

# Лазерно-оптическое исследование воздействия наночастиц алмаза на структуру и функциональные свойства белков

Е.В.Переведенцева, Ф.И.Су, Т.Х.Су, И.Ч.Лин, Ч.Л.Ченг, А.В.Карменян, А.В.Приезжев, А.Е.Луговцов

*Осуществлено наблюдение адсорбции белков плазмы крови альбумина и  $\gamma$ -глобулина на алмазных частицах размером около 5 и около 100 нм с использованием лазерно-оптических методов. Показано, что эта адсорбция слабее, чем для белка-фермента лизоцима, особенно при физиологическом значении рН 7.4. Наблюдаемые изменения фурье-спектров поглощения в ИК области могут быть обусловлены структурными перестройками адсорбированного белка. На примере лизоцима показано, что адсорбция белка, приводящая к заметному изменению полосы Амид I его колебательного спектра, также вызывает значительное снижение функциональной активности белка. Установлено, что наночастицы алмаза размером около 100 нм вызывают менее значительные изменения структуры и функционального состояния белков, чем наноалмазы размером около 5 нм.*

**Ключевые слова:** лазерно-оптические методы, фурье-спектроскопия, наноалмазы, белки плазмы крови, адсорбция.

## 1. Введение

Роль лазерно-оптических методов в исследовании биологических объектов различных уровней сложности постоянно растет [1, 2]. С развитием нанотехнологий эти методы все шире используются при решении различных проблем нанобиофотоники, в частности задач взаимодействия биологически важных молекул с теми или иными наночастицами, случайно или преднамеренно попадающими в организм человека. Физико-химические свойства наночастиц, размеры которых сравнимы с характерными размерами биомолекул и/или клеточных органелл, открывают возможности разработки методик и инструментов на их основе для использования в биологических и медицинских исследованиях, для медицинской диагностики и, в перспективе, для терапевтического воздействия, а также в биотехнологиях.

В последнее время пристальное внимание с точки зрения биомедицинских применений привлекают алмазные наночастицы, что обусловлено их оптико-спектроскопическими, структурными, электрохимическими и поверхностными свойствами, вариативностью размеров в широких пределах, низкой по сравнению со многими другими наночастицами токсичностью [3, 4]. В первую очередь разрабатываются методики конъюгации алмазных наночастиц с биомолекулами в целях получения новых оптических нанозондов и наносенсоров [3]. Представляют интерес возможности использования алмазных наночастиц для направленной доставки лекарств в организме [5, 6], а

также для разработки новых методов терапевтического и хирургического воздействия (например, гипертермия и нанохирurgia) [7]. Реализация этих возможностей поднимает проблемы нанобезопасности, появляющиеся в условиях бурного развития нанотехнологий, и требует понимания того, как наночастицы влияют на биологические системы/объекты, с которыми они взаимодействуют прямо или опосредованно. Например, при исследованиях, связанных с взаимодействием наночастиц как с организмом в целом, так и с отдельными органами и тканями, необходимо понимать механизмы взаимодействия наночастиц с кровью, а значит, и с отдельными ее компонентами. Отметим, что работы по взаимодействию наноалмазов с биологическими объектами на уровне ткань–орган–организм крайне малочисленны (см., напр., [8, 9]).

Цель настоящей работы – исследование *in vitro* взаимодействия наноалмазов с размерами в диапазонах 5–10 и 100–130 нм с основными белками плазмы крови: альбумином (составляет около 60% от всех белков плазмы) и  $\gamma$ -глобулином (или иммуноглобулинами). Анализировалась адсорбция белков на наноалмазах и происходящие при этом изменения их структуры, а также функционального состояния, которые проявлялись в изменении ферментативной активности антибактериального белка лизоцима, содержащегося в биологических жидкостях и широко используемого в исследованиях как модельная система [10].

Взаимодействие компонентов крови с детонационными наноалмазами, к которым относятся используемые в настоящей работе наноалмазы размером 5–10 нм, изучалось ранее в работах [11, 12]. Наблюдались небольшие повреждения лимфоцитов [11] и гемолитическое воздействие на эритроциты, связанное, вероятно, с адсорбцией макромолекул плазмы на наноалмазах, изменяющей осмотические параметры крови, а также ряд ее биохимических характеристик. Однако отмечалось, что эти эффекты были незначительными [12]. Изучалось также взаимодействие ряда белков плазмы крови, включая альбумин и  $\gamma$ -глобулин, с различными наночастицами, в том числе и с нано-

E.V.Perevedentseva, F.Y.Su, T.H.Su, Y.C.Lin, C.L.Cheng. National Dying-Hwa University, Hualien, Taiwan; email: pengelena@mail.com  
A.V.Karmenian. National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan  
А.В.Приезжев, А.Е.Луговцов. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет; Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: avp2@mail.ru, avp2@phys.msu.ru

алмазами размером около 75 нм [13]. Было показано, что как альбумин, так и  $\gamma$ -глобулин в условиях *in vitro* имеют небольшое сродство к наноалмазам. Однако из-за высокого содержания альбумина в плазме он может в заметных количествах адсорбироваться на наноалмазах при их взаимодействии с плазмой.

Изменения структуры белков при их адсорбции на различных твердых поверхностях, включая наночастицы, неоднократно изучались различными лазерно-оптическими методами. Структурные изменения белков тесно связаны с изменениями их функционального состояния [14–16], что наблюдается как при различных воздействиях на них, например при адсорбции, так и в процессе нормального функционирования белков [17]. Эти изменения определяются свойствами белка (структурой, зарядом и т.п.), а также свойствами и структурой поверхности [18] (гидрофобными/гидрофильными свойствами, зарядом и т.д., в том числе кривизной наноструктурированных поверхностей). В частности, эффект воздействия поверхности на свойства адсорбированного альбумина наблюдался и исследовался с использованием явления кругового дихроизма [19], флуоресцентной и ИК фурье-спектроскопии (FTIR) [19, 20] и др. [21–25].

В настоящей работе адсорбция белков на наноалмазах анализировалась по спектрам поглощения в ультрафиолетовой–видимой области; структурные изменения адсорбированных белков анализировались с помощью FTIR-спектроскопии на основе того, что амидные пики белков очень чувствительны к вариациям вторичной структуры [17, 26].

## 2. Материалы и методы

Использовались наноалмазы с размерами 5–10 нм (Microdiamant AG, Швейцария) и 100–130 нм (Kau Diamond, США). Неалмазные фракции, примеси и загрязнения удалялись с поверхности частиц стандартным методом – путем обработки смесью сильных кислот  $H_2SO_4:HNO_3 = 1:3$ , что также способствовало образованию поверхностных карбоксильных COOH-групп. Как показали предыдущие исследования, такой карбоксилированный наноалмаз является более биосовместимым [27], поскольку поверхностные молекулярные и ионные группы участвуют во взаимодействии алмазных наночастиц с биомолекулами [28].

Растворенные в бидистиллированной воде белки – человеческий сывороточный альбумин,  $\gamma$ -глобулин (оба – Sigma, США) и лизоцим (Amresco, США) с концентрацией 40 мг/мл – смешивались с водными суспензиями наноалмазов с концентрацией 4 мг/мл в пропорции 1:1. После тщательного перемешивания в течении двух часов смесь центрифугировалась, при этом осаждались наноалмазы с адсорбированным на поверхности белком. Осадок отмывался в два раза дистиллированной воде для удаления раствора неадсорбированного белка.

В исследовании использовались следующие лазерно-оптические методы: соответствие размеров частиц спецификациям производителей было подтверждено измерениями методом динамического светорассеяния с использованием спектрометра DLS BI-200SM (Brookhaven, США) на базе твердотельного лазера (532 нм) с диодной накачкой;  $\zeta$ -потенциал частиц оценивался с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания), в котором использовался He–Ne-лазер (633 нм) мощностью 4 мВт.

Спектры поглощения измерялись двухлучевым спектрофотометром JASCO V-550 (США). Для показанных на рис.1 спектров поглощения альбумина до и после адсорбции на наноалмазах характерно, как и для большинства других белков, наличие полосы с максимумом около 280 нм. Ее интенсивность в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера пропорциональна концентрации белка в растворе, что позволило использовать спектры поглощения исходного раствора белка и супернатанта после адсорбирования и центрифугирования для оценки количества адсорбированного наноалмазом белка.

Измерения спектров поглощения методом FTIR-спектроскопии проводились на спектрометре FT/IR 2000 (Bomem, Канада) с детектором на основе материала DTGS (Deuterated Triglycine Sulfate). Образцы наносились капельным способом на полированные кремниевые подложки и высушивались в воздушной среде. Измерения также проводились на воздухе, и это позволяет предположить, что состояние белков аналогично их состоянию в водных растворах/суспензиях из-за наличия в них остаточной связанной воды. Во FTIR-спектрах исследуемых образцов эта связанная вода не наблюдается, очевидно потому, что ее немного, и ее пики поглощения перекрываются пиками Амид I, Амид II (1655, 1540  $cm^{-1}$ ) в области  $\delta$ -колебаний воды (1600–1630  $cm^{-1}$ ) и полосами Амид A, B (3100 и 3500  $cm^{-1}$ ) в области  $\nu_{s-}$ ,  $\nu_{as-}$  колебаний воды (3200–3600  $cm^{-1}$ ).

Функциональное состояние белка, адсорбированного на наноалмазе, оценивалось на примере белка-фермента лизоцима и сравнивалось с состоянием последнего в водном растворе. Концентрации лизоцима в контрольных растворах составляли 0.03–0.12 ммоль и соответствовали средним концентрациям лизоцима в суспензии наноалмазов с адсорбированным лизоцимом. Для оценки ферментативной активности лизоцима использовался основанный на флуоресцентной диагностике стандартный тест (тестовый набор EnzChek Lysozyme E-22013 (Molecular Probes Inc., США)). В данном тесте измеряется воздействие лизоцима на клеточную оболочку бактерии *Micrococcus lysodeikticus*, меченой флуоресцеином в такой концентрации, что его флуоресценция в интактной клеточной оболочке тушится. При воздействии лизоцима на оболочку бактерии интенсивность излучения флуоресцеина пропорциональна концентрации лизоцима в растворе и его активности. Флуоресценция измерялась при возбуждении на длине волны 485 нм и излучении с  $\lambda = 530$  нм с помощью микропланшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (THERMO, США).

Кислотно-щелочные свойства (pH) растворов и суспензий, от которых существенно зависит характер взаимодействия компонентов, контролировались с помощью pH-метра SENTRON (Titan, Тайвань).

## 3. Результаты и их обсуждение

На рис.1 показаны спектры поглощения раствора альбумина до и после его адсорбции на наноалмазах размером 100 и 5 нм при pH около 5 и 7.4. Разность интенсивностей полос поглощения белка до и после взаимодействия раствора белка с суспензией наноалмаза характеризует количество адсорбированного наноалмазом альбумина. Видно, что наноалмаз размером 5 нм адсорбирует больше белка, чем наноалмаз размером 100 нм, поскольку суммарная площадь поверхностей частиц наноалмаза размером 5 нм намного больше, чем у 100-нанометровых, в суспензии той

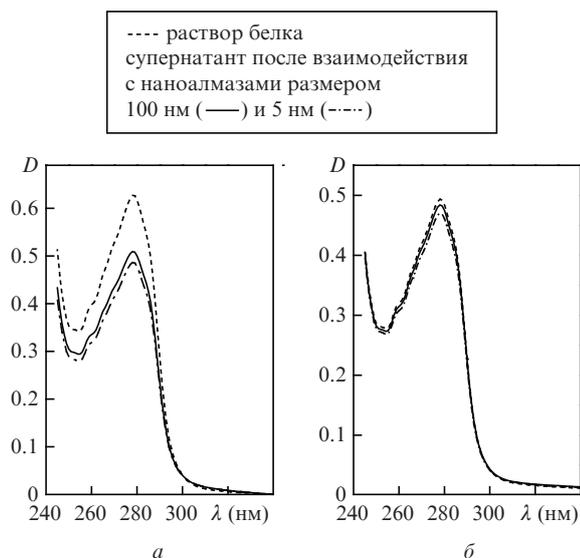


Рис.1. Спектры поглощения растворов альбумина до взаимодействия с нанодиамином и после адсорбции на нанодиамином с размерами 100 и 5 нм при рН около 5 (а) и 7.4 (б); *D* – оптическая плотность.

же весовой концентрации. Кроме того, необходимо отметить, что структуры используемых нанодиаминов, в первую очередь структуры их поверхностей, различаются. Для нанодиаминов размером 100 нм характерно высокое содержание алмазной фракции, наночастицы достаточно хорошо диспергированы в суспензии. Что касается нанодиаминов размером 5 нм, то на их поверхности преобладает углерод со структурой графита и/или разупорядоченный углерод, а в суспензии преимущественно наблюдаются агрегаты и агломераты частиц с сильно нерегулярной поверхностью [29]. Кроме того, нанодиамины с размерами 5 и 100 нм имеют различный ζ-потенциал, который в значительной степени определяет адсорбцию белка на нанодиамином.

Изоэлектрическая точка альбумина соответствует рН 4.4–4.8 [30]. Видно, что при рН, близком к изоэлектрической точке, когда ζ-потенциал альбумина близок к нейтральному, наблюдается заметная адсорбция. Это также видно и на FTIR-спектрах (рис.2).

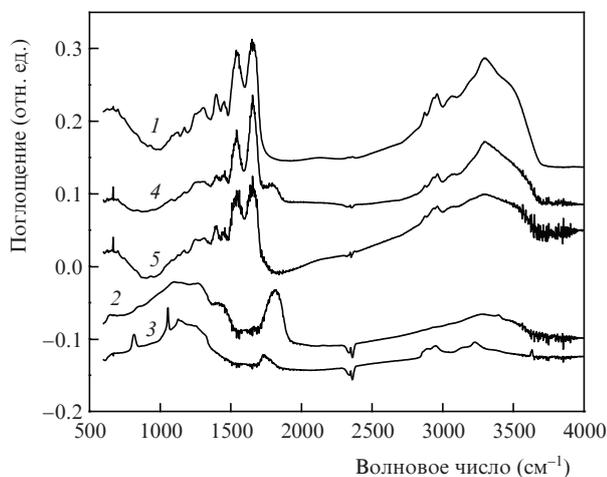


Рис.2. FTIR-спектры альбумина (1), нанодиаминов с размерами 100 (2) и 5 нм (3), а также нанодиаминов с адсорбированным альбумином размерами 100 (4) и 5 нм (5); рН 5.

На рис.2 приведены спектры нанодиаминов размером 100 и 5 нм, спектр альбумина и спектры тех же нанодиаминов с адсорбированным альбумином. Отметим еще раз, что спектры нанодиаминов с адсорбированным альбумином снимались после трехкратного отмывания остаточного альбумина в растворе. Видно, что для этих образцов сигнал белка заметно преобладает над сигналом нанодиамином. При рН 7.4 сигнал белка наблюдается для образца нанодиамином 5 нм с адсорбированным альбумином (рис.3,а, спектр 4) и не наблюдается для нанодиамином 100 нм после адсорбции белка (не показано). Адсорбция альбумина на нанодиамином 5 нм имеет место как при рН около 5, так и при рН 7.4. Отметим, что ζ-потенциал нанодиамином 5 нм в интервале рН 2–7.8 принимает значения от +26 до +32 мВ и резко меняется на отрицательный в интервале рН 8–9, достигая –40 мВ при рН 12.

По-видимому, главным механизмом адсорбции альбумина на нанодиамином является электростатическое притяжение. Это подтверждается тем, что адсорбция на нанодиамином размером 100 нм при физиологических значениях рН (около 7.4) слабая. При этом в широком интервале значений рН нанодиамином 100 нм имеют отрицательный ζ-потенциал (–40...–50 мВ).

Адсорбция γ-глобулина на нанодиамином наблюдалась также при рН около 5–5.5 (рис.3,б). Заметим, что изоэлектрическая точка иммуноглобулинов лежит в широком (6.7–9) интервале рН [31], так что при физиологических

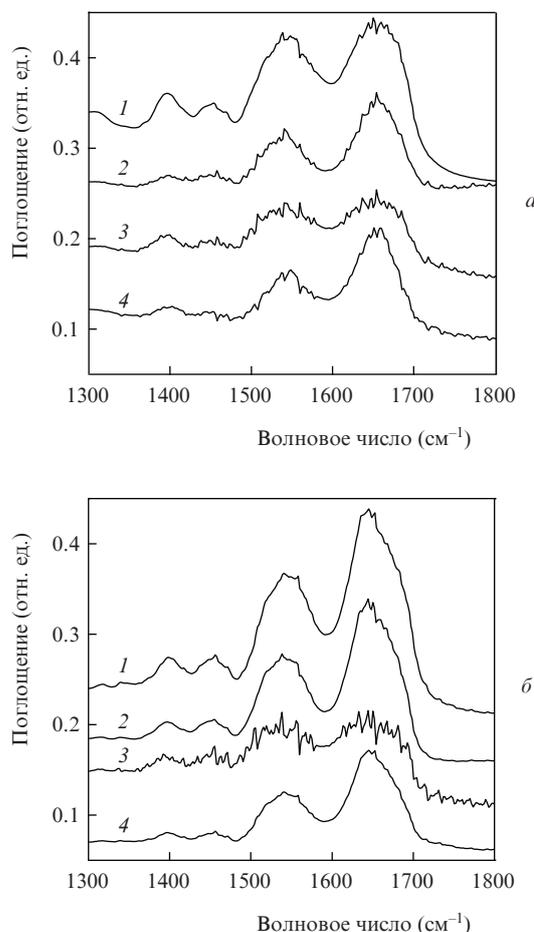


Рис.3. FTIR-спектры альбумина (а) и γ-глобулина (б) в интервале пиков Амид I, II: 1 – белок; 2 – белок, адсорбированный на нанодиамином размером 100 нм; 3, 4 – белок + нанодиамином размером 5 нм; рН 5.5 (1–3) и 7.4 (4).

значениях pH они могут адсорбироваться на нанодиамазах размером как 5, так и 100 нм. Анализ спектров поглощения супенатанта после первого, а также двух- и трехкратного отмывания нанодиамаза с адсорбированным на поверхности белком от раствора неадсорбированного белка также показывает, что адсорбция на нанодиамазах размером 5 нм более стабильна (адсорбированный белок не смывается), чем на нанодиамазах размером 100 нм.

На рис.2 показан фрагмент FTIR-спектра альбумина с характерными для всех белков полосами поглощения амидных групп Амид I (центр на  $1655\text{ см}^{-1}$ , колебания CO-групп полипептидной цепи), Амид II (центр около  $1540\text{ см}^{-1}$ , деформационные колебания групп NH полипептидного остова и колебания боковых групп аминокислотных остатков), Амид III (широкая полоса в области  $1200\text{--}1310\text{ см}^{-1}$ , колебания групп CNH), а также полоса около  $1400\text{ см}^{-1}$ , обусловленная симметричными колебаниями группы COO, и полосы поглощения групп Амиды A, B ( $3000\text{--}3300\text{ см}^{-1}$ ) [17, 26, 32]. Изменение соотношений интенсивностей пиков и их компонентов говорит об изменении вторичной структуры молекулы белка в результате перераспределения вкладов таких элементов структуры, как  $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -структура, неупорядоченная фракция. Так, наиболее интенсивный компонент пика Амид I в нативном состоянии белка обусловлена колебаниями CO-групп полипептидной цепи в составе  $\alpha$ -спирали и неупорядоченной фракции. Сдвиг максимума полосы указывает на относительное увеличение вклада колебаний CO-групп в  $\beta$ -структуре [26].

На рис.2 показаны также фрагменты FTIR-спектров нанодиамазов размером 100 (2) и 5 нм (3). Наиболее характерные и заметные полосы поглощения в спектре карбоксилированного нанодиамаза принадлежат связи C=O ( $1700\text{--}1820\text{ см}^{-1}$ , в зависимости от конкретного карбонилсодержащего соединения и его окружения), гидроксилсодержащим группам ( $\sim 1640, 3400\text{ см}^{-1}$ ), асимметричным ( $2923\text{ см}^{-1}$ ) и симметричным ( $2855\text{ см}^{-1}$ ) колебаниям C-H группы, связям C-O-C и C-OH ( $1100\text{--}1140$  и  $1360\text{--}1420\text{ см}^{-1}$ ) [29, 33]. Сравнивая спектры 2 и 3 со спектрами нанодиамазов с адсорбированным альбумином (спектры 4 и 5), можно видеть, что для этих образцов пики, соответствующие белкам, в частности Амид I и Амид II, существенно преобладают над пиками OH и C=O, соответствующими нанодиамазам.

На рис.3 FTIR-спектры альбумина и  $\gamma$ -глобулина сравниваются со спектрами белков, адсорбированных на нанодиамазах с размерами 100 и 5 нм в интервале пиков Амид I, II. Видно, что изменения формы пика Амид I, а также соотношения интенсивностей полос Амид I, II и III наблюдаются на нанодиамазах обоих размеров при адсорбции на них альбумина в случаях и pH 5.5 (спектры 2, 3), и pH 7.4 (спектр 4). Для  $\gamma$ -глобулина этот эффект менее выражен. Наблюдаемые изменения спектров указывают на структурные изменения молекул белков, но их сложно описать конкретно.

Функциональное состояние белков в большой степени определяется их структурным состоянием. В частности, наблюдалась структурная перестройка альбумина при выполнении им транспортной функции [34]. Что касается иммуноглобулинов, то их структурно-функциональные соотношения крайне сложны. Даже незначительные изменения в четвертичной структуре белка могут нарушить их функционирование [35], так что здесь мы хотим лишь подчеркнуть важность данного исследования для оценки возможности использования нанодиамазов *in vivo*.

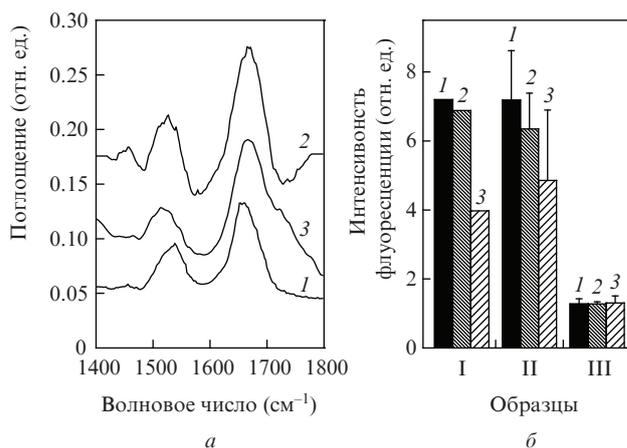


Рис.4. FTIR-спектры в интервале пиков Амид I, II (1 – лизоцим, 2 – лизоцим, адсорбированный на нанодиамазе размером 100 нм, 3 – лизоцим, адсорбированный на нанодиамазе размером 5 нм, pH 6) (а) и функциональная активность (пропорциональна интенсивности флуоресценции) лизоцима в водном растворе (образец I) и лизоцима, адсорбированного на нанодиамазах с размерами 100 (образец II) и 5 нм (образец III); концентрации лизоцима в образцах: 1 – около 0.125 ммоль, 2 – 0.06 ммоль, 3 – 0.03 ммоль (б).

Чтобы продемонстрировать связь между структурными перестройками белка, вызванными его взаимодействием с поверхностью нанодиамаза при адсорбции, и функционированием белка мы использовали фермент лизоцим. На рис.4,а показаны FTIR-спектры в интервале полос Амид I и II для лизоцима, а также для лизоцима, адсорбированного на нанодиамазах, при pH около 6. Отметим, что изоэлектрическая точка лизоцима соответствует pH 11, при этом стабильная и сильная адсорбция лизоцима наблюдается в широком (2–10) интервале pH как на нанодиамазе 100 нм (обусловлена электростатическим притяжением положительно заряженного лизоцима и отрицательно заряженного нанодиамаза), так и на нанодиамазе 5 нм, который имеет положительный  $\zeta$ -потенциал в интервале pH 2–8. Происходит сдвиг центра полосы Амид I от  $1658\text{ см}^{-1}$  для лизоцима к  $1664\text{ см}^{-1}$  для лизоцима, адсорбированного на нанодиамазах 100 нм и к  $1670\text{ см}^{-1}$  для лизоцима, адсорбированного на нанодиамазах 5 нм. В последнем случае у полосы Амид I наблюдается также дополнительное плечо около  $1720\text{ см}^{-1}$ , которое соответствует полосе колебания C=O карбоксильной группы нанодиамаза. Ее присутствие, по-видимому, говорит о плохой упорядоченности, неоднородности слоя лизоцима на этом нанодиамазе, что, скорее всего, обусловлено характерными особенностями нанодиамаза размером 5 нм, а именно структурой поверхности (высоким содержанием неалмазной фракции, большим количеством структурных дефектов, положительным  $\zeta$ -потенциалом), агрегацией, значительной кривизной поверхности.

На рис.4,б представлены результаты исследования функциональной активности лизоцима; сравниваются интенсивности флуоресценции образцов, содержащих лизоцим в растворе, и лизоцим, адсорбированный на нанодиамазах. При использовании теста EnzChek Lysozyme интенсивность излучения флуоресцеина пропорциональна концентрации активного лизоцима в образце. Интенсивности флуоресценции образцов, содержащих лизоцим в растворе и лизоцим, адсорбированный на нанодиамазах размером 100 нм, практически не различаются и пропорционально уменьшаются при уменьшении концентрации

лизоцима в исследуемом образце. Интенсивность флуоресценции образцов, содержащих лизоцим, адсорбированный на наноалмазах размером 5 нм, заметно ниже контрольной, т.е. его функциональная (антибактериальная) активность резко снижается. Отметим, что это согласуется с предыдущими исследованиями токсичности наноалмазов для клеток. Так, было показано, что наноалмазы размером 100 нм не токсичны в очень высоких концентрациях, тогда как наноалмазы размером 5 нм проявляют некоторую цитотоксичность для клеток карциномы легких A549 и фибробластов легких HFL1 [4, 27]. Различия в воздействии наноалмазов с размерами 100 и 5 нм на белки обусловлены, по-видимому, существенными различиями их размеров, а также структурных и поверхностных свойств.

Поскольку альбумин является основным белком в составе плазмы крови, даже адсорбция незначительной его части может повлиять на состояние плазмы и, как следствие, на реологию крови в целом. Для  $\gamma$ -глобулина важность данного исследования обуславливается тем, что самые незначительные изменения в четвертичной структуре белка могут нарушить его функционирование и, тем самым, функционирование иммунной системы организма. Поэтому как наноалмазы, так и любые другие наночастицы могут быть использованы *in vivo* только после тщательного изучения их взаимодействия со всеми системами организма, включая белки плазмы крови.

#### 4. Заключение

Современные лазерно-оптические методы позволяют наблюдать адсорбцию белков плазмы крови альбумина и  $\gamma$ -глобулина на наноалмазах размером 5 и 100 нм. Показано, что эта адсорбция слабее, чем для других белков (например, лизоцима), особенно при физиологическом pH. Тем не менее наблюдаются изменения FTIR-спектров, которые могут быть обусловлены структурными перестройками адсорбированного белка. На примере белка лизоцима показано, что адсорбция белка, вызывающая заметное изменение полосы Амид I его FTIR-спектра, вызывает также значительное снижение функциональной активности белка. Выявлено, что наноалмазы размером 100 нм приводят к менее значительным изменениям структуры и функционального состояния белков, чем наноалмазы размером 5 нм.

На основании полученных результатов можно заключить, что безопасное использование алмазных наночастиц *in vivo*, а также их широкое использование в экспериментах с кровью *in vitro*, которое не влияло бы само по себе на результаты исследований, требуют соответствующих условий. Для этого необходима разработка методов их реализации, в частности способов исключения неконтролируемой адсорбции, и методов функционализации поверхности наночастиц. Однако все это нуждается в дальнейших исследованиях.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №08-02-92002) и NSC Тайваня (грант №NSC 97-2923-M-259-001-MY3).

- Palumbo G., Pratesi R. *Lasers and Current Optical Techniques in Biology, Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology*. Ed. by D.P.Häder, G.Jori, (Cambridge, UK: Europ. Soc. for Photo-biol., 2005, v. 4).
- Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (М.: Физматлит, 2010).
- Krueger A. *Chem. Eur. J.*, **14**, 1382 (2008).
- Chao J.I., Perevedentseva E., Chung P.H., Liu K.K., Cheng C.Y., Chang C.C., Cheng C.L. *Biophys. J.*, **93**, 2199 (2007).
- Chen M., Pierstorff E.D., Lam R., Li S.Y., Huang H., Osawa E., Ho D. *ASC Nano*, **7** (3), 2012 (2009).
- Liu K.K., Zheng W.W., Wang C.C., Chiu Y.C., Cheng C.L., Lo Y.S., Chen C., Chao J.I. *Nanotechnol.*, **21**, 315106 (2010).
- Chang C.C., Chen P.H., Chu H.L., Lee T.C., Chou C.C., Chao J.I., Su C.Y., Chen J.S., Tsai J.S., Tsai C.M., Ho Y.P., Sun K.W., Cheng C.L., Chen F.R. *Appl. Phys. Lett.*, **93**, 033905 (2008).
- Yuan Y., Chen Y., Liu J.-H., Wang H., Liu Y. *Diamond Relat. Mater.*, **18**, 95 (2009).
- Mohan N., Chen C.S., Hsieh H.H., Wu Y.C., Chang H.C. *Nano-Letters*, **10** (9), 3692 (2010).
- Perevedentseva E., Cheng C.Y., Chung P.H., Tu J.S., Hsieh Y.H., Cheng C.L. *Nanotechnol.*, **18**, 315102 (2007).
- Puzyr A.P., Neshumayev D.A., Tarskikh S.V., Makarskaya G.V., Dolmatov V.Yu., Bondar V.S. *Diamond Relat. Mater.*, **13**, 2020 (2004).
- Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. *Diamond Relat. Mater.*, **16**, 2124 (2007).
- Wasdo S.C., Barber D.S., Denslow N.D., Powers K.W., Palazuelos M., Stevens S.M. Jr., Moudgil B.M., Roberts S.M. *Int. J. Nanotechnol.*, **5** (1), 92 (2008).
- Lynch I., Dawson K.A. *NanoToday*, **3** (1–2), 40 (2008).
- Sethuraman A., Belfort G. *Biophys. J.*, **88**, 1322 (2005).
- Zougrana T., Findenegg G. H., Norde W. *J. Coll. Interface Sci.*, **190**, 437 (1997).
- Barth A., Zscherp C. *Quart. Rev. Biophys.*, **35**, 369 (2002).
- Lück M., Paulke B.-R., Schröder W., Blunk T., Müller R.H. *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 478 (1998).
- Xiao Q., Huang S., Qi Z.D., He Z.K., Liu Y. *BBA*, **1784**, 1020 (2008).
- Henry M., Dupont-Gillain C., Bertrand P. *Langmuir*, **19** (15), 6271 (2003).
- Servagent-Noinville S., Revault M., Quiquampoix H., Baron M.-H. *J. Coll. Interface Sci.*, **221**, 273 (2000).
- Sabatino P., Casella L., Granata A., Iafisco M., Lesci I. G., Monzani E., Roveri N. *J. Coll. Interface Sci.*, **314**, 389 (2007).
- De Paoli Lacerda S.H., Park J.J., Meuse C., Pristiniski D., Becker M.L., Karim A., Douglas J.F. *ASC Nano*, **4** (1), 365 (2010).
- Ortega-Vinuesa J.L., Tengvall P., Lundstrom I. *Thin Solid Films*, **324**, 257 (1998).
- Wangoo N., Suri C.R., Shekhawat G. *Appl. Phys. Lett.*, **92**, 133104 (2008).
- Tamm L.K., Tatulian S.A. *Quart. Rev. Biophys.*, **30** (4), 365 (1997).
- Liu K.K., Cheng C.L., Chang C.C., Chao J.I. *Nanotechnol.*, **18**, 325102 (2007).
- Chung P.H., Perevedentseva E., Tu J.S., Chang C.C., Cheng C.-L. *Diamond Relat. Mater.*, **15**, 622 (2006).
- Tu J.-S., Perevedentseva E., Chung P.-H., Cheng C.-L. *J. Chem. Phys.*, **125**, 174713 (2006).
- Oliva F.Y., Avalle L.B., Cámara O.R., De Pauli C.P. *J. Coll. Interface Sci.*, **261**, 299 (2003).
- Li G., Stewart R., Conlan B., Gilbert A., Roerth P., Nair H. *Vox Sanguinis*, **83**, 332 (2002).
- Jakobsen R.J., Wasacz F.M. *Appl. Spectr.*, **44** (9), 1478 (1990).
- Кулакова И. *ФТТ*, **46**, 621 (2004).
- Reed R.G., Barrington C.M. *J. Biol. Chem.*, **264** (17), 9867 (1989).
- Schroeder H.W. Jr., Cavacini L. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **125** (2), S41 (2010).