

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА “ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ
БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ”**

БОРОВА МАРІЯ МИКОЛАЇВНА



УДК 546.3:544.77:577-04

**«ЗЕЛЕНИЙ» СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ КВАНТОВИХ ТОЧОК CdS ТА
ХАРАКТЕРИСТИКА ЇХ ВЛАСТИВОСТЕЙ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі клітинної біології і біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Ємець Алла Іванівна,
завідувач відділу клітинної біології і
біотехнології ДУ «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН України»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України,
Солдаткін Олексій Петрович,
завідувач лабораторії біомолекулярної
електроніки Інституту молекулярної
біології і генетики НАН України

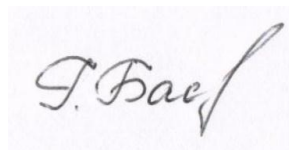
доктор біологічних наук, професор,
Борисова Тетяна Олександрівна,
завідувач відділу нейрохімії Інституту
біохімії ім. О.О. Паладіна НАН України

Захист відбудеться «15» червня 2018 р. об 11:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.
Тел/факс: (044) 434 37 77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «14» травня 2018 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради, к.б.н., н.с.



Г.Я. Басєр

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Напівпровідникові квантові точки, для яких характерні нанорозміри у поєднанні з вираженими люмінесцентними властивостями, розглядаються як перспективні матеріали для різноманітних практичних розробок та впроваджень. Зокрема, квантові точки сульфід кадмію використовують як у біологічних дослідженнях для візуалізації окремих клітин, внутрішньоклітинних структур, детектування токсинів, імунофлуоресцентного мічення білків, протипухлинної терапії та діагностики (тераностики), так і в оптоелектроніці як елементи світлодіодів, сонячних батарей [Tuagi et al., 2014; Matea et al., 2017].

Важлива особливість квантових точок визначається існуванням квантово-розмірних ефектів, які проявляються при зменшенні розмірів наночастинок ≤ 10 нм. Зокрема, за таких умов у квантових точках CdS утворюються системи дискретних енергетичних рівнів електронів та дірок і збільшується ширина забороненої зони, що спричиняє появу "блакитного зсуву" – зростання частоти люмінесцентного оптичного випромінення при зменшенні розмірів квантових точок [Yoffe, 2001]. Завдяки таким специфічним оптичним властивостям квантові точки CdS розглядають як альтернативу розповсюдженим барвникам [Li et al., 2011].

Серед відомих технологій синтезу квантових точок CdS розрізняють фізичні методи – молекулярно-променевою епітаксією та літографією, а також методи хімічного синтезу, до яких належать органометалевий синтез, методи хімічного осадження, синтез у водних розчинах з використанням відповідних прекурсорів металів, тощо. Однак, зазвичай наведені методи є трудомісткими у виконанні, дорогавартісними, потребують високих температур, тиску, а також токсичних розчинників та стабілізаторів [Bansal et al., 2012]. Саме тому актуальність теми зумовлена необхідністю розвитку альтернативних екологічно безпечних, надійних, відтворюваних, економічно виправданих та менш енергозатратних методів синтезу напівпровідникових наноматеріалів.

Новим напрямом нанобіотехнологій є синтез наноматеріалів з використанням різних біологічних організмів. Технологія так званого біологічного чи «зеленого» синтезу суттєво зменшує навантаження на довкілля, є економічно ефективною та високопродуктивною. Важливо, що деякі живі організми мають ендогенну здатність до синтезу неорганічних матеріалів [Mousavi et al., 2012]. У випадку «зеленого» синтезу квантових точок застосовують мікроорганізми, дріжджі та рослинні організми. У дисертаційній роботі представлено розробку методик позаклітинного синтезу квантових точок CdS за використання біологічних матриць. Перевага надається саме позаклітинному механізму біосинтезу квантових точок, оскільки сформовані у такий спосіб напівпровідникові наночастинки не потребують розробки додаткових методик щодо їхнього виділення з клітин та очищення від біоматриксу, що забезпечує їх доступність для подальших біологічних та біомедичних застосувань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана у відділі клітинної біології і біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в рамках проектів : «Розроблення дослідно-промислової технології синтезу точкових наночастинок за допомогою фітоємкостей та культури клітин рослин для візуалізації субклітинних структур (2010–2014 р.р., ДР№ 0110U004665) та «Розробка нанобіотехнологічних підходів отримання квантових точок сульфїду кадмію та дослідження їх біологічної активності» (2014-2016 р.р., РК 0114U003873) відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при Національній академії наук України.

Мета та завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було обґрунтування та розробка відтворюваних методик «зеленого» синтезу наночастинок CdS за допомогою різних біологічних матриць, зокрема, бактерій, міцелію базидіальних грибів та рослинних клітин, дослідження люмінесцентних й структурно-морфологічних властивостей отриманих квантових точок, вивчення їх цито- та генотоксичності для оцінки можливостей подальшого використання у клітинно-біологічних дослідженнях. Для досягнення вищезазначеної мети були поставлені наступні завдання:

1. Синтезувати квантові точки CdS з використанням бактерії *Escherichia coli*, вивчити їх спектри поглинання й фотолюмінесценції, а також стабільність.
2. Розробити методику синтезу квантових точок CdS з використанням міцелію базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* як матриці та дослідити їх оптичні властивості.
3. Розробити методику синтезу квантових точок CdS за допомогою рослинних об'єктів як біологічних матриць: культури «бородатих» коренів *Linaria maroccana* та суспензійної культури клітин *Nicotiana tabacum* (BY-2) і дослідити їх оптичні властивості.
4. Встановити та порівняти особливості структури та морфології отриманих квантових точок CdS, визначити розміри наночастинок за допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) залежно від типу біологічної матриці, використаної для синтезу.
5. З'ясувати цито- та генотоксичний вплив отриманих квантових точок CdS на модельні об'єкти рослинного та тваринного походження.
6. Дослідити особливості внутрішньоклітинної локалізації синтезованих квантових точок CdS для з'ясування можливостей їх застосування як люмінесцентних зондів в мікроскопічних дослідженнях.
7. Розробити методику функціоналізації отриманих квантових точок CdS шляхом модифікації їхньої поверхні за допомогою органічних сполук.

Об'єкт дослідження. Створення напівпровідникових квантових точок CdS, фізико-хімічні та біологічні властивості вказаних квантових точок.

Предмет дослідження. Особливості «зеленого» синтезу квантових точок CdS за використання різних біологічних матриць, порівняння впливу використаних біоматриць на структурні, оптичні характеристики та властивості отриманих квантових точок CdS та вивчення їх токсичності. .

Методи дослідження. У роботі використовували методи культури *in vitro*, цитологічного аналізу, методи світлової та люмінесцентної мікроскопії, метод проточної цитометрії, трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ), оптичної спектрофотометрії, метод електроннографії та локального рентгено-спектрального мікроаналізу, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у наступному:

- вперше розроблено методики «зеленого» синтезу квантових точок CdS з використанням, міцелію гриба *Pleurotus ostreatus* та рослин – культури бородатих коренів *Linaria maroccana* і суспензійної культури клітин *Nicotiana tabacum* (BY-2);
- продемонстровано можливість варіювання розмірів квантових точок CdS залежно від обраної біологічної матриці;
- вперше показано, що отримані з використанням біологічних матриць люмінесцентні наночастинки CdS характеризуються істотно зниженим токсичним впливом на клітини різного походження у порівнянні з квантовими точками, отриманими традиційними хімічними методами, та іонами кадмію;
- виявлено, що створені шляхом «зеленого» синтезу квантові точки CdS характеризуються інтенсивною люмінесценцією і завдяки нанорозмірам швидко проникають у клітини;
- розроблено методику функціоналізації синтезованих зразків квантових точок CdS з використанням поліетіленгліколю та бичачого сивороткового альбуміну;
- встановлено, що спектри фотолюмінесценції функціоналізованих квантових точок CdS мають відмінності від спектрів вихідних наночастинок CdS, а саме, у діапазоні довжин хвиль 460 – 470 нм спостерігається поява протяжного максимуму, відсутнього у спектрах люмінесценції вихідних зразків квантових точок CdS.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано нові методики "зеленого" синтезу напівпровідникових квантових точок CdS. Встановлений у роботі низький токсичний вплив квантових точок CdS, синтезованих за допомогою біологічних матриць, у поєднанні з вираженими люмінесцентними властивостями відкриває можливості їх подальшого використання як нанорозмірних люмінесцентних міток у клітинно-біологічних дослідженнях.

Особистий внесок здобувача. Ідею дослідження, постановку наукових завдань, наступну інтерпретацію отриманих результатів, розробку структури дисертаційної роботи, а також публікацію наукових статей було здійснено спільно з науковим керівником. Автором особисто опрацьовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, виконано основні експериментальні дослідження, взято участь у підготовці публікацій, викладено основні положення та узагальнення дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на наступних конференціях: II Міжнародна літня школа

«Nanotechnology and Nanomaterials» (Буковель, Україна, 25 серпня – 1 вересня 2013 р.), III Міжнародна науково-технічна конференція для молодих вчених «Luminescent Processes in Condensed State of Matter» (Харків, Україна, 18-22 листопада 2013 р.), IV Международная научная конференция «Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии» (Київ, Україна, 19-22 листопада 2013 р.), II конференція для молодих вчених "Plant Biology and Biotechnology" (Київ, Україна, 23 – 24 грудня 2013 р.), Міжнародний конгрес біологів рослин «Plant Biology Europe FESPB/EPSO Congress» (Дублін, Ірландія, 22 – 26 червня 2014 р.), III Міжнародна науково-практична конференція «Nanotechnology and Nanomaterials» (Яремче-Львів, Україна, 23 – 30 серпня 2014 р.), IV Міжнародна науково-практична конференція «Nanotechnology and Nanomaterials» (Львів, Україна, 26 – 29 серпня 2015 р.), Міжнародна конференція «Functional Materials and Nanotechnologies» (Вільнюс, Литва, 5 – 8 жовтня 2015 р.), V Міжнародна науково-практична конференція «Nanotechnology and Nanomaterials» (Львів, Україна, 24 – 27 серпня 2016 р.), Всеукраїнська конференція з міжнародною участю «Хімія, фізика та технологія поверхні» (Київ, Україна, 24 – 25 травня 2017 р.), Міжнародна науково-практична конференція «Nanotechnology and Nanomaterials» (Чернівці, Україна, 23 – 26 серпня 2017 р.).

Публікації. За результатами роботи опубліковано 19 наукових праць, у тому числі 7 статей у фахових наукових виданнях (3 статті у закордонних фахових виданнях, що входять до наукометричних баз даних), 11 тез, опублікованих у матеріалах конференцій та 1 розділ у монографії.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота обсягом 155 сторінок складається з анотації, вступу, семи розділів, узагальнення результатів та загальних висновків. У роботі наведено 5 таблиць, 40 рисунків, 2 додатки. Список використаних джерел містить 186 посилань. Загальний обсяг рукопису 174 сторінки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

У **першому розділі (огляді літератури)** розглянуто відомі літературні дані стосовно загальної характеристики, особливостей кристалічної та електронної будови, оптичних властивостей, а також поширених методів фізичного й хімічного синтезу кадмійвмісних квантових точок (CdS, CdSe, CdTe). Проаналізовано особливості біологічного синтезу кадмійвмісних квантових точок з використанням мікроорганізмів, грибів, водоростей, рослин. Вказано максимуми поглинання та люмінесценції, розміри, особливості морфології та кристалічної структури, характерні для кадмійвмісних квантових точок при застосуванні різних типів біологічних матриць. Розглянуто перспективи використання кадмійвмісних квантових точок у біологічних дослідженнях.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

З метою «зеленого» синтезу квантових точок сульфід кадмію в експериментах використовували наступні біологічні об'єкти: грам-негативну

бактерію *Escherichia coli* (штам МН1); базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (штам 551); культуру бородатих коренів *Linaria maroccana* L.; суспензійну культуру клітин *Nicotiana tabacum* L (BY-2).

Культуру бактерії *E. coli* вирощували на рідкому середовищі LB наступного складу: пептон – 10 г/л, дріжджовий екстракт – 5 г/л, хлорид натрію – 10 г/л, рН 7 за температури 37°C при постійному перемішуванні на роторному шейкері (135 об/хв) протягом 24 год. Для приготування матриці для синтезу квантових точок CdS культуру бактерії центрифугували протягом 10 хв при 5000 об/хв., для біосинтезу CdS використовували надосадову рідину.

Культивування *P. ostreatus* здійснювали у рідкому глюкозопептонно-дріжджовому (ГПД) середовищі наступного складу: глюкоза – 25,0 г/л, пептон – 3,0 г/л, дріжджовий екстракт – 2,0 г/л, KH_2PO_4 – 1,0 г/л, K_2HPO_4 – 1,0 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 г/л, рН 5,5 – 6,0, шляхом внесення дисків міцелію 7-добової культури гриба діаметром 7 мм. Для приготування матриці для синтезу квантових точок через 10 діб стерильно відокремлювали поверхневий міцелій *P. ostreatus* та багаторазово відмивали його бідистильованою водою (не менше 5 разів) від залишків живильного середовища. Далі до міцелію додавали 50 мл стерильної бідистильованої води та культивували при температурі 28°C протягом 4 діб.

Культуру «бородатих» коренів *L. maroccana* вирощували у рідкому середовищі МС (Murashige and Skoog, 1962), що містило: макросолі МС – 100 мл/л, мікросолі МС – 2 мл/л, вітаміни Мореля – 1 мл/л, сахарозу – 20 г/л; хелат заліза – 5 мл/л, рН 5,6 – 5,8, за температури 28°C протягом 10 діб. Культуру коренів п'ятикратно промивали у стерильній бідистильованій воді з метою видалення залишків живильного середовища, отриману біомасу коренів подрібнювали та нагрівали до 60°C. Свіжовиготовлений водний екстракт використовували як матрицю для синтезу квантових точок CdS.

Суспензійну культуру тютюну (BY-2) вирощували у рідкому середовищі МС, до складу якого входили базова суміш мікро- та макросолей МС – 200 мг/л, тіаміну (вітамін В1) – 2 мл/л, KH_2PO_4 – 200 мг/л; сахароза – 30 г/л; та 2,4 Д – 1 мл/л, рН 5,6 – 5,8 за температури 28°C протягом 7 діб. Клітини відокремлювали від живильного середовища шляхом фільтрування, переносили у колби об'ємом 100 мл зі стерильною бідистильованою водою та інкубували при 28°C на роторному шейкері (135 об/хв) протягом 24 год.

Умови «зеленого» синтезу квантових точок CdS представлені у табл. 1. Після центрифугування отримані зразки фільтрували через нітроцелюлозні фільтри Millipore (США) (діаметр пор 0,45 мкм) для стерилізації. З метою підтвердження наявності у синтезованих зразках квантових точок CdS виконували спектрофотометричні та електронно-мікроскопічні дослідження отриманого розчину. Експерименти з біологічного синтезу квантових точок CdS повторювали тричі для кожної біологічної матриці.

Отримання квантових точок CdS за допомогою біологічних матриць

Біологічна матриця	Тип неорганічних солей	Концентрація (моль/л)		Тривалість синтезу CdS, дні	Концентрація квантових точок CdS (мг/мл)
		CdSO ₄	Na ₂ S		
<i>E. coli</i>	CdSO ₄ ; Na ₂ S	0,025	0,5	1	3,6
<i>P. ostreatus</i>	CdSO ₄ ; Na ₂ S	0,025	0,5	8	3,75
<i>L. maroccana</i>	CdSO ₄ ; Na ₂ S	0,025	0,5	11	1,2
<i>N. tabacum</i>	CdSO ₄ ; Na ₂ S	0,025	0,5	9	0,193

Вивчення оптичних та структурних характеристик отриманих наночастинок CdS. Спектри оптичного поглинання отриманих зразків наночастинок CdS вимірювали на спектрофотометрі Specord UV-VIS «Analytik Jena AG» (Німеччина). Запис спектрів поглинання розчинів проводили у стандартних кварцових кюветах товщиною 1 см. **Спектри фотолюмінесценції** вимірювали на серійному спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian, Agilent Technologies, США). Максимальна роздільна здатність приладу складала 1,5 нм, джерело світла – імпульсна ксенонова лампа. Для визначення локалізації максимумів спектри було поділено на компоненти з використанням програмного пакета для оптичної спектрофотометрії (PeakFit 4.11).

Характеризацію структури та морфології отриманих квантових точок CdS здійснювали за допомогою **трансмісійної електронної мікроскопії високого розділення** з використанням електронного мікроскопу JEOL, JEM-2100F (Японія). Прискорююча напруга приладу складала 200 кВ. Попередньо виконували ультразвукову обробку зразків, після чого краплини розчинів зразків наночастинок наносили на мідну сітку з вуглецевим покриттям. **Метод електроннографії** використовували для дослідження кристалічної будови синтезованих наночастинок CdS. Дослідження проводили на електронному мікроскопі JEOL, JEM-2100F (Японія). Електроннограми зразків, осаджених на мідь-вуглецевій сітці, отримували при енергії електронного пучка $E = 100$ кеВ, довжина хвилі електронів $\lambda = 0,012$ нм. **Методом енергороздільної рентгенівської спектроскопії** визначали процентний вміст елементів у полі зору, ширина якого становила 70 – 150 нм, залежно від ділянки зразка. Реєстрували інтенсивності максимумів рентгенівського $K\alpha_{1,2}$ випромінення елементів у досліджуваній пробі з використанням рентгенівського спектрометра з енергетичною дисперсією JED-2300T.

Для визначення діаметру квантових точок CdS використовували емпіричну формулу, наведену у роботі [Yu et al., 2003].

Функціоналізацію синтезованих наночастинок CdS проводили з метою утворення навколо їхньої поверхні реакційно-здатного органічного покриття, що не має токсичних впливів на живі клітини. Для приготування водних розчинів функціоналізованих квантових точок CdS колоїдний розчин

синтезованих наночастинок додавали до відповідних полімерів у співвідношенні 2:1, а саме, 10 мл наночастинок та 5 мл поліетиленгліколю (ПЕГ) й бичачого сивороткового альбуміну (БСА). У подальшому отримані зразки пропускали через нітроцелюлозні фільтри Millipore (США) (діаметр пор 0,45 мкм) і досліджували методом оптичної спектрофотометрії. Для порівняння досліджували також спектри фотолюмінесценції вихідного розчину синтезованих наночастинок CdS без полімерного покриття, а також спектри люмінесценції водних розчинів ПЕГ та БСА.

Дослідження впливу квантових точок CdS на рослинні клітини, клітини HeLa та *Drosophila melanogaster*. Для визначення впливу на рослинні клітини використовували найбільш вразливу модель – протопласти. Протопласти з мезофілу асептичних рослин тютюну *N. tabacum* отримували методом ферментативної деградації клітинної стінки [Potrykus, 1986]. З метою оцінки впливу квантових точок CdS на протопласти з маточних розчинів готували ряд серійних розведень: розчин наночастинок розводили 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 та 1:128. Протопласти інкубували з квантовими точками CdS протягом 24 год., потім їх досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопу Axioskop 40 (“Carl Zeiss”, Німеччина). Комп’ютерну обробку мікрофотографій проводили з використанням програмного забезпечення Axio Vision LE 4.8.2.0 (“Carl Zeiss MicroImaging GmbH”, (Німеччина, 2010). Рівень виживання протопластів визначали як відношення кількості непошкоджених протопластів до загальної кількості досліджуваних протопластів.

Для дослідження цитотоксичної дії квантових точок CdS використовували трансформовані клітини лінії HeLa (клітини раку шийки матки людини). Концентрацію маточних розчинів синтезованих наночастинок CdS наведено у Табл. 1. Для оцінки токсичності квантових точок використовували розведення маточних розчинів наночастинок: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Як контроль використовували біологічні матриці. Для порівняння впливів було використано сіль неорганічного сульфіді кадмію у концентрації 0,4 мг/мл, що відповідає розведенню 1:8, оскільки обробка клітин саме цією концентрацією квантових точок не виявила суттєвих цитотоксичних ефектів. Клітини HeLa культивували у термостаті при 37°C за вологих умов, 5% CO₂, у живильному середовищі RPMI з додаванням 10 % ЕТС (ембріональної телячої сиворотки). Квантові точки CdS інкубували з клітинами HeLa при 37°C протягом 2 діб. Кількість живих клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту [Konget, 2011]. За допомогою методу проточної цитометрії визначали відсоток апопотичних клітин. Проточно-цитометричні дослідження виконували на приладі FACS Calibur (“Becton Dickinson”, США), що оснащений двома лазерами (з довжинами хвиль 488 та 625 нм), з використанням математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 для комп’ютерів Macintosh.

Також досліджували вплив наночастинок CdS на модельний об’єкт *Drosophila melanogaster*. З метою встановлення токсичності досліджуваних квантових точок визначали їх вплив на виживаність мух, час розвитку та плодючість (кількість отриманих особин імаго в F1) в особин, які виростили на середовищі з додаванням та без додавання них. З метою оцінки генотоксичності

досліджуваних наночастинок використовували «wing spot» тест (Ashburner, 2005) Як контроль використовували сіль CdS та біологічні матриці для синтезу квантових точок, які додавали до живильного середовища *D. melanogaster*, що містило: екстракт пивних дріжджів – 13,3 г/л, кукурудзяне борошно – 133 г/л, овочевий сік V8 – 180 г/л, метилпарагідроксибензонат – 0,093 г/л, агар – 13,3 г/л (рН – 6,0). *D. melanogaster* культивували за температури 25°C згідно з [Dermerec, 2008].

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали згідно [Лакин, 1990].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оптичні та структурно-морфологічні характеристики квантових точок CdS, синтезованих з використанням *E. coli* та *P. ostreatus* Спектри поглинання квантових точок CdS (*E. coli*) вимірювали одразу після синтезу, через 10 діб, 1 та 3 місяці (рис. 1а).

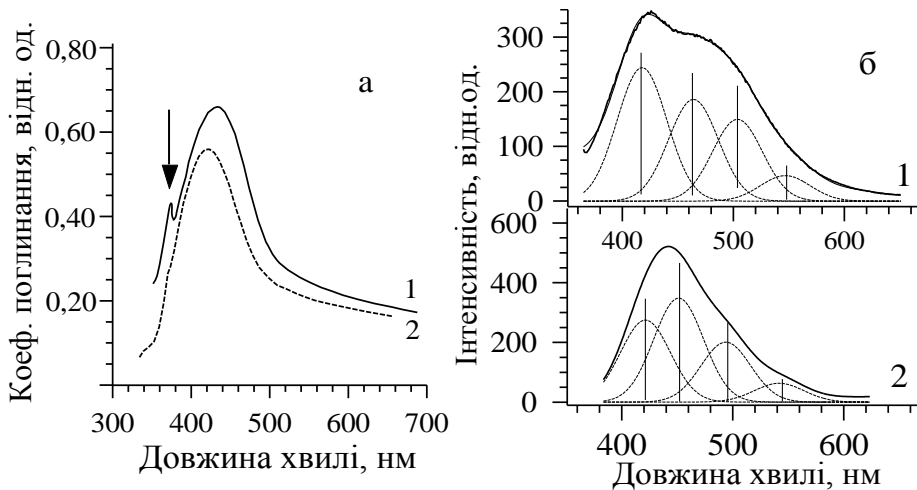


Рис. 1. Спектри поглинання квантових точок CdS (*E. coli*) – а. Спектри фотолюмінесценції квантових точок CdS (*E. coli*) – б. Пунктир-складові спектру (лоренціани)

Показано, що для щойно синтезованих зразків CdS (*E.coli*) характерні широкий максимум поглинання у діапазоні довжин хвиль 420 – 440 нм та вузький пік при 368 нм (рис. 1а, крива 1). Розрахунок за формулою [Yu et al., 2003] показав, що зазначеним максимумам відповідають наночастинки діаметром 2,5 та 5,5 нм. Вузький максимум на довжині хвилі 368 нм зумовлений екситонним поглинанням, яке проявляється при розмірах квантових точок, менших за 3 нм [Асаулата та ін., 2012]. Спектри люмінесценції вимірювали при збудженні випромінюванням $\lambda = 340$ нм. Спектр люмінесценції свіжосинтезованих зразків має форму широкої смуги з максимумами на довжинах хвиль 422 та 470 нм (рис. 1б, крива 1). Через 10 та 30 діб після синтезу спектр мав вигляд симетричної смуги з максимумом вже на довжині хвилі 443 нм (рис. 1б, крива 2). Через 3 місяці зберігання зразків спектр залишався незмінним.

За допомогою ТЕМ було досліджено морфологію, особливості структури, а також розподіл за розмірами квантових точок CdS (*E.coli*). Отримані квантові точки CdS не мали структурних дефектів та характеризувалися наближеною до сферичної формою (рис. 2а). Було побудовано діаграму розподілу наночастинок

за розмірами (рис. 2б). Встановлено, що у синтезованому зразку переважаючою є фракція квантових точок з діаметром від 6 до 8 нм (близько 40 %). Було отримано електронограми зразків, що ілюструють дифракційні максимуми, які відповідають міжплощинним відстаням 0,341, 0,209 та 0,187 нм (рис. 2в).

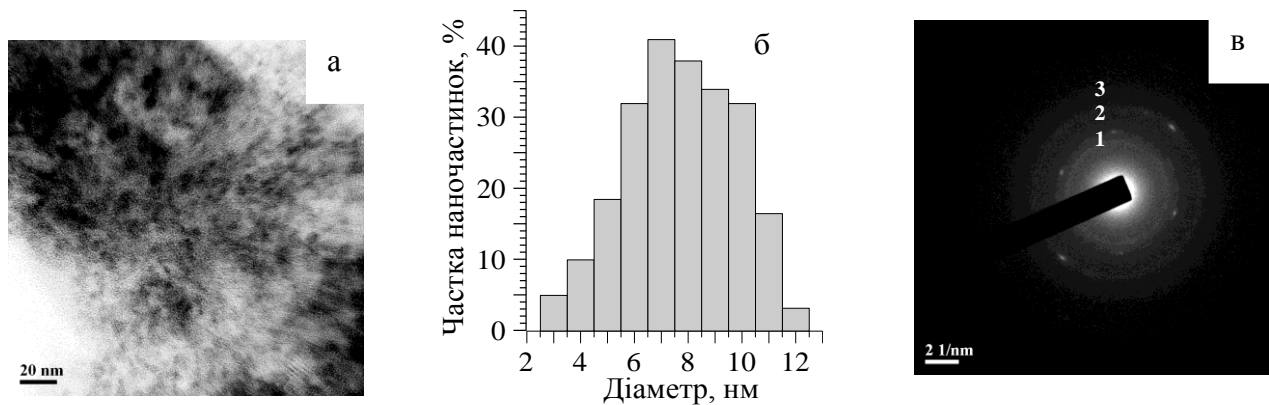


Рис. 2. Електронна мікрофотографія квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *E. coli* – а; розподіл синтезованих квантових точок CdS за розмірами – б; електронограма синтезованих квантових точок CdS – в

На рис. 3а наведено спектри поглинання квантових точок CdS, синтезованих за допомогою гриба *P. ostreatus* (крива 2), та спектри поглинання вихідної грибної матриці (крива 1). Спектр поглинання квантових точок CdS (*P. ostreatus*) має вигляд широкої куполоподібної смуги з максимумом $\lambda_{\max} \approx 453$ нм (рис. 3а). Розрахунок за формулою [Yu et al., 2003] показує, що максимуму в області 450 нм відповідають наночастинки діаметром 5,5 нм. На рис. 3б наведений спектр фотолюмінесценції, отриманий при збудженні випромінюванням з довжиною хвилі $\lambda=340$ нм. Люмінесценція грибної матриці характеризується широкою смугою (крива 1), тоді як люмінесценція синтезованого зразка CdS має складніший характер (крива 2).

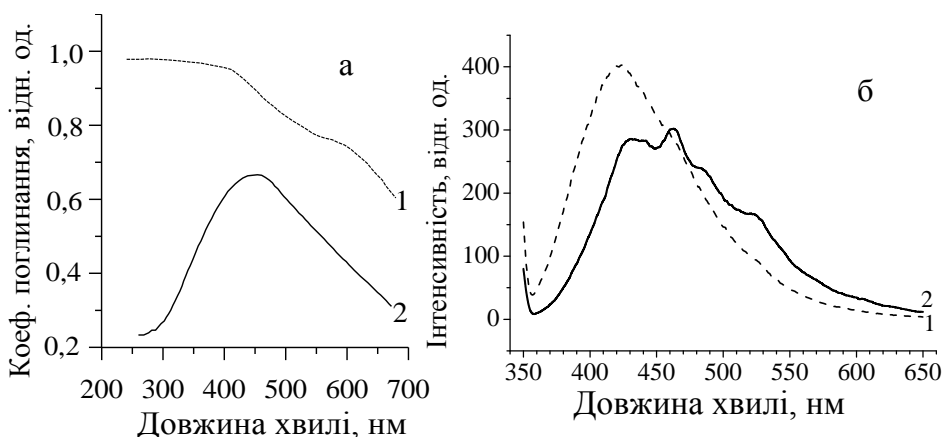


Рис. 3. Спектр поглинання квантових точок CdS (*P. ostreatus*) - а. Спектр фотолюмінесценції - б.

Зокрема, у спектрі спостерігалися декілька максимумів при 431, 462, 486 нм, які відповідають екситонним смугам наночастинок різного діаметру. Отримані дані можна порівняти з роботою [Chen et al., 2014], де для синтезу квантових точок CdS використовували гриб *Phanerochaete chrysosporium*. Отримані авторами квантові точки мали розміри 2,56 нм, оскільки максимум поглинання відповідав довжині хвилі 298 нм.

За даними ТЕМ було встановлено, що окремі квантові точки CdS мають сферичну форму та однорідну структуру поверхні (рис. 4а). Було побудовано діаграму розподілу наночастинок за розмірами (рис. 4б).

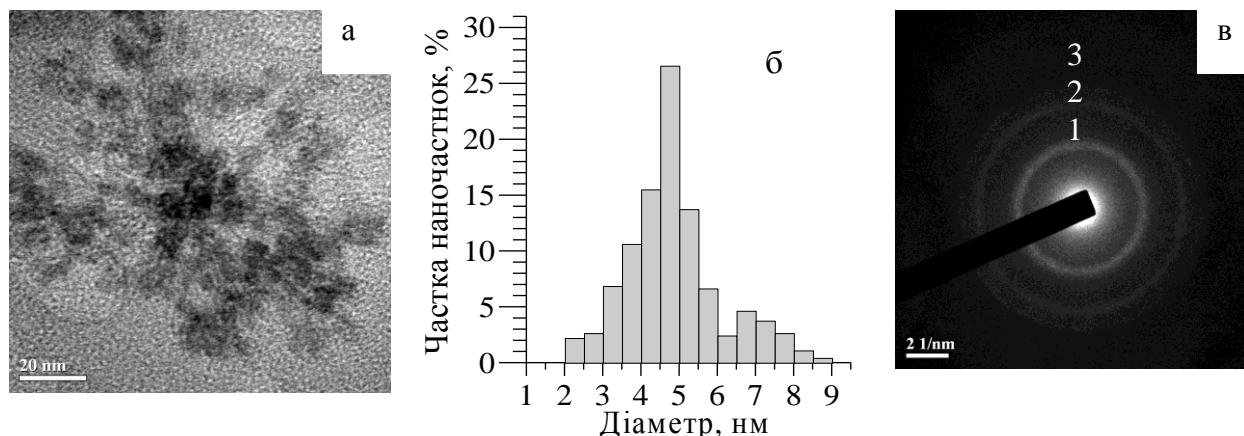


Рис. 4. Електронна мікрофотографія квантових точок CdS (*P. ostreatus*) – а; розподіл квантових точок CdS за розмірами – б; електронограма квантових точок CdS – в

Встановлено, що максимум розподілу (56%) припадає на наночастинки з діаметром 4,0 – 5,5 нм. Нами було отримано електронограми зразків, на яких присутні дифракційні максимуми, що відповідають міжплощинним відстаням 0,334, 0,205 та 0,188 нм (рис. 4в). Завдяки здатності до біоаккумуляції іонів металів мікроорганізми та гриби розглядають як «нанофабрики» для отримання наночастинок металів [Sastry et al., 2003]. Проте, мікроорганізми є досить продуктивними й у випадку синтезу квантових точок. З метою подолання проблем, пов'язаних з виділенням утворених наночастинок з мікробних клітин та їх очищенням, було запропоновано одноетапний підхід позаклітинного синтезу квантових точок CdS за допомогою бактерій. Позаклітинний синтез CdS опосередкований ферментами NADH-залежними редуказами та хінонами, а також активацією ліаз [Bai et al., 2009]. Окрім бактерії *E. coli* для біосинтезу квантових точок CdS нами було вперше використано їстівний гриб *P. ostreatus*. Гриби досить легко вводити в культуру *in vitro*, можна наростити значну біомасу міцелію за відносно короткий проміжок часу (10 - 12 діб). Крім того, гриби секретують значну кількість позаклітинних ферментів [Mandal et al., 2006]. Білки, які виділяють гриби у процесі росту у культурі, задіяні у процесах гідролізу іонів металів, тому, як наслідок, грибні системи забезпечують біосинтез наночастинок навіть швидше, ніж відомі хімічні методи їх синтезу [Bhattacharya and Gupta, 2005]. Білки гідролізують прекурсори халькогенідів, а також забезпечують відновлення сульфатних груп, що призводить до формування квантових точок [Ahmad et al., 2002].

Оптичні та структурно-морфологічні характеристики квантових точок CdS, синтезованих з використанням *L. taroscanata* N. tabacum (BY-2)

Спектр оптичного поглинання отриманих квантових точок CdS, синтезованих з використанням *L. taroscanata* як матриці, характеризувався

двома чіткими максимумами та протяжною структурою в інтервалі між ними (рис. 5а). Виявлено, що максимумам трьох піків поглинання відповідають довжини хвиль 362, 398 та 464 нм. Оцінка за формулою [Yu et al., 2003] показала, що піку на довжині хвилі 362 нм відповідає фракція квантових точок CdS діаметром 2,5 нм, максимуму при 398 нм – діаметром 3,4 нм, а максимуму поглинання при 464 нм – діаметром 6,0 нм. Спектр люмінесценції наночастинок CdS ілюструє рис. 5б. Показано, що максимуми люмінесценції відповідають довжинам хвиль 425, 462 та 500 нм. Отримані результати оптичного аналізу узгоджуються з даними роботи [Kumar et al., 2014], автори якої спостерігали характерний для квантових точок CdS максимум на довжині хвилі 495 нм.

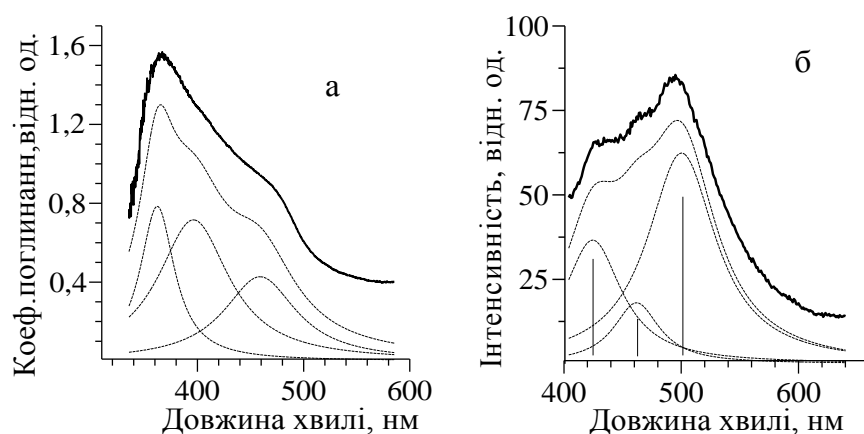


Рис. 5. Спектр поглинання квантових точок CdS (*L. maroccana*) – а; спектр фотолюмінесценції квантових точок CdS (*L. maroccana*) – б

За допомогою методу TEM було проаналізовано морфологію отриманих квантових точок CdS (рис. 6а), їх розподіл за розмірами (рис. 6б), електронограму з дифракційними максимумами (відповідні міжплощинні відстані 0,338 та 0,184 нм, рис. 6в)

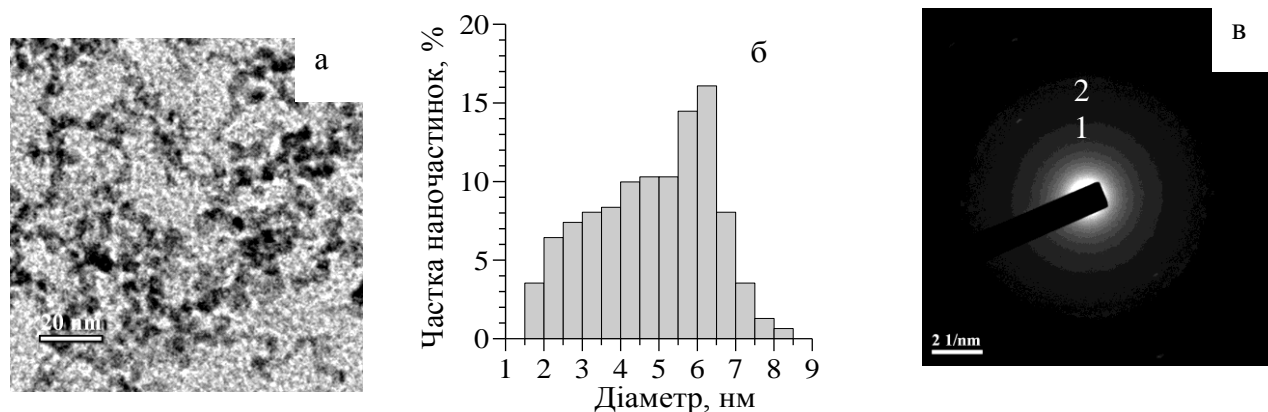


Рис. 6. Електронна мікрофотографія квантових точок CdS (*L. maroccana*) – а; розподіл квантових точок CdS за розмірами – б; електронограма квантових точок CdS – в

Виявлено, що отримані наночастинок мають наближену до сферичної форму і не містять значних дефектів структури поверхні (рис. 6а). Діаграма показує (рис. 6б), що у синтезованому зразку переважає фракція наночастинок діаметром 5,5 – 6,5 нм, її сумарна частка становить близько 30 %.

На рис. 7а представлено спектр оптичного поглинання зразків, синтезованих за допомогою суспензійної культури *N. tabacum* (BY-2) як біоматриці. Пік поглинання отриманих квантових точок лежить у короткохвильовій області спектру і відповідає довжині хвилі 292 нм. Згідно з формулою [Yu et al., 2003], діаметр синтезованих наночастинок відповідає 1,5 нм.

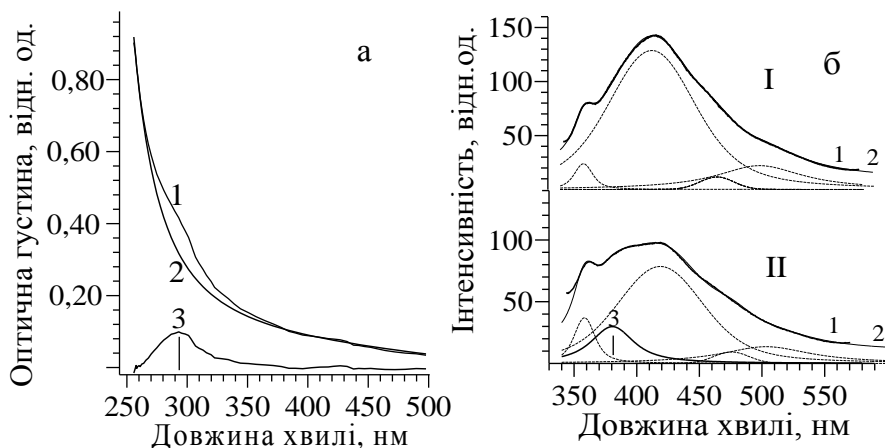


Рис. 7. Спектр поглинання квантових точок CdS (*N. tabacum* (BY-2) – а; спектри фотолюмінесценції – б

Спектр фотолюмінесценції утворених квантових точок CdS представлено на рис. 7б – спектр I відображує люмінесценцію матриці, спектр II – люмінесценцію наночастинок CdS. У спектрі наночастинок спостерігалася наявність плеча інтенсивності у діапазоні 380 – 400 нм. Було виділено максимум люмінесценції (крива 3, рис. 7б), який відповідає довжині хвилі $\lambda = 381$ нм і характеризує люмінесценцію саме отриманих квантових точок CdS.

За даними ТЕМ було визначено морфологію синтезованих квантових точок (рис. 8а). Для них властива переважно сферична форма та відсутність

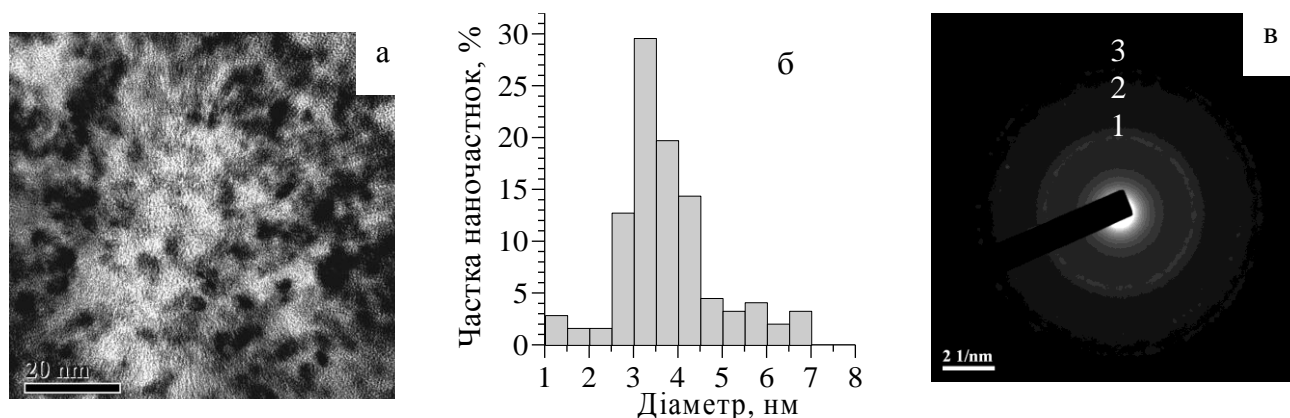


Рис. 8. Електронна мікрофотографія квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *N. tabacum* – а; розподіл синтезованих квантових точок CdS за розмірами – б; електроннограма синтезованих квантових точок CdS – в поверхневих дефектів.

помітних поверхневих дефектів. Згідно діаграми розподілу квантових точок за розмірами (рис. 8б), максимум розподілу знаходився у діапазоні 3,0 – 4,0 нм,

частка таких частинок складала разом 49 %. Показано дифракційні максимуми синтезованих наночастинок, що відповідають міжплощинним відстаням 0,334, 0,205 та 0,188 нм (рис. 8в). Таким чином, використання рослинних біоматриць дозволяє синтезувати стабільні квантові точки CdS діаметром від 3 до 7 нм.

Синтез кадмійвмісних квантових точок з використанням різних частин рослин (екстракти плодів, культури трансгенних коренів, калюсні тканини, пагони, суцвіття, листові екстракти) є альтернативною технологією перед існуючими фізико-хімічними методами. Крім того, такий тип «зеленого» синтезу суттєво здешевлює отримання наночастинок. Рослинний матеріал є також більш доступним для лабораторного впровадження, безпечним і, крім того, містить значну кількість вторинних метаболітів: алкалоїдів, терпеноїдів, фенолів, флаваноїдів, які опосередковують процес синтезу наночастинок. Процес формування стабільних наночастинок CdS опосередкований виділенням у позаклітинне середовище таких речовин, як білки, цукри, алкалоїди, органічні кислоти, амінокислоти, що є компонентами рослинних матриць [Rai and Yadav, 2013].

Дослідження цито- та генотоксичного впливу синтезованих квантових точок CdS на рослинні та тваринні моделі

Використання протопластів як найбільш чутливої моделі дає змогу охарактеризувати відповідь рослинної клітини на досліджуваний подразник. Було проаналізовано вплив отриманих квантових точок CdS (*N. tabacum*) на виживаність мезофільних протопластів *Nicotiana tabacum* L. Встановлено, що у концентраціях 12 мкг/мл (розведення 1:16), 6 мкг/мл (1:32), 3 мкг/мл (1:64), та 2 мкг/мл (1:128) квантові точки CdS не виявляли суттєвого токсичного ефекту. Відсоток неушкоджених протопластів становив при цьому від 79% до 90%. При обробці рослинних клітин дещо вищими концентраціями наночастинок, а саме, 25-49 мкг/мл спостерігали зниження частки неушкоджених протопластів до 40-8 % відповідно.

Крім того, було досліджено вплив квантових точок CdS, отриманих за допомогою *P. ostreatus*, на протопласти *N. tabacum*. Інтервал концентрацій був у межах 30-750 мкг/мл. У результаті 24 год обробки протопластів квантовими точками у низьких концентраціях (30 – 220 мкг/мл), частка неушкоджених протопластів складала 89 – 71%. Тоді як обробка квантовими точками вищих концентрацій, а саме 400 – 750 мкг/мл, призводила до зниження відсотка протопластів з нормальною морфологією. Зокрема, за впливу 400 мкг/мл відсоток життєздатних протопластів становив 58%, за впливу 750 мкг/мл наночастинок CdS частка неушкоджених протопластів становила 49%. Отримані результати можна порівняти з роботою [Khataee et al., 2014], у якій автори оцінювали токсичний вплив різних концентрацій хімічно синтезованих квантових точок сульфиду кадмію на рослину *Spirodela polyrrhiza*. Діапазон досліджуваних концентрацій становив від 1 до 2,5 мг/л. Авторами було показано, що рослина *S. polyrrhiza* виявилася надзвичайно чутливою до наночастинок CdS, які отримано методом гідротермічного синтезу. Її ріст суттєво пригнічувався за впливу концентрацій, що перевищували 1 мг/л. З

отриманих результатів впливає, що найбільш токсичними є хімічно синтезовані квантові точки CdS. Найменш токсичними виявилися квантові точки, які отримано з використанням *P. ostreatus*. Зокрема, вплив 50 мкг/мл розчину квантових точок CdS, синтезованих за використання грибною матриці, не призводив до суттєвих морфологічних порушень протопластів тютюну, частка неушкоджених протопластів становила 86 %. Тоді як вплив цієї ж концентрації – 49 мкг/мл, у випадку квантових точок, синтезованих за допомогою суспензійної культури тютюну, виявився найбільш токсичним. Частка протопластів з нормальною морфологією становила лише 8%.

Окрім протопластів, вплив синтезованих нами квантових точок CdS було досліджено на клітинах HeLa. За результатами досліджень найнижчий токсичний вплив мали квантові точки CdS у розведенні 1:8 – 1:16. Відсоток живих клітин становив при цьому 85 – 95%. З поступовим зростанням концентрацій (розведення 1:1 – 1:4) частка живих клітин дещо знижувалась і становила 42 – 80% залежно від біологічної матриці. Найнижчий токсичний вплив продемонстрували квантові точки CdS, які синтезовані за допомогою грибною матриці. Водночас, квантові точки CdS, отримані за допомогою культури *L. maroccana*, проявляли проапоптичний ефект. (рис. 9).

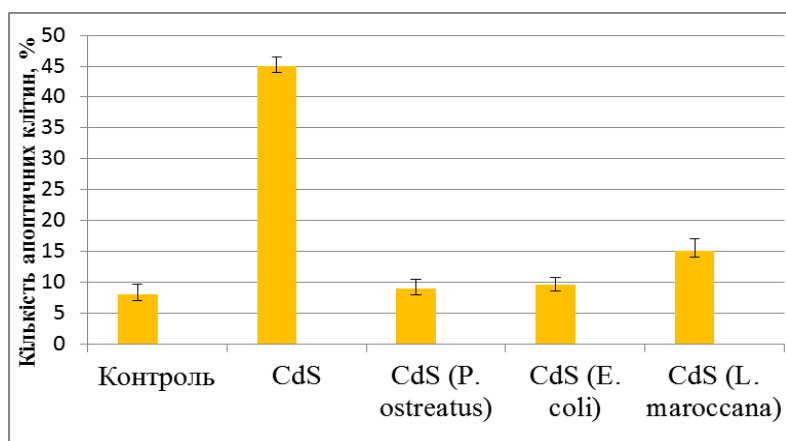


Рис. 9. Кількість апоптичних клітин (%) HeLa після обробки квантовими точками CdS, отриманими за допомогою біоматриць *E. coli*, *P. ostreatus* та *L. maroccana*. Контроль – стандартне середовище

Однак, найбільш токсичним виявився неорганічний сульфід кадмію. Обробка клітин HeLa 0,45 мг/мл неорганічним CdS призводила до зростання кількості апоптичних клітин до 45% (рис. 9). Дослідження токсичного ефекту квантових точок CdS, отриманих за допомогою гриба *P. ostreatus*, бактерії *E. coli* та рослини *L. maroccana* на класичному модельному організмі *D. melanogaster* продемонструвало, що концентрації квантових точок CdS на рівні 0,4 мг/мл та 0,13 мг/мл не впливають суттєво на життєздатність мух. Наночастинки CdS не чинили генотоксичного або мутагенного впливу на *D. melanogaster*. Середня кількість життєздатних особин становила 20 – 25 у порівнянні з контролем (28 життєздатних особин). Слід відмітити, що дрозофіла є більш резистентним організмом у порівнянні з хребетними до різних токсичних впливів [Mitchell et al., 2015]. Наявність навколо квантових точок CdS специфічного покриття біологічного походження може відігравати важливу роль у зниженні рівня їхньої токсичності.

Підсумовуючи отримані результати слід зазначити, що найбільш чутливим модельним об'єктом виявилися рослинні протопласти. Така сприйнятливність їх до зовнішніх чинників пов'язана з відсутністю клітинної стінки [Sheen, 2001]. Використання більш високих концентрацій наночастинок CdS (1,8 та 1,25 мг/мл) викликало повну загибель протопластів. Тому в експерименті були відібрані концентрації у діапазоні 0,03 – 0,75 мг/мл (для квантових точок CdS, синтезованих за використання *P. ostreatus*) та 2 – 49 мкг/мл (для квантових точок CdS, синтезованих за використання *N. tabacum*), які є нетоксичними для рослинних клітин. У випадку застосування пухлинних клітин HeLa та *D. melanogaster* діапазон досліджуваних концентрацій було збільшено до 0,2 - 1,8 мг/мл. Найменш токсичними при цьому виявилися квантові точки CdS, отримані за використання *P. ostreatus*. Найбільша токсичність при цьому була притаманна неорганічному кадмію.

Неперервне збудження органічних барвників зазвичай призводить до помітного фотовицвітання та згасання фотолюмінесценції протягом короткого періоду часу (декілька секунд). Це явище суттєво обмежує час спостереження, який необхідний для аналізу проб. Тому, враховуючи унікальні оптичні властивості квантових точок CdS, що зумовлені квантово-розмірним ефектом, їх розглядають як перспективні флуорохроми [Jin et al., 2011]. Рис. 10 ілюструє візуалізацію епідермальних клітин кореня *L. maroccana*, оброблених квантовими точками CdS (*P. ostreatus*) протягом 24 год.

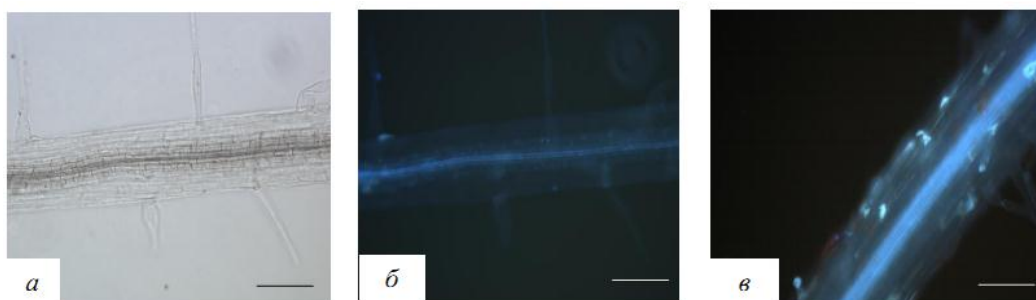


Рис. 10. Мікрофотографія клітин кореня *L. maroccana*: а – прохідне світло; б – контроль (необроблені клітини); в – клітини, оброблені синтезованими квантовими точками CdS (*P. ostreatus*). Концентрація – 3,75 мг/мл. Масштаб 200 мкм

У результаті спостерігали люмінесценцію епідермальних клітин у діапазоні довжин хвиль 420 – 485 нм. Нами встановлено, що квантові точки CdS легко проникають в рослинні та тваринні клітини. Отримані результати є підґрунтям для подальших їх застосувань як люмінесцентних зондів для візуалізації внутрішньоклітинних структур, оскільки для синтезованих квантових точок властива люмінесценція у діапазоні видимого світла, що відповідає синьому та блакитному кольорам.

Функціоналізація поверхні квантових точок CdS

Наночастинки, функціоналізовані специфічними лігандами, мають спорідненість до цільових клітинних структур, або можуть бути модифіковані шляхом приєднання певних біокон'югатів. На рис. 11а наведено спектри

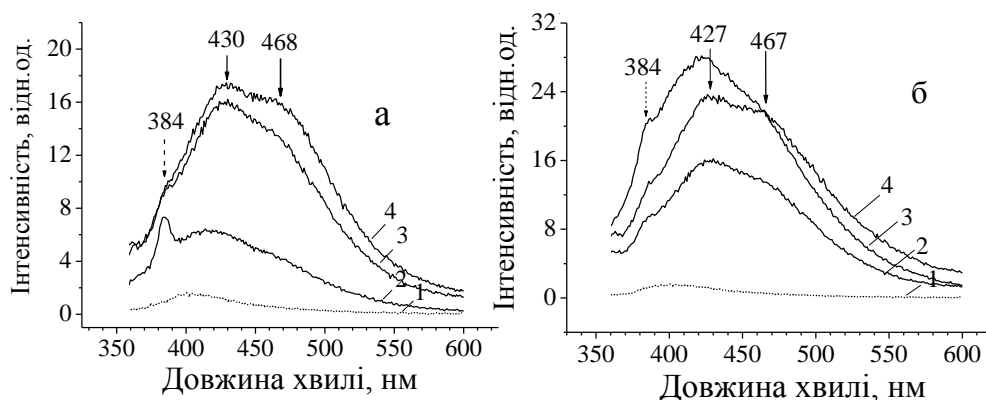


Рис. 11. Спектри фотолюмінесценції квантових точок: ПЕГ-функціоналізація – а; БСА-функціоналізація – б; $\lambda_{зб} = 340$ нм

фотолюмінесценції отриманих квантових точок CdS, розчину поліетиленгліколю (ПЕГ) та функціоналізованих за допомогою ПЕГ наночастинок CdS при збудженні випроміненням $\lambda_{зб} = 340$ нм. Спектр люмінесценції розчину ПЕГ має виражений гострий пік на довжині хвилі 384 нм та розмитий максимум від 400 до 500 нм (рис. 11а, крива 2). Спектр люмінесценції наночастинок CdS характеризувався смугою з максимумом у діапазоні 430 нм (рис. 11а, крива 3) і мав досить високу інтенсивність. Такий максимум є характерним саме для біосинтезованих наночастинок CdS. Крива 4 на рис. 11а відображає спектр наночастинок CdS, функціоналізованих ПЕГ.

Окрім ПЕГ, для функціоналізації наночастинок CdS було використано бичачий сироватковий альбумін (БСА). На рис. 11б представлено спектри фотолюмінесценції вихідних квантових точок CdS та розчину БСА, а також функціоналізованих за допомогою БСА наночастинок CdS. Спектр люмінесценції вихідного розчину БСА (рис. 11б, крива 4) має помітний пік люмінесценції у короткохвильовому діапазоні при 384 нм та виражений протяжний максимум при 430 нм, що плавно спадає. Варто підкреслити, що як і у випадку функціоналізованих наночастинок CdS за допомогою ПЕГ, їх результуючий спектр (рис. 11б, крива 3) не зводиться до суми спектрів компонентів. Спостерігається поява плеча інтенсивності в області 467 нм та згладжування піку у короткохвильовому діапазоні при 384 нм. Зазначені спектральні особливості свідчать про перехід БСА та ПЕГ у зв'язаний стан з поверхнею квантових точок CdS, що змінює спектр їх люмінесценції. Важливо, що як ПЕГ, так і БСА подібним чином модифікують спектр люмінесценції квантових точок CdS – і в одному, і в іншому випадках зростає інтенсивність спектру в діапазоні 460 – 470 нм (рис. 11 а,б), тобто зростає їх яскравість.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі обґрунтовано та розроблено відтворювані методики позаклітинного «зеленого» синтезу напівпровідникових наночастинок CdS. Проаналізовано оптичні та структурно-морфологічні властивості отриманих квантових точок залежно від біологічної матриці, обраної для синтезу, та досліджено токсичний вплив квантових точок CdS на об'єкти рослинного та тваринного походження. Показана можливість проникнення зазначених наночастинок у рослинні та тваринні клітини, а також охарактеризовано оптичні властивості квантових точок CdS, функціоналізованих різними органічними сполуками.

1. Синтезовано квантові точки CdS з використанням бактерії *Escherichia coli*, вивчено їх спектри поглинання (максимум у діапазоні 420 – 440 нм), спектри люмінесценції (максимум у діапазоні 443 нм) та часову стабільність. Показано, що квантові точки залишаються стабільними до трьох місяців після приготування зразків.
2. Розроблено метод синтезу квантових точок CdS з використанням як матриці міцелію базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* та досліджено їх оптичні властивості. Встановлено, що максимум поглинання отриманих квантових точок відповідає 453 нм, а максимумами люмінесценції – 431, 462, 486 нм.
3. Розроблено метод синтезу квантових точок CdS за допомогою рослинних об'єктів як біологічних матриць, а саме: культури «бородатих коренів» *Linaria maroccana* та суспензійної культури клітин *Nicotiana tabacum* (BY-2), а також досліджено їх оптичні властивості. Встановлено, що максимумами поглинання квантових точок, отриманих за допомогою *L. maroccana*, відповідають довжинам хвиль 362, 398 та 464 нм, а отриманих за допомогою *N. tabacum* - 292 нм. Максимумами люмінесценції квантових точок відповідають довжинам хвиль 425, 462 та 500 нм (CdS, отримані за допомогою *L. maroccana*); 381 нм (CdS, отримані за допомогою *N. tabacum*).
4. Встановлено особливості структури та морфології отриманих квантових точок CdS за допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії. Показано, що для CdS (*E. coli*) максимум розподілу за розмірами знаходиться у межах 6 – 8 нм, для CdS (*P. ostreatus*) він відповідає розмірам 4 – 5,5 нм; для CdS (*L. maroccana*) – розмірам 6 – 7 нм та для CdS (*N. tabacum*) – розмірам 3 – 4 нм. Для усіх типів отриманих квантових точок CdS характерна сферична морфологія та відсутність помітних поверхневих дефектів.
5. З'ясовано вплив отриманих квантових CdS на модельні об'єкти рослинного та тваринного походження. Встановлено, що найбільш чутливими до впливу квантових точок CdS є протопласти рослин. У діапазоні концентрацій 2 – 49 мкг/мл (квантові точки CdS, отримані за допомогою *N. tabacum*) відсоток протопластів з нормальною морфологією знижувався зі зростанням концентрацій і становив відповідно 90 – 8 % відповідно. У діапазоні концентрацій 30 – 750 мкг/мл (квантові точки CdS, отримані за допомогою *P. ostreatus*) відсоток протопластів з нормальною морфологією знижувався зі зростанням їх концентрацій і становив 89 – 49% відповідно. Результати

дослідження токсичності квантових точок CdS на модельному організмі *Drosophila melanogaster* свідчать про те, що такі наночастинки суттєво не впливали на життєздатність мух та не чинили генотоксичного або мутагенного впливу. Для квантових точок CdS властива інтенсивна люмінесценція у діапазоні видимого світла, що відповідає синьому та блакитному кольорам. Отримані результати є основою для подальшого застосування квантових точок як люмінесцентних зондів для мікроскопічних досліджень.

6. Встановлено, що спектри фотолюмінесценції функціоналізованих наночастинок CdS мають протяжний максимум у діапазоні довжин хвиль 460 – 470 нм, який відсутній у спектрах вихідних наночастинок, що свідчить про зв'язування молекул ПЕГ та БСА з поверхнею квантових точок CdS.
7. Розроблені відтворювані методики позаклітинного «зеленого» синтезу напівпровідникових наночастинок CdS є більш доступними швидкими та безпечними у порівнянні з хімічно синтезованими квантовими точками CdS.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Борова М.М. Отримання квантових точок CdS з використанням гриба *Pleurotus ostreatus* / М.М. Борова, А.П. Науменко, Я.В. Пірко, Т.А. Круподьорова, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Доповіді НАН України. – 2014. - № 2. – С. 153 – 159 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та підготовлено статтю*).
2. Борова М.М. Стабільність квантових точок CdS, синтезованих за допомогою бактерії *Escherichia coli* / М.М. Борова, А.П. Науменко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Доповіді НАН України. – 2014. – № 7. – С. 145 – 151 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та підготовлено статтю*).
3. Borovaya M.N. Biosynthesis of luminescent CdS quantum dots using plant hairy root culture / M.N. Borovaya, A.P. Naumenko, N.A. Matvieieva, Ya.V. Blume, A.I. Yemets // *Nanoscale Res. Lett.* - 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 1 – 7 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та підготовлено статтю*).
4. Borovaya M.N. Biosynthesis of cadmium sulfide quantum dots using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. / M.N. Borovaya, Ya.V. Pirko, T.A. Krupodorova, A.P. Naumenko, Ya.V. Blume, A.I. Yemets // *Biotechnol. & Biotech. Eq.*–2015. – Vol. 29, № 6. – P.1156 – 1163 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та підготовлено статтю*).
5. Borovaya M.N. Extracellular synthesis of luminescent CdS quantum dots using plant cell culture / M.N. Borovaya, O.M. Burlaka, A.P. Naumenko, Y.V. Blume, A.I. Yemets// *Nanoscale Res. Lett.* 2016. – Vol.11(1). – P. 1 – 8 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та підготовлено статтю*).

6. Проценко О.В. Оцінка токсичності та генотоксичності квантових точок CdS, синтезованих за допомогою біологічних матриць /О.В. Проценко, О.А. Дудка, І.А. Козерецька, М.В. Іномістова, М.М. Борова, Я.В. Пірко, Г.М. Толстанова, Л.І. Остапченко, А.І. Ємець // Доповіді НАН України. – 2016. –№ 4. – С.111 – 117 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та підготовлено статтю*).
7. Ніколаєнко Т.В., Нікуліна В. В., Петрук Н. А., Присяжнюк А. І., Скачкова О. В., Борова М. М., Пірко Я. В., Гарманчук Л. В., Толстанова Г. М., Ємець А. І. Вплив на пухлинні клітини квантових точок сульфїду кадмію, синтезованих з використанням різних біологічних систем // Доповіді НАН України. – 2016. – №. 5. – С.117 – 124 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та підготовлено статтю*).
8. Borovaya M.N. Biosynthesis of quantum dots and their potential applications in biology and biomedicine / M.N. Borovaya, O.M. Burlaka, A.I. Yemets, Ya.V. Blume //Nanoplasmonics, Nano-Optics, Nanocomposites, and Surface Studies (Eds. Fesenko O., Yatsenko L.), Springer-Verlag: Springer Proceedings in Physics. - 2015.- Vol. 167, Chapter 24. – P. 339 – 362 (*Здобувачем разом зі співавторами проведено аналіз літературних даних та підготовлено розділ монографії*).
9. Borovaya M.N. Biosynthesis of cadmium sulfide quantum dots using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. / M.N. Borovaya, Ya.V. Pirko, A.I. Yemets, T.A. Krupodorova, A.P. Naumenko, Ya.V.Blume // II Міжнародна літня школа «Nanotechnology and Nanomaterials», 25 серпня – 1 вересня 2013 р., Буковель, Україна. – С. 365.
10. Borovaya M.N. Biological synthesis of CdS quantum dots using the fungus *Pleurotus ostreatus* / M.N. Borovaya, A.P. Naumenko, Ya.V. Pirko, T.A. Krupodorova, A.I. Yemets, Ya.V. Blume// III International Scientific-Technical Conference for young scientists «Luminescent processes in condensed state of matter», 18 – 22 листопада 2013 р., Харків, Україна. – С. 111-112.
11. Боровая М.Н. Получение квантовых точек CdS с помощью *Pleurotus ostreatus* и *Escherichia coli* / М.Н. Боровая, А.П. Науменко, Я.В. Пірко, А.И. Емец, Я.Б. Блюм // IV Международная научная конференция «Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии», 19 – 22 листопада 2013 р., Київ, Україна. – С. 545.
12. Борова М.М. "Зелений" синтез напівпровідникових наночастинок з використанням *Escherichia coli* та *Pleurotus ostreatus* / М.М. Борова, А.П. Науменко, Я.В. Пірко, Т.А. Круподьорова, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // International on-line Conference & 2nd Conference of Young Scientists "Plant biology and biotechnology", 23 – 24 грудня 2013 р., Київ, Україна. – С.57.
13. Yemets A. Synthesis of CdS quantum dots using biological systems: from bacteria to plants /A. Yemets, M. Borovaya, A. Naumenko, T. Krupodyorova, Ya. Pirko, Ya. Blume //Plant Biology Europe FESP/EPSCO Congress, 22 –26 June 2014, Dublin, Ireland. – С. 175.
14. Borovaya M.N. Biological synthesis of CdS quantum dots using hairy root culture of *Linaria maroccana* L / M.N. Borovaya, A.P. Naumenko, N.A. Matvieieva, Ya.V. Blume, A.I. Yemets //International research and practice conference:

«Nanotechnology and nanomaterials», 23 – 30 серпня 2014 р., Яремче-Львів, Україна. – С. 521.

15. Borovaya M.N. «Green» synthesis of luminescent CdS quantum dots by plant matrix and their toxic effect / M.N. Borovaya, A.P. Naumenko, O.M. Burlaka, Ya.B. Blume, A.I. Yemets // International research and practice conference «Nanotechnology and Nanomaterials», 26 – 29 серпня 2015 р., Львів, Україна. – С. 378 – 379.

16. Borovaya M.N. Production of semiconductor CdS nanoparticles by plant hairy root culture / M.N. Borovaya, A.P. Naumenko, N.A. Matvieieva, Ya.B. Blume, A.I. Yemets // «Functional Materials and Nanotechnologies», 5 – 8 жовтня 2015 р., Вільнюс, Литва. – С. 95.

17. Borovaya M.N. Study of the toxic effects of biologically synthesized CdS quantum dots on the various living systems / M.N. Borovaya, L.V. Garmanchuk, O.M. Burlaka, O.V. Protsenko, L.I. Ostapchenko, Ya.B. Blume, A.I. Yemets // International research and practice conference «Nanotechnology and Nanomaterials», 24 – 27 серпня 2016 р., Львів, Україна. – С. 446.

18. Borovaya M.N. «Green» synthesis of CdS quantum dots by biological matrices/ M.N. Borovaya, A.P. Naumenko, Ya.B. Blume, A.I. Yemets // Українська конференція з міжнародною участю «Chemistry, Physics and Technology of Surface», 24 – 25 травня 2017 р., Київ, Україна. – С. 36.

19. Borovaya M.N. Surface functionalization of CdS quantum dots and their application in bioimaging / M.N. Borovaya, A.P. Naumenko, Ya.B. Blume, A.I. Yemets // International research and practice conference «Nanotechnology and Nanomaterials», 23 – 26 серпня 2017 р., Чернівці, Україна. – С. 592.

АНОТАЦІЯ

Борова М.М. «Зелений» синтез флуоресцентних квантових точок CdS та характеристика їх властивостей

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2018

У дисертаційній роботі розроблено нові методики «зеленого» синтезу квантових точок CdS з використанням таких біологічних матриць як бактерія *Escherichia coli*, базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus*, культура «бородатих» коренів *Linaria maroccana*, суспензійна культура *Nicotiana tabacum* (BY-2). Показано, що максимум поглинання синтезованих квантових точок CdS (*E. coli*) знаходиться у діапазоні 420 – 440 нм, максимум люмінесценції – на довжині хвилі 443 нм. Для квантових точок CdS, що синтезовані з використанням *P. ostreatus* є характерними максимумами поглинання (453 нм) та люмінесценції (462 нм). Квантові точки, які отримано за допомогою *L. maroccana*, мають максимумами поглинання (398 нм) та люмінесценції (462 нм), тоді як для квантових точок, синтезованих із застосуванням *N. tabacum* (BY-2), притаманні максимумами поглинання (292 нм) та люмінесценції (381 нм). За

допомогою методу ТЕМ продемонстровано, що квантові точки мають сферичну форму, не мають поверхневих дефектів та мають діаметр у діапазоні від 3 до 9 нм, залежно від обраної для синтезу біологічної матриці. Показано, що квантові точки CdS не чинять суттєвих негативних впливів на рослинні та тваринні клітини, порівняно з неорганічним кадмієм. Крім того, розроблено методику функціоналізації квантових точок CdS (*P. ostreatus*) з використанням ПЕГ та БСА. Встановлено, що спектри фотолюмінесценції функціоналізованих наночастинок CdS дещо відмінні від спектрів вихідних наночастинок CdS, а саме, у діапазоні довжин хвиль 460 – 470 нм спостерігалася поява протяжного максимуму, відсутнього у спектрах вихідних наночастинок, що свідчить про взаємодію молекул ПЕГ та БСА з наночастинками CdS.

Ключові слова: квантові точки, сульфід кадмію, «зелений» синтез, фотолюмінесценція, трансмісійна електронна мікроскопія, токсичність, біовізуалізація, функціоналізація.

АННОТАЦІЯ

Боровая М.Н. «Зеленый» синтез флуоресцентных квантовых точек CdS и характеристика их свойств

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2018

В диссертационной работе разработаны новые методы биологического синтеза квантовых точек CdS с использованием таких биологических объектов как бактерия *Escherichia coli*, базидиальный гриб *Pleurotus ostreatus*, культура «бородатых» корней *Linaria maroccana*, суспензионная культура *Nicotiana tabacum* (BY-2). Показано, что максимум поглощения синтезированных квантовых точек CdS (*E. coli*) находится в диапазоне 420 – 440 нм, максимум люминесценции – на длине волны 443 нм. Для квантовых точек CdS, синтезированных с использованием *P. ostreatus*, характерны максимумы поглощения (453 нм) и люминесценции (462 нм). Квантовые точки, полученные при помощи *L. maroccana*, имеют максимумы поглощения (398 нм) и люминесценции (462 нм), тогда как для квантовых точек, синтезированных с использованием как матрицы *N. tabacum* (BY-2) свойственны максимумы поглощения (292 нм) и люминесценции (381 нм). С помощью метода ТЕМ продемонстрировано, что квантовые точки имеют сферическую форму, не имеют дефектов поверхности, их диаметр составляет 3 - 9 нм в зависимости от использованной для синтеза биологической матрицы. Показано, что квантовые точки CdS не оказывают негативного воздействия на растительные и животные клетки по сравнению с неорганическим кадмием. Нами также разработана методика функционализации квантовых точек CdS (*P. ostreatus*) с использованием ПЕГ и БСА. Установлено, что спектры фотолюминесценции функционализированных наночастиц CdS отличаются от спектров исходных наночастиц CdS, а именно, в диапазоне длин волн 460 – 470 нм наблюдалось

появление протяженного максимума, отсутствующего в спектрах исходных наночастиц, что свидетельствует о взаимодействии молекул ПЕГ и БСА с наночастицами CdS.

Ключевые слова: квантовые точки, сульфид кадмия, «зеленый» синтез, фотолюминесценция, трансмиссионная электронная микроскопия, цитотоксичность, биовизуализация, фукционализация.

SUMMARY

Borovaya M.N. «Green» synthesis of fluorescent CdS quantum dots and characterization of their properties

The thesis for the Candidate of Science degree in Biology (speciality 03.00.20 - biotechnology). – Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018

New methods of biological synthesis of CdS quantum dots have been developed using such biological matrices as a bacterium *Escherichia coli*, basidial fungus *Pleurotus ostreatus*, «hairy root» culture of *Linaria maroccana*, cell suspension culture of *Nicotiana tabacum* (BY-2). It was shown that an absorption maximum of synthesized CdS quantum dots (*E. coli*) is in the range of 420 – 440 nm, luminescent maximum – at the wavelength of 443 nm. Absorption peak of 453 nm and luminescent maximum of 462 nm are typical for CdS quantum dots, which are synthesized using *P. ostreatus*. For quantum dots obtained with *L. maroccana* it was observed an absorption maximum of 398 nm and luminescent peak at 462 nm, whereas for quantum dots produced using *N. tabacum* (BY-2) absorption and luminescent maxima corresponded to 292 nm and 381 nm respectively. According to TEM results it was demonstrated that CdS quantum dots have a spherical shape, have no surface defects, and also have a diameter in the range from 3 to 9 nm, depending on the biological matrix. It was shown the absence of the negative effects of synthesized CdS nanoparticles on plant and animal cells. In addition, a technique for the functionalization of CdS quantum dots (*P. ostreatus*) using PEG and BSA has been developed. It has been established that the photoluminescence spectra of functionalized CdS nanoparticles differ from the spectra of the initial CdS nanoparticles, namely, in the wavelength range 460 – 470 nm an extended maximum was observed that is absent in the spectra of the initial nanoparticles, which indicates the interaction of PEG and BSA molecules with CdS nanoparticles. So we can concluded that produced CdS quantum dots are stable, have a high luminescence intensity, can penetrate to plant cells which makes them novel non-toxic fluorescent probes for biomedical applications.

Keywords: quantum dots, cadmium sulfide, «green» synthesis, photoluminescence, transmission electron microscopy, cytotoxicity, bioimaging, functionalization.