

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

Е. С. Алешина, С. В. Лебедев

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ: ПРОСТО О СЛОЖНОМ

Учебное пособие

Рекомендовано ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по образовательной программе высшего образования по направлению подготовки 06.03.01 Биология

Оренбург
2021

УДК 579.67:664(075.8)

ББК 28.4я73+36-1я73

А 49

Рецензент – заведующая Центром «Нанотехнологии в сельском хозяйстве», заместитель директора по науке Федерального научного центра биологических систем и агротехнологий Российской Академии наук, доктор биологических наук, доцент Е.А. Сизова

А 49

Алешина, Е. С.

Нанобиотехнологии: просто о сложном : учебное пособие / Е. С. Алешина, С.В. Лебедев ; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург : ОГУ, 2021. – 109 с.

ISBN

Учебное пособие рекомендовано для обучающихся биологических и медицинских направлений подготовки при изучении дисциплин, связанных с развитием новых методов, в том числе нанотехнологий и возможности их применения в биологии и медицине, также может быть использовано в качестве основной литературы при написании курсовой работы и в качестве справочного материала при выполнении экспериментальной части выпускной работы.

В учебном пособии рассмотрены основные виды наноматериалов, возможности и ограничения при их применении в биомедицинских исследованиях, проблемы, связанные с возможной токсичностью наноматериалов, а также рассмотрены психологические и этические проблемы использования наноматериалов в пищевой промышленности.

Учебное пособие соответствует требованиям ФГОС ВО по направлению подготовки 06.03.01 Биология.

УДК 579.67:664(075.8)

ББК 28.4я73+36-1я73

ISBN

© Алешина Е. С.,

Лебедев С. В., 2021

© ОГУ, 2021

Содержание

Введение.....	5
1 История развития наноматериалов и нанотехнологий.....	9
2 Виды наноматериалов и их возможное использование в биомедицинских технологиях.....	18
3 Металлические наночастицы	24
3.1 Наночастицы серебра и их применение в биомедицине.....	26
3.2 Антимикробные свойства наночастиц серебра NPsAg.....	28
3.3 Использование наночастиц серебра в биологических исследованиях...	30
3.4 Использование наночастиц серебра в терапии	31
4 Наночастицы золота и возможность их применения в биомедицинских исследованиях.....	32
4.1 Бיוвизуализация	34
4.2 Использование наночастиц золота в терапии	35
4.3 Использование наночастиц золота в диагностике.....	36
5 Углеродные наноматериалы и возможность их применения в биомедицинских исследованиях.....	37
5.1 Использование углеродных наноматериалов в качестве биосенсоров ..	40
5.2 Использование углеродных наноматериалов для бיוвизуализации	41
5.3 Использование углеродных наноматериалов в терапии	43
6 Квантовые точки	44
6.1 Свойства квантовых точек	47
6.2 Возможности применения квантовых точек для визуализации.....	48
6.3 Интегрированные квантовые точки	53
6.4 Использование квантовых точек в фотодинамической терапии	53
6.5 Использование квантовых точек для доставки лекарств.....	54
7 Токсичность наноматериалов	54
7.1 Токсичность металлических наночастиц	56
7.1.2 Золотые наночастицы	58
7.2 Токсичность углеродных наноматериалов.....	59
7.3 Токсичность квантовых точек	62
8 Лабораторные работы.....	63

8.1 Лабораторная работа № 1 Изучение различных форм наночастиц с использованием микроскопии	63
8.2 Лабораторная работа № 2 Исследование условий при создании суспензий наноматериалов	66
8.3 Лабораторная работа № 3 Определение дисперсности коллоидных растворов наноразмерных углеродных материалов методом фотоэлектроколориметрии.....	69
8.4 Лабораторная работа № 4 Изготовление электропроводящего покрытия из коллоидного препарата с наноразмерными углеродными частицами	75
8.5 Лабораторная работа № 5 Оценка бактерицидной активности наноматериалов	78
8.6 Лабораторная работа № 6 Исследование биологической активности наночастиц металлов, используемых в косметологии	80
9 Психологические и этические проблемы использования нанотехнологий в пищевой промышленности	89
10 К вопросу о терминологии	93
Список использованных источников	98

Введение

В последние два десятилетия в научную лексику стремительно «ворвался» ряд новых слов с префиксом «нано»: наноструктура, нанотехнология, наноматериал, нанокластер, нанокolloиды, нанохимия, нанотоксикология и т.п. Издаются ряд новых журналов, посвященных исключительно этой тематике, написаны монографии, в названии которых присутствует префикс «нано», создаются «нано»профилированные институты, кафедры и отдельные лаборатории.

В большинстве случаев новые названия даны хорошо известным объектам или явлениям. Но есть и такие, которых действительно не было в арсенале исследователей еще 20 лет назад и без которых уже невозможно представить современное развитие науки – это наночастицы во всем их многообразии, начиная от фуллеренов, нанотрубок, нанопроводов до квантовых точек и квантовых кораллов.

Однако хорошо известно, что человечество издавна подвергалось воздействию наночастиц. Естественными источниками наночастиц могут быть действующие вулканы, лесные пожары, выветривание горных пород, микрослой органической поверхности. Наночастицы являются катализаторами для образования крупных кристаллов полезных ископаемых и силикатов.

Широко распространены наночастицы и во многих биологических объектах. Например, высокоупорядоченные одномерные ансамбли магнитных наночастицы железа присутствуют в бактериях рода *Magnetotactic spirillum*, обеспечивая последним ориентацию в магнитном поле Земли.

Истинными мастерами нанотехнологий являются моллюски, морские ежи, звезды и диатомовые водоросли. Так, морская звезда *Ophiocoma wendtii*

снабжена совершенной системой микролинз для оптического зрения. Линзы кристаллизуются таким образом, что кальцит перестает создавать двойное изображение ночью. Присутствие же в линзе магния предотвращает сферическую абберацию линз. Эта звезда пользуется нанотехнологиями, которые прославили Карла Цейса.

Диатомовые водоросли содержат кремневую кислоту, которая благодаря белкам полиаминам создает частицы диоксида кремния размерами от 50 до 900 нм, образуя диатомит. В 1867 г. А.Нобель обнаружил, что отложения этих водорослей поглощают нитроглицерин, так и был создан динамит, прославивший шведского ученого.

Нанотехнологии (греческое слово *нано* означает «карлик») – это создание и использование материалов, устройств и систем через контроль материи в нанометровом масштабе, т.е. на уровне атомов, молекул и суперамолекулярных конструкций. Это термин предназначен для обозначения конструкций и функциональных структур, которые по крайней мере в одной размерности, имеют наноразмер – нанометр (нм) составляет одну миллиардную метра (10^{-9} м). Это примерно всего в четыре раза больше диаметра отдельного атома, ширина ДНК составляет примерно 2,5 нм, а молекулы белка – 1-20 нм.

Важно понимать, что наноматериалы и их свойства пытаются использовать в биологических системах и медицине, но все это инновационно и не до конца изучено. Однако только за последние 5-10 лет новая отрасль науки, известная как «наномедицина», возникла как отдельная область, и с тех пор ее развитие происходит в геометрической прогрессии.

У Ричарда П. Фейнмана была идея, что крошечные нанороботы могут быть спроектированы, изготовлены, и введены в человеческое тело для выполнения «ремонта» на молекулярном уровне. В его научном докладе «Внизу полным-полно места» в 1959 году он предложил использовать станки для изготовления станков меньшего размера, которые можно использовать по очереди и делать станки еще меньшего размера и т. д. Таким образом,

прозвучала мысль о манипуляции отдельными атомами и молекулами, о возможности искусственно создавать вещества и объекты, собирая их атом за атомом, молекула за молекулой. Фейнман предлагал использовать атомы как строительный материал, вроде крохотных деталей, не видимых невооруженным глазом. В то время еще не было приборов, которые бы позволили заглянуть в мир атомов и молекул и воздействовать на них. Фейнман был четко осведомлен о возможном медицинском применении предлагаемых новых технологий. По мнению Фейнмана, наномедицина, мультидисциплинарная область, которая охватывает биологию, химию, физику, инженерию и материаловедение, будут играть важную роль в улучшении условий жизни человека. Общая цель наномедицины ничем не отличается от медицины традиционной – диагностировать как можно точнее и раньше, чтобы лечить как можно эффективнее, без побочных эффектов, а также для оценки эффективности неинвазивного лечения.

Манипулируя лекарствами и другими материалами в нанометровом масштабе, их фундаментальные свойства и биоактивность могут быть изменены, что позволит контролировать характеристики лекарств, такие как растворимость, время действия, контролируемое выведение в течение короткого или длительный срок действия, обусловленные экологическими причинами, узкоспецифичная доставка. Кроме того, за счет использования нанометрового размера и увеличенной площади функциональной поверхности частицы возможно использовать по-разному. К тому же уникальные оптические, магнитные и электронные свойства наноматериалов обеспечивают многообещающие платформы для широкого спектра применений в биомедицине, включая биосенсоры, визуализацию и доставку лекарств (рисунок 1).

Поскольку все свойства наноматериалов зависят от размера и формы, изучение методов их получения является одним из основных направлений исследований. Традиционно синтетические подходы к производству наноматериалам разделились на две категории: «сверху вниз» и «снизу

вверх». Типичная процедура «сверху вниз», так называемый физический метод, предполагает механическое измельчение-обработку сыпучего материала и последующую стабилизацию образовавшихся наночастиц.

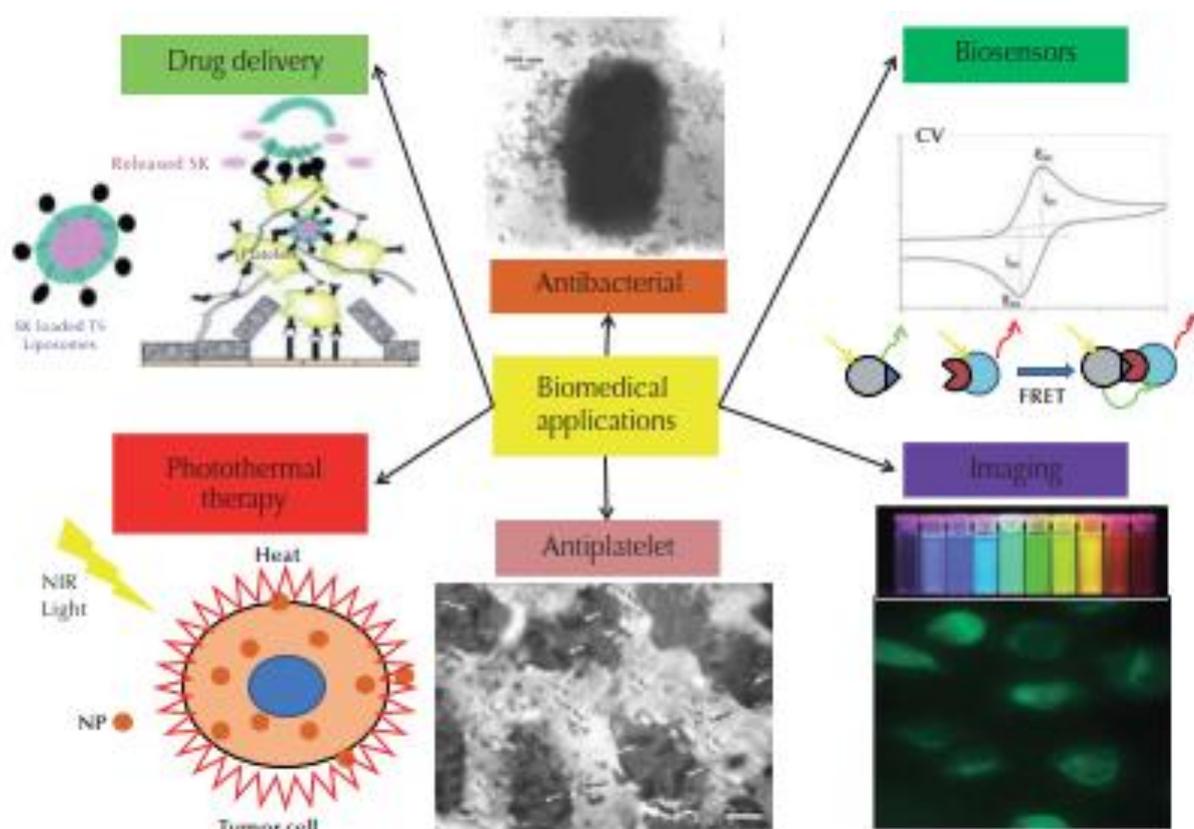


Рисунок 1 – Использование наночастиц в биомедицине

Процедура же «снизу вверх» пытается построить наноматериалы и наноустройства по одной молекуле/атоме за раз, во многом так же, как живые организмы синтезируют макромолекулы.

1 История развития наноматериалов и нанотехнологий

Еще до наступления эры нанотехнологий люди сталкивались с наноразмерными объектами и протекающими на наноразмерном уровне процессами, и использовали их на практике (немного мы об этом говорили во введении). Так, например, биохимические реакции между макромолекулами, из которых состоит все живое, получение фотоизображений, катализ в химическом производстве, бродильные процессы, происходящие при изготовлении вина, сыра, хлеба, и другие происходят на наноуровне.

Однако так называемая «интуитивная нанотехнология», которая первоначально развивалась стихийно, без надлежащего понимания природы используемых объектов и процессов, не могла быть надежной основой в будущем.

Поэтому все большую актуальность приобретают научные исследования, расширяющие горизонты познания наномира и направленные на создание принципиально новых продуктов и технологий.

Давайте разберемся какая же краткая история исследований и разработок в области наноматериалов и нанотехнологий?

Научные исследования нанообъектов берут свое начало в XIX веке, когда в 1856-1857-е годы М. Фарадей впервые получил и изучил свойства коллоидных растворов нанодисперсного золота и тонких пленок на его основе.

Интересно отметить пример нанотехнологического предвидения, сделанного в 1881 году Н.С. Лесковым в повествовании о тульском мастере Левше, сумевшем подковать «аглицкую» блоху «наногвоздями», которые можно было разглядеть только в «мелкоскоп» с увеличением 5 000 000 раз, что соответствует возможностям современной высокоразрешающей

микроскопии (на это первым обратил внимание российский ученый, специалист в области наноматериаловедения Р.А. Андриевский).

В первой половине XX века зародилась и получила развитие техника исследования нанообъектов. В 1928 году была разработана схема устройства оптического микроскопа ближнего поля. В 1932 году был впервые сконструирован просвечивающий электронный микроскоп, а в 1938 году – сканирующий электронный микроскоп. В 1939 году немецкий физик Э. Руска создал первый эффективный электронный микроскоп, за что получил Нобелевскую премию в 1986 году.

Во второй половине XX века была сформирована принципиальная научная и технологическая база для получения и применения наноматериалов и наноизделий.

В 1959 году американский физик, Нобелевский лауреат Р. Фейнман прочитал, ставшую в последствии знаменитой лекцию под названием “Внизу полным-полно места: приглашение в новый мир физики”, в которой была впервые рассмотрена возможность создания наноразмерных деталей и устройств совершенно новым способом – путем поштучной “атомарной” сборки. Р. Фейнман заявил: «Пока мы вынуждены пользоваться атомарными структурами, которые предлагает нам природа». И далее добавил: «Но в принципе физик мог бы синтезировать любое вещество по заданной химической формуле».

В 1972 году был создан оптический микроскоп ближнего поля. В 1981 году немец Г. Бинниг и швейцарец Г. Рорер, работавшие в то время в филиале IBM в Цюрихе, предложили конструкцию сканирующего туннельного микроскопа. Позже, в 1986 году, за работы по сканирующей туннельной микроскопии они были удостоены Нобелевской премии по физике. В этом же 1986 году Г. Бинниг изготовил атомно-силовой микроскоп.

В 1974 году японский ученый К. Танигучи при обсуждении проблем обработки материалов впервые ввел термин «нанотехнология». В 1981 году

американский ученый Г. Глейтер впервые ввел термин «нанокристаллические» материалы. Позже стали использоваться такие термины, как «наноструктурные», «нанофазные», «нанокомпозиционные» материалы и т.п.

В 1986 году американский физик Э. Дрекслер в своей книге «Машины созидания: пришествие эры нанотехнологии», основываясь на биологических моделях, ввел представления о молекулярных роботах, а также развил предложенные Р. Фейнманом идеи нанотехнологической стратегии «снизу – вверх».

Одним из важнейших результатов исследований в области наномира является развитие нанoeлектроники, которая базируется на использовании квантовых эффектов, проявляющихся в наноструктурах. В 1975 году были впервые теоретически рассмотрены принципиальные возможности существования наноструктур пониженной размерности – квантовых точек. В первой половине 1970-х года начались интенсивные исследования полупроводниковых гетероструктур, которые привели в 1993-1994 годах к созданию гетеролазеров на основе наноструктур с квантовыми точками. Значительный вклад в эти исследования внесли российский ученый Ж.И. Алфёров и американский ученый Г. Крёмер, за что они в 2000 году получили Нобелевскую премию по физике. В 1984-1989 годах были предложены квантовые интерференционные транзисторы. В 1985-1986 годы российские ученые Д. Аверин и К. Лихарев исследовали процессы одноэлектронного туннелирования, заложив тем самым основы нового направления в нанoeлектронике – одноэлектроники.

В 2007 г. присуждена Нобелевская премия по физике за открытие и исследование одного из необычных явлений наномира – эффекта гигантского магнитосопротивления, который проявляется в резком (на десятки процентов) возрастании электросопротивления во внешнем магнитном поле, что связано со спин-зависимыми транспортными явлениями в наноструктурах.

Премии удостоены француз А. Ферт и немец П. Грюнберг, независимо друг от друга открывшие этот эффект в 1988 году. Эффект гигантского магнитосопротивления проявляется в магнитных нанопленках и нанопроволоках, которые благодаря этому эффекту перспективно использовать для создания устройств магнитной записи. Открытие этого эффекта послужило основой для развития спинтроники. С 1997 года компания IBM в промышленных масштабах стала производить первый спинтронный прибор – считывающую головку с гигантским магнитосопротивлением размерами 10-100 нм.

В 1987 году Э. Яблонович, сотрудник Bell Communications Research (впоследствии профессор Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе), выдвинул концепцию фотонного кристалла, положив тем самым начало развитию новейшего направления современной оптики – нанофотоники.

Мощным стимулом для развития нанотехнологий стало создание принципиально новых углеродных наноматериалов. Долгое время считалось, что существуют две единственные полиморфные модификации углерода – графит и алмаз. Однако, как оказалось, пределы полиморфных превращений углерода этим не ограничиваются, свидетельством чему являются весьма необычные по своей структуре фуллерены и углеродные нанотрубки.

Впервые возможность существования фуллеренов была предсказана японскими учеными Е. Осава и З. Иошида в 1970 году. Чуть позже, в 1973 году российские ученые Д.А. Бочвар и Е.Г. Гальперн сделали первые теоретические квантово-химические расчеты такой молекулы и доказали ее стабильность. В 1980-е годы были получены данные астрофизических исследований спектров некоторых звезд, указывающие на существование подобных комплексов. В 1985 году фуллерены были впервые синтезированы. Это удалось сделать английскому ученому Г. Крото и американским ученым Р. Керл и Р. Смолли, за что в 1996 году они удостоились Нобелевской премии по химии. В ходе изучения масс-спектров паров графита, полученных в результате лазерного воздействия, ими были выявлены

крупные агрегаты C₆₀ и C₇₀, состоящие соответственно из 60 и 70 углеродных атомов. В 1990 году в Германии ученые В. Кретчмер и К.Фостирополус разработали технологию, позволившую получать фуллерены в достаточно больших количествах. Как выяснилось позже, существуют и природные фуллерены. Они были обнаружены в 1992 году в природном углеродном минерале – шунгите (свое название этот минерал получил от названия поселка Шуньга в Карелии). Углеродные нанотрубки открыл в 1991 году японский ученый С. Иджима. Фуллерены и углеродные нанотрубки с момента их открытия привлекли внимание многих исследователей необычностью своей структуры и свойств. В ходе последующих исследований были выявлены различные производные этих структур, которые получались в результате взаимодействия фуллеренов и углеродных нанотрубок с другими веществами. Было также установлено, что структуры, подобные фуллеренам и углеродным нанотрубкам, могут быть образованы атомами не только углерода, но и других веществ. В частности, в 1992 году были обнаружены фуллереноподобные наночастицы Ti₈C₁₂. В том же 1992 году были впервые синтезированы неуглеродные нанотрубки на основе MoS₂ и WS₂.

О наличии глубоких корней, лежащих в основе нынешних нанотехнологических исследований, свидетельствует история формирования одной из самых молодых областей химии – супрамолекулярной химии, открывающей широкие возможности для создания различных видов молекулярных наноструктур [6].

Термин «супрамолекулярная химия» был введен французским ученым Ж.-М. Леном в 1978 году. Несколько ранее, в 1973 году в его трудах появился термин «супермолекула», который был известен еще в середине 1930-х годов и употреблялся для описания более высокого уровня организации, возникающего при образовании ряда сложных молекулярных соединений. Супермолекулы состоят из компонентов, которые связываются друг с другом по механизму молекулярного распознавания,

предполагающему наличие между ними определенного сродства (комплементарности). На возможность существования такого механизма указывал П. Эрлих еще в 1906 году, подчеркивая, что молекулы реагируют друг с другом строго селективно. Таких же взглядов придерживался Э. Фишер, который в 1894 году сформулировал принцип «ключ – замок» – принцип, предполагающий, что в основе молекулярного распознавания лежит геометрическая комплементарность компонентов, образующих супрамолекулярный ассоциат. Вещества, которые в настоящее время рассматривают как соединения включения, ранее наблюдали А. Кронстедт – в 1756 году, Дж. Пристли – в 1778 году, Б. Пелетье и В. Карстен – в 1785-1786 годы, Г. Дэви – в 1823 году. Термин «клатрат» в его современном толковании был введен Г. Пауэллом в 1947 году. Важный этап в становлении супрамолекулярной химии связан с открытием американским ученым Ч. Педерсеном в 1962 году краун-эфиров – молекул плоской формы, обладающих полостью, способной включать в себя молекулы другого сорта. В 1967 году Ж.-М. Лен осуществил синтез аналогичных молекул с трехмерной полостью, названных криптандами. В начале 1980-х годов американский ученый Д. Крам сконструировал так называемые «молекулы контейнеры» с предварительно организованной структурой – сферанды и кавитанды.

За сравнительно короткий период времени наноматериалы получили широкое распространение в самых различных областях человеческой деятельности. Примером тому является история развития биотехнологии.

Термин «биотехнология» был предложен в 1917 году венгерским инженером К. Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. Под биотехнологией Эреки понимал «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производится те или иные продукты».

Хронология дальнейшего развития биотехнологии выглядит следующим образом: в 1943 году освоено промышленное производство пенициллина; в 1944 году обнаружен генетический материал – дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК (Эвери, МакЛеод, МакКарти), а в 1953 году – двойная спираль ДНК (Уотсон, Крик); в 1966 году расшифрован генетический код; в 1970 году выделена первая рестриктаза – фермент, способный расщеплять ДНК; в 1973 синтезирован полноразмерный ген т-РНК – транспортной рибонуклеиновой кислоты (Коран); в 1975 году разработана технология рекомбинантных ДНК (Бойер, Коэн), а в 1976 году – методы определения нуклеотидной последовательности ДНК. Последующие годы ознаменовались развертыванием широкого фронта исследований в области геной инженерии, которые привели в 1990 году к началу работ над проектом “Геном человека”. В 1997 году было впервые клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки.

Другим примером бурного развития наноматериалов является история создания квантовых компьютеров. В 1985 году профессор Оксфордского университета Д. Дойч предложил математическую модель квантовомеханического варианта машины Тьюринга. В 1994 году П.В. Шор (фирма AT & T Bell), показал, что квантовомеханическая машина Тьюринга может быть создана практически. В частности, она оказалась эффективной в решении задач о разложении на множители больших чисел. В настоящее время алгоритм, предложенный Шором, широко применяется при создании различных типов квантовых компьютеров. В 1998 году М. Такэути (фирма Мицубиси Дэнки) провел принципиальные эксперименты по квантовым вычислительным системам с использованием фотонов. В 1999 году Н. Накамура (фирма NEC) успешно исследовал возможности практической работы квантового компьютера.

Нынешний период в развитии наноматериалов характеризуется резкой активизацией исследований и разработок в данной области, вложением в них

существенных инвестиций. Особенно ярко эти тенденции проявляются в ведущих индустриальных странах мира.

США в этом направлении занимают лидирующие позиции. В 2001 году была утверждена Национальная Нанотехнологическая Инициатива (ННИ), на реализацию которой американское правительство выделило около 500 миллионов долларов на текущий год. Основная идея этой программы была сформулирована следующим образом: «Национальная Нанотехнологическая Инициатива определяет стратегию взаимодействия различных федеральных ведомств США с целью обеспечения приоритетного развития нанотехнологий, которая должна стать основой экономики и национальной безопасности США в первой половине XXI века».

В период 1996-98-х годов, предшествовавший принятию ННИ, специальный комитет американского Центра оценки мирового состояния технологий (World Technology Evaluation Center, WTEC) осуществлял мониторинг и анализ развития нанотехнологий по всем странам и выпускал для научных, технических и административных специалистов США обзорные информационные бюллетени об основных тенденциях развития и достижениях. В 1999 году состоялось заседание Межотраслевой группы по нанонауке, нанотехнике и нанотехнологий (Interagency Working Group on Nanoscience, Engineering and Technology, IWGN), результатом которого стала разработка прогноза исследований в области нанотехнологий на ближайшие 10 лет. В том же году выводы и рекомендации IWGN были поддержаны Национальным советом по науке и технике при президенте США (PCAST), после чего в 2000 году было официально объявлено о принятии ННИ.

В преамбуле к ННИ президент США Б. Клинтон заявил: «Я выделяю 500 миллионов долларов в текущем финансовом году на государственную нанотехнологическую инициативу, которая позволит нам в будущем создавать новые материалы (превосходящие по характеристикам существующие в тысячи раз), записать всю информацию Библиотеки Конгресса на крошечном устройстве, диагностировать раковые заболевания

при появлении нескольких пораженных клеток и добиться других поразительных результатов. Предлагаемая инициатива рассчитана, по крайней мере, на двадцать лет и обещает привести к важным практическим результатам».

Япония, так же как и США, уделяет значительное внимание развитию нанотехнологий. В 2000 году Японская Экономическая Ассоциация (Кэйданрэн) организовала специальный отдел по нанотехнологиям при промышленно-техническом комитете, а в 2001 году был разработан общий план развития нанотехнологических исследований. Основные положения этого плана сводились к следующему: определить в качестве основных направлений «прорыва» в нанонауке информационные технологии, биотехнологии, энергетика, экология и материаловедение; обеспечить приток крупных капиталовложений в отрасли производства, основанные на нанотехнологиях; энергично развивать исследования в указанных направлениях и внедрять их результаты в производство таким образом, чтобы эти направления стали «флагманами» грядущей нанотехнологической революции; разработать государственную стратегию развития нанотехнологий, прежде всего, организовать эффективное сотрудничество промышленных, государственных и научных ведомств и организаций в проведении исследований.

Государственные расходы Японии на развитие нанотехнологий в 2001 году составили около 420 миллионов долларов, что почти равно объему расходов США в этой области в соответствующий период.

Страны Западной Европы начали проводить исследования в области нанотехнологий в рамках соответствующих национальных программ. При этом объемы финансирования этих исследований значительно меньше, чем в США и Японии. В ФРГ нанотехнологические исследования поддерживаются в основном Министерством образования, науки, исследований и технологий.

В Англии руководство развитием нанотехнологий осуществляет Совет по физико-техническим исследованиям, а также Национальная физическая

лаборатория. Во Франции стратегию развития нанотехнологий определяет Национальный Центр научных исследований.

Все больше внимания уделяется развитию нанотехнологий в Китае, Южной Корее, ряде других развивающихся стран. В последние годы нанотехнологические исследования начали проводиться в странах СНГ, в частности, в России, Украине, Беларуси, как правило, в рамках государственных научных программ.

Предполагается, что в ближайшие годы государственные ассигнования в ведущих индустриальных странах мира на исследования в области нанотехнологий существенно возрастут. При этом намеченные исследования будут нацелены на решение ряда конкретных задач, такие как создание сверхминиатюрных транзисторов и запоминающих устройств с мультитерабитовым объемом памяти; повышение быстродействия компьютеров в миллион раз; создание сверхпрочных материалов и разработка на их основе новых транспортных средств; разработка генетических и медицинских препаратов против раковых заболеваний; разработка новых материалов и процессов для защиты окружающей среды и др.

2 Виды наноматериалов и их возможное использование в биомедицинских технологиях

Металлические наночастицы (рисунок 2). Среди различных наноматериалов достаточно интенсивно используются в биомедицинских исследованиях именно металлические наночастицы, они зарекомендовали себя как наиболее удобные и подходящие инструменты в области нанотехнологий. Основываясь на их уникальной оптике, физических и электрических свойствах, металлические наночастицы нашли применение в широком спектре биомедицинских исследований, таких как визуализация,

зондирование, доставка лекарств и работа на генном уровне. Многие исследования в области нанобиотехнологий показывают, что некоторые из этих наночастиц также имеют значительный терапевтический потенциал. Разнообразие применения наночастиц в биомедицинских исследованиях постоянно расширяется в связи с их относительно небольшой токсичностью.

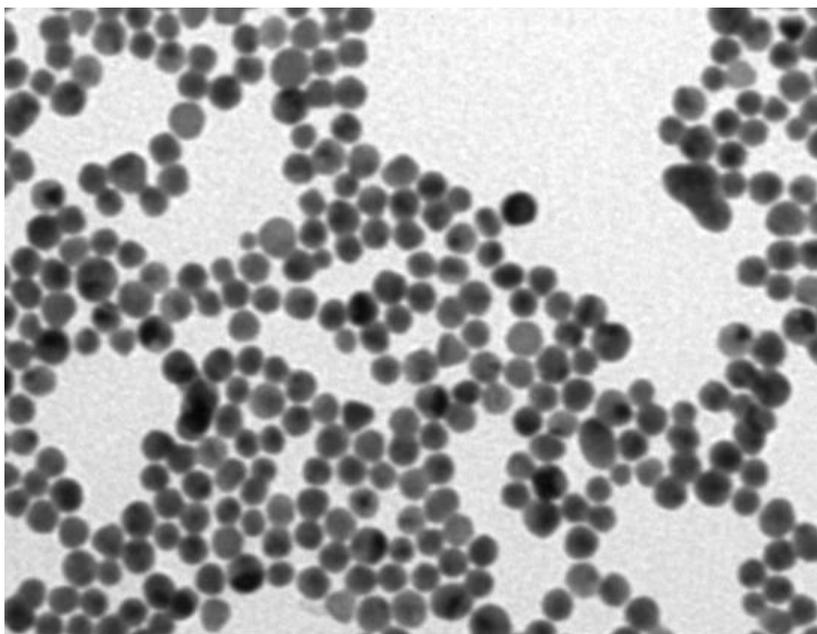


Рисунок 2 – Наночастицы платины, исследованные с использованием трансмиссионной электронной микроскопии

Наноматериалы на основе углерода. Углеродные наноматериалы (CN) включают фуллерены, нанотрубки, наноалмазы и графен.

Фуллерены (рисунок 3). Фуллерены представляют собой новую аллотропную форму углерода с многоугольной структурой, который состоит исключительно из атомов углерода. Растворимое производное фуллеренов, таких как C₆₀, очень перспективны как фармацевтические защитные агенты. Данные наноструктуры характеризуются наличием множеством точек для функционализации различными химическими аддендами. Такие производные уже проходят клинические испытания, обладают хорошей биосовместимостью и низким показателем токсичности даже при относительно высоких дозировках.

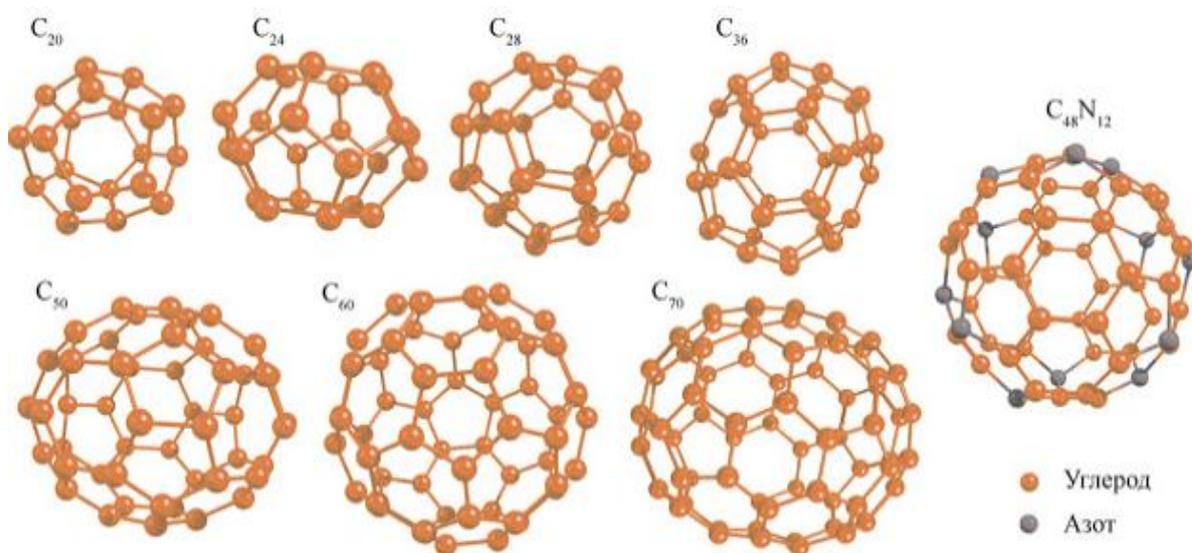


Рисунок 3 – Схематичное изображение различных представителей класса фуллеренов

Фуллереновые соединения можно использовать в качестве противовирусных агентов, в первую очередь против вируса иммунодефицита, в качестве антибактериальных средств (например, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*), как фотодинамические агенты при противоопухолевой терапии, как антиоксидантные и антиапоптотические средства для лечения трофического склероза и болезни Паркинсона.

Углеродные нанотрубки (рисунок 4). Углеродные нанотрубки являются одним из наиболее широко используемых наноматериалов из-за их уникальных физических, химических и биологических свойств. Есть два класса углеродных нанотрубок: однослойные (одностенные) и многослойные (многостенные). Теоретически нанотрубки рассматриваются как свернутые конструкции из одиночных или нескольких листов графена для получения одностенных и многостенных нанотрубок, соответственно. Эти углеродные аллотропные соединения имеют большую площадь поверхности, высокую механическую прочность, сверхлегкий вес, богатые электронные свойства, отличную химическую и термическую стабильность. Благодаря своим

уникальным физико-химическим свойствам исследователи изучают потенциал применения углеродных нанотрубок в биологии и биомедицине. Углеродные нанотрубки легко могут быть поверхностно функционализированы для связывания белков и нуклеиновых кислот, и, следовательно, являются новыми компонентами для доставки терапевтических молекул.

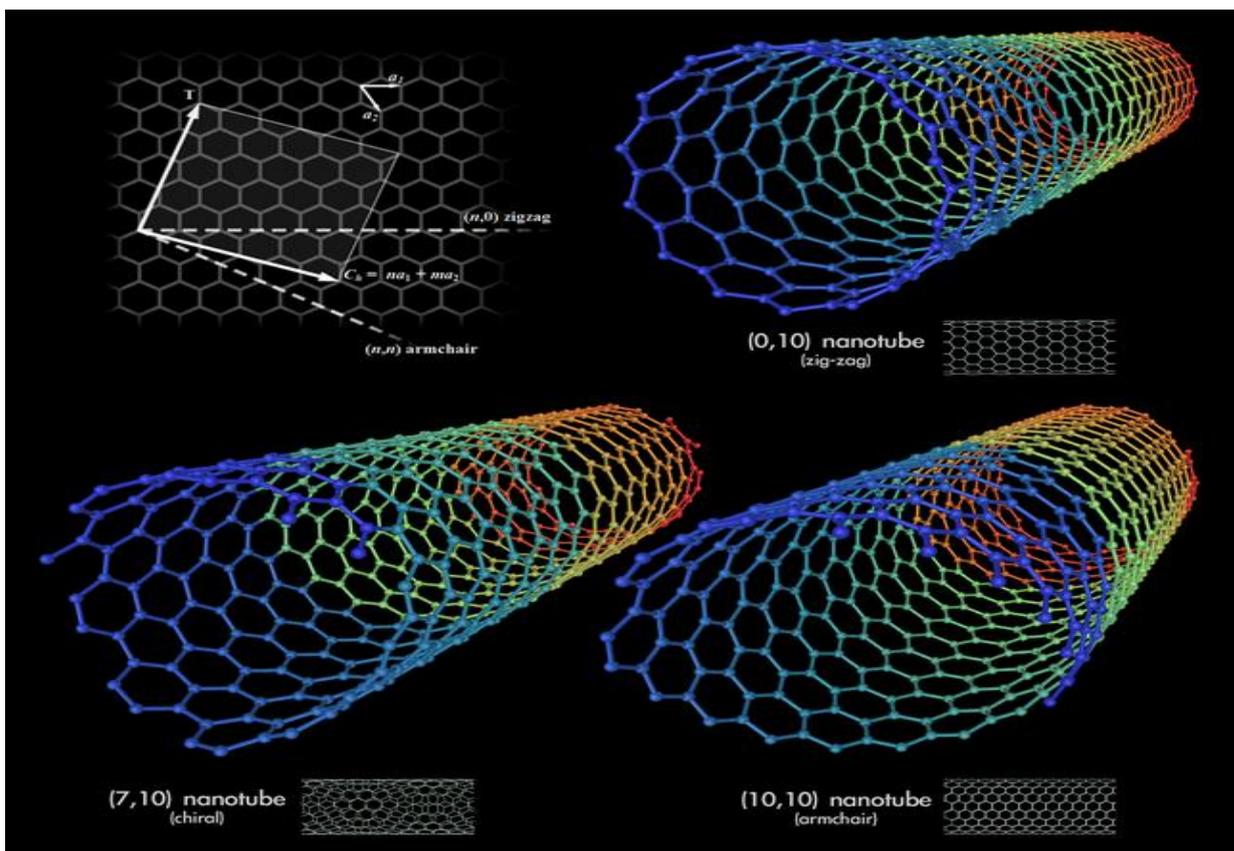


Рисунок 4 – Схематичное изображение одностенных и многостенных углеродных нанотрубок

Наноалмазные частицы (рисунок 5). Алмазные наночастицы были исследованы как биомаркеры для флуоресцентной визуализации. В поверхность наноалмазных частиц могут быть функционализированы белки и нуклеиновые кислоты, позволяющие частицам быть использованными в качестве носителя для фармацевтических агентов или олигонуклеотидов.

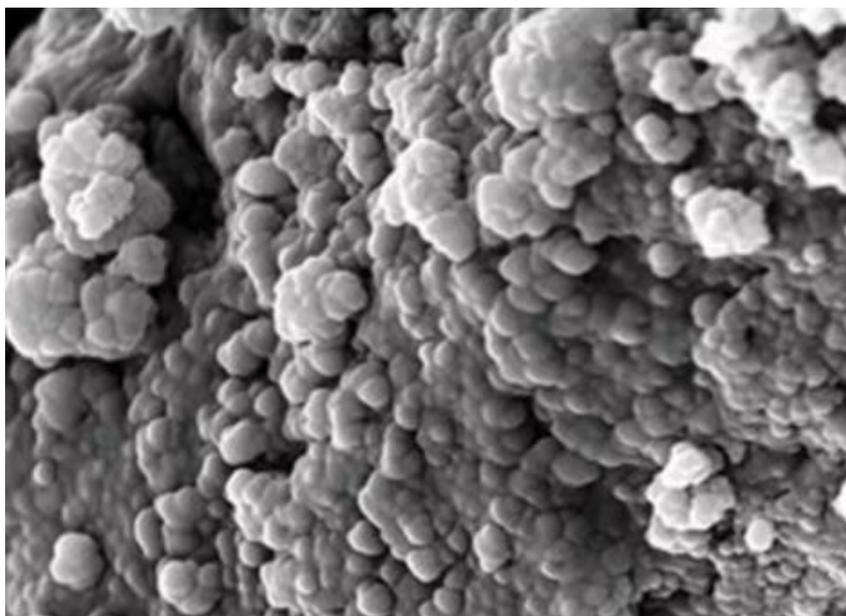


Рисунок 5 – Наночастицы алмаза

Графен (рисунок 6). Отличительные структурные свойства графена, в частности его высокое соотношение сторон, склонность к функциональной модификации, уникальные электронные и оптические свойства, а также его потенциальная биосовместимость, делает его чрезвычайно привлекательным кандидатом для биомедицинских применений, таких как разработка биосенсоров, визуализация, доставка лекарств, бактериальное ингибирование и фототермическая терапия.

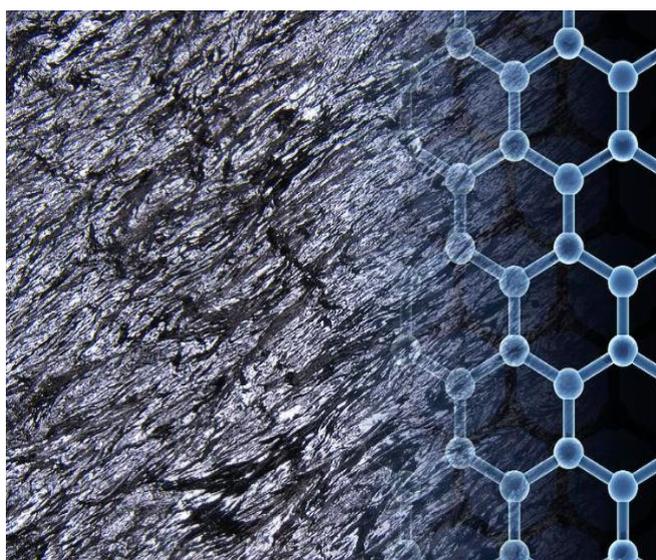


Рисунок 6 – Макрофотография образца графита, формы углерода, которая естественным образом встречается вблизи поверхности Земли.

Справа на изображении показан лист графена в виде синих молекул. Сложенные листы графена образуют минерал графит

Квантовые точки (рисунок 7). Квантовые точки являются отличными полупроводниками и представляют собой нанокристаллы с пространственно ограниченным возбужденным состоянием.

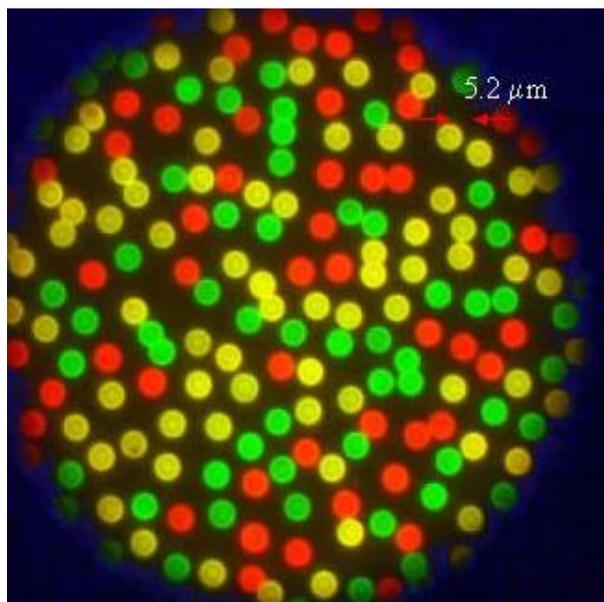


Рисунок 7 – Флуоресценция квантовых точек

Особенностью их биологического применения является необходимость покрытия их другими материалами, чтобы сделать их воднодисперсными и предотвратить утечка токсичных тяжелых металлов. Квантовые точки широко используются в визуализации и маркировке клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Также квантовые точки успешно используются для количественной оценки флуоресценции, в наблюдениях гибридизации, а также как биосенсоры на основе переноса заряда, доставки лекарств и в фотодинамической терапии.

Другие биомедицинские наноматериалы.

Помимо упомянутых выше наноматериалов, другие наночастицы также получили не менее широкое распространение и признание в биомедицинской сфере, в том числе **магнитные наночастицы**, которые обеспечивают множество возможностей в биомедицинских исследованиях за счет простоты оптимизации размеров в соответствии с требованиями, управляемости внешней магнитной силой, усиления контраста в магнитно-резонансной томографии (МРТ) для очистки белков, доставки лекарств, визуализации, маркировки, зондирования.

Полимерные наночастицы имеют коллоидную структуру, состоят из синтетических или полусинтетических полимеров. Полимеры, такие как полисахарид хитозан, полимолочная кислота, капролактон могут быть использованы в качестве носителей лекарств. При этом препарат, инкапсулированный или прикрепленный к наночастице-матрице, растворяется и улавливается.

Липосомы – это наночастицы, содержащие липидную двухслойную мембрану, окруженную водным барьером. Амфифильные молекулы благодаря сходству с биологической мембраной могут быть использованы для улучшения эффективности и безопасности новых препаратов.

Были предложены **твердые липидные наночастицы** как новый тип системы коллоидного лекарственного носителя для внутривенного введения. Система состоит из твердых липидных частиц сферической формы в нанометровом диапазоне, которые исчезают в воде или растворе поверхностно-активного вещества.

3 Металлические наночастицы

Среди различных наноматериалов, используемых в биомедицинских исследованиях, доказано, что металлические наночастицы – самый удобный и подходящий вариант. Свойства наночастиц зависят от их структуры и

состава, и обычно могут быть спроектированы или модифицированы благодаря размерным характеристикам компонентов. Главными параметрами наночастиц являются их форма, размер и морфологическая субструктура. Именно большинство свойств металлических наночастиц зависят от этих параметров. Наноструктурированные металлические коллоиды могут быть получены по принципам «сверху-вниз» и «снизу-вверх», принципы которых описаны ранее.

Тезис о биосовместимости или биогенности наночастиц является одной из основных проблем, которые необходимо преодолеть, чтобы реализовать их безопасное биомедицинское применение. В этом контексте некоторые значительные успехи были достигнуты за счет использования методов, основанных на химических реакциях в растворе (часто называют «влажной химией»). Процедура «влажный химикат» включает выращивание наночастиц в жидкой среде, содержащей различные реагенты и особые восстановители, такие как борогидратнатрия, битартрат калия, метоксиполиэтиленгликоль или гидразин. Тем не менее, в большинстве этих процедур сильные химические восстановители были заменены на более биологически совместимые реагенты, такие как глюкоза. Стабилизация таких агентов, как донорные лиганды, полимеры часто используются для предотвращения агломерирования для более легкого смешивания в условиях *in vivo*. Поверхностно-активное вещество – это молекула, которая динамически адсорбируется на поверхности наночастиц в условиях реакции. Это должно быть достаточно мобильное вещество, чтобы обеспечить доступ для дополнения мономерных звеньев, оставаясь при этом достаточно стабильным для предотвращения агрегации наночастиц. Приведем несколько примеров подходящих поверхностно-активных веществ или стабилизаторов: алкилтиолы, фосфины, оксиды фосфина, фосфаты, амиды или амины, карбоновые кислоты, натрий додецилбензилсульфат или поливинилпирролидон. Поскольку большинство используемых поверхностно-активных веществ имеют низкую совместимость с клетками и

тканями крупного рогатого скота, то сывороточный альбумин представляется достаточно оптимальным выбором для использования в качестве стабилизирующего агента. Ученые пытались по возможности использовать микроорганизмы как экологически чистые нанофабрики для синтеза металлических наночастиц, таких как сульфид кадмия, золото и серебро. В последние годы металлические наночастицы и их сплавы широко изучены и нашли возможность применения в различных областях, например, в сенсорной технике, оптических устройствах, катализе, биологической маркировке, в системе доставки лекарств и лечении некоторых видов рака. Металлические наночастицы нашли свое применение в качестве маркеров для оптического обнаружения биомолекул, имеют значительный терапевтический потенциал, противомикробные и антиагрегатные свойства, а также для стабилизации белков, доставки лекарств и фототермической абляции опухоли. Далее более подробно обсудим биомедицинские возможности применения двух широко используемых металлических наночастиц: серебра (NPsAg) и золота (NPsAu).

3.1 Наночастицы серебра и их применение в биомедицине

Частицы наносеребра обычно меньше 100 нм и содержат от 20 до 15000 атомов серебра (рисунок 8). Серебряные наночастицы (NPsAg) получили пристальное внимание благодаря их уникальным физическим, химическим и биологическим свойствам и используются в оптике, электронике и медицине. Кроме того, наносеребро имеет выраженное антимикробное и противопаразитарное действие. Наночастицы серебра поддерживают поверхностные плазмоны, что связано с коллективными колебаниями электронов на поверхность частицы при возбуждении электромагнитным магнитным излучением, что способствует их уникальным оптическим свойствам. При определенных длинах волн света поверхностные плазмоны приводятся в резонанс и NPsAg приобретают определенный цвет,

который является следствием их размера, формы и окружающей среды. У NPsAg наблюдается желтый цвет раствора и любые видимые изменения в цвете наночастиц в растворе обычно указывают на изменение степени агрегации этих наночастиц.

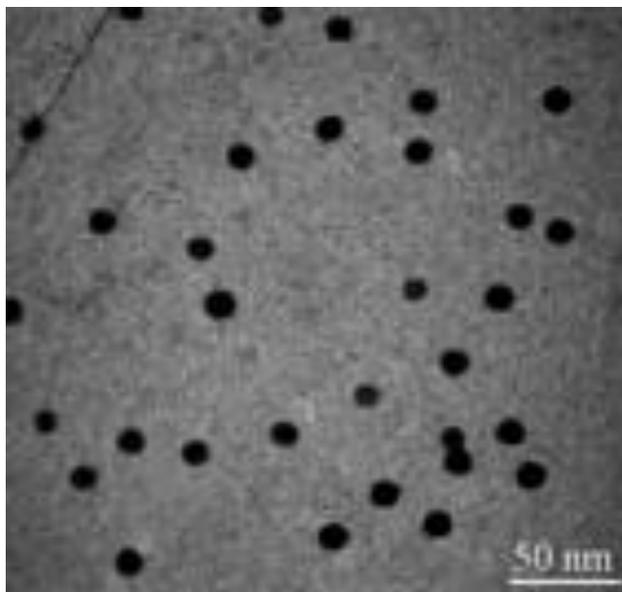


Рисунок 8 – Наночастицы серебра, исследованные с помощью трансмиссионного электронного микроскопа

Пиковая длина волны поглощения NPsAg находится в диапазоне 405-430 нм и свидетельствует о формировании NPsAg. На данном этапе исследований стало возможно синтезировать биосовместимые NPsAg с повышенной стабильностью и значительным антибактериальным эффектом за счет использования глюкозы в качестве восстановителя и бычьим сывороточным альбумином в качестве стабилизатора. Как упоминалось выше, другой подход к синтезу биосовместимых наночастиц серебра является биогенным и предполагает использование микроорганизмов. Например, когда микроорганизм *Pseudomonas stutzeri* AG259, выделенный из серебряного рудника, помещают в концентрированный водный раствор нитрата серебра, происходит восстановление ионов Ag^+ и формирование NPsAg четко определенного размера. Также успешно были синтезированы наночастицы серебра с использованием гриба *Fusarium oxysporum* и бактерий

Staphylococcus aureus. Основываясь на их уникальных физико-химических свойствах, эти NPsAg нашли существенное применение в широком спектре биомедицинских исследованиях, таких как визуализация и терапия, особенно в качестве противомикробных агентов.

3.2 Антимикробные свойства наночастиц серебра NPsAg

Было показано, что наночастицы серебра проявляют значительную антимикробную активность, а также усиливают действие обычных антибиотиков. Они обладают бактерицидной активностью против нескольких бактериальных видов, при этом они более эффективны и имеют более обширный спектр действия, чем большинство обычных антибиотиков. Исследования также показали, что наносеребро обладает более высокой микробиоцидной активностью, чем ионное серебро. Доказана способность коллоидного серебра подавлять рост и размножение бактериальных штаммов, в том числе мультилекарственнорезистентных. Антимикробная активность коллоидных наночастицы серебра зависит от размера, формы частиц, при этом бактерицидная активность возрастает с уменьшением размера наночастицы. Недавно одна группа ученых успешно синтезировала NPsAg, обладающие широким спектром активности с эффективностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. При этом, с помощью электронной микроскопии были выявлены размернозависимые взаимодействия NPsAg с бактериями. Ученые пришли к выводу, что частицы наносеребра в основном в диапазон размеров от 1 до 10 нм прикрепляется к клетке и разрушают ее мембрану. Они также были обнаружены и внутри клетки, влияя на другие важные клеточные процессы. Также наночастицы серебра использовались в качестве среды для доставки антибиотиков и синтеза композитов при использовании в качестве дезинфицирующих фильтров и покрытий. Многими учеными

продемонстрировано влияние высокостабильных наночастиц серебра, наделенных значительными антибактериальными свойствами (рисунок 9).

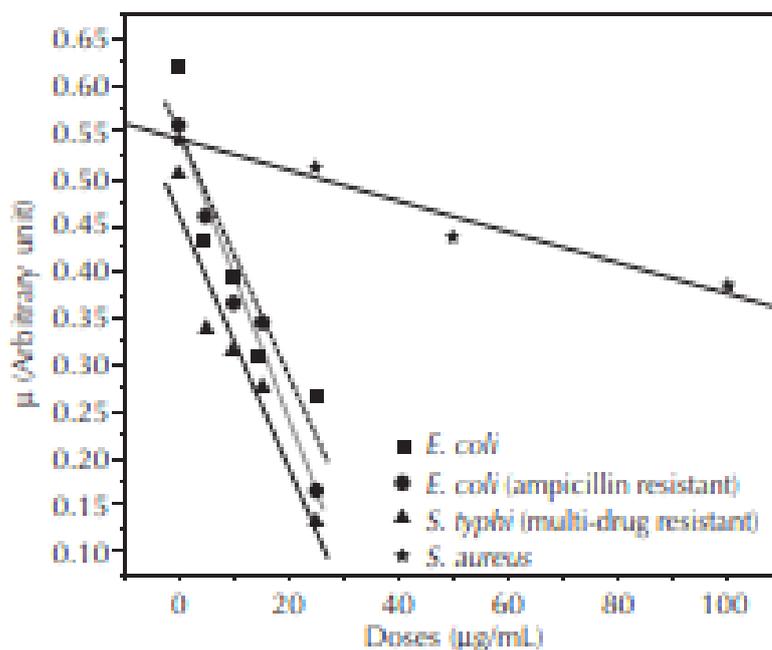


Рисунок 9 – Дозозависимая ингибиция различных штаммов микроорганизмов наночастицами серебра

Были предприняты также попытки понять лежащие в основе молекулярные механизмы такого антимикробного действия. Так, в качестве механизма антибактериального действия наночастиц серебра была выявлена активность на молекулы белков бактерий, в результате такого взаимодействия происходят изменения в передаче сигналов бактериальной клетки. Бактерицидные свойства наночастиц серебра не связаны только с прямым эффектом накопления наночастиц внутриклеточно или на клеточной мембране, но также с действием ионного или растворенного серебра, полученного из наночастиц, которые также обладают значительным антибактериальным действием.

Также выявлено, что наночастицы серебра обладают противовирусным и противогрибковым действием. Так в работах некоторых исследователей показано, что NPsAg размером в диапазоне 1-10 нМ связывается с ВИЧ-1. Эти же авторы показали, что наночастицы серебра подавляют инфекцию

ВИЧ-1 в клетках CD4+MT-2 и репортерных клетках сMAGI HIV. Kim et al. оценил эффективность NPsAg как противогрибкового средства против дрожжей.

3.3 Использование наночастиц серебра в биологических исследованиях

Водные растворы NPsAg широко используются для идентификации белков, изучения взаимодействия различных препаратов с белками для открытия лекарств, понимания эффектов pH и других факторов среды, влияющих на конформацию белков, для обнаружения ДНК при концентрациях до 10^{-13} M, для биодетекции и биологической маркировки.

Также достаточно много исследований, посвященных разработке уникальных наноструктурированных подложек на основе наночастиц серебра (SERS) для использования их в биомедицинских исследованиях. Благодаря такой подложки происходит усиление флуоресценции (MEF) молекулы при размещении ее рядом с металлическими наночастицами. Таким образом, квантовый выход, скорость возбуждения и фотостабильность слабо флуоресцирующих видов может быть значительно увеличена наночастицами серебра. Следовательно, MEF может значительно улучшить производительность современных методов флуоресценции с использованием подложки с покрытием из наночастиц серебра и могут вызвать значительный прорыв в таких областях, как открытие наркотиков, высокопроизводительный скрининг, иммуноанализы, клиническая диагностика и белок-белковая диагностика. Уже сейчас наночастицы серебра используются в визуализации внутриклеточного белка и спектра отдельных наночастиц, при котором NPsAg действуют как иллюмиофор.

3.4 Использование наночастиц серебра в терапии

Наносеребро также используется в качестве биоцидного средства для предотвращения инфекции при ожогах, травматических ранах и диабетических язвах. Другая возможность использования включает улучшение поверхностного покрытия для постоянных катетеров и других медицинских устройств, имплантированных внутрь тела человека. Тиан и другие исследователи показали влияние NPsAg на ранозаживление и формирование рубцовой ткани при диабетических ранах и хронических ранах у мышей (рисунок 10).

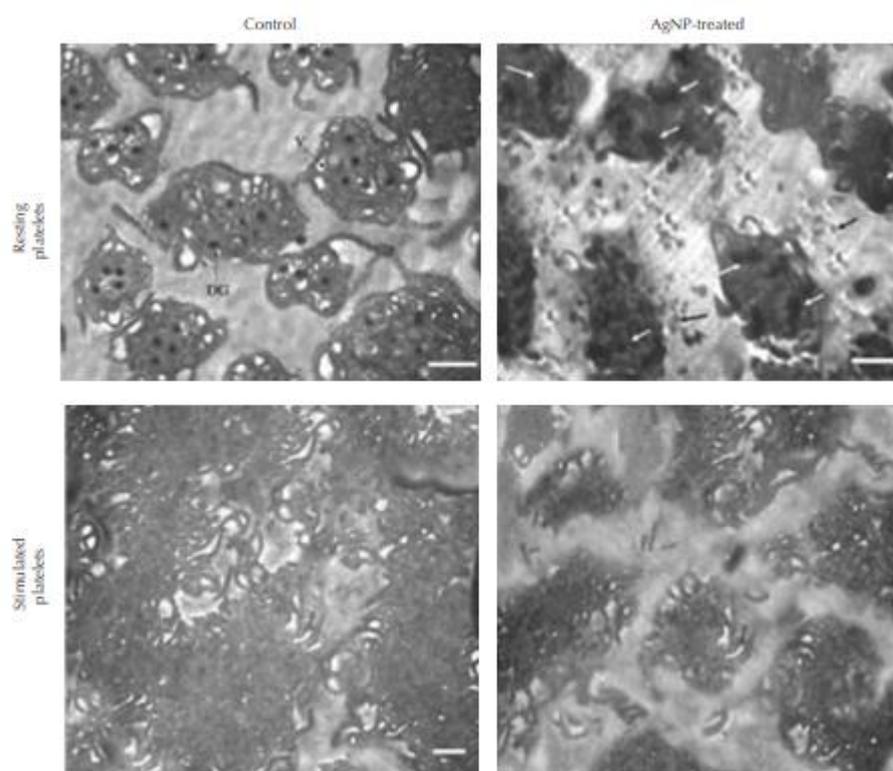


Рисунок 10 – Ингибирование тромбоцитов наночастицами серебра, исследованное с использованием трансмиссионной электронной микроскопии

Это исследование также продемонстрировало эффективность NPsAg в борьбе с местными и системными воспалительными реакциями после ожогов

путем модуляции цитокинов. В последнее время исследователи доказали, что наносеребро обладает врожденными антитромбоцитарными свойствами и что оно эффективно, в зависимости от концентрации, предотвращает интегрин-опосредованные реакции тромбоцитов, как *in vivo*, так и *in vitro*

Механизм данного действия связан с тем, что эти наночастицы не обладают никакой литической активностью против тромбоцитов, а обладают потенциалом в качестве антиагрегантных/антитромбоцитарных средства. Таким образом, применение наносеребра находит все больше точек соприкосновения с медициной.

4 Наночастицы золота и возможность их применения в биомедицинских исследованиях

В последние десятилетия золотые наночастицы (NPsAu) вызывали значительный интерес и были изучены как модельная платформа для биомедицинских исследований из-за их уникальных физико-химических свойств. Частицы золота инертны, что делает их относительно более биосовместимыми. Синтез NPsAu диаметром от единиц до несколько сотен нанометров нашли множество применений как в водных растворах, а так и в органических растворителях.

Как и NPsAg, так и NPsAu синтезируются методом химического восстановления. В типичном синтезе соли золота, такие как AuHCl₄, восстанавливаются дополнительными восстановителями, что приводит к преобразованию ионов Au в наночастицы. Туркевич и др. (1951) впервые синтезировали коллоидное золото Au⁰ из Au^{III} с использованием лимонной кислоты в качестве восстановителя. При этом, данный метод до сих пор используется.

Последние модификации метода Туркевича позволили получать наночастицы золота, контролируя их размер в диапазоне от 9 до 120

нм. Кроме того, используемые стабилизаторы, которые либо адсорбируются, либо химически связаны с поверхностью NPsAu и известные как поверхностно-активные вещества, обычно заряжаются, в результате заряженные наночастицы отталкиваются друг от друга и раствор приобретает определенный цвет.

Хотя NPsAu можно стабилизировать большим разнообразием стабилизаторов (лигандов, поверхностно-активных веществ, полимеров, дендримеров, биомолекул и др.), наиболее стабильные NPsAu, обнаруженные Гирсигом и Mulvaney (1993), были стабилизированы тиолатами с использованием сильной связи Au-S. Безусловно, самый популярный синтетический метод с использованием серы для стабилизации NPsAu, это двухфазный синтез Шиффрина-Бруста с использованием AuHCl₄, тиолов, бромида тетраоктиламмония в толуоле, с образованием тиолата-NPsAu. В результате такого метода NPsAu могут быть перенесены из водной фазы в органическую фазу, и наоборот, путем соответствующей замены лиганда. Водорастворимые NPsAu обычно содержат карбоксильные группы на периферии. В данном случае карбоксильная группа используется для присоединения к аминогруппе биомолекул с использованием 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид-HCl (EDC).

Достаточно распространенным является прикрепление лигандов к NPsAu. Такая биоконъюгация наночастиц золота приводит к тому, что происходит, например, исключение эффектов агрегации или неспецифических связываний во время реакции конъюгации. В частности, количество присоединенных молекул на NPsAu во многих отношениях является лишь приблизительным, поскольку нет стандартного метода для определения покрытия поверхности частиц, модифицированных молекулами.

Интересно, что синтезировать с помощью соответствующих технологий можно не только сферические NPsAu, но также и наночастицы другой геометрии, такие как стержневидные частицы или полые оболочки.

Поскольку наночастицы имеют высокое соотношение площади поверхности к объему, то они достаточно чувствительны к диэлектрической (показателю преломления) природе. Любое изменение в этих частицах (поверхностная модификация, агрегация, средний показатель преломления, и др.) приводит к колориметрическим изменениям дисперсии ионов. Из-за этого суспензии NPsAu часто характеризуются отчетливым изменением цвета от красного (рассеянный) до синего (агрегированный). NPsAu имеют оптические, электронные, каталитические и биосовместимые свойства и потенциально высокую поверхностную реактивность по сравнению с другими металлическими наночастицами.

4.1 Биовизуализация

NPsAu являются прекрасным контрастным веществом, поэтому их можно визуализировать с помощью различных технологий. При этом обычные методы обнаружения основаны на взаимодействии NPsAu со светом. Поглощение и рассеивание электромагнитного излучения с использованием наночастиц благородных металлов сильно усиливаются. Эти уникальные свойства обеспечивают потенциал для разработки новых оптически активных реагентов для получения изображения молекул. В исследованиях *in vitro* для молекулярной визуализации золотые наночастицы действуют как новые контрастные вещества.

Двухфотонная люминесцентная визуализация раковых клеток была достигнута с использованием золотых наночастиц. Также использование поглощения в ближнем инфракрасном диапазоне наночастицами золота можно значительно усилить контраст изображения из-за более существенной разницы оптического поглощения чем у эндогенных тканевых хромофоров. При этом, что немаловажно, что золотые наночастицы также используются в визуализации в естественных условиях.

Помимо использования наночастиц золота для визуализации в видимом свете, частицы золота также обеспечивают отличный контраст для электронной микроскопии (просвечивающая электронная микроскопия) с высоким разрешением по горизонтали. В отличие от флуоресценции усиление контраста в просвечивающей электронной микроскопии с использованием наночастиц Au приводит к получению более устойчивых изображений, так как они не фотообесцвечиваются, что является основным ограничением для флуоресцентных методов. Кроме того, лучше получается визуализация с высокой контрастностью. При иммуноокрашивании молекулы/структуры избытком наночастиц Au происходит то, что практически все объекты оказываются помечены, что обеспечивает контраст для наблюдения и визуализации этой области.

Наночастицы золота сильно поглощают и испускают видимый свет. При поглощении световая энергия возбуждает свободные электроны в наночастицах Au, что вызывает так называемый поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Для золота, резонансная частота предопределяется его объемной диэлектрической проницаемостью и находится в видимой области электромагнитного спектра. Именно поэтому NPsAu могут использоваться для отслеживания мембранных молекул, а также как контрастное вещество в рентгеновских лучах. Подобно серебряным наночастицам, поверхность NPsAu может быть модифицирована лигандами. Последние разработки как раз связаны с модифицированием NPsAu и используются как активные репортерные молекулы для обнаружения ДНК или белков.

4.2 Использование наночастиц золота в терапии

NPsAu уже давно используются для доставки молекул в клетки. Для этого молекулы адсорбируются на поверхности частиц Au и весь конъюгат вводится в клетки. В генной терапии ДНК вводится в клетки, что впоследствии вызывает синтез соответствующих белков. NPsAu были

использованы для доставки противоопухолевых препаратов при лечении рака ткани. Такое использование для доставки лекарств связано с тем, что золотые частицы маленькие, коллоидностабильные, относительно легко конъюгируются с лигандами и инертны, и как следствие относительно биосовместимы.

Кроме того, NPsAu можно использовать при лечении рака, что основано на их фототермических свойствах. Когда частицы золота поглощают свет, свободные электроны в золотых частицах возбуждены, что вызывает колебания свободных электронов, а при взаимодействии между электронами и кристаллической решеткой золотых частиц электроны передают энергию решетке. Впоследствии тепло от частиц золота рассеивается в окружающей среде. Таким образом наночастицы золота могут нагреваться за счет поглощения света, в результате чего поглощенная световая энергия преобразуется в тепловую энергию. Из-за тепла, выделяемого золотой наночастицей, окружающие раковые ткани могут быть уничтожены локально, не подвергая весь организм повышенным температурам. Кроме того, золотые наночастицы имеют достаточно большие размеры (около 100-300 нм в диаметре), чтобы приводит к появлению пиков в ближней инфракрасной области, что улучшает проникновение в ткань живых организмов. В новых исследованиях простата человека, в которой были обнаружены раковые клетки, инкубировалась с золотыми наночастицами и подвергалась воздействию света в ближней инфракрасной области.

4.3 Использование наночастиц золота в диагностике

NPsAu как класс наноматериалов со множеством уникальных свойств, таких как колориметрическая проводимость и нелинейно-оптические свойства, были исследованы на предмет их потенциального применения в биомеханике. NPsAu можно использовать для количественного обнаружения

нуклеиновых кислот и белков в клинических образцах. Например, метод на основе ДНК для сбора наночастиц золота в макро- и микроскопических материалах был детально разработан Миркин и его сотрудниками. Для обнаружения белка используется метод, основанный на агрегации антипротеина А с использованием наночастиц золота. Также рассеивание агрегированных наночастиц золота, помеченных иммуноглобулином G можно использовать для количественной оценки антиген/антитело в водном растворе. Эти два метода позволяют обнаруживать белки на уровне микрограмма, что ограничивает их применение в иммуноанализе, особенно для ранней диагностики рака. NPsAu также можно использовать для передачи электронов в окислительно-восстановительных реакциях для обнаружения веществ, которые являются субстратами для окислительно-восстановительных ферментов. Из-за их небольших размеров, датчики на основе золотых частиц могут иметь огромное значение в диагностике.

5 Углеродные наноматериалы и возможность их применения в биомедицинских исследованиях

Углеродные наноструктуры не менее 25 лет были в приоритете нанонауки после открытия новой формы углерода, называемой фуллереном в 1985 году Крото и соавторами, который был удостоен Нобелевской премии по химии в 1996 году. Самый известной формой фуллерена является фуллерен C₆₀, который состоит из 20 шестиугольников и 12 пятиугольников. Почти 6 лет спустя углеродные нанотрубки были открыты Сумио Иидзима. Таким образом, хорошо известны трехмерные (алмаз, графит), одномерные (нанотрубки) и нульмерные (фуллерены) аллотропные формы углерода.

Сообщество наноуглеродов все время пополнялось и возможности их применения все время расширялись, но графен как одна из форм

наноуглерода не вызывал никакого интереса до тех пор, пока не вышла публикация в 2004 году, где авторы сообщили о простой, легко воспроизводимой технологии для приготовления высококачественного графена. Графен – это название плоского монослоя атомов углерода плотно упакованных в двумерную (2D) сотовую решетку. Графен является основным строительным блоком других важных аллотропов: из него можно складывать 3-хмерный (3D) графит, свернуть в форму 1D нанотрубки и завернуть в 0D фуллерен.

На данный момент существует три метода для производства углеродных нанотрубок: угольная дуга-разряд, лазер-абляция и химическое осаждение из паровой фазы (CVD). Новоселов и др. впервые продемонстрировали синтез графена путем эксфолиации, и это по-прежнему самый популярный метод для синтеза графена. В данный момент графен синтезируется методом Броди, методом Стауденмайера или методом Хаммерса или некоторыми вариациями этих методов. Именно эти методы позволяют максимально усилить биосовместимость углеродных нанотрубок и графена, что позволит легко вводить их в условиях *in vivo* при биомедицинских применениях углеродных нанотрубок и графена.

Для биологических и биомедицинских применений углеродных наноматериалов, крайне важно, чтобы они были совместимы с биологическими системами, и желательно чтобы они были диспергируемыми в воде и нетоксичны. Все это открывает путь для манипуляции и обработки их в физиологических средах. Нас интересуют именно их модификации с биомолекулами. Создание таких нанобиомолекул возможно за счет ковалентного присоединения (образование химической связи), нековалентного взаимодействия (физическое поглощение) или гибридного подходом.

Самый распространенный метод и, вероятно, один из простейших методов ковалентной функционализации наночастиц включает реакции с остатками карбоновой кислоты (-COOH). Биомолекулы могут быть связаны с

остатками карбоновой кислотой, что приведет к образованию функционализированных углеродных нанотрубок и графеновых листов после их активации *N*-гидроксисукцимидом (NHS) с использованием стандартного карбодиимидного (EDC) пептидного связывания. Сильное нековалентное взаимодействие между наноматериалами и некоторыми ароматическими и/или гидрофобными молекулами также можно использовать для дальнейшей функционализации биомолекул. Полиэтиленгликоль может использоваться для нековалентного покрытия углеродных нанотрубок, что предотвращает неспецифическое всасывание белка. Эти углеродные нанотрубки с покрытием полиэтиленгликолем могут затем подвергнуться дальнейшей химической модификации, чтобы обеспечить участки для химического соединения или связывания с белками на основе аффинности. Кроме того, чтобы сделать оксид графена более биосовместимым и более простым в применении в условиях *in vivo* также используют полиэтиленгликоль и 1,1-карбонилдиимидазол. Следовательно, функционирование наноматериалов является ценным инструментом в улучшении биосовместимости наноуглерода.

Все углеродные наноматериалы очень интересны и уникальны – физико-химические свойства, такие как упорядоченная структура с высоким соотношением сторон, сверхлегкий вес, высокая механическая прочность, высокая электропроводность, высокая теплопроводность, металлическая или полуметаллическое поведение и большая площадь поверхности. Напоследок можно сказать, что за последние несколько лет было проведено несколько исследований с указанием потенциальных возможностей применения наноуглерода на основе их уникальных оптических, физических и электрических свойств. Так углеродные наноструктуры уже нашли важные точки соприкосновения в широком спектре биомедицинских исследований, такие как зондирование, визуализация и терапия.

5.1 Использование углеродных наноматериалов в качестве биосенсоров

Расширенные электронные свойства углеродных наноматериалов активно используются в биосенсорах. Интеграция биомолекул с группами CN углеродных наноматериалов позволяет использовать такие гибридные системы как электрохимические биосенсоры (ферментные электроды, иммуносенсоры или датчики ДНК) и активные транзисторы. Конкретное преимущество углеродных нанотрубок, интегрированных биомолекулами выражается в их небольшом размере, позволяющем попадать этим нанoeлектродам в те места, где использование электрохимии было невозможно, например, внутрь белков. Одна из возможностей, которые обеспечивают углеродные нанотрубки – это более эффективный способ привязки к внешнему миру биологической молекулы, используемой в биосенсорах. Обычно это общение достигается посредством передачи электронов. Так, разработаны датчики на основе углеродных нанотрубок для обнаружения широкого спектра биологических молекул, включая глюкозу, нейротрансмиттеры, токсины, белки и ДНК. Несколько исследований показали возможность применения биосенсоров на основе графена с использованием различных окислительно-восстановительных датчиков, таких как H_2O_2 , NADH и аскорбиновая кислота. Такие биодатчики использовались для обнаружения жизненно важные биомолекул, включая глюкозу, ДНК, для обнаружения дофамина и алкоголя. В недавнем исследовании цитохром c был иммобилизован на графене, в результате получился покрытый электрод, который затем использовался для обнаружения оксида азота. Все это показывает возможности для использования в зондировании соответствующего антигена или субстрата покрытого графеном электрода с антителом или ферментом, иммобилизованном на его поверхности.

Это существенно расширяет возможный спектр биомолекул, которые могут быть обнаружены биосенсорами на основе графена. Также графен может служить биосенсором для обнаружения микробов и постановки диагноза на основе полученных результатов.

Помимо электрохимических анализаторов, биосенсоры, создание которых основано на принципе флуоресцентного резонанса, могут быть использованы для обнаружения тромбина, ДНК-ДНК-гибридизации и онкомаркеров.

5.2 Использование углеродных наноматериалов для биовизуализации

Собственные оптические свойства одностенных углеродных нанотрубок и оксида графена делают их пригодными для использования в качестве оптических датчиков. Оба наноматериала, и одностенные углеродные нанотрубки, и оксид графена, демонстрируют выраженное оптическое поглощение в видимом, а также ближнем инфракрасном (NIR) диапазоне.

Эти наноматериалы демонстрируют высокое оптическое поглощение и фотолюминесценцию в ближнем инфракрасном диапазоне, что может быть использовано для визуализации в биологических системах как *in vitro*, так и *in vivo*. Такая микроскопия с использованием одностенных углеродных нанотрубок применяется для изображения клеток печени, а также срезов тканей. Вайсман и сотрудники (2007) продемонстрировали биомедицинские технологии визуализации на основе нанотрубок внутри живого животного. В другом исследовании, биораспределение одностенных углеродных нанотрубок за личинками живых дрозофилах наблюдали с помощью флуоресцентного излучения нанотрубок через флуоресцентные микроскопы. Недавно исследовательская группа успешно использовала

полиэтиленгликолевые одностенные углеродные нанотрубки как зонды для визуализации опухолей *in vivo* у мышей.

Высокое оптическое поглощение одностенных углеродных нанотрубок также может использоваться в фотоакустической визуализации, где звуковые волны генерируются в результате локального нагрева за счет поглощения лазерного света. Фотоакустическая визуализация имеет более высокое пространственное разрешение, чем традиционный ультразвук и более глубокое проникновение в ткани, чем флуоресцентная визуализация. Де Ла Зерда и др. использовали конъюгированные одностенные углеродные нанотрубки в качестве контрастного агента для фотоакустической молекулярной визуализации рака в модельной опухоли у мышей. Эта работа открывает новые возможности для биологической визуализации *in vivo* с использованием одностенных углеродных нанотрубок.

Графен на основе его уникальных оптических свойств также можно использовать для визуализации клеток. Так, исследование Peng et al. продемонстрировало, что флуоресцеин, функционализированный полиэтиленгликолированным оксидом графена, обладает прекрасными флуоресцентными свойствами, может быть эффективно поглощен клетками и служить флуоресцентным нанозондом. Sun et al. показали, что листы оксида графена фотолюминесцирующие в видимом и инфракрасном диапазонах может использоваться для визуализации живых клеток в ближайшем инфракрасном диапазоне без значительного фона. Так при флуоресцентной оценке отдельных пластов оксида графена с использованием проточного цитометра при возбуждении лазером (488 нм) оксид графена испускал флуоресценцию во всех трех каналах проточного цитометра. Все это позволяет предположить, что использование углеродных наноматериалов позволит найти им все большие возможности для их применения в области клеточной визуализации и доставки лекарств.

5.3 Использование углеродных наноматериалов в терапии

Углеродные наноматериалы могут быть отличными инструментами доставки лекарств благодаря их небольшому размеру, большому соотношению площади к объему, склонностью к нековалентному взаимодействию с молекулами лекарств. Углеродные нанотрубки активно изучались как носители лекарств. В последние годы были разработаны разные стратегии конъюгирования молекул лекарственных средств к углеродным нанотрубкам либо путем ковалентного связывания, либо нековалентной адсорбции. Молекула лекарства ковалентно связывается с функциональными группами на поверхности углеродных нанотрубок или на полимерном покрытии углеродных нанотрубок. Ароматические вещества с плоской структурой могут адсорбироваться на поверхности углеродных нанотрубок методом П-укладки. Углеродные нанотрубки применялись как носители лекарственных средств при лечении рака *in vivo* на животных моделях. Углеродные нанотрубки также использовались как биоконъюгаты лигандов для клеточно-специфической адресной доставки лекарств как *in vitro*, так *in vivo*.

Конъюгированный с антителами полиэтиленгликолированный оксид графена был эффективно использован в адресной доставке противоопухолевых препаратов. Важным моментом является то, что мощный нерастворимый в воде противоопухолевый препарат оказался признан терапевтически полезным за счет образования комплекса с полиэтиленгликолированным оксидом графена. Помимо доставки лекарств, одностенные нанотрубки и оксид графена можно также использовать в качестве фототермических терапевтических агентов для уничтожения раковых клеток.

Лазерное излучение использовалось для разрушения раковых клеток со специфической интернализацией одностенных углеродных нанотрубок. Из-за сильного оптического поглощения в ближнем инфракрасном диапазоне,

оксид графена также вызывает фототермическую абляцию опухоли после внутривенного введения в организм животного. Недавние исследования также показали, что одностенные нанотрубки и оксид графена обладают выраженными антибактериальными, а также противопаразитарными свойствами.

6 Квантовые точки

Квантовые точки – это нанокристаллы, близкие к сферической форме с полупроводниковым сердечником, состоящим из элементов периодических групп II-VI (CdSe) или III-V (InP) и оболочкой из ZnS. Они обладают электронными свойствами, промежуточными свойствами между объемными проводниками и дискретными молекулами. Их оптико-электронная природа определяется размером и формой отдельных кристаллов. Квантовые точки были впервые обнаружены в 1980-х годах Алексеем Екимовым, но термин «квантовая точка» был введен Марк Ридом. Квантовые точки с тех пор нашли широкий спектр для применения в транзисторах, солнечных элементах, световых эмиссионных диодах и диодных лазерах из-за своим уникальных электронных свойств. Они также широко исследовались как агенты для биологической визуализации, и возникли как новый класс флуорофоров с практически идеальными характеристиками из-за высокого квантового выхода, широких спектров возбуждения, узких, настраиваемых и симметричных спектров излучения и простоты биоконъюгации. Квантовые точки также нашли применение в качестве биосенсоров, доставки лекарств в фотодинамической терапии.

Синтез квантовых точек достаточно сложный в связи с тем, что важно получить квантовые точки определенного размера с определенными оптическими свойствами, к тому же они потенциально токсичны из-за наличия тяжелых металлов в активной зоне. Квантовые точки могут быть

синтезированы с использованием различных методов, в том числе высокотемпературным синтезом, γ -облучением, синтезом с помощью микроволнового излучения, пленок Ленгмюра-Блоджетт, полиол- и золь-гель методами. Однако они обычно синтезируются путем введения жидких предшественников в горячие (300 °С) органические растворители, такие как оксид триоктилфосфина и гексадециламина, которые служат молекулами лигандов.

В некоторых исследованиях показано, что жидкие предшественники чрезвычайно токсичны и нестабильны, поэтому с недавних времен заменены менее вредными аналогами.

Лиганды, используемые в синтезе, позволяют регулировать время зарождения квантовых точек. Это позволяет синтезировать квантовые точки различных размеров путем изменения количества предшественников и времени роста кристаллов. Выбор лигандов существенно влияет как на синтез квантовых точек, так и на оптические свойства синтезируемых квантовых точек. Существует значительное количество исследований, в которых использование конкретного лиганда приводило к формированию более стабильных квантовых точек с более высоким квантовым выходом. Синтезированные, таким образом, квантовые точки имеют полупроводниковый сердечник из тяжелых металлов, изготовленный из CdSe, CdS или CdTe с низким квантовым выходом, обычно менее 10 %. Это привело к разработке квантовых точек типа II, также называемых «core-shell QDs», которые состоят из оболочки полупроводника с высокой изолирующей зоной из ZnS поверх сердечника из тяжелого металла (рисунок 11). Оболочка противодействует дефектам в ядре и значительно увеличивает квантовый выход до 80 %. Он также ограничивает токсичность ядра, защищая ядро от окисления и делая их фотостабильными, тем самым предотвращая выщелачивание атомов тяжелых металлов из ядра.

Однако эти квантовые точки имеют чрезвычайно гидрофобные поверхности и поэтому нерастворимы в воде и непригодны для

биологического применения, потому как для этого требуется модификация поверхности. Это достигается заменой существующих лигандов гидрофильными лигандами (обмен лигандами) или использованием гидрофобных лигандов для покрытия органическими полимерными лигандами (упаковка лигандов). Один из наиболее распространенных подходов к модификации поверхности включает прикрепление тиолированных полиэтиленгликоль-полимеров. Однако такие квантовые точки демонстрируют низкий квантовый выход. Этот недостаток преодолевается с помощью стратегии упаковки лигандов амфифильными полимерами, такими как полиакриловая кислота. Квантовые точки также подвергались биофункционализации путем связывания их с различными биомолекулами, включая иммуноглобулины, олигонуклеотиды, пептиды и белки, которые позволяют использовать их для маркировки различных клеточных мишеней.

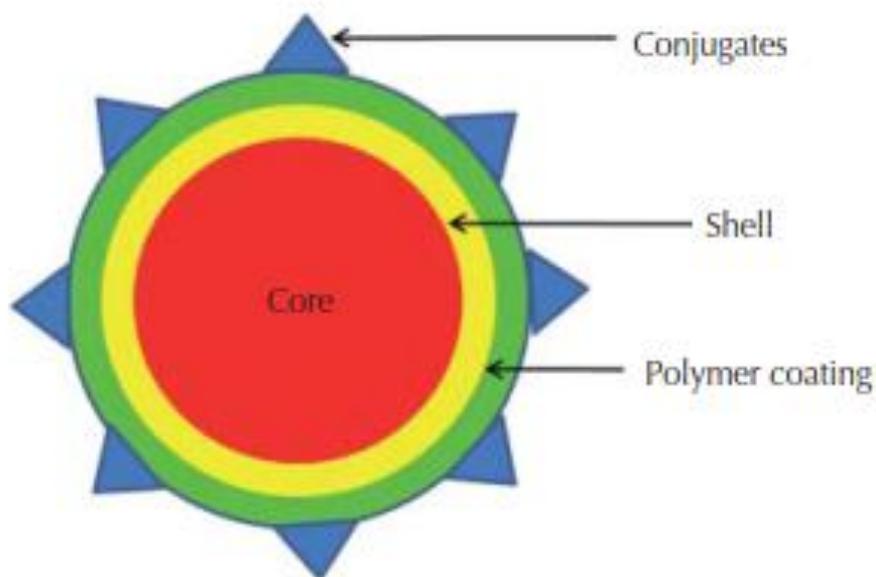


Рисунок 10 – Схематическое представление функционализированного ядра-оболочки квантовой точки

6.1 Свойства квантовых точек

По определению, квантовая точка включает вещество, возбужденное состояние которого ограничено во всех трех пространственных измерениях, что отвечает за их уникальные оптические и электронные свойства, зависящие от размера.

Как правило, чем меньше размер квантовой точки, тем больше разница в энергии между самой высокой валентной зоной и самой низкой зоной проводимости. Таким образом, более крупные квантовые точки, имеющие меньшие защищенные зоны, излучают свет более низкой частоты, в то время как более маленькие квантовые точки излучают свет более высокой частоты (рисунок 12).

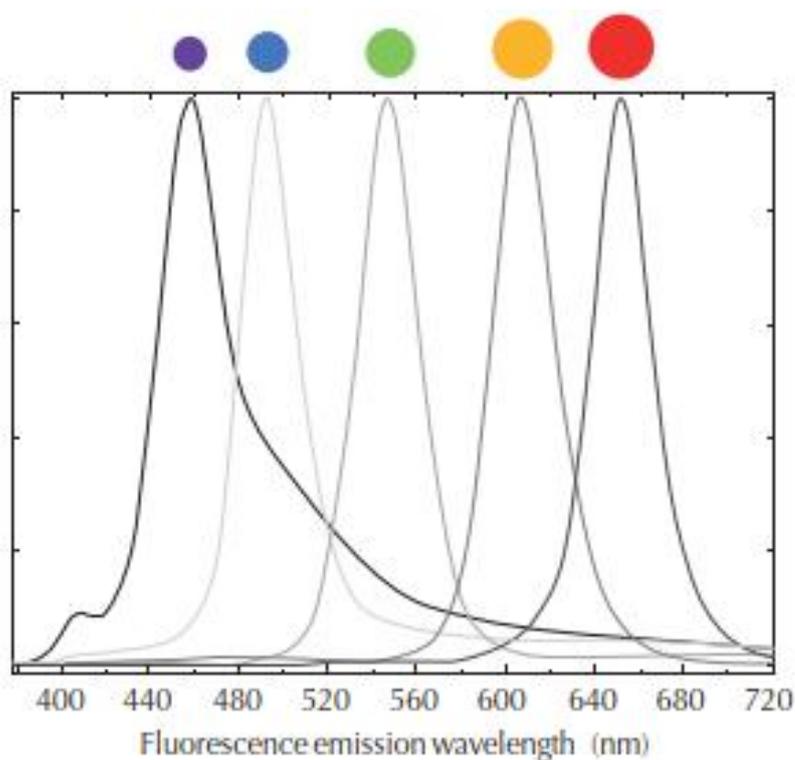


Рисунок 12 – Зависимость спектра излучения квантовых точек от их размера

Кроме того, из-за малого размера нанокристалла квантовой точки его составная часть возбуждается и излучает свет одновременно, что приводит к

высокой интенсивности флуоресценции. Они не фотообесцвечиваются из-за своего неорганического состава и демонстрируют длительный срок флуоресценции до 10-40 наносекунд. Хотя теоретически квантовый выход квантовой точки ниже, чем у органических флуорофоров и их высокий молярный коэффициент экстинкции и длительное время жизни в состоянии возбуждения более чем компенсируются, что приводит к гораздо более ярким сигналам флуоресценции, чем у органических красителей.

Они также демонстрируют другие преимущества перед флуорофорами с большим стоксовым сдвигом и чрезвычайно высокой фотостабильностью. Эти характеристики делают их почти идеальными флуоресцентными маркерами, превосходящими органические флуорофоры. Поскольку квантовые точки имеют перестраиваемое, узкое, симметричное и яркое излучение, то они особенно полезны для мультиплексной визуализации. Однако, поскольку их яркость зависит от диаметра их сердцевинки, относительная яркость квантовой точки с различными длинами волн излучения может заметно варьироваться; а интенсивность сигнала (размер 525 нм) в 17 раз и 32 раза ниже, чем квантовой точки, характеризующейся размером 655 нм и наблюдается ближнее инфракрасное излучение для квантовой точки размером 705 нм, соответственно. Это будет иметь значение для сравнения уровней экспрессии различных элементов, обнаруживаемых с помощью комплексной визуализации квантовой точки, и потребует нормализации данных. Таким образом, квантовые точки наиболее подходят для визуализации, оптической трансдукции и фотосенсибилизации.

6.2 Возможности применения квантовых точек для визуализации

С момента первого исследования об использовании квантовых точек в иммуногистохимии для обнаружения актиновых филаментов в фибробластах мышцы, квантовые точки стали использоваться для обнаружения огромного

количества белков в фиксированных тканях с помощью флюороиммуноанализа, а также методом проточной цитометрии.

Квантовые точки позволяют обнаружить биологические маркеры с высокой чувствительностью. Квантовые точки, покрытые стрептавидином, используемые в сочетании с биотинилированными антителами, первичными или вторичными, чаще всего используются для маркировки и обнаружения белков в клетках и тканях.

Несколько исследовательских групп исследовали различные системы конъюгации для маркировки биологических молекул квантовыми точками. Химия конъюгации стрептавидин-биотин является наиболее практичной из-за наличия коммерческих стрептавидин-квантовые точки/биотинилированных антител и наличия заранее установленных протоколов их использования, требующих лишь незначительной оптимизации.

Важным преимуществом использования квантовых точек является возможность их использования для мультиплексного обнаружения благодаря их перестраиваемому узкому симметричному излучению и широкому возбуждению. Однако в мультиплексных исследованиях часто встречаются две проблемы: перекрестная реактивность организма и плохое разделение сигналов. Первые могут быть решены с помощью различных видов антител или различных методов обнаружения различных антигенов, в то время как последние требуют высококачественного анализа изображений. Мультиплексирование квантовых точек было использовано для одновременного обнаружения нескольких биомаркеров путем последовательного окрашивания каждого антитела (рисунок 13).

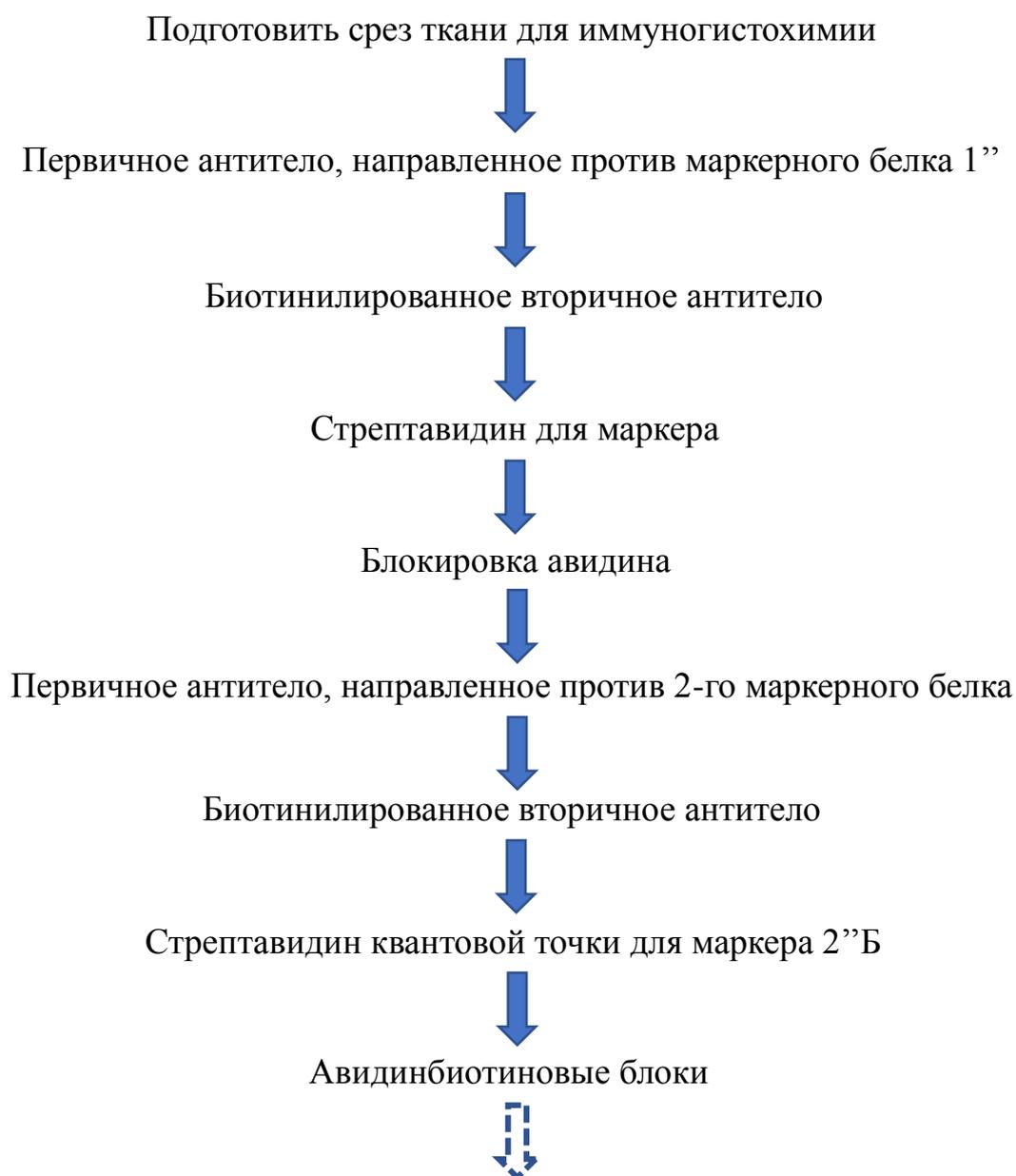


Рисунок 13 – Последовательное окрашивание для мультиплексной визуализации с использованием стрептавидиновых квантовых точек

Ткань сначала обрабатывается первичным белком-маркером, распознающим антитела. Первичное антитело, связанное с маркерным белком, затем маркируется покрытыми стрептавидином квантовыми точками через биотинилированное вторичное антитело. Авидин-биотиновые блоки применяются после маркировки каждого маркера квантовых точек и перед обработкой первичным антителом для следующего белкового маркера. Однако процедура занимает много времени и существует возможность

переноса стрептавидинпокрытых квантовых точек между различными вторичными антителами.

Квантовые точки также были оценены для изучения маркеров в биопсиях игольчатого ядра в клиниках с целью обеспечения персонализированного лечения. Эта технология обеспечивает количественное измерение нескольких маркеров в образцах тканей небольшого размера. В некоторых исследованиях был вариант использования мультиплексной визуализации квантовых точек в клинической практике.

С появлением высокопроизводительных платформ для геномики, протеомики и транскриптомики возрастает необходимость измерения все большего числа биомаркеров *in vivo* в биологических образцах, которые могут включать белки, ДНК или мРНК. Олигонуклеотидные зонды, меченные квантовыми точками, были использованы для идентификации мутаций по флуоресценции гибрида *in situ*.

Конъюгированные квантовые точки со стрептавидином также успешно использовались в исследованиях на хромосомах человека, мышей, растений и микроорганизмов, таких как *Escherichia coli*. Стрептавидин-квантовые точки с биотинилированными зондами были использованы для изучения уровней экспрессии мРНК в тканях животных.

Модифицированные амином олигонуклеотидные зонды могут быть ковалентно присоединены к карбоксильным группировкам на покрытых полимером квантовых точек, что позволяет осуществлять прямую стабильную конъюгацию зонда с квантовой точкой.

Однако мультиплексная визуализация с использованием либо антител, либо ДНК-зондов приводит к получению многоцветных изображений. Для одновременного обнаружения нескольких маркеров необходимо выполнить цветовое разрешение для идентификации и количественной оценки отдельных сигналов. Гиперспектральная визуализация включает в себя сбор-получение полного спектра в каждом месте на плоскости изображения, из которого может быть сгенерирован полный спектральный профиль для

каждого пикселя в поле изображения. Спектральная информация, полученная от каждого пикселя, затем может быть использована для различения шума и сигнала, а также между флуоресцентными сигналами от различных маркеров.

Высокая интенсивность флуоресценции и фотостабильность квантовых точек позволили использовать их для визуализации одной молекулы. Маркировка клеточных белков, таких как эпидермальный фактор роста (EGF), CD44, активируемый протеазой рецептор-1 (PAR-1) и др. с помощью квантовых точек позволяет отслеживать эти белки в живых клетках. Например, способность визуализировать движение PAR-1 на опухолевых клетках на разных стадиях метастазирования показал, что текучесть мембран опухолевых клеток увеличивается во время интравазации, достигает пика в сосудах, особенно высока в псевдоподиеподобных мембранных проекциях, а затем уменьшается во время экстравазации. Таким образом, эта техника поможет в визуализации сложных взаимодействий между биомолекулами и наблюдением за клеточными процессами на молекулярном уровне.

Квантовые точки широко используются в визуализации живых животных, особенно при освещении ближним инфракрасным и инфракрасным светом, который позволяет проникать в кожу и ткани. Высокая яркость квантовых точек позволяет обнаруживать их в глубоких местах. Живые клетки, меченные большим количеством квантовых точек, использовались для изучения эмбриогенеза, метастазирования рака, стволовых клеток. Квантовые точки также использовались для изображения кровеносных сосудов у живых мышей и для отслеживания метастазирования рака. Визуализация живых животных позволяет проводить длительные исследования в реальном времени без частых убийств подопытных животных.

Квантовые точки, конъюгированные с люциферазой, наделены способностью к самосветлению, что позволяет визуализировать глубокие ткани.

6.3 Интегрированные квантовые точки

В отличие от квантовых точек, используемых в качестве метки для обработки изображений, интегрированные квантовые точки присутствуют в системе на протяжении всего анализа и одновременно служат в качестве платформы для детекции, а также датчиком флуоресценции, биолюминесценции резонансного переноса энергии и электрохемилюминесценции. Интегрированные квантовые точки нашли свое применение в зондировании биомолекул, включая обнаружение малых молекул с помощью ферментных методов или обнаружения белков с помощью иммуноанализа, анализа гибридизации нуклеиновых кислот и анализа активности протеаз или нуклеаз.

6.4 Использование квантовых точек в фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия – это менее инвазивный вариант лечения рака, которая включает облучение опухолевой ткани низкоэнергетическими электромагнитными волнами, обычно видимыми или ближними инфракрасными, после обработки фотосенсибилизатором.

Фотосенсибилизатор поглощает падающий фотон, возбуждается, а затем передает энергию молекулярному кислороду, присутствующему повсеместно в организме, что приводит к образованию синглетного кислорода. Синглетный кислород является очень реактивным химическим веществом, которое индуцирует апоптоз или некроз опухолевых клеток, в непосредственной близости повреждая ключевые клеточные органеллы, такие как митохондрии. Высокая фотостабильность, широкий спектр поглощения и большое двухфотонное поперечное сечение поглощения квантовых точек являются большими преимуществами для фотоактивации с использованием видимых и инфракрасных источников света.

Квантовые точки также производят промежуточные продукты реактивного кислорода (ROI) и активных форм азота (RNS) при фотоактивации и, таким образом, вызывают повреждение лизосом и разрыв ДНК.

Таким образом, квантовые точки были оценены на предмет возможного применения в фотодинамической терапии, однако эффективность производства ROI с помощью квантовых точек значительно уступает традиционной.

6.5 Использование квантовых точек для доставки лекарств

Использование квантовых точек для доставки лекарств также достаточно хорошо изучено. В последнее время растет интерес к созданию мультимодальных квантовых точек, способных как визуализировать опухоль *in vivo*, так и доставлять лекарственные средства.

Квантовые точки, конъюгированные как с лигандом, нацеленным на опухоль (антитело), так и с молекулой лекарственного средства, могут эффективно служить этой цели. Например, квантовые точки, конъюгированные с антителами против HER2 и липосомами, содержащими доксорубин, проявляли значительную противоопухолевую активность в HER2-сверхэкспрессирующих клетках рака молочной железы и позволяли визуализировать опухолевые клетки.

7 Токсичность наноматериалов

Нанотехнологии – это развивающаяся область, которая, вероятно, изменит способ проектирования и производства почти всего – от лекарств до компьютеров, одежды и предметов, которые еще не придуманы. Наноматериалы обладают потенциалом для преобразования нашей

повседневной жизни благодаря разработке новых технологий, включая передовые методы медицинской визуализации и новые стратегии лечения.

Таблица 1 – Факторы, влияющие на токсичность наноматериалов

СВОЙСТВА НАНОМАТЕРИАЛОВ

Размер

Как правило, чем меньше размер, тем выше токсичность

Форма

Например, фуллерены более токсичны, чем углеродные нанотрубки

Поверхность

Дефекты и окислительно-восстановительный потенциал наноматериалов отрицательно влияют на токсичность

Агломерация

Наноматериалы с тенденцией к слипанию в физиологических условиях более токсичны

ЗАГРЯЗНЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ПОКРЫТИЯ

Загрязняющие вещества

Например, металлические примеси, используемые во время синтеза углеродных нанотрубок повышают токсичность

Функционализация

Как правило, большее количество гидрофильных лигандов увеличивает токсичность наноматериалов

Покрытие полиэтиленгликолем

Снижает токсичность

Пептидное покрытие

Снижает токсичность

ФАКТОРЫ, СВЯЗАННЫЕ С ПОПАДАНИЕМ В ЖИВОЙ ОРГАНИЗМ

Способ воздействия

Вдыхание вызывает большую токсичность, чем прием внутрь и контакт с кожей

Количество воздействия

Накопление наноматериалов в тканях усиливает токсичность

Внутриклеточное поглощение

Внутриклеточное поглощение наноматериалов имеет тенденцию индуцировать цитотоксичность

Способность организма к элиминации

Более медленная скорость элиминации приводит к повышению токсичности

Однако в последнее время появилось множество тревожных сообщений о токсичности наноматериалов. При широком использовании наноматериалов существует также опасность непреднамеренного воздействия, помимо их преднамеренного использования в диагностике и терапии. При этом, ресурсы и усилия, направленные на понимание токсичности наноматериалов, не идут в ногу с разработкой новых наноматериалов. Пробелы в знаниях, связанные с рисками для здоровья, могут привести к возникновению обязательств, которые могут помешать разработке и эксплуатации полезных наноматериалов.

На токсичность наноматериалов для организма человека влияют несколько факторов: свойства самих наноматериалов, загрязняющие вещества и покрытия наноматериалов, а также некоторые другие факторы (таблицу 1).

В данной главе мы обсудим некоторые моменты токсичности наиболее широко используемых металлических и углеродных наноматериалов и квантовых точек

7.1 Токсичность металлических наночастиц

.7.1.1 AgNPs

Наносеребро – это один из наноматериалов, обладающий наибольшими перспективами для применения в биомедицине, например, в терапии, в качестве антимикробных агентов, и в качестве флуоресцентных меток.

Несмотря на быстрый прогресс и раннее признание нанотехнологий в качестве концепции трансляционных исследований, необходимо поднять вопрос о возможном риске неблагоприятных последствий для здоровья в результате длительного воздействия наночастиц в различных концентрациях на человека и сопутствующих токсикологических и экологических

проблемах. Ведутся постоянные дебаты по преимуществам и недостаткам использования изделий из наносеребра в здравоохранении и медицине. Вероятно, одним из наиболее широко распространенных побочных эффектов серебряных изделий является аргирия. Аргирия возникает, когда подкожное серебро осаждается в микрососудах кожи, что приводит к необратимому окрашиванию кожи от серого до черного. Это постоянное обесцвечивание не является физически вредным, но остается по своей сути серьезной косметической проблемой. Имеются также некоторые сообщения о почечной токсичности и цитотоксичности. Также наблюдалась токсичность для печени после острой токсичности серебра из-за нанокристаллического серебра.

В экспериментах *in vivo* на крысах были четко установлены изменения функции легких и их воспаление. NPsAg, стабилизированные крахмалом и BSA, индуцируют отчетливые дефекты развития у эмбрионов зебры. В недавних исследованиях было установлено участие митохондриальнозависимого пути N-концевой киназы в токсичности NPsAg. Ученые проводили исследования для понимания цитотоксичности и генотоксичности AgNPs, а именно различных этапов токсичности AgNPs путем изучения влияния AgNPs, покрытых крахмалом, на жизнеспособность клеток, выработку АТФ, повреждение ДНК, хромосомные aberrации и клеточный цикл. Повреждение ДНК, хромосомные aberrации и остановка клеточного цикла вызвали беспокойство по поводу безопасности, связанной с применением AgNPs. Поэтому понимание кинетики и токсичности серебряных наночастиц *in vivo* очень важно в контексте лежащих в основе медицинских дебатов о безопасности наносеребра и наноматериалов, покрытых серебром. Недавно Стенсберг и его коллеги провели обширное обсуждение текущих исследований транспорта, активности и судьбы AgNPs на клеточном и организменном уровнях. Авторы предложили несколько механизмов цитотоксичности, основанных на таких исследованиях, а также новые возможности для изучения поглощения и судьбы AgNPs, создания более совершенных моделей для оценки

долгосрочных эффектов *in vivo*. Но есть также сообщения, свидетельствующие о том, что серебро в более низких концентрациях не токсично для клеток человека. Эпидемиологическая история серебра установила нетоксичность при его нормальном использовании. В связи с этим необходимо окончательно разобраться в вопросах хронической токсичности серебра для возможности его масштабного использования.

7.1.2 Золотые наночастицы

Хотя NPsAu состоят из инертного материала и обладают экстраординарными свойствами, которые делают их полезными для широкого спектра биомедицинских исследований, все равно необходимо решать вопросы биосовместимости NPsAu. Несколько групп ученых исследовали клеточное поглощение и токсичность NPsAu. Клетки, подвергшиеся воздействию NPsAu, поглощали их в перинуклеарных компартментах: везикулярных структурах, близких к ядру клетки. Из-за интернализации частиц, клетки или ткани, контактирующие с NPsAu, подвергались воздействию частиц в течение длительного периода времени. Были продемонстрированы воспалительные эффекты в тканях, вызванные NPsAu. Эти результаты показывают, что кинетика и концентрации насыщения сильно зависят от физических размеров наночастицы. Ван и др. исследовали зависящее от формы и размера клеточное поглощение и цитотоксичность наноматериалов Au на кератиноцитах кожи человека. Однако в экспериментах по культивированию клеток NPsAu считались биосовместимым и острой цитотоксичности не вызывали. Коннор и др. изучили поглощение и потенциальную токсичность ряда золотых NPsAu в лейкозных клетках человека. Результаты показывают, что сферические NPsAu с различными модификациями поверхности по своей сути не токсичны для клеток человека, несмотря на то, что они попадают в клетки. С другой стороны, есть несколько примеров токсических эффектов, связанных

с природой Au, которые могут зависеть от типа клеток. Например, как сообщает Patra et al. (2007), наносферы цитрата золота с длиной 33 нм не токсичны для почек детеныша хомяка и клеток гепатоцеллюлярной карциномы печени человека, но цитотоксичны для линии клеток легких карциномы человека. Цитотоксичность золота также зависит от химического состава поверхности и размера частиц. Гудман и др. исследовали токсичность NPsAu, функционализированных как катионными, так и анионными поверхностными группами, на трех различных типах клеток. Результаты показывают, что катионные частицы, как правило, токсичны при гораздо более низких концентрациях, чем анионные частицы, которые они связывают с электростатическим взаимодействием между катионными наночастицами и отрицательно заряженными клеточными мембранами. Токсичность NPsAu связана с их взаимодействием с клеточной мембраной и опосредована с их сильным электростатическим притяжением к отрицательно заряженной цитоплазматической мембране.

7.2 Токсичность углеродных наноматериалов

Спрос на углеродные наноматериалы быстро растет в электрических, механических, медицинских исследованиях из-за их тепловых, электрических, оптических и других свойств. Огромные инвестиции во всем мире вкладываются в производство и применение наноматериалов, однако они должны сопровождаться глубоким пониманием последствий влияния этих наноматериалов для здоровья живых организмов и окружающей среды. Важность возможного вредного воздействия наноматериалов стимулировала появление нанотоксикологии как важной исследовательской дисциплины. В литературе стало появляться множество данных о том, что углеродные наноматериалы могут вызывать токсичность как *in vitro*, так и *in vivo*. Большая часть данных о токсичности *in vivo* была получена в результате исследований с использованием углеродных нанотрубок. Исследования на

животных показали, что воздействие нанотрубок может вызвать воспаление, фиброз, образование эпителиоидных гранул в легких, клеточную цитотоксичность, а также нарушения сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Известно также, что углеродные нанотрубки индуцируют окислительный стресс в кератиноцитах человека с помощью ядерного фактора карра-В (NF-κB). Исследование Портера с коллегами показывает проблемы, связанные с характеристикой токсичности углеродных нанотрубок, и необходимостью дополнительной нанометрологии для связи их физико-химических свойств с их токсичностью. Авторы предлагают сочетание методов электронной микроскопии с высоким разрешением и анализа жизнеспособности клеток для понимания углеродных нанотрубок внутри клеток и тканей. В других недавних исследованиях было обнаружено, что углеродные наноматериалы отрицательно влияют на тромбоциты, как важный компонент системы кровообращения, ответственный за свертывание крови и гемостаз. Наногуглеродный материал, такой как одностенные нанотрубки, многостенные нанотрубки и смешанные углеродные наночастицы, обладали способностью усиливать агрегацию тромбоцитов, что может приводить к смертельным последствиям, таким как инсульт, инфаркт миокарда и тромбоз глубоких вен. Было высказано предположение, что усиленная агрегация тромбоцитов различными наногуглеродами является результатом внеклеточного притока кальция в клетку.

Однако на сегодняшний день в литературе имеется относительно мало исследований, касающихся токсичности графена для клеток или живых организмов. Исследования *in vitro* показали, что оксид графена индуцирует незначительное снижение жизнеспособности клеток при более высоких дозах и может вызывать концентрационнозависимую цитотоксичность в клетках A549 и клетках PC12, опосредованную окислительным стрессом и апоптозом. Форма графеновых листов или их агрегация могут быть важными факторами, способствующими токсичности графена. Исследования на животных показали, что оксид графена может индуцировать сильную

цитотоксичность в зависимости от дозы и времени и может проникать в цитоплазму и ядро, снижая адгезию клеток, индуцируя плавучесть клеток и апоптоз. Оксид графена может проникать в легочную ткань, вызывая воспаление и последующее образование гранулемы. Дальнейшие сравнительные исследования показывают, что клетки по-разному реагируют на восстановленные оксид графена и углеродные нанотрубки, что может быть связано с их различными нанотопографическими особенностями. Восстановленная пленка оксида графена биосовместима со всеми тестируемыми клетками, что подразумевает возможность ее применения в биологии. Также было продемонстрировано, что оксид графена потенциально может индуцировать интегринапосредованную агрегацию тромбоцитов как *in vitro*, так и *in vivo*. Было обнаружено, что тирозинкиназы Src и Syk играют ключевую роль в активации тромбоцитов, индуцированной оксидом графена. При сравнении токсичности различных оксидов графена между собой было выявлено, что распределение заряда на поверхности регулирует его способность взаимодействовать с клетками, активировать и агрегировать тромбоциты.

Поверхностные характеристики наноматериалов, такие как форма, образование агрегатов, покрытие и функционализация могут быть решающими факторами для их неблагоприятного токсического воздействия. Токсичность зависит от соотношения площади поверхности к массе и времени удерживания частиц – частицы, имеющие большую площадь поверхности и более высокое время удерживания, имеют больший контакт с клеточной мембраной и, следовательно, обладают большей способностью к адсорбции и транспортировке в клетки. По сравнению с углеродными нанотрубками, токсичность которых можно объяснить их нерастворимостью в воде и склонностью к образованию агрегатов, более вододиспергируемый графен может служить менее токсичным материалом для применения в физиологических системах. Однако было бы целесообразно критически оценить неблагоприятные протромботические и цитотоксические эффекты

оксида графена, прежде чем использовать его в биомедицине в качестве терапевтического и диагностического инструмента.

7.3 Токсичность квантовых точек

Токсичность тяжелых металлов для клеток млекопитающих достаточно хорошо изучена. Следовательно, наличие ядра из тяжелых металлов в квантовых точках вызывает серьезную озабоченность по поводу их потенциальной токсичности. Был проведен целый ряд исследований по потенциальному применению квантовых точек для биологической визуализации как *in vitro*, так и *in vivo*, что привело к накоплению огромного количества информации по этому вопросу. С другой стороны, вопросам об их токсичности уделяется достаточно мало внимания. Отсутствие адекватных знаний о токсичности квантовых точек *in vivo* препятствует их масштабному использованию, несмотря на то, что они обладают огромным потенциалом для применения в медицинской визуализации. Квантовые точки успешно использовались для отслеживания эмбриональных клеток, Т-клеток, дендритных клеток и мезенхимальных стволовых клеток *in vivo* без какого-либо существенного влияния на жизнеспособность, морфологию, функцию или дифференцировку этих клеток. Квантовые точки, вводимые в кровообращение животной модели с целью нацеливания на сосудистую сеть легких или опухолевую ткань, не вызывали никакой токсичности. Однако было обнаружено, что они активируют первичные моноциты человека *in vitro*, а также индуцируют инфильтрацию нейтрофилов в легких *in vivo* при повторных внутривенных инъекциях. Было также обнаружено, что квантовые точки токсичны для клеток проксимальных канальцев почек свиней в результате индукции аутофаговой гибели клеток. Кроме того, было продемонстрировано растворение ядра тяжелого металла путем фотолиза или окисления, что приводит к повышенной токсичности. Хотя можно экранировать ядро тяжелого металла путем закрытия его лигандами, в

некоторых исследованиях сообщалось о токсичности именно из-за этих лигандов. Захватывающим решением этой проблемы стало использование нетоксичных препаратов квантовых точек, таких как Si или SiC. Детоксицирующие агенты, такие как глутатион или желатин и пептидное покрытие снижали токсичность. Несмотря на эти предварительные данные, существует настоятельная необходимость в комплексном исследовании токсичности квантовых точек как *in vitro*, так и *in vivo*, чтобы можно было разрабатывать более безопасные препараты на основе квантовых точек.

8 Лабораторные работы

8.1 Лабораторная работа № 1 Изучение различных форм наночастиц с использованием микроскопии

Цель работы: изучение принципов изготовления двумерных структур методом анодного травления, изучение физико-химических основ анодного травления алюминия и исследование поверхности образца при помощи оптического микроскопа.

Применяемое оборудование: установка для анодного травления (охлаждаемая электрохимическая ячейка, потенциостат); оборудование для проведения химических реакций при высоких температурах; оптический микроскоп.

Задание: освоить порядок работы на установке для анодного травления, получить образец пористого оксида алюминия, исследовать поверхность полученных образцов при помощи оптического микроскопа.

Подготовка к выполнению работы: ознакомиться с правилами техники безопасности при работе с химическими реактивами, изучить принцип работы установки, ознакомиться с порядком включения электрохимической ячейки и порядком работы на оптическом микроскопе.

Описание аппаратуры и метода измерений: современные тенденции развития микроэлектронной техники предполагают использование функциональных элементов, размеры которых составляют величину от 10 нм до 1 мкм. Переход к наноразмерам приводит к проявлению не характерных для «объемных» материалов свойств, оказывающих существенное влияние на функциональные характеристики, а значит и на область их применения. Одним из наиболее доступных, с точки зрения технологии изготовления, методов получения таких материалов является так называемое наноструктурирование, то есть создание на поверхности или в объеме материала наноразмерных структур: слоев, пор и т.п.

Оксид алюминия в кристаллическом состоянии (сапфир) является одним из самых широкозонных диэлектриков, область прозрачности которого лежит в диапазоне от 0,25 до 4 мкм, и поэтому сапфир может быть использован для оптических устройств, работающих в различных спектральных диапазонах.

Наноструктурированный (пористый) оксид алюминия легко может быть получен методом анодного травления алюминия. Оптические свойства пористого оксида алюминия зависят от размера пор, расстояния между порами и упорядочения, и все эти параметры можно варьировать, подбирая условия анодирования. Интерес представляют не только упорядоченные, но и неупорядоченные двумерные наноструктуры, в которых обнаружен эффект усиления оптических гармоник и локализация света.

Физико-химические основы получения оксида алюминия методом анодного травления: при электрохимическом травлении алюминия, оксид алюминия образуется на аноде в соответствии с реакцией:



При этом на катоде выделяется водород:



Количественной мерой окислительной способности окислителя (и одновременно восстановительной способности его восстановленной формы) является электрический потенциал электрода φ (электродный потенциал), на котором одновременно и с равными скоростями протекают полуреакция его восстановления и обратная ей полуреакция окисления соответствующей восстановленной формы. Значения электродных потенциалов в электрохимии определяются относительно некоторого электрода, потенциал которого условно принят за нулевой. Таким эталонным электродом выбран водородный в стандартных условиях.

Методика выполнения работы:

Внимание! Все работы выполняются в вытяжном шкафу. Смешивание растворов, проведение травления и снятия оксидной пленки при неработающей вентиляции категорически запрещено. При выполнении действий с химическими реактивами необходимо использовать защитные средства (очки, перчатки и проч.).

- 1 Включить элемент Пельтье и дождаться его охлаждения.
- 2 Во время охлаждения элемента Пельтье включить оптический микроскоп и ознакомиться с порядком его настройки.
- 3 Получить изображение поверхности образца в оптическом микроскопе (с максимальным увеличением), сфотографировать полученное изображение. Ознакомиться с химическими реактивами, определить назначение каждого из них.
- 4 При достижении на элементе Пельтье необходимой температуры поместить образец в электрохимическую ячейку, установить ее на элемент Пельтье, залить рабочий реактив, установить на источнике питания требуемое напряжение или ток.

5 Включить мешалку и подключить электрохимическую ячейку к источнику питания (потенциостату), продолжать травление в течение полутора часов.

6 Во время травления провести калибровку увеличения микроскопа с использованием калибровочного элемента.

7 Сфотографировать изображение калибровочного элемента.

8 Отключить источник питания и мешалку, слить электролит в контейнер, промыть ячейку и образец дистиллированной водой, вынуть образец из ячейки.

9 Получить изображение поверхности образца в оптическом микроскопе, сфотографировать полученное изображение.

10 Поместить образец в стакан с раствором для снятия оксида, поставить стакан на водяную баню на плитку и поддерживать при температуре 80-90° С в течение 30 мин.

11 Получить изображение поверхности образца в оптическом микроскопе, сфотографировать полученное изображение.

Обработка, оценка и оформление результатов:

В отчете представить:

1) фотографию микроскопического изображения калибровочного элемента.

2) фотографии микроскопических изображений образца на всех стадиях процесса. Используя калибровку микроскопа, определить для каждого изображения характерный масштаб неоднородностей.

8.2 Лабораторная работа № 2 Исследование условий при создании суспензий наноматериалов

Цель работы: синтезировать в водном растворе сферические наночастицы золота и исследовать их свойства в качестве электролитного сенсора, ознакомиться с основными понятиями метода абсорбционной

спектроскопии и изучить оптические свойства растворов синтезированных наночастиц.

Материалы и оборудование: магнитная мешалка с подогревом MR Hei-Standard, спектрофотометр, термостойкий стаканчик на 100 мл, стаканчик на 50 мл – 2 шт., пипетки на 2 и 5 мл, стеклянный пузырек с крышкой на 50 мл, пробирки – 4 шт., магнитик в термостойкой оболочке, дистиллированная вода, 0,001 М раствор HAuCl_4 , 1 %-ный раствор цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 1 М раствор NaCl , 1 М раствор сахара.

Подготовка к выполнению лабораторной работы: ознакомиться с правилами техники безопасности при работе с химическими реактивами; освоить правила и технику безопасной работы с магнитной мешалкой с подогревом ($1000\text{ }^\circ\text{C}$), изучить принцип устройства спектрофотометра и правила работы на нем, освоить правила использования компьютерной программы для расчета размера частиц.

Методика выполнения работы:

Опыт 1. Синтез сферических наночастиц золота

1 Налейте 20 мл 0,001 М раствора HAuCl_4 в термостойкий стаканчик емкостью 100 мл.

2 Внесите магнитик. Поставьте стаканчик на магнитную мешалку, предварительно нагретую до $1000\text{ }^\circ\text{C}$.

3 Включите перемешивание и нагрейте раствор до кипения при непрерывном интенсивном перемешивании (1400 об/мин).

4 После того, как раствор начнет кипеть, добавьте 2 мл 1 %-ного (0,039 М) раствора цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Продолжайте кипятить и непрерывно интенсивно перемешивать раствор до появления рубиново-красной окраски (~10 мин). Во время перемешивания старайтесь сохранять объём раствора постоянным, равным 22 мл, добавляя по необходимости небольшие порции дистиллированной воды с помощью пипетки на 5 мл.

Отмечайте в журнале изменение цвета раствора, свидетельствующее о протекании химических и структурных превращениях в системе.

5 Когда раствор приобретет окончательный рубиново-красный цвет, выключите нагревание и перемешивание. Снимите стаканчик с мешалки, охладите раствор при комнатной температуре и выдержите его при этой температуре еще 10-15 мин для окончательного созревания.

Опыт 2. Наночастицы золота как электролитный сенсор

1 В стаканчике на 50 мл растворите 0,5 г столовой соли (NaCl) в 10 мл дистиллированной воды, чтобы приготовить 1 М раствор.

2 В стаканчике на 50 мл растворите 2 г сахара в 10 мл дистиллированной воды, чтобы приготовить 1 М раствор.

3 В каждую из четырех пробирок поместите по 3 мл раствора наночастиц золота. Добавьте по 3 мл дистиллированной воды в каждую пробирку.

4 С помощью капельницы внесите одновременно 5-10 капель раствора NaCl в первую пробирку. Запишите свои наблюдения, сравнивая с исходным раствором. Что произошло с наночастицами в растворе?

5 С помощью капельницы внесите одновременно 5-10 капель раствора сахара во вторую пробирку. Запишите свои наблюдения, сравнивая с исходным раствором.

6 Выберите другое вещество и добавьте его в третью пробирку. Перед добавлением вещества предскажите изменения (или их отсутствие) в растворе.

Опыт 3. Исследование оптических свойств наночастиц золота

Возьмите две кварцевые кюветы с толщиной оптического слоя 1 см. Кюветы берите только за боковые грани. Кюветы должны быть предварительно вымыты водой, а при необходимости и спиртом.

1 В одну кювету налейте на ее высоты (или до уровня боковой риски) дистиллированной воды, которая будет играть роль нулевого раствора.

2 Во вторую кювету внесите раствор наночастиц золота. Убедитесь, что в обеих кюветах отсутствуют пузырьки воздуха. В противном случае заполните кюветы заново.

3 Боковые грани и доньшко кювет тщательно протрите фильтровальной бумагой.

4 Поместите кюветы в кюветодержатель спектрофотометра.

5 Строго соблюдая инструкцию работы на спектрофотометре, снимите спектр исследуемого раствора. Отметьте положение максимума на спектре.

6 По положению максимума на спектре сделайте вывод о форме и (качественно) размере наночастиц золота, присутствующих в растворе.

Обработка, оценка и оформление результатов:

В отчете представить:

1 Схему и уравнение реакции синтеза наночастиц золота с помощью реакции окисления-восстановления.

2 Записи в рабочем журнале об изменении цвета раствора во время синтеза.

3 Записи в рабочем журнале о структурных изменениях, соответствующих каждой стадии синтеза.

4 Записи в рабочем журнале о влиянии (или отсутствии влияния) электролитов на устойчивость системы.

5 Спектр абсорбции раствора наночастиц золота.

6 Выводы о форме и размере наночастиц в синтезированном растворе.

8.3 Лабораторная работа № 3 Определение дисперсности коллоидных растворов наноразмерных углеродных материалов методом фотоэлектроколориметрии

Цели работы: ознакомиться с колориметрическим методом определения дисперсности коллоидных частиц в растворах, используемых для создания электропроводящих покрытий с нанокристаллическими

углеродными частицами, изучить работу фотоэлектроколориметра с компенсационной балансировкой лучей проходящего света.

Материалы и оборудование: мерные колбы емкостью 500 мл, пипетки на 5мл, бюретки на 25 мл, фотоэлектроколориметр, резиновая груша, вода дистиллированная.

Задание:

1. Ознакомиться с указаниями по технике безопасности при работе с фотоэлектроколориметром ФЭК-56М.
2. Ознакомиться с фотоэлектроколориметром ФЭК-56М и проставить на схеме наименование позиций.
3. Произвести разведение коллоидных растворов, полученных в разных условиях активации.
4. Выполнить измерения оптической плотности разведенных растворов.
5. Выполнить расчеты и составить отчет о проделанной работе согласно принятой форме.

Общие сведения: как описать частицу? Понимание этого вопроса является основой понимания результатов, получаемых различными методами анализа размеров частиц. Процессы диспергирования и многообразие форм частиц разных материалов делают процесс анализа размеров частиц, более комплексным вопросом, чем это кажется на первый взгляд. Невозможно выразить длину, высоту и ширину одним числовым значением. При определении размеров, например песчинки или частицы пигмента, задача еще больше усложняется. С практической точки зрения важно иметь такое единственное числовое значение, которое будет максимально полно характеризовать исследуемые частицы. Фактически, следует знать, увеличился или уменьшился размер частиц с момента, например, изменения технологии ее размола. Как выразить одним числовым значением размер частицы, которая имеет несколько величин характеризующих ее размер? Единственная форма объекта, который может быть описан одним числовым

значением – это сфера. Достаточно указать диаметр сферы, и это дает исчерпывающую информацию о размерах. Охарактеризовать куб таким же образом невозможно, т.к. измеряемое значение может относиться и к длине ребра, и к диагонали. Но, несмотря на сказанное выше, мы можем выразить его размер одним числовым значением.

Возьмем такое значение как вес, который как объем, и площадь поверхности является универсальным числовым значением, характеризующим объект. Итак, если у нас есть инструментарий для определения веса, то полученное значение мы можем преобразовать значение веса эквивалентной сферы. Это теория эквивалентной сферы. Измеряя некоторые характеристики частицы, предполагаем, что они относятся к сфере, рассчитываем универсальное число (диаметр этой сферы), которое характеризует нашу частицу. Этот пример наглядно подтверждает, что нет необходимости описывать размер частицы тремя или более числовыми значениями, которые, конечно, более точно выражают размер, но неудобны по многим соображениям для контроля. Можно заметить, что применение этой теории приводит к проявлению некоторых интересных эффектов, зависящих от формы объекта. Это наглядно иллюстрируется примером цилиндра и эквивалентной ему сферы. Однако если цилиндр меняет форму или размер, то обязательно меняется объем/вес и выразить эти изменения (т.е. увеличился цилиндр или уменьшился) можно только через модель эквивалентной сферы. Может оказаться, что частица с диаметром 20 мкм имеет толщину всего 0,2 мкм.

Как правило, мы не будем рассматривать такие примеры. Прибор, измеряющий объем частиц, может дать результат – около 5 мкм. Поэтому, возникает возможность дискутировать на предмет точности результатов, получаемых различными методами анализа крупности частиц. Обратите внимание, что при просеивании через сито с размером ячейки, например 25 мкм, все эти цилиндры будут определены как частицы, размер которых меньше 25 мкм. Очевидно, если мы будем рассматривать нашу частицу под

микроскопом, то мы смотрим на нее в плоскостной проекции, в которой можно измерить несколько ее диаметров. И каждый из этих диаметров характеризует эту частицу. Значения этих диаметров отличны друг от друга. Поэтому, важно понимать, что каждый метод определения размера частиц основан на измерении различных характеристик частицы (максимальная длина, минимальная длина, объем, площадь поверхности и т.д.).

Конечные результаты будут разными, в зависимости от применяемых методов, в каждом из которых применяется измерение разных физических характеристик частицы. Практически, можно сравнивать только результаты тех измерений, в которых один и тот же материал анализировался одним и тем же методом. Это, также, означает, что не может существовать стандартов и эталонов размеров для таких частиц, как зерна песка. Эталонем сравнения между разными методами анализа размеров частиц может служить только сфера. Однако, возможно использование стандартных эталонов сравнения для результатов, полученных разными приборами, но использующими один метод.

Для инженера по катализу наиболее полезным представляется сравнение этих сфер по значению площади удельной поверхности, т.к. чем больше площадь удельной поверхности, тем выше степень активности катализаторов. Площадь поверхности сферы равна.

Для сравнения частиц по площади поверхности мы должны возвести значения диаметров в квадрат, разделить на число частиц и извлечь квадратный корень для того, чтобы вернуться к среднему арифметическому диаметру. При использовании электронной микроскопии, для получения среднего значения сумма размеров частиц делится на их количество. Очевидно, что, используя этот метод, мы получим среднее арифметическое значение длины. Имея систему обработки изображения, мы имеем возможность измерить площадь каждой частицы. Тем самым мы получим значение $D [2,0]$. Если использовать прибор, работа которого основана на принципе электрозонной чувствительности, то мы сможем измерить объем

каждой частицы, затем сумму значений объемов разделив на количество частиц, мы определим средний объем или средний эквивалентный диаметр. Метод светорассеяния позволяет определить поверхность распределенных в объеме некоторого растворителя частиц, так как в зависимости от удельной поверхности уменьшается или увеличивается светорассеивание в проходящем свете. Для измерений пригодны любые денситометрические устройства. Современные приборы для аналитических целей снабжены дополнительно зональными светофильтрами и дополнительными устройствами, обеспечивающими функциональность в различных областях науки и практики.

Методика выполнения работы:

Для проведения работ студенты разделяются на группы из 3-4 человек. Каждой группе дают навеску пастообразного коллоидного препарата с заданием произвести измерения удельной поверхности коллоида по методике, приведенной ниже.

1 5 мл суспензии графита известной концентрации перенести через воронку (диаметром 10-15 см) в мерную колбу (500 мл) и разбавить дистиллированной водой до метки, энергично взбалтывать в течение 1 мин и дать 3 мин отстояться от пузырьков воздуха.

2 Затем произвести расчеты. Например, концентрация суспензии 67,04 г/л. В колбе при разбавлении 670,4 мг/л. Затем рассчитать объем суспензии, требуемый для получения концентрации 2 мг/л.

$$670,4 \text{ мг} - 1000 \text{ см}^3$$

$$2 \text{ мг} - x \text{ см}^3$$

$$x = 20000 : 6704 = 2,98 \text{ см}^3$$

Этот объем 2,98 см³ рассчитан на 1 литр, а при пользовании колбами на 500 мл количество суспензии нужно взять вполтину меньше.

$$2,98 \text{ см}^3 : 2 = 1,49 \text{ см}^3$$

3 Затем при помощи бюретки перенести 1,49 мл суспензии из первой колбы в другую мерную колбу (500 мл), довести содержимое до метки дистиллированной водой, взболтать энергично и дать отстояться в течение 3 мин. Полученная суспензия имеет концентрацию 2 мг/л, требуемую для определения оптической плотности.

4 Оптическую плотность полученной суспензии измеряют фотоэлектроколориметром ФЭК-56М. Для этого две чистые и сухие кюветы длиной 5 см тщательно ополоснуть дистиллированной водой, одну из них дважды ополоснуть приготовленной суспензией и ей же наполнить кювету до метки. Вторую кювету заполнить дистиллированной водой, также до метки.

5 Обе кюветы установить в гнезда держателей правого плеча, третью кювету длиной 3 см наполнить дистиллированной водой до метки, поместить в гнездо держателя левого плеча.

6 Измерение производить при светофильтре № 1 с длиной волны 3130 А. Кювету с суспензией помещают в правый пучок света. Кювету длиной 3 см – в левый. Индекс правого барабана устанавливают на нулевое деление шкалы оптической плотности и вращением левого измерительного барабана добиваются смыкания сектора индикаторной лампы прибора. Затем в правый пучок света вводят кювету с дистиллированной водой и вращением правого измерительного барабана вновь добиваются смыкания сектора.

7 Величину оптической плотности суспензии отсчитывают по правому барабану. Измерения повторяют 2-3 раза и берут среднее арифметическое значение оптической плотности D_1 , если измерения D_1 отличаются друг от друга не более, чем на 1 единицу второго знака после запятой. Например, оптическая плотность получилась: 0,66; 0,662. Среднее значение D_1 - 0,661.

8. Удельная поверхность частиц графита в суспензии подсчитывается по формуле: $S = 2825 * D_1 \text{ м}^2/\text{г}$. Например, $S = 2825 * 0,661 = 1867,0 \text{ м}^2/\text{г}$

За результат принимают среднее арифметическое значение определений удельной поверхности двух параллельных проб.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1 Для каждого из образцов определяют удельную поверхность частиц в коллоидном препарате.

2 После выполнения измерений студенты соединяют результаты расчетов в таблицу данных и строят график зависимости удельной поверхности препаратов от времени температуры активации графита.

3 Из анализа таблицы видно, что величина удельной поверхности в образцах 1,2,3,4 проходит через максимум в интервале температур активации 90 °С ...1500 °С.

8.4 Лабораторная работа № 4 Изготовление электропроводящего покрытия из коллоидного препарата с наноразмерными углеродными частицами

Цель работы: изучить методику получения электропроводящих покрытий из коллоидного препарата с наноразмерными углеродными частицами.

Общие сведения: одним из перспективных материалов для покрытий является графит, набор ценных качеств которого обусловлен его структурой и физико-химическими свойствами. Так, например, графит имеет стабильные электрофизические свойства в широком интервале температур и занимает промежуточное положение между металлами и полупроводниками. Технологичным и высокопроизводительным методом является формирование графитовых покрытий из суспензий и паст с последующей сушкой при 10000 °С. Метод позволяет покрывать изделия практически неограниченных размеров и сложной конфигурации, в том числе имеющие полости и глубокие отверстия малого диаметра. Кроме того, метод снимает большинство требований, предъявляемым к теплофизическим свойствам материала подложки.

Технология получения графитовых покрытий из суспензий включает три основные операции: активацию исходного порошка, нанесение суспензии на подложку, сушку при 20 °С -2500 °С. Операция активации предназначена для формирования графитового покрытия с высокой адгезией и когезией, а также для придания седиментационной устойчивости. Активацию исходного порошка проводят в две стадии. Порошок графита вначале размельчают до размеров 1- 50 мкм, затем смешивают с активирующим веществом. В качестве активирующих веществ можно использовать, во-первых, поверхностно активные вещества (ПАВ): олеат натрия, силикат калия, поливиниловый спирт и т.п. Во-вторых, химически активные вещества: азотную кислоту в присутствии концентрированной серной кислоты, оксид свинца(IV), бихромат калия, пероксид водорода.

В первом случае активация происходит в результате адсорбционного взаимодействия поверхности графита с ПАВ, что не обеспечивает длительной седиментационной устойчивости суспензии и достаточной адгезии к подложке.

Кроме того, присутствие ПАВ в ряде случаев нежелательно из-за образования нагара и газовыделения при температурах свыше 4500 °С. Во втором случае активация графитового порошка происходит при химическом взаимодействии графита с активирующей средой. При температурах порядка 60 °С -1100 °С инертный графит вступает во взаимодействие с некоторыми окислителями, образуя после ряда технологических операций, ультрадисперсную суспензию графит-вода (или спирт, или ацетон) с размером частиц от десятков до сотен нанометров. Поверхность графитовых частиц покрывается кислородсодержащими функциональными группами, обеспечивающими как адсорбционное взаимодействие практически с любой подложкой, так и поликонденсационные процессы друг с другом, что определяет формирование покрытия упорядоченной структуры с высокой когезионной прочностью и слоистой микроструктурой.

Полидисперсные углеродные материалы анализируют рентгенографическим методом, основанном на изучении закономерностей образования и изменения дифракционной картины, возникающей при взаимодействии рентгеновских лучей с кристаллической решеткой.

Материалы и оборудование: рентгеновский дифрактометр ДРОН 2,0, кварцевые подложки, сушильный шкаф, муфельная печь, силикат калия, азотная кислота (конц.), серная кислота (конц.), бихромат калия.

Методика выполнения работы:

1. Приготовить образцы покрытий.
2. Ознакомиться с дифрактометром ДРОН 2,0.
3. Произвести измерения и расчет экспериментальной рентгенограммы.

Обработка рентгенографических данных заключается в графической обработке профиля линии, построенной самописцем прибора. Измерения межплоскостных расстояний выполняют по центру тяжести дифракционных линий. Для определения истинной полуширины β образцов вводили поправку на инструментальную полуширину ν_0 по эталонному образцу порошкообразного железа с размером отожженных в вакууме частиц 20-30 мкм. Эталонный образец готовится так же, как и экспериментальные образцы. Истинное (физическое) уширение $\beta = V_0 - (\nu_0)^2 / V_0$, где V_0 – полуширина дифракционной линии, равная проекции отрезка на координатное направление на рентгеновской диаграмме. Затем найдите величину деформаций кристаллической решетки по формуле $\sigma = E^*(d - d_0/d)$, где E^* – модуль упругости.

Найдите размер блоков когерентного рассеяния в направлении перпендикулярном плоскости отражения (002) по формуле $L = k\lambda / \beta \cos\varphi$, где $k=0,89$.

4. Составить отчет о проделанной работе.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1. Для каждого из образцов рассчитать величину размеров частиц углерода.
2. Соединить результаты расчетов в таблицу, из которой должно быть видно, что величина размеров частиц графита в образцах 1-4 закономерно уменьшается с увеличением температуры термообработки.
3. По полученным данным постройте график зависимости величины внутренних напряжений от температуры термообработки покрытия.

8.5 Лабораторная работа № 5 Оценка бактерицидной активности наноматериалов

Цель: изучить влияние наноматериалов на нормальную микрофлору кишечника человека в условиях *in vitro*.

Принцип метода. Безопасность наноматериалов в отношении их влияния на микроорганизмы нормальной микрофлоры кишечника человека в условиях *in vitro* оценивают по влиянию наночастиц на ростовые, культуральные, морфологические, биохимические свойства этих микроорганизмов. Образцы наноматериалов в разных концентрациях одновременно с культурами основных видов нормальной микрофлоры кишечного тракта вносят в среду роста и проводят культивирование по стандартной методике.

Характеристика используемых организмов и тест-систем

В качестве тест-микроорганизмов используют выделенные из стандартизированных коммерческих препаратов пробиотиков («Лактобактерина», «Бифидумбактерина» и «Колибактерина») штаммы следующих микроорганизмов: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli*.

Материалы и оборудование: термостат, поддерживающий рабочую температуру 28-45 °С с отклонением от заданной ± 1 °С ТУ 64-1 -1382-12,

шейкер фирмы «Elmi» или аналогичный, ламинарный шкаф марки ЛШ1 фирмы «Віокот», центрифуга со скоростью вращения ротора до 12 000 об./мин для пробирок объемом 15 см³, встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин, холодильник бытовой электрический, весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, мембранные установки для получения деионизированной воды, анализатор потенциометрический с погрешностью измерений рН ± 0,01, облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 ТУ 954-001-0492102-01, дозаторы с переменным объёмом дозирования фирмы «Gilson», пробирки стерильные типа «Эппендорф», объемом 1,5 см³, пробирки стерильные с крышкой фирмы, вместимостью 15 см³ или аналогичные, наконечники пластиковые, объемом 1-200 мм³, наконечники пластиковые, объемом 200-1 000 мм³, перчатки резиновые, колбы плоскодонные конические разной вместимости, цилиндры стеклянные мерные лабораторные, вместимостью 25, 100, 1 000 см³, воронки стеклянные, флаконы стерильные, объемом 100 и 200 см³, питательные среды:

-среда Бактофок (или другие аналогичные среды) для культивирования бифидобактерий; MRS agar (или другие аналогичные среды) для культивирования лактобацилл; среда Эндо для культивирования *Escherichia coli*; тиогликолевая среда для выращивания тест-микроорганизмов.

Методика выполнения работы:

1. Для оценки роста культур в присутствии наноматериалов проводят наращивание микробной массы тест-микроорганизмов с дальнейшим титрованием методом десятикратных серийных разведений от 10⁰ до 10² КОЕ/мл.

2. Проводят сравнение двух рядов пробирок по 10 см³ тиогликолевой среды (опытных и контрольных) с исследуемыми разведениями тест-микроорганизмов.

3. В опытные ряды вносятся испытуемые наноматериалы. В контрольных содержатся только тест-микрорганизмы. Инкубируют опытные и контрольные пробирки в термостате при 37 °С в течение 72 ч.

4. По окончании инкубирования проводят высевы из тиогликолевой среды опытных и контрольных серий на плотные питательные среды (Бактофок, MRS agar и среду Эндо) для подсчета выросших колоний микроорганизмов.

5. Сравнивают число колоний тест-микрорганизмов в опытных и контрольных рядах, результаты оформляют в виде таблицы. Проверку морфологических, культуральных, ростовых и биохимических качеств тест-микрорганизмов проводят с использованием стандартных систем API Ana, API 20E.

Обработка, оценка и оформление результатов:

Исследуют качество выросших гест-микрорганизмов из опытных и контрольных серий по следующим показателям:

- визуальные признаки роста типичных колоний;
- культуральные, морфологические и биохимические свойства.

Окончательный результат количественного учета выводят из 3 параллельных посевов. Учитывается наличие и количество неспецифической в отношении тест-штаммов микрофлоры.

8.6 Лабораторная работа № 6 Исследование биологической активности наночастиц металлов, используемых в косметологии

Второй сферой расширения применения биолюминесцентного тестирования является исследование интегральной токсичности мутных и окрашенных жидкостей (нануглерода). Использование нанотехнологий и наноматериалов является одним из наиболее интригующих направлений развития науки и техники в XXI веке. К настоящему времени в мире уже

зарегистрировано и выпускается более 1800 наименований наноматериалов (т.е. структур в диапазоне размеров до 100 нанометров). При этом дальнейший прогресс в их производстве и применении неизбежно приведет к массивному поступлению наноматериалов в природные экосистемы и среду обитания человека. В то же время совокупность накопленных фактов свидетельствует о том, что в силу своей малой размерности и большой удельной поверхности наноматериалы могут обладать совершенно иными биологическими (в том числе токсическими) свойствами, нежели вещества в обычном физико-химическом состоянии.

Первые результаты изучения биологической активности наноуглерода оказались достаточно противоречивыми, и не столько дали ответ на поставленные вопросы, сколько вызвали множество новых. Особенностью данного объекта исследования становится то, что наноматериалы, в частности наноуглерод, являются не определенные химические вещества или соединения, но наноразмерные объекты, биологическая активность которых уже не описывается классическими токсикологическими законами, но предположительно зависит от таких особенностей их организации как поверхностные характеристики, размер, форма, состав, химическая реактивность и др. При этом подобные исследования не укладываются в рамки традиционной токсикологии, так как ориентированы на исследование биотоксичности соединений, активность которых не имеет прямых концентрационных зависимостей, но определяется их размерными характеристиками и морфологической организацией.

При этом, большинство соединений наноуглерода не являются водорастворимыми, что предполагает использование неполярных или малополярных растворителей. Особенностью биолюминесцентного тестирования суспензий наноуглерода является то, что на уровень регистрируемого свечения может оказывать влияние не только изменение функционального состояния микроорганизма, но и определяемые свойствами самой суспензии явления частичного поглощения и/или рассеяния

испускаемого света. Указанные обстоятельства могут вести к получению искаженных результатов анализа и определяют необходимость учета оптических свойств суспензий наноуглерода при проведении их биолюминесцентного тестирования.

Подходом, позволяющим исключить влияние оптических свойств наноуглерода и реализованным на платформе микропланшетного люминометра LM-01T («Immunotech», Чехия), стало проведение кинетических измерений биолюминесценции. В данном случае нивелирование оптических свойств УНМ на результат исследования может быть осуществлено путем проведения вычислений по формуле, учитывающей значения светимости в контрольной и опытной пробфх на нулевой и n-ой секунде проведения эксперимента.

Цель работы: оценить биологическую опасность/безопасность суспензий углеродных наноматериалов с использованием светящихся бактерий

Биотестирование проб наноуглерода проводят через 24 часа с момента его разведения. Пробы должны содержаться при температуре 4 °С. Важным условием является использование посуды из стекла, которая должна быть химически чистой.

Методика выполнения работы:

Пробоподготовка:

1 для определения острой интегральной токсичности (биотоксичности) наноуглерода делают навеску нануглерода весом 4 мг в стеклянную емкость;

2 к навеске наноуглерода добавляют 1 мл органического растворителя – диметилсульфоксида категории ч.д.а., интенсивно смешивают пипетированием и оставляют на 24 часа при температуре +4 °С;

3 через 24 часа стеклянную емкость со взвесью наноуглерода в органическом растворителе помещают в источник ванного типа, где обрабатывают ультразвуком в течение 30 минут;

4 часть полученной суспензии переносят в дистиллированную химически чистую воду таким образом, чтобы конечная концентрация органического растворителя равнялась 2,5 % по конечному объему.

Реконструкция биосенсора:

1 вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 мл охлажденной до 4 °С - 8 °С дистиллированной воды (лучше стерильной), рН 7,0-7,4. Несколько раз встряхивают флакон с суспензией бактерий;

2 выдерживают суспензию при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 30 минут;

3 доводят температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (от 15 °С до 25 °С);

4 перед отбором определенных объемов для проведения анализа рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий.

Подготовка планшетного биолюциметра:

1 прибор предварительно прогревают в течение получаса;

2 на компьютере запускают приложение «Kilia», после запуска которого будет происходить тестирование прибора;

3 в окне программы отмечают необходимые ячейки планшета, с которых будут сниматься показания свечения;

4 выбирают меню «Протокол» и подменю «Свойства», выставляют значения инкубации 10800 секунд, интервал между измерениями 300 секунд, нажимают «Ок» и сохраняют созданный протокол.

Процедура биотестирования:

1 в контрольные лунки планшета добавляют по 0,25 мл 2,5 % раствора использованного мало полярного растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) в дистиллированной химически чистой воде;

2 в опытные лунки добавляют по 0,25 мл суспензии наночастиц углерода, предварительно разведенного в растворе ДМСО до конечной концентрации растворителя 2,5 % и наночастиц углерода 0,1 мг/мл;

3 делают двухкратные разведения наночастиц углерода 2,5 % раствором ДМСО, получая следующие концентрации: 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл, 0,0125 мг/мл, ..., 0,00156 мг/мл;

4 при стандартном анализе отбирают из флакона по 0,05 мл рабочей суспензии бактерий и добавляют в контрольные кюветы и опытные кюветы от планшетного люминометра;

5 планшет устанавливают в кюветное отделение у люминометра и производят кинетическое измерение биолюминесценции в течение 3 часов, запуская измерение нажатием соответствующей кнопки в программе «Kilia»;

6 по окончании измерения нажимают кнопку «Экспорт в XLS» и сохраняют данные.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1 по окончании измерения данные сохраняются в файле с расширением «*.txt», открывают его с помощью программы Microsoft Office Excel, выбирая «Формат данных: с разделителями» и нажав кнопку «Готово»;

2 производят замену знаков «.» на знаки «,»;

3 в полученном файле столбцы соответствуют лункам планшета от 1 до 12, начиная со стрипа уровня А и заканчивая стрипом уровня «Н». Последний столбец содержит значения точек времени, на которых производилось измерение свечения;

4 оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб на нулевой и конечной секунде (10800 с) и вычислению относительного значения биолюминесценции по формуле.

8.7 Лабораторная работа № 7 Исследование опасности/безопасности наноматериалов

Цель работы: оценить безопасность наноматериалов по гибели *Daphnia magna* Straus.

Общие сведения: метод основан на установлении различия между количеством погибших дафний в анализируемой пробе (опыт) и культивационной воде (контроль). Критерием острой летальной токсичности является гибель 50 % дафний и более в опыте по сравнению с контролем за 96 ч биотестирования.

Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью $P = 0,95$, составляют ± 66 %. Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике составляет 34 %. Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ($K_2Cr_2O_7$).

Материалы и оборудование: аквариумы емкостью 5, 10 и 100 л аппарат для встряхивания, мешалка лабораторная, оксиметр любого типа, с погрешностью измерения не более $0,5 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$, груши резиновые разные, термолюминодатчик любого типа, поддерживающий температуру воды (20 ± 2) °С, освещенность (500 ± 100) лк. Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшей предельной нагрузкой 200 г, воронки разные лабораторные, бюксы или стаканчики для взвешивания диаметром 30, 40 мм, центрифуга лабораторная медицинская, термометр с ценой деления шкалы 1 °С холодильник любого типа, поддерживающий температуру (4 ± 2) °С, шкаф сушильный электрический общелабораторного назначения, колбы мерные, вместимостью 0,5 и 1,0 дм³, бумага фильтровальная, пипетки мерные, вместимостью от 1 до 10 см³, пипетки автоматические, дозаторы любого типа, объемом 0,1-0,2 см³, посуда стеклянная: вместимостью 2 дм³ для культивирования дафний, вместимостью от 100 до 150 см³ для биотестирования, натрий хлористый, калий двуххромовокислый, вода дистиллированная

Условия выполнения биотестирования

Биотестирование проводят в помещении, где не хранят и не работают с летучими веществами, не используют обработку помещения инсектицидами.

Температура анализируемой пробы при биотестировании должна быть (20 ± 2) °С, концентрация кислорода в пробе в начале биотестирования - не менее 6 мг/л. Во время биотестирования пробы аэрируют. Длительность светового периода должна соответствует естественному, для чего используется термолюминостаг.

Плотность посадки односуточных дафний в опыте и контроле должна составлять 10 экземпляров на 1 л. Повторность трехкратная. Результаты учитывают, если в конце биотестирования количество погибших дафний в контроле не превышало 10 % от LC50 за 24 ч воздействия эталонного вещества K2Cg20 7 (1-3 мг/л).

Подготовка к выполнению биотестирования

В качестве тест-объекта используют лабораторную культуру дафний - *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Культуру дафний выращивают в стеклянной посуде вместимостью до 2 л. Посуду моют пищевой содой и тщательно ополаскивают дистиллированной водой. Нельзя применять синтетические моющие средства и органические растворители!

Для культивирования дафний используют питьевую воду. Питьевую воду предварительно дехлорируют путем отстаивания и аэрируют микрокомпрессором до достижения концентрации растворенного кислорода не менее 6 мг/л. Начальная плотность посадки – 6-10 особей на 1 л воды. Спустя 5-7 суток, в течение которых дафнии привыкают к лабораторным условиям существования и начинают размножаться, в сосуды доливают воду для дальнейшего культивирования.

Пересаживают дафний при помощи стеклянной трубки внутренним диаметром 5-7 мм так, чтобы их не травмировать. Аэрировать воду в посуде с дафниями не рекомендуется.

При поддержании культуры в помещении не должно быть вредных газов и токсичных паров. Оптимальная температура (20 ± 2) °С, продолжительность светового дня 12-14 ч (не освещать культуру прямыми солнечными лучами). Посуду для содержания дафний нельзя мыть моющими и органическими растворителями, лучше мыть пищевой содой, при особом загрязнении - хромовой смесью или соляной кислотой.

Для культивирования дафний используют водопроводную воду, предварительно отстоянную не менее 7 суток и насыщенную кислородом (рН 7,0-8,2; жесткость общая – 3-4 мг-экв./л; концентрация растворенного кислорода не менее 6,0 мг/л). Раз в 7-10 суток половину объема воды с культурой дафний заменяют на свежую, удаляют скопившийся на дне осадок и при большой плотности (более 25 самок) культуру прореживают. Не следует производить аэрацию воды в сосудах. Кормом для дафний служат хлебопекарные дрожжи. Для приготовления дрожжевого корма берут 1 г свежих или 0,3 г воздушно-сухих дрожжей, заливают их 100 мл дистиллированной воды. После набухания дрожжи тщательно перемешивают, дают отстояться в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в сосуды с дафниями в количестве 3 мл на 1 л воды. Кормят дафний 1-2 раза в неделю.

Для биотестирования используют дафний в возрасте до 24 ч, которых кормят за 2-3 ч до начала биотестирования. Самок дафний (20-30 экземпляров) с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей, за одни сутки до биотестирования пересаживают в стеклянную посуду емкостью от 0,5 до 1,0 л с водой для культивирования и вносят корм. После появления молоди взрослых особей удаляют.

Не реже одного раза в месяц культуру односуточных дафний проверяют на пригодность к биотестированию. С этой целью устанавливают среднюю летальную концентрацию за 24 ч биотестирования (LC50 за 24 ч) раствора эталонного вещества двуххромовокислого калия (K₂Cr₂O₇).

Для этого готовят исходный раствор $K_2Cr_2O_7$ 1 г/л, используя дистиллированную воду. Далее, разбавляя исходный раствор культивационной водой, готовят серию растворов от 1,0 до 4,0 мг/л $K_2Cr_2O_7$ с интервалом 1 мг/л. Для контроля используют культивационную воду. Биотестирование проводят в течение 24 ч. На основании полученных результатов рассчитывают EC_{50} за 24 ч для двуххромовокислого калия в соответствии. Если полученная LC_{50} за 24 ч находится в диапазоне реагирования тест-объекта, который равен 1—3 мг/л $K_2Cr_2O_7$, культура дафний пригодна для биотестирования.

Если LC_{50} за 24 ч $K_2Cr_2O_7$ не находится в указанном диапазоне реагирования, проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры. При необходимости культуру заменяют на новую.

Методика выполнения работы:

1 Водные дисперсии тестируемого наноматериала различных концентраций наливают в стеклянные сосуды по 1 л (опыт).

2 Другие сосуды наполняют таким же объемом отфильтрованной воды из емкостей, где культивируются дафнии (контроль). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

3 В каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 дафний в возрасте до 24 ч. Продолжительность биотестирования составляет 96 ч. Во время биотестирования дафний не кормят.

4 В конце биотестирования визуально подсчитывают количество живых дафний. Живыми считают дафний, которые свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позже чем через 15 с после его легкого встряхивания. Остальных дафний считают погибшими.

5 После подсчета дафний в контроле и опыте в каждом сосуде определяют концентрацию растворенного кислорода.

Обработка, оценка и оформление результатов:

Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности наноматериала делают на основании величины А. Если величина А в максимальной протестированной концентрации наноматериала составляет 50 % и более, считают, что анализируемый наноматериал проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности анализируемого наноматериала производят определение LC50 за 96 ч биотестирования путём выполнения последовательных разбавлений тестируемого наноматериала по тому же алгоритму, как это делается для эталонного вещества - калия двуххромовокислого.

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объёме 5 % от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух последовательных определений токсичности одного и того же анализируемого наноматериала, полученным в условиях воспроизводимости (LC50 и LC50.2).

9 Психологические и этические проблемы использования нанотехнологий в пищевой промышленности

При рассмотрении вопроса о коммерциализации продуктов питания, полученных на основе нанотехнологий, важным аспектом является понимание того, как представители общественности формулируют свое видение, ожидания и опасения в отношении технологии, применение и последствия которой только начинают открываться. Нанотехнологии – это новая технология, готовая предложить новейшие предложения для пищевой промышленности на всех уровнях, от упаковки до самого питания. Но сама новизна этой области показала значительное влияние на усилия по налаживанию диалога между учеными и широкой общественностью по

вопросам, связанным с коммерциализацией нанотехнологий. Соответствующих научных данных не хватает, и система оценки или регулирования рисков в значительной степени находится в стадии разработки.

Общественность еще не сформировала четкого мнения о нанотехнологиях, а средства массовой информации не проявили интереса к исследованиям на эту тему.

В таком контексте обмен идеями через диалог между учеными и широкой общественностью видится сложной задачей, и все же идея «выше по течению» – привлечение граждан к процессу предвидеть, оценивать и влиять на траектории технологического развития на очень ранней стадии, до того, как технология будет полностью разработана – набирает валюты как подход, который может изменить отношения между наукой и обществом. Действительно, значительное число таких программ уже осуществлено, в первую очередь в Европе и США.

О растущем интересе к этому подходу свидетельствует растущий объем работ, сообщающих об исследованиях в этом направлении (Guston and Sarewitz 2002, Kleinman and Powell 2005, Gavelin et al. 2007, Kleinman et al. 2007, Toumey 2007, Pidgeon et al. 2009).

В отличие от этого, в Японии идея участия в восходящем потоке редко упоминается. Вместо этого правительство и частный сектор работают над тем, чтобы способствовать общественному признанию. Что касается программ, специфичных для пищевых применений нанотехнологий, то, как правило, к участию приглашаются только эксперты, и они исходят из предположения, что именно эксперты должны решать, какие вопросы важны и как сформулировать условия при обсуждении. Разговор касался продуктов питания, медицинских, экологических применений нанотехнологий, но все они были сосредоточены на оценке технологий, а не на проведении диалога с общественностью.

Другие пищевые технологии, такие как генетическая модификация сельскохозяйственных культур, стали предметом публичных дебатов в ряде стран, включая США, Великобритания, Австралия, Новая Зеландия и Япония (David and Thompson 2008, Horlick-Jones et al. 2007, Hindmarsh and Du Plessis 2008, Kobayashi 2004), но эти программы не могут быть описаны как участие в восходящем потоке, поскольку программы, пытающиеся привлечь общественность, имели место после того как технология уже используется:

Многие справедливо полагают, что вокруг идеи участия в восходящем потоке существует большая концептуальная и методологическая путаница, и поэтому эту концепцию необходимо пересмотреть для уточнения.

Какие же существуют моменты и проблемы применения нанотехнологий в пищевой промышленности?

Во-первых, еда - это то, что поддерживает человеческую жизнь и на протяжении многих веков этнические группы мира сохраняли свои собственные уникальные культуры питания. Когда люди жуют свою пищу, они чувствуют, насколько она вкусна, и когда они едят вкусную пищу, они чувствуют себя счастливыми. При использовании традиционных методов обработки пищевых продуктов для сохранения пищевых продуктов ингредиенты сохраняют свою первоначальную форму; поэтому внешний вид пищи вызывает в воображении потребителя вкус и текстуру ингредиентов.

Развитие новых технологий пищевой промышленности – это такие технологии, как нанотехнологии, дали продукты, которые позволяют потребителю поглощать питательные вещества в различных формах, таких как таблетки, желе и даже жидкости; эти формы затрудняют представление о том, что поглощается. Это хорошая новость для людей, чья пищеварительная функция была ослаблена из-за проблем со здоровьем; с другой стороны, необходимо учитывать возможность того, что мы в конечном итоге будем потреблять много пищи, которая не имеет ни интересного внешнего вида, ни текстуры три раза в день.

Еда – это доказательство того, что мы живы. Мы хотим наслаждаться вкусной едой каждый день, поэтому группа хочет убедиться, что эту радость можно испытать, потребляя нанопродукты. Мы хотим использовать сырые ингредиенты в своей кулинарии, уделять время тщательному приготовлению пищи и есть ее со своими семьями. Это желание обусловлено двумя мотивами: нашей верой в диетическое образование и нашей верой в местное производство для местного потребления. Однако сегодняшние родители и дети заняты и, таким образом, склонны выбирать быстрое питание, используя предварительно приготовленные продукты питания и т. Д. Мы хотелось бы видеть разработку продуктов, которые одновременно способствуют вкусным и безопасным блюдам и сокращают работу, связанную с приготовлением пищи.

Во-вторых, необходимо определение нанопродукции и разработка стандартов на нанопродукцию. Хотелось бы, чтобы соответствующие специализированные учреждения разработали точное определение нанопродукции, необходимо создание международных стандартов.

В-третьих, необходимо применять меры по маркировке нанопродуктов и санкционированию нанопродуктов органом по сертификации для обеспечения того, чтобы потребители могли выбирать и покупать нанопродукты с душевным спокойствием. Необходимо усовершенствовать следующие три типа этикеток: ингредиенты, производственные процессы и назначение (т. е. для содействия перевариванию и всасыванию и т. Д.).

В-четвертых, необходимо обеспечение безопасной рабочей среды, следует создать правила для обеспечения безопасности работников, занятых в производстве нанопродуктов, хотя и с использованием иного подхода, чем для обеспечения безопасности потребителей, покупающих эти продукты.

Какая же должна быть еда с использованием нанотехнологий?

1 Пища, которая улучшает коэффициент поглощения за счет добавления питательных веществ, модифицированных с помощью нанотехнологий.

2 Пищевые продукты, которые выполняют свою питательную функцию, даже когда проглатывается лишь небольшое количество, за счет улучшения коэффициента поглощения ингредиентов, таких как функциональные продукты питания и пищевые добавки.

3 Пища, которая стремится к синергетическому эффекту, создавая гибриды из нескольких питательных веществ, а не полагаясь на отдельные питательные вещества.

4 Пища, в которой сочетаются углеводы и нанотехнологическая версия местных блюд, чтобы можно было принимать различные питательные вещества.

5 Технологии защиты пищевых продуктов от внешнего воздуха, бактерий и т.д. Пища с наноразмерным покрытием, изготовленная с использованием натуральных ингредиентов, задерживает размножение бактерий и продлевает срок ее использования.

6 Технологии, применяющие нанотехнологии для использования преимуществ ранее выброшенных ингредиентов. В интересах предотвращения мирового продовольственного кризиса нанотехнологии могут быть использованы на субстанциях, которые в прошлом были бы выброшены, потому что они не имели питательной ценности.

10 К вопросу о терминологии

Стремительное развитие нанотехнологий вносит ряд новых терминов и определений. Разработка стандартов, терминологии, касающихся нанотехнологий, активно ведется как в отдельных странах, так и на уровне международных организаций. Разработан ряд национальных нанотехнологических стандартов, регламентирующих документов, которые часто отличаются в трактовке нанотерминов, но единой, международно признанной терминологии в области нанотехнологий и наноматериалов к настоящему времени еще не имеется. Например, в официальных документах

США нанотехнологии дается следующее определение: «нанотехнологией является понимание и контроль материи с размерами в диапазоне приблизительно от 1 до 100 нм, в котором уникальные явления способны обеспечить новые применения.

Затрагивая нанофизику, инженерную и технологическую нанотехнология включает отображение, измерение, моделирование и манипулирование материей в указанном диапазоне размеров».

В Великобритании термины «нанофизика» и «нанотехнологии» трактуются следующим образом: «нанофизикой является изучение явлений и манипулирование материалами на атомном, молекулярном и микроскопическом уровнях, где свойства существенно отличаются по сравнению с макроуровнем»; «нанотехнологией является разработка, характеристика, производство и применение структур, устройств и систем посредством контроля формы и размеров в нанометровом диапазоне». Даже эти примеры показывают различия в определениях.

В Украине терминологические стандарты в области нанотехнологий и наноматериалов еще не созданы. Можно, однако, констатировать, что определение понятия «нанотехнология», как правило, включает в себя размеры структурных элементов, являющихся объектами нанотехнологий и находящихся в интервале от размеров отдельных атомов (молекул) до 100 нм, возможность манипулирования этими элементами и получения новых свойств и функций у наноматериалов в указанном диапазоне размеров .

Нами сделана попытка, не претендуя на полноту и законченность, дать краткие определения некоторым, наиболее распространенным, терминам нанотехнологий, широко используемых в литературе.

Нано 10^{-9} м (от греческого *nanos* - карлик), приставка для обозначения порядка величины.

Нанотехнология – совокупность методов и приемов, обеспечивающих манипулирование веществом на уровне атомов и молекул и позволяющих

создавать объекты, включающие компоненты с размерами менее 100 нм, с целью получения материалов с качественно новыми свойствами.

Наноматериалы – материалы, содержащие структурные элементы, размеры которых, хотя бы в одном измерении, менее 100 нм, и обладающие качественно новыми свойствами, функциональными и эксплуатационными характеристиками.

Структурный элемент – составная часть наноматериала, размеры которой совпадают с корреляционным размером того или иного физического явления или параметра. имеющего размерность длины (длина свободного пробега электрона и фонона, длина когерентности в сверхпроводниках, размер магнитных доменов, критический радиус дислокационной петли и др.).

Нанонаука – система знаний, основанная на описании, объяснении и предсказании свойств материальных объектов с нанометрическими характеристическими размерами.

Нанокластер – образование из небольшого числа атомов размером 0,1... 1 нм.

Наночастицы – промежуточные образования из атомов (молекул) между малыми молекулярными кластерами и макроскопическими твердыми телами. Наночастицы состоят из атомов одного или нескольких элементов и имеют характеристические размеры <100 нм.

Нанокристалл – аналог наночастицы, имеющей кристаллографическую решетку.

Нанокристаллические материалы – компактные и дисперсные материалы, состоящие из нанокристаллов.

Нанобъекты – многочастичные системы, состоящие из индивидуальных, изолированных наночастиц.

Наносистема – объект в виде упорядоченных и связанных между собой элементов с нанометрическими размерами, кооперация которых

обеспечивает возникновение у объекта качественно новых свойств, связанных с проявлением наномасштабных факторов.

Наноструктура – совокупность наночастиц определенного размера и состава с наличием функциональных связей.

Нанокompозиты – объекты, полученные введением наночастиц в какие-либо матрицы, в которых межчастичные взаимодействия становятся сильными и маскируют свойства изолированных частиц.

Наносистемная техника – полностью или частично созданные на основе наноматериалов и нанотехнологий функционально законченные системы и устройства, характеристики которых кардинальным образом отличаются от аналогичных систем и устройств, созданных по традиционным технологиям.

Наноиндустрия – вид деятельности по созданию продукции на основе нанотехнологий, наноматериалов и наносистемной техники.

Нанодиагностика – совокупность методов исследования структурных, физико-химических, механических и др. характеристик наноматериалов, анализ состава и метрических параметров нановеществ.

Нанoeлектроника – область физики полупроводников, оперирующая искусственными устройствами, размеры которых, или период их сверхструктуры равны или меньше 100 нм.

Квантовая яма – объект, в котором имеется размерное квантование движения носителей заряда в одном направлении.

Квантовая проволока – объект, в котором имеется размерное квантование движения носителей заряда в двух направлениях.

Квантовая точка – нанообъект, в котором движение носителей заряда квантовано во всех трех направлениях («искусственный» атом приблизительно сферической или кубической формы с размерами 2... 10 нм).

Фуллерен – многоатомная молекула углерода с общей формулой C_n (n - четное), имеющая форму замкнутого полого многогранника, и относящаяся к

четвертой аллотропической форме углерода (первые три – алмаз, графит, карбин).

Фуллерит – твердофазная кристаллическая структура, образованная на основе

Фуллериды – химические соединения на основе молекул фуллерена.

Атом металла может находиться внутри фуллерена, вне его или может быть встроен в структуру углеродного каркаса.

Углеродные нанотрубки – новый класс углеродных образований: протяженные структуры в виде полого цилиндра, состоящие из одного или нескольких свернутых в трубку графитовых слоев с гексагональной организацией углеродных атомов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites / Dabbousi B., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F., Heine J., Mattoussi H., Ober R., et al. // *J.Phys. Chem.* – 1997. – 101. – P. 9463-9475.
2. Activation of mast cells by silver particles in a patient with localized argyria due to implantation of acupuncture needles / Kakurai M., Demitsu T., Umemoto N., Ohtsuki M., Nakagawa H. // *Br. J. Dermatol.* – 2003. – 148. – P. 822.
3. Adverse health effects of selenium in humans / Vinceti M., Wei E.T., Malagoli C., Bergomi M., Vivoli G. // *Rev. Environ. Health.* – 2001. – 16. – 233-251.
4. Alkilany, A.M. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? / Alkilany A.M., Murphy C.J. // *J. Nanopart. Res.* – 2010. – 12. – P. 2313-2333.
5. Almeida, A.J. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins / Almeida A.J., Souto E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2007. – 59. – 478-490.
6. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles / Li Y., Leung P., Yao L., Song Q.W., Newton E. // *J. Hosp. Infec.* – 62. – P. 58-63.
7. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J. // *Nanomedicine: NBM.* – 2007. 3. P. 95-101.
8. Aptamer-based silver nanoparticles used for intraellular protein imaging and single nanoparticle spectral analysis / Chen L.Q., Xiao S.J., Peng L., Wu T., Ling J., et al. // *J. Phys. Chem.* – 114. –P. 3655-3659.
9. Bentolila, L.A. Single-step multicolor fluorescence in situ hybridization using semiconductor quantum dot-DNA conjugates / Bentolila L.A., Weiss S. // *Cell Biochem. Biophys.* – 2006. – 45. – P. 59-70.

10. Biocompatibility of graphene oxide / Wang K., Ruan J., Song H., Zhang J. Wo Y., Guo S., Cui D. // *Nanoscale Res. Lett.* – 2011. – 6. P. 8.
11. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry / Xing Y, Chaudry Q, Shen C, Kong KY, Zhou HE, Chung LW, Petros JA, O'Regan RM, Yezhelyev MV, Simons JW, Wang MD, Nie S. // *Nat. Protoc.* – 2007. 2. – P. 1152-1165.
12. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against Gram-positive and Gram-negative bacteria / Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. // *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* – 2010. – 6. – P. 103-109.
13. Bio-nanotechnology. A revolution in food, biomedical and health sciences / 2013. – John Wiley and sons, Ltd. – 840 p.
14. Brandl M. Liposomes as drug carriers: A technological approach. *Biotechnol. // Annu. Rev.* – 2001. – 7. P. 59-85.
15. C₆₀: Buckminsterfullerene / Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E. // *Nature.* – 1985. – 318. – P. 162-163.
16. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods / Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – 128. – P. 2115-2120.
17. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery / Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. // *Nano Res.* – 2009. – 2. – P. 85-120.
18. Cell selective response to gold nanoparticles / Patra H.K., Banerjee S., Chaudhuri U., Lahiri P., Dasgupta A.K. // *Nanomedicine.* – 2007. – 3. – P. 111-119.
19. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes / Wang S., Lu W., Tovmachenko O., Rai U.S., Yu H., Ray P.C. // *Chem. Phys. Lett.* – 2008. – 463. – P. 145-149.

20. Chan, W.C.W. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection / Chan W.C.W., Nie S.M. // *Science*. – 1998. – 281, 2016-2018.
21. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles / Shrivastava S., Bera T., Singh S.K., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D. // *ACS Nano*. – 2009. – 3. – P. 1357-1364.
22. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles / Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. // *Nanotechnology*. 2007. – 18. – P. 225103-225111.
23. Chithrani, B.D. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells / Chithrani BD, Ghazan AA, Chan CW. // *Nano Lett.* – 2006. – 6. – 662-668.
24. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells / Zhang Y., Ali S.F., Dervishi E., Xu Y., Li Z., Casciano D., Biris A.S. // *ACS Nano*. – 2010. – 4. – P. 3181.
25. Daniel, M.C. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-sized-related properties, and applications towards biology, catalysis and nanotechnology / Daniel M.C., Astruc D. // *Chem. Rev.* – 2004. – 104. – P. 293-346.
26. Delivery and visualization of proteins conjugated to quantum dots in cardiac myocytes / Koshman Y.E., Waters S.B., Walker L.A., Los T., de Tombe P., Goldspink P.H., Russell B. // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2008. – 45. – P. 853-856.
27. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized grapheme / Sasidharan A., Panchakarla L.S. Chandran P., Menon D., Nair S., Rao C.N.R., Koyakutty M. // *Nanoscale*. – 2011. – 3. – P. 2461-2464.
28. Ekimov, A.I. Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals / Ekimov A.I., Onushchenko A.A. // *JETP Lett.* – 1981. – 34. – P. 345-349.

29. Electric field effect in atomically thin carbon films / Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA. // *Science*. – 2004. – 306. P. 666-669.
30. Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum* / Ahmad A., Mukherjee P., Mandal D., Senapati S., Islam Khan M., Kumar R., Sastry M. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – 124. P. 12108-12109.
31. Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites / Marimuthu S., Rahuman A.A., Rajakumar G., Santhoshkumar T., Kirthi A.V., Jayaseelan C., Bagavan A., Zahir A.A., Elango G., Kamaraj C. // *Parasitol. Res.* – 2011. – 108. – P. 1541-1549.
32. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* / Ahmad A., Mukherjee P., Senapati S., Mandal D., Khan M.I., Kumar R., Sastry M. // *Colloids Surf. B.* – 2003. – 28. – P. 313-318.
33. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum* / Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Khan MI, Kumar R. // *Chem. Biochem.* – 2002. – 3. P. 461-463.
34. Feynman, R.P. There's plenty of room at the bottom / R.P. Feynman // *Eng. Sci. (CalTech)*. – 1960. – 23. P. 22-36.
35. Ghosh, K.K. Preparation of Ag nanoparticles in surfactant solution / Ghosh, K.K., Kolay S. // *J. Dispersion Sci. Technol.* – 2008. – 29. – P. 676-681.
36. Giersig, M. Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition / Giersig M, Mulvaney P. // *Langmuir*. – 1993. – 9. – P. 3408-3413.
37. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity / Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D. // *Small* 1. – 2005. – P. 325-327.
38. Gold nanoparticles in delivery applications / Ghosh P., Han G., De M., Kim C.K., Rotello V.M. // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2008. – 60. – P. 1307-1315.

39. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A review. / Shao Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay I.A., Lin Y. // *Electroanalysis*. – 2010. – 22. – P. 1027-1036.
40. Graphene fluorescence resonance energy transfer aptasensor for the thrombin detection / Chang H., Tang L., Wang Y., Jiang J., Li J. // *Anal. Chem.* – 2010. – 82. – P. 2341-2346.
41. High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis / Kong X.L., Huang L.C., Hsu C.M., Chen W.H., Han C.C., Chang H.C. // *Anal. Chem.* – 2005. – 77. P. 259-265.
42. Huang, L.C., Chang H.C. Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds / Huang L.C., Chang H.C. // *Langmuir*. – 2004. – 20. – P. 5879-5884.
43. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization / Pathak S, Choi SK, Arnheim N, Thompson ME. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – 123. – 4103-4104.
44. Hyper-Rayleigh scattering of protein-modified gold nanoparticles / Zhang CX, Zhang Y, Wang X, Tang ZM, Lu ZH. // *Anal. Biochem.* – 2008. – 320. P. 136-140.
45. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. // *Nature*. – 1991. – 354. – P. 56-58.
46. Imaging methods for determining uptake and toxicity of carbon nanotubes in vitro and in vivo / Nerl H.C., Cheng C., Goode A.E., Bergin S.D., Lich B., Gass M., Porter A.E. // *Nanomedicine (Lond.)*. – 2011. – 6. – P. 849-865.
47. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor QDs / Wu X.Y., Liu H., Liu J., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M.P. // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – 21. – P. 41-46.
48. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells / Chang Y., Yanga S.T., Liua J.H., Dong E., Wang Y., Cao A., Liu Y., Wang H. // *Toxicol. Lett.* – 2011. – 200. – P. 201.

49. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1 / Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ. // *J. Nanobiotechnol.* – 2005. – 3. –P. 6.
50. Interfacing live cells with nanocarbon substrates / Agarwal S., Zhou X., Ye F., He Q., Chen G.C.K., Soo J., Beoy F., Zhang H., Chen P. // *Langmuir.* – 2010. – 26. –2244.
51. Intracellular imaging with a graphene-based fluorescent probe / Peng C., Hu W., Zhou Y., Fan C., Huang Q. // *Small.* – 2010. – 6, 1686–92 (2010).
52. Labelling and intracellular tracking of functionally active plasmid DNA with semiconductor quantum dots / Srinivasan C, Lee J, Papadimitrakopoulos F, Silbart LK, Zhao M, Burgess DJ. // *Mol. Ther.* – 2006. – 14. – P. 192-201.
53. Liu, F. Graphene oxide arrays for detecting specific DNA hybridization by fluorescence resonance energy transfer / Liu F., Young C.J., Seo T.S. // *Biosensors Bioelectronics.* – 2010. – 25. –P. 2361-2365.
54. Lung function changes in Sprague -Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles / Sung J.H., Ji J.H., Yoon J.U., Kim D.S., Song M.Y., Jeong J., Han B.S., Han J.H., Chung Y.H., Kim J., et al. // *Inhal. Toxicol.* – 2008. – 20. – P. 567-574.
55. Makadia, H.K. Poly lactic-co-glycolic acid (plga) as biodegradable controlled drug delivery carrier / Makadia H.K., Siegel S.J. // *Polymers.* 2011. – 3. – P. 1377-1397.
56. Mallick, K. Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route / Mallick K. Witcomb M.J., Scurell M.S. // *J. Mater. Sci.* – 2003. – 39. – P. 4459-4463.
57. Medintz, I.L Interactions between redox complexes and semiconductor quantum dots coupled via a peptide bridge / Medintz I.L., Pons T., Trammell S.A., Grimes A.F., English D.S., Blanco-Canosa J.B., Dawson P.E., Mattoussi H. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. 130. P. 16745-16756.

58. Mohanty, N. Graphene-based singlebacterium resolution biodevice and DNA transistor: Interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents / Mohanty N., Berry V. // *Nano Lett.* – 2008. – 8. P. 4469-4476.
59. Multispectral imaging of clinically relevant cellular targets in tonsil and lymphoid tissue using semiconductor quantum dots / Fountaine T.J., Wincovitch S.M., Geho D.H., Garfield S.H., Pittaluga S. // *Mod.Pathol.* – 2006. – 19. – P. 1181-1191.
60. Murray, C.B. Synthesis and characterization of nearly monodispersed CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites / Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. // *J.Am. Chem. Soc.* – 1993. – 115. – P. 8706-8715.
61. Nanda, A. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE / Nanda, A, Saravanan M. // *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* – 2009. – 5. – P. 452-456.
62. Nanocrystalline silver particles: Synthesis, agglomeration, and sputtering induced by electron beam / Li Y., Duan X., Qian Y., Li Y., Liao H. // *J. Colloid Interface Sci.* – 1999. – 209. – P. 347-349.
63. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery / X. Sun, Z. Liu, K. Welsher, J.T. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric, H. Dai // *Nano Res.* – 2008. – 1. P. 203–212.
64. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis / Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D., Drews M., Morandi M., Malinski T., Radomski M.W. // *Br. J. Pharmacol.* – 2005. – 146. – P. 882-893.
65. Nanostructural materials formation by mechanical alloying: Morphologic analysis based on transmission and scanning electron microscopic observations / Gaffet E., Tachikart M., El Kedim O., Rahouadj R. // *Mater. Charact.* – 1996. – 36. – P. 185-190.
66. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy / Keren S., Zavaleta C., Cheng Z., De La Zerda A., Gheysens O., Gambhir S.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – 105. – P. 5844-5849.

67. Noninvasive Raman spectroscopy in living mice for evaluation of tumor targeting with carbon nanotubes / Zavaleta C., De La Zerda A., Liu Z., Keren S., Cheng Z., Schipper M., Chen X., Dai H., Gambhir S.S. // *Nano Lett.* – 2008. – 8. – P. 2800-2805.
68. Oligonucleotide modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation / Rosi N.L., Giljohann D.A., Thaxton C.S., Lytton-Jean A.K.R., Han M.S., Mirkin C.A. // *Science.* – 2006. – 312. – P. 1027-1030.
69. Oligonucleotide modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation / Rosi N.L., Giljohann D.A., Thaxton C.S., Lytton-Jean A.K.R., Han M.S., Mirkin C.A. // *Science.* – 2006. – 312. – P. 1027-1030.
70. PEGylated nanographene oxide for delivery of water insoluble cancer drugs / Liu Z, Robinson JT, Sun X, Dai H. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – 130.– P. 10876–10877.
71. Peng, Z.A. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor / Peng, Z.A., Peng X. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – 123. – P. 183-184.
72. Photoacoustic molecular imaging in living mice utilizing targeted carbon nanotubes / De La Zerda A., Zavaleta C., Keren S., Vaithilingam S., Bodapati S., Liu Z., Levi J., Ma T.-J., Oralkan O., Cheng Z., et al. // *Nat. Nanotech.* – 2008. – 3. – P. 557-562.
73. Polyhydroxylated fullerene derivative C(60)(OH) (24) prevents mitochondrial dysfunction and oxidative damage in an MPP(+) -induced cellular model of Parkinson's disease / Cai X., Jia H., Liu Z., Hou B., Luo C., Feng Z., Li W., Liu J. // *J. Neurosci. Res.* – 2008. – 86. – P. 3622-34.
74. Polymeric systems for controlled drug release / Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M. // *Chem. Rev.* – 1999. 99. P. 3181-3198.
75. Preparation, structure and electrochemical properties of graphene modified electrode / Tang L.H., Wang Y., Li Y.M., Feng H.B., Lu J., Li J.H. // *Adv. Funct. Mater.* – 2009. – 19. – P. 2782.

76. Quantum dot/bioluminescence resonance energy transfer based highly sensitive detection of proteases / Yao H., Zhang Y., Xiao F., Xia Z.Y., Rao J. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – 46. – 4346-4349.
77. Quantum-dot-labeled DNA probes for fluorescence in situ hybridization(FISH) in the microorganism *Escherichia coli* / Wu S.M., Zhao X., Zhang Z.L., Xie H.Y., Tian Z.Q., Peng J., Lu Z.X., Pang D.W., Xie Z.X. // *ChemPhysChem.* – 2006. – 7. – P. 1062-1067.
78. Rosi, N.L. Nanostructures in biodiagnostics / Rosi N.L., Mirkin C.A.// *Chem. Rev.* – 2005. – 105. – P. 1547-1562.
79. Samia, A.C.S. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy / Samia A.C.S., Chen X.B., Burda C. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – 125. P. 15736-15377.
80. Selective prostate cancer thermal ablation with laser activated gold nanoshells / Stern M.J., Stanfield J., Kabbani W., Hsieh J.T., Cadeddu J.A.// *J. Urol.* – 2008. –179. – P. 748-753.
81. Selfilluminating quantum dot conjugates for in vivo imaging / So M.K., Xu C., Loening A.M., Gambhir S.S., Rao J. // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – 24. – P. 339-343.
82. Shi, Y. Photoluminescence-enhanced biocompatible quantum dots by phospholipid functionalization / Shi Y, He P, Zhu X. // *Mater. Res. Bull.* – 2008. – 43. – 2626-2635.
83. Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: Near-IR imaging and biocompatibility studies in *Drosophila* / Leeuw T.K., Reith R.M., Simonette R.A., Harden M.E., Cherukuri P., Tsyboulski D.A., Beckingham K.M., Weisman R.B. // *Nano Lett.* – 2007. – P. 2650-2654.
84. Stabilization of protein by biocompatible nanoparticles of silver / Singh SK, Shrivastava S, Nayak M, Sinha ASK, Jagannadham MV, Dash D. // *J. Bionanosci.* – 2009. – 3. P. 88-96.
85. Stable and nondisruptive in vitro/in vivo labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots / Ohyabu Y., Kaul Z., Yoshioka T., Inoue

K., Sakai S., Mishima H., Uemura T., Kaul S.C., Wadhwa R. // *Hum. Gene Ther.* – 2009. – 20. P. 217-224.

86. Study of chemical composition of nanostructural materials prepared by laser cutting of metals / Amulyavichus A., Daugvila A., Davidonis R., Sipavichus C. // *Fizika Metallov I Metallovedenie.* 1998. – 85. – P. 111-117.

87. Submicrometer metallic barcodes / Nicewarner-Pena S.R., Freeman R.G., Reiss B.D., He L., Pena D.J., Walton I.D., Cromer R., Keating C.D., Natan M.J. // *Science.* – 2001. – 294. – P. 137-141.

88. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery / Liu Z., Sun X., Nakayama N., Dai H. // *ACS Nano.* 2007. – 1. P. 50-56.

89. Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant – potassium bitartrate / Tan Y., Dai Y., Li Y., Zhua D. // *J. Mater. Chem.* 2003. – 13. – P. 1069-1075.

90. Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo / Weng K.C., Noble C.O., Papahadjopoulos-Sternberg B., Chen F.F., Drummond D.C., Kirpotin D.B., Wang D., Hom Y.K., Hann B., Park J.W. // *Nano Lett.* – 2008. 8. P. 2851-2857.

91. The bactericidal effect of silver nanoparticles / Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. // *Nanotechnology.* – 2005. – 16. – P. 2346-2353.

92. The development of quantum dot calibration beads and quantitative multicolor bioassays in flow cytometry and microscopy / Wu Y, Campos SK, Lopez GP, Ozbun MA, Sklar LA, Buranda T. // *Anal. Biochem.* – 2007. – 364. –P. 180192.

93. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application / Bolander M.E., Mukhopadhyay D., Sarkar G., Mukherjee P. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – 69. P. 485492.

94. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets / Singh SK, Singh MK, Nayak MK, Kumari S, Shrivastava S, Gracio JA, Dash D. // ACS Nano. – 2011. – 5. P. 4987-4996.
95. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing / Tian J., Wong K.K., Ho C.M., Lok C.N., Yu W.Y., Che C.M. // Chem. Med. Chem. – 2007. – 2. – P. 129-136.
96. Toxicological studies on silver nanoparticles: Challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging / Stensberg MC, Wei Q, McLamore E, Porterfield DM, Wei A, Serp̄lveda MS. // Nanomedicine (Lond.). – 2011. – 6. – P. 879-898.
97. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. / Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A. // Chem. Commun. – 2004. P. 16-17.
98. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited / Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. // J. Phys. Chem. – 2006. – 110. – P. 15700-15707.
99. Turkevich, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold / Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. // Disc. Faraday Soc. – 1951. – P. 55-75.
100. Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy / Robinson J.T., Tabakman S.M., Liang Y. Wang H., Sanchez Casalongue H., Vinh D., Dai H. // J. Am. Chem. Soc. – 2011. – 33. – P. 6825-6831.
101. Wilson, W.L. Quantum confinement in size-selected, surface-oxidized silicon nanocrystals / Wilson W.L., Szajowski P.F., Brus L.E. // Science. – 1993. – 262. – P. 1242-1244.
102. Xing, Y. Semiconductor quantum dots for biosensing and in vivo imaging / Xing Y., Xia Z., Rao J. // IEEE Tran. Nanobioscience. – 2009. – 8. P. 4-12.

103. Наноматериалы и нанотехнологии / Анищик В.М. и др.. – Минск:
Изд. Центр БГУ, 2008. – 375 с.