

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА ПОСЛЕ ЕГО КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ
НА НАНОАЛМАЗЫ ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА

N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina,
A.V. Baron, V.S. Bondar

THE STUDY OF THE ACTIVITY OF LYSOZYME AFTER ITS COVALENT IMMOBILIZATION
ON DETONATION-SYNTHESIZED NANODIAMONDS

Ронжин Н.О. – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, г. Красноярск. E-mail: roniol@mail.ru

Посохина Е.Д. – магистрант каф. биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, г. Красноярск. E-mail: katerina.p.93@mail.ru

Барон А.В. – канд. мед. наук, доц., ст. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, г. Красноярск. E-mail: alexeybaron@mail.ru

Бондарь В.С. – д-р биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаб. нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, г. Красноярск. E-mail: bondvs@mail.ru

Ronzhin N.O. – Cand. Biol. Sci., Junior Staff Scientist, Lab. of Nanobiotechnology and Bioluminescence, Institute of Biophysics, SB RAS, Krasnoyarsk. E-mail: roniol@mail.ru

Posokhina E.D. – Magistrate Student, Chair of Biotechnology, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk. E-mail: katerina.p.93@mail.ru

Baron A.V. – Cand. Med. Sci., Assoc. Prof., Senior Staff Scientist, Lab. of Nanobiotechnology and Bioluminescence, Institute of Biophysics, SB RAS, Krasoyarsk. E-mail: alexeybaron@mail.ru

Bondar V.S. – Dr. Biol. Sci., Leading Staff Scientist, Head, Lab. of Nanobiotechnology and Bioluminescence, Institute of Biophysics, SB RAS, Krasnoyarsk. E-mail: bondvs@mail.ru

Проведена сравнительная оценка антибактериальной активности свободного и ковалентно связанного с наноалмазами лизоцима с использованием в качестве модельной мишени грамотрицательных светопрозрачных бактерий *Photobacterium phosphoreum*. Активность свободного и иммобилизованного фермента после добавления к клеточной суспензии оценивали по изменению величины ее оптической плотности. Ковалентную пришивку лизоцима проводили на поверхность наноалмазов, активированную бензохиноном. Установлено, что количество иммобилизованного на наноалмазы лизоцима определяется весовым соотношением компонентов (фермент:наночастицы) на стадии ковалентной пришивки белка. Максимальная иммобилизация лизоцима (до 1 мг белка на 1 мг наночастиц) наблюдается при весовом соотношении фермент:наноалмазы – 6:1. Повышение количества белка на стадии пришивки не увеличивает этот показатель. Сделано предположение, что дополнительным фактором, влияющим на

эффективность ковалентного связывания лизоцима, по-видимому, является размер кластеров наночастиц. Установлено, что ковалентно пришитый на наноалмазы лизоцим проявляет функциональную активность и вызывает лизис бактериальных клеток, что подтверждается снижением оптической плотности клеточной суспензии. Добавка к суспензии бактерий хелатора двухвалентных ионов ЭДТА (концентрация 2 мМ) увеличивает эффект иммобилизованного фермента более чем в 2 раза. В сравнительных экспериментах показано, что активность лизоцима в составе комплекса наноалмазы–фермент снижена по сравнению с активностью свободного лизоцима. При равных концентрациях (25 мкг/мл) добавленного в клеточную суспензию свободного и иммобилизованного на наноалмазы лизоцима одинаковый показатель лизиса бактериальных клеток *P. phosphoreum* (снижение оптической плотности на 60–65%) регистрируется через 1 час и 3 часа соответственно. Обсуждаются причины наблюдаемого эффекта.

Ключевые слова: *наноалмазы, лизоцим, ковалентная иммобилизация фермента, антибактериальная активность, светящиеся бактерии Photobacterium phosphoreum.*

A comparative evaluation of the antibacterial activity of free lysozyme and lysozyme covalently conjugated to nanodiamonds was carried out using gram-negative luminescent bacteria Photobacterium phosphoreum as model target. The activity of both free and immobilized lysozyme was evaluated by changes in optical density of bacterial cell suspension after addition of each of them into the suspension. The surface of nanodiamonds intended for covalent immobilization of lysozyme was activated with benzoquinone. It was found that the amount of lysozyme immobilized on nanodiamonds depended on the weight ratio of components (enzyme: nanoparticles) at the stage of covalent binding. Maximum immobilization of lysozyme (up to 1 mg protein per 1 mg nanoparticles) was observed at the weight ratio enzyme: nanodiamonds equal to 6:1. At the increase of protein amount at the stage of covalent immobilization the binding value did not increase. It is suggested that nanoparticle cluster size is likely to be additional factor influencing on covalent binding effectiveness. It was shown that lysozyme covalently conjugated to nanodiamonds exhibited catalytic activity and lysed bacterial cells as confirmed by the decrease in optical density of cell suspension. The addition of chelator of bivalent metal ions – EDTA (at the concentration of 2mM) in the suspension enhanced the action of immobilized enzyme more than twofold. Comparative experiments showed that the activity of lysozyme as part of nanodiamonds–enzyme complex was lower than the activity of free lysozyme. At equal concentration (25 mkg/ml) of free and immobilized lysozyme injected into cell suspension the same value of the reduction of optical density (by 60–65 %) was registered after 1 and 3 hours, respectively. The causes of observed effect are discussed in the study.

Keywords: *nanodiamonds, lysozyme, enzyme covalent immobilization, antibacterial activity, luminescent bacteria Photobacterium phosphoreum.*

Введение. В последние годы многие исследователи отмечают перспективность применения наноалмазов детонационного синтеза в решении широкого спектра биомедицинских задач [1–3]. Одно из активно развиваемых направлений связано с изучением применимости данных

наночастиц в качестве носителей при конструировании новых систем индикации для биомониторинга и медицинской диагностики (включая системы многократного действия) [4, 5] и систем адресной доставки биоактивных субстанций (например, лекарственных веществ) [6, 7]; при создании новых лечебных средств комбинированного и пролонгированного действия [8, 9]. Для использования в этих целях интерес представляют модифицированные наноалмазы (МНА), которые имеют высокоразвитую химически полиморфную, активную поверхность, обладают высокой коллоидной устойчивостью в различных дисперсионных средах и адаптированы для медико-биологических исследований [10–12].

Цель работы. Сравнительная оценка антибактериальной активности свободного и ковалентно иммобилизованного на МНА лизоцима с использованием в качестве модельной мишени грамтрицательных светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum*.

Объекты, методы и результаты исследований. В исследованиях использовали лизоцим из белка куриных яиц («Serva», Германия) и МНА марки RUDDM 0-125 (средний размер кластеров $d_{50} = 49,6$ нм), производимые ООО «Реал-Дзержинск» (Дзержинск, Россия) по технологии [13], разработанной в ИБФ СО РАН (Красноярск, Россия). Для экспериментов готовили гидрозолю с концентрацией МНА 10,0 г/л добавлением деионизованной (ДИ) воды (Milli-Q system, «Millipore», США) к навеске порошка наночастиц.

Комплекс МНА-лизоцим получали ковалентной иммобилизацией фермента на поверхность наночастиц, функционализированную бензохиноном по известной методике [14, 15]. Предварительную активацию поверхности наночастиц бензохиноном и последующую пришивку лизоцима проводили таким же образом, как это изложено в наших предыдущих работах по конструированию на основе МНА и иных белков и ферментов систем адресной доставки биологически активных субстанций и биохимической диагностики физиологически важных веществ [5, 6]. Иммобилизацию фермента на носителе проводили при разных весовых соотношениях компонентов (лизоцим:МНА) – 1:1; 2:1; 4:1; 6:1; 8:1 (мг:мг). Наночастицы с иммобилизованным ферментом (комплекс МНА-лизоцим) собирали центрифугированием (Centrifuge 5415R, «Eppendorf», Германия) при 16000 g в течение 10 мин при 10°C. Полученный супернатант от-

бирали для количественной оценки не иммобилизованного на МНА фермента, которую проводили спектрофотометрически в диапазоне 200–400 нм (спектрофотометр UV-1800, «Shimadzu», Япония). Осадок трижды промывали раствором 0,25М NaCl для полного удаления остатков не связанного ковалентно (или неспецифически адсорбированного) частицами МНА лизоцима, каждый раз ресуспандируя наночастицы в свежей порции промывочного раствора, собирая их центрифугированием при указанных выше условиях и отбирая супернатанты для спектрального анализа. Расчеты количества ковалентно пришитого на МНА лизоцима проводили из величин оптической плотности исходного раствора фермента и супернатантов при длине волны 279 нм.

При сравнительной оценке активности свободного и иммобилизованного на МНА лизоцима модельной мишенью являлись граммотрицательные светящиеся морские бактерии *Photobacterium phosphoreum* – штамм 2015 из Коллекции культур микроорганизмов IBSO, ИБФ СО РАН, Красноярск (<http://www.ibp.ru/collection>). Для экспериментов использовали бактериальные клетки, которые получали при культивировании данного штамма в жидкой питательной среде по известной технологии (<http://www.ibp.ru/collection/>). Бактериальные клетки дважды отмывали от питательной среды физраствором, после чего ресуспандировали в ДИ воде и использовали в исследованиях. Для работы готовили клеточные суспензии с величиной оптической плотности от 0,3 до 0,6 оптических единиц при длине волны 600 нм.

Функциональную активность лизоцима оценивали по изменению величины оптической плотности бактериальной суспензии после добавления аликвоты раствора фермента или гидрозоля комплекса МНА–лизоцим. Выбор этого критерия оценки основывался на общеизвестном механизме действия изучаемого фермента – разрушение пептидогликанового слоя клеточной стенки бактерий, что сопровождается их деструкцией и, как следствие, снижением величины оптической плотности бактериальной суспензии. Контрольные (без добавления препаратов лизоцима) и опытные (с добавлением препаратов фермента) суспензии бактериальных клеток инкубировали при комнатной температуре и постоянном перемешивании со скоростью

250 об/мин (Orbital Shaker OS-10, «BIOSAN», Латвия). Через равные промежутки времени из суспензий отбирали образцы объемом 1 мл и оценивали величину их оптической плотности при длине волны 600 нм (спектрофотометр UV-1800).

В предварительных исследованиях с использованием растворов лизоцима было показано (рис. 1), что в экспериментальных условиях наибольший лизис бактериальных клеток наблюдался через 1 час инкубации. Максимальный эффект достигался при концентрации фермента в клеточной суспензии 25 мкг/мл, в этом случае регистрировалось снижение оптической плотности на 60–65 %. Как видно из представленных данных (рис. 1), двукратное повышение концентрации фермента не приводило к увеличению лизиса бактерий *P. phosphoreum* при исследованных временах инкубации клеточных суспензий.

Установлено (рис. 2), что при ковалентной иммобилизации лизоцима сорбционная емкость МНА существенным образом зависит от весового соотношения компонентов – фермент:наночастицы. Из приведенных данных видно, что в одинаковых экспериментальных условиях максимальная пришивка фермента на МНА (до 1 мг белка на 1 мг наночастиц) достигается при их весовом соотношении 6:1, которое, по-видимому, является оптимальным. Увеличение количества белка в реакционной смеси (соотношение лизоцима и МНА – 8:1) не приводит к повышению показателя сорбционной емкости наночастиц (рис. 2). Следует отметить, что максимальная сорбционная емкость МНА, установленная в данной работе при ковалентной пришивке лизоцима, существенно (в 4–5 раз) превышает аналогичный показатель, полученный нами ранее [16] при использовании весового соотношения фермент:наночастицы – 1:2. Вероятно, не менее важным фактором, влияющим на эффективность ковалентной пришивки белка, может являться и размер кластеров используемых наночастиц. В пользу такого предположения свидетельствует то, что в упомянутой выше работе [16] для пришивки лизоцима нами были использованы МНА со значительно большим средним размером кластеров ($d_{50} = 100$ нм) по сравнению с наночастицами, использованными в настоящей работе.

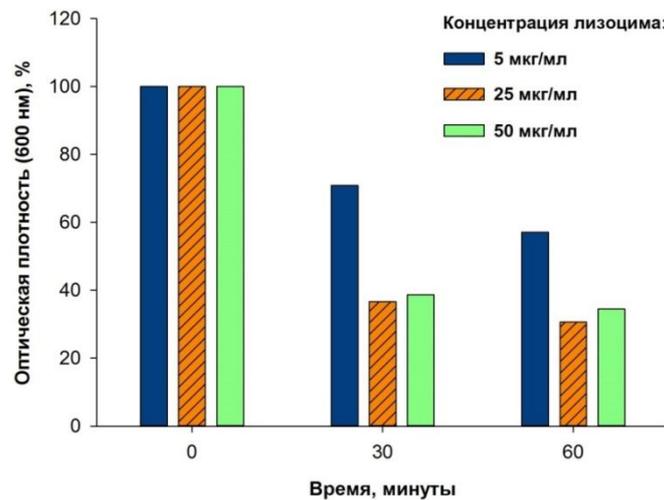


Рис. 1. Оптическая плотность клеточных суспензий *Photobacterium phosphoreum* с добавлением разных концентраций лизоцима в зависимости от времени инкубации.

Данные в сериях нормированы на величины начальной оптической плотности образцов сразу после добавления фермента

Представленные выше результаты свидетельствуют, что соотношение наноноситель: белок и размерный фактор наночастиц могут иметь принципиальное значение для эффективной ковалентной иммобилизации фермента (ферментов).

Как показали эксперименты (рис. 3), ковалентно иммобилизованный на МНА лизоцим проявляет антибактериальную активность и вызывает лизис бактериальных клеток *P. phosphoreum*. Это подтверждается снижением оптической плотности клеточной суспензии (на 20–25%) при ее инкубации в течение 3 часов в присутствии комплекса МНА–лизоцим. Следует отметить, что при проведении этих исследований финальная концентрация вносимого в суспензию фермента, иммобилизованного на МНА, составляла 25 мкг/мл. Как было показано выше (см. рис. 1), при такой концентрации свободного лизоцима наблюдался наибольший эффект лизиса бактерий. Бактериолитический эффект комплекса МНА–лизоцим не опосредован воздействием наночастиц на клетки. В модельных экспериментах мы не выявили различий в изменениях оптической плотности контрольных (без добавления МНА) и опытных (при добавлении МНА) бактериальных суспензий при их инкубации в течение 3 часов. При этом концентрация наночастиц в клеточной суспензии была такой же, как и в случае добавления к суспензии комплекса МНА–лизоцим. С целью

проверки усиления бактериолитической эффективности иммобилизованного на МНА фермента в суспензию бактериальных клеток *P. phosphoreum* предварительно добавляли ЭДТА до финальной концентрации 2 мМ. Известно [17], что такая обработка увеличивает доступ к пептидогликановому слою клеточной стенки грамотрицательных бактерий и, как следствие, повышает их чувствительность к воздействию лизоцима. В результате проведенных исследований было показано (рис. 3), что добавка ЭДТА увеличивает лизирующий эффект комплекса МНА–лизоцим более чем в 2 раза. При этом следует отметить, что активность иммобилизованного лизоцима была, тем не менее, ниже по сравнению с активностью свободного фермента. Из сравнительного анализа данных следует (рис. 1, 3), что при одинаковой концентрации (25 мкг/мл) фермента в клеточной суспензии эффективность действия свободного лизоцима примерно в 3 раза выше по сравнению с лизоцимом, находящимся в составе комплекса. В случае использования свободного фермента снижение оптической плотности суспензии на 60–65 % наблюдается при ее инкубации в течение 1 часа. При использовании комплекса МНА–лизоцим на фоне предварительной добавки ЭДТА в бактериальную суспензию аналогичный показатель достигается при инкубации суспензии в течение 3 часов.

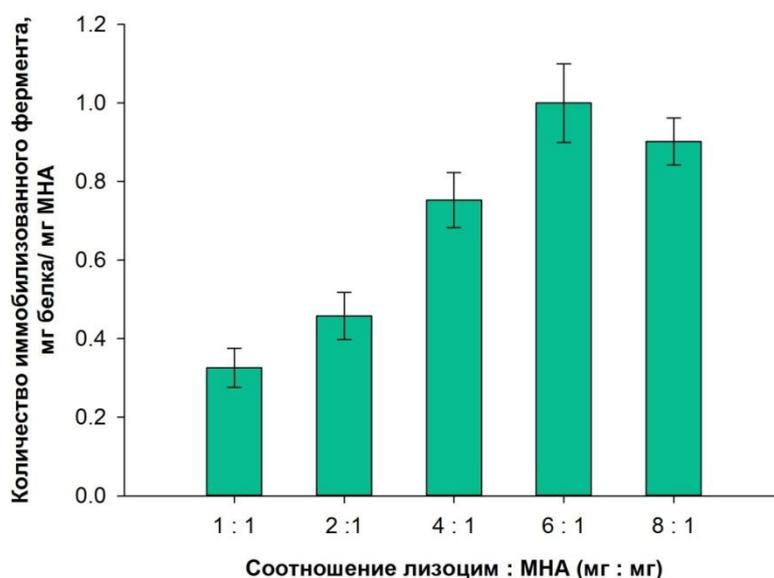


Рис. 2. Сорбционная емкость МНА при ковалентной иммобилизации лизоцима в зависимости от количества фермента в реакции

Наблюдаемое снижение активности ковалентно пришитого на МНА лизоцима по сравнению со свободным ферментом может быть вызвано следующими причинами. Из-за неправильной пространственной ориентации комплексов МНА–лизоцим по отношению к бактериальным клеткам часть молекул активного фермента не взаимодействует с клеточной стенкой. При ковалентной иммобилизации лизоцима на наночастицах экранируется активный центр части молекул фермента, в

результате чего они не могут выполнять каталитическую функцию. Нельзя исключить, что в процессе ковалентной пришивки часть молекул лизоцима может одновременно взаимодействовать с несколькими кластерами МНА. Образование таких сложных агрегатов наночастиц и молекул фермента может приводить к снижению (или потере) каталитической функции лизоцима. Выяснение этих вопросов требует дальнейшего изучения.

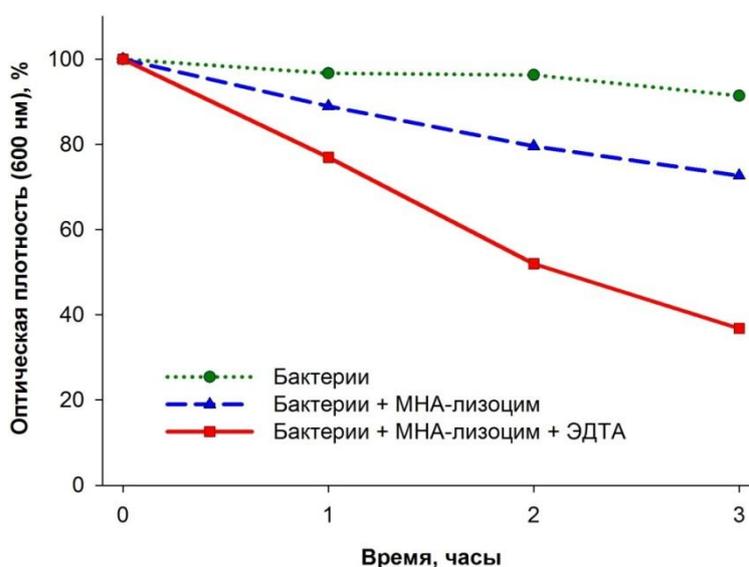


Рис. 3. Оптическая плотность клеточных суспензий *Photobacterium phosphoreum* в присутствии комплекса МНА–лизоцим в зависимости от времени инкубации. Данные в сериях нормированы на величину начальной оптической плотности образцов сразу после добавления комплекса МНА–фермент

Выводы. Таким образом, в работе показано, что иммобилизованный посредством ковалентной пришивки на частицы МНА лизоцим проявляет функциональную активность и вызывает лизис бактериальных клеток. Это продемонстрировано на примере использования в качестве модельной мишени грамотрицательных светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum*. В экспериментах показано, что эффективность ковалентной иммобилизации лизоцима в значительной степени определяется соотношением компонентов – фермент: МНА. Высказано предположение, что еще одним важным фактором, оказывающим влияние на эффективность ковалентной пришивки белка, может являться размер кластеров наночастиц. Установлено, что при соотношении белок:наночастицы – 6:1 на 1 мг МНА со средним размером кластеров $d_{50} = 49,6$ нм может быть ковалентно иммобилизовано до 1 мг лизоцима. В сравнительных экспериментах показано, что функциональная активность фермента, входящего в состав комплекса МНА–лизоцим, снижена по сравнению с активностью свободного фермента. Предполагается, что приоритетной задачей дальнейших исследований будет являться определение и оптимизация условий повышения функциональной активности лизоцима при его ковалентной пришивке на МНА для повышения антибактериальной эффективности комплекса наночастицы–фермент.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 0360-2014-0006).

Литература

1. Ho D., Wang C.-H.K., Chow E.K.-H. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine // *Science Advances*. – 2015. – V. 1. – № 7. – P. 1–14.
2. The properties and applications of nanodiamonds / V.N. Mochalin, O. Shenderova, D.Ho [et al.] // *Nature Nanotechnology*. – 2012. – V. 7. – P. 11–23.
3. Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications // *Solid State Mater. Sci.* – 2009. – V. 34. – P. 18–74.
4. Catalytic activity of nanodiamonds in azocoupling reaction / N.O. Ronzhin, A.P. Puzyr, A.E. Burov [et al.] // *J. Biomater. and Nanobiotechnol.* – 2014. – V.5. – № 3. – P.173–178.
5. Конструирование многоазовой системы биохимического определения мочевины на основе наноалмазов / Н.О. Ронжин, А.В. Барон, В.С. Бондарь [и др.] // *ДАН*. – 2015. – Т. 465. – С. 741–744.
6. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances / K.V. Purtoy, A.I. Petunin, A.E. Burov [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – V. 5. – P. 631–636.
7. The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug Delivery Systems / Y. Zhu, J. Li, W. Li [et al.] // *Theranostics*. – 2012. – V. 2 (3). – P. 302–312.
8. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R.A. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – I. 29. – P. 5720–5728.
9. The adsorption of tetracycline and vancomycin onto nanodiamond with controlled release / J. Giammarco, V.N. Mochalin, J. Haeckel [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2016. – V. 468. – P. 253–261.
10. Colloidal stability of modified nanodiamond particles / N. Gibson, O. Shenderova, T.J.M. Luo [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2009. – V. 18. – P. 620–626.
11. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds / A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky [et al.] // *NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem.* – 2005. – V. 192. – P. 261–270.
12. Бондарь В.С., Пузырь А.П. Наноалмазы для биологических исследований // *Физика твердого тела*. – 2004. – Т. 46 (4). – С. 716–719.
13. Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью: пат. №2252192 Рос. Федерация : МПК С01В 31/06 / Пузырь А.П., Бондарь В.С. – Оpubл. 20.05.2005, Бюл. № 14.

14. Brandt J., Andersson L.O., Porath J. Covalent Attachment of Proteins to Polysaccharide Carriers by Means of Benzoquinone // *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure.* – 1975. – V. 386 (1). – P. 196–202.
15. Ready to Use P-Benzoquinone-Activated Supports for Biochemical Coupling with Special Applications for Laccase Immobilization / M.-A. Mateescu, G. Weltrowska, E. Agostinelli [et al.] // *Biotech. Tech.* – 1989. – V. 3 (6). – P. 415–420.
16. Могильная О.А., Бондарь В.С. Сравнительные исследования антибактериальных свойств лизоцима при его адсорбции и ковалентном связывании на наноалмазах // *Российские нанотехнологии.* – 2012. – Т. 7. – С. 43–48.
17. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
7. The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug Delivery Systems / Y. Zhu, J. Li, W. Li [et al.] // *Theranostics.* – 2012. – V. 2 (3). – P. 302–312.
8. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R.A. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – V. 30. – I. 29. – P. 5720–5728.
9. The adsorption of tetracycline and vancomycin onto nanodiamond with controlled release / J. Giammarco, V.N. Mochalin, J. Haeckel [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2016. – V. 468. – P. 253–261.
10. Colloidal stability of modified nanodiamond particles / N. Gibson, O. Shenderova, T.J.M. Luo [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2009. – V. 18. – P. 620–626.
11. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds / A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky [et al.] // *NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem.* – 2005. – V. 192. – P. 261–270.
12. Bondar' V.S., Puzyr' A.P. Nanoalmazy dlja biologicheskikh issledovanij // *Fizika tverdogo tela.* – 2004. – Т. 46 (4). – С. 716–719.
13. Sposob poluchenija nanoalmazov vzryvnogo sinteza s povyshennoj kolloidnoj ustojchivost'ju: pat. №2252192 Ros. Federacija : MPK C01B 31/06 / Puzyr' A.P., Bondar' V.S. – Opubl. 20.05.2005, Bjul. № 14.
14. Brandt J., Andersson L.O., Porath J. Covalent Attachment of Proteins to Polysaccharide Carriers by Means of Benzoquinone // *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure.* – 1975. – V. 386 (1). – P. 196–202.
15. Ready to Use P-Benzoquinone-Activated Supports for Biochemical Coupling with Special Applications for Laccase Immobilization / M.-A. Mateescu, G. Weltrowska, E. Agostinelli [et al.] // *Biotech. Tech.* – 1989. – V. 3 (6). – P. 415–420.
16. Mogil'naja O.A., Bondar' V.S. Sravnitel'nye issledovanija antibakterial'nyh svojstv lizocima pri ego adsorbicii i kovalentnom svjazyvanii na nanoalmazah // *Rossijskie nanotehnologii.* – 2012. – Т. 7. – С. 43–48.
17. Skoups R. Metody oчитки belkov. – М.: Мир, 1985. – 358 с.

Literatura

1. Ho D., Wang C.-H.K., Chow E.K.-H. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine // *Science Advances.* – 2015. – V. 1. – № 7. – P. 1–14.
2. The properties and applications of nanodiamonds / V.N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho [et al.] // *Nature Nanotechnology.* – 2012. – V. 7. – P. 11–23.
3. Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications // *Solid State Mater. Sci.* – 2009. – V. 34. – P. 18–74.
4. Catalytic activity of nanodiamonds in azocoupling reaction / N.O. Ronzhin, A.P. Puzyr, A.E. Burov [et al.] // *J. Biomater. and Nanobiotechnol.* – 2014. – V.5. – № 3. – P.173–178.
5. Konstruirovanie mnogorazovoj sistemy biohimicheskogo opredelenija mocheviny na osnove nanoalmazov / N.O. Ronzhin, A.V. Baron, V.S. Bondar' [i dr.] // *DAN.* – 2015. – Т. 465. – С. 741–744.
6. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances / K.V. Purtov, A.I. Petunin, A.E. Burov [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – V. 5. – P. 631–636.
7. The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug Delivery Systems / Y. Zhu, J. Li, W. Li [et al.] // *Theranostics.* – 2012. – V. 2 (3). – P. 302–312.
8. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R.A. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – V. 30. – I. 29. – P. 5720–5728.
9. The adsorption of tetracycline and vancomycin onto nanodiamond with controlled release / J. Giammarco, V.N. Mochalin, J. Haeckel [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2016. – V. 468. – P. 253–261.
10. Colloidal stability of modified nanodiamond particles / N. Gibson, O. Shenderova, T.J.M. Luo [et al.] // *Diamond Relat. Mater.* – 2009. – V. 18. – P. 620–626.
11. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds / A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky [et al.] // *NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem.* – 2005. – V. 192. – P. 261–270.
12. Bondar' V.S., Puzyr' A.P. Nanoalmazy dlja biologicheskikh issledovanij // *Fizika tverdogo tela.* – 2004. – Т. 46 (4). – С. 716–719.
13. Sposob poluchenija nanoalmazov vzryvnogo sinteza s povyshennoj kolloidnoj ustojchivost'ju: pat. №2252192 Ros. Federacija : MPK C01B 31/06 / Puzyr' A.P., Bondar' V.S. – Opubl. 20.05.2005, Bjul. № 14.
14. Brandt J., Andersson L.O., Porath J. Covalent Attachment of Proteins to Polysaccharide Carriers by Means of Benzoquinone // *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure.* – 1975. – V. 386 (1). – P. 196–202.
15. Ready to Use P-Benzoquinone-Activated Supports for Biochemical Coupling with Special Applications for Laccase Immobilization / M.-A. Mateescu, G. Weltrowska, E. Agostinelli [et al.] // *Biotech. Tech.* – 1989. – V. 3 (6). – P. 415–420.
16. Mogil'naja O.A., Bondar' V.S. Sravnitel'nye issledovanija antibakterial'nyh svojstv lizocima pri ego adsorbicii i kovalentnom svjazyvanii na nanoalmazah // *Rossijskie nanotehnologii.* – 2012. – Т. 7. – С. 43–48.
17. Skoups R. Metody oчитки belkov. – М.: Мир, 1985. – 358 с.

