

На правах рукописи



Ронжин Никита Олегович

**ИНДИКАТОРНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАНОАЛМАЗОВ ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА**

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2015

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ФГБУН ИБФ СО РАН), г. Красноярск

Научный руководитель: **Бондарь Владимир Станиславович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии и биолюминесценции

Официальные оппоненты: **Судачкова Нина Евгеньевна**, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН «Институт леса им. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук», отдел физико-химической биологии и биотехнологии древесных растений, главный научный сотрудник

Лямкин Алексей Иванович, доктор физико-математических наук, профессор, ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Институт инженерной физики и радиоэлектроники, заведующий кафедрой физики

Ведущая организация: **ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»**, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, г. Красноярск

Защита состоится «___» _____ 2015 г. в _____ час. на заседании диссертационного совета Д 003.007.01 при ФГБУН ИБФ СО РАН по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ИБФ СО РАН и на сайте <http://www.ibp.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Зотина Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Развитие нанотехнологии открывает новые возможности эффективного решения широкого спектра задач, возникающих в различных сферах деятельности человека. Внедрение наноматериалов и нанотехнологий в биологию, биотехнологию, медицину, фармакологию, экологию будет способствовать их выходу на новый качественный уровень. В этом направлении мировым научным сообществом проводятся исследования с наночастицами разной физико-химической природы, а список исследуемых объектов и решаемых задач чрезвычайно широк (Nikitin et al., 2010; Purto et al., 2010; Wang et al., 2010; Lopez-Moreno et al., 2010; Lad, Agrawal, 2012; Lamanna et al., 2012; Mieszawska et al., 2013; Goenka et al., 2014, Ho et al., 2015).

Одной из актуальных задач нанобиотехнологии является разработка новых эффективных средств индикации и диагностики (включая системы многоцветного использования), расширяющих арсенал известных методов, применяемых в медицинской диагностике и экологическом мониторинге. Для данной области несомненный интерес могут представлять модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, образующие свободнодисперсные системы и адаптированные для медико-биологических исследований (Bondar, Puzyr, 2004; Puzyr et al., 2005; Puzyr et al., 2007). Физико-химические свойства МНА (размер наночастиц, сочетание химически полиморфной, активной поверхности и высокой коллоидной устойчивости в дисперсионных средах), открывают возможности их применения в разработке и создании новых материалов и технологий для биологии, медицины, фармакологии, экологии.

Цели и задачи исследования. Целью работы являлось изучение применимости МНА как основы в конструировании индикаторных и диагностических систем многоцветного использования.

Указанная цель достигалась решением следующих задач:

1. На примере реакции окислительного азосочетания исследовать каталитический эффект МНА при взаимодействии органических соединений и оценить применимость данных наночастиц для создания средств индикации фенола.

2. Изучить применимость МНА в создании биолюминесцентной индикаторной тест-системы посредством неспецифической адсорбции светоизлучающего фермента люциферазы на поверхность наночастиц и оценить свойства полученного комплекса МНА-люцифераза.
3. Исследовать применимость МНА в конструировании систем биохимического определения глюкозы и холестерина с помощью одновременной ковалентной иммобилизации на поверхности наночастиц нескольких ферментов – глюкозооксидазы и пероксидазы для индикации глюкозы; холестеринэстеразы, холестериноксидазы и пероксидазы для индикации холестерина.
4. Оценить функциональную активность полученных тест-систем биохимической диагностики МНА-ферменты при разных физико-химических условиях среды (температура, рН, состав буферной системы), многократном использовании и длительном хранении.
5. Провести сравнительный анализ количественного определения глюкозы и холестерина в образцах сыворотки крови человека *in vitro* с использованием тест-систем МНА-ферменты и полифункционального биохимического анализатора, применяемого в клинических лабораториях.

Положения, выносимые на защиту:

1. На примере реакции окислительного азосочетания показан каталитический эффект МНА при взаимодействии органических соединений, что открывает возможность создания новых способов индикации химических веществ, в частности, фенола.
2. Показано, что МНА могут использоваться в качестве носителя для адсорбции и ковалентной пришивки ферментов с сохранением их каталитической функции, что открывает возможности конструирования новых многоцветных систем индикации и биохимической диагностики.

Научная новизна и практическая значимость. Все результаты, представленные в диссертации, получены впервые. В работе демонстрируется нетрадиционное применение наночастиц алмаза как материала биотехнологического назначения: как катализатора в реакциях взаимодействия органических соединений, на приме-

ре реакции окислительного азосочетания (4-аминоантипирин – фенол – перекись водорода); в качестве носителя биомолекул (ферментов), сохраняющих функциональную активность после адсорбции и ковалентной пришивки на наночастицы.

Показано, что частицы МНА могут использоваться для создания новых эффективных индикаторных и диагностических систем многоразового использования: для экологического мониторинга загрязнений окружающей среды фенолом и его соединениями; в биолюминесцентном микроанализе; для количественного определения глюкозы и холестерина в сыворотке крови человека *in vitro*.

Полученные новые знания вносят вклад в развитие представлений о физико-химических и функциональных свойствах частиц МНА и новых вариантах их применения как материала биотехнологического назначения. Разработанные на основе МНА многоразовые индикаторные и диагностические системы могут найти применение в медицинской диагностике физиологически важных веществ и экологическом мониторинге загрязнений водных сред соединениями фенола.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы представлены на: V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); IV Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2014); Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых учёных-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); Четырнадцатой международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике» (С-Петербург, 2012); Научно-технической конференции с международным участием «VI Ставеровские чтения» (Бийск, 2012); Конференции с международным участием «Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности» (Ульяновск, 2011); Конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных-физиков НКСФ-XXXVII и НКСФ-XXXVIII (Красноярск, 2008, 2009); Конференциях аспирантов и молодых ученых-исследователей ИБФ СО РАН и КИЦ СО РАН (Красноярск, 2011, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, включая 5 статей в научных журналах, 3 из которых рекомендованы ВАК.

Благодарности. Автор выражает благодарность сотруднику ФГБУН Институт химии и мимической технологии СО РАН В.Ф. Каргину за помощь в проведении элементного анализа МНА.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 125 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования, заключение, выводы и список цитируемой литературы (118 источников, включая 66 иностранных). Работа содержит 40 рисунков, 3 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы МНА марок RUDDM 0-125 ($d_{50} = 49.6$ нм) и RUDDM 200-500 ($d_{50} = 270$ нм), производимые ООО «Реал-Дзержинск» (Россия) по технологии (Патент № 2252192, 2005), разработанной в ИБФ СО РАН.

Для создания индикаторной биолюминесцентной системы использовали светоизлучающий фермент люциферазу из бактериальных клеток *E. coli* рекомбинантного штамма-продуцента Z905 (коллекция ИБФ СО РАН), содержащих плазмиду pPHL7 с генами бактериальной люминесцентной системы *Ph. leiognathi* (Патент № 2073714, 1997).

Индикаторный комплекс МНА-люцифераза получали посредством физической адсорбции люциферазы на частицы МНА при помощи смешивания раствора фермента с гидрозолем наночастиц в объемном соотношении 1:1. После этого частицы с адсорбированным ферментом собирали центрифугированием. Полученный осадок МНА отмывали от не связавшегося и слабосвязавшегося с частицами фермента, отмывтый комплекс МНА-люцифераза переводили в состояние гидрозоля и использовали для последующего конструирования биолюминесцентной индикаторной тест-системы.

Конструирование индикаторной тест-системы осуществляли посредством послойного закрепления полимерной матрицы, МНА и люциферазы на стеклянной

подложке. В зависимости от способа закрепления компонентов на стеклянной подложке, на завершающей стадии подложку с фиксированной матрицей помещали на 15 – 30 минут в суспензию, содержащую комплекс МНА-люцифераза; подложку с фиксированными матрицей и МНА помещали в раствор фермента. После всего, тест-систему промывали для удаления не связавшихся комплексов МНА-люцифераза, либо не связавшихся молекул фермента.

Активность люциферазы тестировали с помощью фотовосстановленного ФМН (Гительзон и др., 1984; Бондарь и др., 1988), используя билюминометр (модель БЛМ 8801) производства СКТБ «Наука» (Красноярск, Россия), калиброванный по радиоактивному стандарту Гастингса-Вебера (Hastings, Weber, 1963). Одна люминесцентная единица составляла 10^8 фотонов в 1 секунду. Люминесцентные сигналы регистрировали с помощью самописца (модель 2210) фирмы «ЛКВ» (Швеция).

Для создания тест-систем биохимической диагностики использовали растворы ферментов из наборов Холестерин-Витал (Витал Диагностик, С.-Петербург, Россия) и Glucose LS (ProDia International, Германия), применяемых для определения концентрации общего холестерина и глюкозы в сыворотке крови.

Тест-систему для определения глюкозы получали с помощью одновременной ковалентной пришивки глюкозооксидазы и пероксидазы, тест-систему для определения холестерина – с помощью одновременной ковалентной пришивки холестеринэстеразы, холестериноксидазы и пероксидазы на поверхность МНА, функционализированную бензохиноном по известной методике (Brandt et al., 1975; Остерман, 1985; Mateescu et al., 1989). Емкость МНА при ковалентной иммобилизации ферментов оценивали по количеству суммарного белка, пришитого на единицу веса носителя.

Концентрацию белка в образцах измеряли методом микроопределения с биуретовым реактивом (Кочетов, 1981), используя БСА в качестве стандарта. В ряде случаев, определение белка в проводили спектрофотометрически по величине оптической плотности при 280 нм, для расчетов использовали калибровочную зависимость величины оптической плотности от концентрации БСА в растворе.

Функциональную активность сконструированных тест-систем биохимической диагностики (комплексы МНА-ферменты) оценивали по образованию окрашенного продукта реакции (хинонимин) в присутствии соответствующего определяемого аналита – глюкозы или холестерина. Образовавшийся продукт реакции регистрировали спектрофотометрически по величине оптической плотности при 506 нм.

Применимость сконструированных тест-систем для практического использования оценивали в сравнительных исследованиях определения глюкозы и холестерина в образцах сыворотки крови человека *in vitro* с помощью комплексов МНА-ферменты и полифункционального биохимического анализатора Sapphire 400 (Niigata Mechatronics, Japan).

Анализ элементного состава МНА проводили на электронном микроскопе ТМ-1000 (Hitachi, Япония). При создании и изучении тест-систем использовали центрифугу 5415R (Eppendorf, Германия) и спектрофотометры UVIKON 943 (Kontron Instruments, Италия) и UV-2600 (Shimadzu, Япония).

В работе использовали реагенты фирм «Sigma», «Serva», «Fluka», «Aldrich», а также отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование каталитической активности МНА в реакции окислительного азосочетания

На примере реакции окислительного азосочетания (перекись водорода – 4-аминоантипирин – фенол) показан каталитический эффект МНА в реакциях взаимодействия органических соединений. Частицы МНА катализируют реакцию (Рис. 1), о чем свидетельствует образование окрашенного продукта. Показано, что зависимость образования продукта реакции имеет практически линейный вид в диапазоне времени 5 – 20 минут.

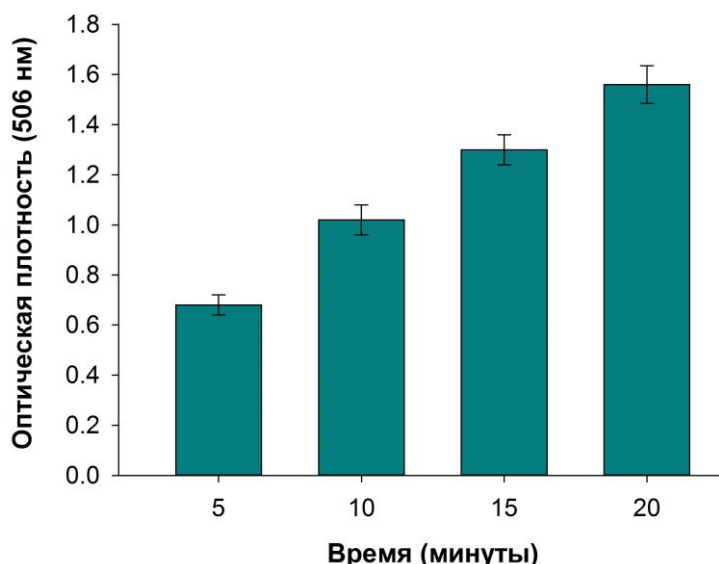


Рис. 1. Зависимость образования продукта реакции перекись водорода – 4-ААП – фенол от времени инкубации с МНА при 20 °С.

В работе впервые установлено, что каталитический эффект МНА реализуется за счет присутствующих на поверхности наночастиц микропримесей ионов железа и меди. Это подтверждается результатами модельных экспериментов с растворами ионов металлов, которые выявляются на поверхности МНА в виде микропримесей. Установлено, что реакцию окислительного азосочетания катализируют только ионы Fe и Cu (Рис. 2). Ионы первой переходной серии (Mn, Co, Ni), двухвалентные ионы Mg и Ca и трехвалентные ионы Al не обладают каталитическим эффектом.

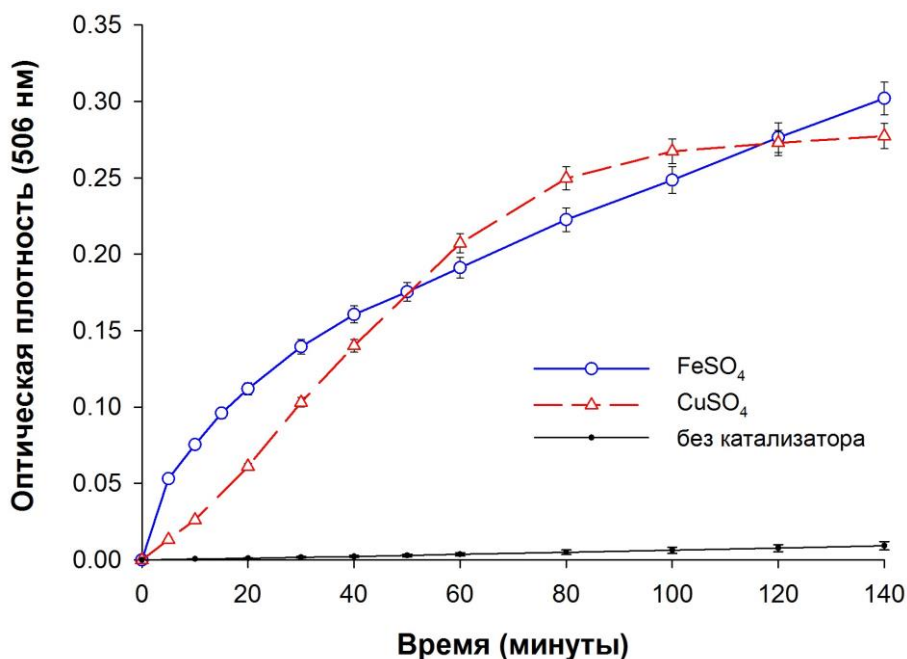


Рис. 2. Зависимость образования продукта реакции перекись водорода – 4-ААП – фенол, катализируемой ионами Fe и Cu, от времени инкубации.

Показано, что каталитическая эффективность МНА с разными размерами кластеров определяется количеством поверхностных примесей ионов железа и меди (Таблица 1).

Таблица 1

Элементный состав образцов МНА с разными размерами кластеров.

Микропримеси элементов	Образцы МНА	
	RUDDM 0-125 ($d_{50} = 49.6$ нм)	RUDDM 200-500 ($d_{50} = 270$ нм)
Fe (мкг/мг)	4.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3
Cu (мкг/мг)	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.2
O (мкг/мг)	10.12 ± 0.44	4.18 ± 0.64

Выход продукта реакции почти в 2 раза выше в присутствии МНА с малыми размерами кластеров ($d_{50} = 49.6$ нм), по сравнению с наночастицами с большими размерами ($d_{50} = 270$ нм), что объясняется большим содержанием ионов Fe и Cu (в 2 и 1.5 раза, соответственно) на частицах МНА с малыми размерами кластеров. Нейтрализация поверхностных ионов с помощью ЭДТА приводит к значительному ухудшению каталитических свойств МНА с малыми и большими размерами кластеров – выход продукта реакции снижается в 2 и 2.5 раза, соответственно.

Поскольку обработка МНА хелатором (ЭДТА) не приводит к полной утрате их каталитической функции, высказано предположение, что в механизме катализа дополнительно могут участвовать также химически активные кислород содержащие функциональные группы, обнаруживаемые на поверхности МНА. Высокое содержание кислорода выявлено в образцах МНА с разными размерами кластеров (Таблица 1).

Выход продукта катализируемой МНА реакции имеет линейную зависимость при концентрации фенола в диапазоне 0 – 10 мкг/мл (Рис. 3). Показано, что каталитический эффект МНА зависит от температуры: при 40 °С выход продукта реакции в 4 раза выше, чем при 20 °С.

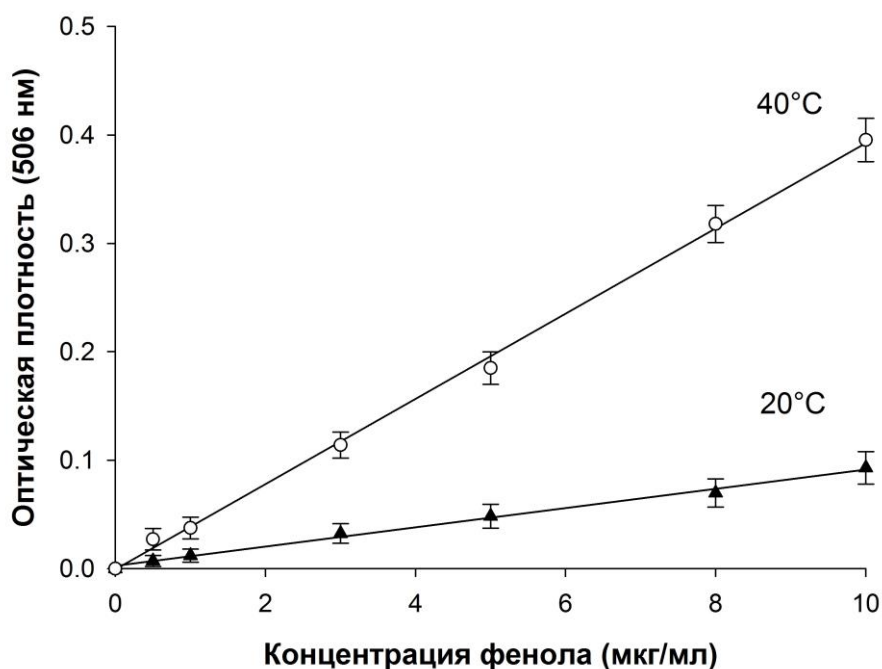


Рис. 3. Образование продукта реакции, катализируемое МНА при разных температурах, в зависимости от концентрации фенола (инкубация образцов 10 мин).

Полученные результаты свидетельствуют о применимости МНА для создания новых катализаторов взаимодействия органических соединений и систем экспресс индикации для экологического мониторинга загрязнений окружающей среды (например, водных экосистем) соединениями фенола.

2. Конструирование и изучение свойств биолюминесцентной тест-системы на основе МНА, люциферазы и полимерной матрицы

Осуществлена адсорбция светоизлучающего белка люциферазы на поверхность частиц МНА с сохранением активности фермента и иммобилизация полученного комплекса МНА-люцифераза на полимерной матрице. Последовательность стадий конструирования тест-системы и ее вид представлены на схеме (Рис. 4). Показано, что конструкция стержневого типа является наиболее оптимальной для проведения люминесцентного тестирования, учитывая технические особенности кюветного биолюминометра.

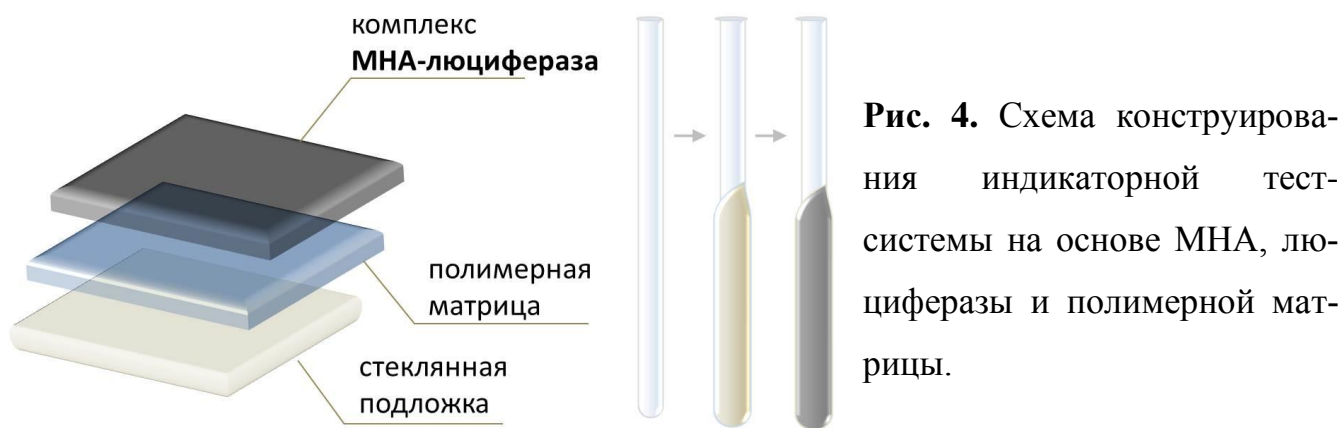


Рис. 4. Схема конструирования индикаторной тест-системы на основе МНА, люциферазы и полимерной матрицы.

При адсорбции рекомбинантной люциферазы на поверхность МНА было установлено три механизма связывания фермента с наночастицами: лабильное связывание с сохранением активности и возможностью десорбции (около 40 % фермента); прочное связывание с утратой активности (около 40 – 45 % фермента); прочное связывание с сохранением активности и невозможностью десорбции (примерно 15 % фермента).

В исследованиях было показано (Рис. 5), что адсорбированная на поверхности наночастиц люцифераза обладает существенно большей термоустойчивостью, по сравнению со свободным ферментом в воде (или буфере).

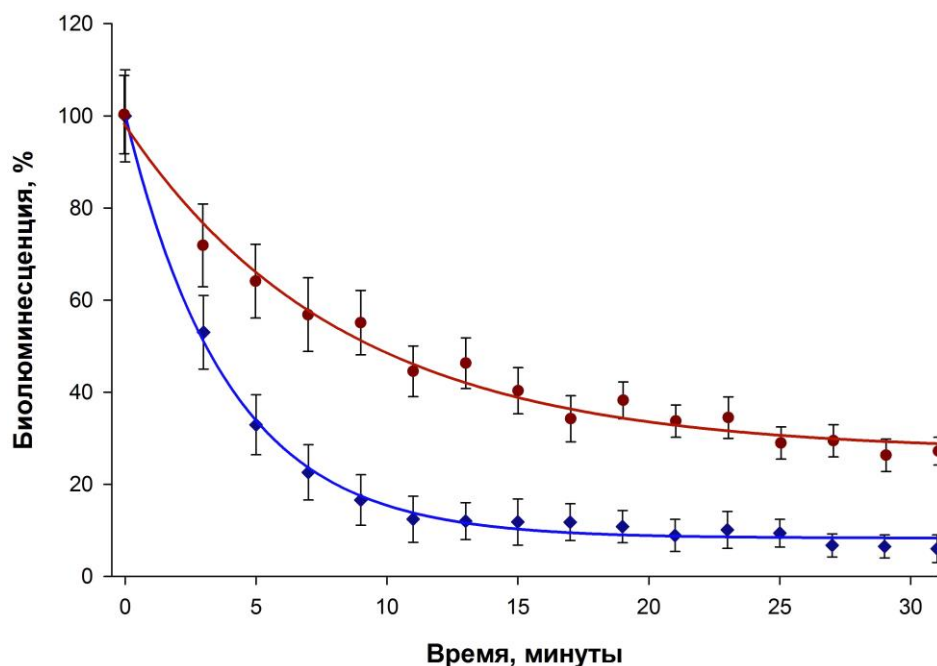


Рис. 5. Активность свободной люциферазы (◆) и в составе индикаторного комплекса МНА-люцифераза (●) в зависимости от времени инкубации при 36 °С.

В составе комплекса с частицами МНА фермент, по сравнению со свободной люциферазой, проявляет также бóльшую активность практически во всех исследованных буферных системах с нейтральным значением рН – 7.0: трисовом, бис-трис пропановом, аммоний ацетатном, натрий ацетатном, фосфатном буфере.

В работе продемонстрирована многократность использования полученной тест-системы в биолюминесцентном тестировании (Рис. 6). Показано, что созданная конструкция полимерная матрица-МНА-люцифераза прочно фиксирована на стеклянной подложке и не удаляется при многократной промывке струей воды и впрыскивании в кювету раствора фотовосстановленного ФМН.

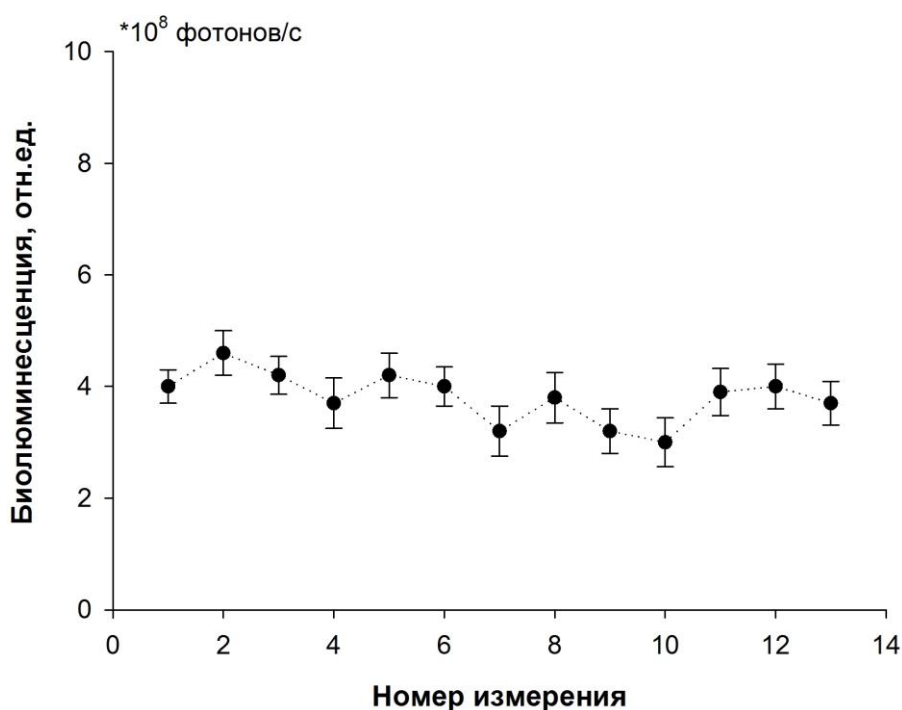


Рис. 6. Люминесцентные сигналы, регистрируемые при многократном использовании сконструированной тест-системы.

3. Конструирование и исследование свойств систем биохимического определения глюкозы и холестерина на основе МНА и ферментов

Конструирование тест-систем биохимической диагностики выполнялось с помощью одновременной ковалентной иммобилизации двух (глюкозооксидаза и пероксидаза) и трёх (холестеринэстераза, холестериноксидаза и пероксидаза) фер-

ментов на поверхность МНА, предварительно функционализированную бензохиноном.

Общий принцип работы систем биохимической диагностики, создаваемых на основе МНА и ферментов, представлен гипотетической схемой (Рис. 7). Определяемое вещество (аналит) трансформируется в цепи последовательных биохимических реакций, катализируемых ковалентно иммобилизованными на поверхности наночастиц ферментами $E_1 \rightarrow E_2 \rightarrow \dots \rightarrow E_n$, в соответствующие продукты $P_1 \rightarrow P_2 \rightarrow \dots \rightarrow P_n$. Конечный продукт (P_n) является окрашенным и легко выявляется спектральными методами анализа.

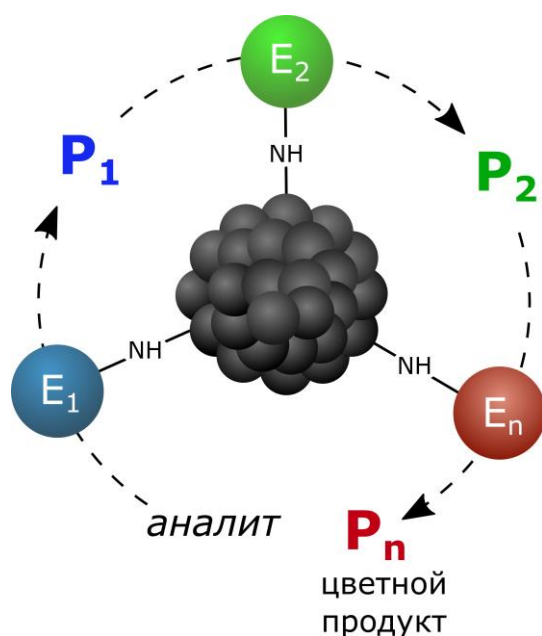


Рис. 7. Гипотетическая схема функционирования тест-систем биохимической диагностики, конструируемых на основе МНА и ферментов.

Установлено, что в обоих случаях ферменты, ковалентно иммобилизованные на частицы МНА, проявляют свою функциональную активность и катализируют цепь последовательных биохимических реакций, приводящих к образованию окрашенного продукта (хинонимин).

Выявлено, что обе диагностические системы (комплексы МНА-ферменты) активны в широком диапазоне температур (Рис. 8). Видно, что температурный оптимум для системы определения холестерина составляет около 50 °С. При этой температуре выход продукта реакции существенно (в 4.5 раза) выше по сравнению с его образованием при 20 °С. Тем не менее, при температуре 20 °С выход продукта вполне достаточен для его спектрального тестирования. Активность системы

определения глюкозы незначительно возрастает в интервале температур 20 – 45 °С (повышение выхода продукта около 10 %), по сравнению с ее активностью при температуре 20 °С. Полученные данные могут объясняться температурным оптимумом работы ферментов, входящих в состав диагностических систем.

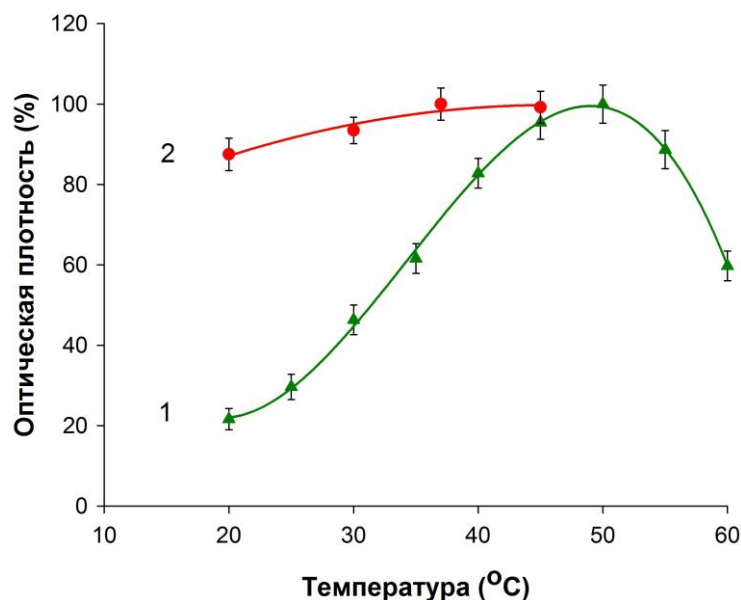


Рис. 8. Выход продукта реакции, катализируемой тест-системой определения холестерина (1) и глюкозы (2), в зависимости от температуры. Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при изменениях глюкозы и холестерина.

Показано (Рис. 9), что индикаторные системы МНА-ферменты могут функционировать в широком диапазоне рН, проявляя большую активность при слабокислых и нейтральных условиях среды. Следует отметить, что столь же эффективно обе диагностические системы функционируют в деионизованной воде.

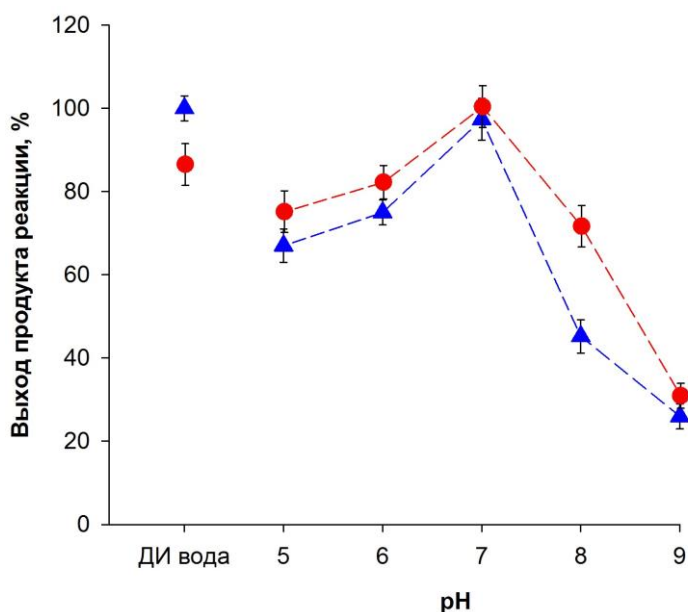


Рис. 9. Выход продукта реакции, катализируемой тест-системами определения холестерина (▲) и глюкозы (●), в зависимости от рН. Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при измерениях холестерина и глюкозы, соответственно.

В работе показано, что системы определения холестерина и глюкозы эффективно функционируют в разных буферах с нейтральным значением pH – 7.0: фосфатном, аммоний ацетатном, бис-трис пропановом, натрий ацетатном и трисовом. Наиболее оптимальной средой для функционирования обеих систем является фосфатный буфер и деионизованная вода.

Исследования показали, что сконструированные комплексы МНА-ферменты позволяют осуществлять многократное тестирование определяемых аналитов – глюкозы и холестерина (Рис. 10), а также проявляют свою функциональную активность при хранении в виде водных суспензий в течение 2 – 3 месяцев при 4 °С.

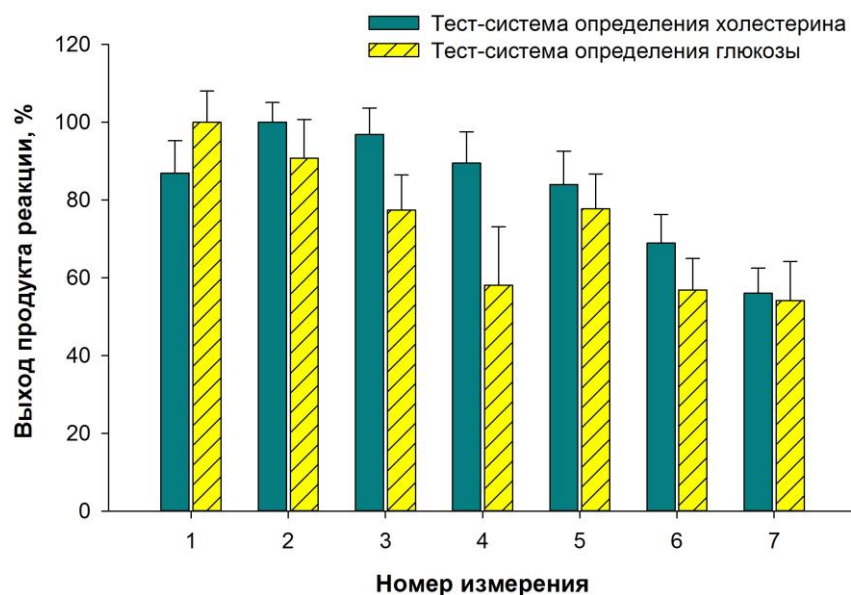


Рис. 10. Выход продукта реакции при многократном использовании тест-систем определения холестерина и глюкозы. Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при измерениях холестерина и глюкозы, соответственно.

Установлено, что полученные системы биохимической диагностики обеспечивают линейный выход продукта в широком интервале концентраций анализируемых веществ (Рис. 11). Для системы определения глюкозы это наблюдается в диапазоне концентраций 0.01 – 1.5 мг/мл, для системы определения холестерина – в диапазоне 0.01 – 0.2 мг/мл. Это позволяет осуществлять тестирование данных аналитов в пределах их физиологических концентраций в крови человека. Полученные результаты имеют практическое значение и позволяют прогнозировать применимость сконструированных тест-систем в медицинской диагностике физиологически важных веществ.

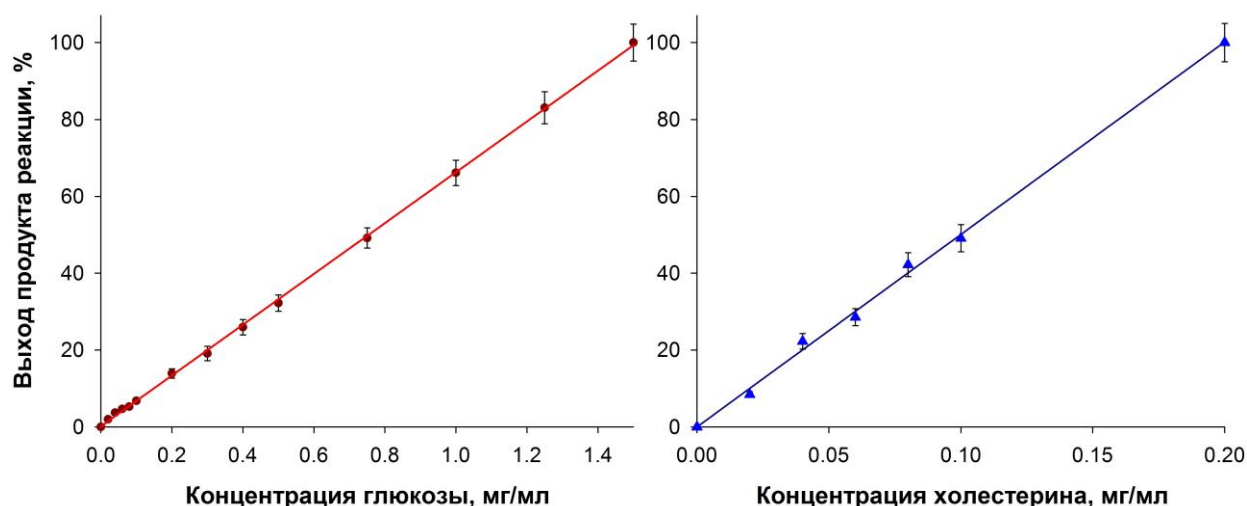


Рис. 11. Выход продукта реакции, катализируемой тест-системами МНА-ферменты, в зависимости от концентрации глюкозы и холестерина. Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта.

Оценку практической применимости сконструированных систем биохимической диагностики проводили в сравнительных экспериментах определения концентрации глюкозы и общего холестерина в образцах сыворотки крови человека *in vitro* с помощью комплексов МНА-ферменты и полифункционального автоматизированного биохимического анализатора Sapphire 400 (Niigata Mechatronics, Japan).

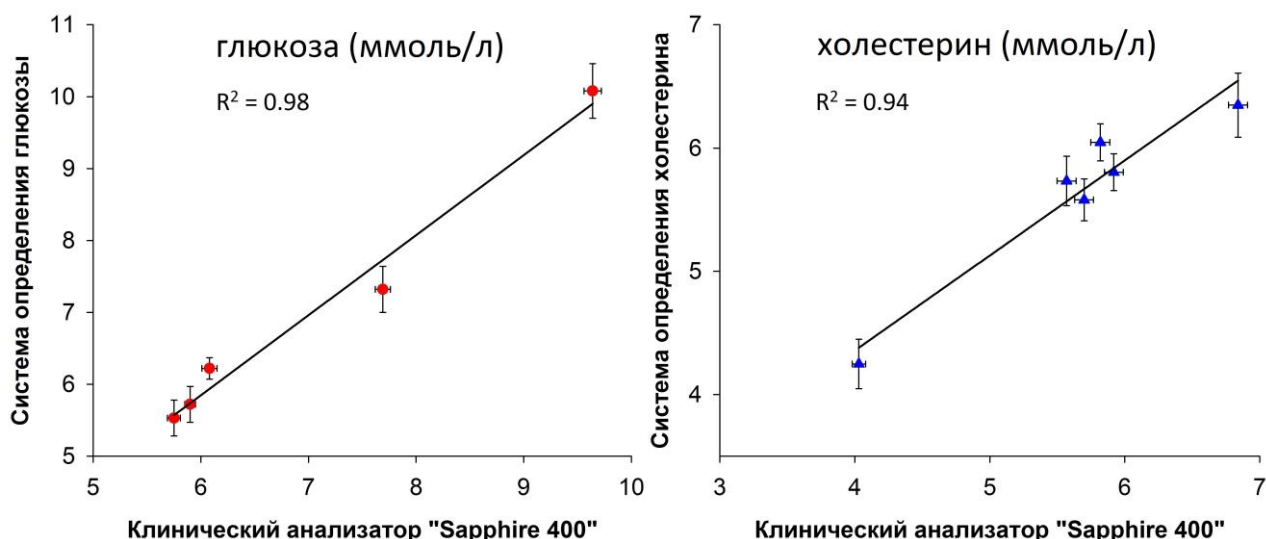


Рис. 12. Корреляционные зависимости между двумя методами определения глюкозы и холестерина в сыворотке крови человека – с помощью биохимического анализатора Sapphire 400 и систем МНА-ферменты.

Было установлено (Рис. 12), что сконструированные диагностические системы МНА-ферменты пригодны для определения данных аналитов в сыворотке крови, о чем свидетельствует высокий коэффициент корреляции между двумя методами тестирования: при определении глюкозы он составил значение 0.98, при определении холестерина – 0.94.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что каталитический эффект МНА в реакции окислительного азосочетания (перекись водорода – 4-аминоантипирин – фенол) реализуется за счет поверхностных микропримесей ионов Fe и Cu. Вероятно, в механизме катализа дополнительно могут участвовать химически активные кислород содержащие группы МНА. Выход цветного продукта катализируемой МНА реакции имеет линейную зависимость от концентрации фенола в диапазоне 0 – 10 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о применимости МНА для создания новых катализаторов взаимодействия органических соединений и систем экспресс индикации загрязнений окружающей среды соединениями фенола.

2. Сконструирована биолюминесцентная индикаторная тест-система посредством адсорбции светоизлучающего фермента люциферазы на поверхность МНА и закрепления полученного комплекса МНА-люцифераза на органической полимерной матрице. Адсорбированная на поверхности наночастиц люцифераза, по сравнению со свободным ферментом, обладает большей термостабильностью и проявляет бóльшую активность в различных буферных системах с нейтральным значением pH (7.0). Показана возможность многократного использования сконструированной тест-системы в люминесцентном микроанализе.

3. Сконструированы системы биохимического определения глюкозы и холестерина посредством одновременной ковалентной иммобилизации двух (глюкозооксидаза и пероксидаза) и трёх (холестеринэстераза, холестериноксидаза и пероксидаза) ферментов, соответственно, на поверхность МНА, активированную бензохиноном. Установлено, что в обоих случаях иммобилизованные ферменты проявляют свою функциональную активность и в присутствии соответствующего аналита

катализируют цепь последовательных биохимических реакций, приводящих к образованию окрашенного продукта (хинонимин).

4. Показано, что полученные системы биохимической диагностики (комплексы МНА-ферменты) функционируют в широком диапазоне температур и pH, разных буферах с нейтральным значением pH (7.0) и деионизованной воде; обеспечивают линейный выход продукта в широком интервале концентраций определяемых аналитов; позволяют проводить многократное тестирование; проявляют функциональную активность в течение 2 – 3 месяцев хранения при 4 °С.

5. Установлено, что сконструированные тест-системы применимы для определения общего холестерина и глюкозы в сыворотке крови *in vitro*. В параллельных экспериментах показано высокое совпадение данных при определении этих аналитов с помощью автоматизированного биохимического анализатора и диагностических систем МНА-ферменты: коэффициент корреляции при определении глюкозы составил 0.98, при определении холестерина – 0.94.

Публикации по теме диссертации

Статьи в журналах

1. **Ronzhin, N.O.** Catalytic Activity of Nanodiamonds in Azocoupling Reaction / N.O. Ronzhin, A.P. Puzyr, A.E. Burov, V.S. Bondar // Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. – 2014. – V. 5. – P. 173-178.
2. **Ronzhin, N.O.** Nanodiamond-Based Test Systems for Biochemical Determination of Glucose and Cholesterol / N.O. Ronzhin, A.V. Baron, E.S. Mamaeva, A.P. Puzyr, V.S. Bondar // Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. – 2013. – V. 4. – P. 242-246.
3. **Ронжин, Н.О.** Наноалмазы в биотехнологии: применение для выделения белков и создания индикаторных тест-систем / Н.О. Ронжин, К.А. Харин, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2010. – Т. 3. – № 4. – С. 418-433.
4. Бондарь, В.С. Многоцветные системы биохимической диагностики на основе наноалмазов / В.С. Бондарь, **Н.О. Ронжин**, Е.С. Мамаева, А.В. Барон, И.И. Гительзон // Доклады Академии Наук. – 2013. – Т. 448. – № 6. – С. 722-725.

5. Purtov, K. Biodistribution of Different Sized Nanodiamonds in Mice / K. Purtov, A. Petunin, E. Inzhevatin, A. Burov, **N. Ronzhin**, A. Puzyr, V. Bondar // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2015. – V. 15. – P. 1070-1075.

Статьи и тезисы в материалах конференций

1. **Ронжин, Н.О.** Системы биохимического определения глюкозы и холестерина на основе наноалмазов / Н.О. Ронжин, А.В. Барон, В.С. Бондарь // Сборник научных трудов IV Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки», Белгород. – 2014. – Ч.1. – С. 40-46.

2. **Ронжин, Н.О.** Индикаторные тест-системы на основе наноалмазов детонационного синтеза / Н.О. Ронжин, А.В. Барон, В.С. Бондарь // Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013», Иркутск. – 2013. – С. 442-445.

3. **Ронжин, Н.О.** Система определения холестерина на основе комплекса наноалмазы-ферменты / Н.О. Ронжин, А.П. Пузырь, А.В. Барон, В.С. Бондарь // Материалы докладов IV Съезда биофизиков России. Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике», Н. Новгород. – 2012. – С. 81.

4. **Ронжин, Н.О.** Индикаторные системы многоразового действия на основе наноалмазов / Н.О. Ронжин, Е.С. Мамаева, А.В. Барон, В.С. Бондарь // Сборник статей Четырнадцатой международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике», С-Петербург. – 2012. – С. 247-248.

5. Бондарь, В.С. Наноалмазы взрывного синтеза как материал биотехнологического назначения / В.С. Бондарь, К.В. Пуртов, **Н.О. Ронжин**, А.В. Барон, А.Е. Буров, А.И. Петунин, О.А. Могильная, И.И. Гительзон, Н.Н. Дегерменджи, А.Г. Дегерменджи // Ультрадисперсные порошки, наноструктуры, материалы: получение, свойства, применение. VI Ставеровские чтения: Труды научно-технологической конференции с международным участием, Бийск. – 2012. – С. 288-292.

6. **Ронжин, Н.О.** Изучение каталитических свойств модифицированных наноалмазов взрывного синтеза в реакции окислительного азосочетания / Н.О. Ронжин,

А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Сб. науч. Тр. Научно-практического семинара с международным участием «Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности», Ульяновск. – 2011. – С. 152-156.

7. **Ронжин, Н.О.** Разработка стабильной люминесцентной тест-системы многоазового действия на основе комплекса наноалмаз-люцифераза и органической матрицы / Н.О. Ронжин, К.А. Харин, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Сборник научных работ Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», Ярославль. – 2009. – С. 98-99.

8. **Ронжин, Н.О.** О возможности создания индикаторной тест-системы многоазового действия с использованием комплекса наноалмаз-люцифераза и полимерной матрицы / Н.О. Ронжин, К.А. Харин, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Материалы научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных-физиков НКСФ-XXXVIII, Красноярск. – 2009. – С. 135-139.

9. **Ронжин, Н.О.** Выделение и очистка люциферазы в объёме с помощью наноалмазов детонационного синтеза / Н.О. Ронжин, К.А. Харин, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Материалы научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных-физиков НКСФ-XXXVII, Красноярск. – 2008. – С. 113-117.