

УДК 678.8

БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТОТИПА БИОПРЕПАРАТА – КОМПОЗИТА НАНОЧАСТИЦ И УГЛЕВОДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2024 г. Г. И. Чурилов¹, С. Д. Полищук^{2,*}, Д. Г. Чурилов², В. В. Чурилова², А. В. Шемякин²

¹Рязанский государственный медицинский университет, Рязань, Россия

²Рязанский государственный агротехнологический университет, Рязань, Россия

*E-mail: svpolishuk@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2024 г.

После доработки 21.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Реализована оценка токсичности наночастиц (НЧ) и композитов НЧ металлов, модифицированных полисахаридами, посредством количественного определения внутриклеточных уровней активных форм кислорода. Для создания нанокompозитов использовали НЧ меди размером 25–40 нм, удельная поверхность 30–60 м²/г, железа – 30–40 нм, 40–50 м²/г, кобальта – 30–50 нм, 30–50 м²/г, в качестве природного полимера – полисахарид лекарственного растения горец птичий. Многофункциональные нанобиокompозиты обладают синергизмом свойств природной полимерной матрицы и материала центрального наноразмерного ядра, а также пролонгированным действием и меньшей токсичностью, чем сами НЧ. Разработанные нанокompозиты позволяют повысить урожайность пшеницы на 10–40%, а при введении в корм животным увеличить их темпы роста, снизить заболеваемость.

DOI: 10.56304/S1992722324601605

ВВЕДЕНИЕ

В сфере сельского хозяйства активно разрабатываются инновационные технологии производства сельскохозяйственной продукции, совершенствуются материалы, например микроудобрения и стимуляторы роста, используемые как для увеличения урожайности, так и для повышения кормовых качеств растений, а также биологически активные добавки, которые в дальнейшем могут использоваться в медицине и ветеринарии [1–6]. При активации обменных процессов в живых системах важную роль играют микроэлементы. Однако установлено, что катионы и анионы металлов оказывают токсичное влияние на живой организм. В качестве замены токсичных металлических ионов можно рассматривать микроэлементы в форме наночастиц (НЧ) металлов (железа, меди, кобальта), которые за счет небольших размеров проявляют высокую биологическую активность, обладают определенными физико-химическими характеристиками, не влияют на экологическую обстановку биоценозов полей, а также пищевых цепей [7, 8]. В настоящий момент ученые, агрономы, животноводы, ветеринары проявляют все больший интерес к НЧ, что вызвано особенностями их биологического действия, отличного от свойств этого вещества в

форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий.

Одним из определяющих факторов биологических эффектов НЧ являются их физико-химические характеристики: химический и фазовый составы, распределение частиц по размерам, величина их удельной поверхности и степень агломерации [9, 10].

К настоящему времени экологические эффекты НЧ техногенного происхождения изучены не полностью в связи со сложностью контроля за их накоплением и последующим выделением из природных продуктов. Известно, что НЧ оксидов металлов накапливаются в растениях и уменьшают морфофизиологические показатели их роста. Обладая достаточно сильным окислительным эффектом, НЧ стимулируют выработку свободных радикалов. Комбинация НЧ с природными полисахаридами позволяет достигать обратного эффекта, а именно увеличения морфофизиологических показателей роста растений, в связи с чем исследование цитотоксических свойств нанокompозитов актуально и востребовано [11–13]. Предполагаемое увеличение производства и использования НЧ в качестве микроудобрений приведет к усилению их эффекта на человека и окружающую среду. Люди обычно подвергаются

Таблица 1. Фазовый состав НЧ металлов

НЧ	Состав	Содержание, %
Cu	Cu	83
	Cu ₂ O	11
	CuO	6
Fe	Fe	96
	Fe ₃ O ₄	4
Co	Co	77
	Co ₃ O ₄	12
	CoO	11

Таблица 2. Удельная поверхность НЧ металлов

НЧ	Удельная поверхность, м ² /г
Fe	45.7
Co	52.1
Cu	6.5

воздействию НЧ при вдыхании, проглатывании, контакте с кожей и инъекциях. При попадании в организм человека НЧ способны преодолевать различные клеточные барьеры и могут достигать наиболее чувствительных органов, таких как легкие, печень и почки, что приводит к повреждению митохондрий, мутациям ДНК и в итоге к апоптозу/гибели клеток. Производство активных форм кислорода (АФК), которые могут вызывать окислительный стресс, воспаление и последующее повреждение белков, клеточных мембран и ДНК, является преобладающим механизмом, ведущим к токсичности.

НЧ широко используются в биологических и клинических исследованиях [14–16], однако на данный момент распространенных методов исследования их токсичности не много. Самым простым методом, позволяющим оценивать области наибольшего накопления НЧ *in vitro* и *in vivo* в объектах, является стереомикроскопия [17, 18]. Просвечивающая электронная микроскопия может предоставить более подробную информацию о поглощении и локализации НЧ *in vitro*, позволяя как визуализировать их расположение в клетке или ткани, так и в сочетании со спектроскопическими методами характеризовать состав интернализованных НЧ. Растровая и сканирующая электронная микроскопии позволяют проводить морфологический анализ [19]. Другими распространенными методами исследования токсичности являются МТС/МТТ-тесты [20–22], флуоресцентная спектроскопия [23], гемолитическая активность [24]. Метод *in vitro*-исследования токсичности магнитных НЧ, основанный на измерении внутриклеточных АФК с помощью

платинированного нанокapиллярного сенсора, обладает рядом преимуществ, такими как низкоинвазивность и, соответственно, возможность исследования живых клеток, временное разрешение, а также относительно высокая скорость проведения измерений [25–29].

Цель данного исследования – показать влияние водорастворимых полисахаридов (природного биополимера) на снижение проокислительной активности металлических НЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования выступали композиты – НЧ меди, кобальта и железа, модифицированные природными полисахаридами, выделенными из лекарственных растений, которые представляли собой навески-порошки.

Исследуемые частицы получены в Национальном исследовательском технологическом университете “МИСИС” химическим методом путем осаждения гидроксидов металлов из растворов солей с последующим их восстановлением в водородном потоке при низких температурах. Синтез образцов проводили с использованием аппаратно-программного комплекса для получения нанодисперсных систем химическими методами (АПК “Нанохим”). С помощью рентгенофазового анализа на дифрактометре XRD-7000 (Shimadzu) определен фазовый состав (табл. 1). С помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) “Tescan” “Vega 3” определены дисперсность (табл. 2) и морфология полученных НЧ металлов, имеющих форму, близкую к сферической (рис. 1). Химический и гранулометрический состав НЧ исследовали с помощью СЭМ JSM-6010PLLIS/LA (JEOL, Япония) и просвечивающего электронного микроскопа JEM 2100 tools (JEOL, Япония).

Для создания нанокомпозитов использовали НЧ меди, железа, кобальта и в качестве природного полимера полисахарид горца птичьего (*Polygonum aviculare*).

Для нанокомпозитов НЧ и водорастворимых полисахаридов получены спектры с помощью ИК-фурье-спектрометра Nicolet 380.

Использование природного полисахарида совместно с НЧ металлов в качестве их стабилизатора и восстановителя представляется простым и технологичным способом создания наноразмерных материалов широкого диапазона воздействия. Как средства доставки подобные нанокомпозиты могут видоизменить рецепторы и ориентировать нужную биологическую реакцию в правильном направлении. Кроме того, можно в широком диапазоне варьировать характеристики НЧ и наноструктур, что, в свою очередь, может

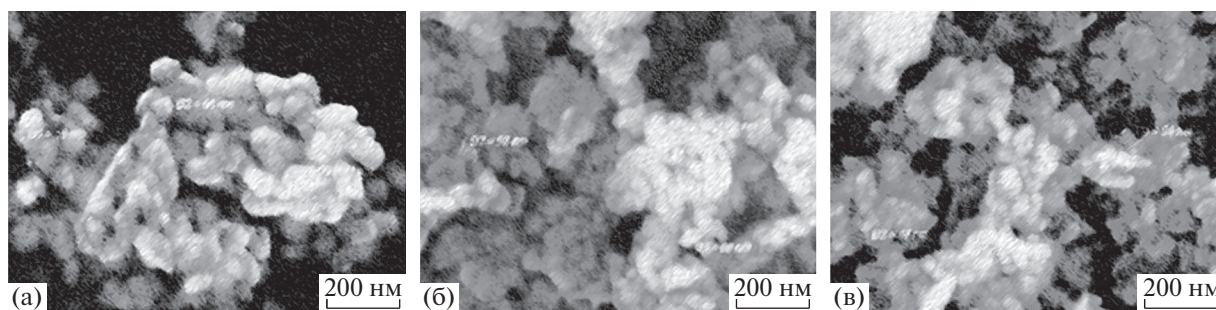


Рис. 1. СЭМ-изображения НЧ Fe (а), Cu (б), Co (в).

привести к существенному изменению их функциональных свойств [30].

В работе использовали следующие стандарты: ГОСТ 8.417-2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения ГОСТ 12.2.007.0-75 Система стандартов безопасности труда. Общие требования безопасности ГОСТ 12.3.019-80. Испытания и измерения электрические МИ 1317-2000.

Исследование токсичности НЧ с помощью платинированного нанокапиллярного сенсора. Для исследования токсичности магнитных НЧ на основе измерения внутриклеточных АФК использовали:

- CO_2 -лазерный пуллер Р-2000 (Sutter Instrument, США) — устройство для изготовления нанокапилляров из стеклянных заготовок, необходимых для последующего создания платиновых сенсоров;

- полые заготовки из кварцевого стекла с внутренним 0.6 мм и внешним диаметром 1.2 мм, длиной 7.5 см;

- персональный компьютер необходим в качестве центра управления описанным выше оборудованием;

- усилитель тока Axon Multi Clamp 700B. Оборудование предназначено для считывания сверхмалых токов с наноэлектрода (Axon Instruments, Burlingame, CA, США);

- оптический инвертированный микроскоп Микромед и ЛЮМ (Микромед, Россия). Оптический инвертированный микроскоп необходим для дополнительного контроля пространственного положения нанокапилляра при его наведении на объекты измерения (единичные клетки);

- программное обеспечение (ПО) pClamp и набор программ, позволяющих управлять усилителем электрического сигнала, ПО Topr View для работы с цифровой камерой, передающей изображение с оптического микроскопа, для первичной обработки и дальнейшей интерпретации полученных данных.

Реактивы для выполнения анализа: для измерения первичных характеристик электрода в качестве стандартного электрохимического медиатора использовали 1 мМ раствор ферроцен метанола. Растворы гидроксида натрия (0.1 М) и хлорида калия (10 мМ) применяли с целью активации поверхности и образования полостей для более высоко адгезивного осаждения платины.

Культивирование клеточных культур. Для культивирования использовали следующее оборудование:

- ламинарный шкаф SafeFastElite 209S (Faster, Италия);

- CO_2 -инкубатор C-series (Binder, Германия) — устройство, поддерживающее условия, необходимые для жизни и роста клеточных культур.

Для культивирования клеток линии эмбриональной почки человека HEK293 и карциномы предстательной железы человека PC3 использовали среду DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Концентрированный раствор L-глутамин (200 мМ) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) добавляли в среду культивирования в соотношении 1 : 100. Далее эмбриональную бычью сыворотку (Sigma, США) вводили в среду культивирования в соотношении 1 : 10, чтобы ее содержание в среде составляло 10%. Для снятия клеток с субстрата использовали раствор трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США).

Подготовка клеточных культур PC3 и HEK293 для проведения электрохимических измерений. Клеточные линии эмбриональной почки человека HEK 293 и карциномы предстательной железы человека PC3 выращивали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS и 1% антибиотика антимикотика в стандартном культуральном инкубаторе, содержащем 5% CO_2 при 37°C. Клетки высевали в пластиковые чашки диаметром 35 мм за 24 ч до эксперимента в количестве 0.35 млн (HEK293) и 0.175 млн (PC3) на чашку. После 24 ч в чашки добавляли аликвоту исследуемых НЧ и инкубировали клетки при 37°C (5% CO_2) в течение 1 ч.

Проведение электрохимических измерений. После 1 ч инкубации чашку Петри переносили к месту проведения электрохимических измерений. Среду, содержащую исследуемые НЧ (5 мкг/мл), извлекали с помощью одноканального механического дозатора и заменяли 2 мл сбалансированного солевого раствора Хэнкса. Процедуру повторяли несколько раз для полного удаления следов среды и НЧ. Затем чашку Петри фиксировали на предметном столике оптического микроскопа. Платиновый нанокапиллярный сенсор подводили в ручном режиме к поверхности клетки и затем переводили в режим “подведение”. Также в чашку Петри опускали Ag/AgCl-электрод сравнения. Параллельно в ПО фиксировали постоянный приложенный потенциал +800 мВ и записывали проходящий ток в режиме реального времени. Электрод с помощью микроманипулятора вводили в клетку с шагом 2 мкм (под углом 51°) на 30 с, после его извлекали. Расчет внутриклеточного значения АФК проводили на основании тока, протекающего внутри единичной клетки, и калибровочной кривой, полученной после эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Непосредственно перед проведением экспериментов были подготовлены стоковые растворы, содержащие НЧ, растворенные в фосфатном буферном растворе с итоговой концентрацией 1 мг/мл. Растворы представляли собой однородную жидкость черного цвета, находящуюся в микроцентрифужных пробирках. Перед проведением всех экспериментов данные растворы подвергали ультразвуковому (УЗ) воздействию с целью препятствия возможной агрегации НЧ. УЗ-обработку проводили в УЗ-бане (Сапфир, Россия) с частотой 35 кГц в течение 25 мин.

Применение полисахаридов актуально для производства наноструктурированных материалов благодаря их многомерной физиологической активности (модуляции эндокринной системы и др.).

Основной проблемой на данный момент остается получение НЧ определенного размера, сохраняющих высокую химическую или биологическую активность в течение продолжительного времени. Особенностью химических свойств НЧ металлов является их высокая реакционная способность благодаря повышенной склонности к ионному и атомному обмену, а также адсорбции на различных поверхностях. С одной стороны, это дает возможность получать новые материалы и вещества, с другой является причиной короткого срока жизни НЧ, так как они легко вступают в реакцию с другими химическими соединениями и агрегируют.

Отметим, что при использовании полисахаридов, различающихся величинами молекулярных масс, степенью метилэтерифицирования остатков галактуроновой кислоты, содержанием нейтральных моносахаридных остатков, протяженностью линейных участков, а также строением разветвленных областей молекулы, можно существенно изменять характеристики НЧ и наноструктур, что, в свою очередь, может привести к существенному изменению их функциональных свойств [15].

Получение нанокompозита на примере НЧ меди и водорастворимого полисахарида, выделенного из горца птичьего. Для получения нанокompозита использовали НЧ меди с характеристиками: средний размер 25 нм, чистота 99.8%, 0.02 г НЧ растворяли в 10 мл воды с последующей обработкой в УЗ-диспергаторе УЗД-1-ПК в течение 8 мин. В 100 мл воды растворяли 1 г полисахарида. К гомогенному раствору полисахарида добавляли 10 мл раствора НЧ меди и диспергировали 5 мин. Полученные нанокompозиты осаждали этанолом, промывали ацетоном и выделяли в сухом виде. Нанокompозиты хорошо растворимы в воде, 5–20%-ные растворы содержат 0.000017–0.000165 мг/дм³ нанометалла.

Для нанокompозитов НЧ металлов и водорастворимых полисахаридов получены спектры с помощью ИК-фурье-спектрометра Nicolet 380. На рис. 2 приведен спектр нанокompозита на основе НЧ меди размером 60–80 нм и полисахарида, выделенного из горца птичьего.

После УЗ-обработки и последующего осаждения получили 0.5 г нанокompозита. Его анализ показал падение общей интенсивности спектра от образца 1 к образцу 2, что коррелирует с количеством органической составляющей в пробе. Также заметно образование слабой полосы поглощения в области 1200 см⁻¹, что в совокупности с ростом максимума в области ~1250 см⁻¹ может быть связано с формированием в пробе эфирных связей типа С–О. Заметен рост линии ~1000 см⁻¹, что, как правило, связывают с наличием связей углерод–кислород–металл, характерных для структуры композита.

Таким образом, разработана методика получения прототипа биопрепарата – нанокompозита на основе биологически активных НЧ и углеводов растительного происхождения. Получен опытный образец нанокompозита, который представляет собой комбинацию полисахарида, выделенного из растения горец птичий, и техногенных НЧ, на примере меди. Стабильность препарата сохраняется в течение недели. Если сравнивать биопрепараты на основе наноразмерных металлов с подобными нанокompозитами, то последние усиливают обмен веществ в организме жи-

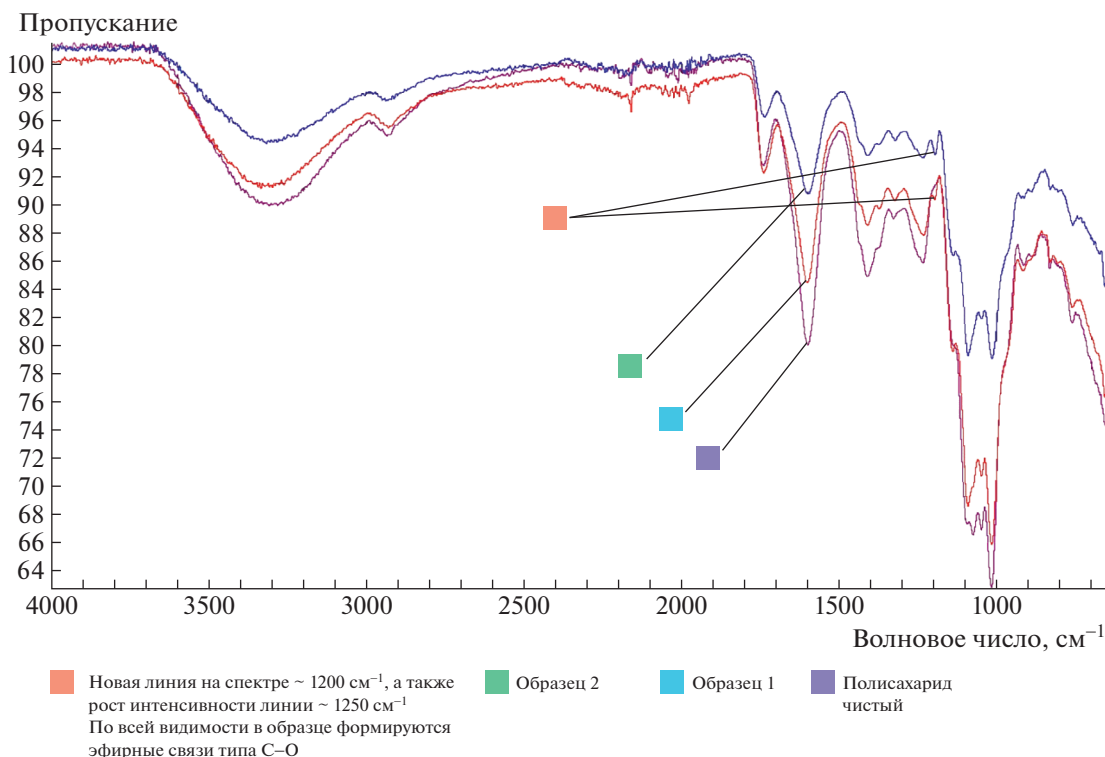


Рис. 2. ИК-спектр нанокompозита на основе НЧ меди размером 60–80 нм и полисахарида, выделенного из горца птичьего.

вотных, активизируют иммунную, ферментную и гуморальные системы.

Оценка уровней АФК под действием исследуемых НЧ. В рамках исследований по оценке токсичности композитов НЧ кобальта, меди и железа с природным полимером были проведены измерения АФК внутри раковых клеток предстательной железы РС3 и эмбриональных клеток почек человека НЕК 293 с помощью электрохимического метода с использованием платинизированных нанокapиллярных сенсоров. Выбор данных клеточных линий обусловлен тем, что они являются, во-первых, наиболее часто используемыми в клеточных работах, во-вторых, характеризуются разной природой происхождения (раковая/нераковая).

В ходе трех независимых экспериментов получен массив данных, содержащий информацию об уровне АФК в четырех исследованных группах клеток (контрольной группе и группах, инкубированных с НЧ Со, Си или Fe) (табл. 3). Анализ был выполнен как для композитов (модифицированных водорастворимыми полисахаридами НЧ), так и для не модифицированных НЧ.

На начальном этапе массивы данных были представлены в виде столбчатой диаграммы “box plot” для клеточной линии РС3 (рис. 3) и НЕК293 (рис. 4). Такой формат позволяет быстро найти

выбросы, являющиеся неотъемлемой частью данных, полученных в ходе измерения биологических объектов. Отметим, что значения внутриклеточных АФК для контрольных групп имели заметно меньший разброс значений по сравнению с экспериментальными группами, что является частой закономерностью, отмеченной в схожих измерениях.

Затем в полученных массивах были определены средние значения уровня АФК и стандартные ошибки для каждой из исследуемых групп. Также был проведен однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA) с целью установления статистически значимых различий между исследуемыми группами образцов. Полученные финальные значения были представлены в виде графиков.

Интерпретация измеренных уровней АФК внутри единичных клеток под воздействием исследуемых НЧ. Сводные графики по оценке токсичности НЧ кобальта, меди и железа, модифицированных полисахаридами, полученные посредством измерения внутриклеточного уровня АФК, представлены на рис. 5.

Уровень АФК единичных клеток РС3 (раковая клеточная линия) после инкубации с исследуемыми НЧ оказался повышен (рис. 5a). Среднее увеличение уровня АФК составило 160% по срав-

Таблица 3. Первичный массив данных, содержащий АФК единичных клеток разных исследуемых групп композитивов

Уровень АФК единичных клеток линии РС3, мкМ			
Контроль	НЧ Со	НЧ Cu	НЧ Fe
1.65314	1.70521	5.04867	4.29449
1.74512	4.70697	5.36698	6.76456
2.04956	5.20928	5.58752	7.19265
2.71431	6.22466	6.61084	8.06645
2.90046	6.90437	7.44821	8.,80193
3.21189	7.63662	7.49681	9.06969
3.33508	7.83249	7.5575	11.4257
3.95847	9.25434	11.11255	13.86832
4.05766	9.31125		14.72351
4.61754	11.51396		
4.83501	12.30666		
	13.24665		
	15.37176		
Уровень АФК единичных клеток линии НЕК293, мкМ			
1.31597	1.80471	2.88188	3.89111
1.39522	2.57985	3.42829	3.94385
2.27605	3.09888	3.65676	4.4764
2.78775	3.18003	4.64541	5.21438
4.30413	3.57498	4.67631	5.36701
4.43396	3.91283	4.78699	5.83973
4.47384	4.55787	5.34581	6.24075
4.92514	5.77307	6.98937	6.59477
5.00468	6.588	7.70693	7.88516
	7.63616	9.48618	8.60843
	8.21747	11.31561	8.67934
			10.9396

нению с контролем ($p > 0.05$, one-way ANOVA). Статистически значимой разницы между прооксидантным действием различных типов НЧ не обнаружено ($p > 0.05$, one-way ANOVA).

Данные представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением.

Статистически незначимые различия были обнаружены во внутриклеточных уровнях АФК единичных клеток НЕК293 (нераковая клеточная линия) контрольной группы и группы, инкубированной с НЧ Со ($p > 0.05$, one-way ANOVA) (рис. 5б). НЧ Cu и Fe равнозначно увеличивали АФК на 89% ($p < 0.05$, one-way ANOVA), НЧ кобальта – на 43%.

На основании полученных результатов отмечено снижение прооксидантного действия НЧ, находящихся в комплексе с природными полисахаридами, по сравнению с нативными (не модифицированными) НЧ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производство АФК, которые могут вызывать окислительный стресс, воспаление и последующее повреждение белков, клеточных мембран и ДНК, является преобладающим механизмом, ведущим к токсичности.

В ходе исследований по оценке токсичности медных и кобальтовых НЧ и их комплексов с природными полисахаридами были проведены измерения АФК внутри раковых клеток предстательной железы РС3 и эмбриональных клеток почек человека НЕК 293 электрохимическим методом с использованием платинизированных нанопиллярных сенсоров. Поведение НЧ зависит от различных факторов: способа их получения, размера, площади поверхности, химического состава. Все эти факторы, включая эффект малых доз, были изучены в более ранних работах: показано, что НЧ меди, железа, цинка и кобальта диаметром 20–80 нм обладают биологической активностью и могут применяться как стимуляторы роста живых систем. Анализ имеющихся научных данных указывает на высокую степень новизны и актуальности предлагаемого направления. Однако токсичность наноматериалов и НЧ также необходимо учитывать, особенно в данный момент их широкого применения. Определение роли НЧ при различных путях их поступления в живые системы организма, оценка степени и характера их воздействия, разработка физико-химических методов анализа поведения НЧ в живых системах остаются важными задачами научных исследова-

Таблица 4. Уровень АФК в клетках, регистрируемый после их обработки НЧ

НЧ	Уровень АФК, мкМ			
	НЕК293		РС3	
	Не модифицированные	Модифицированные	Не модифицированные	Модифицированные
Со	14.8	4.6	31.2	8.6
Cu	11.2	5.9	15.6	7.0
Fe	12.4	6.5	17.4	9.4

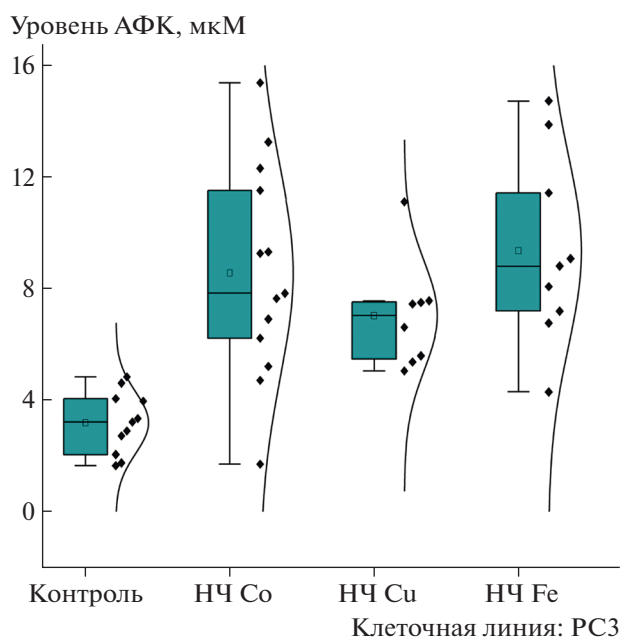


Рис. 3. Полученные данные в ходе измерений АФК внутри единичных клеток линии РС3. График демонстрирует медианное значение, среднее значение, 25-й и 75-й проценти (поля). Усы определяются 5-м и 95-м процентилями.

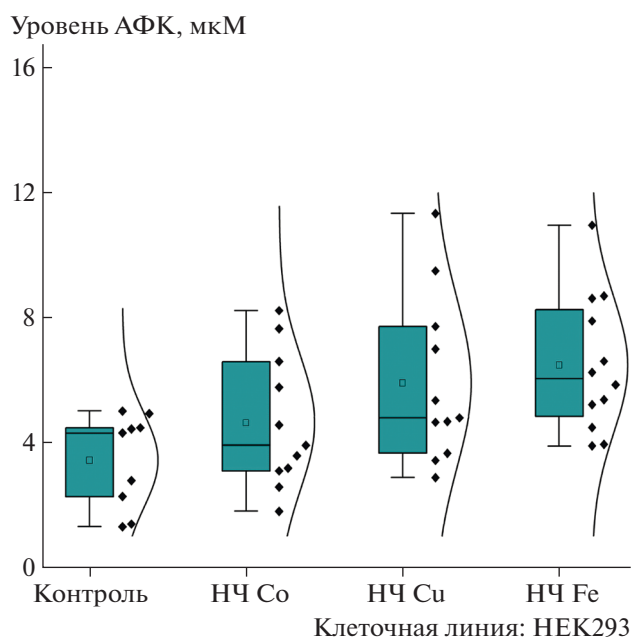


Рис. 4. Полученные данные в ходе измерений АФК внутри единичных клеток линии HEK293. График демонстрирует медианное значение, среднее значение, 25-й и 75-й проценти (поля). Усы определяются 5-м и 95-м процентилями.

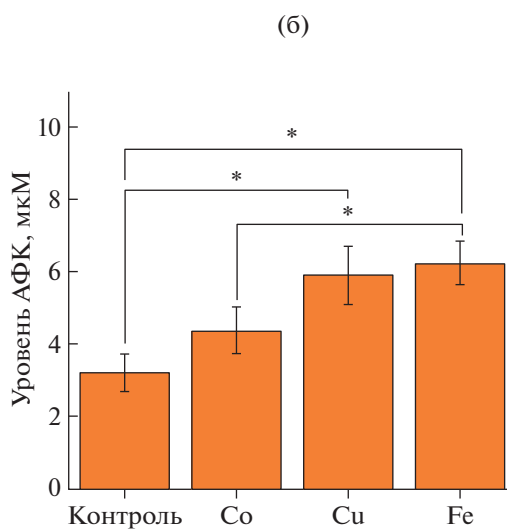
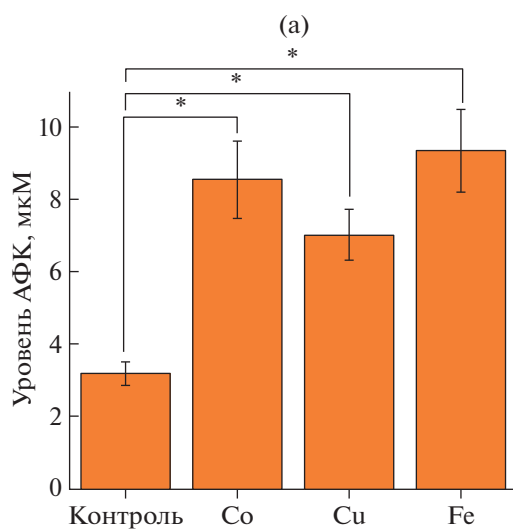


Рис. 5. Уровни внутриклеточных АФК под воздействием модифицированных полисахаридами НЧ для клеточных линий РС3 (а) и HEK293 (б).

ний с целью определения возможностей их использования в различных областях народного хозяйства.

Результатами проведенной работы стала количественная оценка внутриклеточных АФК, продуцированных клетками контрольной группы и группами, инкубированных с НЧ кобальта, меди и железа.

Установлено, что модифицированные НЧ кобальта, меди и железа, взаимодействуя с клетками, обладают прооксидантным эффектом, сниженным по сравнению с нативными НЧ. Также отмечено более выраженное воздействие исследуемых НЧ на раковую клеточную линию РС3 по сравнению с нераковой линией HEK293. Прооксидантный эффект НЧ составил в среднем 160%

для клеточной линии РС3 и 89% для клеточной линии НЕК293, за исключением НЧ Со, проявивших в меньшей степени прооксидантную активность.

Экспериментально установлено преимущество с точки зрения экологической безопасности применения композитов нанометаллов с природными полисахаридами по сравнению с нативными НЧ.

Нанокompозиты улучшают переваримость и усвоение питательных веществ рациона животных: их можно использовать как биодобавки и фармакологические препараты в ветеринарии, а при дополнительном изучении их фармакологической активности применять и в медицине.

Исследовано влияние прототипа биопрепарата — нанокompозита на основе биологически активных НЧ и углеводов растительного происхождения — на физиологическое состояние лабораторных животных и морфобиологические показатели крови [31]. По результатам экспериментов введение в рацион нанокompозитов на основе НЧ металлов способствует улучшению физиологического состояния лабораторных животных, накоплению живой массы, а также улучшению показателей крови, но при определенной дозировке НЧ. Нанокompозиты обладают более высокой фармакологической активностью, чем сами полисахариды. Однако по-прежнему требуется всестороннее тщательное изучение эффектов подобных нанокompозитов на организм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондаков С.Э., Кузнецов Д.В., Чурилов Г.И. и др. // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 5. С. 30.
2. Полищук С.Д., Чурилов Г.И., Чурилова В.В. и др. // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П.А. Костычева. 2019. Т. 4. № 44. С. 45.
3. Чурилов Д.Г., Полищук С.Д., Чурилова В.В. Тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. “Комплексный подход к научно-техническому обеспечению сельского хозяйства (Международные Бочкаревские чтения)”, Рязань, 2019. С. 396.
4. Чурилова В.В., Полищук С.Д., Чурилов Д.Г., Назарова А.А. // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П.А. Костычева. 2017. № 2 (34). С. 130.
5. Lupova E., Vinogradov D., Zaharova O., Kucher D. // BIO Web Conf. 2020. V. 27. P. 00014. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202700014>
6. Chernikova O., Mazhaysky Y., Seregina T., Buryak S. // E3S Web Conf. 2020. V. 212. P. 01002. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021201002>
7. Churilov G.I., Polischuk S.D., Churilov D.G. et al. // Int. J. Nanotechnol. 2018. V. 15. № 4–5. P. 258. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2019.102400>
8. Teterin V., Terentyev V., Andreev K. et al. // E3S Web Conf. 2020. V. 203. P. 02011. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202020302011>
9. Antoshina O., Odnodushnova J., Fadkin G. et al. // BIO Web Conf. 2020. V. 17. P. 00084. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700084>
10. Musayev F., Danilin S., Zakharova O., Rodikov S. // E3S Web Conf. 2020. V. 210. P. 04003. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021004003>
11. Чурилов Г.И., Иванычева Ю.Н., Полищук С.Д. и др. // Нанотехника. 2013. № 4 (36). С. 43.
12. Vinogradov D.V., Evsenina M.V., Lupova E.I. // IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 2022. V. 1069. № 1. P. 012029. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1069/1/012029>
13. Виноградов Д.В., Зубкова Т.В. // Серия конференций ВГД: Наука о земле и окружающей среде. 2022. Т. 981. № 2. С. 022058.
14. Чурилова В.В. “Влияние наночастиц на основе меди в качестве микроэлементного удобрения на рост и развитие свеклы и моркови” Дис. ... канд. биол. наук. Рязань: ВНИИ Агрохимии имени Д.Н. Прянишникова, 2022.
15. Kwon H.J., Shin K., Soh M. et al. // Adv. Mater. 2018. V. 30. № 42. P. 1704290. <https://doi.org/10.1002/adma.201704290>
16. Marouzi S., Sabouri Z., Darroudi M. // Ceram. Int. 2021. V. 47. № 14. P. 19632. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.03.301>
17. Prabhu S., Poulouse E.K. // Int. Nano Lett. 2012. V. 2. № 1. P. 32. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
18. Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L. // Analyst. 2009. V. 134. № 3. P. 425. <https://doi.org/10.1039/b818082b>
19. Yashiniprabha M., Vaseeharan B. // Mat. Sci. Eng. C. 2019. V. 103. P. 109763. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109763>
20. Poma A., Vecchiotti G., Colafarina S. et al. // Nanomaterials. 2019. V. 9. № 9. P. 1299. <https://doi.org/10.3390/nano9091299>
21. Guntur S.R., Kumar N.S., Hegde M.M., Dirisala V.R. // Anal. Chem. Insights. 2018. V. 13. <https://doi.org/10.1177/1177390118782877>
22. Xu Z., Feng Q., Wang M. et al. // Front. Oncol. 2020. V. 10. P. 575415. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.575415>
23. Pem B., González-Mancebo D., Moros M. et al. // Methods Appl. Fluoresc. 2019. V. 7. № 1. P. 014001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aae9c8>
24. Nakkala J.R., Mata R., Raja K. et al. // Mat. Sci. Eng. C. 2018. V. 91. P. 372. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.048>

25. *Muhammad W., Khan M.A., Nazir M. et al.* // Mater. Sci. Eng. C. 2019. V. 103. P. 109740.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109740>
26. *Erofeev A., Gorelkin P., Garanina A. et al.* // Sci. Rep. 2018. № 18. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25852-4>
27. *Vaneev A.N., Gorelkin P.V., Garanina A.S. et al.* // Anal. Chem. 2020. V. 92. № 12. P. 8010.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01256>
28. *Petrov R.A., Mefedova S.R., Yamansarov E.Yu. et al.* // Mol. Pharmaceutics. 2021. V. 18. № 1. P. 461.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00980>
29. *Novotortsev V.K., Kukushkin M.E., Tafeenko V.A. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 5. P. 2613.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052613>
30. *Krasnovskaya O.O., Guk D.A., Naumov A.E. et al.* // J. Med. Chem. 2020. V. 63 № 21. P. 13031.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01196>
31. *Чурилов Г.И.* Полисахариды растений рода Горец и Лапчатка: выделение, строение, биологическое действие полисахаридов растений и влияние на их свойства нанокристаллических металлов: монография. Рязань: Изд-во РГТУ, 2007. 155 с.