

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева»**

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)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»

Научный руководитель:

Абакумов Максим Артемович

к.х.н., доцент, зав. лабораторией «Биомедицинские наноматериалы» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»

Официальные оппоненты:

Горин Дмитрий Александрович

д.х.н., проф. центра фотоники и фотонных технологий Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Клячко Наталья Львовна

д.х.н., проф. зав. кафедрой химической энзимологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России»

Защита состоится «28» августа 2024 года в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета РХТУ.2.6.03 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева и на официальном сайте университета <http://diss.muctr.ru>

Автореферат разослан « » 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета
РХТУ.2.6.03, доцент, к.х.н.

Мурадова А.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 гипointенсивные 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. Для достижения поставленной цели, были сформулированы и решены 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 элементным 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, несущие 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. 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 презентированным в митохондрии, 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) (ноу-хау НИТУ МИСИС № 05-645-2020 от 2 декабря 2020 на «Способ одновременной визуализации биологических структур»).

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, мёссбауэровская 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, входящая в базу научного цитирования РИНЦ, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, изложена новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования.

В первой главе изложен обзор литературы, в котором рассмотрены основные способы визуализации биомолекул методами световой и электронной микроскопии, описаны основные способы получения МНЧ, основные способы модификации и функционализации поверхности МНЧ адресными молекулами.

Во второй главе описаны материалы, методы синтеза МНЧ сложных оксидов железа, физико-химические и биологические методы их исследования.

В третьей главе, состоящей из четырех частей, представлены результаты диссертационного исследования и их обсуждение:

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.

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 БС (205°C) и ДБЭ (293°C) с добавлением ОК (Рисунок 1А). Методом ПЭМ было установлено, что все МНЧ Fe_3O_4 синтезированные в БС и ДБЭ с добавлением ОК обладали монодисперсным распределением по размерам и имели правильную сферическую форму со средним размером 7 ± 1 нм и 10 ± 2 нм соответственно. 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). Рисунок 1В 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 1). Результаты магнитометрии (Рисунок 1Г), (Таблица 1) при комнатной температуре свидетельствуют о суперпарамагнитной природе образцов МНЧ Fe_3O_4 (с размерами менее 20 нм), что характерно, для МНЧ магнетита таких размеров и хорошо согласуется с литературными данными^{1,2}.

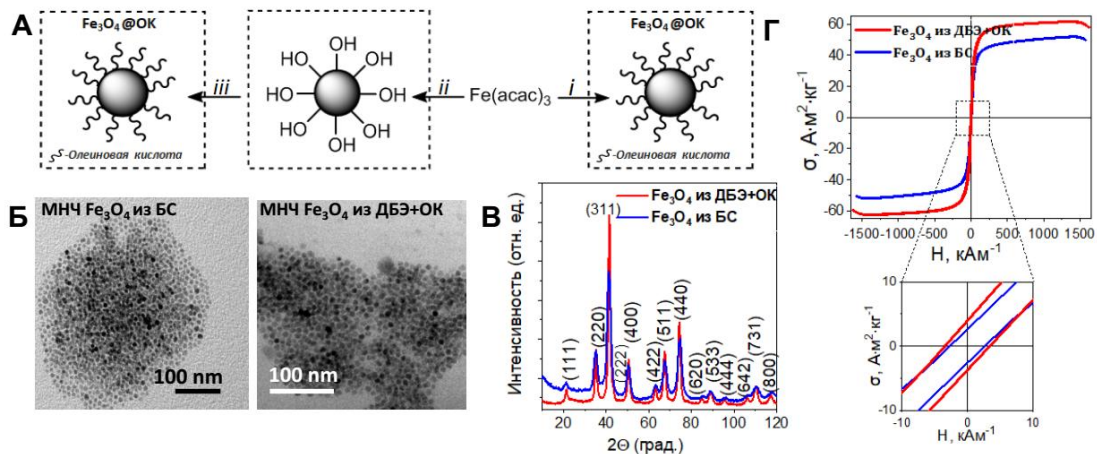


Рисунок 1. (А) Схематическое изображение методики синтеза МНЧ Fe_3O_4 в БС и ДБЭ с добавлением ОК. (Б) ПЭМ-микрофотографии синтезированных МНЧ Fe_3O_4 . (В) Рентгенограммы порошков МНЧ Fe_3O_4 . (Г) Кривые намагничивания МНЧ Fe_3O_4 при $T=300 \text{ K}$. **Реагенты и условия:** (i) ДБЭ, ОК, Ar, 296°C ; (ii) БС Ar, 205°C ; (iii) ОК, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$.

Значения удельной намагниченности насыщения σ_s двух типов МНЧ Fe_3O_4 составили $53,5 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ и $61,6 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$ (Таблица 1), и достаточно хорошо согласуются с некоторыми ранними экспериментальными работами по синтезу и исследованию магнитных свойств МНЧ Fe_3O_4 ¹⁻³.

1. M.D. Nguyen, H.-V. Tran, S.X. and T.R.L. // Appl. Sci. – 2021. – № 11. – P. 11301.

2. Wei, Y. // Procedia Eng. – 2011. – Vol. 27. – № 2012. – P. 632-637. DOI: 10.1016/j.proeng.2011.12.498.

3. Zamegar, Z. // Green Chem. Lett. Rev. – 2017. – Vol. 8253. DOI: 10.1080/17518253.2017.1358769.

Полученные значения σ_s ниже, чем у объемного магнетита ($90 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$)², 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^{4,5}.

Таблица 1. Основные физические характеристики МНЧ Fe_3O_4 .

Образец	Размер кристаллита, установленный из ОКР, нм	Размер ядра по ПЭМ, нм	Удельная намагниченность насыщения σ_s , $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$	Остаточная намагниченность насыщения σ_r , $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{кг}^{-1}$	Коэрцитивная сила, H_c , $\text{кA}\cdot\text{м}^{-1}$
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	3.9	3.4

3.1.2 Синтез, структура и исследование физико-химических свойств MFe_2O_4 ($\text{M}=\text{Mn}, \text{Co}, \text{Zn}$). Для получения МНЧ MFe_2O_4 был выбран одностадийный метод термического разложения (Рисунок 2). Все реакции разложения проводили либо в БС, либо в ДБЭ с добавлением ОК в качестве растворителя. Мольное соотношение металлосодержащих прекурсоров составляло $n_{\text{Mn,Co,Zn}(\text{acac})_2}/n_{\text{Fe}(\text{acac})_3} = 1/2$. 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 (Рисунок 2Б). Элементное соотношение металлов в МНЧ MFe_2O_4 , полученных в БС, хорошо коррелировало с соотношением вводимых в реакцию металлосодержащих прекурсоров ($\text{M}:\text{Fe}=1:2$, $\text{M}:\text{Fe}=1:6$ и $\text{M}:\text{Fe}=1:10$), и что более важно, было показано, что элементное соотношение металлов в МНЧ MFe_2O_4 воспроизводится в трех независимых синтезах (Рисунок 2Б).

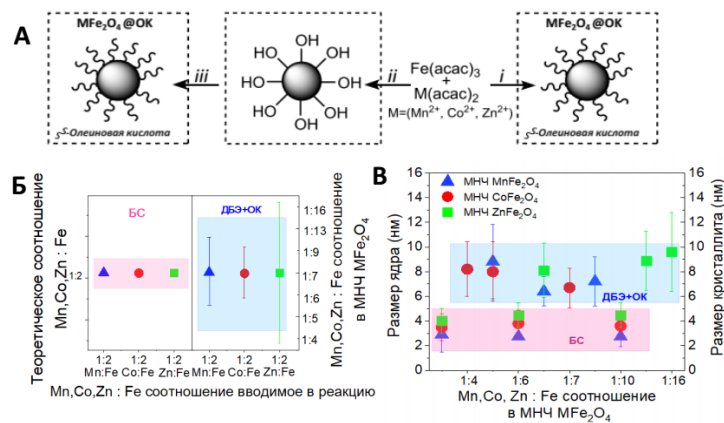


Рисунок 2. (А) Схематическое изображение методики синтеза МНЧ MFe_2O_4 в БС и ДБЭ с добавлением ОК. (Б) Результаты МП-АЭС МНЧ MFe_2O_4 . (В) Сравнение размера МНЧ MFe_2O_4 магнитного ядра установленного по ПЭМ и размера кристаллита установленного по РФА. **Реагенты и условия:** (i) ДБЭ, ОК, Ar, 296°C; (ii) БС, Ar, 205 °C, (iii) ОК, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$.

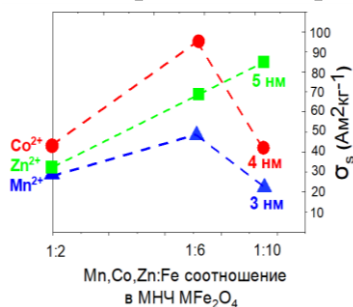
Для объяснения полученных результатов необходимо рассмотреть механизмы протекающих реакций формирования МНЧ MFe_2O_4 . Механизм реакции в БС включает в себя сольволиз ацетилацетанатов за которым следует реакция альдольной конденсации⁶.

4. Li, Q. // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-4. DOI: 10.1038/s41598-017-09897-5.

5. Upadhyay, S. // J. Alloys Compd. – 2016. – Vol. 678. – P. 478-485. DOI: 10.1016/j.jallcom.2016.03.279.

6. M. Niederberger, G.G. // Chem. a Eur. J. – 2006. – P. 7282-7302. DOI: 10.1002/chem.200600313.

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 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 ⁷. Совместное присутствие ОК и бензойного альдегида, обладающих восстановительными свойствами, в реакционной смеси приводит к частичному восстановлению Fe^{3+} до Fe^{2+} и нарушению стехиометрии МНЧ MFe_2O_4 . 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. Методом ПЭМ было обнаружено, что БС по сравнению с ДБЭ приводит к образованию МНЧ намного меньшего размера (Рисунок 2В). 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. Результаты РФА анализа 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). Размеры кристаллитов МНЧ были рассчитаны по формуле Дебая–Шеррера с использованием полученных дифрактограмм и хорошо согласуются с сопоставлением данных о размере установленных методом ПЭМ (Рисунок 2В). 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. Для МНЧ MFe_2O_4 , синтезированных в БС 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 состояние⁸. Для МНЧ MFe_2O_4 с полученным элементным соотношением $\text{M}:\text{Fe} = 1:2, 1:6, 1:10$, на Рисунке 3 можно наблюдать, что значение удельной намагниченности насыщения σ_s в МНЧ MnFe_2O_4 и МНЧ CoFe_2O_4 возрастает, достигает своего максимума в точке ($\text{Mn,Co}:\text{Fe} \approx 1:6$), после чего идет на спад. Образец МНЧ ZnFe_2O_4 достигает своего максимума в точке ($\text{Zn}:\text{Fe}=1:10$) и при последующем уменьшении количества Zn^{2+} в составе МНЧ приведет к уменьшению удельной намагниченности насыщения σ_s исследуемого образца до значений чистого $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ⁹. Данный факт подтверждается и коррелирует с более ранней работой, в которой



локальный максимум σ_s для МНЧ ZnFe_2O_4 наблюдается при соотношении $\text{Zn}:\text{Fe} = 1:6-1:10$ ¹⁰.

Рисунок 3. Зависимость изменения удельной намагниченности насыщения (σ_s) МНЧ MFe_2O_4 , с различным элементным соотношением ($\text{Mn,Co,Zn} : \text{Fe} = 1:2, 1:6, 1:10$), в БС.

7. L. Qiao, Z. Fu, J. Li, J. Ghosen, M. Zeng, J. Stebbins, P. N. Prasad, M.T.S. // ASC Nano. – 2017. – P. 1-36.

8. Galvao, W.S. // Solid State Phenom. – 2016. – Vol. 241. – P. 139-176. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.241.139.

9. Demortière, A. Panissod, P. // Nanoscale. – 2011. – Vol. 3. – P. 225-232. DOI: 10.1039/c0nr00521e.

10. Yang, Y. // J. Mater. Chem. – 2013. – Vol. 1. – № 2875. – P. 2875-2885. DOI: 10.1039/c3tc00790a.

3.2 Функционализация поверхности МНЧ Fe₃O₄ и МНЧ MFe₂O₄.

Полученные результаты явно указывают, что в качестве объектов для дальнейшей функционализации поверхности предпочтительнее использовать МНЧ Fe₃O₄ и МНЧ MFe₂O₄ 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 АТ. Для проведения первого этапа модификации в качестве катехолсодержащего лиганда была выбрана 3,4-дигидроксифенилуксуная кислота (ДФУК) (МНЧ@ДФУК). Для облегчения десорбции молекул ОК, находящихся на поверхности МНЧ использовали каталитические количества NaOH, тогда как сама реакция проводилась в двухфазной системе C₆H₅CH₃/CH₃OH (Рисунок 4). Было установлено, что после модификации МНЧ хорошо диспергируются в dH₂O, а в PBS слипаются с образованием крупных агрегатов, после чего полностью выпадают в осадок, что хорошо согласуется с ранее описанными в литературе результатами¹¹. В этой связи проводили дополнительную модификацию терминальных карбоксильных групп ДФУК молекулами гетеробифункционального аминокарбоксипроизводного полиэтиленгликоля (ПЭГ) (NH₂-ПЭГ-COOH, M_w ~ 1100 г·моль⁻¹) по карбодиимидному методу (Рисунок 4), что позволило обеспечить высокую агрегативную стабильность МНЧ за счет появления дополнительного стерического фактора. Из полученных ПЭМ-микрофотографий (Рисунок 4), можно наблюдать, что вокруг ядра МНЧ формируется органическая оболочка толщиной ~ 4-5 нм, что доказывает модификацию МНЧ молекулами ПЭГ с молекулярной массой 1100 г·моль⁻¹, линейный размер которых, как было показано ранее, составляет 4 нм¹². 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). 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 (Рисунок 5).

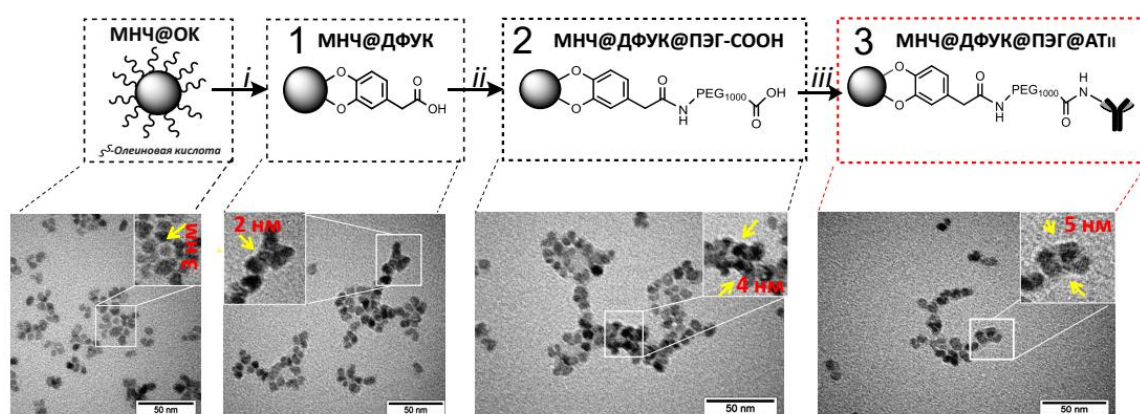


Рисунок 4. Схематическое изображение пошаговой модификации МНЧ с целью их гидрофилизации и прочного связывания с АТ на примере образца МНЧ ZnFe₂O₄ с соответствующими ПЭМ-изображениями для каждого этапа. **Реагенты и условия:** (i) NaOH, CH₃OH, ДФУК, 50°C, 6ч.; (ii) EDC, NHS, NH₂-ПЭГ₁₁₀₀-COOH, 12ч, T_{комн.}; (iii) EDC, NHS, АТ_{II}, 12ч, +4°C.

11. Huang, D. // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 1-10. DOI: 10.1038/srep14361.

12. Spadaro, D. // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5. – № 113. – P. 93139-93146.

Полученные результаты (Рисунок 5) 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.

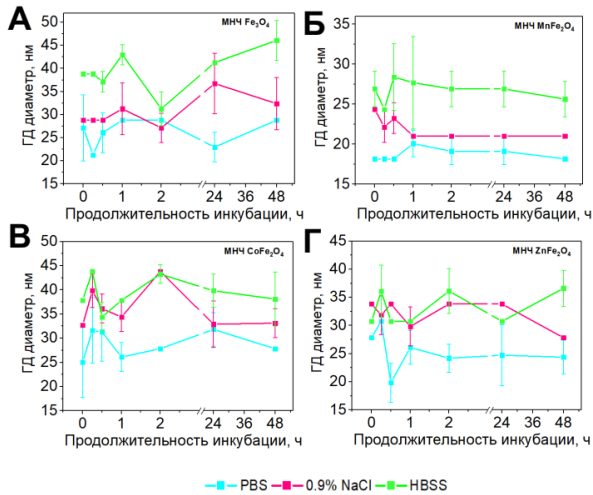


Рисунок 5. Зависимость ГД размера МНЧ@ДФУК@ПЭГ в солевых буферах от времени.

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, так как, предположительно, катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} взаимодействуют с терминальными карбоксильными группами ПЭГ-COОН и приводят к слипанию МНЧ друг с другом. На основании полученных данных был сделан вывод, что МНЧ проявляют наилучшую агрегативную устойчивость в течение всего времени эксперимента в буфере PBS, что позволяет использовать его для проведения дальнейших экспериментов и конъюгации с АТ.

3.3 Функционализация МНЧ антителами.

Реакцию конъюгации с АТ проводили по карбодимидному методу (Рисунок 4). Крайне важно, чтобы после связывания с МНЧ, АТ_{II} по-прежнему могли бы взаимодействовать с белковым антигеном, презентированным в клетках. Для сохранения иммунохимической активности АТ_{II} оптимальное время инкубации с МНЧ составило 12 часов, при постоянном перемешивании и температуре +4°C. 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 (0.240-0.305) (Рисунок 6).

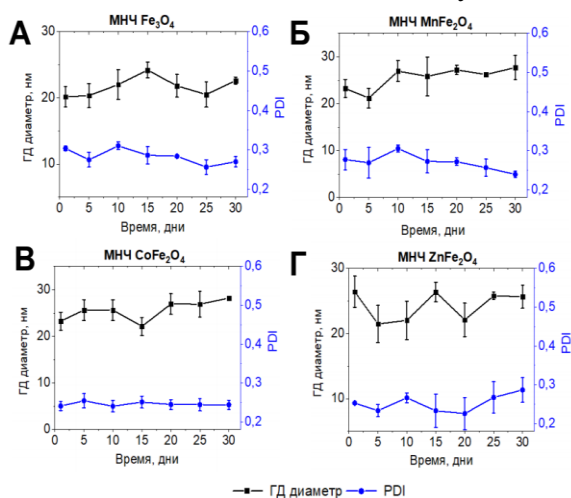


Рисунок 6. Исследование стабильности МНЧ@ДОПАК@ПЭГ@АТ_{II}.

Качественную оценку специфичности связывания разработанных нанозондов МНЧ@ДОПАК@ПЭГ@АТ_{II} с белковыми антигенами в клеточных компартаментах презентированных в клетке исследовали методом непрямого ИФА. Для данного эксперимента предварительно конъюгировали МНЧ с АТ_{II} флуоресцентно меченными красителем—Alexa-488.

Исследования проводили на линии клеток рака предстательной железы РС3 человека. Потенциальными мишенями были выбраны антитела к одному из компонентов клеточного цитоскелета к белку микротрубочек

α -тубулину, к многофункциональному белку межклеточных контактов β -катенину, 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, β -катенину, митохондриям, ядру и вторичных антител АТ_{II}-Alexa488, соответствуют изображениям, представленным производителем (Abcam, ab223075, ab92824, ab191181; Affinity Biosciences, T0033) (Рисунок 7 А).

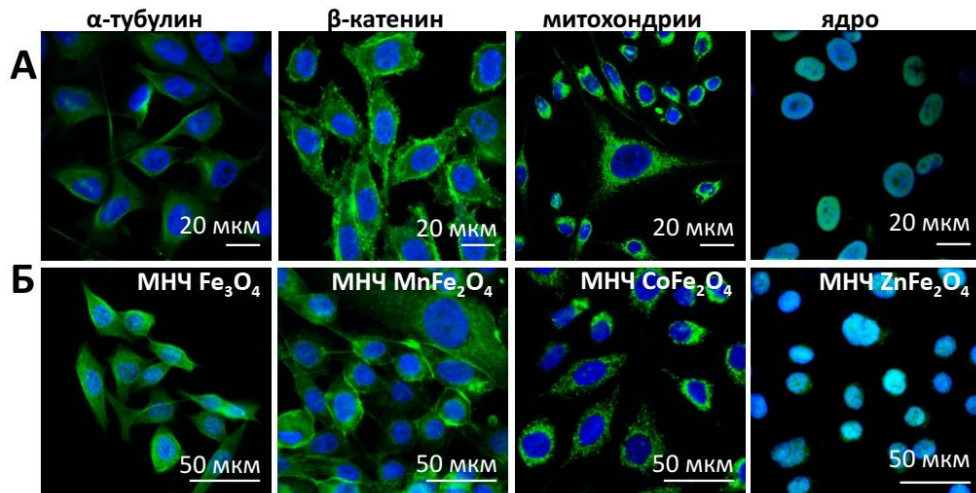


Рисунок 7. Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, после ИФА, проведенного на клетках РС3, до взаимодействия с нанозондом (А) и после взаимодействия с нанозондом МНЧ@ДОПАК@ПЭГ@АТ_{II} (Б).

Проведенный ИФА, для исследования специфичности связывания АТ_{II}-Alexa488, конъюгированных с МНЧ Fe₃O₄, МНЧ MnFe₂O₄, МНЧ CoFe₂O₄ и МНЧ ZnFe₂O₄ с АТ_I к белку микротрубочек α -тубулину, к β -катенину, к белковому антигену локализованному в митохондрии и к белковому антигену локализованному в ядре соответственно, показали схожую визуализацию свечения, которая совпадает с локализацией свечения флуоресцентных АТ_{II}-Alexa 488 не конъюгированных с МНЧ (Рисунок 7Б). Таким образом, в ходе проведения химических реакций мы получили нанозонды, в состав которых входят вторичные АТ_{II} меченые флуоресцентным красителем Alexa 488 (АТ_{II}-Alexa488), которые способны специфически связываться с белковым антигеном, а также характеризуются содержанием МНЧ Fe₃O₄, МНЧ MnFe₂O₄, МНЧ CoFe₂O₄, МНЧ ZnFe₂O₄ 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 РС3 методом ЭМ.

Если перенести иммуноцитохимическую реакцию на ультратонкий срез, и заменить флуоресцентную метку Alexa-488 конъюгированную с АТ_{II} на МНЧ сложных оксидов железа, то локализацию связывания с первичными АТ_I, можно исследовать с помощью ПЭМ, благодаря высокой электронной плотности МНЧ, по сравнению с биологическими объектами. Проведенные эксперименты на ультратонких срезах РС3 после связывания нанозонда МНЧ Fe₃O₄@ДФУК@ПЭГ@АТ_{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 8Б). Высокие концентрации МНЧ встречаются вдоль отростков микротрубочек расположенных в клетке параллельно или пересекающих плоскость среза, что хорошо согласуется с результатами ИФА анализа (Рисунок 8). Для доказательства специфичности связывания нанозонда МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ проводили иммунореакцию на клетках РСЗ, без первичных АТ_{I} , при анализе ПЭМ-микрофотографий МНЧ на тубулиновых микротрубочках задетектировано не было (Рисунок 8А). В ядрах МНЧ не выявлены.

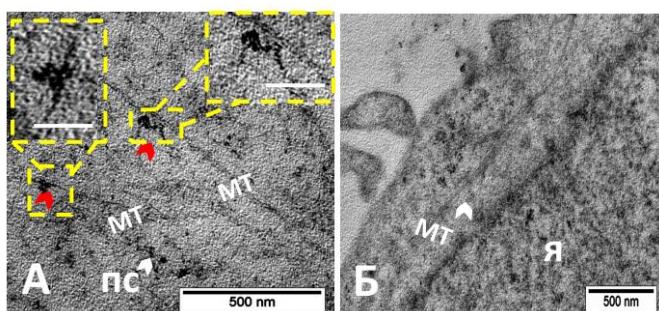


Рисунок 8. (А) – Микрофотографии тубулиновых микротрубочек и локализованных на них МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ после иммунореакции; (Б) – Микрофотографии тубулиновых микротрубочек после иммунореакции без инкубации с АТ_{I} . Масштабный отрезок выделенной области 50 нм. Контрастирование

образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. МТ-микротрубочки; Я-ядро; ПС-полисомы. Красными стрелками обозначены обнаруженные МНЧ.

Проведенные эксперименты на ультратонких срезах клеток РСЗ 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 9А), что хорошо согласуется с локализацией антигена полученного при проведении ИФА анализа (Рисунок 8). 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 9 Б).

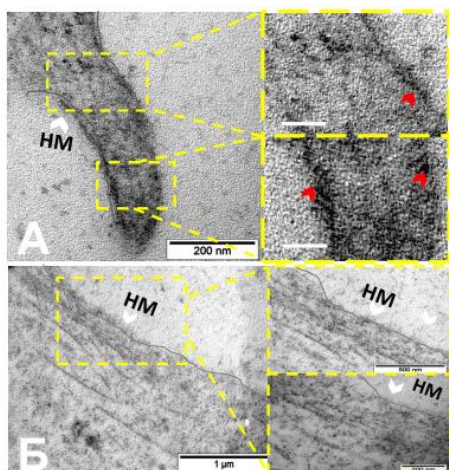


Рисунок 9. (А) – Микрофотографии клеточной мембраны и расположенных вдоль нее МНЧ $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ после иммунореакции; (Б) – Микрофотографии клеточной мембраны после иммунореакции без инкубации с АТ_{I} . Масштабный отрезок выделенной области 50 нм. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. НМ-наружная мембрана. ПС-полисомы. Красными стрелками обозначены обнаруженные МНЧ.

Проведенные эксперименты на ультратонких срезах клеток РСЗ 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 10А). Для доказательства специфичности связывания нанозонда проводили инкубацию с МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ на клеточном срезе без первичных АТ_{I} . По полученным ПЭМ-микрофотографиям (Рисунок 10Б) 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

$\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ 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%.

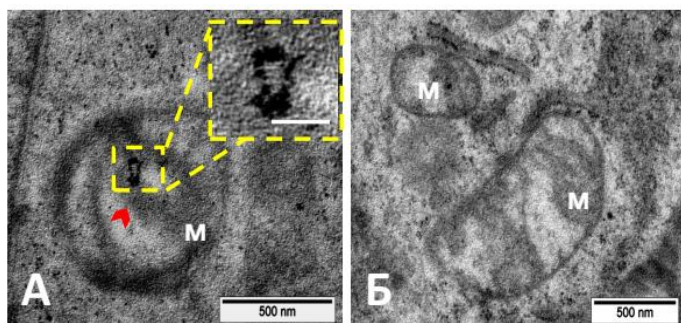


Рисунок 10. (А) – Микрофотографии митохондрий и локализованных на них МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ после иммунореакции; (Б) – Микрофотографии митохондрий после иммунореакции без инкубации с АТ_1 . Масштабный отрезок выделенной области 50 нм. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом

осмия, UranylLess и Lead Citrate. М – митохондрии. Красными стрелками обозначены обнаруженные МНЧ.

В дополнении, для того, чтобы убедиться в точной локализации МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ была проведена СПЭМ-НАADF микроскопия митохондрии и получены изображения высокого разрешения (Рисунок 11). Митохондрия на микрофотографии имеет форму вытянутого овала. В светлый цвет окрашены мембранные структуры, которые дополнительно были покрашены UranylLess и Lead Citrate и тетраоксидом осмия. Стоит обратить внимание на то, что МНЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ 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 11) 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.

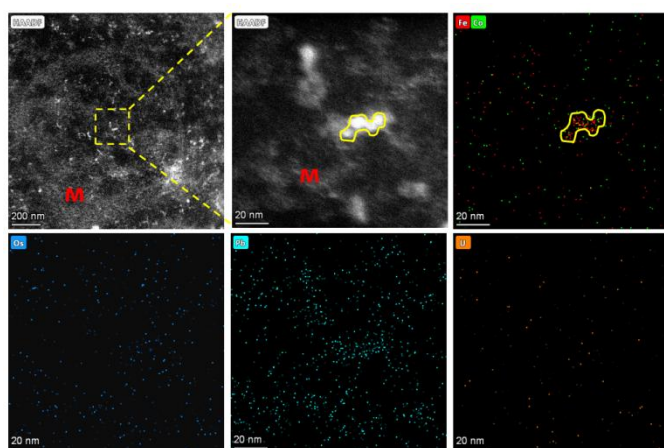


Рисунок 11. СПЭМ изображение, элементные индивидуальные ЭДРС карты высокоспецифичного зонда $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ДФУК}@\text{ПЭГ}@\text{АТ}_{\text{II}}$ в митохондрии в клетках РСЗ. Контрастирование образцов проводили тетраоксидом осмия, UranylLess и Lead Citrate. М – митохондрия.

Согласно количественным данным относительное содержание Pb, Os и Fe с Co 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 компартов МНЧ не дало дополнительных преимуществ относительно метода ПЭМ. Однако ЭДСР анализ в тандеме с СПЭМ НАADF 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 остается 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 молекулами ДФУК 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 РС3: 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 функционализована 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 HAADF 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 ЭДРС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ

Публикации в научных изданиях индексируемых в базе данных РИНЦ

1. **Иванова А.В.** Исследование гидродинамических параметров коллоидов наночастиц методом динамического светорассеяния/ **А.В. Иванова**, А.А. Никитин, М.А. Абакумов// Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2020. – Т.84, №11. – С. 1580-1586.

Публикации в научных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus/Web of Science

1. Synthesis and intensive analysis of antibody labeled single core magnetic nanoparticles for targeted delivery to the cell membrane. / **A.V. Ivanova**, A.A. Nikitin, A.N. Gabashvily, D.A. Vishnevskiy, M.A. Abakumov // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2021. – P. 1-40. DOI: 10.1016/j.jmmm.2020.167487.

2. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid-based universal coating technique for magnetic nanoparticles stabilization for biomedical applications / A. Semkina, A. Nikitin, **A. Ivanova**, N. Chmelyuk, N. Sviridenkova, P. Lazareva, M. Abakumov // Journal of Functional Biomaterials. – 2023. – Vol. 14(9). – P. 461. DOI: 10.3390/jfb14090461.

3. Thermal decomposition of acetylacetonates for highly reproducible synthesis of M-ferrite (Mn, Co and Zn) nanoparticles with tunable magnetic properties. / **A.V. Ivanova**, E.V. Ivanova, A.A. Nikitin, V.M. Cherepanov, M.A. Abakumov // Journal of Alloys and Compounds. – 2024. – Vol. 976. – P. 172736. DOI: 10.1016/j.jallcom.2023.172737

Публикации в сборниках материалов и тезисов научных конференций

1. Визуализация макромолекул методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения, комбинированной с элементным анализом / **Иванова А.В.**, Никитина А.А., Габашвили А.Н., Абакумов М.А. // VII Троицкая конференция с международным участием "Медицинская физика" (ТКМФ-7) : сборник тезисов / ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2020. – С. 132–133.

2. Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа для визуализации клеточных структур / **Иванова А.В.**, Никитин А.А., Габашвили А.Н., Абакумов М.А. // «Ломоносов - 2021», секция «Химия»: материалы международного молодежного научного форума / отв. ред. Дзубан А.В., Коваленко Н.А. – М. – М.: Издательство «Перо», 2021 – С. 1164.

3. Синтез наночастиц ферритов кобальта и марганца для применения в биологии и медицине / Зайчатникова К.И., Кононова А.Н., **Иванова А.В.**, Никитин А.А., Абакумов М.А. // «Ломоносов - 2020»: материалы международного молодежного научного форума / отв. Ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – М. :МАКС Пресс, 2020 – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. – ISBN 978-5-317-06519-5.

4. Синтез наночастиц феррита марганца для применения в биологии и медицине / **Иванова А.В.**, Кононова А.Н., Абакумов М.А. // XXIV Международная научная конференция Новое в магнетизме и магнитных материалах: сборник докладов / МИРЭА - Российский технологический университет. – Москва, 2021. – С. 675–678.

5. Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа для визуализации клеточных структур в сверхвысоком разрешении / **Иванова А.В.** // Современные тенденции развития функциональных материалов: материалы докладов международной молодежной научной конференции / под ред. Иванов Д.А., Ахкямова А.Ф., Бовсуновская П.В., Пирязев А.А., Есаулова И.Г. – Сочи: Научно-технологический университет «Сириус», 2021. – С. 50.

6. Синтез и функционализация поверхности наночастиц сложных оксидов железа моноклональными антителами для визуализации внутриклеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии / **Иванова А.В.**, Абакумов М.А. // «Ломоносов - 2022»: материалы международного молодежного научного форума / отв. Ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. – М. :МАКС Пресс. – Москва, 2022. – С. 32.

7. Наночастицы сложных оксидов железа для визуализации внутриклеточных структур в сверхвысоком разрешении / **Иванова А.В.**, Абакумов М.А. // IX Всероссийская научная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции»: сборник тезисов / Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН). – Москва, 2022. – С. 68.

8. Синтез и применение наночастиц магнетита для визуализации внутриклеточных структур / Иванова Е.В., **Иванова А.В.**, Абакумов М.А. // IX Всероссийская научная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» : сборник тезисов / Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН). – Москва, 2022. – С. 69.

9. Синтез и применение магнитных наночастиц для микроскопии сверхвысокого разрешения / **Иванова А.В.**, Иванова Е.В. // Современные тенденции развития функциональных материалов: материалы докладов международной молодежной научной конференции / под ред. Иванов Д.А., Ахьямова А.Ф., Бовсуновская П.В., Пирязев А.А., Есаулова И.Г. – Сочи: Научно-технологический университет «Сириус», 2022. – С. 32.

10. Применение наночастиц ферритов цинка и марганца для визуализации биомолекул в клетке / Иванова Е.В., **Иванова А.В.**, Абакумов М.А. // «Ломоносов - 2023»: материалы международного молодежного научного форума / отв. Ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. – М.: МАКС Пресс. – Москва, 2023. – С. 1180.

Патент РФ

1. Патент № 2787203 Российская Федерация, МПК C10G 49/00 (2006.01), C01G 51/00 (2006.01), B82B 3/00 (2006.01), B82Y 40/00 (2011.01). Способ получения наночастиц феррита кобальта: №2022123700 заявл. 06.09.2022. опубл. 29.12.2022 Бюл. №1 / **А. В. Иванова**, М.А. Абакумов. – 9 с. : ил.

Ноу-хау

1. **Иванова А.В.**, Абакумов М.А. Национальный исследовательский университет «МИСиС». «Способ одновременной визуализации биологических структур сверхвысокого разрешения». Ноу-хау № 05-645-2020 от 2 декабря 2020 г.

Сокращения, принятые в тексте

АТ-антитело; **АТ_I**-первичное антитело; **АТ_{II}**-вторичное антитело; **БС**-бензиловый спирт; **ГД**-гидродинамический, **ДБЭ**-дибензиловый эфир; **ДСР**-динамическое светорассеяние; **ДФУК-3,4**-дигидроксифенилуксусная кислота; **ИФА**-иммунофлуоресцентный анализ; **МНЧ**-магнитные наночастицы; **МП АЭС**-атомно-эмиссионная спектроскопия с микроволновой плазмой; **НЧ**-наночастицы; **ОК**-олеиновая кислота; **ПАВ**-поверхностно-активное вещество; **ПЭГ**-полиэтиленгликоль; **ПЭМ**-просвечивающая электронная микроскопия; **РФА**-рентгенофазовый анализ; **СПЭМ**-сканирующая темнопольная электронная микроскопия; **ЭДРС**-энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия; **ЭМ**-электронная микроскопия; **Асас**-ацетилацетонат; **Alexa 488**-сульфированный зеленый флуоресцентный краситель; **Ar**-аргон; **CH₃OH**-метанол; **Co(acac)₂**-ацетилацетонат кобальта; **dH₂O**-дистиллированная вода; **DPBS**-фосфатно-солевой буфер Дульбекко; **EDC-1**-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; **Fe(acac)₃**-ацетилацетонат железа (III); **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); **NaOH**-гидроксид натрия; **NHS**-N-гидроксисукцинимид; **PBS**-натрий фосфатный буфер; **PDI**-индекс полидисперсности; **Zn(acac)₂**-ацетилацетонат цинка (II); **UranylLess**-уранилацетат.