

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПОКРЫТИЯ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ НА КОЛЛОИДНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ В РАСТВОРАХ ТРАНСФЕРРИНА

Воротнов А.Д.¹, Цареградская А.И.¹, Лианг Л.³, Юдинцев А.В.¹, Костюк А.Б.¹, Звягин А.В.¹⁻³

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: a.r.t.e.s@mail.ru

² Сеченовский университет
ул. Трубецкая, 8, г. Москва, 119991, РФ

³ Университет Маккуори
Балаклава-роуд, 2109, г. Сидней, Австралия

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Коллоидная стабильность наночастиц (НЧ) играет ключевую роль в их успешном применении в различных биомедицинских приложениях. Насколько бы хорошо не были изучены их свойства в идеализированных условиях, все может кардинально измениться при взаимодействии с биологическими объектами. В живом организме НЧ в первую очередь встречают белки, которые формируют на их поверхности так называемую белковую корону. Хотя в большинстве случаев НЧ взаимодействуют со множеством белков одновременно, по-прежнему актуальными являются исследования взаимодействия НЧ с отдельными белками, а также последствий, к которым они приводят. В данной работе было исследовано влияние поверхностного покрытия наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ) на коллоидную стабильность в растворах трансферрина (Тф). Показано, что в случае положительно заряженных НАФ-ПЭИ, Тф играет роль коагулянта и приводит к выпадению НЧ в осадок. В то время как коллоидная стабильность отрицательно заряженных НАФ-ПАК зависит от числа молекул Тф, приходящихся на одну НЧ. Так при избытке Тф в растворе наблюдается образование монослоя белка на поверхности НАФ-ПАК, который обеспечивает их коллоидную стабильность и может быть использован при разработке тераностических агентов, способных преодолеть гемато-энцефалический барьер.

Ключевые слова: белковая корона, антистоксовые нанопосфосфоры, трансферрин, флуоресцентная корреляционная спектроскопия, агрегация.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие неуклонно растет число публикации по «белковой короне» - слое белка, адсорбированного на поверхности наночастиц (НЧ) различной природы [1], что свидетельствует о высоком интересе исследователей к данной теме. Однако, данная тематика практически не охватывает новый класс неорганических фотолуминесцентных НЧ – наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ). Благодаря своим уникальным фотофизическим свойствам [2], низкой цитотоксичности [3, 4], возможности изменения характеристик на этапе синтеза и модификации поверхности, они могут использоваться в различных областях биомедицины: оптической визуализации [5], тераностике [6], фотодинамической терапии [7], доставке лекарств [8] и др.

В общем случае, непосредственно после введения в биологическую среду, происходит активное взаимодействие НЧ с окружающими белками с последующим формированием белковой короны. При этом свойства комплексов НЧ-белок зависят от множества параметров, таких как: размер, форма, шероховатость и химические свойства поверхности НЧ, а также от концентраций и типов белков, находящихся в среде. В дальнейшем, адсорбированный белковый слой играет ключевую роль в клеточной интернализации, биораспределении, выведении из организма и токсичности. Так, образование белковой короны на поверхности тераностических комплексов на платформе НЧ способно изменить заранее заданные свойства последних и повлиять на эффективность направленной доставки данных комплексов к целевым клеткам [9]. Именно поэтому, понимание процессов формирования белковой короны на поверхности НАФ является ключевым для эффективного и безопасного применения данного типа частиц.

Коллоидная стабильность НАФ является одним из наиболее важных свойств, которые могут изменяться при взаимодействии с белками. На данный момент влияние различных белков на стабильность НЧ остается недостаточно изученным. В то время как одни исследователи наблюдают коллоидную стабильность НЧ при образовании белковой короны [10-12], другие сообщают о кластеризации или агрегации частиц [13-15].

Для исследования образования белковой короны на поверхности НЧ применяется широкий спектр методов [16], большинство из которых нуждается в очистке образца от слабо связанных белков (называемых «протеиновое облако») перед измерением, что вносит искажения в получаемые результаты. Указанного недостатка лишен метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) [17], который позволяет количественно анализировать адсорбцию белков непосредственно в биологической среде, содержащей, как

адсорбированные, так и слабосвязанные с НЧ белки. ФКС является одним из методов *in situ*, позволяющим измерять с точностью до субнанометра увеличение гидродинамического радиуса (R_h) НЧ при формировании белковой короны.

В данной работе при помощи ФКС было проведено исследование влияния поверхностного покрытия НАФ на их коллоидную стабильность при инкубации с растворами трансферрина (Тф). Выбор Тф был обусловлен тем, что он является одним из самых распространенных гликопротеинов крови и отвечает за транспорт железа в кровеносной системе. Кроме того, Тф интернализуется путем специфического взаимодействия со своим родственным рецептором на клеточной мембране и может быть использован в качестве направляющего лиганда для модификации терапевтических НЧ [18, 19] или контрастирующих веществ [20].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и поверхностная модификация НАФ. В работе были использованы НАФ, представляющие собой гексагональные нанокристаллы NaYF_4 , легированные 20 ат. % Yb^{3+} и 8 ат. % Tm^{3+} . Описание методики синтеза НАФ приведено в работе [21]. Для придания НАФ положительного и отрицательного поверхностного заряда они были покрыты полимерами: полиэтиленимином (ПЭИ) и полиакриловой кислотой (ПАК), соответственно. Для этого, лиганды олеиновой кислоты на поверхности НАФ были удалены при помощи NOBF_4 [22]. 5 мл раствора НАФ в циклогексане (5 мг/мл) смешивали с 5 мл N,N-диметилформамидного (ДМФА) раствора NOBF_4 (0,01 М), которые затем перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После этого, НАФ центрифугировали, повторно диспергировали в ДМФА и флокулировали со смесью толуола и циклогексана (1/1). Далее, НАФ были дважды промыты в этаноле и диспергированы в 5 мл этанола. Так же, 100 мг ПЭИ были разведены в 5 мл этанола и смешаны с ранее полученным раствором НАФ в этаноле при интенсивном перемешивании в течение 24 ч при комнатной температуре. Наконец, несвязанные молекулы ПЭИ были удалены путем центрифугирования, после чего НАФ-ПЭИ промывались в этаноле и дважды в дистиллированной воде. НАФ-ПАК были синтезированы по той же методике, за исключением добавления 25 мл раствора ПАК в этаноле (4 мг/мл) вместо ПЭИ. Реакцию замещения лигандов ПАК проводили при 80 °С при перемешивании в течение 3 ч. Конечный продукт НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК диспергировали в воде (1 мг/мл) для хранения.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). ПЭМ изображения НАФ после синтеза, а также после покрытия их поверхности ПАК и ПЭИ, были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа Philips CM10 при ускоряющем напряжении 100 кВ. Капли объемом 5 мкл растворов НАФ в циклогексане, НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК в воде были нанесены на медные решетки, покрытые углеродом, после чего высушены при комнатной температуре.

Динамическое рассеяние света (ДРС) и лазерная доплеровская велосиметрия (ЛДВ). Измерения R_h и дзета-потенциала НЧ были выполнены на системе Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания), оснащенной 633-нм He-Ne лазером. Измерения размеров НАФ были проведены методом ДРС в полистирольных кюветах (Sarstedt AG & Co. KG, Германия). Размеры анализировались на основе данных о распределении размеров НАФ по числу частиц. Измерения дзета-потенциала были выполнены методом ЛДВ в одноразовых U-образных капиллярных кюветах DTS1070 (Malvern Panalytical, Великобритания).

Приготовление растворов Тф. Исходный раствор Тф был получен путем смешивания 20 мг лиофилизированного порошка Тф из человеческой плазмы крови (кат. № 90190, Sigma-Aldrich) с 0,5 мл физиологического раствора (ФР) (рН 7,0-7,5, кат. № R010п, ПанЭко). Далее раствор Тф пропускать через 0,22 мкм мембранный фильтр для удаления агрегатов. Концентрация Тф в получившемся растворе была определена методом ВСА. Все последующие разведения растворов Тф до концентраций 300, 30, 3, 0,3, 0,03 и 0,003 мкМ выполнялись с помощью добавления ФР.

Инкубация НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ с Тф. Перед инкубацией с растворами Тф водные растворы НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК подвергались очистке от агрегатов. Для этого пробирки с водными растворами НАФ озвучивали в течение 30 минут в ультразвуковой ванне G112SP1T (Avanti, США), а затем центрифугировали при 0,5 г в течение 20 минут на центрифуге 5418 R (Eppendorf, Германия). После чего из пробирок отбирался супернатант НАФ, который в дальнейшем использовался для проведения инкубации с растворами Тф.

Водные растворы НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК смешивались с растворами Тф в равных объемах таким образом, чтобы концентрация белка в конечных растворах составляла 150, 15, 1,5, 0,15, 0,015 и 0,0015 мкМ, а концентрация НАФ - 0,4 мкм⁻³ для всех растворов. Кроме того, для контроля, водные растворы НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ были смешаны с деионизованной водой и ФР. Инкубация образцов производилась в течение 10 минут при температуре 21 °С.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС). Эксперименты ФКС проводились на инвертированном лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Германия), оснащенный системой счета одиночных фотонов с временной корреляцией (TCSPC) (Simple-Tau 152, Becker & Hickl GmbH, Германия). НАФ возбуждались с помощью Ti:Sa фемтосекундного лазера Chameleon Vision II (Coherent, США) на длине волны 975 нм, путем фокусировки излучения внутри растворов с помощью водно-иммерсионного объектива (C-Apochromat 63x / 1,2w Corr, Carl Zeiss, Германия). Фотолуминесценция (ФЛ) НАФ собиралась тем же объективом, проходила через дихроичное зеркало (ZT1064rdc-sp, Chroma, США) и краевой коротковолновый фильтр (FF01-890/SP, Semrock, США) на недесканирующий порт микроскопа. Затем

свет разделялся с помощью дихроичного зеркала (FF552-Di02, Semrock, США) и с помощью полосового фильтра (FF01-466/40, Semrock, США) выделялся диапазон 446-486 нм. После этого ФЛ НАФ регистрировалась с помощью точечного гибридного детектора HPM-100-40 (Becker&Hickl GmbH, Германия). Фотоны были записаны с помощью карты SPC-150 (Becker & Hickl GmbH, Germany) в FIFO (first in, first out) режиме. Все измерения проводились в лаборатории при контролируемой температуре 21 °С, используя среднюю мощность возбуждения ~ 840 мкВт на образце. Исследуемые образцы помещались в отдельные лунки 96 луночного планшета с прозрачным дном из покровного стекла толщиной 170 мкм (кат. № 0030741030, Eppendorf). Фокальная плоскость была установлена на глубине 240 мкм от поверхности покровного стекла внутри растворов, чтобы избежать засветки детектора ярким сигналом, исходящим от агрегатов НАФ осевших на дно лунки планшета за время инкубации (10 минут).

Определение наблюдаемого объема ($V_{\text{наб}}$) было выполнено путем получения 3D изображений ФЛ НАФ-ПЭИ, нанесенных на поверхность покровного стекла [23]. Возбуждение осуществлялось на длине волны 975 нм, ФЛ НАФ регистрировалась в диапазоне 446-486 нм.

3D изображения ФЛ НАФ представляют собой $V_{\text{наб}}$, который хорошо описывается трехмерной функцией Гаусса [24]:

$$G(x, y, z) = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2+y^2)}{r_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{z_0^2}\right), \quad (1)$$

где I_0 – максимальное значение интенсивности ФЛ, r_0 и z_0 соответствуют латеральному радиусу и половине высоты, на которых значение интенсивности ФЛ составляет $1/e^2$ от I_0 . При этом $V_{\text{наб}} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$.

Путем аппроксимации ортогональных проекций XY и XZ профилей интенсивности ФЛ НАФ были получены значения r_0 и z_0 , с помощью которых был определен $V_{\text{наб}}$.

Анализ данных ФКС. Автокорреляционные кривые рассчитывались с помощью программного обеспечения SPCM (Becker & Hickl GmbH, Германия). Для каждого образца были получены 5 автокорреляционных кривых, которые затем аппроксимировались автокорреляционной функцией для случая 3D диффузии частиц одного типа:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_d}\right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (2)$$

где N – среднее число частиц в $V_{\text{наб}}$, τ_d – время диффузии частиц через $V_{\text{наб}}$, $s = \frac{z_0}{r_0}$.

Таким образом, были получены N и τ_d НАФ при фиксированном значении $s = 3,1$, которое было определено при калибровке $V_{\text{наб}}$. Используя связь τ_d с коэффициентом диффузии (D):

$$\tau_d = \frac{r_0^2}{4D}, \quad (3)$$

были рассчитаны R_h НАФ через соотношение Стокса-Эйнштейна:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (4)$$

где k – постоянная Больцмана, T – температура, η – коэффициент вязкости раствора при заданной температуре.

Изменения вязкости растворов при увеличении концентрации Тф были учтены с помощью линейного приближения вклада растворенного вещества в вязкость каждого из растворов через характеристическую вязкость Тф $[\eta] = 4,4 \text{ см}^3 \text{ г}^{-1}$ [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате синтеза НАФ были получены преимущественно сферические НЧ как видно на ПЭМ изображении (рис. 1А). Анализ ПЭМ изображений НАФ после синтеза показал, что распределение частиц монодисперсное, со средним диаметром $21,7 \pm 0,2$ нм. Кроме того, частицы распределены в поле зрения равномерно и ни что не указывает на их агрегацию. В случае НАФ-ПАК на ПЭМ изображении (рис. 1Б) наблюдается «скупенность» частиц, которая, как мы предполагаем, обусловлена их кластеризацией. Аналогичное поведение НАФ прослеживается и для случая модификации поверхности слоем ПЭИ, как видно из рисунка 1В. Поэтому для осаждения крупных агрегатов НАФ нами была проведена предварительная подготовка образцов, которая заключалась в озвучивании, центрифугировании и отборе супернатанта.

Измерение R_h методом ДРС показало, что средний радиус кластеров НАФ после обработки равен $23,8 \pm 1,2$ нм. Учитывая толщину полимерного покрытия НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ, которая составляет ~ 2 нм, как видно на вставках рисунков 1Б и 1В, можно заключить, что в результате предварительной подготовки в водных растворах остались фракции частиц, преимущественно состоящие из кластеров НАФ, содержащих от 2

до 5 частиц. Несмотря на это, полученные водные растворы НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ оставались коллоидно стабильными как минимум в течение месяца, согласно данным полученным методом ФКС. Вероятно, высокую коллоидную стабильность кластеров НАФ в водном растворе обеспечивали высокие положительные $56,5 \pm 1,1$ мВ и отрицательные $-33,1 \pm 0,4$ мВ значения дзета-потенциалов НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК, соответственно.

Однако, в ФР для обоих типов НАФ была выражена кластеризация частиц, которая заключалась в увеличении R_h и уменьшении N в наблюдаемом объеме (рисунок 2 и 3). Вероятно, склонность НАФ к агрегации в ФР вызвана полярностью молекул NaCl, находящихся в растворе, и поверхностным зарядом самих НЧ, что приводит к сильным электростатическим взаимодействиям между ними.

Нами также было проведено исследование влияния поверхностного покрытия НАФ на коллоидную стабильность частиц в растворах Тф с концентрациями от 1,5 нМ до 150 мкМ. Мы обнаружили, что инкубация НАФ-ПАК с растворами Тф не приводит к монотонному увеличению гидродинамического радиуса с выходом на насыщение при увеличении концентрации белка, как это было показано для FePt, частиц группой Nienhaus [11, 26]. Вместо этого, при инкубации НАФ-ПАК с растворами Тф (рис. 2) при концентрации белка 150 нМ наблюдается скачкообразное увеличение гидродинамического радиуса и уменьшение числа частиц в наблюдаемом объеме, что свидетельствует об образовании агрегатов частиц. В тоже время, при дальнейшем увеличении концентрации белка наблюдается стабилизация R_h и N . При концентрации Тф 150 мкМ на поверхности НЧ образуется монослой белка толщиной 5,3 нм, что хорошо согласуется с геометрическими размерами Тф ($4,2 \times 10 \times 7$ нм³) [11].

Полученные результаты хорошо описываются моделью, предложенной Cukalevski et al.[14]. Согласно данной модели можно выделить четыре режима адсорбции белка.

Первый режим реализуется при малых концентрациях белка. При этом адсорбированный на поверхности белок может служить «мостиком» между двумя частицами, связывая их друг с другом. В данном случае раствор будет состоять из небольших агрегатов и свободных частиц.

Во втором режиме, при дальнейшем увеличении концентрации происходит активное присоединение белка на большую часть поверхности НЧ. При этом, белок на поверхности одной частицы способен связаться с несколькими частицами. Как следствие данный процесс приводит к образованию крупных агрегатов. В нашем случае, данный режим достигается при концентрации Тф 150 нМ и сопровождается выпадением крупных агрегатов в осадок, которые можно наблюдать в проходящем свете на дне лунки планшета (рис. 2В, агрегаты отмечены белыми стрелками).

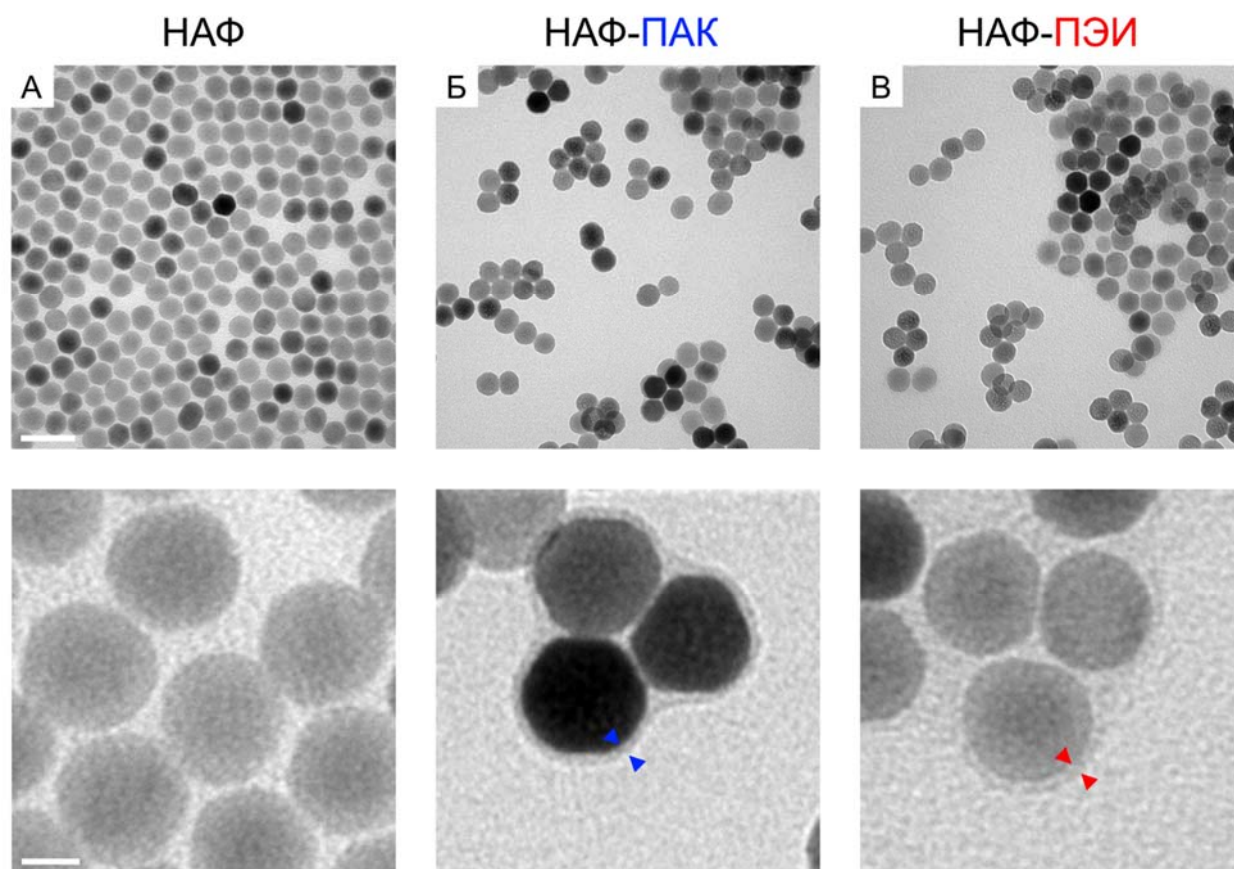


Рисунок 1. ПЭМ изображения НАФ после синтеза (А), а также после покрытия их поверхности ПАК (Б) и ПЭИ (В). Масштабный отрезок 50 нм. На вставках снизу приведены увеличенные ПЭМ изображения, отображающие толщины полимерных покрытий ПАК и ПЭИ, отмеченных синими и красными стрелками, соответственно. Масштабный отрезок 10 нм

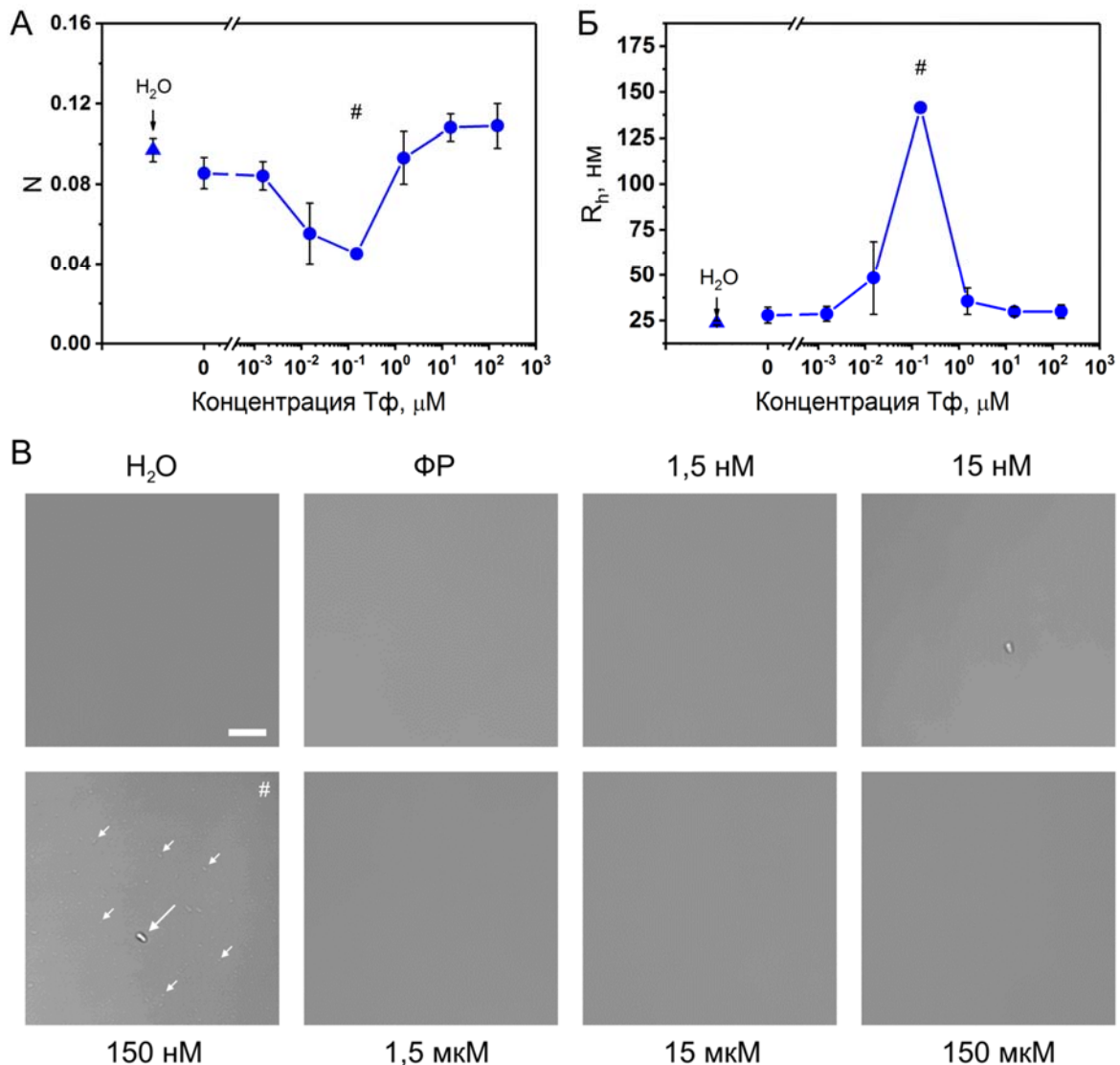


Рисунок 2. Инкубация в течение 10 минут НАФ-ПАК с Тφ в различных концентрациях при 21 С. Число частиц НАФ-ПАК в наблюдаемом объеме (А) и их гидродинамический радиус (Б) в зависимости от типа раствора и концентрации Тφ. Решеткой (#) отмечена концентрация Тφ, для которой наблюдалась значительная агрегация НАФ-ПАК, сопровождаемая большим разбросом значений R_h . Изображения дна лунки планшета в проходящем свете с растворами НАФ-ПАК в воде, ФР и растворах Тφ при различных концентрациях (В). Решеткой (#) отмечено изображение, соответствующее концентрации Тφ в растворе при которой наблюдалась наибольшая агрегация НАФ-ПАК. Белыми стрелками отмечена небольшая часть агрегатов, которые выпали в осадок на дно лунки планшета. Масштабный отрезок 5 мкм

В третьем режиме, при еще больших концентрациях, белок начинает покрывать значительную часть поверхности НЧ, что снижается вероятность связи двух частиц посредством белка и приводит к появлению небольших агрегатов.

В четвертом режиме в условиях большого избытка белка происходит быстрое покрытие НАФ слоем белка, который опосредует дальнейшее взаимодействие частиц. Аналогичное поведение наблюдалось в работе [15], где НЧ золота диаметром 20 нм инкубировали с различными белками: человеческим сывороточным альбумином, аполипопротеином А1, фибриногеном и иммуноглобулином G.

При инкубации НАФ-ПЭИ с Тφ наблюдается иной характер образования белковой короны (рис. 3). Как и в случае НАФ-ПАК на средних концентрациях Тφ (150 нМ) наблюдается скачкообразное увеличение R_h и уменьшение N . Однако, при дальнейшем увеличении концентрации белка коллоидной стабильности НАФ-ПЭИ не наблюдается, а происходит выпадение крупных кластеров НАФ-ПЭИ в осадок, которые легко визуализируются на дне лунки планшета (рис. 3В). Предположительно это связано с разворачиванием структуры Тφ после присоединения его к одной частице, с последующей возможностью связаться со второй частицей образуя кластер, увеличивающийся в размерах во всех направлениях по мере присоединения других молекул белка. При этом стабилизации НАФ-ПЭИ в растворах с высокими концентрациями Тφ не происходит, а белок играет роль коагулянта.

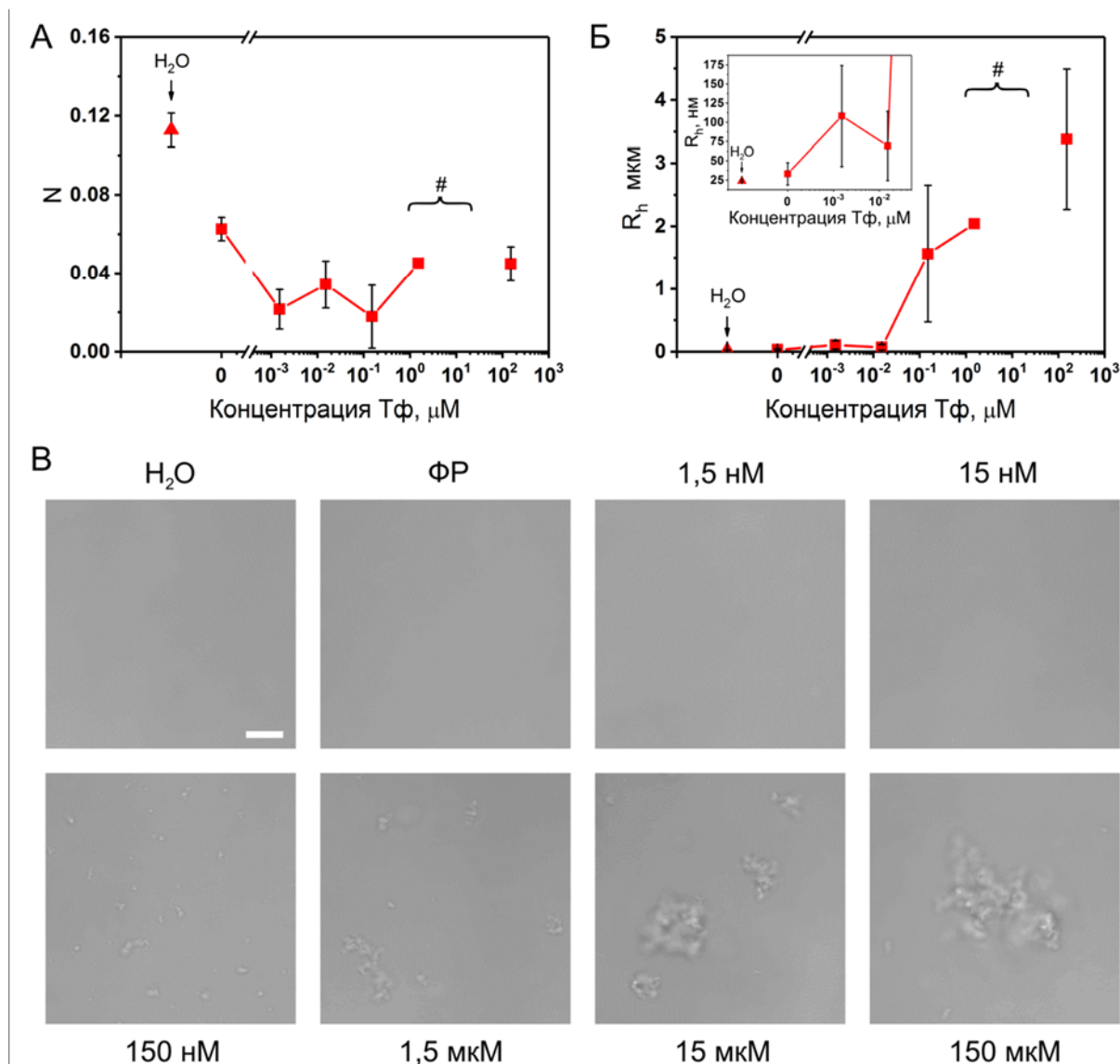


Рисунок 3. Инкубация в течение 10 минут НАФ-ПЭИ с Тф в различных концентрациях при 21 С. Число частиц НАФ-ПЭИ в наблюдаемом объеме (А) и их гидродинамический радиус (Б) в зависимости от типа раствора и концентрации Тф. Решеткой (#) отмечены концентрации Тф, для которой либо наблюдалась значительная агрегация НАФ-ПЭИ, сопровождаемая большим разбросом значений R_h , либо значения N и R_h не были получены вследствие выпадения агрегатов в осадок. На вставке графика (Б) приведен увеличенный масштаб для малых концентраций Тф. Изображения дна лунок планшета в проходящем свете с растворами НАФ-ПАК в воде, ФР и растворах Тф при различных концентрациях (В). Масштабный отрезок 5 мкм

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии было проведено исследование влияние поверхностного покрытия наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ) на коллоидную стабильность в растворах трансферрина (Тф). Показано, что, несмотря на кластеризацию, происходящую на стадии покрытия поверхности НАФ полимерами, они сохраняют стабильность в водном растворе в течение длительного времени. Обнаружено, что коллоидная стабильность отрицательно заряженных НАФ-ПАК зависит от числа молекул Тф, приходящихся на одну НЧ. При высоких концентрациях Тф на поверхности НАФ-ПАК образуется монослой белка, который обеспечивает их коллоидную стабильность и может быть использован при разработке тераностических агентов, способных преодолеть гемато-энцефалический барьер. В случае положительно заряженных НАФ-ПЭИ, Тф играет роль коагулянта и приводит к выпадению НЧ в осадок.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00723).

Список литературы / References:

1. Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 2009, vol. 8, no. 7, pp. 543-557. DOI: 10.1038/nmat2442.
2. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. Upconversion nanoparticles and their hybrid assemblies for biomedical applications. *Russian Chemical Reviews*, 2016, vol. 85, no. 12, pp. 1277-1296. DOI: 10.1070/rcr4663.
3. Gu Z.J., Yan L., Tian G., Li S.J., Chai Z.F., Zhao Y.L. Recent Advances in Design and Fabrication of Upconversion Nanoparticles and Their Safe Theranostic Applications. *Advanced Materials*, 2013, vol. 25, no. 28, pp. 3758-3779. DOI: 10.1002/adma.201301197.
4. DaCosta M.V., Doughan S., Han Y., Krull U.J. Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2014, vol. 832, pp. 1-33. DOI: 10.1016/j.aca.2014.04.030.
5. Zhao L., Kutikov A., Shen J., Duan C.Y., Song J., Han G. Stem Cell Labeling using Polyethylenimine Conjugated (α -NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ Upconversion Nanoparticles. *Theranostics*, 2013, vol. 3, no. 4, pp. 249-257. DOI: 10.7150/thno.5432.
6. Chen G.Y., Qiu H.L., Prasad P.N., Chen X.Y. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chemical Reviews*, 2014, vol. 114, no. 10, pp. 5161-5214. DOI: 10.1021/cr400425h.
7. Fan W.P., Bu W.B., Shi J.L. On The Latest Three-Stage Development of Nanomedicines based on Upconversion Nanoparticles. *Advanced Materials*, 2016, vol. 28, no. 21, pp. 3987-4011. DOI: 10.1002/adma.201505678.
8. Liu B., Chen Y.Y., Li C.X., He F., Hou Z.Y., Huang S.S., Zhu H.M., Chen X.Y., Lin J. Poly(Acrylic Acid) Modification of Nd³⁺-Sensitized Upconversion Nanophosphors for Highly Efficient UCL Imaging and pH-Responsive Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*, 2015, vol. 25, no. 29, pp. 4717-4729. DOI: 10.1002/adfm.201501582.
9. Salvati A., Pitek A.S., Monopoli M.P., Prapainop K., Bombelli F.B., Hristov D.R., Kelly P.M., Aberg C., Mahon E., Dawson K.A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotechnology*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. 137-143. DOI: 10.1038/nnano.2012.237.
10. Rucker C., Potzl M., Zhang F., Parak W.J., Nienhaus G.U. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2009, vol. 4, no. 9, pp. 577-580. DOI: 10.1038/nnano.2009.195.
11. Jiang X., Weise S., Hafner M., Rucker C., Zhang F., Parak W.J., Nienhaus G.U. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, vol. 7, pp. S5-S13. DOI: 10.1098/rsif.2009.0272.focus.
12. Gebauer J.S., Malissek M., Simon S., Knauer S.K., Maskos M., Stauber R.H., Peukert W., Treuel L. Impact of the Nanoparticle-Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure. *Langmuir*, 2012, vol. 28, no. 25, pp. 9673-9679. DOI: 10.1021/la301104a.
13. Bharti B., Meissner J., Findenegg G. H. Aggregation of Silica Nanoparticles Directed by Adsorption of Lysozyme. *Langmuir*, 2011, vol. 27, no. 16, pp. 9823-9833. DOI: 10.1021/la201898v.
14. Cukalevski R., Ferreira S.A., Dunning C.J., Berggard T., Cedervall T. IgG and fibrinogen driven nanoparticle aggregation. *Nano Research*, 2015, vol. 8, no. 8, pp. 2733-2743. DOI: 10.1007/s12274-015-0780-4.
15. Ho Y.T., Azman N.A., Loh F.W.Y., Ong G.K.T., Engudar G., Kriz S.A., Kah J.C.Y. Protein Corona Formed from Different Blood Plasma Proteins Affects the Colloidal Stability of Nanoparticles Differently. *Bioconjugate Chemistry*, 2018, vol. 29, no. 11, pp. 3923-3934. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00743.
16. Huhn J., Fedeli C., Zhang Q., Masood A., del Pino P., Khashab N.M., Papini E., Parak W.J. Dissociation coefficients of protein adsorption to nanoparticles as quantitative metrics for description of the protein corona: A comparison of experimental techniques and methodological relevance. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, vol. 75, pp. 148-161. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.12.015.
17. Shang L., Nienhaus G.U. In Situ Characterization of Protein Adsorption onto Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 2017, vol. 50, no. 2, pp. 387-395. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00579.
18. Wang Z.Q., Tian Z.M., Dong Y., Li L., Tian L., Li Y.Q., Yang B.S. Nanodiamond-conjugated transferrin as chemotherapeutic drug delivery. *Diamond and Related Materials*, 2015, vol. 58, pp. 84-93. DOI: 10.1016/j.diamond.2015.06.008.
19. Deshpande P., Jhaveri A., Pattni B., Biswas S., Torchilin V. Transferrin and octaarginine modified dual-functional liposomes with improved cancer cell targeting and enhanced intracellular delivery for the treatment of ovarian cancer. *Drug Delivery*, 2018, vol. 25, no. 1, pp. 517-532. DOI: 10.1080/10717544.2018.1435747.
20. Wang D., Zhu L., Pu Y., Wang J.X., Chen J.F., Dai L.M. Transferrin-coated magnetic upconversion nanoparticles for efficient photodynamic therapy with near-infrared irradiation and luminescence bioimaging. *Nanoscale*, 2017, vol. 9, no. 31, pp. 11214-11221. DOI: 10.1039/c7nr03019c.
21. Zhao J.B., Jin D.Y., Schartner E.P., Lu Y.Q., Liu Y.J., Zvyagin A.V., Zhang L.X., Dawes J.M., Xi P., Piper J.A., Goldys E.M., Monro T.M. Single-nanocrystal sensitivity achieved by enhanced upconversion luminescence. *Nature Nanotechnology*, 2013, vol. 8, no. 10, pp. 729-734. DOI: 10.1038/nnano.2013.171.

22. Dong A. G., Ye X. C., Chen J., Kang Y. J., Gordon T., Kikkawa J. M., Murray C. B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol. 133, no. 4, pp. 998-1006. DOI: 10.1021/ja108948z.
23. Ruttinger S., Buschmann V., Kramer B., Erdmann R., Macdonald R., Koberling F. Comparison and accuracy of methods to determine the confocal volume for quantitative fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Microscopy*, 2008, vol. 232, no. 2, pp. 343-352. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2008.02105.x.
24. Wehry E. L. Principles of fluorescence spectroscopy - Lakowicz, Jr. *American Scientist*, 1984, vol. 72, no. 4, pp. 395-396.
25. Armstrong J. K., Wenby R. B., Meiselman H. J., Fisher T. C. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophysical Journal*, 2004, vol. 87, no. 6, pp. 4259-4270. DOI: 10.1529/biophysj.104.047746.
26. Mahmoudi M., Abdelmonem A. M., Behzadi S., Clement J. H., Dutz S., Ejtehadi M. R., Hartmann R., Kantner K., Linne U., Maffre P., Metzler S., Moghadam M. K., Pfeiffer C., Rezaei M., Ruiz-Lozano P., Serpooshan V., Shokrgozar M. A., Nienhaus G. U., Parak W. J. Temperature: The "Ignored" Factor at the NanoBio Interface. *Acs Nano*, 2013, vol. 7, no. 8, pp. 6555-6562. DOI: 10.1021/nn305337c.

EFFECT OF THE SURFACE COATING OF UPCONVERSION NANOPARTICLES ON THE COLLOIDAL STABILITY IN TRANSFERRIN SOLUTIONS

Vorotnov A.D.¹, Tsaregradskaya A.I.¹, Liang L.³, Yudin A.V.¹, Kostyuk A.B.¹, Zvyagin A.V.^{1,3}

¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

Gagarina prosp., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: a.r.t.e.s@mail.ru

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Trubetskaya str., 8/2, Moscow, 119991, Russia

³Macquarie University

Balaclava Road, 2109, Sydney, Australia

Abstract. The colloidal stability of nanoparticles (NPs) plays a key role in their successful usage in various biomedical applications. No matter how well their properties are studied under idealized conditions, everything can change dramatically while interacting with biological objects. In a living organism, NPs are primarily met by proteins, which form a so-called protein corona on their surface. Although in most cases NPs interact with many proteins simultaneously, studies of the interactions of NPs with individual proteins, as well as the consequences to which they lead, are still relevant. In this work, the effect of the surface coating of upconversion nanoparticles (UCNPs) on colloidal stability in transferrin (Tf) solutions was investigated. It is shown that in case of positively charged UCNP-PEI, Tf plays the role of a coagulant and leads to the precipitation of NPs. At the same time, the colloidal stability of negatively charged UCNP-PAA depends on the number of Tf molecules per one NP. So with an excess of Tf in the solution, a monolayer of protein is observed on the surface of UCNP-PAA, which ensures their colloid stability and can be used in the development of theranostics agents capable of overcoming the blood-brain barrier.

Key words: protein corona, upconversion nanoparticles, transferrin, fluorescence correlation spectroscopy, aggregation.