

3. Challah-Jacques, M., P. Chesne, J. and Renard. 2003. Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer. *J. Renard Cloning and stem cells*. 5 (4):295–299.
4. Tao, Y., C. Cao, and M. Zhang. 2008. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation. *J. Of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92(4): 438–447.
5. Gordon, I. 1989. Large-scale production of cattle embryos by in vitro culture methods. *J. Ag. Biotech. News and Inform*. 13:345–348.
6. Zhao, Y., P. Brezina, and C. Hsu. 2011. In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *J. Biochimica et Biophysica Acta*. 1810:843–852.
7. Kane, M. T. 2003. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *J. Animal Reproduction Science*. 79:171–190.
8. Kosenyuk, Y. 2006. Nuclear transfer in rabbit: the state of the art. *Ann. Anim. Sci.* 1:109–122.
9. Tarkowski, A. K. 1966. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *J. Cytogenetic*. 5(3):394–400.
10. Watson, A. J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*. 85:11–13.



УДК 636.4.082:[620.3^591.463.1]

ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОБІОМАТЕРІАЛІВ

С. І. КОВТУН¹, Н. П. ГАЛАГАН², О. В. ЩЕРБАК¹

¹Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

²Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН (Київ, Україна)

kovtun_si@i.ua

Застосовано нанобіоматеріали на основі високодисперсного кремнезему в системі біотехнологічних досліджень. Здійснено оцінку *in vitro* біологічної активності 0,001%-ї концентрації нанобіоматеріалів, синтезованих на основі високодисперсного кремнезему (ВДК, 1) та: 2) альбуміну сироватки крові великої рогатої худоби (БСА, ВДК/БСА); 3) N-ацетилнейрамінової кислоти (N-АНК, ВДК/N-АНК) і 4) ВДК, БСА і N-ацетилнейрамінової кислоти (ВДК/БСА/N-АНК). Показано, що стимулюючий ефект нанобіоматеріалів на життєздатність кріоконсервованих сперматозоїдів бугаїв голитинської породи залежить від природи їх поверхні. Встановлено, що після перебування сперматозоїдів із додаванням 0,001%-ї концентрації ВДК/БСА/N-АНК упродовж 30 хвилин відбулось зростання активності сперматозоїдів на 10,0%, порівняно з іншими групами. В статті відображена перспективність проведення подальших досліджень з використанням нанобіоматеріалів у системі збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин.

Ключові слова: бугаї, нанобіоматеріал, високодисперсний кремнезем, еякульовані сперматозоїди, збереження генофонду, кріоконсервація

EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF NANOBIO MATERIALS

S. I. Kovtun¹, N. P. Galagan², O. V. Shcherbak¹

¹Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

²O.O. Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS (Kyiv, Ukraine)

Applied nanobiomaterial on the basis of ultrafine silica in the system of biotechnology research. Evaluated *in vitro* the biological activity of 0.001% concentration nanobiomaterials, synthesized on the basis of ultrafine silica (UFS, 1) and: 2) albumin serum bovine (BSA, UFS/BSA); 3) N-acetylneuraminic acid (NANA, BDK/NANA) and 4) UFS, BSA and N-acetylneuraminic acid

© С. І. КОВТУН, Н. П. ГАЛАГАН, О. В. ЩЕРБАК, 2016

(UFS/BSA/NANA). It is shown that the stimulating effect nanobiomaterials on the viability of cryo-preserved sperm of bulls of Holstein breed depends on the nature of their surface. Found that after exposure of spermatozoa with the addition of 0.001% concentration UFS/BSA/NANA within 30 minutes there was an increase in the activity of spermatozoa of 10.0%, compared with other groups. The article describes the prospects for further research using nanobiomaterials in the system for the conservation and sustainable use of genetic resources of farm animals.

Keywords: bulls, nanobiomaterials, ultrafine silica, ejaculating of spermatozoa, preserve the gene pool, cryopreservation

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НАНОБИОМАТЕРИАЛОВ

С. І. Ковтун¹, Н. П. Галаган², О. В. Щербак¹

¹Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН (Чубинское, Украина)

²Институт химии поверхности им. А.А.Чуйко Национальной академии наук Украины (Киев, Украина)

Представлены результаты использования нанобиоматериалов на основе высокодисперсного кремнезема в системе биотехнологических исследований. Осуществлена оценка *in vitro* биологической активности 0,001%-й концентрации нанобиоматериалов, синтезированных на основе высокодисперсного кремнезема (ВДК, 1) и: 2) альбумина сыворотки крови крупного рогатого скота (БСА, ВДК/БСА); 3) N-ацетилнейраминовой кислоты (N-АНК, ВДК/N-АНК) и 4) ВДК, БСА и N-ацетилнейраминовой кислоты (ВДК/БСА/N-АНК). Показано, что стимулирующий эффект нанобиоматериалов на жизнеспособность криоконсервированных сперматозоидов быков голштинской породы зависит от природы их поверхности. Установлено, что после пребывания сперматозоидов с добавлением 0,001%-й концентрации ВДК/БСА/N-АНК в течение 30 минут произошел рост активности сперматозоидов на 10,0%, по сравнению с другими группами. В статье отображена перспективность проведения дальнейших исследований с использованием нанобиоматериалов в системе сохранения и рационального использования генетических ресурсов сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: быки, нанобиоматериал, высокодисперсный кремнезём, эякулированные сперматозоиды, сохранение генофонда, криоконсервация

Вступ. Вирішальну роль у сучасній технології довгострокового зберігання генофонду сільськогосподарських тварин відіграють не тільки умови низькотемпературної консервації гамет та ембріонів, а й склад кріосередовищ, які здатні максимально забезпечити їх цілісність під час цього процесу. Тому кріосередовища постійно удосконалюються, щоб забезпечити більшу життєздатність клітин після їх розморожування. Раніше було встановлено, що додавання в незначній кількості високодисперсного (нанорозмірного) кремнезему до стандартного ЛГЖ-кріосередовища для заморожування сперми бугаїв призводить до підвищення виживаності гамет після їх деконсервації [1]. Щодо ВДК, то він широко застосовується при виготовленні лікарських засобів як допоміжна речовина, тому що в межах певних концентрацій є фізіологічно нешкідливим і сумісним із біологічною системою [2]. Такий SiO₂ має розвинену поверхню, вкриту гідроксильними групами, яка виявляє високі адсорбційні властивості щодо багатьох речовин. Заміщення гідроксилів синтетичними або природними сполуками дає можливість створювати на його основі іммобілізовані біологічно активні препарати пролонгованої та адсорбційної дії [3]. Так закріплення на поверхні ВДК деяких вуглеводів дозволило одержати нанобиоматеріали (НБМ), які при додаванні їх до деяких кріосередовищ в порівнянні із вихідним SiO₂ сприяли більшій виживаності гамет після розморожування [4, 5].

Тому метою наших досліджень було створення НБМ на основі ВДК, альбуміну сироватки крові великої рогатої худоби (БСА) та N-ацетилнейрамінової кислоти (N-АНК), а також перевірка їх біологічної активності з використанням еякульованих гамет бугаїв.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведено в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. Використано сперму бугаїв голштинської породи Стролх 379536/678, Том 379545/345 та Триплле 244, яка зберігається в

банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН біля 30 років.

Синтез біологічно активних наноматеріалів на основі ВДК та біомолекул здійснено на базі Інституту хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України. Для одержання НБМ використовували ВДК А-300 із $S_{\text{пит}}=285 \text{ м}^2/\text{г}$ (м. Калуш, Україна), який попередньо прожарювали 2 години за температури 400°C ; БСА ($M_r \sim 67000$, фракція V; «Fluka», США) та N-АНК («Sigma», США). В дослідженнях були використані НБМ, одержані двома різними способами. НБМ ВДК/N-АНК був одержаний методом просочування адсорбента водним розчином N-АНК (так звана імпрегнація), тоді як ВДК/БСА/N-АНК – методом нековалентної іммобілізації. В разі останнього поверхню ВДК спочатку модифікували білком. Подібний підхід був зумовлений неспроможністю N-АНК безпосередньо адсорбуватись на поверхні ВДК. Тому на першому етапі проводили адсорбцію на ній БСА в статичних умовах при $\text{pH}=4,8$, що є його ізоелектричною точкою [3], з вихідною концентрацією водного розчину альбуміну $1 - 14 \text{ мг/мл}$. Співвідношення адсорбент:адсорбат становило 10:1. Для досягнення адсорбційної рівноваги розчин білку витримували дві години при постійному перемішуванні в присутності ВДК, після чого осад кремнезему відокремлювали центрифугуванням (4000 об/хв, 10 хв.) та висушували його упродовж чотирьох діб у термостаті за температури 37°C . Після висушування його ретельно розтирали в ступці та визначали ступінь десорбції у воду. Потім знову центрифугували та висушували, розтирали та надалі використовували як адсорбент для одержання НБМ – ВДК/БСА/N-АНК. В цьому випадку в якості адсорбату був водний розчин N-АНК в межах концентрацій $6,5 - 60 \text{ мкг/мл}$. Процес адсорбції N-АНК на поверхні ВДК, модифікованій білком, та десорбції проводили в умовах, зазначених вище для білка, за винятком того, що час адсорбції для N-АНК тривав одну годину [3].

Для визначення концентрації білка в розчині використовували мікробіуретовий метод [7] з використанням фотоелектроколориметра КФК-2. Щодо N-АНК, то для визначення її концентрації у розчині застосовували метод [8] з використанням спектрофотометру марки Lambda-35 (Perkin-Elmer, USA).

Побудову ізотерм адсорбції біомолекул, що оцінювали цей процес, здійснено завдяки розрахункам параметрів процесу, виконані згідно [9, 10].

Для підтвердження іммобілізації як білку на ВДК, так і N-АНК на ВДК/БСА використана ІЧ-спектроскопія. ІЧ-спектри знімали на спектрометрі Thermo Nicolet Nexus FTIR в області $4000-400 \text{ см}^{-1}$. Для зменшення розсіювання ІЧ-випромінювання зразки змішували з попередньо підсушеним KBr («Riedel-de Haen», Франція, ч.д.а.) у співвідношенні 1:19 для білка та 1:4 для наноматеріалу. Для обробки спектрів використовували програмне забезпечення фірми «Omnis». Оцінку ефективності взаємодії біомолекул з адсорбентом проводили за інтенсивністю смуги валентних коливань в області 3750 см^{-1} , що належить ізольованим(вільним) ОН-групам [3].

Для вивчення особливостей формування поверхневого шару НБМ із білком як адсорбенту для іммобілізації N-АНК та у відповідності із результатами адсорбції та ІЧ-спектроскопії використані мас-спектрометричні дослідження. Їх проводили методом температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії (ТПД МС) на приладі МХ-7304А (Україна, Суми). Специфічні деталі та особливості методу ТПД МС розглянуті в роботі [11]. Для підтвердження успішної іммобілізації БСА на поверхні ВДК використовували наявність в термограмах розкладу зразків НБМ ВДК/БСА піку 34 а.о.м. , який є тестовим для білкового шару [12-14].

НБМ 1) ВДК; 2) ВДК/БСА; 3) ВДК/N-АНК і 4) ВДК/БСА/N-АНК додавались до гамет бугаїв після їх розморожування в концентрації $0,001\%$. Дія НБМ на сперматозоїди оцінювалась у відсотках за показником життєздатності у відповідності з їх активним рухом.

Результати досліджень. Наявність поверхневого шару із біомолекул у зразках НБМ були перевірені розрахунками параметрів адсорбції та такими фізико-хімічними методами, як інфра-червона спектроскопія та температурно-програмована мас-спектрометрія.

Відомо [15], що ефективність адсорбційної взаємодії із носієм оцінюється по ізотермам адсорбції, які побудовані за параметрами процесу згідно [9, 10], і вигляд яких залежить від механізму взаємодії адсорбата і адсорбента. У відповідності із рис. 1 (а, б) ізотерми БСА та N-АНК можна віднести до ленгмюрівського типу [15]. Це свідчить про сильну взаємодію білку та поверхні ВДК. Максимальна адсорбція (Γ_{∞}) для альбуміну становила 410 мг/г, а його десорбція з поверхні ВДК не перевищувала 11,3%. Ізотерма, що представлена на рис. 1б свідчить, що попередня іммобілізація білку на поверхні ВДК сприяла адсорбції N-АНК на ВДК. Десорбція N-АНК із поверхні НБМ ВДК/БСА незначна (0,015%).

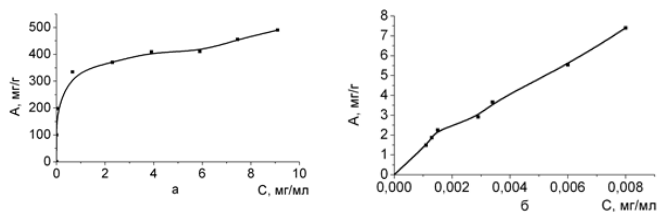


Рис. 1. Ізотерми адсорбції білка БСА, адсорбованого на ВДК (а) та N-АНК, адсорбованої на НБМ ВДК/БСА(б)

На рис. 2 (а, б) наведені термограми БСА у конденсованому та адсорбованому на поверхні ВДК станах. При розкладі БСА в конденсованому стані спостерігається поява піку 34 а.о.м., яка інтерпретується як маса молекули сірководню, що утворюється внаслідок розкладу залишків сірковмісних амінокислот у складі білка. Його адсорбція призводить до розширення максимуму термічного виділення 34 а.о.м. від 30°C до 60°C і більше, тобто процес термічного розкладу втрачає свій кооперативний характер внаслідок взаємодії БСА із поверхнею високодисперсного носія. Це зумовлено також як зменшенням кількості ОН-груп поверхні ВДК, так і кількістю адсорбованого білка. Зменшення інтенсивності піку визначається стабілізацією молекули білка при контакті із адсорбентом.

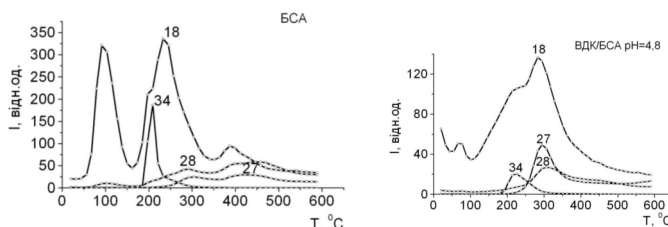


Рис. 2. Термограми розкладання БСА в конденсованому (а) та адсорбованому (б) станах

В ІЧ-спектрі вихідного кремнезему(рис. 3, крива 2) смуга валентних ОН-коливань спостерігається в області 3750 cm^{-1} , яка відповідає ізольованим ОН-групам. Зменшення інтенсивності смуги при $\lambda=3750 \text{ cm}^{-1}$, яке спостерігалось після контакту БСА або N-АНК із ВДК/БСА (рис. 3), свідчить про утворення водневих зв'язків поверхневим шаром гідроксильних груп, таким чином підтверджуючи іммобілізацію біомолекул на поверхні адсорбенту.

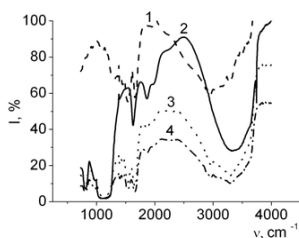


Рис. 3. ІЧ-спектри біомолекул, адсорбованих на поверхні ВДК:
1 – БСА; 2- ВДК; 3 – ВДК/БСА/N-АНК ; 4 - ВДК/БСА

Це свідчить про їх зв'язування із функціональними групами адсорбованих біомолекул [6]. В разі ВДК/БСА спостерігається також зміщення так званих смуг поглинання Амід I та Амід II, котрі є характеристичними в ІЧ-спектроскопії білків [16]. Тому є підстави вважати утворення Н-зв'язку між N-H-групами молекули БСА та гідроксилами ВДК [17].

Імобілізація N-АНК на поверхні композиту ВДК/БСА відбувається за участю гідроксильних, карбонільних, аміногруп як білку, так і самого вуглеводу (рис. 3).

Отже завдяки попередній модифікації ВДК білком БСА здійснено на ній імобілізацію N-АНК, що дозволило одержати НБМ на їх основі.

Наступним етапом наших досліджень було оцінити біологічну активність створених нанобіоматеріалів. Біологічну активність НБМ виявляли шляхом дослідження впливу додавання НБМ на життєздатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів бугаїв голштинської породи.

Встановлено, що після розморожування сперматозоїдів бугаїв вони проявляли в середньому активність на рівні $50,0 \pm 5,77\%$ (табл. 1). Цей показник активності гамет у контролі (без додавання НБМ) знизився упродовж 30 хв. лише на 3,3%, і становив $46,7 \pm 6,01\%$.

1. Показники життєздатності еякульованих сперматозоїдів бугаїв голштинської породи

Кличка, №	Активність після розморожування, %	Вживаність після розморожування, години
Стролх 379536/678	50	4,5
Том 379545/345	40	4,0
Триплле 244	60	5,5
Середній показник	$50 \pm 5,77$	$4,7 \pm 0,44$

В дослідних групах (рис. 4) через 30 хв. найбільш активними були гамети, які перебували з ВДК/БСА/N-АНК ($56,7 \pm 8,82$). Найнижчу активність мали гамети, які перебували із ВДК. Порівняно із контролем вона знизилась на 10% та на 20%, порівняно з ВДК/БСА/N-АНК. Отже, додавання ВДК в концентрації 0,001% до розморожених сперматозоїдів бугаїв є недоцільним.

За наявності НБМ ВДК/БСА на відміну від ВДК/БСА/N-АНК рухливість гамет знизилась лише на 1,7%. В той же час у присутності НБМ без білка, а саме ВДК/N-АНК, спостерігали зниження рухливості на 11,7%. Це свідчить про можливість стабілізації кількості рухливих клітин за рахунок білку в НБМ. Однак, при малих концентраціях наночасток у середовищі із клітинами можливість їх контакту із клітинною поверхнею незначна. Тому можна припустити, що цей ефект спостерігається завдяки взаємодії НБМ із компонентами плазми сім'яної рідини та кріосередовища і це може призводити до перерозподілу форм води [6].

Через 60 хвилин від початку дослідження найбільш активними були гамети із ВДК/N-АНК ($48,3 \pm 4,41\%$) та ВДК/БСА/N-АНК ($51,7 \pm 8,82\%$). В контролі на цей період спостерігалась нижча рухливість гамет ($41,7 \pm 7,26\%$), ніж з вищевказаними дослідними групами, та вища на 13,4% і 1,7% порівняно із ВДК та ВДК/БСА. Через 1,5 години від початку дослідження в контролі і в дослідних групах спостерігалось поступове зниження їх рухливості.

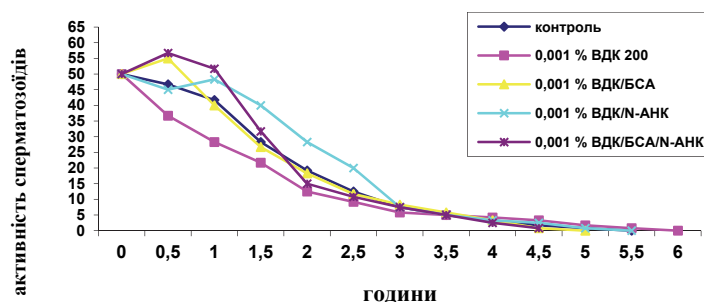


Рис. 4. Вплив НБМ на життєздатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів бугаїв

Отже, при оцінці біологічної активності НБМ найбільш перспективними виявились ВДК/БСА та ВДК/БСА/Н-АНК. Перший НБМ забезпечив початкове зростання рухливості сперматозоїдів до рівня $55,0 \pm 5,77\%$, а ВДК/БСА/Н-АНК, як було вказано вище – до $56,7 \pm 8,82\%$. Різниці між ними практично не виявлено, але відмічено особливу роль білка в її прояві як природної поверхневоактивної речовини. Хоча механізм прояву кожного із НБМ скоріш за все різний. Щодо Н-АНК в НБМ, то згідно своїм функціональним властивостям, вона може забезпечувати підвищений ступінь хімічної спорідненості наноматеріалів до певних компонентів сім'яної рідини або відповідних рецепторів клітини на відміну від білка.

Висновки. Отже, при вивченні впливу нанобіоматеріалів найбільш активними виявились ВДК/БСА/Н-АНК та ВДК/Н-АНК. Присутність цих нанобіоматеріалів у деконсервованих еякульованих сперматозоїдах бугаїв забезпечувала позитивний вплив на життєздатність таких сперматозоїдів. У представлених дослідженнях нами застосовано схему деконсервації еякульованих сперматозоїдів бугаїв та встановлено ефективність використання ВДК/БСА/Н-АНК для підвищення життєздатності таких сперматозоїдів.

Подяка. За науковий супровід роботи висловлюємо вдячність завідувачу лабораторії мас-спектрометрії нанорозмірних систем Інституту хімії поверхні Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України В. О. Покровському.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Использование аэросилов в практике искусственного осеменения / В. Е. Недава, А. А. Чуйко, Л. А. Бегма, А. А. Бегма // Зоотехния. – 1990. – № 8. – С. 63–65.
2. Алуштин, М. Т. Аэросил и его применение в фармацевтической практике / М. Т. Алуштин, М. И. Астраханова // Фармация. – 1958. – Вып. 17, № 6. – С. 73–77.
3. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А. А. Чуйко. – К. : Наукова думка, 2003. – 415 с.
4. Галаган, Н. П. Наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема и биомолекул в средах с репродуктивными клетками / Н. П. Галаган // Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья : материалы II Всерос. науч. конф. с международным участием – М.; Белгород, 2006. – С. 55–59.
5. Буркат, В. П. Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда / В. П. Буркат, С. И. Ковтун, Н. П. Галаган // Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных : материалы международной научно-практической конференции. – Дубровицы – Быково, 2007. – С. 450–452.
6. Гунько, В. М. Вода на межфазной границе / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наукова думка, 2009. – 694 с.
7. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М. : Высш.шк., 1980. – 215 с.
8. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград: Публ. Дом Ленинград. у-та, 1982. – 272 с.
9. Митрофанов, П. П. Практикум по физической и коллоидной химии / П. П. Митрофанов. – М. : Медгиз, 1950. – 183 с.
10. Айвазов, Б. В. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции / Б. В. Айвазов, – М. : Высш. шк., 1973. – 208 с.
11. Pokrovskiy, V. A. Temperature-programmed desorption mass spectrometry / V. A. Pokrovskiy // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. – 2000. – V. 62. – P. 407–415.
12. Гриценко, І. В. Дослідження термічного розкладу альбуміну методом температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії / І. В. Гриценко, Б. Г. Місчанчук, Н. П. Галаган // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2004. – Вип. 10. – С. 187–191.
13. Температурно-програмована десорбційна мас-спектрометрія бичачого сироваткового альбуміну в конденсованому стані і адсорбованого на поверхні високодисперсних оксидів /

Н. Ю. Клименко, Н. П. Галаган, Б. Г. Місчанчук, В. І. Зарко, В. О. Покровський // Химия, физика и технология поверхности. – 2008. – Вып. 14. – С. 456–466.

14. Temperature-programmed desorption as a tool for quantification of protein adsorption capacity in micro- and nanoporous materials / R. Gadiou, E. A. dos Santos, M. Vijayaraj, K. Anselme, J. Dentzer, G. A. Soares, C. Vix-Guterl // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2009. – V. 73. – P. 168–174.

15. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел / Под ред. Г. Парфита, К. Рочестера. – М. : Мир, 1986. – 488 с.

16. Чиргадзе, Ю. Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков / Ю. Н. Чиргадзе. – М. : Наука, 1965. – 134 с.

17. Тарасевич, Ю. И. Взаимодействие глобулярных белков с поверхностью кремнезема / Ю. И. Тарасевич, Л. И. Монахова // *Коллоид. журн.* – 2002. – Т. 64, №4. – С. 535–540.

REFERENCES

1. Nedava, V. E., A. A. Chujko, L. A. Begma, and A. A. Begma. 1990. Ispol'zovanie ayerosilov v praktike iskusstvennogo osemneniya – The use of aerosil in the practice of artificial insemination. *Zootehniya – Zootehniya*. 8:63–65 (in Russian).

2. Alushtin, M. T., and M. I. Astrakhanova. 1958. Aerosil i ego primenenie v farmatsevticheskoy praktike – Aerosil and its use in the pharmaceutical practice. *Farmatsiya – Pharmacia*. 17(6):73–77 (in Russian).

3. Chuyko, A. A. 2003. *Meditinskaya khimiya i klinicheskoe primenenie dioksida kremniya – Medicinal chemistry and clinical application of silica*. Kiev, Naukova dumka, 415 (in Russian).

4. Galagan, N. P. 2006. Nanomaterialy na osnove vysokodispersnogo kremnezema i biomolekul v sredakh s reproduktivnymi kletkami – Nanomaterials based on highly dispersed silica and biomolecules in environments with reproductive cells. *Sorbenty kak faktor kachestva zhizni i zdorov'ya : materialy II Vseros. nauch. konf. s mezhdunarodnym uchastiem – Sorbents as a factor in quality of life and health: Materials II All-Russia. scientific. Conf. with international participation*. Moskva-Belgorod, 55–59 (in Russian).

5. Burkat, V. P. S. I. Kovtun, and N. P. Galagan. 2007. Nanobiotehnologicheskie metody dlya sokhraneniya genofonda – Nano Biotechnological methods for genetic conservation. *Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nye problemy biologii vosпроизводства zhivotnykh» – Proceedings of the international scientific-practical conference "Actual problems of animal reproduction biology"*. Dubrovitsy – Bykovo, 450–452 (in Russian).

6. Gun'ko, V. M., V. V. Turov, and P. P. Gorbik. 2009. *Voda na mezhfaznoy granitse – The water at the interface*. Kiev, Naukova dumka, 694 (in Russian).

7. Kochetov, G. A. 1980. *Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii – Practical Guide to enzymology*. Moskva, Vysshaya shkola, 215 (in Russian).

8. Prokhorova, M. I. 1982. *Metody biokhimicheskikh issledovaniy (lipidnyy i energeticheskiy obmen) – Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism)*. Leningrad, Publ. Dom Leningrad.u-ta., 272 (in Russian).

9. Mitrofanov, P. P. 1950. *Praktikum po fizicheskoy i kolloidnoy khimii – Workshop on Physical and Colloid Chemistry*. Moskva, Medgiz, 183 (in Russian).

10. Ayvazov, B. V. 1973. *Praktikum po khimii poverkhnostnykh yavleniy i adsorbtsii – Workshop on surface chemistry and adsorption*. Moskva, Vysshaya. shkola., 208 (in Russian).

11. Pokrovskiy, V. A. 2000. Temperature-programmed desorption mass spectrometry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 62:407–415.

12. Hrytsenko, I. V., B. H. Mischanuk, and N. P. Halahan. 2004. Doslidzhennya termichnoho rozkladu al'buminu metodom temperaturno-prohramovanoi desorbtsiynoi mas-spektrometriyi – Doslidzhennya termichnogo rozkladu albuminu by temperature-programovanoi desorbtsiynoi weight-spektrometri. *Khimiya, fizyka ta tekhnolohiya poverkhni – Himiya, fizika that tehnologiya poverhni*. 10:187-191 (in Ukrainian).

13. Klymenko, N. Yu., N. P. Halahan, B. H. Mischanchuk, V. I. Zarko, and V. O. Pokrovs'kyy. 2008. Temperaturno-prohramovana desorbtsiyna mas-spektrometriya bychachoho syrovatkovoho al'buminu v kondensovanomu stani i adsorbovanoho na poverkhni vysokodispersnykh oksydiv – Temperature-programovana desorbtsiyna weight-spektrometriya bichachoho sirovatkovogo albuminu in kondensovanomu stani i adsorbovanoho on poverhni visokodispersnih oksydiv. *Khymyya, fizyka y tekhnolohyya poverkhnosty – Chemistry, physics and surface technology*. 14:456–466 (in Ukrainian).
14. Gadiou, R., E. A. Santos dos, M. Viyayaray, K. Anselme, J. Dentzer, G.A. Soares, and C. Vix-Guterl. 2009. Temperature-programmed desorption as a tool for quantification of protein adsorption capacity in micro- and nanoporous materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 73:168–174.
15. Parfita, G. and K. Rochestera. 1986. Adsorbtsiya iz rastvorov na poverkhnosti tverdykh tel – Adsorption from solutions on solid surfaces. *Pod red. G. Parfita, K. Rochestera – Ed. G.Parfita, K.Rochestera*. Moskva, Mir, 488 (in Russian).
16. Chirgadze, Yu. N. 1965. *Infrakrasnye spektry i struktura polipeptidov i belkov – Infrared spectra and structure of polypeptides and proteins*. Moskva, Nauka, 134 (in Russian).
17. Tarasevich, Yu. I., and L. I. Monakhova 2002. Vzaimodeystvie globulyarnikh belkov s poverkhnost'yu kremnezema – The interaction with the surface of globular proteins silica. *Kolloid. Zhurn – Colloid. zhurn*. 64(4):535-540 (in Russian).

