



УДК 543.38: 543.9

Синтез и иммобилизация липосом на основе фосфатидилхолина и пальмитиновой кислоты на поверхности электрода пьезокварцевого сенсора

Федерякина М.А., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Поступила в редакцию 22.09.2014 г.

Исследованы условия получения нормальных липосом на основе фосфатидилхолина и пальмитиновой кислоты фиксированного размера. Показано влияние концентрации и природы ПАВ, продолжительности ультразвукового диспергирования на размер и дисперсность синтезируемых липосом. Оптимизированы условия иммобилизации липосом на поверхности золотого электрода пьезокварцевого сенсора. Показано, что иммобилизация биотинилированных липосом на силосановую подложку, активированную глутаровым альдегидом и авидином приводит к получению наиболее устойчивых слоев, сохраняющих активность в течение 30 суток.

Ключевые слова: липосомы, фосфатидилхолин, пальмитиновая кислота, авидин, биотин, пьезокварцевый сенсор, иммобилизация

Synthesis and immobilization of liposomes on the basis of phosphatidylcholine and palmitic acid on the electrode surface of the piezoelectric sensor

Federjakina M.A., Ermolaeva T.N.

Lipetsk State Technical University, Lipetsk

The conditions of synthesizing normal liposomes of the fixed size on the basis of phosphatidylcholine and palmitic acid were investigated and the regularity of their immobilization on the surface of electrodes of piezoelectric sensors are studied. It is shown that the dehydration and rehydration method with the subsequent ultrasonic dispersing during 1 h in the presence of Triton X 100 in the mass relation to lipid 1:800 is most suitable for receiving monodisperse fractions of liposomes with the diameter of 61 ± 4 nm. Various technologies of fixing liposomes or biotinylated liposomes on the surface of the sensor are compared and the quality of the obtained coverings is investigated by QCM and AFM methods. It is shown that optimum values of mass ($1,47 \pm 0,03$ mkg), surface roughnesses (124 ± 13 nm) and the maximum stability (for 30 days) characterize flat layers of the liposomes immobilized on the silane substrate activated by glutaraldehyde through the avidin-biotin complex. The obtained results can be used when forming the receptor layer of piezoelectric sensors and will allow to expand the circle of the defined connections significantly.

Keywords: liposomes, phosphatidylcholine, palmitic acid, avidin, biotin, piezoelectric sensor, immobilization

Введение

Липосомы или липидные везикулы – самоорганизованные структуры, образованные одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными слоями [1]. Стабилизированные липосомы размером 5—50 микрон, состоящие из

природных или искусственных фосфолипидов, находят применение в медицине в качестве средств доставки фармакологически активных соединений к клеткам-мишеням. Заслуживает упоминания их использование для диагностических и аналитических целей. В ядро липосомы можно включать различные радиоактивные, рентгеноконтрастные, парамагнитные вещества, а также вещества, отражающие ультразвук, улучшающие качество изображений в таких распространенных методах диагностики, как компьютерная томография, рентгенография и ультразвуковое зондирование [2]. Особенности строения липидных везикул и их уникальные свойства объясняют перспективность их применения во всех наиболее значимых методах идентификации и определения веществ самой разнообразной химической природы. Интерес к аналитическому использованию липосом растет, и как показывают многочисленные статьи и обзоры, в настоящее время они уже используются в жидкостной хроматографии и капиллярном электрофорезе, иммуноанализе, биосенсорах [3-5]. Значительный интерес представляет применение липосом в пьезокварцевых сенсорах для создания распознающего слоя из липидных везикул [6, 7], для сэндвич-определения аналита, связанного с липосомами – утяжелителями непосредственно или через субчастицы, например, нуклеотиды или антигены [8], в частности для определения в сэндвич-формате токсинов холеры [9]. Кроме того, пьезокварцевые сенсоры могут быть использованы для изучения взаимодействия между липосомами и твердыми поверхностями, что может сообщить новый импульс исследованиям в области иммунодиагностики, капиллярного электрофореза, поскольку информация, полученная из научной литературы зачастую противоречива. Несоответствия, возможно, связаны с изменчивостью липосомы при синтезе и адсорбции на разнородной поверхности.

Применение липосом на стадии иммобилизации приводит к получению как гидрофильных, так и гидрофобных поверхностей, что позволяет существенно расширить круг определяемых с помощью пьезокварцевого сенсора соединений.

Целью настоящего исследования является изучение закономерностей образования нормальных липосом на основе фосфатидилхолина и пальмитиновой кислоты, а также исследование возможности их использования в пьезокварцевых сенсорах.

Эксперимент

Реактивы и оборудование. В работе использовали следующие растворители: этанол, диэтиловый эфир (Реахим, Россия), ацетон, диоксан (Вектон, Россия), хлороформ (Sigma-Aldrich, США), димексид (Марбиофарм, Россия).

Для синтеза и иммобилизации липосом применяли фосфатидилхолин со степенью чистоты 76% (препарат «Эссенциале форте», Испания), α -токоферол (NSP, США), Triton X 100 (MP Biomedicals, France), бромид цетилтриметиламмония (AppliChem, Германия), пальмитиновую кислоту, ч.д.а. (Реахим, Россия), α -липоевую кислоту, 2-меркаптоэтиламин гидрохлорид (МЕА), 1-этил-3- γ -аминопропил триэтоксисилан (APTES), гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), биотин и авидин, 2-этаноламин (EA), поли-L-лизина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США), глутаровый альдегид – GA (Reanal, Венгрия), NH_4Cl (х.ч. Реахим, Россия).

Для приготовления 1 л фосфатного буферного раствора (PBS) с pH 6.74 растворяли 0.12 г NaCl, 4.25 г NaH_2PO_4 , 4.05 г KH_2PO_4 (Реахим, Россия). Боратный буферный раствора (pH 8.0) получали путем растворения 0.95 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ и 1.00 г Na_3N в 1 л дистиллированной воды.

Исследование свойств покрытий, полученных при иммобилизации липосом на электроде пьезокварцевого гравиметрического сенсора [11, 12], проводилось методом атомной силовой микроскопии (SOLVER P47-PRO, ЗАО NT-MDT, Россия) и пьезокварцевого микровзвешивания на установке, включающей схему возбуждения (TTL на базе IC74LS320), цифровой модуль ДиаСкоп (Бафика, Россия) и персональный компьютер. В качестве гравиметрического сенсора применяли пьезокварцевые резонаторы АТ – среза с золотыми электродами, диаметром 8 мм и собственной частотой $10 \text{ МГц} \pm 1 \text{ Гц}$ (ЗАО ЭТНА, Москва).

Синтез «нормальных» липосом ("жирные хвосты" упрятаны внутрь, а в контакте с водным окружением находятся полярные группы фосфолипидных молекул) осуществляли введением раствора липида в легколетучем растворителе в буферный раствор (способы 1 и 2), а также путем дегидратации-регидратации (способ 3) [10]:

Способ 1 (Способ 2). К 100 мл фосфатного буферного раствора добавляли 10 мл раствора, содержащего 62 мг/мл фосфатидилхолина и 5 мг/мл пальмитиновой кислоты в этаноле (смеси этанол: диэтиловый эфир в молярном соотношении 1:1), а затем фиксированное количество ПАВ Triton X 100 (цетилтриметиламмония бромид), выдерживали в течение 2.5 ч при температуре 65°C (60°C) до полного испарения растворителя.

Способ 3. В круглодонную колбу помещали 10 мл раствора, содержащего 62 мг/мл фосфатидилхолина и 5 мг/мл пальмитиновой кислоты в смеси этанол : хлороформ в объемном соотношении 5: 95 и выдерживали 1.5 ч при температуре 55°C до образования сухой пленки липида. Для регидратации в колбу вводили 50 мл буферного раствора и фиксированное количество ПАВ (Triton X 100, цетилтриметиламмония бромид), α -токоферол (1 мг на 50 мг фосфолипида) для защиты фосфатидилхолина от окисления. Для отделения не прореагировавшего липида и крупных частиц от дисперсии липосом в ходе синтеза проводили ультрацентрифугирование (Центрифуга ЦЛН-2, Киргизия) с частотой 9000 об/мин в течение 1 ч. Дополнительная гомогенизация дисперсий липосом осуществлялась путем двукратной ультразвуковой обработки с частотой 40 кГц в течение 30 мин (с выдерживанием в промежутке при температуре 4°C) в ультразвуковой ванне ПСБ-2835-03 («ПСБ–Галс», Россия).

Средний диаметр липосом устанавливали методами турбидиметрии с применением градуировочной кривой Геллера (SPEKOL 10, Carlzeiss Jena, Германия) и методом атомно-силовой микроскопии в контактной и полуконтактной моде на воздухе на подложке из слюды.

Для получения биотилированного поли-L-лизина 300 мг биотина, 150 мг NHS и 190 мг EDC растворяли в 30 мл димексида и перемешивали в течение 1.5 ч. Затем к 50 мл раствора поли-L-лизина (1 мг/мл) в боратном буферном растворе добавляли 1.25 мл предварительно полученного раствора и перемешивали при комнатной температуре в течение еще 4 ч. В смесь вводили 1 мл 1 М раствор NH_4Cl и проводили очистку от не связавшихся реагентов методом диализа [8].

Для введения полилизинных конъюгатов в липидную мембрану к 10 мл суспензии липосом добавляли 6.25 мл поли-L-лизинного конъюгата (массовое отношение липид : конъюгат 1:10). В полученную смесь вводили 4.5 мл раствора, содержащего 17 мМ NHS и 17 мМ EDC в смеси диоксан : дистиллированная вода (объемное соотношение 9 : 1) и перемешивали в течение 0.5 часа. Затем биотин-модифицированные липосомы для гомогенизации обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин.

Иммобилизация липосом. Иммобилизация "целых" липосом на поверхности

электрода сенсора осуществлялась тремя способами.

Способ 1. На поверхность электрода дозировали 0,005 мл 5 мМ раствора МЕА в этаноле и выдерживали в парах этанола в течение 24 ч, промывали этанолом и дистиллированной водой до постоянной массы. К 5 мл дисперсии липосом (6.2 мг липида/мл) добавляли 2.5 мл раствора, содержащего 17 мМ NHS и 17 мМ EDC в смеси диоксан : дистиллированная вода в объемном соотношении 9 : 1 и выдерживали в течение 3 ч. На поверхность самоорганизованного монослоя МЕА наносили 0.015 мкл раствора липосом и кросс-реагентов и выдерживали в течение 1 ч. Для дезактивации NHS на поверхность сенсора с иммобилизованными липосомами наносили 0.01 мл 1 М раствор ЕА, выдерживали 0.5 ч и промывали дистиллированной водой.

Способ 2. На поверхности электрода наносили 0.01 мл 2.5% раствора АРТЕS в ацетоне, высушивали на воздухе и выдерживали в течение 30 мин при температуре 75°C. Затем наносили 0.015 мл 2.5 % раствора GA, через 15 мин сенсор промывали фосфатным буферным раствором и высушивали. На полученную подложку наносили 0.005 мл раствора, содержащего 17 мМ NHS и 17 мМ EDC, 0.01 мл раствора авидина (1 мг/мл) и выдерживали в течение 1 ч во влажной камере, промывали дистиллированной водой и высушивали. Далее на поверхность сенсора наносили 0.01 мл 1 М раствора ЕА и через 0.5 ч 0.01 мл биотинилированных липосом, выдерживали в течение 1ч для связывания авидина и биотина. Сенсор промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянной массы.

Способ 3. На поверхность электрода пьезокварцевого сенсора наносили 0,01 мл 5 мМ раствора α -липоевой кислоты в этаноле и выдерживали в парах этанола в течение 24 ч. На слой α -липоевой кислоты дозировали 0,01 мл раствора, содержащего 17 мМ NHS и 17 мМ EDC в смеси диоксан : дистиллированная вода в объемном отношении 9 : 1, выдерживали 3 ч во влажной камере и промывали дистиллированной водой. Затем на подложку наносили 0.01 мл раствора авидина (1 мг/мл) и выдерживали сенсор в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Для деактивации не связавшегося NHS наносили на поверхность сенсора 0.01 мл 1М раствора ЕА и выдерживали в течение 0.5 ч. На полученный слой дозировали 0.01 мл биотинилированных липосом и выдерживали в течение 1 ч. Сенсор промывали дистиллированной водой и высушивали.

Обсуждение результатов

В зависимости от способа синтеза размер липосом изменяется в достаточно широких пределах от 50 до 200 нм. Именно поэтому при синтезе монодисперсных липосом на основе фосфатидилхолина и пальмитиновой кислоты было необходимо изучить влияние концентрации и природы ПАВ, продолжительности ультразвукового диспергирования на размер и гетерогенность синтезируемых липосом. Средний диаметр липидных везикул контролировались методами атомно-силовой микроскопии и турбидиметрии. Отмечено, что размеры липосом изменяются в интервале 165-85 нм (рис.1). Образование более гомогенной фракции в способе 3 связано, прежде всего, с дополнительной стадией ультразвукового диспергирования, а также с применением смешанного органического растворителя, способствующего повышению скорости растворения фосфатидилхолина и образования более однородных липидных пленок на поверхности реакционного сосуда.

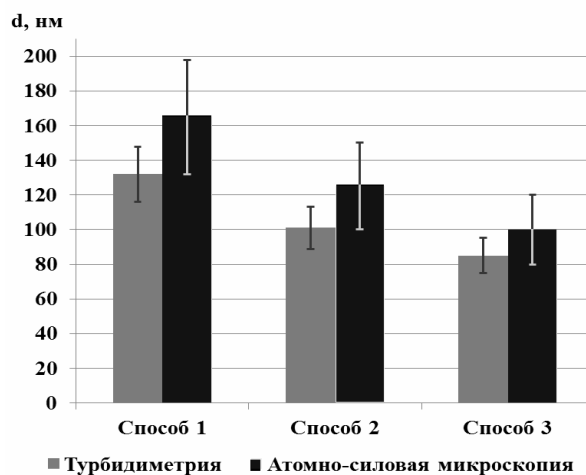


Рис. 1. Влияние способа синтеза на средний диаметр липосом d

Известно, что при продолжительной ультразвуковой обработке образуются липосомы, имеющие дефекты структуры и склонные к обратной агрегации и слиянию, поэтому для стабилизации липидных мембран везикул, полученных при ультразвуковой обработке, в систему вводят различные стабилизаторы [13]. Наиболее активно при синтезе липосом используются неионогенные и катионные ПАВ (Triton X 100 или бромид цетилтриметиламмония), поскольку они облегчают замыкание липидных бислоев вследствие наличия в составе их молекул объемной гидрофильной области и относительно небольших гидрофобных участков. Одновременное присутствие детергента и фосфатидилхолина в составе мицеллы активизирует два противоположных процесса - детергент стремится образовать структуру с более высокой кривизной поверхности, а фосфатидилхолин сохранить бислоюную организацию молекул в мембране, что приводит к замыканию липидных мембран в достаточно устойчивые структуры, стабильность которых обеспечивается присутствием ПАВ в системе.

Размеры частиц, синтезированных в присутствии ПАВ (соотношение ПАВ/фосфолипид 1:100 и 1:200, ультразвуковая обработка в течение 1 ч) свидетельствуют, что эффективность солюбилизации липидных мембран неионогенным ПАВ выше, чем при использовании катионного ПАВ, что способствует стабилизации частиц при ультразвуковом излучении (рис.2). Поэтому дальнейшие исследования проводили с использованием Triton X 100.

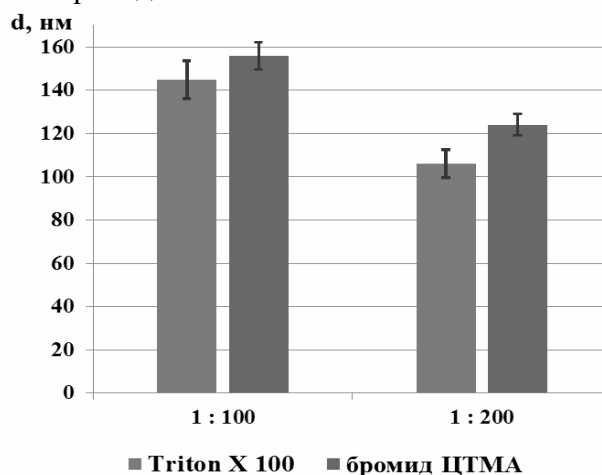


Рис. 2. Зависимость размера липидных везикул от природы введенного ПАВ, при соотношении ПАВ/фосфолипид 1:100 и 1: 200.

Применение ПАВ и продолжительность ультразвуковой обработки являются взаимодополняющими факторами, сочетание которых необходимо для получения нормальных везикул, пригодных для дальнейшего применения в пьезокварцевых сенсорах. Оценка влияния продолжительности ультразвуковой обработки на размер и дисперсность липосом (рис.3а) проводилась в интервале от 30 мин до 1 ч. Воздействие ультразвука на дисперсию липосом в течение 5 мин чередовалось с перерывами по 2 мин.

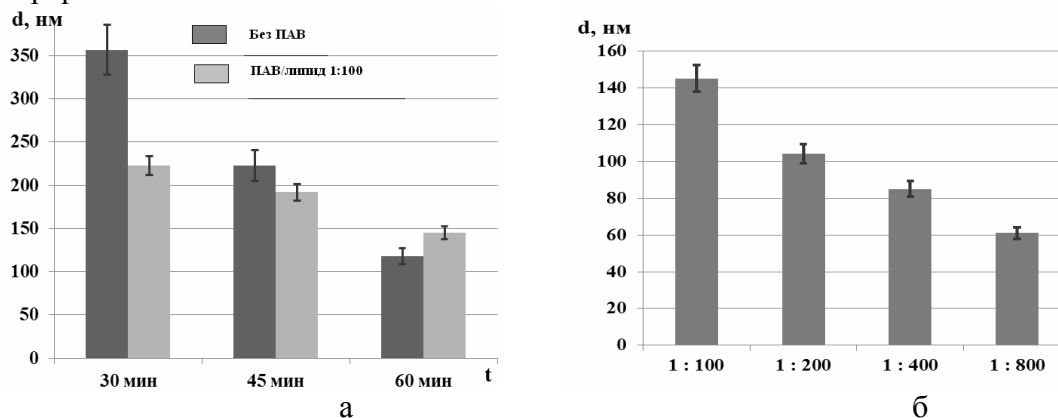


Рис. 3. Зависимость размера и дисперсности липосом от продолжительности ультразвуковой обработки (а) и соотношения ПАВ/липид при ультразвуковой обработке в течение 1ч (б)

Проведенные исследования показывают, что уменьшение содержания ПАВ (мкг) в системе по отношению к липиду до 1 : 800 (рис.3б) позволяет синтезировать однородные фракции липидных везикул диаметром 61 ± 5 нм. Таким образом, способ 3 обеспечивает получение нанолипосом с контролируемым средним диаметром и узким распределением по размерам, которые могут быть использованы в качестве модельных систем для исследования процессов иммобилизации на поверхности пьезокварцевого сенсора.

При формировании распознающего слоя биосенсора важное значение имеет этап создания на его поверхности подложки, способствующей повышению устойчивости и увеличению поверхностной концентрации активных центров связывания [6, 7]. Процесс формирования распознающего покрытия на основе нормальных липосом происходит между двумя веществами, одно из которых закреплено на сенсоре, а другое - находится в растворе, и может быть изучен методом пьезокварцевого микровзвешивания и атомной силовой микроскопии, как классическая гетерогенная реакция [11, 12]. Сопоставлены различные технологии закрепления липосом на поверхности сенсора и исследовано качество полученных покрытий. Для характеристики покрытий использованы следующие параметры: Δf – частота колебания сенсора с иммобилизованными липосомами; Δm – масса слоя; $\Delta h_{пл}$ – толщина слоя ; S_a – удельная шероховатость; R_a – размах высот; N – устойчивость слоя.

Создание самоорганизованных монослоев на основе тиолов (α -липоевой кислоты, 2 – меркаптоэтиламина) при иммобилизации липидных наноструктур способствует образованию более прочных ковалентных связей между аминокгруппами тиола, закрепленного на поверхности электрода, и карбоксильными группами липосом (рис. 4, табл. 1). Формирование монослоя МЕА (способ 1) осуществляется при образовании координационных связей между атомами золота и якорным атомом серы, а стабилизация и пространственное ориентирование слоя

происходит за счет ван-дер-ваальсовых сил между углеводородными радикалами. Липосомы практически количественно связываются с активированным монослоем МЭА, масса покрытия практически не изменяется при его промывании дистиллированной водой. Однако устойчивость такого модифицирующего слоя невелика – продолжительность хранения сенсора во влажной камере при 4°C не превышает 5-6 дней.

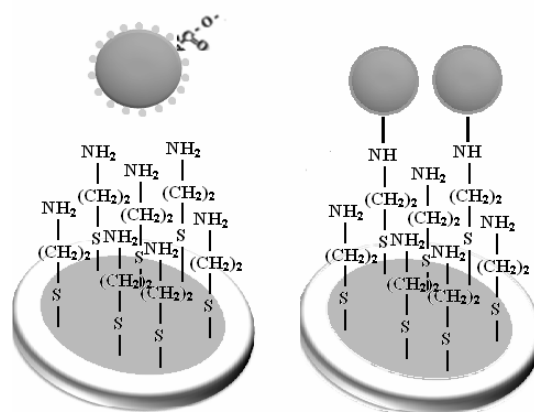


Рис. 4. Схема иммобилизации липосом на монослое 2-меркаптиламина

Биотинилирование липосом повышает их стабильность и снижает степень деформации при контакте с твердой поверхностью, что заметно увеличивает (до 2 недель) продолжительность хранения биосенсора во влажной камере (4°C) без изменения массы модифицирующего слоя. При иммобилизации биотинилированных липидных везикул через аффинный комплекс авидина с биотином на монослое α -липовой кислоты не затрагиваются активные центры специфического связывания авидина с биотином [14], закрепление происходит вследствие образования связей между аминогруппами авидина, не участвующими в аффинном взаимодействии, и карбоксильными группами тиола (рис. 5).

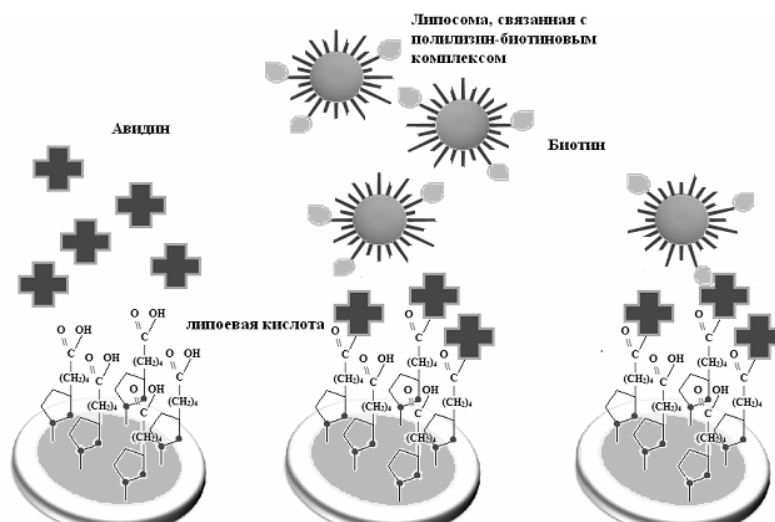


Рис. 5. Схема иммобилизации липосом через аффинный комплекс авидин – биотин на подложки из α -липовой кислоты

Покрyтия, сформированные способом 3, отличаются большей массой и толщиной по сравнению со слоями, полученными способом 1 (табл.1). При этом с авидином связывает 65 % биотинилированных липосом, остальные легко удаляются при промывании поверхности сенсора водой.

При иммобилизации биотинилированных липосом способом 2 для создания подложки использовали АРТЕС с активными аминoгруппами и ГА в качестве бифункционального реагента (рис.6). Такой подход способствовал формированию более плотного и однородного слоя по сравнению со способом 3, сохраняя высокую степень аффинности авидина к биотину. АРТЕС закрепляется на поверхности золотого электрода через карбоксильный кислород, а аминoгруппы АРТЕС и авидина связываются с помощью ГА, обеспечивая плотную сшивку липосом и силиконовой подложки (рис. 6). Наличие длинных гибких линкерных мостиков на основе ГА, связывающих поверхность АРТЕС с авидином, обеспечивает равномерное распределение биотинилированных липосом на подложке (рис.7) и способствует увеличению активных центров связывания по сравнению со способом 3. Масса и толщина слоя заметно выше (табл. 1), однако его устойчивость возрастает до 1 месяца при хранении сенсора при температуре 4°C.

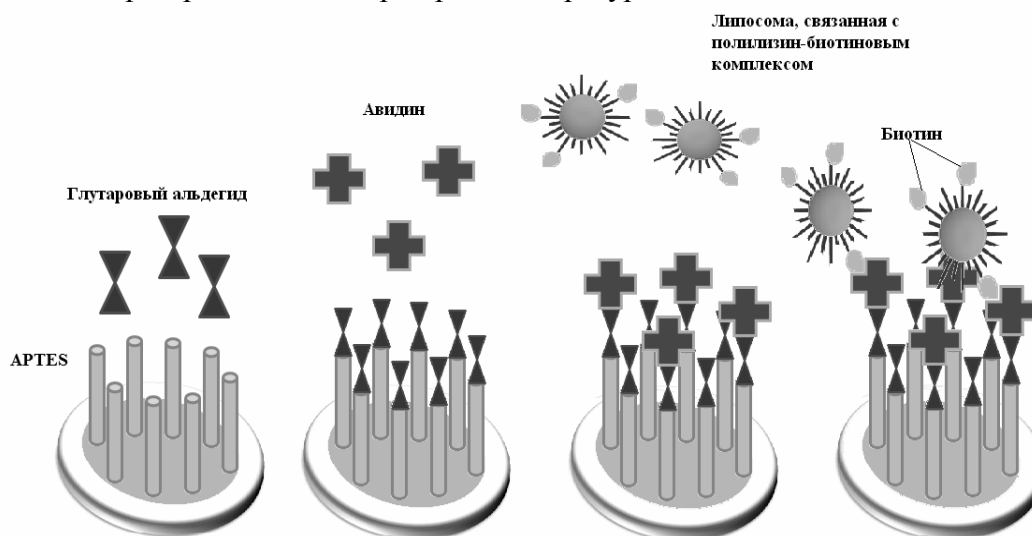


Рис. 6. Схема иммобилизации липосом через аффинный комплекс авидин – биотин на подложке на основе АРТЕС (способ 2).

Таблица 3. Влияние способа иммобилизации липосом на характеристики биомодифицирующего слоя

Способ	Δf , Гц	Δm , мкг	$\Delta h_{пл}$	S_a	R_a	N_s ,сут
			нм			
1	635 ± 12	0.09 ± 0.01	24.8 ± 0.7	112 ± 4	71 ± 2	5-6
2	1195 ± 24	0.79 ± 0.03	51.0 ± 1.0	124 ± 13	78 ± 1	30
3	943 ± 19	0.63 ± 0.01	40.6 ± 0.8	155 ± 21	80 ± 2	12

Значения средней шероховатости и размаха высот поверхности слоя на основе “целых” липосом (способ 2) свидетельствуют об образовании однородного покрытия с равномерным распределением везикул (рис.7), что позволяет рекомендовать такие подложки для эффективного связывания с белковыми конюгатами, например, при создании пьезокварцевого иммуносенсора для конкурентном определении рактопамина и кленбутерола в пищевой продукции.

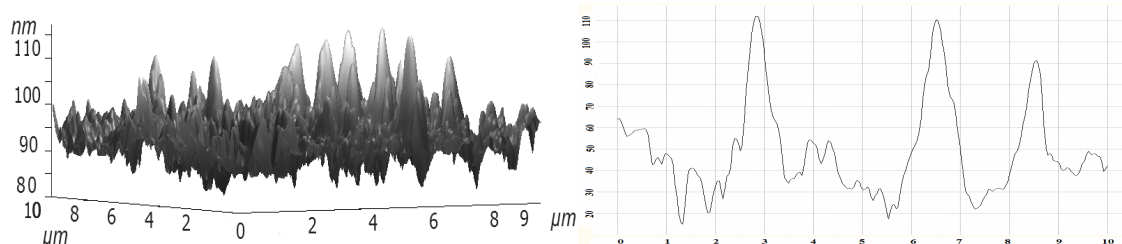


Рис. 7. Профиль поверхности модифицирующего слоя на основе нормальных биотинилированных липосом, полученного способом 2 (разрешение 10x10 мкм)

Заключение

Проведенные исследования показали, что для получения монодисперсных фракций нормальных липосом на основе фосфатидилхолина и пальмитиновой кислоты диаметром 61 ± 4 нм наиболее пригоден метод дегидратации – регидратации с последующим ультразвуковым диспергированием в течении 1 ч в присутствии Triton X 100 в массовом отношении к липиду 1:800.

Модифицирующие слои пьезокварцевого сенсора на основе нормальных липосом, полученные путем закрепления везикул через аффинный комплекс авидин – биотин на поверхности APTES, характеризуются оптимальными значениями массы (1.47 ± 0.03 мкг), шероховатости поверхности (124 ± 13 нм) и максимальной устойчивостью.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-03-97505.

Список литературы

1. Липосомы в биологических системах. Под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. М.: Медицина. 1983. 384 с.
2. Барсуков А.И. Липосомы // Соросовский образ. журнал. 1998. Вып. 10. С. 2-9.
3. Edwards K., Baemner A. Liposomes in analyses // Talanta. 2006. V. 68. pp.1421-1431.
4. Rongen H, Bult van Bennekom W. Liposomes and immunoassays // Journal of Immunological Methods. 1997. V. 204. pp. 105-133.
5. Gomez-Hens A., Fernandez-Romero J. The role of liposomes in analytical Processes // Trends in Analytical Chemistry. 2005, V. 24, No. 1/ pp. 9-19.
6. Nakane Y., Kubo I. Layer-by-layer of liposomes and membrane protein as a recognition element of biosensor // Thin Solid Films. 2009. V. 518. pp. 678-681.
7. Morita S., Nukui M., Kubo Y. Immobilization of liposomes onto quartz crystal microbalance to detect interaction between liposomes and proteins // Journal of Colloid and Interface Science. 2006. V. 298. pp. 672-678.
8. Patolsky F., Lichtenstein A., Willner I. Amplified Microgravimetric Quartz-Crystal-Microbalance Assay of DNA Using Oligonucleotide-Functionalized Liposomes or Biotinylated Liposomes // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122, pp. 418-419.
9. Alfonta L., Willner I. Electrochemical and Quartz Crystal Microbalance Detection of the Cholera Toxin Employing Horseradish Peroxidase And GM1-Functionalized Liposomes // Anal. Chem. 2001. V. 73. pp. 5287-5295.
10. Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure // Biochimica et Biophysica Acta. 1986. V. 858. pp. 161-168.
11. Pignataro B., Steinem C., Galla H. et al. Specific Adhesion of Vesicles Monitored by Scanning Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance // Biophysical Journal. 2000. V. 78. No 1. pp. 487-498.
12. Brochu H., Vermette P. Liposome layers characterized by quartz crystal microbalance measurements and multirelease delivery // Langmuir. 2007. V. 23. pp. 7679-7686.

13. Молотковский Ю.Г., Дергоусов А.А., Бергельсон Л.Д. Новые типы полимеризуемых фосфатидилхолинов, синтез, свойства // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. вып.11. С. 1485.
14. Vermette P., Griesser H., Kambouris P et al. Characterization of Surface-Immobilized Layers of Intact Liposomes // Biomacromolecules. 2004. V. 5. pp. 1496-1502

References

1. Liposomy v biologicheskikh sistemah [Liposomes in biological systems], Pod red. G. Gregoriadis, A. Allisona, Medicina, 1983, 384 p.
2. Barsukov A.I. Liposomy (Liposomes), Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal, 1998, No. 10, pp. 2-9.
3. Edwards K., Baumner A. Liposomes in analyses, Talanta, 2006, V. 68. pp.1421-1431.
4. Rongen H, Bult van Bennekom W. Liposomes and immunoassays, Journal of Immunological Methods, 1997, V. 204, pp. 105-133.
5. Gomez-Hens A., Fernandez-Romero J. The role of liposomes in analytical Processes, Trends in Analytical Chemistry, 2005, No. 1, pp. 9-19.
6. Nakane Y., Kubo I. Layer-by-layer of liposomes and membrane protein as a recognition element of biosensor, Thin Solid Films, 2009, V. 518, pp. 678-681.
7. Morita S., Nukui M., Kubo Y. Immobilization of liposomes onto quartz crystal microbalance to detect interaction between liposomes and proteins, Journal of Colloid and Interface Science, 2006, V. 298, pp. 672-678.
8. Patolsky F., Lichtenstein A., Willner I. Amplified Microgravimetric Quartz-Crystal-Microbalance Assay of DNA Using Oligonucleotide-Functionalized Liposomes or Biotinylated Liposomes, J. Am. Chem. Soc, 2000, V. 122, pp.418-419.
9. Alfonta L., Willner I. Electrochemical and Quartz Crystal Microbalance Detection of the Cholera Toxin Employing Horseradish Peroxidase And GM1-Functionalized Liposomes, Anal. Chem, 2001, V. 73, pp. 5287-5295.
10. Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, Biochimica et Biophysica Acta, 1986, V. 858, pp. 161-168.
11. Pignataro B., Steinem C., Galla H. et al. Specific Adhesion of Vesicles Monitored by Scanning Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance, Biophysical Journal, 2000, No 1. pp. 487-498.
12. Brochu H., Vermette P. Liposome layers characterized by quartz crystal microbalance measurements and multirelease delivery, Langmuir, 2007, V.23, pp. 7679-7686.
13. Molotkovskij Ju.G., Dergousov A.A., Bergel'son L.D. Novye tipy polimerizuemyh fosfatidilholinov, sintez, svoystva [New types of the polymerized fosfatidilkholin, synthesis, properties], Bioorganicheskaja himija, 1988, No. 11, pp. 1485- 1489.
14. Vermette P., Griesser H., Kambouris P., Meagher L. Characterization of Surface-Immobilized Layers of Intact Liposomes, Biomacromolecules, 2004, V. 5, pp. 1496-1502.

Федерякина Мария Александровна – магистрант, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Липецкий государственный технический университет», Липецк

Ермолаева Татьяна Николаевна – д.х.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Липецкий государственный технический университет», Липецк

Federjakina Marija A. – magistrand, Federal government budgetary of higher education «Lipetsk State Technical University», Lipetsk

Ermolaeva Tatyana N. – doctor of chemistry, professor, Federal government budgetary of higher education «Lipetsk State Technical University», Lipetsk, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru