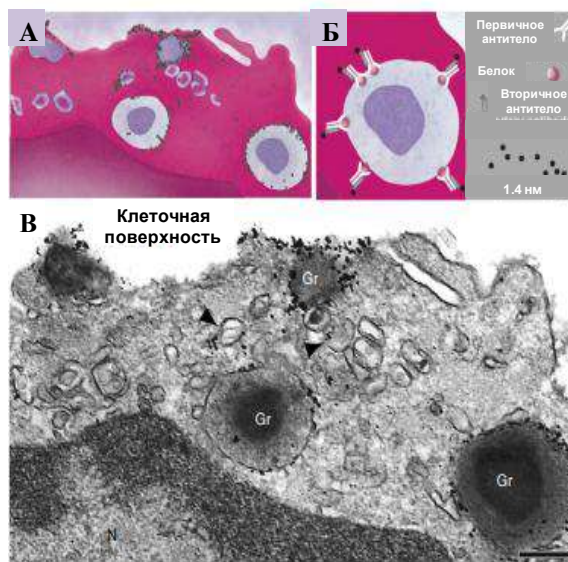


Рисунок 8 – Применение системы «immunogold» для визуализации субклеточных сайтов человеческих эозинофильных лейкоцитов, меченных CD63. Можно наблюдать микродомены на клеточной поверхности, цитоплазматические секреторные гранулы (Gr) и большие везикулы (указаны стрелками) [37]

В исследовании [38] авторы впервые продемонстрировали применение рассматриваемой системы для изучения нервной системы личинок кольчатых червей *Platynereis* для идентификации пептидергических нейронов в конектомах. Благодаря чему была составлена карта распределения нейропептидов сопоставленная с синаптическими конектомными картами. В будущем данный подход может быть адаптирован для других организмов таких как мухи, рыбы и мыши. Кроме того, было показано, что использование «immunogold» может применяться для количественного анализа белка в пресинаптических окончаниях [39; 40].

Использования НЧ золота разного размера [41] расширило возможности метода «immunogold» для одновременной визуализации внутриклеточных структур больше, чем одна. Применение НЧ золота размером 21 и 41 нм позволило одновременно визуализировать два лектина - связывающих сайта в эпителиальных клетках печени крысы [42]. Двойная иммуноэлектронная микроскопия была использована для изучения изменений внутриклеточного распределения н-октаноил и н-деcanoил грелина в грелин - продуцирующих клетках желудка мышей. Иммуноэлектронно-микроскопический анализ выявил существование н-октаноил и н-деcanoил грелина в одних и тех же секреторных гранулах (смешенного типа) в грелин – продуцирующих клетках [43]. Аналогично, в работе [44], НЧ золота диаметром $19,0 \pm 0,5$ нм и $12,5 \pm 0,2$ нм применяли для одновременной детекции двух секреторных белков поджелудочной железы в аппарате Гольджи, конденсирующих вакуолях, и зимогенных гранулах ацинарных клеток крысы (Рисунок 9). С использованием данной методики визуализации биологических образцов сложно осуществить одновременную детекцию нескольких макромолекул или клеточных структур. Несомненно, процедуры окрашивания с использованием НЧ золота имеют значительные преимущества для локализации внутриклеточных структур на наноуровне, однако такой подход трудоемок и ограничивается двумя исследуемыми мишенями.

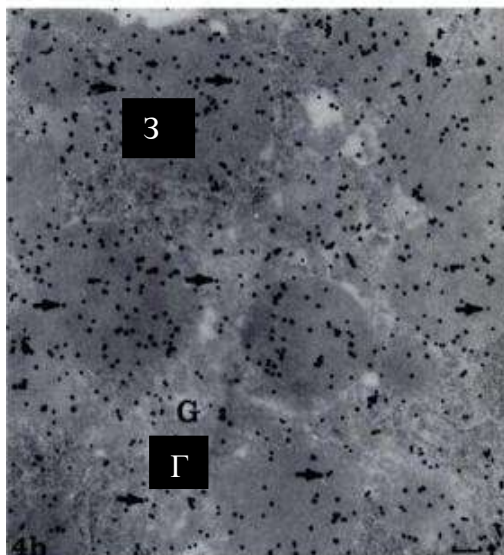


Рисунок 9 – Ультратонкий срез ткани поджелудочной железы крысы, показывающий фрагмент аппарата Гольджи (Г) и зимогенные гранулы (З) ацинарные клетки. ЗНЧ указаны стрелками.

Поиск новых специфических зондов для визуализации внутриклеточных структур (больше, чем две) до сих пор остается актуальным. Но также важно их успешное применение на практике, для наиболее эффективного решения конкретной задачи визуализации. Создание конструкций, несущих в качестве метки металлы, характеризующиеся высокой электронной плотностью, позволит использовать метод электронной микроскопии с энергодисперсионным рентгеновским анализом для одновременной детекции нескольких макромолекул или клеточных структур.

1.4 Требования, предъявляемые к структуре разрабатываемого зонда

Комплексная стратегия разработки специфичных нанозондов для упрощения задач визуализации внутриклеточных структур и увеличению количества единовременно детектируемых мишеней должна включать в себя несколько этапов. На основе структуры специфичного агента «immunogold» мы предположили, что принципиально структура разрабатываемого нами нанозонда должна содержать следующие компоненты: векторную молекулу,

обеспечивающую специфическое взаимодействие с молекулярной мишенью в клетке, химическую сшивку (линкер), выступающую в качестве промежуточного звена между компонентами конструкции и контрастный агент (на основе НЧ), характеризующейся высокой электронной плотностью. Для этого разберем детально каждый компонент конструкции. Рассмотрим основные методы синтеза НЧ, модификацию и функционализацию их поверхности.

1.4.1 Методы получения НЧ

В настоящее время предложено большое количество различных способов синтеза, которые позволяют получать НЧ различных материалов, форм и размеров (Рисунок 11). Среди такого многообразия можно подобрать НЧ, имеющие конкретные свойства для решения конкретной задачи. Синтез МНЧ за последнее время хорошо изучен. Химические методы получения МНЧ, в отличие от физических методов получения и процессов биоминерализации (Рисунок 10), считаются более пригодными, так как позволяют контролировать распределение МНЧ по размерам (однородность), степень кристалличности, чистоту фазы и стехиометрический состав [45]. Наиболее распространенными химическими методами, широко используемыми для синтеза МНЧ являются: метод микроэмульсий, совместного соосаждения, термического разложения, гидротермальный, полиольный и золь-гель метод [46–51]. Данные методы направлены на получение высококачественных МНЧ оксидов железа. Основные способы получения и механизмы формирования МНЧ будут описаны ниже.



Рисунок 10 – Сравнение распространенности основных методов, существующих в настоящее время для синтеза МНЧ, с преобладанием подробных химических методов. Изображение изменено из [52].

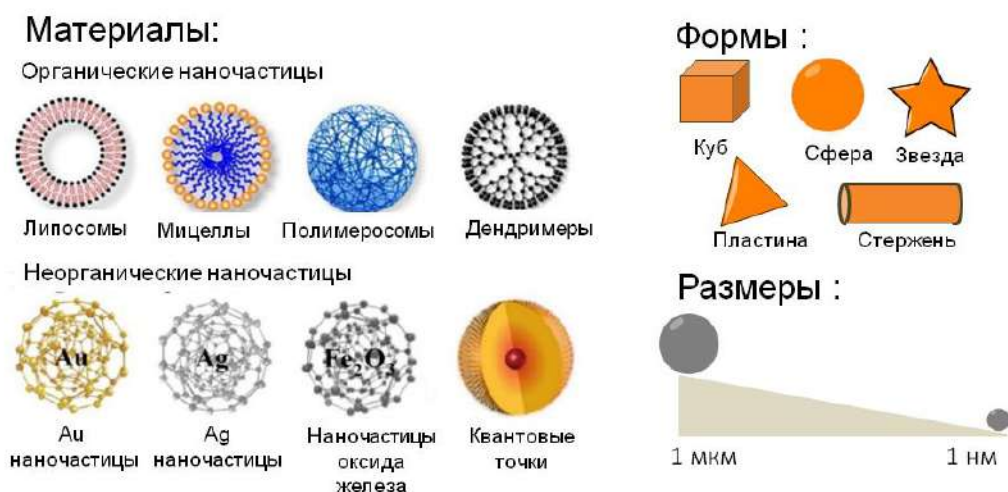


Рисунок 11 – Виды НЧ по типу материала, форме и размеру (не ограничивается тем, что представлено на рисунке). Изображение изменено из [53; 54]

1.4.1.1 Метод микроэмульсий

Одним из наиболее часто используемых методов получения монодисперсных МНЧ является микроэмульсионный метод. Традиционный микроэмульсионный метод основан на микроэмульсиях вода-в-масле (В/М) и он используется для получения металлических и других неорганических НЧ

с начала 1980-х годов [55]. Основная стратегия синтеза МНЧ микроэмульсионным методом заключается в смешивании двух фаз, первая фаза - металлический прекурсор, а вторая - соосажающий агент. Две фазы контактируя друг с другом образуют осадок нанометрового размера. Выбор органического растворителя не имеет решающего значения – обычно на практике используются нелетучие углеводороды, например, гептан и октан.

Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами: использование простого оборудования, температура синтеза близкая к температуре окружающей среды [56], возможность получения большого разнообразия материалов с высокой степенью контроля размера, состава и высокой удельной площадью поверхностью МНЧ, полученные микроэмульсионным методом МНЧ, имеют меньшие размеры и большую намагниченность насыщения [57].

Для синтеза МНЧ чаще всего используют обратные микроэмульсии в которых капли воды распределены в фазе неполярного растворителя. Размер капель составляет десятки нанометров и варьируется за счет соотношения вода-растворитель-ПАВ, что позволяет регулировать размер получаемых наночастиц, и повышать их монодисперсность [58]. Свойства МНЧ, полученных микроэмульсионным методом зависят от типа и структуры ПАВ [59]. ПАВ представляет собой амфифильную молекулу, которая снижает поверхностное натяжение между водой и маслом [60]. Наиболее распространенными ПАВ, которые применяют для синтеза МНЧ являются: полиоксиэтилен октилфениловый эфир (Triton X-100) [61], двухцепочечный анионный бис(2-этилгексил) сульфосукцинат натрия (Na(AOT)) [62], одноцепочечный анионный додецилсульфат натрия (SDS) [61], катионный цетилтриметиламмоний хлорид (СТАС) или цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) [63]. Системы на основе Na(AOT) являются одними из самых охарактеризованных. Было обнаружено, что размер обратных капель микроэмульсии, генерируемых этой системой, увеличивается линейно с количеством воды, добавляемой в систему [64]. Использование систем на

основе Na(AOT), вероятно, является лучшим методом синтеза неорганических НЧ в микроэмульсиях по двум причинам: возможность контролировать размер капель и регулировать количество микроэмульсий, доступных для получения МНЧ [59]. В исследовании [64] авторы синтезировали методом микроэмульсий МНЧ со средним диаметром от $4\pm 0,2$ до $12\pm 0,3$ нм, размер которых можно было регулировать концентрацией и температурой ПАВ. В качестве прекурсора использовали додецил сульфат железа $Fe(DS)_2$. В другой работе группе исследователей удалось регулируемо получить МНЧ с размерами 3, 5, 7 и 9 нм за счет варьирования соотношения компонентов, образующих микроэмульсии [65]. Аналогично в работе [61] было продемонстрировано, что для контроля размера МНЧ также может быть использовано изменение химической структуры применяемого ПАВ, а именно увеличение его гидрофобности, приведет к образованию микроэмульсий меньшего размера, и наоборот, что имеет соответствующее влияние на размер образующихся в них МНЧ.

Основным недостатком данного метода является неблагоприятное воздействие остаточных ПАВ на свойства МНЧ и сложность процедур масштабирования синтеза МНЧ [66–68].

1.4.1.2 Полиольный метод

Одним из многообещающих методов синтеза МНЧ для биомедицинских приложений является метод полиолов. МНЧ могут быть получены путем восстановления солей металлов и соосаждения солей металлов из раствора, включающего полиол [69; 70]. В данном методе в качестве прекурсора используют соли металлов железа, например, такие как нитраты и ацетаты, которые ресуспендируют в диоле, например, таком как этиленгликоль или диэтиленгликоль. После реакционную смесь нагревают до температуры кипения растворителя с образованием промежуточного соединения, которое восстанавливают до образования ядер МНЧ. В

полиольном методе полиол действует для прекурсора, как растворитель, восстановитель и в некоторых случаях как комплексообразующий агент. Контролировать размер МНЧ можно путем внесения в реакционную среду инородных МНЧ. Таким образом, этапы зарождения и роста могут быть полностью разделены и данным способом получены однородные МНЧ [70]. МНЧ субмикронного размера могут быть получены путем повышения температуры реакции и добавления инородных зародышей *in situ*. Данный метод был использован для получения нанокристаллических порошков Co-Ni и Fe-Co [71; 72]. Монодисперсные МНЧ со средним размером 100 нм можно получить без затравки (гомогенное зародышеобразование), в то время как для получения МНЧ размером 50-100 нм в качестве зародышеобразователя необходимо использовать Pt (гетерогенная нуклеация) [73]. МНЧ CoFe_2O_4 размером 6 нм получали из прекурсоров хлорида железа и ацетата кобальта в 1,2-пропандиоле с добавлением воды и ацетата натрия [74]. Wan и его коллеги сообщили о методе получения, стабильных, монодисперсных и биосовместимых МНЧ с размером магнитного ядра $8,5 \pm 1,2$ нм, основанном на разложении $\text{Fe}(\text{acac})_3$ в триэтиленгликоле при повышенной температуре. Полученные МНЧ оказались перспективными для применения в качестве контрастного агента в магнитно-резонансной томографии (МРТ) [75]. Главным преимуществом полиольного метода является то, что полиолы выступают как в качестве растворителя, так и в качестве стабилизирующего агента образующихся МНЧ.

1.4.1.3 Золь-гель метод

Самым распространенным методом получения монодисперсных стехиометрических оксидов металлов является золь-гель метод. Процесс образования МНЧ данным методом при комнатной температуре основан на реакциях гидролиза и поликонденсации алкоксидов металлов для получения «золя» (коллоидного раствора МНЧ), который затем сушат или

«гелеобразуют» путем удаления растворителя до получения трехмерной сетки оксида железа [76]. В описываемом методе получения МНЧ в качестве растворителя чаще всего выступает вода, но также могут быть использованы органические растворители. Золь-гель метод простой и масштабируемый, позволяет получать МНЧ контролируемого размера и формы при комнатной температуре [77], а размер получаемых МНЧ можно регулировать в диапазоне от 15 до 50 нм [78]. Помимо этого необходимо учитывать тип растворителя, температуру, прекурсоры, катализаторы, pH, механическое перемешивание, то есть те факторы, которые могут влиять на кинетику реакции гидролиза и конденсации. Для получения МНЧ оксидов металлов золь-гель процесс предлагает несколько преимуществ по сравнению с другими методами, включая хорошую гомогенность, низкую стоимость и высокую чистоту аморфных фаз. Недостатком данного метода является то, что в процессе образуются трехмерные оксидные сетки, тем самым невозможно синтезировать пространственно - упорядоченные структуры, состоящие из МНЧ, находящихся на одинаковом расстоянии друг от друга. Sara Shaker с соавторами успешно получили золь - гель методом в сочетании с отжигом МНЧ Fe_3O_4 при температуре 200 °С, 300 °С, 400 °С [79]. Результаты показали, что размер МНЧ можно контролировать, изменяя температуру отжига. В работах [80; 81] были получены МНЧ маггемита в диапазоне размеров от 6 до 15 нм после прямой термообработки гелей при температуре 400 °С встроенные в инертную, неорганическую, прозрачную, термостойкую кремниевую матрицу.

1.4.1.4 Гидротермальный метод

Гидротермальным методом можно синтезировать широкий спектр кристаллических МНЧ. Общая методика получения МНЧ состоит из (твердого) линолеата металла, жидкой фазы этанол линолевой кислоты и водно - этанольного раствора, выдержанных в гидротермальных (то есть при

высокой температуре и давлении) условиях [82]. Типичная температура реакции для проведения гидротермального синтеза составляет около 220 °С, необходимое давление выше 10^7 Па при общем времени около 72 часов в автоклаве [83; 84]. Этим методом можно регулировать форму и размер МНЧ с возможностью получения МНЧ от десятков до сотен нм [85; 86]. Несмотря на несколько исследований по поиску подходящих лигандов для синтеза монодисперсных МНЧ [87], гидротермальным методом невозможно получать водорастворимые МНЧ размером менее 10 нм [88]. Zheng вместе с соавторами получили 27 нм МНЧ Fe_3O_4 в присутствии ПАВ (бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия [89]. В [90] сообщили, что проводили синтез в течении 6 часов при температуре 140 °С и получили МНЧ Fe_3O_4 диаметром 40 нм с намагниченностью насыщения 85,8 эму/г. Как правило, размер МНЧ зависит от концентрации прекурсора, времени синтеза и температуры, при которой протекает реакция [91]. Hasani и соавторы исследовали влияние концентрации прекурсора в диапазоне от 0,03 до 0,06 М на форму МНЧ [92]. Было показано, что при концентрации прекурсора 0,03 М получаются сферические МНЧ с диаметром $15,6 \pm 4,0$ нм.

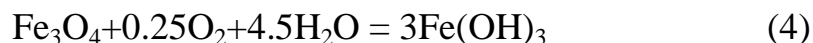
Одной из основных проблем традиционного гидротермального метода является медленная кинетика реакции при любой заданной температуре. Использование гидротермального метода в тандеме с микроволновым нагревом – решение данной проблемы [60]. Гидротермальный метод является экологически чистым и универсальным, так как не требует при получении МНЧ органических растворителей [93]. По сравнению с другими методами получения МНЧ, гидротермальный метод предпочтительнее золь-гель и других методов из-за его преимуществ в получении МНЧ желаемой формы, размера, высокой кристалличности и постоянного состава [94].

1.4.1.5 Метод совместного соосаждения

Метод совместного соосаждения является наиболее популярным методом синтеза МНЧ. В частности, он широко используется в биомедицине из-за нетоксичности используемых материалов [95]. Этот метод позволяет синтезировать МНЧ в инертной атмосфере при комнатной температуре [96]. Общая схема реакции может быть записана следующим образом:



Согласно термодинамике реакции (3), полное соосаждение происходит при pH = 9-14 при сохранении молярного соотношения $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+} = 2:1$ в присутствии инертного газа. В противном случае Fe_3O_4 может быть окислен (4) Неконтролируемое окисление кислородом воздуха может приводить к получению немагнитных фаз оксигидроксидов железа и $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Предотвратить процесс окисления можно путем проведения реакции в инертной атмосфере и добавления в реакционную смесь ПАВ [97].



Путем данного подхода получают МНЧ с широким распределением по размеру в диапазоне от 5 до 40 нм. В более общем плане размер, форма и магнитные свойства МНЧ зависят от условий реакций, таких как тип используемых солей [98], pH и ионная сила [99; 100]. Группа ученых под руководством Krishna Surenda показала, что размер магнитных НЧ, синтезированных методом соосаждения, изменяется от 6 до 14 нм при изменении концентрации прекурсора [101]. Кроме того, было продемонстрировано, что регулируя pH и ионную силу, можно контролировать средний размер МНЧ от 2 до 15 нм [68]. Увеличение pH и ионной силы приводит к образованию МНЧ маленького размера. Оба параметра влияют на химическую структуру поверхности и на

электростатический поверхностный заряд МНЧ. Проведение реакции соосаждения при температуре ниже 60 °С приводит к образованию аморфного гидратированного оксигидроксида, который можно легко превратить в Fe_2O_3 , тогда как проведение реакции при 80 °С благоприятствуют образованию Fe_3O_4 [102].

Преимуществами соосаждения является простота синтеза, высокий выход и воспроизводимость, чистота продукта, отсутствие органических растворителей. Однако, используя данную методику, довольно сложно контролировать форму и размер синтезируемых МНЧ.

1.4.1.6 Метод термического разложения

Термическое разложение является одним из наиболее эффективных методов получения МНЧ с узким распределением по размерам, а также позволяет регулировать средний размер МНЧ [103]. В частности, термическое разложение может быть достигнуто двумя различными способами «нагревом» и «горячим впрыском». Процесс нагревания подразумевает непрерывный нагрев предварительно перемешанного раствора прекурсоров, поверхностно-активных веществ и растворителя до заданной температуры, при которой начинается кластеризация и рост МНЧ [104]. Напротив, метод горячего впрыска вызывает быстрое и гомогенное зародышеобразование путем введения реагентов в горячий раствор ПАВ с последующей контролируемой фазой роста. В любом случае оба процесса основаны на одном и том же принципе, заключающемся в нагревании немагнитного металлоорганического соединения предшественника в присутствии органических растворителей и поверхностно-активных веществ [103]. Чаще всего в качестве прекурсоров используют карбонилы и ацетилацетонаты железа, а в качестве ПАВ длинноцепочечные жирные кислоты, например, такие как олеиновая кислота, палмитат, стеарат, гексадециламин [45; 83; 105; 106]. Важно отметить, что аргон играет важную

роль в поддержании инертности атмосферы. Оптимальная температура, необходимая для этой реакции находится в диапазоне от 100 - 350 °С, что приводит к образованию кристаллических МНЧ с узким распределением по размерам от 4 - 30 нм [103; 107]. В этом контексте температура нагрева и время выдержки являются самыми важными факторами для контроля размера МНЧ.

Фактором риска, связанным с этим методом, является использование органических растворителей, что ограничивает его применение в бионаномедицине. Преимуществом термического разложения является возможность регулирования количества вводимого стабилизирующего агента и режима нагревания реакционной среды, что позволяет контролировать скорость процессов нуклеации и роста МНЧ. Правильный подбор этих параметров позволит более точно контролировать морфологические характеристики синтезируемых МНЧ. Hueon и его коллеги [105] термическим разложением получали монодисперсные МНЧ оксида железа размером 5-22 нм в высококипящих органических растворителях: 1-гексадецен, октиловый эфир, 1-октадецен, 1-эйкозен или триоктиламин. Используя в качестве прекурсора гексагидрат хлорида железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), в качестве растворителя 2 – пиридин были получены МНЧ Fe_3O_4 размером 4 нм, 12 нм и 60 нм при времени кипячения 1, 10,24 часа [108]. Стоит отдельно отметить, что форма МНЧ в зависимости от времени кипячения менялась от сферической до кубической. Разложение ацетилацетоната железа $\text{Fe}(\text{acac})_3$ в присутствии 1,2-гексадекандиола, олеиламина и олеиновой кислоты в дифениловом эфире приводит к образованию МНЧ Fe_3O_4 [109]. В работе [110] авторами было предложено использовать гидрофильные стабилизирующие агенты, в качестве которых могут быть использованы высококипящие растворители, такие как бензиловый спирт [111], что упростит процедуру синтеза.

1.4.1.7 Сравнение методов синтеза

В предыдущих разделах были кратко описаны различные пути синтеза МНЧ. Сравнение методов, используемых для получения МНЧ с достоинствами и недостатками представлены в Таблица 1. С помощью химических методов синтеза можно контролировать размер и форму, регулируя различные условия реакции [57]. Самым универсальным способом получения МНЧ является гидротермальный метод и превосходит другие методы, такие как золь-гель метод и микроэмульсия из-за его преимуществ с точки зрения получения МНЧ желаемого размера, формы, высокой кристалличности и гомогенного состава. Метод соосаждения предпочтительнее из-за его простоты и легкости в синтезе МНЧ. Золь-гель метод имеет свои преимущества: простота и масштабируемость, экономическая эффективность, контролируемый размер и форма при комнатной температуре. Микроэмульсионный метод пригоден для синтеза монодисперсных МНЧ различной морфологии, но получаются МНЧ с низким выходом. Метод термического разложения является лучшим методом для получения МНЧ контролируемого размера, формы и состава [60].

Каждый метод имеет свои ограничения и его выбор зависит от многих факторов, таких как выход, размер, форма и экономическая эффективность. Мнения о выборе могут отличаться от исследователя к исследователю в зависимости от цели применения. Именно поэтому ни один метод не называют оптимальным методом синтеза МНЧ.

Таблица 1 – Достоинства и недостатки методов синтеза МНЧ

Метод синтеза	Растворитель	Температура и время синтеза	ПАВ	Преимущества	Недостатки
Микроэмульсионный	Органический	20-50 °С, несколько часов	Добавление во время реакции	Регулируемая форма, размер	Низкий выход
Полиольный	Органический (полиолы)	150 °С, несколько часов	Добавление во время реакции	Регулируемая форма, размер	Высокая температура
Золь-гель метод	Вода	Комнатная температура, несколько минут	Добавление во время реакции	Простой, регулируемая форма и размер, высокая чистота аморфных фаз	Продукт содержит трехмерные оксидные сетки
Гидротермальный	Вода-этанол	220 °С, несколько дней	Добавление во время реакции	Желаемая форма, размер, состав.	Высокая температура и давление
Соосаждения	Вода	90 °С, несколько минут	Добавление во время реакции	Высокий выход, воспроизводимость	Нет контроля формы и размера
Термического разложения	Органический	100-320°С, часы, дни	Добавление во время реакции	Регулируемая форма, размер, состав	Высокая температура и инертная атмосфера

1.4.2 Методы стабилизации поверхности наночастиц

Химическая модификация поверхности МНЧ сильно зависит от конкретной цели их применения. Для увеличения стабильности (устойчивости к агрегации) используют различные стратегии модификации

поверхности (Рисунок 12). Оптимальное покрытие МНЧ должно быть гидрофильным и устойчивым при физиологических рН, иметь функциональные группы для взаимодействия с целевыми молекулами, быть биосовместимым и биodeградируемым. Выделяют две основные группы: органические покрытия (мономерные, полимерные, ПАВ) [112–114] и неорганические покрытия (углерод, диоксид кремния, драгоценные металлы или оксиды) [115].

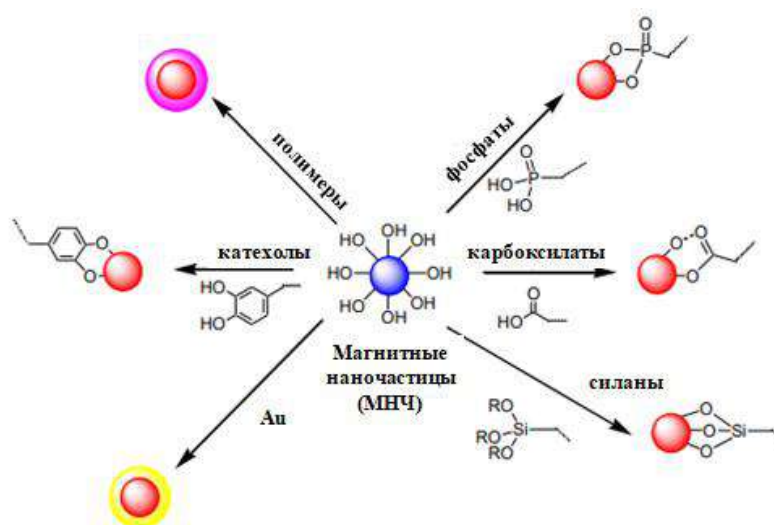


Рисунок 12 – Различные стратегии стабилизации МНЧ. Изображение изменено из [116]

1.4.2.1 Органические покрытия

Мономерные покрытия на основе малых органических молекул широко распространены и используются для покрытия МНЧ. Наиболее распространенными являются производные пирокатехина [116], которые образуют с поверхностью МНЧ чрезвычайно стабильные комплексы [117]. Хи с соавторами были первыми, кто описал общую стратегию функционализации МНЧ через химический линкер на основе дофамина (производное катехола) [118]. Группа ученых [119] показала как различные лиганды на основе катехола могут быть одновременно присоединены к

поверхности МНЧ, что позволяет легко и с высокой воспроизводимостью формировать наноструктуры, на поверхность которых могут быть введены карбоксильные, аминные и другие заряженные функциональные группы. Производные дофамина являются наиболее широко используемыми линкерами для конъюгации с МНЧ, однако использование дофамина было поставлено под сомнение, поскольку комплекс МНЧ-катехин имеет тенденцию диссоциировать при физиологических значениях рН и может окисляться до хиноноподобной структуры в присутствии Fe^{3+} как на поверхности, так и в растворе [119]. Для решения этой проблемы в литературе были предложены модифицированные производные дофамина. Система МНЧ, модифицированных нитрокатехиновыми лигандами была недавно использована Textor совместно с коллегами для создания МНЧ покрытых дендритной полимерной оболочкой, с превосходной коллоидной стабильностью [120]. Другим распространенным низкомолекулярным покрытием являются молекулы органических кислот, например, лимонной кислоты [121]. Лимонная кислота может координироваться на поверхности оксида железа за счет нескольких карбоксильных групп, входящих в ее состав. При этом группы, не взаимодействующие непосредственно с поверхностью МНЧ остаются доступными растворителю, что обеспечивает наличие отрицательного заряда на поверхности таких МНЧ при физиологических рН, и обеспечивает им гидрофильные свойства. Помимо лимонной кислоты, были исследованы другие молекулы на основе карбоновых кислот (например, димеркаптоянтарная кислота [122] и 3-аллилацетилацетонат [123]). Координационная связь образованная между МНЧ и молекулами карбоновых кислот лабильна и может быть легко разорвана, поэтому такие покрытия имеют ограничения для модификации поверхности многофункциональных МНЧ. Фосфонаты считаются менее распространенным низкомолекулярным покрытием, чем лимонная кислота, однако они показали сильное сродство к поверхности МНЧ за счет образования сильных бидентантных связей Fe-O-P [124]. Эти связи более

прочные, чем связи, образованные молекулами карбоновых кислот, с хорошей стабильностью в течение нескольких недель при нейтральном pH. Кроме того, плотность пришивки фосфонатов выше, чем при использовании карбоксилатов. В работе [125] для получения коллоидно стабильных МНЧ были использованы молекулы гексадецилфосфоновой кислоты и дигексадецилфосфата. При этом, исследование термодинамики процесса десорбции покрытия позволило предположить, что использованные молекулы образуют на поверхности МНЧ структуру в виде квази-бислоя, напоминающего структуру липосом. Одновременной функционализации аминными, карбоксильными и азидными группами подверглись МНЧ за счет того, что их поверхность была покрыта 2-аминоэтилфосфонатом [126], что делает этот лиганд перспективным для контролируемой функционализации поверхности.

Для большинства исследователей предпочтительнее использовать полимерные покрытия, нежели функционализировать МНЧ малыми органическими молекулами [127; 128]. Одним из полимеров, используемых для стабилизации поверхности МНЧ является ПЭГ. Он представляет собой биосовместимый линейный полимер, который обладает широким диапазоном концевых функциональных групп. ПЭГ одобрен FDA для использования в лекарственных препаратах [129]. Это нейтральная гидрофильная молекула, которая позволяет увеличить время циркуляции модифицированных ПЭГ МНЧ за счет предотвращения процесса неспецифической адсорбции белков и последующего захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) [130]. Молекулярная масса ПЭГ может варьироваться, так, например, ПЭГи с молекулярной массой меньше 100000 Да считаются амфифильными и хорошо растворимы в воде, а также во многих органических растворителях. В работе [131] была проведена поверхностная модификация МНЧ ПЭГ в водном растворе. Гетеробифункциональные ПЭГи являются универсальными конструкциями, которые одним концом взаимодействуют с поверхностью МНЧ, а другим с целевой молекулой [132; 133]. ПЭГ является

эффективным покрытием, которое используется для уменьшения агрегации МНЧ в физиологических буферах, благодаря стерическим отталкиваниям цепей ПЭГ и его высокой гидрофильности.

Одним из широко используемых полимерных покрытий МНЧ является декстран. Декстран представляет собой разветвленный полисахарид, полимер глюкозы, с размерами от 10 до 150 кДа. Благодаря своей высокой биосовместимости имеет высокое сродство к поверхности МНЧ. Впервые использование декстрана в качестве покрытия МНЧ было описано в работе [134] в 1982 году. С тех пор различные полимерные формы декстрана используются для стабилизации поверхности МНЧ, включая карбоксидекстран и карбоксиметилдекстран [135]. Duguet совместно с соавторами [80] разработали поэтапный процесс ковалентного связывания декстрана с поверхностью сверхмалых суперпарамагнитных МНЧ через силановые группы.

Самым популярным катионным гидрофильным полимером для модификации поверхности МНЧ является хитозан [136; 137]. В первую очередь это связано с большим распространением его в природе, биосовместимостью и простотой функционализации. На протяжении десятилетий хитозан и его производные были использованы для формирования полимерных наночастиц посредством электростатического комплексообразования с нуклеиновыми кислотами и различными фармацевтическими препаратами [137], лишь недавно он стал применяться для модификации поверхности МНЧ [138]. МНЧ покрытые хитозаном были получены путем физической адсорбции, размер модифицированных МНЧ составил около 15 нм в диаметре [48]. Катионная природа полимера позволяет загружать посредством электростатических взаимодействий анионные аденовирусы на МНЧ Fe_3O_4 покрытые хитозаном, что повысило эффективность трансфекции [139]. В дополнении, к своим биоадсорбционным свойствам хитозан имеет на своей поверхности как амино- так и гидроксильные функциональные группы, то есть выступает в

роли «химической сшивки», через которую на поверхность МНЧ можно загрузить различные таргетные молекулы.

Полиэтиленимин (ПЭИ) - еще один водорастворимый катионный полимер, который может принимать как линейную, так и разветвленную форму [140]. Широко используется как средство доставки ДНК. Доставка генов с использованием ПЭИ происходит благодаря способности образовывать комплексы с ДНК, способствовать высвобождению эндосом за счет «эффекта протонной помпы» и направлять внутриклеточный перенос своего груза в ядро [140; 141]. Чтобы расширить возможности ПЭИ и МНЧ их объединили [142–146]. Наиболее распространенным применением этих конструкций была трансфекция клеток *in vitro* либо ДНК, либо м-РНК [142; 147]. В работе [135] было показано, что может быть стабилизирован ПЭИ на первом этапе, а на втором - поли (этиленоксид)-блокполи(глутаминовой кислотой). Стоит отметить, что модификация поверхности $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ прошла успешно, гидродинамический диаметр МНЧ увеличивался ступенчато от 25 нм до 46 нм. Было установлено, что покрытые МНЧ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ устойчивы в воде и физиологическом водном растворе.

Помимо вышеприведенных полимерных покрытий для МНЧ, могут быть использованы такие синтетических полимерные покрытия, как поливиниловый спирт, альгиновая кислота, полиметакриловая кислота, поливинилпирролидон, полицианакрилат, поли(ϵ -капролактон) и другие [135]. Их главным преимуществом является возможность направленно задавать химические свойства поверхности МНЧ.

1.4.2.2 Неорганические покрытия

Производные кремния, благодаря своей высокой стабильности в водных средах и совместимости с различными реакциями биоконъюгации для введения таргетных лигандов являются наиболее распространенным неорганическим покрытием. Оксиды кремния представляют аморфный

материал с высокой механической прочностью. SiO_2 имеет много преимуществ перед органическими покрытиями. Покрытия из диоксида кремния прочны, растворимы в воде, коллоидно стабильны и фотостабильны [148; 149]. Способ покрытия МНЧ SiO_2 достаточно прост. Выделяют два способа получения кремниевой оболочки: щелочной гидролиз тетраэтилортосиликата (ТЭОС), известный как синтез Штёбера [150], и золь-гель метод (протекающий как в водной фазе, так и в органической фазе олеиновой кислоты) [149; 151]. Аморфная структура диоксида кремния препятствует образованию однородного слоя на поверхности МНЧ. Контролировать толщину кремниевой оболочки можно, тщательно контролируя условия реакции и используя ТЭОС в качестве модифицирующего агента, и на выходе получать МНЧ размером от 10 нм до 1 мкм [152; 153]. Zhang совместно с соавторами изучали синтез МНЧ «ядро-оболочка» $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ методом обратной микроэмульсии [154]. Они обнаружили, что толщина кремниевой оболочки увеличивается с размером водной фазы, что позволяет избежать образования свободных частиц кремнезема. Кремниевые оболочки подходят для инкапсуляции МНЧ красителями или лекарствами. Salgueirino-Maceira с коллегами получили бифункциональный гибридный наноматериал, способный проявлять, как люминесцентные, так и магнитные свойства, инкапсулируя МНЧ Fe_3O_4 и квантовые точки CdTe в сферы из диоксида кремния [155]. Исследователи также сосредоточены на других способах применения кремнезема. Deng с коллегами синтезировали суперпарамагнитные микросферы $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ перпендикулярно ориентированной мезопористой оболочкой SiO_2 [156]. Полученные микросферы обладали очень высокой намагниченностью, большой площадью поверхности, большим объемом пор и однородными доступными мезопорами. Преимуществом покрытия МНЧ диоксидом кремния является наличие поверхностных силановых групп, которые могут легко реагировать для ковалентного присоединения специфических лигандов к поверхности МНЧ [157]. Например, аминные группы на поверхности МНЧ

магнетита могут быть введены путем гидролиза и конденсации кремнийорганических соединений, таких как аминопропилтриэтоксисилан или меркаптопропилсилан [158].

Для придания материалу бифункциональных свойств МНЧ покрывают благородными металлами. Основным из таких металлов является золото. В статье [159] описаны результаты исследования синтеза и сборки МНЧ ядро-оболочка $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ с высокой монодисперсностью. Простой, легкий и эффективный подход к синтезу бифункциональной гибридной наноструктуры $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ с использованием L-цистеин в качестве линкера был предложен Wang совместно с коллегами [160]. Поверхность МНЧ была модифицирована большим количеством НЧ Au размером менее 10 нм, а пик поглощения таких МНЧ можно удобно настроить в широком спектральном диапазоне, охватывающем от видимого до ближнего инфракрасного спектра (БИК), просто контролируя диаметр Fe_3O_4 . Золото также обладает хорошими фототермическими свойствами. Новый антибактериальный композит МНЧ из антибактериального золота для улучшения качества воды был успешно синтезирован для уничтожения устойчивых к антибиотикам патогенов [161]. Результаты свидетельствуют о том, что изготовленные МНЧ@Au являются высокоэффективным фототермическим агентом против широкого спектра бактерий. Важно отметить, что разработанный метод показал превосходные результаты для *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).

Серебро - еще один элемент среди благородных металлов используемый в качестве покрытия МНЧ. Серебряное покрытие обладает сильными бактерицидными свойствами [162]. Структура и свойства серебряных покрытий аналогичны золотым, способны образовывать МНЧ со структурой «ядро-оболочка». Chen с коллегами синтезировали гибридные МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Ag}$ диаметром 200 нм [163]. Благодаря оболочки из углерода и серебра на своей поверхности, полученный нанозонд сочетает в себе два режима визуализации МНЧ методом МРТ и методом

флуоресцентной микроскопии. Иногда исследователи используют золото и серебро в тандеме для покрытия МНЧ.

Некоторые редкоземельные элементы также можно использовать для модификации поверхности формируя структуры ядро-оболочка. Путем поэтапного синтеза была разработана наноструктура ядро-оболочка $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NaLuF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$ с многофункциональными свойствами [164]. Этот класс нанозондов, состоящий из ядра Fe_3O_4 и оболочки NaLuF_4 , сочетает в себе достоинства трех режимов визуализации: люминесценции с повышением частоты, магнитно-резонансной томографии и компьютерной томографии и подходит для различных приложений, требующих разного пространственного разрешения и глубины визуализации.

1.4.3 Конъюгация наночастиц оксида железа с высокоспецифичными биомолекулами

Для наделения МНЧ дополнительным функционалом используют множество различных подходов. Сочетание МНЧ с тканеспецифичными векторными молекулами (с моноклональными антителами, фрагментами антител, пептидами или другими биомолекулами) позволит распознать конкретные молекулярные маркеры на поверхности клеток, такие как, например, клеточно-специфичные рецепторы или транспортные белки. В последнее время особое внимание уделяют векторным контейнерным системам на основе антител к опухоль-ассоциированным белкам: Her-2 (второй рецептор эпидермального фактора роста) [165], EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) [166; 167], GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок), CX-43 (коннексин 43, интегральный мембранный белок) [168], VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) [111; 169], VEGFR2 (антитела, к рецептору фактора роста эндотелия сосудов второго типа) [170; 171]. Известно, что VEGF и VEGFR2 являются регуляторами проницаемости микрососудов [172–174], а также VEGFR2 гиперэкспрессирован рядом

опухолей [175–177]. Помимо этого, VEGFR2 имеет большое значение для неопластического ангиогенеза [178; 179], и может быть использован в качестве молекулярной мишени для направленного транспорта антиангиогенной терапии опухолей.

Сохранение биореактивности антител иммобилизованных на поверхность МНЧ имеет важное значение. Известно большое разнообразие стратегий для ковалентного связывания антител-мишеней или других молекул-мишеней на поверхности МНЧ [180]. Для большинства стратегий требуются амино- или карбоксильные группы, которые могут быть дополнительно модифицированы гетеробифункциональными агентами для связывания таргетных молекул. Существует три подхода ковалентного связывания МНЧ с биоактивными веществами. Первый включает химическую модификацию функциональной группы на поверхности МНЧ с последующим присоединением ее к функциональной группе указанного биоактивного вещества. Второй подход использует активацию функциональных групп МНЧ, а третий подход основан на химической модификации биоактивного вещества. Самой распространенной стратегией является второй подход. Чаще всего активацию карбоксильных групп проводят по карбодимидному методу. В роли активирующих агентов выступают молекулы EDC и NHS, образуя промежуточное нестабильное соединение, которое реагирует с аминогруппами молекул-мишеней с образованием амидных связей между поверхностью МНЧ и антителом. Этот метод приводит к хаотично ориентированным антителам на поверхности МНЧ и к небольшому снижению биоактивности конъюгированного антитела, однако, почти не влияет на специфичность связывания. Используя гетеробифункциональные агенты можно варьировать длину спейсера между поверхностью МНЧ и конъюгированными биомолекулами для регулировки гибкости молекул-мишеней [180].

Проведенный анализ литературы позволяет заключить, что электронная микроскопия представляет собой инструмент визуализации

ультраструктуры клетки с нанометровым разрешением порядка 1-3 нм. Визуализация биологических объектов в сверхвысоком разрешении поможет выяснить многие нерешенные проблемы и неизвестные аспекты взаимодействия биологических макромолекул в клетке с точностью до нанометров. Например, определить конкретные белки, обеспечивающие контакт вирусных частиц с живыми клетками. С другой стороны, можно будет глубже понять механизмы взаимодействия и субмолекулярное устройство различных транскрипционных и трансляционных факторов, выявить антител-связывающие эпитопы в составе антигенов. Детекция специфических белков и структур в электронно - микроскопических изображениях остается нерешенной проблемой. На сегодняшний день единственным способом для визуализации биомолекул является мечение антител наночастицами золота («immunogold»). Однако данным методом очень трудно проводить одновременную визуализацию нескольких молекулярных мишеней в клетке. Поэтому исходя из вышеизложенного, в настоящей диссертационной работе решено разработать новый метод детекции различных клеточных структур, где впервые будут использованы МНЧ сложных оксидов железа в качестве метки (регистрируемой с помощью ПЭМ в тандеме с энергодисперсионным анализом) и высокоспецифичные антитела к клеточному антигену. Этот метод не имеет аналогов в мире и существенно расширит возможности электронной микроскопии в рамках исследования внутриклеточных структур.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБРАЗЦЫ

2.1 Материалы для исследований

2.1.1. Химические реактивы, прекурсоры и вспомогательные материалы

Ацетилацетонат железа (III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$, $\geq 99,9\%$), ацетилацетонат марганца (II) ($\text{Mn}(\text{acac})_2$, $\geq 99,9\%$), ацетилацетонат кобальта (II) ($\text{Co}(\text{acac})_2$, $\geq 99,9\%$), ацетилацетонат цинка (II) ($\text{Zn}(\text{acac})_2$, $\geq 99,9\%$), олеиновая кислота (ОА, 90%), дибензиловый эфир ($\geq 98\%$), бензиловый спирт ($\geq 99,9\%$), ацетон ($\geq 97\%$), толуол ($\geq 97\%$), гидроксид натрия (NaOH , $\geq 98\%$), соляная кислота (HCl , 37%), азотная кислота (HNO_3 , 65%), этанол (95%), метанол (98%), ацетат аммония (99%), гидрат натриевой соли 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-*p,p'*-дисульфоновой кислоты (феррозин, 97%), L-аскорбиновая кислота ($\geq 99\%$), 3,4-дигидроксибензилуксусная кислота (ДФУК, 98%), (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC, 98%), N-гидроксисукцинимид (NHS, 98%), поли(этилен гликоль) 2-аминоэтиловый эфир уксусной кислоты ($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$, $M_w \sim 1100 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$), хлорид натрия (99,0%), хлорид калия (99,0%), гидрокарбонат натрия (99,7%), дигидрофосфат калия (99,0%), гидрофосфат натрия (99,0%), 4',6-диамидин-2-фенилиндол (DAPI, 98%), 4,4'-бис(1-гидрокси-8-амино-3,6-дисульфонафталиназо)-3,3'-диметилбифенила («трипановый синий»), периодат натрия (NaIO_4), Formvar®, метилен хлористый были приобретены у фирмы Sigma-Aldrich (США). Диметилсульфоксид (ДМСО, 99,9%) был приобретен у фирмы ХИММЕД (Россия). Tween-20 приобретен у фирмы Helicon (Россия). Triton X-100 приобретен у фирмы ApplyChem (Германия). Параформальдегид приобретен у фирмы Panreac (Spain). Клетки рака предстательной железы человека PC3 были приобретены в ATCC Manassas, VA (США). Культуральные флаконы T25 и серологические пипетки объемом 5 мл, 10 мл, 25 мл были приобретены у фирмы Corning (США). Антитела

мышинные к белку α -тубулину (T0033) приобретены в Affinity Biosciences (Китай). Антитела кроличьи к белку β -катенину (ab 223075), антитела мышинные к митохондриям (ab92824) и антитела мышинные к ядру (ab 191181), неимунная сыворотка козы приобретены в Abcam (Великобритания). Вторичные флуоресцентномеченые антитела Alexa488 goat antimouse и вторичные флуоресцентномеченые антитела Alexa488 goat antirabbit, ростовая среда RPMI-1640, сыворотка новорожденных телят (FBS), трипсин-ЭДТА были приобретены у LifeTechnologies (США). Антитела козы к иммуноглобулинам мыши приобретены в ИМТЕК (Россия). Набор для колориметрического определения белка методом Брэдфорда был приобретен у Fine Test (Южная Корея). Пенициллин, стрептомицин были приобретены у Gibco (США). L-глутамин приобретен у фирмы Invitrogen (США). Йодная кислота (H_5IO_6), трис(гидрохисметил)аминометан (TRIS) были приобретены в Central Drug House (P) (Индия). Тетраоксид осмия (4% OsO_4) приобретен у Acros Organics (Бельгия). Катализатор Benzoyl Peroxide (Stabilized), LR-White Resin, Lead Citrate, UranylLess EM Stain приобретены в Electron Microscopy Science (США). Все приобретенные реагенты использовались без какой-либо дополнительной очистки. Деионизированная вода была получена с помощью системы очистки Millipore Milli-Q Academic System.

Для концентрирования образцов использовались целлюлозные центрифужные фильтры Amicon® (США) с диаметром пор 30 кДа и фильтры Sartorius (Германия) 300 кДа, шприцевые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и 0,22 мкм приобретены у фирмы Millipore (США). Для удаления низкомолекулярных продуктов использовались мини-колонки PD-10 и NAP-10 с носителем Sephadex G-25 фирмы GE HealthCare (США).

2.1.2. Культивирование клеточной линии для *in vitro* экспериментов

In vitro исследования проводили на клетках рака предстательной железы человека РС3. Клетки рака предстательной железы человека РС3

культивировали в флаконах T25 при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Среду RPMI-1640 готовили с добавлением 1 mM пирувата натрия, 2 mM L-глутамина, 1% раствора смеси пенициллина 100 ед/мл, стрептомицина 100 мкг/мл и амфотерицина 0,25 мкг/мл) и 10% сыворотки новорожденных телят. Культивирование продолжали до образования монослоя, после проводили ферментативную диссоциацию 0,05% трипсин - ЭДТА и последующий пассаж. Количество клеток подсчитывали на автоматическом счетчике, жизнеспособность определяли с помощью красителя динатриевой соли 4,4'-бис(1-гидрокси-8-амино-3,6-дисульфонафталиназо)-3,3'-диметилбифенила («трипановый синий»).

2.2 Получение образцов и их исследование

2.2.1. Синтез образцов МНЧ Fe₃O₄ и МНЧ MFe₂O₄ (M = Mn, Co, Zn) в ДБЭ с добавлением ОК

В трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл, снабженную магнитной мешалкой, термопарой в токе аргона при перемешивании вносили Fe(acac)₃ (2ммоль) или (1,33 ммоль) и M(acac)₂ (0,67 ммоль), олеиновую кислоту (32 ммоль) и дибензиловый эфир (40 мл). Полученный, темно-красный раствор, дегазировали при 110°C в течение 30 мин. в токе аргона. Температуру смеси повышали до 290 °C со скоростью 4 °C/мин и затем выдерживали при 290 °C в течение 4 ч. После чего, колбу охлаждали до комнатной температуры в атмосфере аргона. Синтезированные МНЧ отделяли от реакционной среды центрифугированием (6000 об/мин, 20 мин) и добавлением в качестве осадителя этанола (4 x 25 мл). Выделенные МНЧ редуцировали в толуоле (в объеме, необходимом для получения нужной концентрации), образуя стабильную при комнатной температуре коричневую дисперсию.

2.2.2. Синтез образцов МНЧ Fe₃O₄ и МНЧ MFe₂O₄ (M = Mn, Co, Zn) в БС

В трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл, снабженную магнитной мешалкой и термопарой в токе аргона при перемешивании вносили Fe(асас)₃ (13 ммоль) или (8,7 ммоль, 11,1 ммоль, 11,8 ммоль) и M(асас)₂ (4,3 ммоль, 1,9 ммоль, 1,2 ммоль) ресуспендировали в бензиловом спирте (100 мл). Смесь нагревали до 50 °С со скоростью 0,5 °С/мин в течение 50 мин в токе аргона при перемешивании (300 об/мин). После этого систему нагревали со скоростью 25 °С/ч до температуры кипения бензилового спирта в атмосфере аргона в течение 24 ч. Реакционную массу охлаждали до комнатной температуры и промывали в ацетоне. Остатки ацетона упаривали на роторном испарителе.

20 мг сухого порошка МНЧ перерастворяли в 50 мкл олеиновой кислоты и 5 мл толуола и оставляли на ультразвуковой ванне на 15 мин при 50°С. Полученный стабильный коллоидный раствор МНЧ охлаждали до комнатной температуры и хранили в холодильнике при 4 °С.

2.2.3. Модификация поверхности МНЧ 3,4-дигидроксифенилуксусной кислотой (МНЧ@ДФУК)

24 мг гидроксида натрия (NaOH) растворяли в 10 мл безводного метанола (CH₃OH) с последующим добавлением 51 мг 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДФУК) и 10 мл M-ферритов в толуоле с концентрацией [Fe]=1 мг/мл. Полученную смесь инкубировали в течение 5 ч на водяной бане при 50 °С и непрерывном перемешивании на магнитной мешалке (530 об/мин).

По окончании реакции МНЧ@ДФУК отделяли от раствора центрифугированием (6000 об/мин, 20 мин), надосадочную жидкость сливали, а осадок (МНЧ@ДФУК) сушили в токе аргона от остатков толуола и метанола. Затем функционализированные МНЧ@ДФУК ресуспендировали

в 10 мл дистиллированной воды, раствор промывали на центрифужных фильтрах Millipore® Amicon Ultra-4, MWCO 30 кДа, концентрировали до 1 мл и дополнительно последовательно пропускали через шприцевые фильтры Millipore с размером пор 0,45 мкм и 0,22 мкм соответственно для удаления любых возможных агрегатов МНЧ@ДФУК.

2.2.4. Функционализация поверхности МНЧ@ДФУК аминокарбокси производным ПЭГ (МНЧ@ДФУК@ПЭГ)

1 мл водного раствора МНЧ@ДФУК с концентрацией железа $[Fe]=1$ мг/мл смешивали с 8,27 мкл водного раствора NHS (10 мг/мл) и 13,78 мкл водного раствора EDC (10 мг/мл). Реакционную смесь инкубировали при перемешивании в течение 15 мин при комнатной температуре, затем МНЧ@ДФУК с активированными карбоксильными группами пропускали через миниколонку PD-10 с сефадексом G-25 для удаления свободных молекул EDC и NHS. После чего, добавляли 100 мкл раствора полиэтиленгликоля 2-аминоэтилового эфира уксусной кислоты (ПЭГ, $M_n \sim 1100$ г/моль) в деионизированной воде (100 мг/мл) и инкубировали полученную смесь в течение 12 ч при комнатной температуре. Функционализированные МНЧ-ДФУК-ПЭГ отделяли от избытка ПЭГ гель-фильтрацией на миниколонке PD-10 с сефадексом G-25 (элюент – PBS) с последующей фильтрацией на шприцевых фильтрах Millipore 0,45 мкм и 0,22 мкм соответственно.

2.2.5. Функционализация МНЧ@ДФУК@ПЭГ вторичными флуоресцентномеченными антителами Alexa488 (МНЧ@ДФУК@ПЭГ@AT_{II}Alexa 488)

1 мл МНЧ@ДФУК@ПЭГ с концентрацией железа $[Fe]=1$ мг/мл в буфере PBS инкубировали с 12 мкл раствора NHS в PBS (10 мг/мл) и 21 мкл раствора EDC в PBS (10 мг/мл). Полученную смесь перемешивали в течение

15 мин на шейкере при комнатной температуре, после чего добавляли раствор 3 мкл (2мг/мл) вторичных антител козы/кролика к иммуноглобулинам мыши флуоресцентномеченные Alexa488 (AT_{II}Alexa 488) и инкубировали ночь при +4 °С. Модифицированные МНЧ (МНЧ@ДФУК@ПЭГ@AT_{II}Alexa 488) очищали от несвязавшихся антител на центрифужных фильтрах Sartorius (Германия) 300 кДа.

2.2.6. Функционализация МНЧ@ДФУК@ПЭГ вторичными антителами (МНЧ@ДФУК@ПЭГ@AT_{II})

1 мл МНЧ@ДФУК@ПЭГ с концентрацией железа [Fe]=1мг/мл в буфере PBS инкубировали с 24 мкл раствора NHS в PBS (10 мг/мл) и 42 мкл раствора EDC в PBS (10 мг/мл). Полученную смесь перемешивали в течение 15 мин на шейкере при комнатной температуре, после чего добавляли раствор 80 мкл (1мг/мл) вторичных антител козы/кролика к иммуноглобулинам мыши (AT_{II}) и инкубировали ночь при +4 °С. Модифицированные МНЧ (МНЧ@ДФУК@ПЭГ@AT_{II}) очищали от несвязавшихся антител на центрифужных фильтрах Sartorius (Германия) 300 кДа.

2.3. Методы исследований

2.3.1. Определение элементного состава МНЧ

Элементный анализ проводили на установке 4200 MP-AES (Agilent Technologies; США). Образцы растворяли в концентрированной соляной или азотной кислоте и разводили дистиллированной водой так, чтобы концентрации соответствующих элементов лежали в диапазоне 0-100 ppm. После включения прибора плазма стабилизировалась в течение 15 минут. Значения интенсивностей во всех измерениях усреднялись в 3 повторах по 3 секунды. Перед измерением образцов, методом наименьших квадратов

строилась линейная калибровка прибора по 4 стандартам с концентрацией исследуемого элемента (0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm) и дистиллированной воде в качестве нулевой точки. Значения концентраций соответствующих элементов в образцах вычислялись с использованием коэффициентов данной калибровки.

2.3.2 Определение концентрации железа в МНЧ

Концентрацию железа в образце определяли фотометрическим колориметрическим тестом (FerroZine). Для этого 2 мкл раствора МНЧ растворяли в 8 мкл концентрированной соляной кислоты. Образовавшийся раствор разбавляли в 500 раз дистиллированной водой. Спектрофотометрические измерения интенсивности проводили на планшетном спектрофотометре Thermo Scientific Multiskan GO spectrometer поглощения света проводили при длине волны 560 нм. Интенсивность образующейся окраски прямо пропорциональна концентрации железа в пробе.

2.3.3. Анализ образцов МНЧ методами аналитической ПЭМ

Микрофотографии образцов МНЧ были получены методом просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе JEOL JEM-1400 120 кВ. На перфорированную медную сетку (300 ячеек), покрытую Formvar® наносили каплю свежеприготовленного образца МНЧ. Ждали полного высыхания. Распределение МНЧ по размерам оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ. Для каждого образца анализировали не менее 1000 МНЧ.

Изображения темнопольной сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (HAADF-STEM) и спектры характеристического рентгеновского излучения в сканирующем режиме (EDX-STEM) были получены при помощи просвечивающего электронного микроскопа Titan Themis Z, оснащенного корректором сферических аберраций DCOR+ и

системой из 4-х широкоугольных рентгеновских детекторов Super-X. Ускоряющее напряжение источника составляло 200 кВ.

Микрофотографии ультратонких срезов клеток рака предстательной железы РС3 в светлом поле были получены методом просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе JEOL JEM-1400 120 кВ. На никелевые бленды с овальным отверстием (1x2 мм), покрытые Formvar® наносили ультратонкие срезы (70 нм) клеток РС3. Ждали полного высыхания.

Подложку из Formvar® получали из 1 % раствора Formvar® разбавленного в 3 раза дихлорметаном. 10 мкл полученного раствора капали в дистиллированную воду под углом 60° на расстоянии 2 мм от поверхности воды. После полного высыхания помещали на ровную поверхность пленки несколько бленд. При помощи парафильма собирали покрытые бленды с поверхности воды.

2.3.4. Исследование гидродинамического размера МНЧ

Гидродинамический размер МНЧ определяли методом динамического светорассеяния на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS при 25°C. Готовили раствор МНЧ с концентрацией 0,2 мг/мл в растворителе, в котором проводили реакцию.

2.3.5. Рентгенофазовый анализ

Рентгено-фазовый анализ изучали на рентгеновском дифрактометре ДРОН-4 (ЛНПО «Буревестник», Россия) с Co K α -излучением ($\lambda = 0,179$ нм), ток трубки 19 мА, напряжение 40 кВ, трубка работала в стандартном режиме. Съемка проводилась при углах дифракции 2Θ от 10 до 120° со скоростью сканирования 0,1° и временем экспозиции в точке съемки 1 с. Качественный фазовый анализ проводили путем сравнения спектров с использованием программного обеспечения PDXL: INTEGRATED SOFTWARE for POWDER DIFFRACTION.

2.3.6. Магнитные измерения

Измерения статических магнитных свойств (от -1500 до 1500 кА/м, 300 К) проводили на приборе Quantum Design PPPMS-9 (Quantum Design, США) с амплитудой колебаний 2 мм, частотой 40 Гц.

2.3.7. Мёссбауэровская спектроскопия

Мёссбауэровские спектры ^{57}Fe регистрировали при комнатной температуре на электродинамическом спектрометре CMS-1104Em, работающем в режиме постоянного ускорения. В качестве источника резонансного γ -излучения использовали ^{57}Co в родиевой матрице. Спектры обрабатывали в приближении линий Лоренца с помощью программы SPECTR из пакета MStools. Изомерные сдвиги (δ) определяли относительно центроида спектра α -Fe.

2.3.8. ИК- спектроскопия

ИК-спектры образцов МНЧ регистрировали на приборе Nicolet 380 (Thermo scientific, США) по методу прессования таблеток с KBr в дипапозоне от 4000 до 400 см^{-1} . Твердый образец МНЧ измельчали с сухим KBr, затем смесь подвергали гидравлическому прессованию. На выходе получали прозрачную таблетку и измеряли спектр гранулы.

2.3.9 Определение количества АТ в образце

Количество АТ в образце определяли фотометрическим колориметрическим тестом Брэдфорда. Для этого 300 мкл теста Брэдфорда смешивали с 10 мкл образца с концентрацией $[\text{Fe}]=50$ мкг/мл. Инкубировали смесь в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Спектрофотометрические измерения интенсивности проводили на планшетном спектрофотометре Thermo Scientific Multiskan GO spectrometer

поглощения света проводили при длине волны 595 нм. Интенсивность образующейся окраски прямо пропорциональна концентрации АТ в пробе.

2.4 *In vitro* исследование образцов МНЧ

2.4.1. Непрямой иммунофлуоресцентный анализ

МНЧ@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II}-Alexa488

Клетки целевой культуры рака предстательной железы человека РС3 выращивали на высокоадгезивном полистироле или покровных стеклах в концентрации $5 \cdot 10^3$ клеток на лунку в 200 мкл ростовой среды RPMI 1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой. Клетки культивировали в течение 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, до достижения 70% конфлюентности монослоя, после чего ростовую среду удаляли. Добавляли стерильный раствор 4%-ного параформальдегида (200 мкл. на лунку), выдерживали 15 минут при температуре 4°C. Для предотвращения неспецифического взаимодействия антител с антигенами фазу забивали 2% раствором сыворотки крови козы, выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч после чего трижды промывали буфером PBST. Затем вносили первичные антитела α -тубулина в разведении 1:200, антитела к митохондриям в разведении 1:800, антитела к ядру 1:300, антитела к β -катенину в разведении 1:1000 и инкубировали с фиксированной культурой РС3 в течение 1 ч при 37°C. Затем промывали 3 раза PBST. Добавляли конъюгат МНЧ@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II}-Alexa488 и в качестве контроля АТ_{II}-Alexa488 инкубировали в течение часа при 37°C. После этого клетки отмывали 3 раза PBST от несвязавшихся вторичных антител и инкубировали с красителем DAPI (0,001 мг/мл) в течение 5 мин. На следующем этапе клетки отмывали от красителя 1 раз PBST. Анализ проводили на конфокальном микроскопе Ti2 Eclipse фирмы Nikon (Япония).

2.4.2. Протокол подготовки клеток РСЗ для исследования методом ЭМ

Клетки целевой культуры рака предстательной железы человека РСЗ выращивали на высокоадгезивном полистироле или покровных стеклах в концентрации $5 \cdot 10^3$ клеток на лунку в 200 мкл ростовой среды RPMI 1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой. Клетки культивировали в течение 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, до достижения 100% конfluenceности монослоя, после чего ростовую среду удаляли. Клетки фиксировали в течение 1 ч с использованием 2% параформальдегида и 0,05% глутаральдегида в PBS (200 мкл. на лунку). После чего трижды промывали буфером PBS, и трижды буфером DPBS с ионами кальция и магния и проводили обработку 1% OsO₄ в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. Затем клетки РСЗ обезвоживали в спиртах (50% 2x5 мин, 70% 2x5 мин, 95% 2x5 мин) и последовательно заливали в акриловую смолу LR White в три этапа (LR White I, 1ч при 4°C; LR White II, 1ч при 4°C; LR White III, 24ч при 58°C). На следующем этапе получали ультратонкие срезы 70 нм клеточных образцов РСЗ на ультратоме Leica EM UC6, которые помещали на никелевые бленды, покрытые формварной пленкой. Все последующие этапы проводили во влажной камере на каплях. Для проведения иммуноокрашивания клеточные срезы травяли 3 мин 2% йодной кислотой, после чего промывали H₂O 5x2 мин и проводили повторное травление 3 мин насыщенным раствором NaIO₄ (50 °C, 250 мг/мл). Затем срезы экспонировали в 5% раствором сыворотки крови козы на TRIS буфере pH=7,0-7,2, выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем инкубировали в 0,1 М TRIS буфере pH=7,0 с 1% раствором сыворотки крови козы в течение 24 ч при 4°C сначала с первичными антителами к белку α-тубулину (в разведении 1:200), к митохондриям (в разведении 1:800), к ядру (в разведении 1:300), к β-катенину (в разведении 1:1000). Затем промывали 5x4 мин в 0,1 М TRIS буфере pH=7,0 и 2x5 мин в 0,1 М TRIS буфере pH=8,2. Добавляли вторичные (1:50) антикроличьи/мышинные

антитела, конъюгированные с наночастицами сложных оксидов железа на 0,1 М Tris буфере pH=8,2. После этого клетки отмывали в 0,1 М TRIS буфере pH=7,0 5x4 мин и в H₂O 3x4 мин от несвязавшихся вторичных антител. Контрастировали клеточные срезы UranylLess EM Stain 15 мин при 37°C и Lead Citrate 5 мин при 37 °C с добавлением гранул гидроксида натрия.

Для каждой группы образцов было проведено как минимум две биологические повторности экспериментов, для каждой из которых проводили отдельный цикл фиксации, заключения в заливочную смолу, получения ультратонких срезов 70 нм и проведение иммуноцитохимической реакции.

2.4.3. Приготовление ультратонких срезов клеток РСЗ

Кусочки клеткок РСЗ, заключенные в смолу, затачивали острой бритвой, придавая форму усеченной пирамиды с оптимальным углом наклона 35-45°. Срезы толщиной около 70-100 нм получали на ультратоме Leica EM UC6. Срезы монтировали на никелевые бленды для электронной микроскопии с ультратонкой подложкой из Formvar®.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка методики синтеза МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4 ($\text{M}=\text{Mn}, \text{Co}, \text{Zn}$) исследование их структуры и физико-химических свойств

3.1.1 Синтез, структура и исследование физико-химических свойств МНЧ Fe_3O_4

Наночастицы магнетита Fe_3O_4 были получены методом термического разложения коммерчески доступного ацетилацетоната железа (III) $\text{Fe}(\text{acac})_3$ в бензиловом спирте (БС) (205°C) и дибензиловом эфире (ДБЭ) (293°C) с добавлением олеиновой кислоты (ОК) (Рисунок 13).

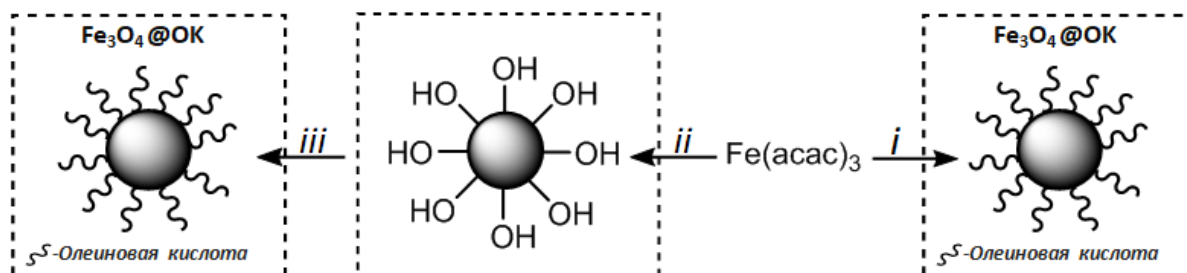


Рисунок 13 – Схематическое изображение методики синтеза МНЧ Fe_3O_4 в БС и ДБЭ с добавлением ОК. Реагенты и условия: (i) ДБЭ, ОК, Ar, 296°C , (ii) БС, Ar, 205°C , (iii) ОК, толуол

Из анализа синтезированных образцов методом ПЭМ было установлено, что все МНЧ Fe_3O_4 полученные в БС и ДБЭ с добавлением ОК обладали монодисперсным распределением по размерам и имели правильную сферическую или полигональную форму со средним размером 7 ± 1 нм и 10 ± 2 нм соответственно. ЭДРС карты МНЧ Fe_3O_4 из БС иллюстрируют гомогенное распределение кислорода и железа в МНЧ, а

изображение электронной дифракции (ЭД) содержит кольцевые рефлексы, которые можно проиндцировать в F -центрированной кубической ячейке с параметром $a \sim 8,4 \text{ \AA}$, что хорошо согласуется с ожидаемой для Fe_3O_4 обращенной структурой шпинели (Рисунок 14).

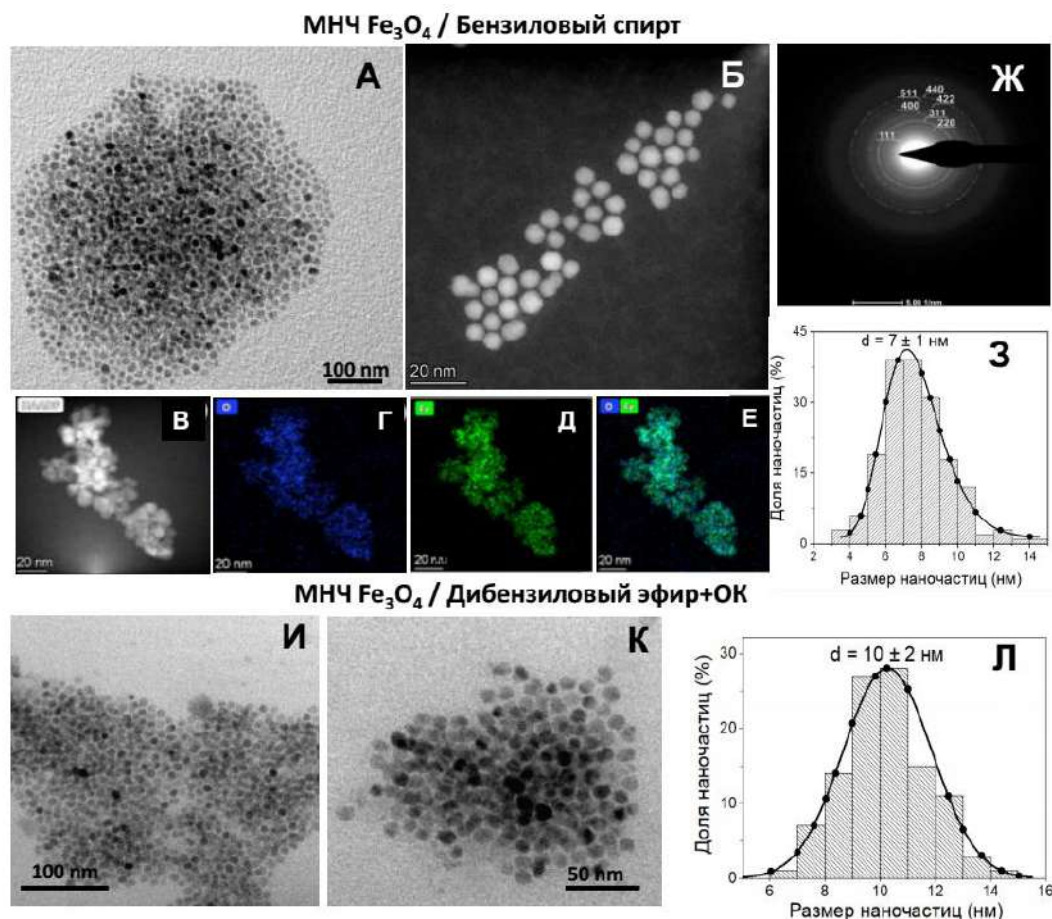


Рисунок 14 – ПЭМ-микрофотографии МНЧ Fe_3O_4 синтезированные в БС и ДБЭ с добавлением ОК и соответствующие им гистограммы распределения

МНЧ Fe_3O_4 по размерам.

А – Обзорная ПЭМ микрофотография МНЧ Fe_3O_4 , Б – Обзорная СПЭМ - микрофотография МНЧ Fe_3O_4 , В – СПЭМ изображение области картирования МНЧ Fe_3O_4 , Г – индивидуальная ЭДРС карта О, Д – индивидуальная ЭДРС карта Fe, Е – смешанная ЭДРС карта О/Fe, Ж – изображение ЭД МНЧ Fe_3O_4 , З – гистограмма распределения МНЧ Fe_3O_4 по размерам, И,К – ПЭМ микрофотографии МНЧ Fe_3O_4 , Л – гистограмма распределения МНЧ Fe_3O_4 по размерам

На рентгенограммах порошков МНЧ Fe_3O_4 , зарегистрированных методом РФА при комнатной температуре положение и относительная интенсивность всех дифракционных максимумов указывала на образование чистой фазы магнетита Fe_3O_4 (для образца из БС $a = 8,385 \text{ \AA}$, ICDD № 9009768 и $a = 8,362 \text{ \AA}$, ICDD № 01-079-0418 для образца из ДБЭ с добавлением ОК). Рассчитанные значения параметра решетки фаз для образцов МНЧ Fe_3O_4 находились в промежутке между значениями для магнетита Fe_3O_4 ($a = 8.396 \text{ \AA}$, JCPDS 19-0629) и для маггемита $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($a = 8.3461 \text{ \AA}$, JPCDS 39-1346). Рисунок 15А демонстрирует, что рефлексы на рентгенограмме образца МНЧ Fe_3O_4 из БС оказались более уширенными, в сравнении с образцом МНЧ Fe_3O_4 полученным из ДБЭ с добавлением ОК, что может быть объяснено малым размером исследуемых МНЧ. Все образцы имели монокристаллическую природу, что подтверждается сопоставлением данных о размере МНЧ Fe_3O_4 , полученных методами ПЭМ и РФА (Таблица 2).

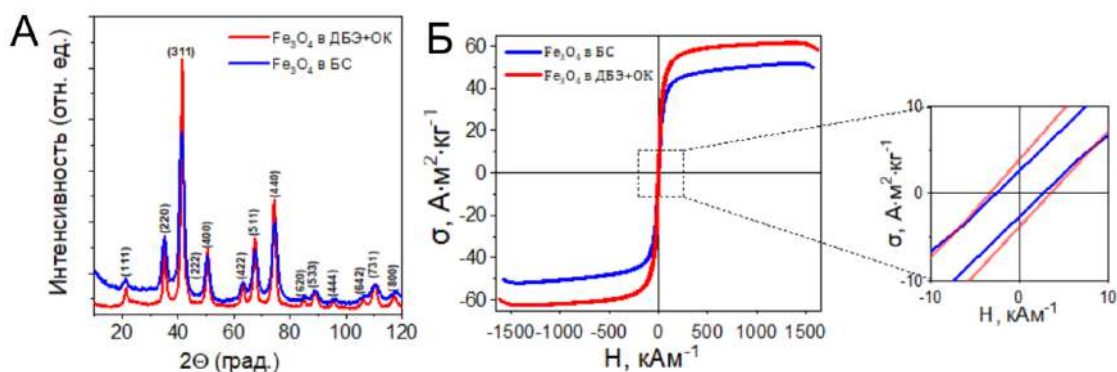


Рисунок 15 – Рентгенофазовый анализ и анализ магнитных свойств

А – Рентгенограммы порошков МНЧ Fe_3O_4 , Б – Кривые намагничивания МНЧ Fe_3O_4 при $T=300 \text{ K}$

Результаты магнитометрии (Рисунок 15Б), (Таблица 2) при комнатной температуре свидетельствуют о суперпарамагнитной природе образцов МНЧ Fe_3O_4 (с размерами менее 20 nm), что характерно, для МНЧ магнетита таких размеров и хорошо согласуется с литературными данными [181; 182].

Значения удельной намагниченности насыщения σ_s двух типов МНЧ Fe_3O_4 составили $53,5 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ и $61,6 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ (Таблица 2), и достаточно хорошо согласуются с некоторыми ранними экспериментальными работами по синтезу и исследованию магнитных свойств МНЧ Fe_3O_4 [183–186]. Полученные значения σ_s ниже, чем у объемного магнетита ($90 \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$) [185], что связано с малым размером синтезированных МНЧ. Зависимость остаточной намагниченности σ_r и значений коэрцитивной силы H_c от размера МНЧ коррелирует с результатами, описанными в литературе [187; 188].

Таблица 2 – Основные физические характеристики МНЧ Fe_3O_4

Образец	Размер кристаллита установленный из ОКР, нм	Размер ядра по ПЭМ, нм	Удельная намагниченность насыщения σ_s , $\text{А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$	Остаточная намагниченность насыщения σ_r , $\text{А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$	Коэрцитивная сила, H_c , $\text{кА}\cdot\text{м}^{-1}$
Fe_3O_4 из БС	5 ± 2	7 ± 1	53.5	3.7	1.5
Fe_3O_4 из ДБЭ+ОК	11 ± 2	10 ± 2	61.6	3.96	3.4

Из-за близости значений параметра решетки фазы магнетита Fe_3O_4 и магемита $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ практически невозможно сделать вывод о типе образовавшейся фазы. В этой связи образцы МНЧ Fe_3O_4 были изучены методом Мессбауэровской спектроскопии (Рисунок 16), (Рисунок 17).

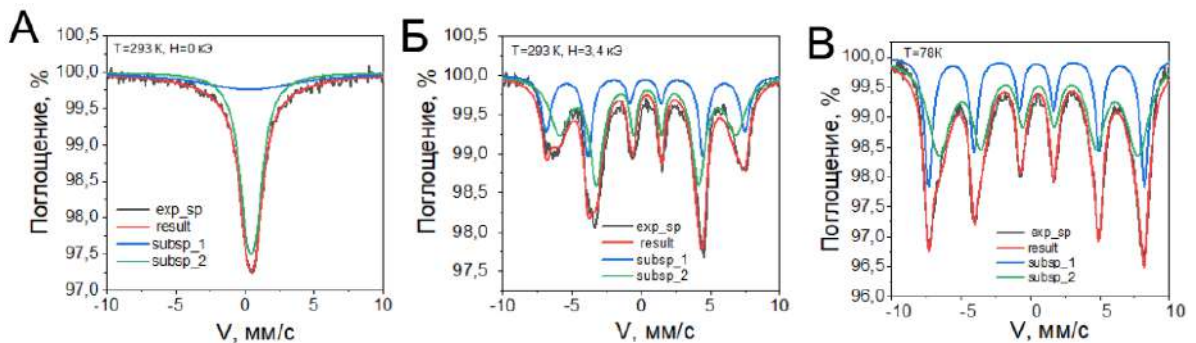


Рисунок 16 – ^{57}Fe мессбауэровские спектры МНЧ Fe_3O_4 из БС

А – ^{57}Fe мессбауэровский спектр при $T=293 \text{ К}$ и $H=0 \text{ кЭ}$, Б – ^{57}Fe мессбауэровский спектр при $T=293 \text{ К}$ и $H=3,4 \text{ кЭ}$, В – ^{57}Fe мессбауэровский спектр при $T=78 \text{ К}$

При комнатной температуре $T=293\text{K}$ в спектре образца МНЧ Fe_3O_4 из БС при напряженности поля $H=0$ наблюдается уширенный релаксационный синглет, состоящий из суперпозиции синглета А и дублета В с изомерными сдвигами $\delta_A=0.30(2)$ мм/с и $\delta_B=0.44(16)$ мм/с, и площадями $S_A=33\%$ и $S_B=67\%$ (1:2), что соответствует структуре магнетита (Рисунок 16А). Во внешнем поле $H=3,4$ кЭ (Рисунок 16Б) частота релаксации уменьшается и проявляется хорошо разрешенная для ядер ^{57}Fe сверхтонкая магнитная структура (секстет), также соответствующая структуре магнетита. Это же подтверждается спектром при температуре жидкого азота $T=78\text{K}$ (Рисунок 16В). Такая форма спектра говорит о том, что магнитные моменты МНЧ зафиксированы в локальных минимумах энергии, а релаксационные переходы между этими состояниями замедлены по сравнению со временем жизни ядра ^{57}Fe [189].

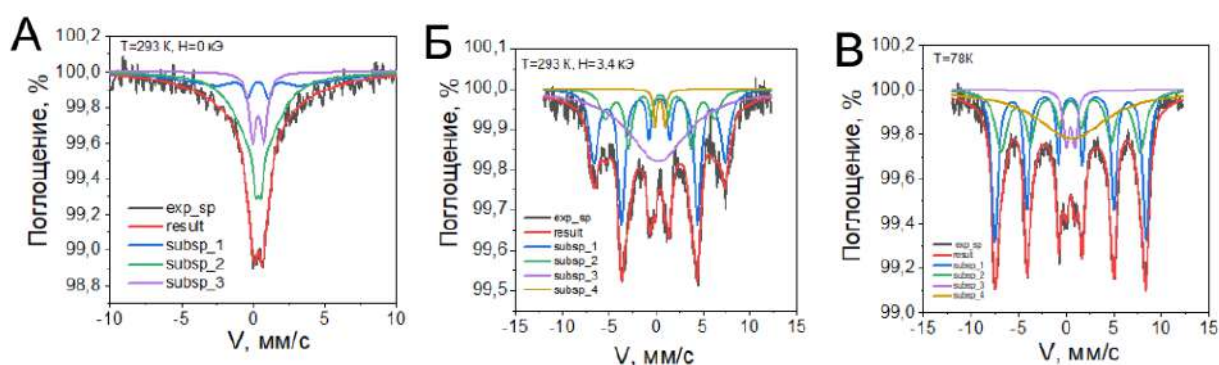


Рисунок 17 – ^{57}Fe мессбауэровские спектры МНЧ Fe_3O_4 из ДБЭ+ОК

А – ^{57}Fe мессбауэровский спектр при $T=293\text{K}$ и $H=0$ кЭ, Б – ^{57}Fe мессбауэровский спектр при $T=293\text{K}$ и $H=3,4$ кЭ, В – ^{57}Fe мессбауэровский спектр при $T=78\text{K}$

Мессбауэровские спектры порошков МНЧ Fe_3O_4 из ДБЭ с добавлением ОК были зарегистрированы при комнатной температуре $T=293\text{K}$ напряженности поля $H=0$ кЭ, $H=3,4$ кЭ и при температуре жидкого азота $T=78\text{K}$, которые продемонстрировали картину, характерную для типичного магнетита (Рисунок 17).

3.1.2 Синтез, элементный состав, структура и свойства МНЧ MFe_2O_4 ($M=Mn, Co, Zn$)

В научной литературе описано множество различных методов синтеза МНЧ MFe_2O_4 ($M = Mn, Co, Zn$) сложных оксидов железа [190–192]. Для получения МНЧ MFe_2O_4 был выбран одностадийный метод термического разложения (Рисунок 18). Все реакции разложения проводили либо в БС, либо в ДБЭ с добавлением ОК в качестве растворителя. Мольное соотношение металлосодержащих прекурсоров составляло $n_{Mn,Co,Zn(acac)_2}/n_{Fe(acac)_3} = 1/2$.

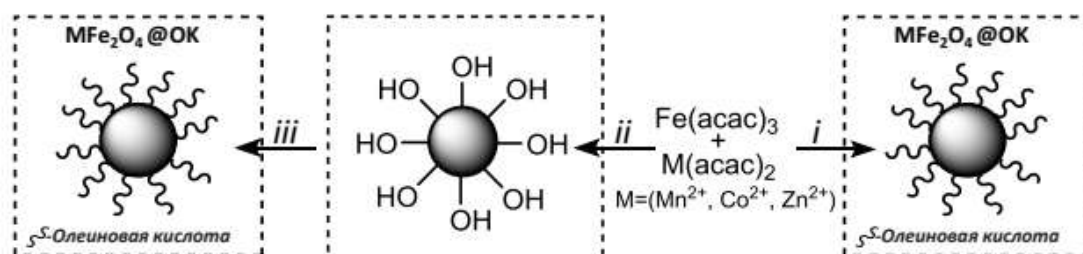


Рисунок 18 – Схематическое изображение методики синтеза МНЧ MFe_2O_4 в БС и ДБЭ с добавлением ОК. Реагенты и условия: (i) ДБЭ, ОК, Ar, 296°C, (ii) БС, Ar, 205 °C, (iii) ОК, толуол

Хорошо известно, что различные условия проведения реакций оказывают непосредственное влияние на морфологию получаемых МНЧ [193–195], однако данных по влиянию условий проведения реакции на стехиометрический состав существенно меньше и недостаточно для систематического анализа. Так, в ходе проведения эксперимента было установлено, что синтез МНЧ MFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК приводит к образованию ферритовых МНЧ, однако элементный состав непредсказуемо варьируется в диапазоне от 1:4 до 1:16, тогда как плановое элементное соотношение металлов в составе МНЧ MFe_2O_4 должно быть 1:2 (Таблица 3), (Рисунок 19).

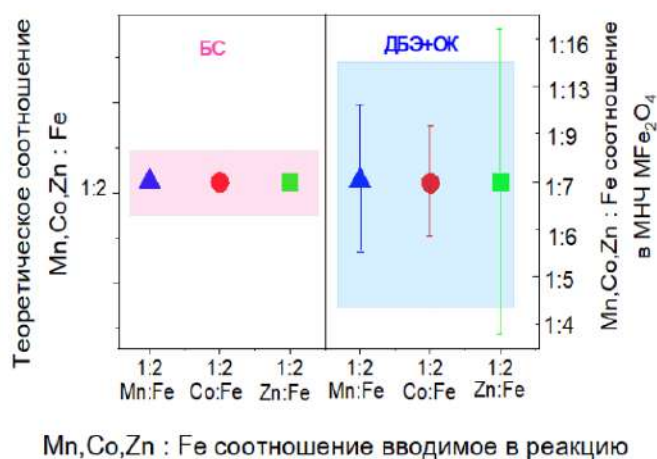


Рисунок 19 – Результаты МП-АЭС МНЧ MFe_2O_4 . Элементное соотношение $Mn,Co,Zn:Fe$ в МНЧ синтезированных в БС (слева) и элементное соотношение $Mn, Co, Zn:Fe$ в МНЧ, синтезированных в ДБЭ с добавлением ОК (справа).

Элементное соотношение металлов в МНЧ MFe_2O_4 , полученных в БС, хорошо коррелировало с соотношением вводимых в реакцию металлосодержащих прекурсоров ($M:Fe = 1:2$, $M:Fe=1:6$ и $M:Fe=1:10$), и что более важно, было показано, что элементное соотношение металлов в МНЧ MFe_2O_4 воспроизводится в трех независимых синтезах (Рисунок 19, Таблица 3). Методом МП-АЭС был определен элементный состав полученных ферритовых МНЧ, который был близок к стехиометрическому. Для объяснения полученных результатов, по влиянию растворителей на стехиометрический состав МНЧ MFe_2O_4 необходимо рассмотреть механизмы протекающих реакций формирования МНЧ MFe_2O_4 . Механизм реакции в БС включает в себя два последовательных процесса - сольволиз ацетилацетанатов за которым следует реакция альдольной конденсации [196]. В конечной реакционной смеси образуется гидроксильная группа, связанная с ионами металлов Fe^{3+} и M^{2+} , которые связываются с другим центром Fe^{3+} , представляя собой начальную точку образования МНЧ.

ДБЭ является хорошим растворителем ацетилацетанатов, однако он нестабилен при высоких температурах, образует летучие продукты, такие как бензойный альдегид или бензилбензоат, что представляет собой основную

причину невоспроизводимости синтеза, и, предположительно, влияет на элементный состав получаемых МНЧ MFe_2O_4 [197].

Таблица 3 – Результаты МП-АЭС МНЧ MFe_2O_4

Образец	Теоретическое соотношение $M^{2+} (Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}) / Fe^{3+}$	Концентрация $M^{2+} (Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+})$ измеренная на МП-АЭС, мг/л	Концентрация Fe^{3+} измеренная на МП - АЭС, мг/л	Соотношения концентраций $M^{2+} (Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}) / Fe^{3+}$ в МНЧ измеренных методом МП-АЭС
$MnFe_2O_4$ / БС				
Mn-1:2 (1)	1:2	28.60	56.47	1:2
Mn-1:2 (2)	1:2	12.39	24.23	1:2
Mn-1:2 (3)	1:2	34.15	67.84	1:2
Mn-1:6	1:6	50.20	303.21	1:6
Mn-1:10	1:10	5.53	54.58	1:10
$MnFe_2O_4$ / ДБЭ+ОК				
Mn-1:2	1:2	10.58	49.16	1:5
Mn-1:2	1:2	2.97	26.82	1:9
Mn-1:2	1:2	3.68	23.12	1:6
$CoFe_2O_4$ / БС				
Co-1:2 (1)	1:2	23.55	46.71	1:2
Co-1:2 (2)	1:2	40.53	79.50	1:2
Co-1:2 (3)	1:2	31.02	62.08	1:2
Co-1:6	1:6	42.05	248.15	1:6
Co-1:10	1:10	29.12	288.30	1:10
$CoFe_2O_4$ / ДБЭ+ОК				
Co-1:2 (1)	1:2	4.09	16.02	1:4
Co-1:2 (2)	1:2	2.15	15.05	1:7
Co-1:2 (3)	1:2	2.14	10.67	1:5
$ZnFe_2O_4$ / БС				
Zn-1:2 (1)	1:2	7.43	15.84	1:2
Zn-1:2 (2)	1:2	40.78	79.02	1:2
Zn-1:2 (3)	1:2	50.76	100.45	1:2
Zn-1:6	1:6	28.1	167.8	1:6
Zn-1:10	1:10	23.68	246.80	1:10
$ZnFe_2O_4$ / ДБЭ+ОК				
Zn-1:2	1:2	5.06	32.60	1:6
Zn-1:2	1:2	1.38	19.24	1:13
Zn-1:2	1:2	1.12	17.86	1:16

ОК в проводимой реакции одновременно является поверхностно-активным веществом (ПАВ) и сильным восстановителем. Совместное присутствие ОК и бензойного альдегида, обладающего восстановительными свойствами, в реакционной смеси приводит к частичному восстановлению Fe^{3+} до Fe^{2+} и нарушению стехиометрии МНЧ MFe_2O_4 . Основным окислителем в этой реакции, в инертной атмосфере Ar, являются ионы Fe^{3+} .

Наличие восстановителя приводит к появлению ионов Fe^{2+} , которые начинают конкурировать с ионами M^{2+} за позиции в растущей кристаллической решетке МНЧ MFe_2O_4 , тем самым уменьшая количество ионов M^{2+} , входящих в состав МНЧ MFe_2O_4 , что приводит к невоспроизводимой стехиометрии финального продукта. Данный факт подтверждается в работе [198], где авторы термическим разложением в БС в присутствии ОК, олеиламина или их комбинации получали МНЧ CoFe_2O_4 . При этом ни ОК, ни олеиламин по отдельности не показали изменение в элементном соотношении Co:Fe, в то время как одновременное присутствие в реакционной смеси ОК и олеиламина в высокой концентрации приводит к восстановлению Fe^{3+} до Fe^{2+} и замещению Co^{2+} . Yannez-Willar и др. в своей статье [199] сравнивали два растворителя такие, как БС и гексанол. Было показано, что реакция получения МНЧ феррита никеля в БС приводит к восстановлению Ni^{2+} до Ni^0 , объясняя этот эффект более сильными восстановительными свойствами БС по сравнению с гексанолом. Другим, возможным, объяснением невоспроизводимой стехиометрии в МНЧ MFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК является влияние более высокой температуры синтеза и более высокой скорости нагрева, что приводит к разным скоростям разложения Fe и M-ацетилацетонатов, и потере элементного соотношения в МНЧ MFe_2O_4 . Чтобы проверить предположение о влиянии скорости нагрева на элементный состав продуктов реакции нами была проведена реакция термического разложения ацетилацетонатов железа (III) и марганца (II) в ДБЭ с добавлением ОК с мольным соотношением вводимых в реакцию прекурсоров $n_{\text{Mn}(\text{acac})_2}/n_{\text{Fe}(\text{acac})_3} = 1/2$ со скоростью нагрева аналогичной

скорости нагрева прекурсоров в БС. В этом эксперименте элементное соотношение металлов в МНЧ синтезированного феррита марганца составило $\text{Mn:Fe} = 1:5$ и было отлично от стехиометрического (Таблица 4). Размер ядра МНЧ, установленный методом ПЭМ 5 ± 1 нм (Рисунок 20) оказался ниже, чем при использовании стандартных режимов нагрева синтеза МНЧ MnFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК.

Таблица 4 – Результаты МП-АЭС образца МНЧ MnFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК со скоростью нагрева аналогичной скорости нагрева прекурсоров в БС

Теоретическое соотношение $\text{Mn}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$	Концентрация Mn^{2+} измеренная на МП-АЭС, мг/л	Концентрация Fe^{3+} измеренная на МП АЭС, мг/л	Соотношение концентраций $\text{Mn}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ в МНЧ измеренных методом МП-АЭС
МНЧ MnFe_2O_4 / ДБЭ+ОК			
1:2	28.30	156.63	1:5

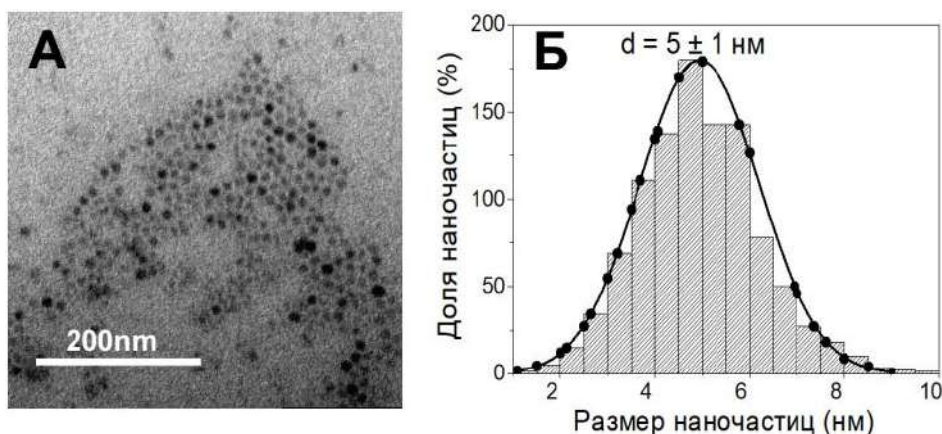


Рисунок 20 – ПЭМ-микрофотографии образца МНЧ MnFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК со скоростью со скоростью нагрева аналогичной скорости нагрева прекурсоров БС

А – Обзорная ПЭМ микрофотография МНЧ MnFe_2O_4 , Б – гистограмма распределения МНЧ MnFe_2O_4 по размерам

Для того, чтобы проверить влияние инертной атмосферы на элементный состав продуктов реакции были проведены реакции разложения прекурсоров ацетилацетонатов кобальта (II) и железа (III) ($n_{Co(acac)_2}/n_{Fe(acac)_3} = 1/2$) в ДБЭ с добавлением ОК на воздухе со скоростью нагрева реакционной смеси 4 °С/мин и доведении температуры нагрева до 293°С методом ПЭМ были обнаружены фракции МНЧ $CoFe_2O_4$ (I-фракция) и побочные продукты в виде полиморфных агломератов МНЧ $CoFe_2O_4$ с широким распределением по размерам (II-фракция) (Рисунок 21). Низкий выход реакции не позволил выделить заметное количество МНЧ для исследования их структуры и магнитных свойств. Методом ЭД установлено, что полученные МНЧ являются ферритами (Таблица 6, Рисунок 21Г, Рисунок 21З) с нарушенным стехиометрическим составом (Таблица 5).

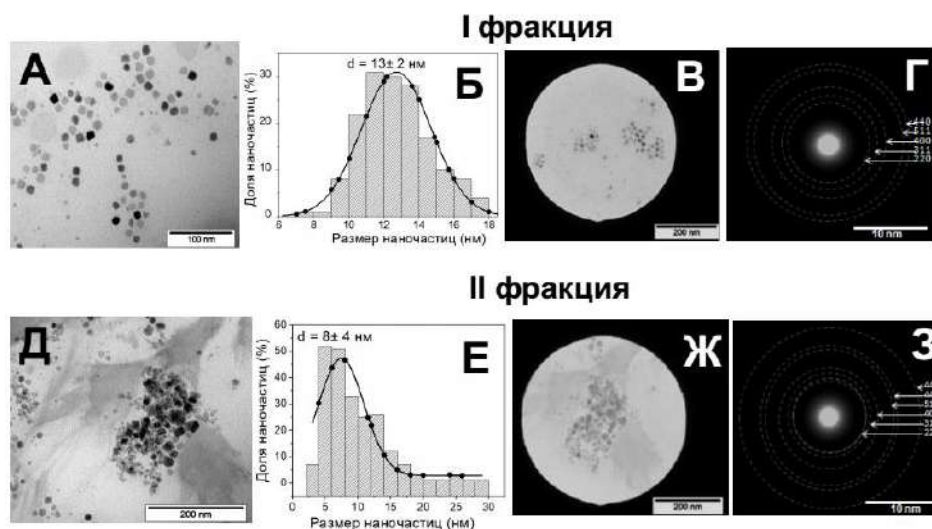


Рисунок 21 – ПЭМ-микрофотографии образца МНЧ $CoFe_2O_4$ в ДБЭ с добавлением ОК на воздухе.

А – Обзорная ПЭМ микрофотография МНЧ $CoFe_2O_4$ (I фракция),
 Б – гистограмма распределения МНЧ $CoFe_2O_4$ по размерам (I фракция),
 В,Г – изображение ЭД МНЧ $CoFe_2O_4$ (I фракция), Д – Обзорная ПЭМ микрофотография МНЧ $CoFe_2O_4$ (II фракция), Е – гистограмма распределения МНЧ $CoFe_2O_4$ по размерам (II фракция), Ж,З – изображение ЭД МНЧ $CoFe_2O_4$ (II фракция)

Таблица 5 – Результаты МП-АЭС образца МНЧ CoFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК на воздухе при 293°C

Теоретическое соотношение $\text{Co}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$	Концентрация Co^{2+} измеренная на МП-АЭС, мг/л	Концентрация Fe^{3+} измеренная на МП-АЭС, мг/л	Соотношение концентраций $\text{Co}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ в МНЧ измеренные методом МП-АЭС
МНЧ CoFe_2O_4/ ДБЭ+ОК			
1:2	14,15	78,31	1:5

Таблица 6 – Результаты ЭД выбранной области МНЧ CoFe_2O_4

№	$1/2g$ (нм ⁻¹)	$1/g$ (нм ⁻¹)	g (нм)	d -межплоскостное расстояние (Å)	(hkl)
I-фракция					
1	6.71	3.36	0.297	2.97	220
2	7.96	3.98	0.251	2.51	311
3	9.58	4.792	0.209	2.09	400
4	12.45	6.227	0.161	1.61	511
5	13.64	6.8175	0.147	1.47	440
II-фракция					
1	6.80	3.40	0.294	2.94	220
2	7.89	3.95	0.253	2.53	311
3	9.59	4.80	0.210	2.10	400
4	12.28	6.14	0.163	1.63	511
5	13.47	6.74	0.149	1.49	440
6	16.03	8.01	0.125	1.25	444

Чтобы проверить предположение о влиянии температуры синтеза на элементный состав продуктов реакции были проведены реакции разложения прекурсоров в ДБЭ вводимых в соотношении $n_{\text{Co}(\text{acac})_2} / n_{\text{Fe}(\text{acac})_3} = 1/2$ с добавлением ОК со скоростью нагрева $4^\circ\text{C}/\text{мин}$ при доведении температуры нагрева реакционной смеси до 225°C и до 250°C , что в конечном итоге привело к образованию следовых количеств МНЧ (Рисунок 22) нестехиометрического феррита кобальта (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты МП-АЭС образцов МНЧ CoFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК синтезированных при температуре 225°C и 250°C .

Образец	Теоретическое соотношение $\text{Co}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$	Концентрация Co^{2+} измеренная на МП-АЭС, мг/л	Концентрация Fe^{3+} измеренная на МП-АЭС, мг/л	Соотношения концентраций $\text{Co}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ в МНЧ измеренные методом МП-АЭС
МНЧ CoFe_2O_4 / ДБЭ+ОК				
225°C	1:2	12.38	49.33	1:4
250°C	1:2	10.69	85.55	1:8

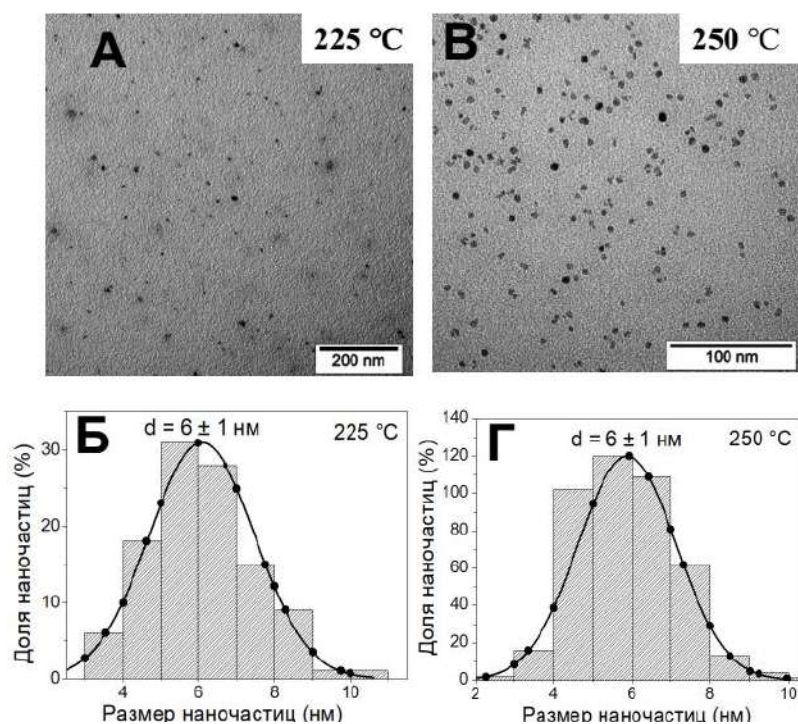


Рисунок 22 – ПЭМ-микрофотографии образцов МНЧ CoFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК и нагрева реакционной смеси до 225°C и до 250°C

А – Обзорная ПЭМ микрофотография МНЧ CoFe_2O_4 , полученных при нагреве реакционной смеси до 225°C , Б – гистограмма распределения МНЧ CoFe_2O_4 по размерам, полученных при нагреве реакционной смеси до 225°C , В – Обзорная ПЭМ микрофотография МНЧ CoFe_2O_4 , полученных при нагреве реакционной смеси до 250°C , Б – гистограмма распределения МНЧ CoFe_2O_4 по размерам, полученных при нагреве реакционной смеси до 250°C

Учитывая все вышесказанное очевидно, что единственным оставшимся параметром, который может влиять на итоговый элементный состав синтезируемых ферритов является химическая структура растворителя и ПАВ, и в частности их способность восстанавливать ионы Fe^{3+} до ионов Fe^{2+} конкурируя с ионами M^{2+} за позиции в кристаллической решетке, образующихся МНЧ. В итоге, экспериментальные доказательства подтверждают постулат о том, что ключевую роль в синтезе МНЧ MFe_2O_4 с контролируемым элементным составом играют восстановители, изначально присутствующие в реакционной смеси, такие как ОК, или бензойный альдегид, образующийся при реакции термического разложения в ДБЭ. Очевидно, что стоит учитывать их окислительно-восстановительные свойства, если необходимо соблюдать элементный состав МНЧ.

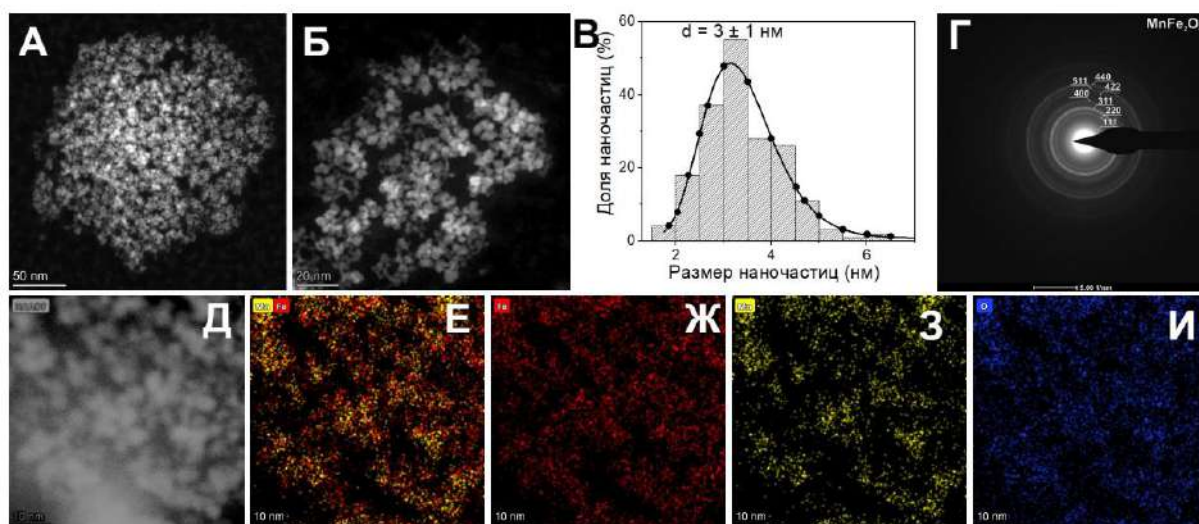


Рисунок 23 – СПЭМ – микрофотографии МНЧ MnFe_2O_4 из БС

А,Б – Обзорные СПЭМ - микрофотографии МНЧ MnFe_2O_4 , В – гистограмма распределения МНЧ MnFe_2O_4 по размерам, Г – изображение ЭД МНЧ MnFe_2O_4 , Д – СПЭМ изображение области картирования МНЧ MnFe_2O_4 , Е – смешанная ЭДРС карта Mn/Fe, Ж - индивидуальная ЭДРС карта Fe, З – индивидуальная ЭДРС карта Mn, И – индивидуальная ЭДРС карта O

Более подробная информация о морфологии и структуре МНЧ MFe_2O_4 , синтезированных в БС была получена методом ПЭМ. Из обзорных СПЭМ изображений можно наблюдать, что МНЧ MnFe_2O_4 агломерированы и имеют

наименьший размер среди всех изученных образцов 3 ± 1 нм (Рисунок 23) (Таблица 8). Изображение ЭД МНЧ MnFe_2O_4 согласуется с предполагаемой структурой шпинели с параметром $a \sim 8,5 \text{ \AA}$ (Рисунок 23Г). Согласно ЭДРС картам Mn и Fe распределены равномерно (Рисунок 23Е) среднее атомное соотношение, определенное по ЭДРС-спектру $\text{Mn:Fe} = 0,35:0,65$ (2) близко к номинальному.

Средний размер ядра МНЧ CoFe_2O_4 , установленный методом ПЭМ составляет 6 ± 2 нм (Рисунок 24В). ЭДРС спектр, получен с одной из групп МНЧ CoFe_2O_4 и содержит характеристические сигналы С, О, Fe, Co и Cu (Рисунок 24Д). Сигналы С, Cu и, частично, О возникают от поддерживающей сетки; остальные элементы входят в состав образца. Среднее мольное соотношение Co:Fe , рассчитанное по нескольким областям интереса, составляет $0.31:0.69(1) \sim 1:2$, что хорошо согласуется с мольным количеством вводимых в реакцию прекурсоров.

Изображение ЭД МНЧ CoFe_2O_4 очень похоже на изображение ЭД МНЧ MnFe_2O_4 , поскольку эти соединения обладают одинаковой кристаллической структурой и близкими параметрами элементарной ячейки (Рисунок 24Г).

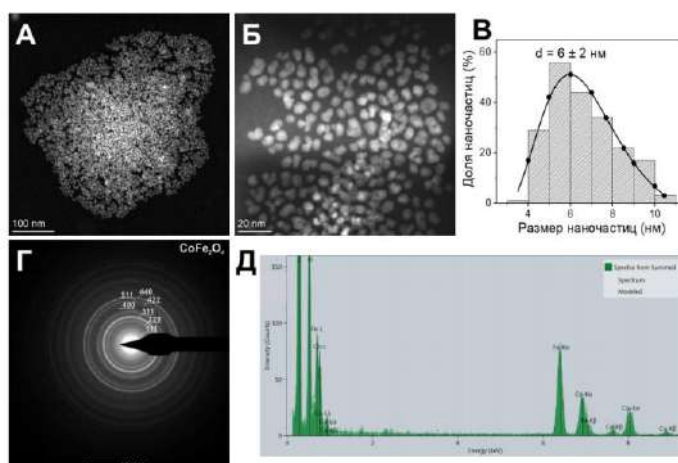


Рисунок 24 – СПЭМ – микрофотографии МНЧ CoFe_2O_4 из БС

А,Б – Обзорные СПЭМ - микрофотографии МНЧ CoFe_2O_4 , В – гистограмма распределения МНЧ CoFe_2O_4 по размерам, Г – изображение ЭД МНЧ CoFe_2O_4 , Д – ЭДРС-спектр МНЧ MnFe_2O_4

Микрофотографии образца МНЧ $ZnFe_2O_4$ свидетельствуют о том, что синтезированные МНЧ агломерированы, имеют средний размер 4 ± 2 нм (Рисунок 25). Согласно ЭДРС картам O, Zn и Fe в МНЧ распределены равномерно (Рисунок 25Е). Изображение ЭД $ZnFe_2O_4$ содержит кольцевые рефлексы, которые соответствуют F -центрированной кубической ячейке с параметром $a \sim 8,4 \text{ \AA}$ (Рисунок 25Г).

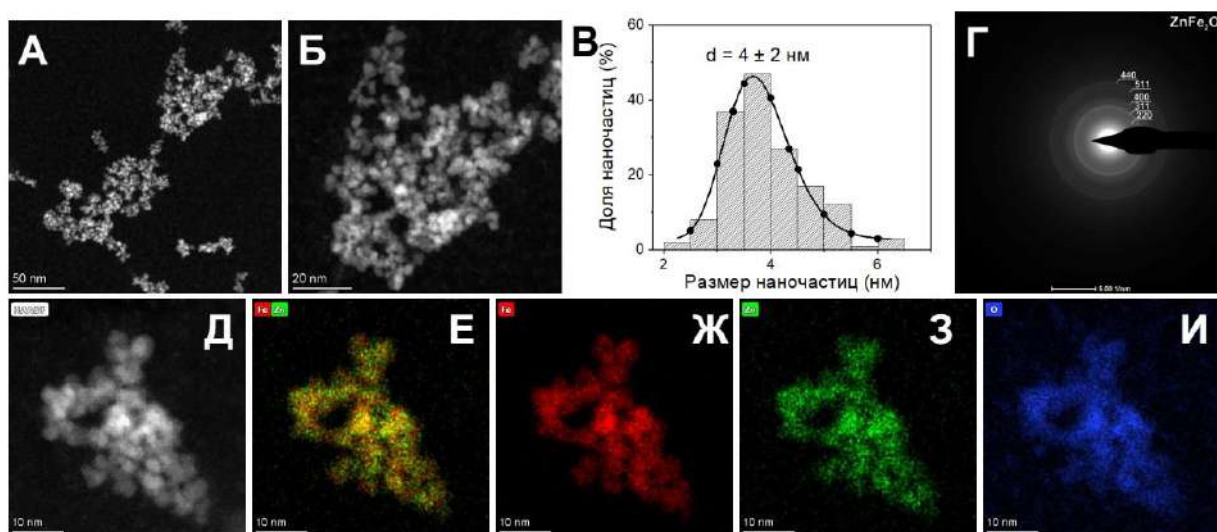


Рисунок 25 – СПЭМ – микрофотографии МНЧ $ZnFe_2O_4$ из БС

А,Б – Обзорные СПЭМ - микрофотографии МНЧ $ZnFe_2O_4$, В – гистограмма распределения МНЧ $ZnFe_2O_4$ по размерам, Г – изображение ЭД МНЧ $ZnFe_2O_4$, Д – СПЭМ изображение области картирования МНЧ $ZnFe_2O_4$, Е – смешанная ЭДРС карта Fe/Zn, Ж - индивидуальная ЭДРС карта Fe, З – индивидуальная ЭДРС карта Zn, И – индивидуальная ЭДРС карта O

ПЭМ-анализ образцов МНЧ MFe_2O_4 , синтезированных в ДБЭ с добавлением ОК, свидетельствует о том, что МНЧ являются монодисперсными, а также имеют отчетливо выраженную полигональную форму (Рисунок 26А). Диаметр МНЧ MFe_2O_4 (без учета агрегации) описывается нормальным распределением (Рисунок 26Б). В случае трех повторов, размер магнитного ядра от синтеза к синтезу варьируется составляет 9 ± 3 нм, 7 ± 2 нм, 4 ± 1 нм для МНЧ $MnFe_2O_4$, 8 ± 2 нм, 7 ± 2 нм, 8 ± 2 нм для МНЧ $CoFe_2O_4$ соответственно, 8 ± 2 нм, 9 ± 2 нм, 10 ± 3 нм для МНЧ

ZnFe_2O_4 . Полученный результат можно объяснить влиянием химической структуры растворителя ДБЭ и ОК на скорость нагрева реакционной смеси при которой процесс зародышеобразования протекает неравномерно, что обуславливает, в итоге разные размеры МНЧ MFe_2O_4 (Таблица 8).

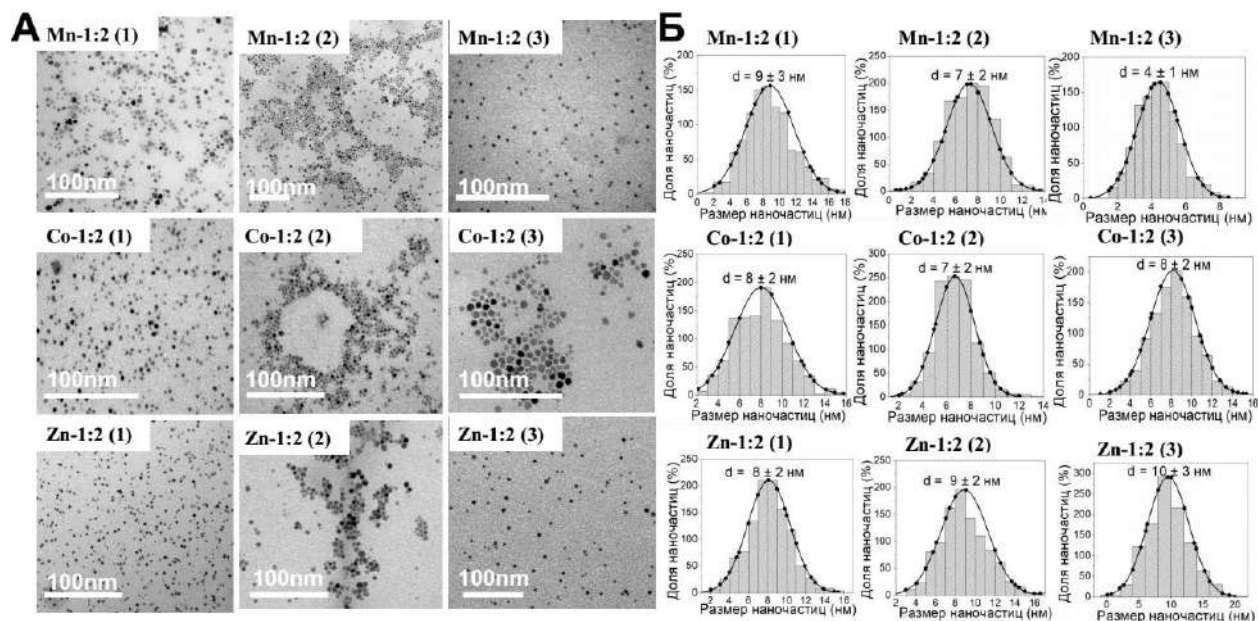


Рисунок 26 – ПЭМ – микрофотографии МНЧ MFe_2O_4 синтезированных в ДБЭ с добавлением ОК

А – Обзорные ПЭМ - микрофотографии МНЧ MnFe_2O_4 , МНЧ CoFe_2O_4 , МНЧ ZnFe_2O_4 , Б – гистограммы распределения МНЧ MnFe_2O_4 , МНЧ CoFe_2O_4 , МНЧ ZnFe_2O_4 по размерам

Сравнивая образцы МНЧ MFe_2O_4 из БС мы наблюдаем тенденцию к увеличению размера МНЧ при уменьшении ионных радиусов катионов переходных металлов (Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}), входящих в состав МНЧ MFe_2O_4 (Таблица 8). Еще одним интересным наблюдением является влияние растворителя на размер МНЧ MFe_2O_4 . Методом ПЭМ было обнаружено, что БС по сравнению с ДБЭ приводит к образованию МНЧ намного меньшего размера (Таблица 8). Полученные результаты можно объяснить более сильными нуклеофильными свойствами БС по сравнению с ДБЭ, что усиливает сольволиз ацетилацетонатных комплексов в БС. Как следствие, реакция зародышеобразования протекает быстрее и предпочтительнее по

сравнению с реакцией роста и приводит к образованию МНЧ меньшего размера.

Таблица 8 – Структурные характеристики МНЧ MFe_2O_4

^a Полученные методом РФА

^b Полученные методом ПЭМ

Образец	Пространственная группа ^a	Параметр решетки (А) ^a	Размер кристаллита (нм) ^a	Размер ядра МНЧ (нм) ^b
$MnFe_2O_4$ / БС				
Mn-1:2 (1)		8.44 (13)	3 ± 1	4 ± 1
Mn-1:2 (2)		8.52 (2)	3 ± 1	3 ± 1
Mn-1:2 (3)	Fd-3m	8.50 (2)	3 ± 1	3 ± 1
Mn-1:6		8.45 (4)	5 ± 1	4 ± 1
Mn-1:10		8.42 (19)	5 ± 1	5 ± 1
$MnFe_2O_4$ / ДБЭ+ОК				
Mn-1:2		8.42 (3)	10 ± 1	9 ± 3
Mn-1:2	Fd-3m	8.43 (5)	6 ± 1	7 ± 2
Mn-1:2		8.53 (2)	3 ± 1	4 ± 1
$CoFe_2O_4$ / БС				
Co-1:2 (1)		8.42 (3)	4 ± 1	3 ± 1
Co-1:2 (2)		8.45 (4)	4 ± 1	3 ± 1
Co-1:2 (3)	Fd-3m	8.44 (5)	4 ± 1	4 ± 1
Co-1:6		8.40 (9)	3 ± 1	4 ± 1
Co-1:10		8.41 (4)	4 ± 1	4 ± 1
$CoFe_2O_4$ / ДБЭ+ОК				
Co-1:2 (1)		8.42 (2)	9 ± 2	8 ± 2
Co-1:2 (2)	Fd-3m	8.43 (5)	7 ± 1	7 ± 2
Co-1:2 (3)		8.41 (7)	9 ± 1	8 ± 2
$ZnFe_2O_4$ / БС				
Zn-1:2 (1)		8.44 (18)	4 ± 2	4 ± 2
Zn-1:2 (2)		8.43 (5)	4 ± 2	3 ± 1
Zn-1:2 (3)	Fd-3m	8.45 (5)	5 ± 1	5 ± 1
Zn-1:6		8.43 (6)	7 ± 1	5 ± 2
Zn-1:10		8.42 (16)	6 ± 1	5 ± 1
$ZnFe_2O_4$ / ДБЭ+ОК				
Zn-1:2		8.40 (4)	6 ± 1	8 ± 2
Zn-1:2	Fd-3m	8.41 (3)	9 ± 1	9 ± 2
Zn-1:2		8.43 (3)	8 ± 1	10 ± 3

Результаты РФА анализа (Таблица 8) показали, что все образцы МНЧ ферритов обладали ожидаемой кубической кристаллической структурой

шпинели, идентифицированной как MnFe_2O_4 (JCPDS № 1528316), CoFe_2O_4 (JCPDS № 01-074-6402), ZnFe_2O_4 (JCPDS № 00-022-1012). На рентгенограммах образцов МНЧ MFe_2O_4 , полученных в результате реакций в БС и ДБЭ с добавлением ОК наблюдались хорошо определенные дифракционные пики от кристаллографических плоскостей (220), (311), (222), (400), (422), (511) и (440), характерных для ферритов (Рисунок 27, Рисунок 28).

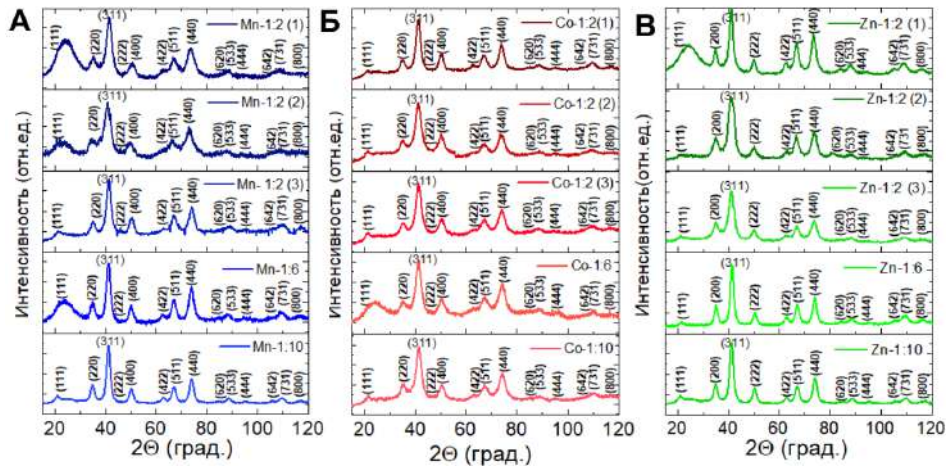


Рисунок 27 – Результаты РФА МНЧ MFe_2O_4 синтезированных из БС.

А – Рентгенограммы порошков МНЧ MnFe_2O_4 , Б – Рентгенограммы порошков МНЧ CoFe_2O_4 , В – Рентгенограммы порошков МНЧ ZnFe_2O_4

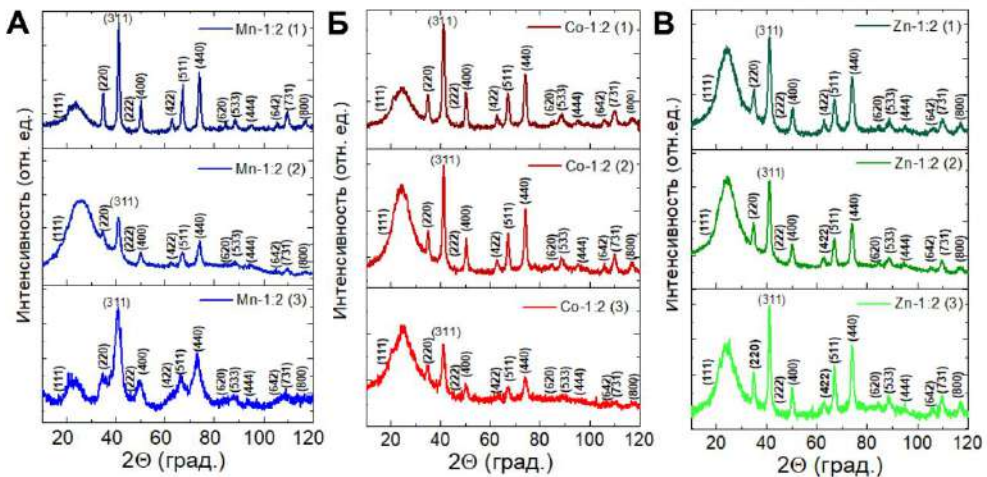


Рисунок 28 – Результаты РФА МНЧ MFe_2O_4 синтезированных из ДБЭ с добавлением ОК

А – Рентгенограммы порошков МНЧ MnFe_2O_4 , Б – Рентгенограммы порошков МНЧ CoFe_2O_4 , В – Рентгенограммы порошков МНЧ ZnFe_2O_4

Другой интересной особенностью полученных результатов является уширение рефлексов, наблюдаемое для всех образцов, синтезированных в БС, в сравнении с образцами из ДБЭ, что можно объяснить малым размером исследуемых МНЧ MFe_2O_4 от 3 ± 1 нм до 5 ± 1 нм. Размеры кристаллитов МНЧ были рассчитаны по формуле Дебая–Шеррера с использованием полученных дифрактограмм и хорошо согласуются с сопоставлением данных о размере установленными методом ПЭМ (Таблица 8, Рисунок 29).

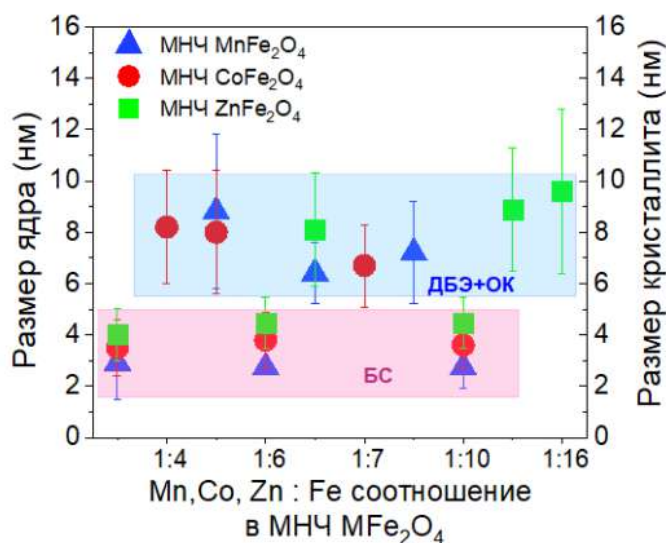


Рисунок 29 – Сравнение размера магнитного ядра установленного по ПЭМ и размера кристаллита установленного по РФА для МНЧ MFe_2O_4

К сожалению, провести детальное исследование магнитных свойств МНЧ MFe_2O_4 в ДБЭ с добавлением ОК невозможно, в виду явных отличий в элементном составе образцов, размере и низкой воспроизводимости синтеза. Тем не менее, результаты магнитометрии при комнатной температуре $T=293K$ показали, что все типы МНЧ MFe_2O_4 имели коэрцитивную силу отличную от нуля, что говорит о ферромагнитной природе образцов. При этом с увеличением среднего размера МНЧ значения удельной намагниченности насыщения σ_s и остаточной удельной намагниченности σ_r также возрастали (Рисунок 30, Таблица 9).

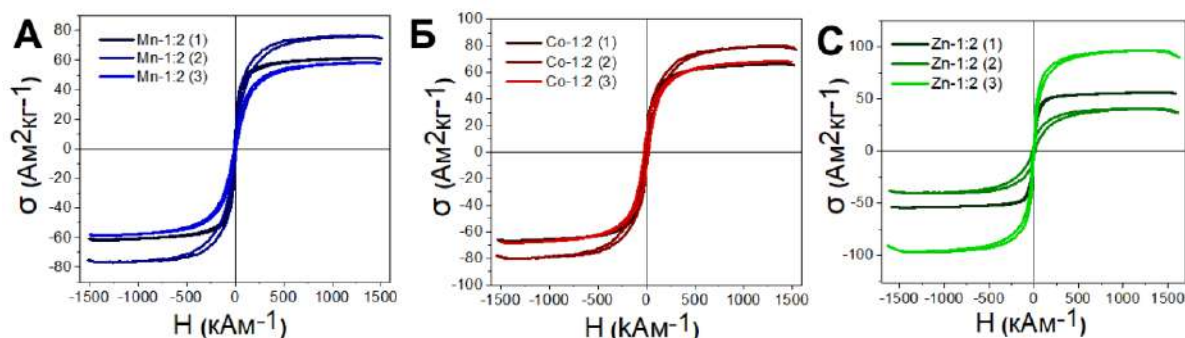


Рисунок 30 – Петли гистерезиса образцов МНЧ ферритов синтезированных в ДБЭ с добавлением ОК при $T=293\text{K}$.

А - Кривые намагничивания МНЧ MnFe_2O_4 , Б - Кривые намагничивания МНЧ CoFe_2O_4 , В - Кривые намагничивания МНЧ ZnFe_2O_4 .

Таблица 9 – Магнитные свойства образцов МНЧ MFe_2O_4 синтезированных в ДБЭ с добавлением ОК.

Образец	H_c , Э ($\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$)	σ_r , $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$	σ_s , $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$
МНЧ MnFe_2O_4 / ДБЭ+ОК			
Mn-1:2 (1)	53.8 (4.3)	4.4	61.6
Mn-1:2 (2)	128.5 (10.2)	7.4	76.8
Mn-1:2 (3)	114.4 (9.1)	2.7	58.5
МНЧ CoFe_2O_4 / ДБЭ+ОК			
Co-1:2 (1)	277.4 (22.1)	11.7	68.3
Co-1:2 (2)	127.2 (10.1)	6.9	80.3
Co-1:2 (3)	47.0 (3.7)	3.8	66.3
МНЧ ZnFe_2O_4 / ДБЭ+ОК			
Zn-1:2 (1)	186.8 (14.9)	5.1	40.7
Zn-1:2 (2)	40.5 (3.2)	3.2	56.1
Zn-1:2 (3)	74.2 (5.9)	7.1	96.9

Таким образом, влияние содержания M^{2+} на магнитные свойства, полученные при комнатной температуре $T=293\text{K}$ оценивали для МНЧ MFe_2O_4 , синтезированных в БС (Таблица 10). Все измерения показывают, что МНЧ MFe_2O_4 проявляют суперпарамагнитное поведение, что согласуется с установленным ранее средним размером МНЧ MFe_2O_4 (менее 10 нм), при котором происходит переход в суперпарамагнитное состояние [200] [201]. Также стоит отметить, что намагниченность насыщения возрастает по мере

увеличения приложенного поля и достигает точки насыщения в максимальном поле ($\pm 15 \text{ кА}\cdot\text{м}^{-1}$) (Рисунок 31). Из представленных петель гистерезиса образцов МНЧ MFe_2O_4 с полученным элементарным соотношением $\text{M:Fe} = 1:2, 1:6, 1:10$, можно видеть, что значение удельной намагниченности насыщения σ_s в МНЧ MnFe_2O_4 и МНЧ CoFe_2O_4 возрастает, достигает своего максимума в точке ($\text{Mn,Co:Fe} \approx 1:6$), после чего идет на спад (Рисунок 31Г). Такое поведение объясняется распределением катионов металлов по тетраэдрическим (А-подрешетка) и октаэдрическим (В-подрешетка) позициям в кристаллической решетке и зависит от типа шпинели [202]. Первоначальный рост σ_s происходит за счет того, что катионы Mn^{2+} и Co^{2+} встраиваясь в А-подрешетку, провоцируют перемещение ионов Fe^{3+} в подрешетку В, тем самым увеличивая в ней магнитный момент и, соответственно, увеличивая суммарный магнитный момент.

Таблица 10 – Магнитные свойства образцов МНЧ MFe_2O_4 из БС.

Образец	$H, \text{ Э (кА}\cdot\text{м}^{-1})$	$\sigma_r, \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$	$\sigma_s, \text{ А}\cdot\text{м}^2\cdot\text{кг}^{-1}$
МНЧ MnFe_2O_4 / БС			
Mn-1:2 (1)	75.8 (6.0)	0.5	28.8
Mn-1:2 (2)	252.2 (20.1)	1.9	26.5
Mn-1:2 (3)	152.4 (12.7)	0.7	20.3
Mn-1:6	55.3 (4.4)	0.9	46.1
Mn-1:10	125.8 (10.0)	0.5	19.7
МНЧ CoFe_2O_4 / БС			
Co-1:2 (1)	77.3 (6.1)	0.5	35.2
Co-1:2 (2)	59.1 (4.7)	0.9	45.3
Co-1:2 (3)	75.3 (6.0)	0.7	43.0
Co-1:6	195.4 (15.5)	5.8	99.3
Co-1:10	72.5 (5.8)	0.8	36.6
МНЧ ZnFe_2O_4 / БС			
Zn-1:2 (1)	99.1 (7.9)	0.5	26.8
Zn-1:2 (2)	74.7 (5.9)	0.5	31.0
Zn-1:2 (3)	66.9 (5.3)	0.6	33.7
Zn-1:6	37.8 (3.0)	1.8	64.3
Zn-1:10	100.7 (8.0)	9.9	85.1

Наряду с растущим внутри подрешеточным В-В взаимодействием, ослабевает межподрешеточное А-В взаимодействие, за счет того, что число магнитных ионов в подрешетке А уменьшается [203]. Увеличение суммарного магнитного момента наблюдается до тех пор, пока А-В взаимодействие между подрешетками остается достаточно сильным. После, в точке $\text{Mn,Co:Fe} \approx 1:6$ А-В взаимодействие становится слишком слабым и σ_s принимает спадающий характер. Разница в значениях σ_s МНЧ MnFe_2O_4 (3 нм) и МНЧ CoFe_2O_4 (4 нм) обосновывается меньшим значением величины магнитно ядра [204].

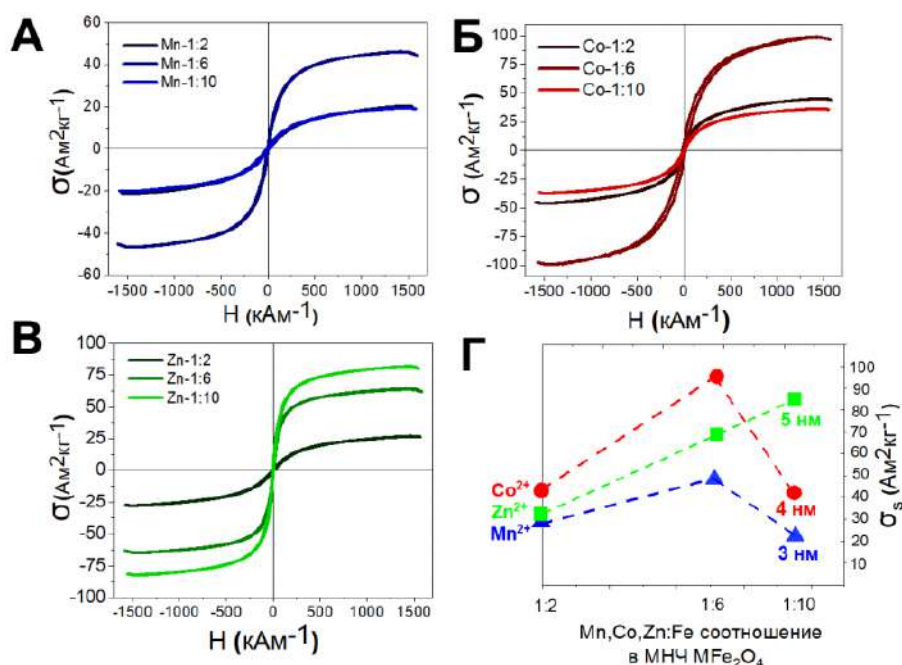


Рисунок 31 – Петли магнитного гистерезиса МНЧ MFe_2O_4 в БС при $T=293\text{K}$.

Намагниченность насыщения рассчитана с использованием массы МНЧ MFe_2O_4 и содержания Fe, определенного методом МП-АЭС

А - Кривые намагничивания МНЧ MnFe_2O_4 , Б - Кривые намагничивания МНЧ CoFe_2O_4 , В - Кривые намагничивания МНЧ ZnFe_2O_4 , Г- Зависимость изменения удельной намагниченности насыщения (σ_s) МНЧ MFe_2O_4 с различным элементарным соотношением ($\text{Mn,Co,Zn : Fe} = 1:2, 1:6, 1:10$) в БС

Среди всех исследуемых ферритов особое место занимает феррит цинка, поскольку он проявляет необычное поведение на наноуровне. Объемный ZnFe_2O_4 имеет нормальную структуру шпинели, в которой все ионы Zn^{2+} занимают тетраэдрические позиции, а все ионы Fe^{3+} занимают октаэдрические позиции, поэтому при комнатной температуре объемный феррит цинка является парамагнитным. Магнитные свойства существенно изменяются при уменьшении размера частиц до нескольких десятков нанометров: в этом масштабе происходит инверсия катионов; часть катионов цинка занимает октаэдрические позиции, а часть катионов железа – тетраэдрические позиции [205; 206]. Таким образом, происходит трансформация структуры нормальной шпинели в смешанную, что приводит к неравновесию в системе с конкурирующими магнитными взаимодействиями и, как правило, к возникновению результирующей спонтанной намагниченности. Степень инверсии катионов зависит от размера частиц [205–207]. В результате таких превращений намагниченность МНЧ ZnFe_2O_4 может достигать достаточно высоких значений, и это явление, по-видимому, наблюдается в нашем случае (Рисунок 31Г). Можно также предположить, что образец МНЧ ZnFe_2O_4 достиг своего максимума в точке ($\text{Zn:Fe}=1:10$) и при последующем уменьшении количества Zn^{2+} в составе МНЧ приведет к уменьшению удельной σ_s намагниченности насыщения исследуемого образца до значений чистого $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [208; 209]. Данный факт подтверждается и коррелирует с более ранней работой, в которой локальный максимум σ_s для МНЧ ZnFe_2O_4 наблюдается при соотношении $\text{Zn:Fe} = 1:6-1:10$ [210].

Полученные результаты подтверждают возможность управления магнитными свойствами МНЧ ферритов путем изменения доли металла в кристаллической структуре, достигаемого за счет изменения мольного соотношения прекурсоров в реакциях термического разложения в БС.

Для всех МНЧ MFe_2O_4 из БС были зарегистрированы мессбауэровские спектры при комнатной температуре $T=293\text{K}$, а также в присутствии внешнего

магнитного поля $H=3.4$ кЭ (Рисунок 32). Изомерные сдвиги (δ) определяли относительно центра спектра α -Fe. Спектры, измеренные при $H = 0$, аппроксимировались в рамках модели парамагнитных дублетов (Таблица 11).

Таблица 11 – Параметры мессбауэровских спектров МНЧ ферритов, полученных в бензиловом спирте при величине поля $H=0$.

Образец	Изомерный сдвиг δ , $\text{мм}\cdot\text{с}^{-1}$	Квадрупольный сдвиг ϵ , $\text{мм}\cdot\text{с}^{-1}$	Ширина линии γ , $\text{мм}\cdot\text{с}^{-1}$	χ^2
Mn-1:2	0.34 (1)	0.37 (1)	0.68 (2)	0.95
Co-1:2	0.33 (1)	0.31 (1)	0.74 (2)	1.36
Zn-1:2	0.35 (1)	0.33 (1)	0.70 (1)	1.47

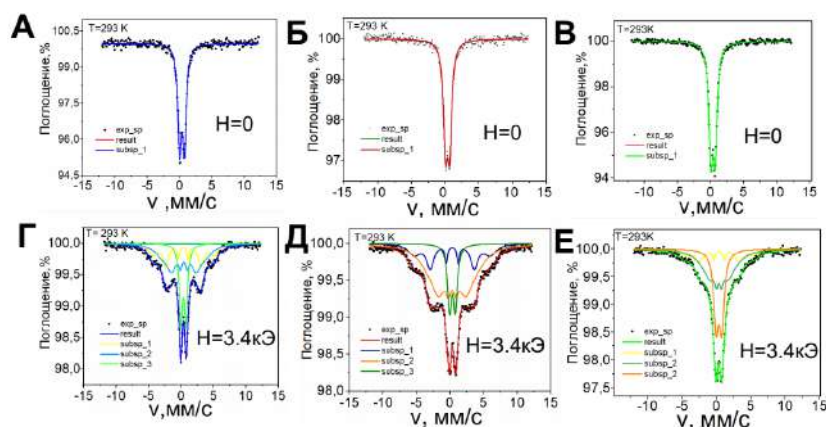


Рисунок 32 – Мессбауэровские спектры порошков образцов МНЧ MFe_2O_4 в БС, измеренные при $T = 293$ К, $H = 0$ и в присутствии внешнего магнитного поля $H = 3.4$ кЭ. Сплошными линиями показаны результирующий и парциальный спектры в модели суперпозиции двух секстетов и одного дублета.

А – Мессбауэровский спектр МНЧ MnFe_2O_4 , $H=0$, Б – Мессбауэровский спектр МНЧ CoFe_2O_4 , $H=0$, В – Мессбауэровский спектр МНЧ ZnFe_2O_4 , $H=0$, Г – Мессбауэровский спектр МНЧ MnFe_2O_4 , $H=3.4$ кЭ, Д – Мессбауэровский спектр МНЧ CoFe_2O_4 , $H=3.4$ кЭ, Е – Мессбауэровский спектр МНЧ ZnFe_2O_4 , $H=3.4$ кЭ

Спектры, измеренные при $H=3.4$ кЭ аппроксимировались в рамках модели суперпозиции двух секстетов и парамагнитного дублета (Таблица 12).

Таблица 12 – Параметры Мессбауэровских спектров МНЧ ферритов, полученных в бензиловом спирте при величине поля $H = 3.4$ кЭ.

Нст – сверхтонкое магнитное поле, А – относительный вес.

Образец	Изомерный сдвиг (δ), мм \cdot с $^{-1}$	Квадрупольный сдвиг (QS), мм \cdot с $^{-1}$	Нст, кЭ	А%
Mn-1:2	0.33 (3)	0	292 (3)	28 (3)
секстет	0.39 (9)	0	202 (9)	45 (5)
дублет	0.34 (2)	0.40 (2)	0	27 (2)
Co-1:2	0.33 (2)	0	353 (3)	22 (2)
секстет	0.32 (6)	0	213 (7)	62 (4)
дублет	0.36 (2)	0.43 (2)	0	16 (1)
Zn-1:2	0.37 (4)	0	310 (4)	18 (3)
секстет	0.35 (21)	0	135 (23)	45 (8)
дублет	0.35 (2)	0.33 (1)	0	37 (9)

По значениям изомерного сдвига от 0,33 до 0,35 мм \cdot с $^{-1}$ все дублеты соответствуют ионам Fe $^{3+}$.

Стоит обратить внимание на то, что относительно большая ширина линии указывает на то, что образцы демонстрируют суперпарамагнитное поведение. Наложение слабого магнитного поля привело к частичному восстановлению магнитной сверхтонкой структуры в спектрах – эффекту индуцированного полем суперферримагнетизма, наблюдавшемуся ранее в магнитных МНЧ со средним размером 4 нм [211]. Наибольший эффект наблюдался для феррита кобальта, наименьший для феррита цинка, что связано с относительной величиной магнитной анизотропии, наибольшей для феррита кобальта.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что все синтезированные МНЧ MFe $_2$ O $_4$ из БС могут оказаться весьма перспективными для дальнейшего применения ввиду высокой моносферности, высокой агрегативной стабильности в неполярных

органических растворителях, необходимого фазового и элементного состава, что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для последующей функционализации органическими лигандами с целью гидрофилизации МНЧ MFe_2O_4 и получения стабильных водных коллоидов.

3.2 Функционализация поверхности МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4

Полученные результаты явно указывают, что в качестве объектов для дальнейшей функционализации поверхности предпочтительнее использовать МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4 синтезированные в БС. Для проведения последующих экспериментов требуется дополнительная стадия, заключающаяся в модификации поверхности МНЧ органическими лигандами, которые, с одной стороны, обеспечивали бы высокую стабильность МНЧ в солевых буферах, а с другой – позволили бы ковалентно закрепить на МНЧ молекулы антител (АТ). Проблема стабилизации МНЧ в водно-солевых буферах до сих пор остается одной из ключевых задач современной нанохимии. На данный момент существует несколько основных способов стабилизации МНЧ в водно-солевых буферах: 1) модификация поверхности МНЧ полимерами, а также низкомолекулярными веществами путем нековалентного связывания; 2) образование прочных ковалентных/донорно-акцепторных связей между поверхностью МНЧ и молекулами лиганда.

Сразу необходимо отметить, что использование для наших целей механизмов нековалентной модификации (гидрофобные, электростатические взаимодействия и т. д.) поверхности МНЧ различными органическими молекулами не может применяться в данном случае, т.к. молекулы АТ должны быть прочно закреплены на МНЧ, во избежание их отрыва или замещения в процессе проведения экспериментов. Лиганд и АТ не должны отрываться от поверхности МНЧ при механических и других воздействиях, а также не должны замещаться другими химическими молекулами, например,

белками в ходе проведения *in vitro* экспериментов в буферах, содержащих сыворотку.

Другой способ агрегативной стабилизации МНЧ в водно-солевых буферах, основанный на ковалентном связывании лиганда с поверхностью МНЧ, позволяет гарантировать, что лиганд останется связанным с МНЧ при внешнем воздействии на него различных сил, а также при изменении внешних условий (рН раствора, ионная сила, температура и т.д.). Более того, в случае использования дополнительного линкера все связи в нем также должны быть ковалентными во избежание отрыва молекул лиганда от МНЧ. Нами была применена стратегия, основанная на использовании производных катехола (дофамин, дигидроксифенилуксусная кислота и т.п.) для гидрофилизации МНЧ [212; 213]. Терминальная группа такого катехола служит “якорем” для закрепления каких-либо линкеров, тогда как vicинальные кислороды образуют прочную донорно-акцепторную связь с ионами железа, входящими в состав МНЧ [214] и сохраняя при этом монодисперсное распределение МНЧ по размерам. (Рисунок 33).

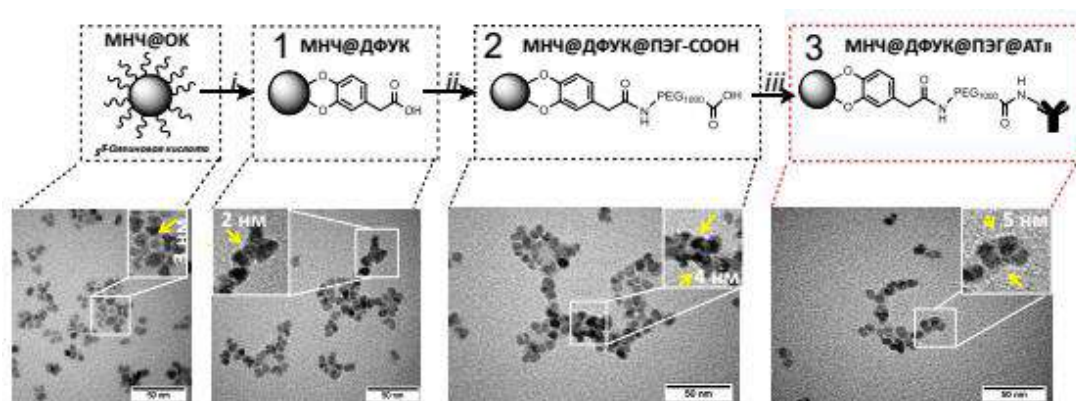


Рисунок 33 – Схематическое изображение пошаговой модификации МНЧ с целью их гидрофилизации и прочного связывания с антителами (АТ) на примере образца МНЧ $ZnFe_2O_4$ с соответствующими ПЭМ-изображениями для каждого этапа. Реагенты и условия: (i) $NaOH, CH_3OH$, ДФУК, $50^\circ C$, 6ч., (ii) EDC, NHS, NH_2 -ПЭГ₁₁₀₀-COOH, 12ч, $T_{комн.}$, (iii) EDC, NHS, АТ_{II}, 12ч, $+4^\circ C$.

В ходе проведения экспериментов было установлено, что наилучшая агрегативная стабильность для таких МНЧ достигается только в толуоле (Рисунок 34). За основу, для проведения первого этапа модификации в качестве катехолсодержащего лиганда была выбрана 3,4-дигидроксифенилуксуная кислота (ДФУК). Для облегчения десорбции молекул ОК, находящихся на поверхности МНЧ использовали каталитические количества NaOH, тогда как сама реакция проводилась в двухфазной системе $C_6H_5CH_3/CH_3OH$ (Рисунок 33). По окончании реакции методом ДСР были измерены ГД параметры полученных коллоидов (Таблица 13).

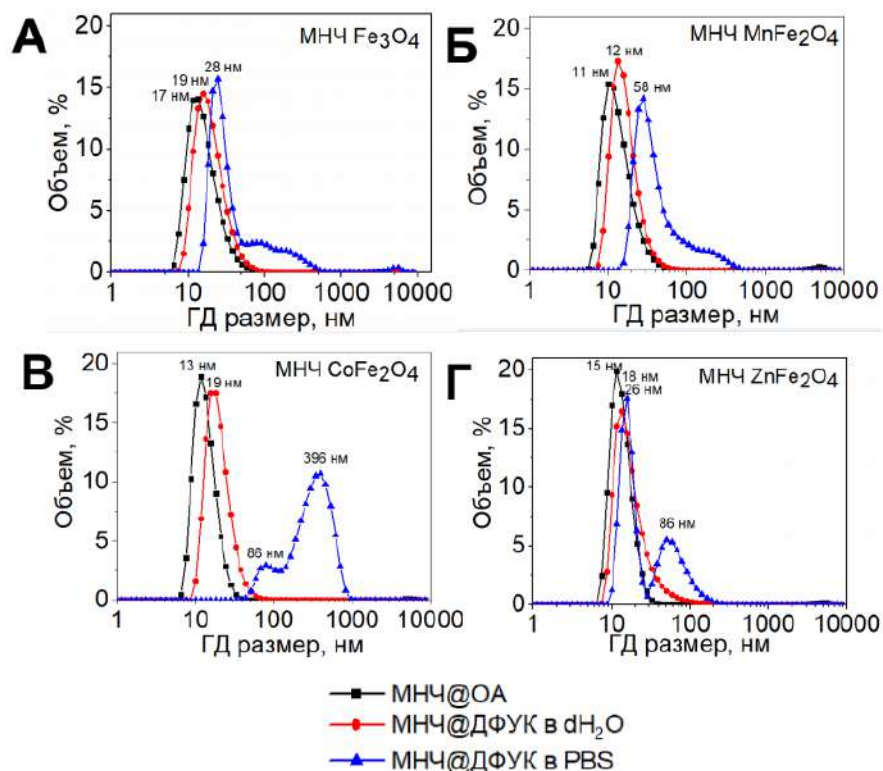


Рисунок 34 – Гидродинамические кривые коллоида МНЧ@ДФУК

А – Распределение ГД-параметров по объему МНЧ Fe_3O_4 , Б – Распределение ГД-параметров по объему МНЧ $MnFe_2O_4$, В – Распределение ГД-параметров по объему МНЧ $CoFe_2O_4$, Г - Распределение ГД-параметров по объему МНЧ $ZnFe_2O_4$

Кроме того было установлено, что после модификации МНЧ диспергируются в дистиллированной воде (dH_2O) и имеют средний ГД размер, который, с учетом размера органической оболочки и толщиной двойного электрического слоя, сравним с размером единичного магнитного ядра (Рисунок 34, Таблица 13). Анализ агрегативной стабильности МНЧ@ДФУК в натрий–фосфатном буфере (PBS) методом ДСР показал, что все четыре типа МНЧ обладают агрегативной неустойчивостью, слипаются с образованием крупных агрегатов, после чего полностью выпадают в осадок (Рисунок 34, Таблица 13), что хорошо согласуется с ранее описанными в литературе результатами [214].

Таблица 13 – Гидродинамические характеристики до и после модификации МНЧ@ДФУК

Образец (шифр)	Размер по ПЭМ, нм	Гидродинамический размер, нм	PDI
$Fe_3O_4@OK$	7 ± 1	17 ± 1	0,194
$Fe_3O_4@ДФУК$ в dH_2O	7 ± 1	19 ± 1	0,267
$Fe_3O_4@ДФУК$ в PBS	7 ± 1	27 ± 19	0,351
$MnFe_2O_4@OK$	3 ± 1	11 ± 2	0,246
$MnFe_2O_4@ДФУК$ в dH_2O	3 ± 1	12 ± 1	0,295
$MnFe_2O_4@ДФУК$ в PBS	3 ± 1	58 ± 18	0,381
$CoFe_2O_4@OK$	4 ± 1	13 ± 1	0,209
$CoFe_2O_4@ДФУК$ в dH_2O	4 ± 1	19 ± 2	0,244
$CoFe_2O_4@ДФУК$ в PBS	4 ± 1	86 ± 9	0,334
$ZnFe_2O_4@OK$	5 ± 1	15 ± 1	0,109
$ZnFe_2O_4@ДФУК$ в dH_2O	5 ± 1	18 ± 1	0,273
$ZnFe_2O_4@ДФУК$ в PBS	5 ± 1	26 ± 7	0,379

Дополнительную модификацию терминальных карбоксильных групп ДФУК проводили гетеробифункциональным аминокарбоксипроизводным полиэтиленгликоля (ПЭГ) (NH_2 -ПЭГ- $COOH$, $M_w \sim 1100$ г·моль⁻¹) по карбодиимидному методу (Рисунок 33), что позволило обеспечить высокую агрегативную стабильность МНЧ за счет появления дополнительного стерического фактора.

Из полученных ПЭМ-микрофотографий (Рисунок 33) можно видеть, что вокруг ядра МНЧ формируется органическая оболочка толщиной ~ 5 нм, что доказывает модификацию МНЧ молекулами ПЭГ с молекулярной массой $1100 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$, линейный размер которых, как было показано ранее, составляет 4 нм [215]. Также косвенным подтверждением связыванияДФУК и ПЭГ являются численные результаты измерений ГД-размера МНЧ, который увеличивается на каждом этапе модификации (Таблица 14).

Таблица 14 – Гидродинамические характеристики до и после модификации МНЧ@ДФУК@ПЭГ-СООН.

Образец (шифр)	Размер по ПЭМ, нм	Гидродинамический размер, нм	PDI
Fe ₃ O ₄ @ОК	7 ± 1	17±1	0,194
Fe ₃ O ₄ @ДФУК	7 ± 1	19±1	0,267
Fe ₃ O ₄ @ДФУК@ПЭГ-СООН	7 ± 1	26±1	0,204
MnFe ₂ O ₄ @ОК	3 ± 1	11±2	0,246
MnFe ₂ O ₄ @ДФУК	3 ± 1	12±1	0,295
MnFe ₂ O ₄ @ДФУК@ПЭГ-СООН	3 ± 1	18±1	0,195
CoFe ₂ O ₄ @ОК	4 ± 1	13±1	0,209
CoFe ₂ O ₄ @ДФУК	4 ± 1	19±2	0,244
CoFe ₂ O ₄ @ДФУК@ПЭГ-СООН	4 ± 1	22±1	0,216
ZnFe ₂ O ₄ @ОК	5 ± 1	15±1	0,109
ZnFe ₂ O ₄ @ДФУК	5 ± 1	18±1	0,273
ZnFe ₂ O ₄ @ДФУК@ПЭГ-СООН	5 ± 1	21±1	0,200

Для доказательства успешной модификации поверхности МНЧ были зарегистрированы ИК-спектры с Фурье преобразованием для всех четырех типов МНЧ по каждому этапу функционализации (Рисунок 35).

В ИК-спектре МНЧ@ОК четко выражены острые пики в области 582 см^{-1} , 592 см^{-1} и 447 см^{-1} , которые являются характерными пиками поглощения колебаний связи Fe-O [216; 217] и присутствует во всех зарегистрированных спектрах образцов. Пик при 713 см^{-1} и при 586 см^{-1} соответствует характеристическим колебаниям связи Mn-O в образце МНЧ

MnFe_2O_4 [218]. Характерный сигнал при 591 см^{-1} соответствует валентным колебаниям Co-O в образце МНЧ CoFe_2O_4 [219]. Поглощение связи Zn-O при 406 см^{-1} является характерным сигналом для образца МНЧ ZnFe_2O_4 . [220; 221]. Широкий пик в области между 4000 и 3000 см^{-1} соответствует частоте валентных колебаний молекул воды, которые вероятнее всего присутствуют в КВr [222] [223]. Пики в области 2920 см^{-1} и 2860 см^{-1} соответствуют антисимметричным и симметричным колебаниям $-\text{CH}_2$ группы гидрофобной цепи ОК. Карбоксильная группа $\text{COO}-$ от ОК вызывает асимметричные/симметричные колебания при 1560 см^{-1} и 1460 см^{-1} , группа $=\text{C}-\text{H}$ от ОК вызывает пик в области левее 3000 см^{-1} , а также пик в области 1420 см^{-1} , который, вероятнее всего, обусловлен образованием карбоксилата железа при координировании молекул ОК на поверхности МНЧ [224; 225].

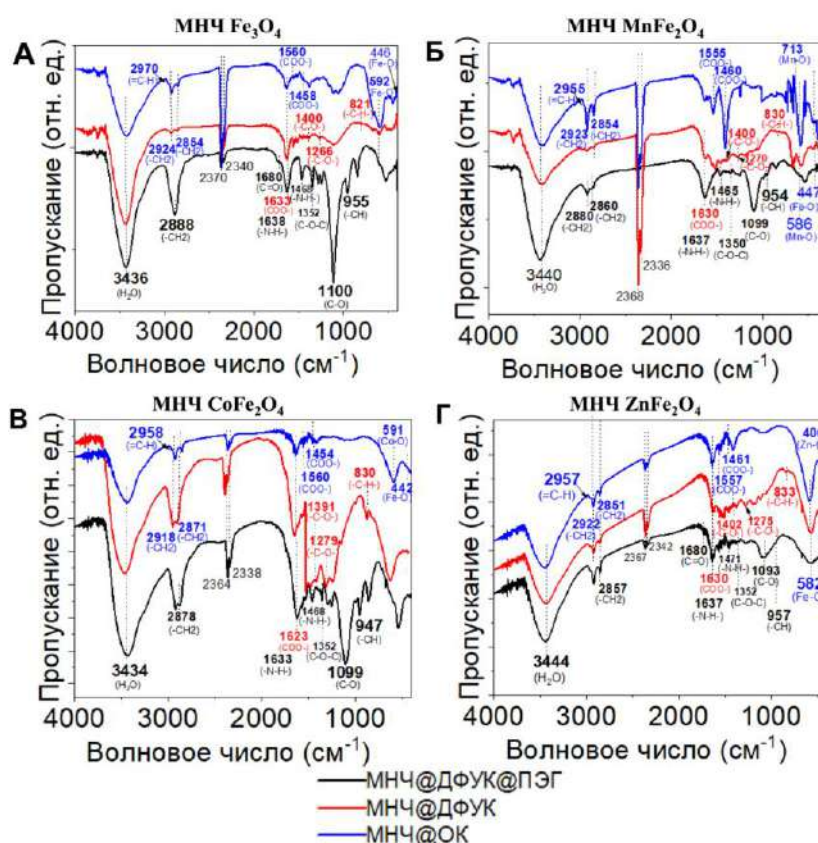


Рисунок 35 – ИК-спектры порошков МНЧ зарегистрированные на каждом из этапов модификации поверхности

А – ИК-спектры МНЧ Fe_3O_4 , Б – ИК-спектры МНЧ MnFe_2O_4 , В – ИК-спектры МНЧ CoFe_2O_4 , В – ИК-спектры МНЧ ZnFe_2O_4

После ковалентной модификации поверхности МНЧ молекуламиДФУК необходимо отметить, что асимметричное (в области 1560 см^{-1}) и симметричное (в области 1460 см^{-1}) колебания карбоксильных групп на всех спектрах отсутствуют. Характерные валентные колебания связей COO^- , $-\text{C}-\text{O}-$, $-\text{C}-\text{H}-$ входящих в состав молекулыДФУК наблюдались в области $1620-1630\text{ см}^{-1}$, $1391-1400\text{ см}^{-1}$, $1270-1280\text{ см}^{-1}$ и $820-830\text{ см}^{-1}$ соответственно. Появление слабого сигнала при 1406 см^{-1} можно отнести к симметричным колебаниям карбоксильных групп COO^- и COOH [226], что указывает на то, что МНЧ успешно модифицированы молекуламиДФУК.

На ИК-спектрах МНЧ@ДФУК@ПЭГ задетектировано асимметричное/симметричное растяжение $-\text{CH}_2$ связи в области при 2880 см^{-1} и/или 2860 см^{-1} и растяжение связи $\text{C}-\text{O}$ при 1090 см^{-1} , что говорит об успешной модификации поверхности МНЧ молекулами ПЭГ. Полоса в области 1680 см^{-1} соответствует вибрационным колебаниям связи $\text{C}=\text{O}$ [227]. Более того, пики при 1638 см^{-1} и 1465 см^{-1} обусловлены $-\text{NH}-$ асимметричными/симметричными колебаниями [228]. Чуть заметные пики при 1350 см^{-1} и 1108 см^{-1} указывают на асимметричное и симметричное растяжение связи $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и изгиб вне плоскости $-\text{CH}$ цепей молекул ПЭГ- COOH при 955 см^{-1} . Положение пика в области $2336\text{ см}^{-1}-2370\text{ см}^{-1}$ для всех синтезированных МНЧ сопоставлено с положением сигнала связи $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ индивидуального CO_2 в твердом и газообразном состоянии [229; 230].

Таким образом, можно сделать вывод, что наличие пиков поглощения, соответствующее функциональным группам используемых органических лигандовДФУК и ПЭГ, говорит об их успешном связывании между собой и с поверхностью МНЧ.

В виду того, что все последующие эксперименты, в частности конъюгация с АТ, будут проводиться в солевых буферах, полученные МНЧ должны обладать высокой агрегативной устойчивостью. Поэтому для всех синтезированных коллоидов МНЧ@ДОПАК@ПЭГ исследовали изменение

их ГД размера с течением времени в различных солевых буферах (PBS, HBSS и 0.9% NaCl), которые широко используются для биологических исследований. В качестве экспериментальных точек были выбраны 0,5, 1, 2, 4, 24 и 48 ч инкубации. Более длительные временные точки не исследовались по причине проведения *in vitro* экспериментов с образцами МНЧ в интервалах 0 – 48 ч. Выбранный временной промежуток обусловлен тем, что в течение 48 ч будет осуществлен весь цикл последующих экспериментов, начиная от конъюгации МНЧ@ДФУК@ПЭГ с АТ, и заканчивая процедурами отмывки полученных МНЧ от свободных, несвязавшихся АТ.

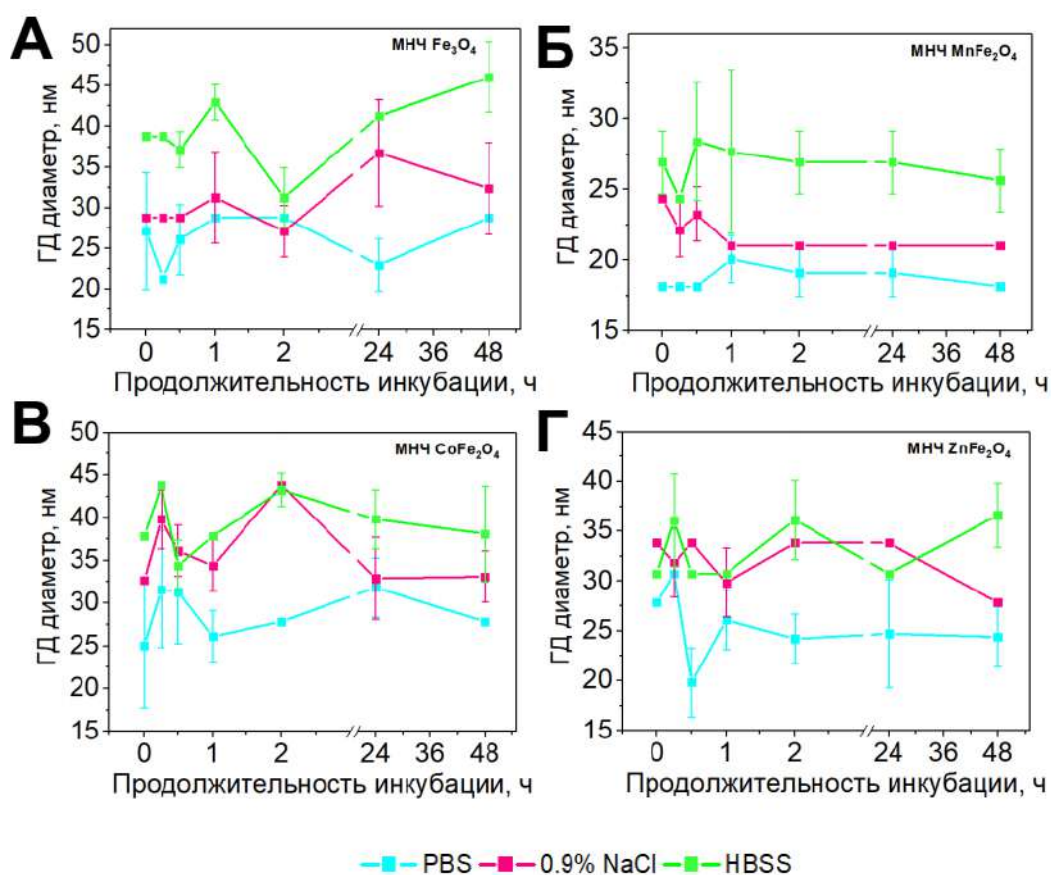


Рисунок 36 – Зависимость гидродинамического размера МНЧ@ДФУК@ПЭГ в солевых буферах от времени

А – Зависимость гидродинамического размера МНЧ Fe₃O₄@ДФУК@ПЭГ,

Б – Зависимость гидродинамического размера МНЧ MnFe₂O₄@ДФУК@ПЭГ,

В – Зависимость гидродинамического размера МНЧ CoFe₂O₄@ДФУК@ПЭГ,

Г – Зависимость гидродинамического размера МНЧ ZnFe₂O₄@ДФУК@ПЭГ

Полученные результаты (Рисунок 36) однозначно свидетельствуют о том, что в течение 48 часов ГД размеры образцов МНЧ в буфере PBS меняются незначительно, что говорит о том, что такие МНЧ монодисперсны. Однако МНЧ в буфере 0.9% NaCl собираются в небольшие агрегаты с размером до 40 нм, после чего их ГД размер изменяется незначительно, что также говорит о высокой агрегативной стабильности таких коллоидов, несмотря на частичную агрегацию МНЧ.

Следует обратить внимание на тот факт, что с появлением катионов щелочно-земельных металлов, входящих в состав буфера HBSS увеличивается ГД размер МНЧ (Таблица 15, Рисунок 36).

Таблица 15 - Гидродинамические характеристики образцов МНЧ@ДФУК@ПЭГ в различных солевых буферах

Образец МНЧ@ДФУК@ПЭГ	Размер по ПЭМ, нм	Гидродинамический диаметр, нм			PDI
		PBS	0.9% NaCl	HBSS	
МНЧ Fe ₃ O ₄ @ДФУК@ПЭГ	7±1	26±1	28±1	46±1	0,204
МНЧ MnFe ₂ O ₄ @ДФУК@ПЭГ	3 ± 1	18±1	21±1	28±4	0,293
МНЧ CoFe ₂ O ₄ @ДФУК@ПЭГ	4 ± 1	22±1	32±1	43±1	0,259
МНЧ ZnFe ₂ O ₄ @ДФУК@ПЭГ	5 ± 1	21±1	39±1	50±4	0,200

Анализ численных данных позволил установить, что снижение стабильности в ряду исследуемых буферов может быть связано с наличием в составе буфера HBSS катионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (Таблица 16), которые взаимодействуют с терминальными карбоксильными группами ПЭГ-СООН и приводят к слипанию МНЧ друг с другом.

Таблица 16 – Сводная таблица компонентов входящих в солевые буферы

Компоненты	Солевой буфер, мМ		
	0.9% NaCl	PBS	HBSS
Хлорид натрия	137	137	1378
Хлорид калия	-	2.7	5
Фосфаты	-	10	7
Хлорид кальция	-	-	1
Хлорид магния	-	-	0.5
Сульфат магния	-	-	0.4
Глюкоза	-	-	6
Гидрокарбонат натрия	-	-	4

На основании полученных данных был сделан вывод, что МНЧ проявляют наилучшую агрегативную устойчивость в течение всего времени эксперимента в буфере PBS, что позволяет использовать данный буфер для проведения дальнейших экспериментов и конъюгации с АТ.

3.3 Функционализация МНЧ антителами

Один из наиболее распространённых способов конъюгации целевых молекул на поверхность модифицированных МНЧ является ковалентное присоединение. Такой подход может быть осуществлен посредством применения кросслинкеров, которые выбираются в зависимости от того, какие функциональные группы экспонированы на поверхности МНЧ. Наиболее распространены кросслинкеры со спейсером нулевой длины и одним из представителей является EDC [231]. EDC хорошо растворим в воде и активирует -COOH группы на поверхности МНЧ, делая возможным связывание их с аминогруппами целевых биомолекул.

Крайне важным является подбор оптимальных условий проведения химической реакции, и подбор оптимального молярного соотношения молекул АТ к общей площади поверхности МНЧ при которых после связывания с МНЧ АТ по-прежнему могли бы взаимодействовать с белковым антигеном, презентированным в клетках. Количество АТ необходимых для

конъюгации с МНЧ, а в дальнейшем и их сайт-специфическую доступность определяли с использованием уравнений (4) – (6). Объем, и площадь занимаемая всеми МНЧ рассчитанные с использованием данных о размере МНЧ, полученных при помощи ПЭМ, в 1 мг МНЧ ($\rho_{\text{МНЧ}} = 5.2 \text{ г/см}^3$), :

$$V_{\text{МНЧ}} = \frac{\pi d^3}{6}, S_{\text{МНЧ}} = \pi d^2$$

Ранее, было экспериментально показано, что на один нм² МНЧ приходится 3-4 молекулыДФУК, из чего следует, что количествоДФУК, приходящихся на 1 МНЧ можно определить по формуле:

$$N_{\text{ДФУК}} = 3 \cdot S_{\text{МНЧ}},$$

$$N_{\text{ДФУК(на 1МНЧ)}} = N_{\text{ПЭГ(на 1МНЧ)}} = N_{\text{АТ(на 1МНЧ)}},$$

Количество антител, приходящихся на одну МНЧ:

$$n_{\text{АТ(на 1МНЧ)}} = \frac{N_{\text{АТ(на 1МНЧ)}}}{N_A}, m_{\text{АТ(на 1МНЧ)}} = M_{\text{АТ}} \cdot n_{\text{АТ(на 1МНЧ)}} \quad (4)$$

Количество МНЧ в 1 мг образца:

$$N_{\text{МНЧ}} = \frac{m_{\text{МНЧ}}}{m_{1\text{МНЧ}}} \quad (5)$$

где $m_{1\text{МНЧ}}$ – масса одной наночастицы.

Количество молекул антител приходящихся на 1 мг МНЧ ($M_{\text{АТ}} = 150\,000 \text{ г/моль}$):

$$N_{\text{АТ}} = N_{\text{АТ(на 1МНЧ)}} \cdot N_{\text{МНЧ(на 1мг)}} \quad (6)$$

Таблица 17 – Расчетные параметры для каждого типа МНЧ

	МНЧ Fe ₃ O ₄	МНЧ MnFe ₂ O ₄	МНЧ CoFe ₂ O ₄	МНЧ ZnFe ₂ O ₄
$S_{\text{МНЧ}}, \text{ нм}^2$	154	28	50	79
$V_{\text{МНЧ}}, \text{ нм}^3$	180	5	34	65
$N_{\text{МНЧ}}$ в 1 мг	1,0683E+15	3,8461E+16	5,6561E+15	2,4342E+15
$N_{\text{АТ}}$ (на 1 МНЧ)	462	84	151	237
$N_{\text{АТ}}$ в 1 мг МНЧ	4,94E+17	32,3E+17	8,54E+17	5,77E+17

Все реакции проводили с учетом предварительных расчетов по карбодиимидному методу (Рисунок 33). Для сохранения иммунохимической активности АТ оптимальное время инкубации с МНЧ составило 12 часов, при постоянном перемешивании и температуре +4°C. По окончании реакции раствор собирали, очищали на центрифужных фильтрах 300кДа и анализировали на содержание молекул АТ_{II} в образце и проскоке. Количественную оценку степени связывания АТ_{II} с МНЧ определяли по методу Бэдфорда. Полученные результаты позволили установить, что количество свободных АТ_{II} в проскоке, прошедшем через фильтр, находится в пределах детектируемого значения (1 – 3 мкг), что позволило подтвердить наличие АТ_{II} на МНЧ и рассчитать их количество (Рисунок 37).

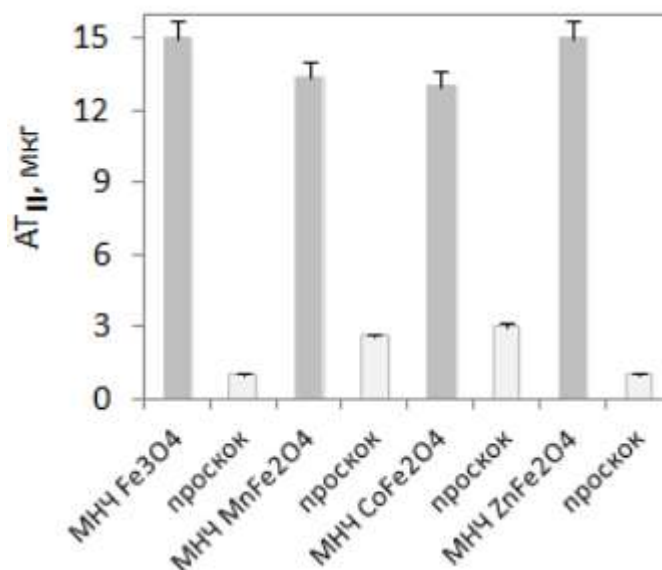


Рисунок 37 – Количество АТ_{II} в коллоиде МНЧ и в растворе, прошедшем через фильтр, после инкубации МНЧ@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II} в PBS при 4 °С в течение 12 ч

Химическую оценку стабильности МНЧ@ДОПАК@ПЭГ@АТ_{II} в буфере PBS анализировали методом ДСР, который показал, что МНЧ@АТ_{II} находятся в растворе не виде агрегатов, а отдельных МНЧ и в течение 30 суток не теряют свою стабильность. ГД диаметр всех МНЧ@ДОПАК@ПЭГ@АТ_{II} остается практически постоянным, а PDI

изменяется незначительно (Рисунок 38). Данный результат является одним из ключевых для полной реализации идеи в исследования биомолекул методом ПЭМ.

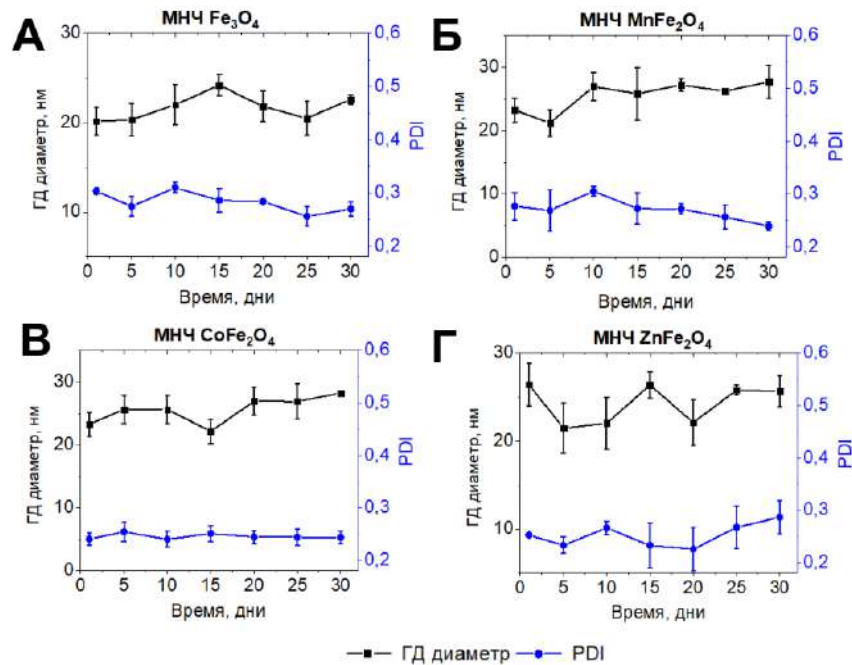


Рисунок 38 – Исследование стабильности MNCh@ДОПАК@ПЭГ@АТ_{II}

Качественную оценку специфичности связывания разработанных нанозондов MNCh@ДОПАК@ПЭГ@АТ_{II} с белковыми антигенами в клеточных компартментах презентированных в клетке исследовали методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа (ИФА). Для данного эксперимента предварительно конъюгировали MNCh с АТ_{II} флуоресцентно меченными красителем –Alexa 488. От избытка АТ_{II} очищались на центрифужных фильтрах 300 кДа. Загрузку АТ_{II} в конъюгате определяли по количеству свободных АТ_{II}, прошедших через фильтр спектрофотометрически.

Исследования проводили на линии клеток рака предстательной железы РС3 человека. Данная культура имеет крупные размеры от 15 до 30 мкм, высокую адгезию с субстратом и формирует ярко выраженные ламеллы, что облегчает визуализацию сети микротрубочек. Потенциальными мишенями были выбраны антитела к одному из компонентов клеточного цитоскелета к

белку микротрубочек α -тубулину, к многофункциональному белку межклеточных контактов β -катенину (Abcam, ab223075), к основным компартментам клетки: к ядру (Abcam, ab191181) и митохондриям (Abcam, ab92824).

Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, после непрямого ИФА, с использованием первичных антител АТ_I к белку α -тубулину и вторичных антител АТ_{II}-Alexa488, соответствуют изображениям, представленным производителем (Affinity Biosciences, T0033) (Рисунок 39 1).

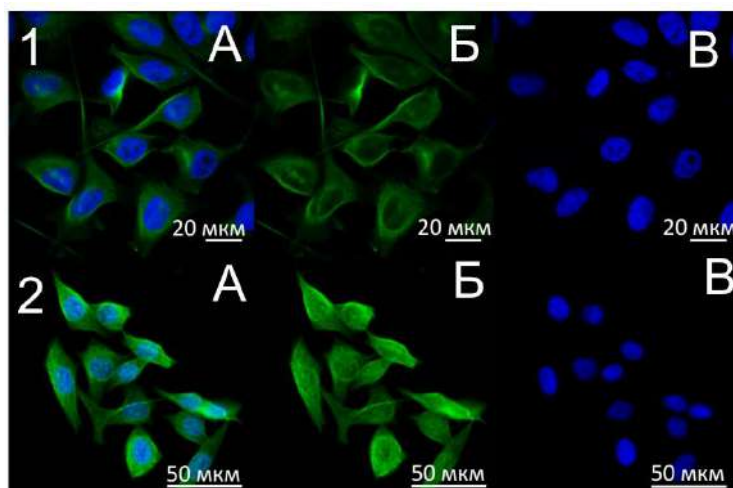


Рисунок 39 – Флуоресцентные фотографии тубулиновых микротрубочек клеток РС3 человека до и после взаимодействия с нанозондом МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II}$

А – совмещенное изображение, Б – флуоресценция вторичных козьих антител Alexa 488-anti-mouse, В – флуоресценция ядерного красителя DAPI. Цифрами обозначены следующие соединения: 1-контроль АТ_{II}-Alexa488 без МНЧ, 2- МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II}$ -Alexa488

В этой связи можно сделать вывод, что клетки РС3 экспрессируют белок α -тубулин, который расположен вокруг клеточного ядра и формирует микротрубочки, расходящиеся к периферии подобно нитям тонкой паутины (Рисунок 39 1). Схожий характер визуализации белка α -тубулина с использованием АТ_{II}-Alexa488, конъюгированных с МНЧ, позволяет

предположить, что разработанный нанозонд МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$ специфически связывается с микротрубочками белка α -тубулина и эффективно его визуализирует в клетках РСЗ человека (Рисунок 39 2).

Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, после непрямого ИФА, с использованием первичных антител АТ_{I} к белку β -катенину и вторичных антител $\text{АТ}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$, соответствуют изображениям, представленным производителем (Abcam ab223075) (Рисунок 40 1).

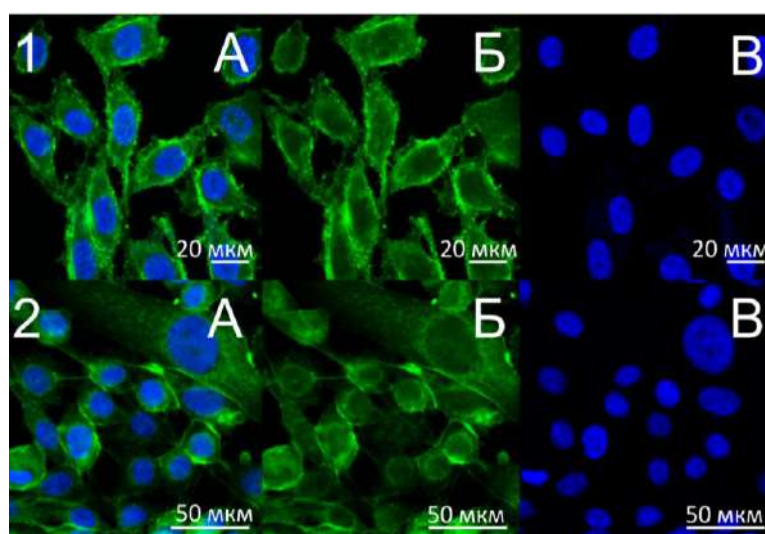


Рисунок 40 – Флуоресцентные фотографии межклеточных контактов β -катенина клеток РСЗ человека до и после взаимодействия с нанозондом МНЧ $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$

А – совмещенное изображение, Б – флуоресценция вторичных козых антител Alexa 488-anti-rabbit, В – флуоресценция ядерного красителя DAPI. Цифрами обозначены следующие соединения: 1-контроль $\text{АТ}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$ без МНЧ, 2- МНЧ $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$

В этой связи можно сделать вывод, что клетки РСЗ экспрессируют антиген, к которому специфичны антитела АТ_{I} к белку β -катенину и его экспрессия локализована в ядре, цитоплазме и на клеточной мембране (Рисунок 40 1). При высокой экспрессии β -катенина на клеточной мембране, снижается его экспрессия в ядре и цитоплазме [232; 233]. Схожий характер

визуализации белка β -катенина с использованием AT_{II} -Alexa488, конъюгированных с МНЧ, позволяет предположить, что разработанный нанозонд МНЧ $MnFe_2O_4@ДФУК@ПЭГ@AT_{II}$ -Alexa488 специфически связывается с β -катенином и эффективно его визуализирует в клетках РСЗ человека (Рисунок 40 2).

Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, после непрямого ИФА, с использованием первичных антител AT_I к митохондриям и вторичных антител AT_{II} -Alexa488, соответствуют изображениям, представленным производителем (Abcam, ab92824) (Рисунок 41 1).

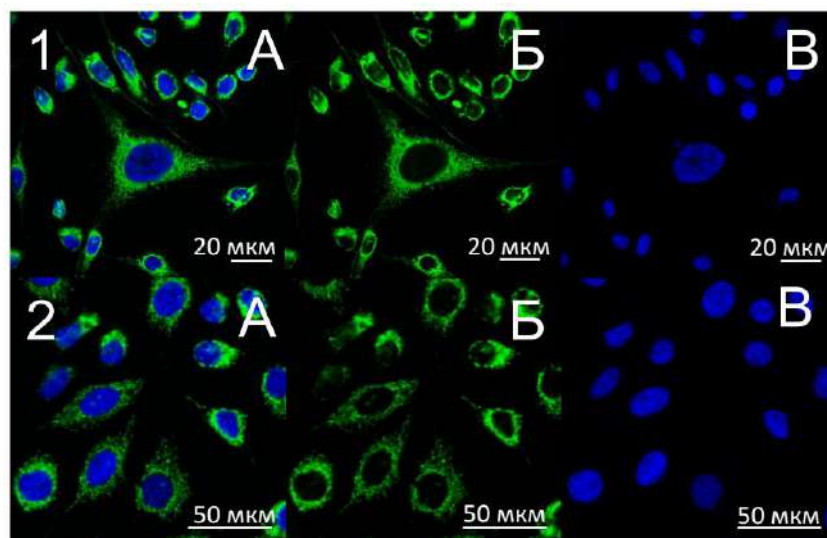


Рисунок 41 – Флуоресцентные фотографии митохондрий клеток РСЗ человека до и после взаимодействия с нанозондом МНЧ



А – совмещенное изображение; Б – флуоресценция ядерного красителя DAPI;

В – флуоресценция вторичных козьих антител Alexa 488-anti-mouse.

Цифрами обозначены следующие соединения: 1-контроль AT_{II} -Alexa488 без МНЧ, 2- МНЧ $CoFe_2O_4@ДФУК@ПЭГ@AT_{II}$ -Alexa488

Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, после непрямого ИФА, с использованием первичных антител AT_I к ядру соответствуют изображениям, представленным производителем (Abcam, ab191181) (Рисунок 42 1).

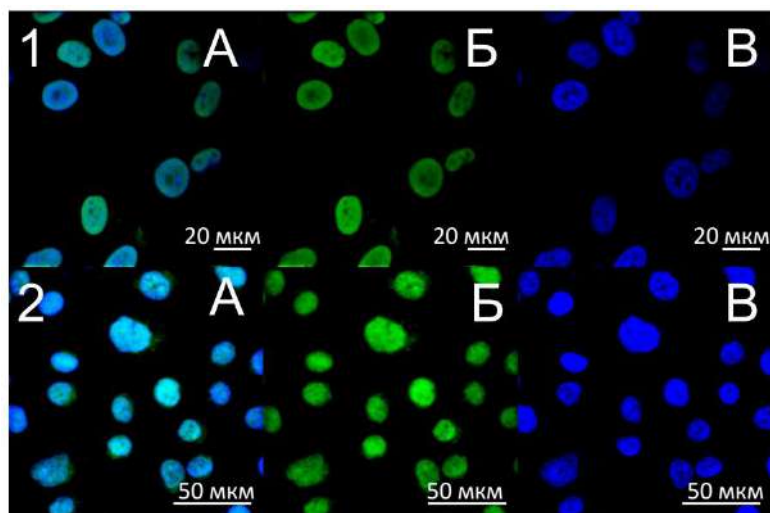


Рисунок 42 – Флуоресцентные фотографии ядра клеток РС3 человека до и после взаимодействия с нанозондом МНЧ



А – совмещенное изображение; Б – флуоресценция ядерного красителя DAPI;

В – флуоресценция вторичных козьих антител Alexa 488-anti-mouse.

Цифрами обозначены следующие соединения: 1-контроль $\text{AT}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$ без МНЧ, 2- МНЧ $\text{ZnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{AT}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$

Стоит также отметить, что локализация свечения флуоресцентных $\text{AT}_{\text{II}}\text{-Alexa 488}$ совпадает с локализацией ядерного красителя DAPI из чего можно сделать вывод, что клетки РС3 экспрессируют антиген, к которому специфичны антитела AT_{I} , и его экспрессия локализована в ядре (Рисунок 42 1). Схожий характер визуализации белкового антигена локализованного в ядре с использованием $\text{AT}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$, конъюгированных с МНЧ, позволяет предположить, что разработанный нанозонд МНЧ $\text{ZnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{AT}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$ специфически связывается с белковым антигеном в ядре и эффективно его визуализирует в клетках РС3 человека (Рисунок 42 2).

Таким образом, в ходе проведения химических реакций мы получили нанозонды, в состав которых входят вторичные моноклональные антитела меченые флуоресцентным красителем Alexa 488 ($\text{AT}_{\text{II}}\text{-Alexa488}$), которые способны специфически связываться с белковым антигеном, а также

характеризуются содержанием МНЧ Fe_3O_4 , МНЧ MnFe_2O_4 , МНЧ CoFe_2O_4 , МНЧ ZnFe_2O_4 разного элементного состава. Полученные результаты непрямого ИФА для выбранных АТ_I свидетельствуют о том, что полученные нанозонды проявляют высокую эффективность связывания по отношению к выбранным мишеням. В дополнении к вышеизложенному, анализируя все четыре нанозонда и четыре разные мишени, можно отметить, что именно АТ_I определяет специфичность связывания нанозондов с белковым антигеном презентированным в клетке.

3.4 Визуализация локализации полученных МНЧ в составе нанозонда в клетках РСЗ методом ЭМ

Если перенести иммуноцитохимическую реакцию на ультратонкий срез, и заменить флуоресцентную метку Alexa-488 конъюгированную с АТ_{II} на МНЧ сложных оксидов железа, полученных выше, МНЧ Fe_3O_4 , МНЧ MnFe_2O_4 , МНЧ CoFe_2O_4 , МНЧ ZnFe_2O_4 , то локализацию связывания с первичными АТ_I, можно исследовать с помощью ПЭМ, благодаря высокой электронной плотности МНЧ, по сравнению с биологическими объектами. За счет высокой неоднородности ультратонких срезов клеточных образцов, а также за счет элементов контрастеров, использование которых может приводить к получению артефактов, необходимо предварительно исследовать срезы клеток РСЗ методом ПЭМ в светлом поле до проведения иммунореакции и визуализировать клеточные компартменты (ядро, митохондрии, микротрубочки и клеточную мембрану), белковые антигены которые были задетектированы методом ИФА.

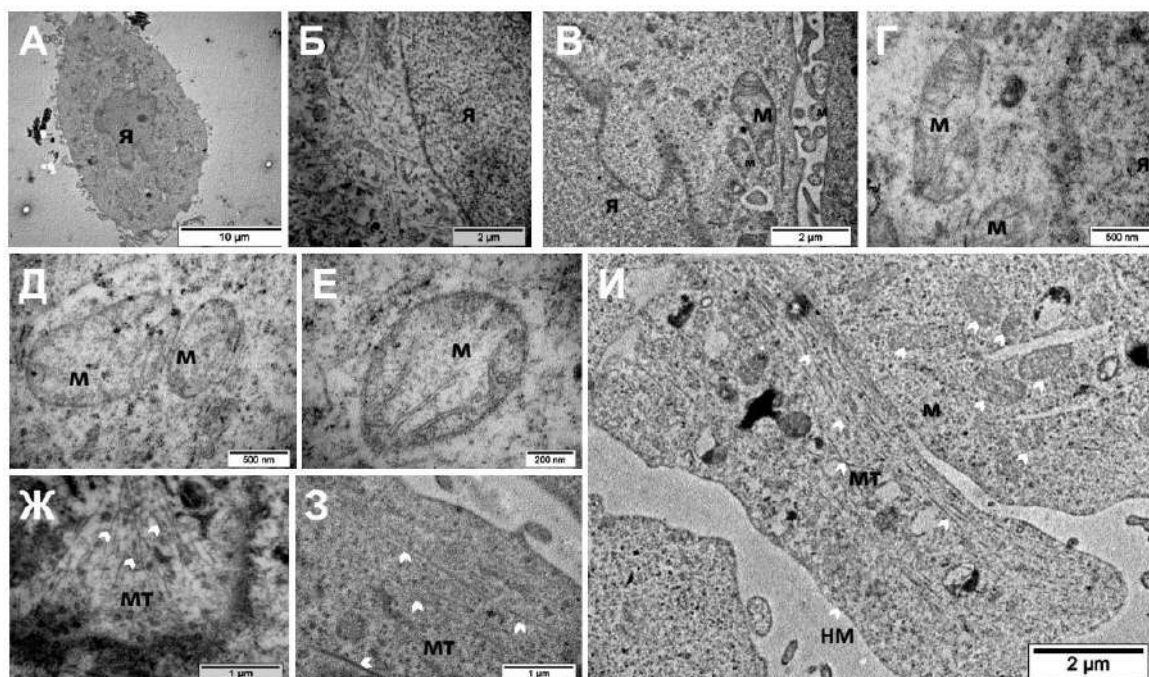


Рисунок 43 – ПЭМ-изображения клеточных компартментов, органелл культуры клеток РС3. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. Я – ядро, МТ – микротрубочки, М – митохондрия, НМ-наружная мембрана. Белыми стрелками указано расположение микротрубочек.

Под электронным микроскопом на продольном срезе нами была обнаружена клетка (Рисунок 43А), в центральной части которой локализована самая крупная округлая органелла, окруженная оболочкой из двух мембран – ядро (Рисунок 43 Б, В). Помимо этого нами были визуализированы митохондрии продольное сечение которых выглядит как вытянутый овал внутри которого находится внутренняя мембрана, образующая многочисленные складки – кристы, направленные в матрикс митохондрий (Рисунок 43В,Г,Д,Е). В среднем, в одной клетке насчитывается от 20 до 1000 митохондрий, размер которых варьируется от 0,5 мкм до 7 мкм. Также методом ПЭМ удалось обнаружить сеть микроскопических трубчатых структур (Рисунок 43 Ж,З), известных как микротрубочки, которые являются частью цитоскелета клетки и имеют толщину около 20-25 нм. Микротрубочки стабилизируются вокруг ядра, у края клетки, а также в ламеллах (Рисунок 43 И). Клеточная мембрана под электронным

микроскопом представляет собой электронно-плотный слой, разделенный электронно-плотным прозрачным промежутком (Рисунок 43И). Полученные микрофотографии клеточных компартментов хорошо согласуются с результатами работ представленными ранее в научной литературе [233–237,238,239].

Проведенные эксперименты на ультратонких срезах РСЗ после связывания нанозонда МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ с первичными АТ_{I} к белку α -тубулину показали, что более выраженное накопление МНЧ отмечено в основном в цитоплазме на одиночных или сгруппированных трубчатых структурах (Рисунок 44А).

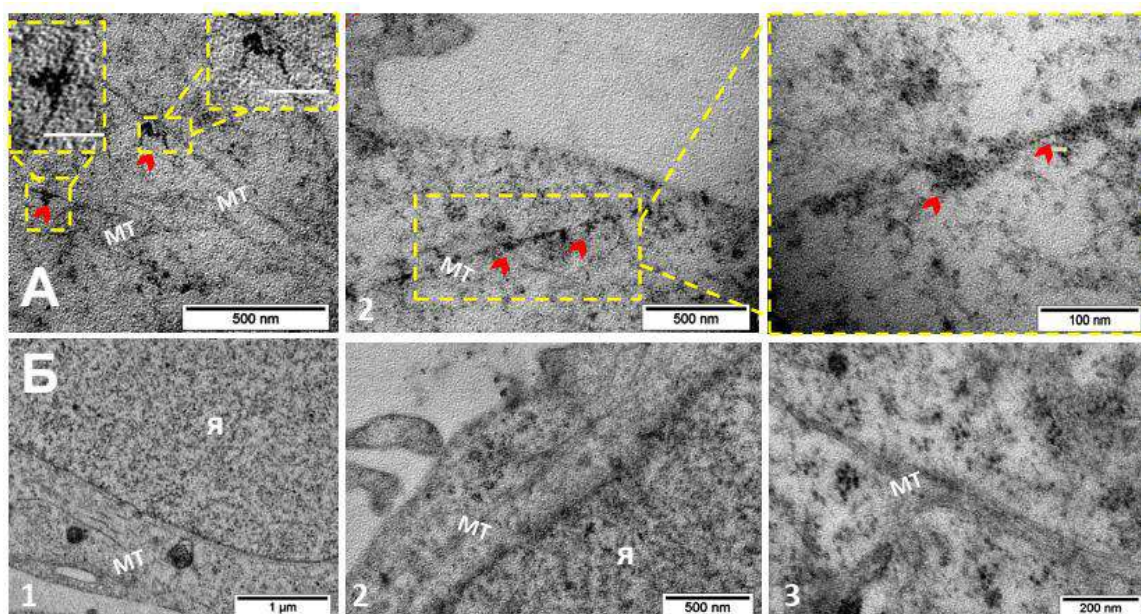


Рисунок 44 – ПЭМ-изображения электронноплотных включений на микротрубочках, выявленных, после иммунореакции нанозонда МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ на клетках РСЗ. Масштабный отрезок выделенной области 50 нм. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. Я – ядро, МТ – микротрубочки. Красными стрелками обозначены обнаруженные МНЧ. А – Микрофотографии тубулиновых микротрубочек и локализованных на них МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ после иммунореакции; Б – Микрофотографии тубулиновых микротрубочек после иммунореакции без инкубации с АТ_{I} .

Высокие концентрации МНЧ встречаются вдоль отростков микротрубочек расположенных в клетке параллельно или пересекающих плоскость среза, что хорошо согласуется с результатами ИФА анализа (Рисунок 39). Для доказательства специфичности связывания нанозонда МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ проводили иммунореакцию на клетках РС3, без первичных АТ_{I} , при анализе ПЭМ-микрофотографий МНЧ на тубулиновых микротрубочках задетектировано не было (Рисунок 44Б). В ядрах МНЧ не выявлены.

Проведенные эксперименты на ультратонких срезах клеток РС3 после связывания нанозонда МНЧ $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ с первичными АТ_{I} к β -катенину показали, что МНЧ преимущественно располагаются на границе клеток (Рисунок 45А), что хорошо согласуется с локализацией антигена полученного при проведении ИФА анализа (Рисунок 40).

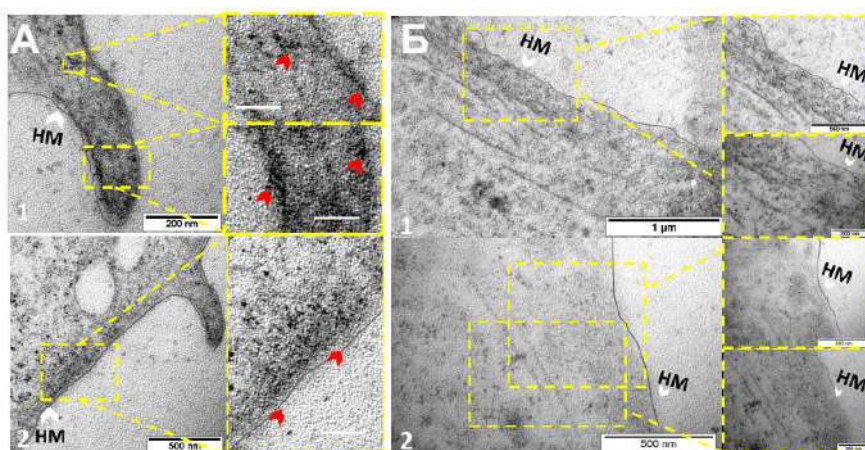


Рисунок 45 – ПЭМ-изображения электронноплотных включений на клеточной мембране, выявленных, после иммунореакции нанозонда МНЧ $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ на клетках РС3. Масштабный отрезок выделенной области 50 нм. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. НМ-наружная мембрана.

Красными стрелками обозначены обнаруженные МНЧ.

А – Микрофотографии клеточной мембраны и расположенных вдоль нее МНЧ $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ после иммунореакции;

Б – Микрофотографии клеточной мембраны после иммунореакции без инкубации с АТ_{I} .

Для доказательства специфичности связывания МНЧ с β -катенином была проведена иммунореакция с нанозондом без первичных АТ_I, при анализе ПЭМ-микрофотографий МНЧ на клеточной мембране задетектировано не было (Рисунок 45Б).

Проведенные эксперименты на ультратонких срезах клеток РС3 после связывания нанозонда МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ с первичными АТ_I специфичными к белковому антигену в митохондриях показали, что большинство МНЧ располагается над митохондриальным матриксом. В некоторых местах наблюдается выравнивание МНЧ вдоль внутренней мембраны и крист (Рисунок 46А).

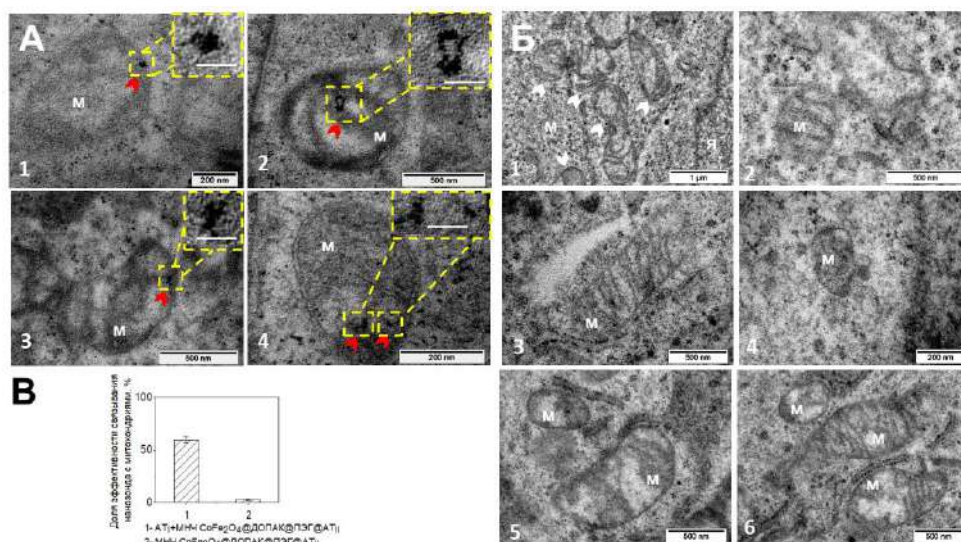


Рисунок 46 – ПЭМ-изображения электронноплотных включений в митохондриях, выявленных, после иммунореакции нанозонда МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ на клетках РС3. Масштабный отрезок выделенной области 50 нм. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. Я – ядро, М – митохондрии.

Красными стрелками обозначены обнаруженные МНЧ.

А – Микрофотографии митохондрий и локализованных на них МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ после иммунореакции;

Б – Микрофотографии митохондрий после иммунореакции без инкубации с АТ_I; В – Доля эффективности связывания нанозонда с митохондриями после проведения иммунореакции.

Для доказательства специфичности связывания нанозонда проводили инкубацию с МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II}$ на клеточном срезе без первичных $АТ_I$. По полученным ПЭМ-микрофотографиям (Рисунок 46Б) можно сделать вывод о том, что единичные МНЧ CoFe_2O_4 иногда наблюдаются в цитоплазме, и не ассоциируются с отдельными клеточными структурами. Долю эффективности связывания нанозонда МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II}$ с белковым антигеном в митохондриях оценивали отношением общего количества митохондрий в клетке к числу митохондрий, в которых обнаружены МНЧ после иммунореакции. Таким образом, в нашем случае было промаркировано 12 митохондрий из 20 возможных, что составляет 60%.

В дополнении, для того, чтобы убедиться в точной локализации МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ДФУК@ПЭГ@АТ_{II}$ была проведена СПЭМ-НАADF микроскопия митохондрии и получены изображения высокого разрешения (Рисунок 47). Митохондрия на микрофотографии имеет форму вытянутого овала. В светлый цвет окрашены мембранные структуры, которые дополнительно были покрашены UranylLess и Lead Citrate и тетраоксидом осмия.

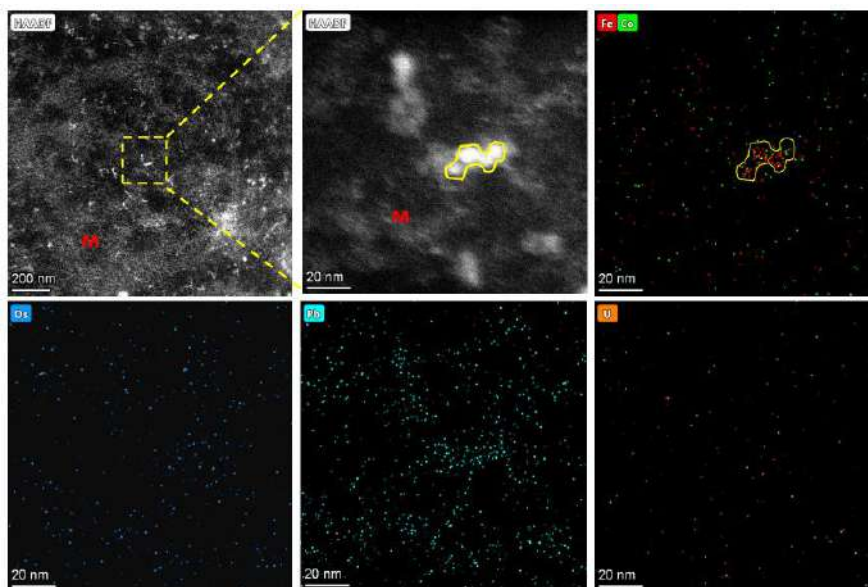


Рисунок 47 – СПЭМ изображение, элементные индивидуальные ЭДРС карты высокоспецифичного зонда $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ДФУК@ПЭГ@МАТ_{II}$ в митохондрии в клетках РС3. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. М – митохондрии.

Стоит обратить внимание на то, что МНЧ CoFe_2O_4 @ДФУК@ПЭГ@МАТ_{II} сохраняют свою исходную морфологию и, практически не претерпевают изменений в биологическом окружении, в процессе пробоподготовки. МНЧ представляют собой светлые яркие включения на фоне темного биологического матрикса. ЭДСР анализ МНЧ позволяет идентифицировать очень маленькие единичные 4 нм МНЧ CoFe_2O_4 . Композиционные ЭДСР карты (Рисунок 47) показали, что МНЧ CoFe_2O_4 , локализованы в митохондриях, им соответствуют интенсивные характеристические ЭДРС сигналы Co и Fe. Согласно количественным ЭДРС данным, усредненное соотношение Co:Fe составляет $34 \pm 5 : 66 \pm 5$ атомных процентов и близко к 1:2. Согласно количественным данным относительное содержание свинца, осмия и железа с кобальтом неоднородно, интенсивные ЭДРС сигналы от Pb, U и Os не совпадают с расположением МНЧ CoFe_2O_4 . Применение метода СПЭМ в светлопольном режиме для выявления и визуализации, клеточных компартментов МНЧ не дало дополнительных преимуществ относительно метода ПЭМ. Однако ЭДСР анализ в тандеме с СПЭМ HAADF позволил обнаружить с высоким разрешением единичные МНЧ в биологическом образце и достоверно идентифицировать их катионный состав.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За счет высокого разрешения до 0,1 нм ЭМ становится все более популярным методом исследования биологических структур на субмолекулярном уровне. Коллоидное золото – широко используется, применяется в качестве электронно-плотного маркера антител для детекции биомолекул в клетке методом ПЭМ. Для большинства научных исследований интересно и необходимо проводить одновременную детекцию нескольких мишеней, что сложно и трудоемко, если использовать метод иммуномечения золотыми наночастицами. Поиск новых подходов и методов решения этой задачи осатется актуальным и интересным. В ходе проведенного исследования в данной диссертационной работе был разработан способ получения и синтезированы МНЧ сложных оксидов железа Fe_3O_4 и MFe_2O_4 с контролируемым элементным составом и магнитными свойствами. Полученные результаты позволили использовать МНЧ синтезированные в БС, как перспективный материал для создания нанозонда, что было подтверждено экспериментами *in vitro* на клетках. В результате модифицирования поверхности МНЧ молекуламиДФУК и ПЭГ удалось получить стабильные в водных растворах при физиологических условиях МНЧ Fe_3O_4 и МНЧ MFe_2O_4 . Отработанные подходы были применены в задачах по изучению загрузки АТ на МНЧ.

Все выбранные четыре типа МНЧ были успешно конъюгированы с АТ, которые оказались стабильными и не потеряли своей иммунореактивности, по отношению к белковым антигенам расположенным в клетках РСЗ: к белку микротрубочек α -тубулину, к многофункциональному белку межклеточных контактов β -катенину, к основным клеточным компартментам: к ядру и митохондриям.

Полученные результаты также позволили рассматривать синтезированные конъюгаты МНЧ с АТ, как перспективный и эффективный препарат для решения задач ПЭМ-визуализации биомолекул, который

позволит производить детекцию нескольких белковых антигенов, что было подтверждено в ходе экспериментов *in vitro* на ультратонких срезах клеток рака предстательной железы человека РС3.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

1. Разработаны методы синтеза однофазных высококристаллических МНЧ Fe_3O_4 , МНЧ MnFe_2O_4 , МНЧ CoFe_2O_4 и МНЧ ZnFe_2O_4 в БС с размером магнитного ядра 7 ± 1 нм, 3 ± 1 нм, 4 ± 1 нм и 5 ± 1 нм соответственно и заданным элементным соотношением $\text{Mn,Co,Zn:Fe}=1:2,1:6,1;10$. Для МНЧ Fe_3O_4 , МНЧ MnFe_2O_4 , МНЧ CoFe_2O_4 и МНЧ ZnFe_2O_4 , неконтролируемого элементного состава, полученных из ДБЭ с добавлением ОК, размер магнитного ядра варьировался от синтеза к синтезу и составил 10 ± 2 нм для МНЧ Fe_3O_4 , 9 ± 3 нм, 7 ± 2 нм, 4 ± 1 нм для МНЧ MnFe_2O_4 , 8 ± 2 нм, 7 ± 2 нм, 8 ± 2 нм для МНЧ CoFe_2O_4 и 8 ± 2 нм, 9 ± 2 нм, 10 ± 3 нм для МНЧ ZnFe_2O_4 . Предложено объяснение, что ключевую роль в синтезе МНЧ с контролируемым элементным составом играют восстановители, присутствующие в реакционной смеси: ОК и бензойный альдегид, образующийся при разложении ДБЭ.

2. Методами РФА и мессбауэровской спектроскопии было доказано, что МНЧ обладают кубической кристаллической структурой шпинели и являются чистыми магнетитом и ферритами, характеризуются пространственной группой $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ и проявляют суперпарамагнитные свойства. Изучено влияние элементного состава на магнитные свойства для МНЧ из БС. Установлено, что удельная намагниченность насыщения для МНЧ MnFe_2O_4 и МНЧ CoFe_2O_4 возрастает и достигает своего максимума в точке $\text{Mn,Co:Fe}\approx 1:6$, после чего идет на спад.

3. Показано, что поверхность МНЧ может быть функционализирована органической оболочкой посредством реализации механизма прямого ковалентного связывания МНЧ непосредственно с лигандом. Было выявлено, что в результате модификации молекулами

ДФУК, МНЧ стабильны в dH_2O и имеют средний гидродинамический размер, 19 ± 1 нм для МНЧ Fe_3O_4 , 12 ± 1 нм для МНЧ $MnFe_2O_4$, 19 ± 2 нм для МНЧ $CoFe_2O_4$ и 18 ± 1 нм для МНЧ $ZnFe_2O_4$ который, с учетом величины органической оболочки и толщины двойного электрического слоя, сравним с размером единичного магнитного ядра. Введение дополнительной стадии модификации поверхности МНЧ молекулами ПЭГ-СООН позволило обеспечить агрегативную устойчивость МНЧ в PBS и сохранить ее в течение 48 часов. ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием подтвердила наличие пиков поглощения, соответствующее функциональным группам используемых в реакциях органических лигандов ДФУК и ПЭГ-СООН.

4. Разработан оригинальный метод конъюгации АТ с модифицированными МНЧ, который позволил сохранить агрегативную устойчивость разработанного конъюгата в течение 30 дней, при этом PDI изменялся незначительно (0,240-0,305). Экспериментально было установлено, что включение АТ в состав конъюгата не влияет на их иммунохимические свойства, что подтверждено медом ИФА.

5. Методом ПЭМ обнаружено связывание АТ_{II} в составе МНЧ с первичными антителами к β -катенину, α -тубулину микротрубочек и белковому антигену митохондрий. Методом СПЭМ НАADF установлено, что интенсивные ЭДРС сигналы от Fe, Co совпадают с расположением МНЧ $CoFe_2O_4$. Согласно количественным ЭДРС данным, усредненное значение Co:Fe составляет $34 \pm 5:66 \pm 5$ атомных процентов и близко к 1:2.

Учитывая тот факт, что в настоящее время отсутствуют аналоги агента «Immunogold», полученные в данной работе нанозонды позволили упростить и расширить функциональность уже имеющегося агента. Разработанные нанозонды перспективны и позволят в дальнейшем выяснить многие нерешенные проблемы и неизвестные аспекты, например, позволят определить точное место связывания вирусных частиц с конкретными

белками с точностью до нанометров. Описанные в диссертационной работе методики визуализации белковых антигенов на ультратонких клеточных срезах методом ПЭМ требуют дополнительной оптимизации для более точного прогнозирования результата. В частности, дополнительно требуется более детальное исследование по разработке методик визуализации одновременно нескольких биомолекул на ультратонких срезах методом ПЭМ. Также необходим более детальный подбор параметров для проведения съемки на СПЭМ HAADF в тандеме с ЭДСР.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТ	антитело
АТ _I	первичное антитело
АТ _{II}	вторичное антитело
БС	бензиловый спирт
ДБЭ	дибензиловый эфир
ДСР	динамическое светорассеяние
ДФУК	3,4-дигидроксифенилуксусная кислота
ГД	гидродинамический
ИК	инфракрасная спектроскопия
ИФА	иммунофлуоресцентный анализ
МНЧ	магнитные наночастицы
МП АЭС	атомно-эмиссионная спектроскопия с микроволновой плазмой
МРТ	магнитно-резонансная томография
НЧ	наночастицы
ОК	олеиновая кислота
ПАВ	поверхностно-активное вещество
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ПЭИ	полиэтиленимин
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
РФА	рентгенофазовый анализ
РЭМ	растровая электронная микроскопия
РМА	электронно-зондовый микроанализ
СПЭМ	сканирующая темнопольная электронная микроскопия
СПЭЭ	спектроскопия потерь энергии электронов
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ЭД	электронная дифракция
ЭДРС	энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

ЭМ	электронная микроскопия
Acac	ацетилацетонат
Alexa 488	сульфированный зеленый флуоресцентный краситель
Ar	аргон
CH ₃ OH	метанол
Co(acac) ₂	ацетилацетонат кобальта (II)
CoFe ₂ O ₄	наночастицы феррита кобальта
Cy5	цианин-5-амин
DPBS	фосфатно-солевой буфер Дульбекко
EDC	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
FBS	сыворотка новорожденных телят
Fe(acac) ₃	ацетилацетонат железа (III)
Fe ₃ O ₄	наночастицы магнетита
GFAP	глиальный фибриллярный кислый белок
HAADF	кольцевой детектор электронов рассеивающий на высокие углы в темном поле
HBSS	солевой раствор Хенкса
Lead Citrate	цитрат свинца
Mn(acac) ₂	ацетилацетонат марганца (II)
MnFe ₂ O ₄	наночастицы феррита марганца
NaOH	гидроксид натрия
NHS	N-гидроксисукцинимид
PDI	индекс полидисперсности
PBS	натрий-фосфатный буфер
RPMI 1640	культуральная среда roswell park memorial institute
TRIS	трис(гидроксиметил)аминометан
UranylLess	уранил ацетат
Zn(acac) ₂	ацетилацетонат цинка (II)
ZnFe ₂ O ₄	наночастицы феррита цинка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. Vol. 47 / Феофанов А.В. – 2007. – 371-410 p.
2. Ettinger, A. Fluorescence live cell imaging / A. Ettinger, T. Wittmann // *Methods in Cell Biology*. – 2014. – P. 77-94.
3. Lippincott-Schwartz, J. Development and use of fluorescent protein markers in living cells / J. Lippincott-Schwartz, G.H. Patterson // *Science*. – 2003. – Vol. 300. – P. 87-91. DOI: 10.1126/science.1082520.
4. Dobrucki, J.W. Fluorescence Microscopy / J.W. Dobrucki, U. Kubitscheck // *Nature methods*. – 2017. – Vol. 2. – № 12. – P. 910-919. DOI: 10.1002/9783527687732.ch3.
5. Schermelleh, L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy / L. Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt // *Journal of Cell Biology*. – 2010. – Vol. 190. – № 2. – P. 165-175. DOI: 10.1083/jcb.201002018.
6. Stehbens, S. Imaging intracellular protein dynamics by spinning disk confocal microscopy / S. Stehbens, H. Pemble, L. Murrow, T. Wittmann // *Methods in Enzymology*. – 2012. – Vol. 504. – P. 293-313. DOI: 10.1016/B978-0-12-391857-4.00015-X.
7. Wayne, R. The dependence of image formation on the nature of Light / R. Wayne // *Light and Video Microscopy*. – 2014. – P. 43-78. DOI: 10.1016/b978-0-12-411484-5.00003-2.
8. Requejo-Isidro, J. Fluorescence nanoscopy. Methods and applications / J. Requejo-Isidro // *Journal of Chemical Biology*. – 2013. – Vol. 6. – P. 97-120. DOI: 10.1007/s12154-013-0096-3.
9. Fernández-Suárez, M. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells / M. Fernández-Suárez, A.Y. Ting // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2008. – Vol. 9. – P. 929-943. DOI: 10.1038/nrm2531.
10. Ryabichk, S.S. Super-resolution microscopy in studying the structure and function of the cell nucleus / S.S. Ryabichk, A.N. Ibragimo, L.A. Lebedev et

al. // *Acta Naturae*. – 2017. – Vol. 9. – № 4. – P. 42-51. DOI: 10.32607/20758251-2017-9-4-42-51.

11. Gustafsson, M.G.L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy / M.G.L. Gustafsson // *Journal of Microscopy*. – 2000. – Vol. 198. – № 2. – P. 82-87. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.

12. Yamanaka, M. Introduction to super-resolution microscopy / M. Yamanaka, N.I. Smith, K. Fujita // *Microscopy*. – 2014. – Vol. 63. – № 3. – P. 177-192. DOI: 10.1093/jmicro/dfu007.

13. Haase, S. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy / S. Haase, B. Burke, L. Schermelleh et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 320. – P. 1332-1336. DOI: 10.1126/science.1156947.

14. Hell, S.W. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy / S.W. Hell, J. Wichmann // *Optics Letters*. – 1994. – Vol. 19. – № 11. – P. 780-782. DOI: 10.1364/ol.19.000780.

15. Blom, H. STED microscopy: Increased resolution for medical research? / H. Blom, H. Brismar // *Journal of Internal Medicine*. – 2014. – P. 1-19. DOI: 10.1111/joim.12278.

16. Müller, T. STED microscopy and its applications: New insights into cellular processes on the nanoscale / T. Müller, C. Schumann, A. Kraegeloh // *ChemPhysChem*. – 2012. – Vol. 13. – P. 1986-2000. DOI: 10.1002/cphc.201100986.

17. Hell, S.W. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement / S.W. Hell, R. Jahn, M.A. Lauterbach et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 320. – P. 246-249. DOI: 10.1126/science.1154228.

18. Bonhoeffer, T. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy / T. Bonhoeffer, K.I. Willig, S.W. Hell et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 48. – P. 18982-18987.

DOI: 10.1073/pnas.0810028105.

19. Berning, S. Nanoscopy in a living mouse brain / S. Berning, K.I. Willig, H. Steffens et al. // *Science*. – 2012. – Vol. 335. – P. 551. DOI: 10.1126/science.1215369.

20. Hell, S.W. Toward fluorescence nanoscopy / S.W. Hell // *Nature Biotechnology*. – 2003. – Vol. 21. – № 11. – P. 1347-1355. DOI: 10.1038/nbt895.

21. Bückers, J. Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses / J. Bückers, D. Wildanger, S.W. Hell et al. // *Optics Express*. – 2011. – Vol. 19. – № 4. – P. 3130-3143. DOI: 10.1364/oe.19.003130.

22. Betzig, E. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution / E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat et al. // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – № 5793. – P. 1642-1645. DOI: 10.1126/science.1127344.

23. Rust, M.J. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). / M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang // *Nature methods*. – 2006. – Vol. 3. – № 10. – P. 793-795. DOI: 10.1038/nmeth929.

24. Hess, S.T. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy / S.T. Hess, T.P.K. Girirajan, M.D. Mason // *Biophysical Journal*. – 2006. – Vol. 91. – № 11. – P. 4258-4272. DOI: 10.1529/biophysj.106.091116.

25. Whelan, D.R. Super-resolution single-molecule localization microscopy: Tricks of the trade / D.R. Whelan, T.D.M. Bell // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2015. – Vol. 6. – № 3. – P. 374-382. DOI: 10.1021/jz5019702.

26. Signaling, S.A.T. Super-resolution analysis of TCR-dependent signaling: single-molecule localization microscopy / S.A.T. Signaling, V.A. Barr, J. Yi, L.E. Samelson // *The immune synapse: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 1584. – P. 183-206. DOI: 10.1007/978-1-4939-6881-7.

27. Мишин, А.С. Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения живых клеток / А.С. Мишин, К.А. Лукьянов // *Успехи*

биологической химии. – 2019. – Vol. 59. – P. 39-66.

28. East, J.M. Membrane trafficking / J.M. East // *Molecular Membrane Biology*. – 2010. – Vol. 27. – № 8. – P. 383-384. DOI: 10.3109/09687688.2010.541162.

29. Inkson, B.J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization / B.J. Inkson // *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. – 2016. – P. 17-43. DOI: 10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X.

30. Zhou, W. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM) / W. Zhou, R. Apkarian, Z.L. Wang, D. Joy // *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. – 2007. – P. 1-40. DOI: 10.1007/978-0-387-39620-0_1.

31. Tang, C.Y. Transmission Electron Microscopy (TEM) / C.Y. Tang, Z. Yang // *Membrane Characterization*. – Elsevier B.V., 2017. – P. 145-159.

32. К.Н. Морозова. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях / К.Н. Морозова. – 2013. – 1-85 p.

33. Brydson, R. Analytical transmission electron microscopy. Reviews in mineralogy and geochemistry / R. Brydson, A. Brown, L.G. Benning, K. Livi // *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*. – 2014. – Vol. 78. – № 1. – P. 6-51. DOI: 10.2138/rmg.2014.78.6.

34. Kishore, R. Transmission electron microscopy and X-ray diffraction analysis of aluminum-induced crystallization of amorphous silicon in α -Si:H/Al and Al/ α -Si:H structures / R. Kishore, C. Hotz, H.A. Naseem, W.D. Brown // *Microscopy and Microanalysis*. – 2005. – Vol. 11. – № 2. – P. 133-137. DOI: 10.1017/S1431927605050208.

35. D'Amico, F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry / F. D'Amico, E. Skarmoutsou, F. Stivala // *Journal of Immunological Methods*. – 2009. – Vol. 341. – № 1-2. – P. 1-18. DOI: 10.1016/j.jim.2008.11.007.

36. Diaz, E. Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin:

a peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli* / E. Diaz, E. Garcia, C. Ascaso et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – Vol. 264. – № 2. – P. 1238-1244. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)85077-9.

37. Melo, R.C.N. Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes / R.C.N. Melo, E. Morgan, R. Monahan-Earley et al. // *Nature Protocols*. – 2014. – Vol. 9. – № 10. – P. 2382-2394. DOI: 10.1038/nprot.2014.163.

38. Shahidi, R. A serial multiplex immunogold labeling method for identifying peptidergic neurons in connectomes / R. Shahidi, E.A. Williams, M. Conzelmann et al. // *eLife*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1-24. DOI: 10.7554/eLife.11147.

39. Hussain, S. A possible postsynaptic role for SNAP-25 in hippocampal synapses / S. Hussain, H. Ringsevjen, M. Schupp et al. // *Brain Structure and Function*. – 2019. – Vol. 224. – № 2. – P. 521-532. DOI: 10.1007/s00429-018-1782-2.

40. Gundersen, V. Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: A quantitative immunogold analysis in rat hippocampus / V. Gundersen, F.A. Chaudhry, J.G. Bjaalie et al. // *Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18. – № 16. – P. 6059-6070. DOI: 10.1523/jneurosci.18-16-06059.1998.

41. Mayhew, T.M. Multiple-labelling immunoEM using different sizes of colloidal gold: Alternative approaches to test for differential distribution and colocalization in subcellular structures / T.M. Mayhew, J.M. Lucocq // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2011. – Vol. 135. – № 3. – P. 317-326. DOI: 10.1007/s00418-011-0788-0.

42. Con, A. Colloidal gold, ferritin and peroxidase as markers for electron microscopic double labeling lectin techniques / A. Con // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 1978. – Vol. 26. – № 3. – P. 163-169.

43. Nishi, Y. Changes in subcellular distribution of n-octanoyl or n-decanoyl ghrelin in ghrelin-producing cells / Y. Nishi, H. Mifune, A. Yabuki et al.

// *Frontiers in Endocrinology*. – 2013. – Vol. 4. – № 84. – P. 1-9. DOI: 10.3389/fendo.2013.00084.

44. Bendayan, M. Double immunocytochemical labeling applying the protein A-gold technique / M. Bendayan // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 1982. – Vol. 30. – № 1. – P. 81-85. DOI: 10.1177/30.1.6172469.

45. Hyeon, T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles / T. Hyeon // *Chemical Communications*. – 2003. – Vol. 3. – № 8. – P. 927-934. DOI: 10.1039/b207789b.

46. Chin, A.B. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure / A.B. Chin, I.I. Yaacob // *Journal of Materials Processing Technology*. – 2007. – Vol. 191. – № 1-3. – P. 235-237. DOI: 10.1016/j.jmatprotec.2007.03.011.

47. Albornoz, C. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid / C. Albornoz, S.E. Jacobo // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2006. – Vol. 305. – № 1. – P. 12-15. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.11.021.

48. Kim, E.H. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent / E.H. Kim, H.S. Lee, B.K. Kwak, B.K. Kim // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2005. – Vol. 289. – P. 328-330. DOI: 10.1016/j.jmmm.2004.11.093.

49. Wan, J. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods / J. Wan, X. Chen, Z. Wang et al. // *Journal of Crystal Growth*. – 2005. – Vol. 276. – № 3-4. – P. 571-576. DOI: 10.1016/j.jcrysgr.2004.11.423.

50. Unni, M. Thermal decomposition synthesis of iron oxide nanoparticles with diminished magnetic dead Layer by controlled addition of oxygen / M. Unni, A.M. Uhl, S. Savliwala et al. // *ACS Nano*. – 2017. – Vol. 11. – № 2. – P. 2284-2303. DOI: 10.1021/acsnano.7b00609.

51. Kim, Y. Il. Synthesis and characterization of CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method / Y. Il

Kim, D. Kim, C.S. Lee // *Physica B: Condensed Matter*. – 2003. – Vol. 337. – № 1-4. – P. 42-51. DOI: 10.1016/S0921-4526(03)00322-3.

52. Ansari, S.A.M.K. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and functionalization for biomedical applications in the Central Nervous System / S.A.M.K. Ansari, E. Ficiarà, F.A. Ruffinatti et al. // *Materials*. – 2019. – Vol. 12. – № 3. – P. 1-24. DOI: 10.3390/ma12030465.

53. Itani, R. SiRNA conjugated nanoparticles—a next generation strategy to treat lung cancer / R. Itani, A. Al Faraj // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 23. – P. 1-15. DOI: 10.3390/ijms20236088.

54. Heinz, H. Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications / H. Heinz, C. Pramanik, O. Heinz et al. // *Surface Science Reports*. – 2017. – Vol. 72. – № 1. – P. 1-58. DOI: 10.1016/j.surfrep.2017.02.001.

55. Boutonnet, M. The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions / M. Boutonnet, J. Kizling, P. Stenius, G. Maire // *Colloids and Surfaces*. – 1982. – Vol. 5. – № 3. – P. 209-225. DOI: 10.1016/0166-6622(82)80079-6.

56. Woo, K. Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles / K. Woo, J. Hong, S. Choi et al. // *Chemistry of Materials*. – 2004. – Vol. 16. – № 14. – P. 2814-2818. DOI: 10.1021/cm049552x.

57. Wu, W. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies / W. Wu, Q. He, C. Jiang // *Nanoscale Research Letters*. – 2008. – Vol. 3. – № 11. – P. 397-415. DOI: 10.1007/s11671-008-9174-9.

58. Pileni, M.P. The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals / M.P. Pileni // *Nature Materials*. – 2003. – Vol. 2. – № 3. – P. 145-150. DOI: 10.1038/nmat817.

59. Sanchez-Dominguez, M. New trends on the synthesis of inorganic nanoparticles using microemulsions as confined reaction media / M. Sanchez-Dominguez, C. Aubery, C. Solans // *Smart Nanoparticles Technology*. – 2012. – № May 2014. – P. 195-220. DOI: 10.5772/33010.

60. Faraji, M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications / M. Faraji, Y. Yamini, M. Rezaee // *Journal of Iranian Chemical Society*. – 2010. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-37.
61. Housaindokht, M.R. Study the effect of HLB of surfactant on particle size distribution of hematite nanoparticles prepared via the reverse microemulsion / M.R. Housaindokht, A. Nakhaei Pour // *Solid State Sciences*. – 2012. – Vol. 14. – № 5. – P. 622-625. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2012.01.016.
62. Caponetti, E. Synthesis, size control, and passivation of CdS nanoparticles in water/AOT/n-heptane microemulsions / E. Caponetti, L. Pedone, D. Chillura Martino et al. // *Materials Science and Engineering C*. – 2003. – Vol. 23. – № 4. – P. 531-539. DOI: 10.1016/S0928-4931(03)00030-4.
63. Lakshmanan, R. Microemulsion prepared magnetic nanoparticles for phosphate removal: Time efficient studies / R. Lakshmanan, C. Okoli, M. Boutonnet et al. // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2014. – Vol. 2. – № 1. – P. 185-189. DOI: 10.1016/j.jece.2013.12.008.
64. Pileni, M.P. Fabrication and properties of nanosized material made by using colloidal assemblies as templates / M.P. Pileni // *Crystal Research and Technology*. – 1998. – Vol. 33. – № 7-8. – P. 1155-1186. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4079(199810)33:7/8<1155::AID-CRAT1155>3.0.CO;2-A.
65. Lee, Y. Large-scale synthesis of uniform and crystalline magnetite nanoparticles using reverse micelles as nanoreactors under reflux conditions / Y. Lee, J. Lee, C.J. Bae et al. // *Advanced Functional Materials*. – 2005. – Vol. 15. – № 3. – P. 503-509. DOI: 10.1002/adfm.200400187.
66. Ali, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles / A. Ali, H. Zafar, M. Zia et al. // *Nanotechnology, Science and Applications*. – 2016. – Vol. 9. – P. 49-67. DOI: 10.2147/NSA.S99986.
67. Soenen, S.J.H. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: An overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes / S.J.H. Soenen, M. De Cuyper // *Contrast Media and*

Molecular Imaging. – 2009. – Vol. 4. – № 5. – P. 207-219. DOI: 10.1002/cmimi.282.

68. Roca, A.G. Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / A.G. Roca, R. Costo, A.F. Rebolledo, P. Tartaj. – 2009. – Vol. 224002. DOI: 10.1088/0022-3727/42/22/224002.

69. Nejati-Koshki, K. Synthesis and in vitro study of cisplatin-loaded Fe₃O₄ nanoparticles modified with PLGA-PEG6000 copolymers in treatment of lung cancer / K. Nejati-Koshki, M. Mesgari, E. Ebrahimi et al. // Journal of Microencapsulation. – 2014. – Vol. 31. – № 8. – P. 815-823. DOI: 10.3109/02652048.2014.940011.

70. Tartaj, P. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / P. Tartaj, M. Del Puerto Morales, S. Veintemillas-Verdaguer et al. // Journal of Physics D: Applied Physics. – 2003. – Vol. 36. – № 13. DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/202.

71. Viau, G. Heterogeneous nucleation and growth of metal nanoparticles in polyols / G. Viau, P. Toneguzzo, A. Pierrard et al. // Scripta Materialia. – 2001. – Vol. 44. – P. 2263-2267. DOI: 10.1016/S1359-6462(01)00752-7.

72. Giri, A.K. AC magnetic properties of compacted FeCo nanocomposites / A.K. Giri, K.M. Chowdary, S.A. Majetich // Materials Physics and Mechanics. – 2000. – Vol. 1. – P. 1-10. DOI: 10.1109/20.908665.

73. Tartaj, P. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / P. Tartaj, P. Morales, S. Veintemillas-verdaguer, T. Gonz // Journal of Physics D: Applied Physics. – 2003. – Vol. 36. – P. 182-197. DOI: 10.1088/0022-3727/42/22/224002.

74. Ammar, S. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles synthesized by hydrolysis in a polyol medium / S. Ammar, A. Helfen, N. Jouini et al. // Journal of Materials Chemistry. – 2001. – Vol. 11. – P. 186-192. DOI: 10.1039/b003193n.

75. Wan, J. Stable and biocompatible colloidal dispersions of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with minimum aggregation for

biomedical applications / J. Wan, R. Yuan, C. Zhang et al. // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2016. – Vol. 120. – P. 23799-23806. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b06614.

76. Hasany, S.F. Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles / S.F. Hasany, I. Ahmed, J. Rajan, A. Rehman. – 2011. – № March 2016. DOI: 10.5923/j.nn.20120206.01.

77. Raja, K. Sol-gel synthesis and characterization of α -Fe₂O₃ nanoparticles / K. Raja, M.M. Jaculine, M. Jose et al. // *Superlattices and Microstructures*. – 2015. – Vol. 86. – P. 306-312. DOI: 10.1016/j.spmi.2015.07.044.

78. Mathevula, L.E. Structural and optical properties of sol-gel derived α -Fe₂O₃ nanoparticles / L.E. Mathevula, L.L. Noto, B.M. Mothudi et al. // *Journal of Luminescence*. – 2017. – Vol. 192. – P. 879-887. DOI: 10.1016/j.jlumin.2017.07.055.

79. Shaker, S. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles by sol-gel method for water treatment / S. Shaker, S. Zafarian, S. Chidurala, K.V. Rao // *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. – 2013. – Vol. 2. – № 7. – P. 2969-2973.

80. Grasset, F. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy / F. Grasset, E. Duguet // *Journal of Materials Chemistry*. – 2004. – Vol. 14. – P. 2161-2175. DOI: 10.1039/B402025A.

81. Laurent, S. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles / S. Laurent, S. Dutz, U.O. Häfeli, M. Mahmoudi // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2011. – Vol. 166. – № 1-2. – P. 8-23. DOI: 10.1016/j.cis.2011.04.003.

82. Lu, A.H. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application / A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schüth // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2007. – Vol. 46. – № 8. – P. 1222-1244. DOI: 10.1002/anie.200602866.

83. Biehl, P. Magnetic Nanoparticles Featuring Polyzwitterionic Coatings

/ P. Biehl, M. Von Der Lühe, S. Dutz, F.H. Schacher // Polimers. – 2018. – Vol. 10 (1). – № 91. DOI: 10.3390/polym10010091.

84. Wang, Y. Hydrothermal and biomineralization synthesis of a dual-modal nanoprobe for targeted near-infrared persistent luminescence and magnetic resonance imaging / Y. Wang, C.X. Yang, X.P. Yan // *Nanoscale*. – 2017. – Vol. 9. – № 26. – P. 9049-9055. DOI: 10.1039/c7nr02038d.

85. Nejati, K. Preparation and magnetic properties of nano size nickel ferrite particles using hydrothermal method / K. Nejati, R. Zabihi // *Chemistry Central Journal*. – 2012. – Vol. 6. – № 23. – P. 1-6. DOI: 10.1186/1752-153X-6-23.

86. Lassoued, A. Synthesis, photoluminescence and Magnetic properties of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanoparticles through precipitation or hydrothermal methods / A. Lassoued, M.S. Lassoued, B. Dkhil et al. // *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. – 2018. – P. 1-38. DOI: 10.1016/j.physe.2018.04.009.

87. Xu, B. Solvothermal synthesis of monodisperse nanocrystals / B. Xu, X. Wang // *Dalton Transactions*. – 2012. – Vol. 41. – P. 4719-4725. DOI: 10.1039/c2dt11842d.

88. Otoni, M. The solvothermal synthesis of magnetic iron oxide nanocrystals and the preparation of hybrid poly (l-lactide)–polyethyleneimine magnetic particles / M. Otoni, J. Lee, M.M. Stevanovi et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – Vol. 109. – P. 236-243. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.03.053.

89. Zheng, Y.H. Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles / Y.H. Zheng, Y. Cheng, F. Bao, Y.S. Wang // *Materials Research Bulletin*. – 2006. – Vol. 41. – № 3. – P. 525-529. DOI: 10.1016/j.materresbull.2005.09.015.

90. Zohre, S. Trichostatin A-induced apoptosis is mediated by krüppel-like factor 4 in ovarian and lung cancer / S. Zohre, N.K. Kazem, A. Abolfazl et al. // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2014. – Vol. 15. – № 16. –

P. 6581-6586. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.16.6581.

91. Gyergyek, S. Hydrothermal growth of iron oxide NPs with a uniform size distribution for magnetically induced hyperthermia: Structural, colloidal and magnetic properties / S. Gyergyek, D. Makovec, M. Jagodič et al. // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2016. DOI: 10.1016/j.jallcom.2016.09.238.

92. F. Hasany, S. Systematic review of the preparation techniques of iron oxide magnetic nanoparticles / S. F. Hasany, I. Ahmed, R. J, A. Rehman // *Nanoscience and Nanotechnology*. – 2013. – Vol. 2. – № 6. – P. 148-158. DOI: 10.5923/j.nn.20120206.01.

93. Wegmann, M. Synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles / M. Wegmann, M. Scharr. – Elsevier Inc., 2018. – 145-181 p.

94. Muhammad Zahid, Nimra Nadeem, Muhammad Asif Hanif, Ijaz Ahmad Bhatti, Haq Nawaz Bhatti, G.M. Metal ferrites and their graphene-based nanocomposites: Synthesis, characterization, and applications in wastewater treatment / G.M. Muhammad Zahid, Nimra Nadeem, Muhammad Asif Hanif, Ijaz Ahmad Bhatti, Haq Nawaz Bhatti // *Nanotechnology in the Life Sciences book series (NALIS)*. – 2019. – P. 181-212.

95. Osial, M. Easy synthesis and characterization of holmium-doped SPIONs / M. Osial, P. Rybicka, M. Pękała et al. // *Nanomaterials*. – 2018. – Vol. 8. – № 6. – P. 1-15. DOI: 10.3390/nano8060430.

96. Bhandari, R. Single step synthesis, characterization and applications of curcumin functionalized iron oxide magnetic nanoparticles / R. Bhandari, P. Gupta, T. Dziubla, J.Z. Hilt // *Materials Science and Engineering C*. – 2016. – Vol. 67. – P. 59-64. DOI: 10.1016/j.msec.2016.04.093.

97. Gupta, A.K. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications / A.K. Gupta, M. Gupta // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – № 18. – P. 3995-4021. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.

98. Fatima, H. Iron-based magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging / H. Fatima, K.S. Kim // *Advanced Powder Technology*. – 2018. –

Vol. 29. – № 11. – P. 2678-2685. DOI: 10.1016/j.appt.2018.07.017.

99. Gruskiene, R. Preparation and characterization of iron oxide magnetic nanoparticles functionalized by nisin / R. Gruskiene, T. Krivorotova, R. Staneviciene et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2018. – Vol. 169. – P. 126-134. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.017.

100. Lassoued, A. Control of the shape and size of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanoparticles synthesized through the chemical precipitation method / A. Lassoued, B. Dkhil, A. Gadri, S. Ammar // *Results in Physics*. – 2017. – Vol. 7. – P. 3007-3015. DOI: 10.1016/j.rinp.2017.07.066.

101. Annapoorani, M.K.S.S. Magnetic hyperthermia studies on water-soluble polyacrylic acid-coated cobalt ferrite nanoparticles / M.K.S.S. Annapoorani // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2014. – Vol. 16. – № 12. – P. 1-14. DOI: 10.1007/s11051-014-2773-8.

102. Govan, J. Recent advances in the application of magnetic nanoparticles as a support for homogeneous catalysts / J. Govan, Y.K. Gun'ko // *Nanomaterials*. – 2014. – Vol. 4. – № 2. – P. 222-241. DOI: 10.3390/nano4020222.

103. Belaïd, S. Influence of experimental parameters on iron oxide nanoparticles properties synthesized by thermal decomposition: size and nuclear magnetic resonance studies / S. Belaïd, D. Stanicki, L. Vander Elst et al. // *Nanotechnology*. – 2018. – P. 1-30. DOI: 10.1088@1361-6528@aaae59.

104. Frey, N.A. Magnetic nanoparticles: Synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage / N.A. Frey, S. Peng, K. Cheng, S. Sun // *Chemical Society Reviews*. – 2009. – Vol. 38. – № 9. – P. 2532-2542. DOI: 10.1039/b815548h.

105. Park, J. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals / J. Park, K. An, Y. Hwang et al. // *Nature Materials*. – 2004. – Vol. 3. – P. 891-895. DOI: 10.1038/nmat1251.

106. Tanwar, S. Magnetic field dependence of blocking temperature in oleic acid functionalized iron oxide nanoparticles / S. Tanwar, V.P.S.A. Surinder. –

2012. – Vol. 25. – P. 2041-2045. DOI: 10.1007/s10948-012-1559-4.

107. Jović Orsini, N. Magnetic and power absorption measurements on iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition of Fe(acac)₃ / N. Jović Orsini, B. Babić-Stojić, V. Spasojević et al. // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2018. – Vol. 449. – P. 286-296. DOI: 10.1016/j.jmmm.2017.10.053.

108. Li, Z. Preparation of water-soluble magnetite nanocrystals from hydrated ferric salts in 2-pyrrolidone: mechanism leading to Fe₃O₄ / Z. Li, Q. Sun, M. Gao // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2005. – Vol. 44. – P. 123-126. DOI: 10.1002/anie.200460715.

109. Sun, S. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles / S. Sun, H. Zeng // *JACS Communication*. – 2002. – № 31. – P. 8204-8205. DOI: 10.1021/ja026501x.

110. Yu, W.W. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. / W.W. Yu, J.C. Falkner, C.T. Yavuz, V.L. Colvin // *Chemical communications (Cambridge, England)*. – 2004. – P. 2306-2307. DOI: 10.1039/b409601k.

111. Abakumov, M.A. VEGF-targeted magnetic nanoparticles for MRI visualization of brain tumor / M.A. Abakumov, N. V. Nukolova, M. Sokolsky-Papkov et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2015. – Vol. 11. – № 4. – P. 825-833. DOI: 10.1016/j.nano.2014.12.011.

112. Euliss, L.E. Cooperative assembly of magnetic nanoparticles and block copolypeptides in aqueous media / L.E. Euliss, S.G. Grancharov, S. O'Brien et al. // *Nano Letters*. – 2003. – Vol. 3. – № 11. – P. 1489-1493. DOI: 10.1021/nl034472y.

113. Kim, M. Super-stable, high-quality Fe₃O₄ dendron-nanocrystals dispersible in both organic and aqueous solutions / M. Kim, Y. Chen, Y. Liu, X. Peng // *Advanced Materials*. – 2005. – Vol. 17. – № 11. – P. 1429-1432. DOI: 10.1002/adma.200401991.

114. Geng, L. Superior impact toughness and excellent storage modulus of

poly(lactic acid) foams reinforced by shish-kebab nanoporous structure / L. Geng, L. Li, H. Mi et al. // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2017. – Vol. 9. – № 25. – P. 21071-21076. DOI: 10.1021/acsami.7b05127.

115. Sobal, N.S. Synthesis and structure of colloidal bimetallic nanocrystals: the non-alloying system Ag/Co / N.S. Sobal, M. Hilgendorff, H. Möhwald et al. // *Nano Letters*. – 2002. – Vol. 2. – № 6. – P. 621-624. DOI: 10.1021/nl025533f.

116. Turcheniuk, K. Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles. / K. Turcheniuk, A. V Tarasevych, V.P. Kukhar et al. // *Nanoscale*. – 2013. – Vol. 5. – № 207890. – P. 10729-52. DOI: 10.1039/c3nr04131j.

117. Yuen, A.K.L. The interplay of catechol ligands with nanoparticulate iron oxides / A.K.L. Yuen, G.A. Hutton, A.F. Masters et al. – 2012. – P. 2545-2559. DOI: 10.1039/c2dt11864e.

118. Xu, C. Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles / C. Xu, K. Xu, H. Gu et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126. – № 32. – P. 9938-9939. DOI: 10.1021/ja0464802.

119. Mykola Mazur, A.B. Iron oxide magnetic nanoparticles with versatile surface functions based on dopamine anchors / A.B. Mykola Mazur, V. Kuncser, A. Galatanu et al. // *Nanoscale*. – 2010. – № 207890. DOI: 10.1039/C3NR33506B.

120. Gillich, T. PEG-stabilized core a shell nanoparticles : impact of linear versus dendritic polymer shell architecture on colloidal properties and the reversibility of temperature-induced aggregation / T. Gillich, C. Acikgo, L. Isa et al. // *ACS Nano*. – 2012. DOI: 10.1021/nn304045q.

121. Liu, J. Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups / J. Liu, Z. Sun, Y. Deng et al. // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2009. – Vol. 48. – P. 5875-5879. DOI: 10.1002/anie.200901566.

122. Fauconnier, N. Synthesis of aqueous magnetic liquids complexation of

maghemite nanoparticles / N. Fauconnier, J. Roger, J.N. Pons // *Journal of Molecular Liquids*. – 1999. – Vol. 83. – P. 233-242. DOI: 10.1016/S0167-7322(99)00088-4.

123. Hayashi, K. One-pot biofunctionalization of magnetic nanoparticles via thiol - ene click reaction for magnetic hyperthermia and magnetic resonance imaging / K. Hayashi, K. Ono, H. Suzuki et al. // *Chemistry of Materials*. – 2010. – Vol. 22. – № 12. – P. 3768-3772. DOI: 10.1021/cm100810g.

124. Mutin, P.H. Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules / P.H. Mutin, G. Guerrero // *Journal of Materials Chemistry*. – 2005. – Vol. 15. – P. 3761-3768. DOI: 10.1039/b505422b.

125. Sahoo, Y. Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: A comparison with fatty acids / Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried et al. // *Langmuir*. – 2001. – Vol. 17. – № 23. – P. 7907-7911. DOI: 10.1021/la010703+.

126. Das, M. “Clickable”, trifunctional magnetite nanoparticles and their chemoselective biofunctionalization / M. Das, D. Bandyopadhyay, D. Mishra et al. // *Bioconjugate Chemistry*. – 2011. – Vol. 22. – № 6. – P. 1181-1193. DOI: 10.1021/bc2000484.

127. Bronstein, L.M. Dendrimers as encapsulating, stabilizing, or directing agents for inorganic nanoparticles / L.M. Bronstein, Z.B. Shifrina // *Chemical Reviews*. – 2011. – Vol. 111. – № 9. – P. 5301-5344. DOI: 10.1021/cr2000724.

128. Boyer, C. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications / C. Boyer, M.R. Whittaker, V. Bulmus et al. // *NPG Asia Materials*. – 2010. – Vol. 2. – № 1. – P. 23-30. DOI: 10.1038/asiamat.2010.6.

129. Fuertges, F. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins / F. Fuertges, A. Abuchowski // *Journal of Controlled Release*. – 1990. – Vol. 11. – № 1-3. – P. 139-148. DOI: 10.1016/0168-3659(90)90127-F.

130. Milton Harris, J. Effect of pegylation on pharmaceuticals / J. Milton Harris, R.B. Chess // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2003. – Vol. 2. – № 3. – P. 214-221. DOI: 10.1038/nrd1033.

131. Lutz, J.F. One-pot synthesis of PEGylated ultrasmall iron-oxide nanoparticles and their in vivo evaluation as magnetic resonance imaging contrast agents / J.F. Lutz, S. Stiller, A. Hoth et al. // *Biomacromolecules*. – 2006. – Vol. 7. – № 11. – P. 3132-3138. DOI: 10.1021/bm0607527.

132. Kohler, N. A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents / N. Kohler, G.E. Fryxell, M. Zhang // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126. – № 23. – P. 7206-7211. DOI: 10.1021/ja049195r.

133. Veiseh, O. Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas / O. Veiseh, C. Sun, J. Gunn et al. // *Nano Letters*. – 2005. – Vol. 5. – № 6. – P. 1003-1008. DOI: 10.1021/nl0502569.

134. Molday, R.S. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells / R.S. Molday, D. Mackenzie // *Journal of Immunological Methods*. – 1982. – Vol. 52. – № 3. – P. 353-367. DOI: 10.1016/0022-1759(82)90007-2.

135. Laurent, S. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications / S. Laurent, D. Forge, M. Port et al. // *Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 108. – P. 2064-2110. DOI: 10.1021/cr068445e.

136. Kumar, M.N.V.R. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives / M.N.V.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli et al. // *Chemical Reviews*. – 2004. – Vol. 104. – № 12. – P. 6017-6084. DOI: 10.1021/cr030441b.

137. Janes, K.A. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules / K.A. Janes, P. Calvo, M.J. Alonso // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2001. – Vol. 47. – № 1. – P. 83-97. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00123-X.

138. Kim, E.H. Biomedical applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated within chitosan / E.H. Kim, Y. Ahn, H.S. Lee // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2007. – Vols. 434-435. – № SPEC. ISS. – P. 633-

636. DOI: 10.1016/j.jallcom.2006.08.311.

139. Bhattarai, S.R. Laboratory formulated magnetic nanoparticles for enhancement of viral gene expression in suspension cell line / S.R. Bhattarai, S.Y. Kim, K.Y. Jang et al. // *Journal of Virological Methods*. – 2008. – Vol. 147. – № 2. – P. 213-218. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.08.028.

140. Kircheis, R. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines / R. Kircheis, L. Wightman, E. Wagner // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2001. – Vol. 53. – P. 341-358. DOI: 10.1016/s0169-409x(01)00202-2.

141. Godbey, W.T. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery / W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – Vol. 96. – № 9. – P. 5177-5181. DOI: 10.1073/pnas.96.9.5177.

142. Steitz, B. Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction / B. Steitz, H. Hofmann, S.W. Kamau et al. // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2007. – Vol. 311. – № 1 SPEC. ISS. – P. 300-305. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1194.

143. Chorny, M. Magnetically driven plasmid DNA delivery with biodegradable polymeric nanoparticles / M. Chorny, B. Polyak, I.S. Alferiev et al. // *The FASEB Journal*. – 2007. – Vol. 21. – P. 2510-2519. DOI: 10.1096/fj.07-8070com.

144. Park, I. Determination of nanoparticle vehicle unpackaging by MR imaging of a T2 magnetic relaxation switch / I. Park, C. Ng, J. Wang et al. // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – P. 724-732. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.10.018.

145. Mcbain, S.C. Polyethyleneimine functionalized iron oxide nanoparticles as agents for DNA delivery and transfection / S.C. Mcbain, H.H.P. Yiu, A. El Haj, J. Dobson // *Journal of Materials Chemistry*. – 2007. – Vol. 17. –

P. 2561-2565. DOI: 10.1039/b617402g.

146. Corti, M. Magnetic and relaxometric properties of polyethylenimine-coated superparamagnetic MRI contrast agents / M. Corti, A. Lascialfari, M. Marinone et al. – 2008. – Vol. 320. – P. 316-319. DOI: 10.1016/j.jmmm.2008.02.115.

147. Huth, S. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer / S. Huth, J. Lausier, C. Rudolph et al. // The journal of Gene Medicine. – 2004. – Vol. 6. – P. 923-936. DOI: 10.1002/jgm.577.

148. Erathodiyil, N. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications / N. Erathodiyil, J.Y. Ying // Accounts of Chemical Research. – 2011. – Vol. 44. – № 10. – P. 925-935. DOI: 10.1021/ar2000327.

149. Chu, X. Surface modification of magnetic nanoparticles in biomedicine / X. Chu, J. Yu, Y.L. Hou // Chinese Physics B. – 2015. – Vol. 24. – № 1. – P. 1-9. DOI: 10.1088/1674-1056/24/1/014704.

150. Hui, C. Core-shell Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles synthesized with well-dispersed hydrophilic Fe₃O₄ seeds / C. Hui, C. Shen, J. Tian et al. // Nanoscale. – 2011. – Vol. 3. – № 2. – P. 701-705. DOI: 10.1039/c0nr00497a.

151. Zhou, Z.H. NiFe₂O₄ nanoparticles formed in situ in silica matrix by mechanical activation / Z.H. Zhou, J.M. Xue, J. Wang et al. // Journal of Applied Physics. – 2002. – Vol. 91. – № 9. – P. 6015-6020. DOI: 10.1063/1.1462853.

152. Tie, S.L. Monodisperse Fe₃O₄/Fe@SiO₂ core/shell nanoparticles with enhanced magnetic property / S.L. Tie, H.C. Lee, Y.S. Bae et al. // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2007. – Vol. 293. – № 1-3. – P. 278-285. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.07.044.

153. Ren, C. Preparation and properties of a new multifunctional material composed of superparamagnetic core and rhodamine B doped silica shell / C. Ren, J. Li, X. Chen et al. // Nanotechnology. – 2007. – Vol. 18. – № 34. DOI: 10.1088/0957-4484/18/34/345604.

154. Yang, Y. Organosilane-assisted transformation from core-shell to

yolk-shell nanocomposites / Y. Yang, J. Liu, X. Li et al. // *Chemistry of Materials*. – 2011. – Vol. 23. – № 16. – P. 3676-3684. DOI: 10.1021/cm201182d.

155. Salgueiriño-Maceira, V. Composite silica spheres with magnetic and luminescent functionalities / V. Salgueiriño-Maceira, M.A. Correa-Duarte, M. Spasova et al. // *Advanced Functional Materials*. – 2006. – Vol. 16. – № 4. – P. 509-514. DOI: 10.1002/adfm.200500565.

156. Deng, Y. Superparamagnetic high-magnetization microspheres with an Fe₃O₄@SiO₂ core and perpendicularly aligned mesoporous SiO₂ shell for removal of microcystins / Y. Deng, D. Qi, C. Deng et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 1. – P. 28-29. DOI: 10.1021/ja0777584.

157. Li, D. Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles / D. Li, W.Y. Teoh, J.J. Gooding et al. // *Advanced Functional Materials*. – 2010. – Vol. 20. – № 11. – P. 1767-1777. DOI: 10.1002/adfm.201000188.

158. Press, A.I.N. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles / A.I.N. Press. – 2004. – Vol. 279. – P. 210-217. DOI: 10.1016/j.jmmm.2004.01.094.

159. Wang, L. Monodispersed core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles / L. Wang, J. Luo, Q. Fan et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – Vol. 109. – № 46. – P. 21593-21601. DOI: 10.1021/jp0543429.

160. Wang, Y. A simple method to construct bifunctional Fe₃O₄/Au hybrid nanostructures and tune their optical properties in the near-infrared region / Y. Wang, Y. Shen, A. Xie et al. // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2010. – Vol. 114. – № 10. – P. 4297-4301. DOI: 10.1021/jp9099804.

161. Ramasamy, M. Magnetic, optical gold nanorods for recyclable photothermal ablation of bacteria / M. Ramasamy, S.S. Lee, D.K. Yi, K. Kim // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – Vol. 2. – № 8. – P. 981-988. DOI: 10.1039/c3tb21310b.

162. Chudasama, B. Enhanced antibacterial activity of bifunctional Fe₃O₄-

Ag core-shell nanostructures / B. Chudasama, A.K. Vala, N. Andhariya et al. // Nano Research. – 2009. – Vol. 2. – № 12. – P. 955-965. DOI: 10.1007/s12274-009-9098-4.

163. Chen, J. Multifunctional Fe₃O₄@C@Ag hybrid nanoparticles as dual modal imaging probes and near-infrared light-responsive drug delivery platform / J. Chen, Z. Guo, H.B. Wang et al. // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34. – № 2. – P. 571-581. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.002.

164. Zhu, X. Core-shell Fe₃O₄@NaLuF₄:Yb,Er/Tm nanostructure for MRI, CT and upconversion luminescence tri-modality imaging / X. Zhu, J. Zhou, M. Chen et al. // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – № 18. – P. 4618-4627. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.007.

165. Lingappa, M. Immunoliposomal delivery of ²¹³Bi for α -emitter targeting of metastatic breast cancer / M. Lingappa, H. Song, S. Thompson et al. // Cancer Research. – 2010. – Vol. 70. – № 17. – P. 6815-6823. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4548.

166. Feng, B. Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging in vivo / B. Feng, K. Tomizawa, H. Michiue et al. // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – № 14. – P. 4139-4145. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.086.

167. Mamot, C. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo / C. Mamot, D.C. Drummond, C.O. Noble et al. // Cancer Research. – 2005. – Vol. 65. – № 24. – P. 11631-11638. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1093.

168. Chekhonin, V.P. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43 / V.P. Chekhonin, V.P. Baklaushev, G.M. Yusubalieva et al. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2012. – Vol. 8. – № 1. – P. 63-70. DOI: 10.1016/j.nano.2011.05.011.

169. Norden, A.D. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma / A.D.

Norden, J. Drappatz, P.Y. Wen // *Nature Reviews Neurology*. – 2009. – Vol. 5. – № 11. – P. 610-620. DOI: 10.1038/nrneuro.2009.159.

170. Christofori, G. Targeting tumor-associated endothelial cells: anti-VEGFR2 immunoliposomes mediate tumor vessel disruption and inhibit tumor growth / G. Christofori, R. Ritschard, R. Herrmann et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2011. – Vol. 18. – № 2. – P. 454-464. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-11-1102.

171. Miettinen, M. Vascular endothelial growth factor receptor 2 as a marker for malignant vascular tumors and mesothelioma: An immunohistochemical study of 262 vascular endothelial and 1640 nonvascular tumors / M. Miettinen, M.S. Rikala, J. Rys et al. // *American Journal of Surgical Pathology*. – 2012. – Vol. 36. – № 4. – P. 629-639. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318243555b.

172. Matter, A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target / A. Matter // *Drug Discovery Today*. – 2001. – Vol. 6. – № 19. – P. 1005-1024. DOI: 10.1016/S1359-6446(01)01939-0.

173. Ferrara, N. The biology of vascular endothelial cell growth factor isoforms / N. Ferrara, T. Davis-Smyth // *Biology of VEGF*. – 2008. – Vol. 18. – № 1. – P. 1-13. DOI: 10.1007/978-0-387-78632-2_1.

174. Miletic, H. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms / H. Miletic, S.P. Niclou, M. Johansson, R. Bjerkvig // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2009. – Vol. 13. – № 4. – P. 455-468. DOI: 10.1517/14728220902806444.

175. Podar, K. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications / K. Podar, K.C. Anderson // *Clin Res*. – 2008. – Vol. 105. – № 4. – P. 1383-1395. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2909.

176. Dias, S. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration / S. Dias, K. Hattori, Z. Zhu et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2000. – Vol. 106. – № 4. – P. 511-521. DOI: 10.1172/JCI8978.

177. Hicklin, D.J. Role of the vascular endothelial growth factor pathway

in tumor growth and angiogenesis / D.J. Hicklin, L.M. Ellis // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – Vol. 23. – № 5. – P. 1011-1027. DOI: 10.1200/JCO.2005.06.081.

178. Holmes, K. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition / K. Holmes, O.L. Roberts, A.M. Thomas, M.J. Cross // *Cellular Signalling*. – 2007. – Vol. 19. – № 10. – P. 2003-2012. DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.05.013.

179. Ferrara, N. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins / N. Ferrara, K. Houck, L.Y.N. Jakeman, D.W. Leung // *Endocrine Society*. – 1992. – Vol. 13. – № 1. – P. 18-32. DOI: 10.1210/edrv-13-1-18.

180. Veisheh, O. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging / O. Veisheh, J.W. Gunn, M. Zhang // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – Vol. 62. – № 3. – P. 284-304. DOI: 10.1016/j.addr.2009.11.002.

181. Ganapathe, L.S. Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in biomedical application: From synthesis to surface functionalisation / L.S. Ganapathe, M.A. Mohamed, R.M. Yunus, D.D. Berhanuddin // *Magnetochemistry*. – 2020. – Vol. 6 (4). – № 68. DOI: 10.3390/magnetochemistry6040068.

182. Lisjak, D. Anisotropic magnetic nanoparticles: A review of their properties, syntheses and potential applications / D. Lisjak, A. Mertelj // *Progress in Materials Science*. – 2018. – Vol. 95. – P. 286-328. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2018.03.003.

183. Nguyen, M.D. Fe₃O₄ nanoparticles: structures, synthesis, magnetic properties, surface functionalization and emerging applications / M.D. Nguyen, H.-V. Tran, S.X. And, T.R. Lee // *Applied Science*. – 2021. – Vol. 11. – № 11301. – P. 1-35. DOI: 10.3390/app112311301.

184. Liu, Z.L. Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles / Z.L. Liu, Y.J. Liu, K.L. Yao et al. // *Journal of Materials Synthesis and Processing*. – 2002. – Vol. 10. – № 2. – P. 83-87. DOI:

10.1016/J.MATERRESBULL.2005.09.015.

185. Wei, Y. Procedia engineering synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties / Y. Wei, B. Han, X. Hu, Y. Lin // Procedia Engineering. – 2011. – Vol. 27. – № 2012. – P. 632-637. DOI: 10.1016/j.proeng.2011.12.498.

186. Zarnegar, Z. Green chemistry letters and reviews modified chemical coprecipitation of magnetic magnetite nanoparticles using linear – dendritic copolymers / Z. Zarnegar, J. Safari // Green Chemistry Letters and Reviews. – 2017. – Vol. 10. – № 4. DOI: 10.1080/17518253.2017.1358769.

187. Li, Q. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles / Q. Li, C.W. Kartikowati, S. Horie et al. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-4. DOI: 10.1038/s41598-017-09897-5.

188. Upadhyay, S. Influence of crystallite size on the magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles / S. Upadhyay, K. Parekh, B. Pandey // Journal of Alloys and Compounds. – 2016. – Vol. 678. – P. 478-485. DOI: 10.1016/j.jallcom.2016.03.279.

189. Chuev, M.A. Mössbauer spectra of magnetic nanoparticles in the model of continuous diffusion and precession of uniform magnetization / M.A. Chuev // Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters. – 2006. – Vol. 83. – P. 572-577. DOI: 10.1134/S0021364006120101.

190. Sun, S. Monodisperse MFe₂O₄ (M=Fe,Co,Mn) nanoparticles / S. Sun, H. Zeng, D.B. Robinson et al. // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – Vol. 4. – № 1. – P. 126-132. DOI: 10.1021/ja0380852.

191. Dippong, T. Recent advances in synthesis and applications of MFe₂O₄ (M = Co, Cu, Mn, Ni, Zn) nanoparticles / T. Dippong, E.A. Levei, O. Cadar // Nanomaterials. – 2021. – Vol. 11. – № 6. – P. 3-8. DOI: 10.3390/nano11061560.

192. Naidek, K.P. Structure and morphology of spinel MFe₂O₄ (M=Fe, Co, Ni) nanoparticles chemically synthesized from heterometallic complexes / K.P. Naidek, F. Bianconi, T.C.R. da Rocha et al. // Journal of Colloid and Interface

Science. – 2011. – Vol. 358. – № 1. – P. 39-46. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.03.001.

193. Nikitin, A.A. Anisotropic iron-oxide nanoparticles for diagnostic MRI: synthesis and contrast properties / A.A. Nikitin, M.A. Khramtsov, A.G. Savchenko et al. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2018. – Vol. 52. – № 3. DOI: 10.1007/s11094-018-1796-3.

194. Nikitin, A. Synthesis of iron oxide nanoclusters by thermal decomposition / A. Nikitin, I. Shchetinin, N. Tabachkova et al. // *Langmuir*. – 2018. – Vol. 34. – № 15. – P. 4640-4650. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b00753.

195. Roca, A.G. Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles / A.G. Roca, L. Gutiérrez, H. Gavilán et al. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2019. – Vol. 138. – P. 68-104. DOI: 10.1016/j.addr.2018.12.008.

196. M. Niederberger, G.G. Organic reaction pathways in the nonaqueous synthesis of metal oxide / G.G. M. Niederberger // *Chemistry a European Journal*. – 2006. – Vol. 12. – № 28. – P. 7282-7302. DOI: 10.1002/chem.200600313.

197. Qiao, L. Standardizing size- and shape-controlled synthesis of monodisperse magnetite (Fe₃O₄) nanocrystals by identifying and exploiting effects of organic impurities / L. Qiao, Z. Fu, J. Li et al. // *ACS Nano*. – 2017. – Vol. 11. – P. 6370-6381. DOI: 10.1021/acsnano.7b02752.

198. Leroux, C. Synthesis of CoFe₂O₄ nanocubes / C. Leroux, F. De Medeiros, V. Madigou et al. // *Nano-Structures & Nano-Objects*. – 2020. – Vol. 21. – P. 1-32. DOI: 10.1016/j.nanos.2019.100422 .

199. Yannez-Vilar, S. A simple solvothermal synthesis of MFe₂O₄ (M $\frac{1}{4}$ Mn, Co and Ni) nanoparticles / S. Yannez-Vilar, M.S.-A. Ujar, C. Gomez-Aguirre et al. // *Journal of Solid State Chemistry*. – 2009. – Vol. 182. – P. 2685-2690. DOI: 10.1016/j.jssc.2009.07.028.

200. Galvao, W.S. Super-paramagnetic nanoparticles with spinel structure : a review of synthesis and biomedical applications / W.S. Galvao, D.M.A. Neto, R.M. Freire, P.B.A. Fechine // *Solid State Phenomena*. – 2016. – Vol. 241. – P. 139-176. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.241.139.

201. Karaagac, O. The influence of synthesis parameters on one-step synthesized superparamagnetic cobalt ferrite nanoparticles with high saturation magnetization / O. Karaagac, B.B. Yildiz, H. Köçkar // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2019. – Vol. 473. – P. 262-267. DOI: 10.1016/j.jmmm.2018.10.063.

202. Osaka, T. Electrodeposition of highly functional thin films for magnetic recording devices of the next century / T. Osaka // *Electrochimica Acta*. – 2000. – Vol. 45. – P. 3311-3321. DOI: 10.1016/S0013-4686(00)00407-2.

203. Ibrahim, S.T. Study of cation distribution and magnetic properties of MFe_2O_4 ($M=Fe, Co, Zn, Mn, \text{ and } Cu$) nanoparticles / S.T. Ibrahim, S.M.R. Saeri // *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*. – 2022. – Vol. 4. – P. 899-908. DOI: 10.1007/s10948-021-06129-w.

204. Zhang, S. Monolayer assembly of ferrimagnetic $CoxFe_{3-x}O_4$ nanocubes for magnetic recording / S. Zhang, S. Sun // *Nano Letters*. – 2014. – Vol. 14. – № 6. – P. 3395-3399. DOI: 10.1021/nl500904a.

205. Pradeep, A. Structural, magnetic and electrical properties of nanocrystalline zinc ferrite / A. Pradeep, P. Priyadharsini, G. Chandrasekaran // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2011. – Vol. 509. – № 9. – P. 3917-3923. DOI: 10.1016/j.jallcom.2010.12.168.

206. Pal, J. Observation of bulk like magnetic ordering below the blocking temperature in nanosized zinc ferrite / J. Pal, G. Dixit, R.C. Srivastava et al. // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2012. – Vol. 324. – № 16. – P. 2553-2559. DOI: 10.1016/j.jmmm.2012.03.045.

207. Blanco-Gutierrez, V. Neutron diffraction study and superparamagnetic behavior of $ZnFe_2O_4$ nanoparticles obtained with different conditions / V. Blanco-Gutierrez, E. Climent-pascual, M.J. Torralvo-fernandez // *Journal of Solid State Chemistry*. – 2011. – Vol. 184. – № 7. – P. 1608-1613. DOI: 10.1016/j.jssc.2011.04.034.

208. Dutta, P. Size dependence of magnetic parameters and surface disorder in magnetite nanoparticles / P. Dutta, S. Pal, M.S. Seehra et al. // *Journal*

of Applied Physics. – 2009. – Vol. 501. – P. 10-13. DOI: 10.1063/1.3055272.

209. Panissod, P. Size-dependent properties of magnetic iron oxide nanocrystals / P. Panissod, B.P. Pichon, G. Pourroy et al. // *Nanoscale*. – 2011. – № 1. – P. 225-232. DOI: 10.1039/c0nr00521e.

210. Yang, Y. Synthesis of nonstoichiometric zinc ferrite nanoparticles with extraordinary room temperature magnetism and their diverse applications / Y. Yang, X. Liu, Y. Yang et al. // *Journal of Materials Chemistry*. – 2013. – Vol. 1. – № 2875. – P. 2875-2885. DOI: 10.1039/c3tc00790a.

211. Polikarpov, M.A. External Field Induced Superferrimagnetism in Magnetite Nanoparticles / M.A. Polikarpov, V.M. Cherepanov, M.A. Chuev et al. // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. – 2010. – Vol. 74. – № 3. – P. 402-404. DOI: 10.3103/S1062873810030184.

212. Shultz, M.D. Reactive nature of dopamine as a surface functionalization agent in iron oxide nanoparticles / M.D. Shultz, J. Ulises Reveles, S.N. Khanna, E.E. Carpenter // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Vol. 129. – № 9. – P. 2482-2487. DOI: 10.1021/ja0651963.

213. Melin, V. Reactivity of catecholamine-driven Fenton reaction and its relationships with iron(III) speciation / V. Melin, A. Henríquez, J. Freer, D. Contreras // *Redox Report*. – 2015. DOI: 10.1179/1351000214Y.0000000119.

214. Huang, D. Nanoparticles modulate autophagic effect in a dispersity-dependent manner / D. Huang, H. Zhou, J. Gao // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 1-10. DOI: 10.1038/srep14361.

215. Spadaro, D. Scaling of optical forces on Au-PEG core-shell nanoparticles / D. Spadaro, M.A. Iatì, M.G. Donato et al. // *RSC Advances*. – 2015. – Vol. 5. – № 113. – P. 93139-93146.

216. Namduri, H. Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry / H. Namduri, S. Nasrazadani // *Corrosion Science*. – 2008. – Vol. 50. – № 9. – P. 2493-2497. DOI: 10.1016/j.corsci.2008.06.034.

217. Ma, M. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles

coated by amino silane / M. Ma, Y. Zhang, W. Yu et al. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2003. – Vol. 212. – P. 219-226. DOI: 10.1016/S0927-7757(02)00305-9.

218. Taylor, P. FTIR spectroscopic study of biogenic Mn-Oxide formation by *pseudomonas putida* GB-1 FTIR spectroscopic study of biogenic Mn-oxide formation by *pseudomonas putida* GB-1 / P. Taylor, S.J. Parikh, J. Chorover et al. // *Geomicrobiology Journal*. – 2005. – Vol. 22. – № 5. – P. 37-41. DOI: 10.1080/01490450590947724.

219. Simonescu, C.M. Facile synthesis of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in the presence of sodium bis (2-ethyl-hexyl) sulfosuccinate and their application in dyes removal from single and binary aqueous solutions / C.M. Simonescu, A. Tătăruș, D.C. Culiță et al. // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11. – № 11. – P. 1-27. DOI: 10.3390/nano11113128.

220. Nguyen, T.B. RSC Advances with a highly recyclable visible-light-response for / T.B. Nguyen, R. Doong. – 2017. – P. 50006-50016. DOI: 10.1039/c7ra08271a.

221. Abbasian, A.R. Salt-assisted solution combustion synthesis of nanostructured ZnFe₂O₄-ZnS powders / A.R. Abbasian, M. Rahmani // *Inorganic Chemistry Communications*. – 2020. – Vol. 111. – P. 107629. DOI: 10.1016/j.inoche.2019.107629.

222. Yallapu, M.M. PEG-functionalized magnetic nanoparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging applications / M.M. Yallapu, S.P. Foy, T.K. Jain, V. Labhasetwar // *Pharmaceutical Research*. – 2010. – Vol. 27. – № 11. – P. 2283-2295. DOI: 10.1007/s11095-010-0260-1.

223. Jie, Z. Hydrothermal synthesis and self-assembly of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles with the magnetic and electrochemical properties / Z. Jie, X. Ying, B. Nian, C. Wu // *Journal of Crystal Growth*. – 2008. – Vol. 310. – P. 5453-5457. DOI: 10.1016/j.jcrysgr.2008.08.064.

224. Berti, I.O.P. De. Alternative low-cost approach to the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by thermal decomposition of organic precursors

/ I.O.P. De Berti, M. V Cagnoli, G. Pecchi, J.L. Alessandrini. – 2013. – Vol. 175601. DOI: 10.1088/0957-4484/24/17/175601.

225. Roonasi, P. Applied Surface Science A Fourier transform infrared (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) study of oleate adsorbed on magnetite nano-particle surface / P. Roonasi, A. Holmgren. – 2009. – Vol. 255. – P. 5891-5895. DOI: 10.1016/j.apsusc.2009.01.031.

226. Togashi, T. Surfactant-assisted one-pot synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticle clusters with tunable cluster size and magnetic field sensitivity / T. Togashi, T. Naka, S. Asahina et al. // Dalton Transactions. – 2011. – Vol. 40. – № 5. – P. 1073-1078. DOI: 10.1039/c0dt01280g.

227. Park, J.Y. Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications. / J.Y. Park, P. Daksha, G.H. Lee et al. // Nanotechnology. – 2008. – Vol. 19. – P. 365603. DOI: 10.1088/0957-4484/19/36/365603.

228. Kumosinski, T.F. Determination of the global secondary structure of proteins by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy / T.F. Kumosinski, H.M. Farrell // Trends in Food Science and Technology. – 1993. – Vol. 4. – № 6. – P. 169-175. DOI: 10.1016/0924-2244(93)90119-U.

229. Iskra, A. Infrared spectroscopy of gas – phase $M(\text{CO}_2)_n$ ($M=\text{Co}, \text{Rh}, \text{Ir}$) ion – molecule complexes / A. Iskra, A.S. Gentleman, A. Kartouzian et al. // The Journal of Physical Chemistry A. – 2016. – P. 2-34. DOI: 10.1021/acs.jpca.6b10902.

230. Isokoski, K. Astrophysics highly resolved infrared spectra of pure CO_2 ice (15 – 75 K) / K. Isokoski, C.A. Poteet, H. Linnartz // Astronomy and Astrophysics. – 2013. – Vol. 85. – P. 4-9.

231. Saha, B. The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles / B. Saha, P. Songe, T.H. Evers, M.W.J. Prins // Analyst. – 2017. – Vol. 142. – № 22. – P. 4247-4256. DOI: 10.1039/c7an01424d.

232. Sena, P. Subcellular localization of β -catenin and APC proteins in colorectal preneoplastic and neoplastic lesions / P. Sena, M. Saviano, S. Monni et al. // *Cancer Letters*. – 2006. – Vol. 241. – P. 203-212. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.10.011.

233. Mills, F. Cognitive flexibility and long-term depression (LTD) are impaired following β -catenin stabilization in vivo / F. Mills, T.E. Bartlett, L. Dissing-olesen et al. // *PNAS Early edition*. – 2014. – P. 1-6. DOI: 10.1073/pnas.1404670111.

234. Guo, F. Orientation of microtubules suggests a role in mRNA transportation in fertilized eggs of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*) / F. Guo, L. Yu, S. Watkins, Y. Han // *Protoplasma*. – 2007. – P. 239-243. DOI: 10.1007/s00709-007-0266-7.

235. Han, Y. Polysomes are associated with microtubules in fertilized eggs of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*) / Y. Han, J. Yu, F. Guo, S.C. Watkins // *Protoplasma*. – 2006. – Vol. 227. – P. 223-227. DOI: 10.1007/s00709-005-0150-2.

236. Kwiatkowska, M. Immunogold method evidences that kinesin and myosin bind to and couple microtubules and actin filaments in lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis / M. Kwiatkowska, J. Teresa // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2013. – Vol. 35. – P. 1967-1977. DOI: 10.1007/s11738-013-1235-8.

237. Amiry-moghaddam, M. Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane / M. Amiry-moghaddam, H. Lindland, S. Zelenin et al. // *The FASEB Journal*. – 2015. – Vol. 19. – P. 1459-1467. DOI: 10.1096/fj.04-3515com.

238. Orlov, I. Live cell immunogold labeling of RNA polymerase II / I. Orlov, A. Schertel, G. Zuber et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 7-11. DOI: 10.1038/srep08324.