

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**  
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА**  
**«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ**  
**НАН УКРАЇНИ»**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**БОРОВА МАРІЯ МИКОЛАЇВНА**

**УДК 546.3:544.77:577-04**

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Борова М.М.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент  
НАН України Ємець Алла Іванівна

Київ – 2017

	2
АНОТАЦІЯ.....	6
SUMMARY.....	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. Властивості, методи синтезу та перспективи застосування кадмій-вмісних квантових точок (огляд літератури).....	25
1.1. Загальна характеристика та класифікація квантових точок.....	25
1.2. Оптичні властивості квантових точок.....	28
1.3. Фізичні методи синтезу квантових точок.....	32
1.4. Хімічні методи синтезу квантових точок.....	35
1.5. Особливості біологічного синтезу кадмій-вмісних квантових точок.....	39
1.5.1. Синтез квантових точок за використання бактерій.....	39
1.5.2. Синтез квантових точок за використання дріжджів.....	43
1.5.3.1. Синтез квантових точок за використання багатоклітинних організмів.....	44
1.5.3.2. Синтез квантових точок за використання діатомових водоростей.....	45
1.5.3.3. Синтез квантових точок за використання грибів.....	47
1.5.3.4. Синтез квантових точок з використанням рослинних екстрактів.....	48
1.6. Викорстання квантових точок як люмінесцентних міток для візуалізації внутрішньоклітинних структур та процесів у живих клітинах.....	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1. Об'єкти досліджень.....	56
2.2. Реактиви, що були застосовані у роботі.....	56
2.3. Умови культивування біологічних об'єктів.....	57
2.4. Синтез квантових точок CdS за допомогою біоматриць.....	58
2.5. Дослідження оптичних характеристик біосинтезованих квантових точок CdS.....	60
2.6. Трансмійсна електронна мікроскопія, електронографія та	

рентгеноспектральний мікроаналіз зразків синтезованих квантових точок CdS.....	61
2.7. Методика функціоналізації квантових точок CdS.....	63
2.8. Люмінесцентна мікроскопія рослинних та тваринних клітин.....	63
2.9. Дослідження впливу отриманих квантових точок CdS на рослинні та тваринні моделі.....	64
2.9.1. Вплив квантових точок CdS на протопласти <i>Nicotiana tabacum</i> .....	64
2.9.2. Вплив квантових точок CdS на пухлинні клітини лінії HeLa.....	66
2.10. Вплив синтезованих квантових точок CdS на <i>Drosophila melanogaster</i> .....	69
2.11. Статистична обробка даних.....	70
РОЗДІЛ 3. Синтез квантових точок CdS за використання бактерії <i>E. coli</i> ....	72
3.1. Оптичні властивості квантових точок CdS, синтезованих за використання <i>E. coli</i> .....	73
3.2. Структурно-морфологічні властивості квантових точок CdS, синтезованих за використання <i>E. coli</i> .....	78
3.3. Електронографія та елементний рентгеноспектральний мікроаналіз квантових точок CdS, синтезованих за допомогою <i>E. coli</i> .....	80
РОЗДІЛ 4. Синтез квантових точок CdS, за використання базидіального гриба <i>P. ostreatus</i> .....	84
4.1. Характеристика люмінесцентних властивостей квантових точок CdS, отриманих за використання <i>P. ostreatus</i> .....	84
4.2. Структурно-морфологічні особливості квантових точок CdS, що синтезовані за допомогою <i>P. ostreatus</i> .....	89
4.3. Електронографія та елементний рентгеноспектральний мікроаналіз квантових точок CdS, синтезованих за допомогою <i>P. ostreatus</i> .....	91
РОЗДІЛ 5. Синтез квантових точок CdS, отриманих за використання рослинних матриць.....	94

5.1. Аналіз оптичних властивостей квантових точок сульфїду кадмію, синтезованих за використання <i>L. maroccana</i> .....	95
5.2. Структура та морфологія квантових точок сульфїду кадмію, синтезованих за допомогою <i>L. maroccana</i> .....	99
5.3. Електроннографія та локальний рентгеноспектральний аналіз квантових точок CdS, синтезованих за використання <i>L. maroccana</i> .....	102
5.4. Особливості оптичних характеристик квантових точок CdS, отриманих за допомогою <i>Nicotiana tabacum</i> (BY-2).....	103
5.5. Аналіз структурно-морфологічних особливостей квантових точок CdS, синтезованих за використання <i>N. tabacum</i> (BY-2).....	106
5.6. Електроннографія та елементний рентгеноспектральний мікроаналіз квантових точок CdS, що синтезовані за допомогою BY-2.....	109
РОЗДІЛ 6. Дослідження цитотоксичних впливів синтезованих квантових точок сульфїду кадмію.....	113
6.1. Визначення цитотоксичності квантових точок CdS на протопласти <i>N. tabacum</i> .....	114
6.2. Дослідження токсичної дії квантових точок CdS на пухлинні клітини лінії HeLa.....	119
6.3. Вплив синтезованих квантових точок CdS на <i>Drosophila melanogaster</i> .....	126
6.4. Внутрішньоклітинна локалізація синтезованих квантових точок CdS.....	132
РОЗДІЛ 7. Функціоналізація поверхні квантових точок CdS.....	137
7.1. Оптична спектрофотометрія наночастинок CdS, що функціоналізовані за допомогою ПЕГ.....	138
7.2. Оптична спектрофотометрія наночастинок CdS, що функціоналізовані з використанням БСА.....	141
Узагальнення отриманих результатів.....	145

Висновки.....	152
Список використаних джерел.....	154
Додаток А.....	173
Додаток Б.....	174

## АНОТАЦІЯ

*Борова М.М.* «Зелений» синтез флуоресцентних квантових точок CdS та характеристика їх властивостей. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (09 – біологія), ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2017.

Бінарні халькогеніди нанометрових розмірів, які належать до II-VI груп періодичної системи елементів, а саме CdS, PbS, ZnS, CdSe, PbSe, привертають значну увагу завдяки унікальним квантово-розмірним властивостям. Серед названих сполук найбільш інтенсивно досліджують CdS через можливість його застосування в оптоелектроніці, різноманітних біосенсорах, а також як альтернативу широкоживим органічним барвникам через високу фотостабільність та стійкість до фотовицвітання. Зазвичай наночастинки CdS отримують з використанням мікрохвильового нагріву, мікроемульсійного синтезу, ультразвукового опромінення тощо. Проте, часто фізико-хімічні методи є шкідливими через накопичення токсичних побічних продуктів, потребують високотоксичних реактивів, спеціального лабораторного устаткування, залишаються низькопродуктивними та досить дорогавартісними. Саме тому біосинтез напівпровідникових наночастинок сульфїду кадмію на сьогоднішній день розглядають як новий перспективний напрям біотехнологічних досліджень. Зазначений тип синтезу наноматеріалів суттєво зменшує навантаження на довкілля, є економічно ефективним та високопродуктивним.

У дисертаційній роботі представлено нові легко відсворювані методики позаклітинного синтезу квантових точок CdS за використання таких біологічних об'єктів як бактерія *Escherichia coli*, базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus*, культура «бородатих» коренів *Linaria maroccana* та суспензійна культура *Nicotiana tabacum* (BY-2).

Отримані нами результати підтверджують дані попередніх досліджень, що використання культури *E. coli* дозволяє синтезувати нанорозмірні квантові точки сульфід кадмію позаклітинно. Показано, що максимум люмінесценції синтезованих квантових точок CdS знаходиться на довжині хвилі 443 нм, що є типовим для наночастинок сульфід кадмію, синтезованих за використання мікроорганізмів. Крім того, за допомогою оптичного спектрального аналізу нами вперше встановлено стабільність утворених квантових точок. Виявлено, що наночастинки з часом лише частково агломерують, однак зберігають здатність до люмінесценції протягом 3 місяців після синтезу. За використання методу трансмісійної електронної мікроскопії встановлено, що квантові точки мають форму близьку до сферичної, не мають поверхневих дефектів та мають діаметр від 5 до 10 нм.

Крім того, нами розроблено методику синтезу квантових точок CdS за використання базидіального гриба *P. ostreatus*. За допомогою спектрального аналізу встановлено, що отримані піки поглинання (453 нм) та люмінесценції (462 нм) є типовими для квантових точок CdS. Використовуючи метод трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) продемонстровано, що отримані квантові точки у середньому мають діаметр 3,5 – 5,5 нм. Методом електронографії встановлено, що для отриманих наночастинок CdS характерною є структура кристалічної ґратки, яка відповідає модифікації вюрцит.

Також нами розроблено методику отримання напівпровідникових наночастинок CdS за допомогою культури «бородатих» коренів *Linaria maroccana* L. Встановлено, що піки поглинання відповідають довжинам хвиль 362, 398 та 464 нм, у той час як максимумами люмінесценції знаходяться на довжинах хвиль 425, 462 та 500 нм. За використання ТЕМ виявлено, що синтезовані наночастинки мають розміри 5 – 7 нм та не містять помітних поверхневих дефектів. Отримані результати вперше характеризують особливості біосинтезу квантових точок за використання культури «бородатих» коренів. Крім того, вперше запропоновано методику синтезу нанорозмірного CdS за використання суспензійної культури *N. tabacum* (BY-2). Показано, що у спектрі по-

глинання отриманих зразків спостерігається максимум, який відповідає довжині хвилі 292 нм. У спектрі фотолюмінесценції було зафіксовано пік на довжині хвилі 381 нм, що свідчить про зменшення діаметру квантових точок. Дані ТЕМ добре узгоджуються з результатами оптичного аналізу зразків. Зокрема, виявлено, що максимум розподілу наночастинок CdS за розмірами знаходиться у межах 3,0 – 4,0 нм.

Досліджено цитотоксичний вплив синтезованих квантових точок на тваринних та рослинних тест-системах. Показано, що використання низьких концентрацій квантових точок не має жодних негативних впливів на морфологію та життєздатність рослинних протопластів. При використанні концентрацій від 0,06 до 0,012 мг/мл відсоток неушкоджених протопластів з нормальною морфологією знаходився у межах 80 – 90 %. Окрім протопластів, вплив синтезованих нами квантових точок CdS було досліджено на клітинах лінії HeLa (клітини раку шийки матки людини). 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 *P. ostreatus*. Дослідження токсичного ефекту квантових точок CdS, на класичному модельному організмі *Drosophila melanogaster* продемонструвало, що концентрації квантових точок CdS на рівні 0,13 та 0,4 мг/мл не впливають суттєво на життєздатність мух. Наночастинок CdS не чинили також генотоксичного або мутагенного впливу на *D. melanogaster*.

При цьому варто відзначити, що використання водного розчину сульфід кадмію у діапазоні зазначених концентрацій, виявилось надзвичайно токсичним для досліджуваних об'єктів. Низький токсичний вплив кадмієвмісних наночастинок можна пов'язати з наявністю специфічного органічного покриття біологічного походження навколо них, яке відіграє роль природного стабілізатора, а також перешкоджає прямому контакту іонів кадмію з живими



клітинами. Виявлено, що отримані квантові точки CdS мають високу інтенсивність люмінесценції, що у поєднанні з розміром у межах 10 нм дозволяє використовувати їх як люмінесцентні мітки для прижиттєвої візуалізації клітин. Для синтезованих квантових точок є характерною люмінесценція у діапазоні довжин хвиль видимого світла, що відповідає синьому та блакитному кольорам.

Нами також розроблено методику функціоналізації отриманих шляхом «зеленого» синтезу квантових точок CdS за використання полі етиленгліколю (ПЕГ) та бичачого сировоткового альбуміну (БСА). Функціоналізація необхідна для мінімізації можливих небажаних ефектів біологічних матриць, що були використані для синтезу наночастинок. Внаслідок функціоналізації створюється інертне покриття навколо ядра квантових точок, що є безпечним для внутрішньоклітинного середовища. Встановлено, що спектри фотолюмінесценції функціоналізованих квантових точок CdS мали відмінності від спектрів вихідних наночастинок CdS, а саме, в області довжин хвиль 460 – 470 нм спостерігали появу протяжного максимуму, відсутнього у спектрах вихідних наночастинок. Крім того, спектри не містили максимумів, характерних для вихідних розчинів ПЕГ та БСА, що свідчить про перехід молекул ПЕГ та БСА у зв'язаний стан з наночастинками CdS.

Таким чином, у дисертаційній роботі запропоновано нові методики «зеленого» синтезу квантових точок CdS. Отримані наночастинки можуть бути застосовані у подальшому напрямі досліджень, що пов'язаний з візуалізацією клітинних структур, створенням біокон'югатів квантових точок з білками, ДНК, антитілами для імуногістохімічних аналізів. Синтезовані квантові точки можна розглядати як безпечні люмінесцентні нанозонди нового покоління.

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

## SUMMARY

*Borovaya M.N.* «Green» synthesis of fluorescent CdS quantum dots and characterization of their properties. Qualification scientific work as the manuscript. Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences. on a speciality 03.00.20 – biotechnology, (09–biology), Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

Nanometer-sized binary chalcogenides belonging to the groups II–VI semiconductors such as CdS, PbS, ZnS, CdSe, PbSe, etc. have attracted considerable attention due to their unique if compared to their bulk counterparts properties related to the size quantization properties. Among these compounds, CdS is the most intensively investigated due to the possibility of its use in optoelectronics, as biosensors, and also as an alternative to widely used organic dyes because of high photostability and resistance to photobleaching. Typically, CdS nanoparticles are obtained using microwave heating, microemulsion synthesis, ultrasound irradiation etc. However, physico-chemical methods are often harmful because of the accumulation of toxic by-products, need high-toxic reagents, special laboratory equipment, remain low-yielding and fairly expensive. That is why the biosynthesis of semiconductor cadmium sulfide quantum dots is considered today as a new promising field of biotechnological research. This type of synthesis of nanomaterials significantly reduces the environmental burden, is cost effective and highly productive.

In the thesis, new easily reproducible methods of biological synthesis of CdS quantum dots have been developed using such biological objects as a bacterium *Escherichia coli*, basidial fungus *Pleurotus ostreatus*, «hairy root» culture of *Linaria maroccana*, cell suspension culture of *Nicotiana tabacum* (BY-2).

The results confirm that the use of *E. coli* supernatant allows to obtain nanosized cadmium sulfide quantum dots extracellularly. It is shown that a maximum at luminescent spectrum of synthesized CdS quantum dots is at a wavelength of 443 nm, which is typical for cadmium sulfide nanoparticles synthesized by microorganisms. In addition, the stability of produced quantum dots has been investigat-

ed for the first time with the aid of optical spectral analysis. It was established that nanoparticles are partially agglomerated over time, but retain their luminescence ability within a month after sample preparation. By the method of transmission electron microscopy, it has been demonstrated that quantum dots have a spherical shape, have no surface defects and have a diameter from 5 to 10 nm.

In addition, the method of biological synthesis of CdS quantum dots by *P. ostreatus* is developed. It was found that absorption (453 nm) and luminescent peaks (462 nm) are typical for CdS quantum dots. TEM method demonstrated that produced quantum dots have an average diameter within 3.5 – 5.5 nm. By electron diffraction spectroscopy it was found that CdS nanoparticles have a wurtzite modification structure of the crystalline lattice. Also it has been developed the technique for semiconductor CdS quantum dots synthesis using hairy root culture of *Linaria maroccana*. It was established that absorption peaks correspond to wavelengths at 362 nm, 398 nm and 464 nm, while the luminescent maxima are at wavelengths of 425 nm, 462 nm and 500 nm. Using TEM, it was found that synthesized nanoparticles have dimensions in the range of 5 – 7 nm and do not significant surface defects. Obtained results characterize the features of biosynthesis of quantum dots by hairy roots for the first time. In addition, a new approach for the biological synthesis of nanosized CdS with the use of cell suspension culture of *N. tabacum* (BY-2) was proposed. It is shown that absorption spectrum of CdS samples had a maximum corresponding to a wavelength of 292 nm. In a photoluminescence spectrum a clear peak at 381 nm was observed, indicating a decrease the diameter of quantum dots. TEM data are in good agreement with the results of optical analysis. In particular, it was found that a maximum of particle size distribution is in the range of 3.0 – 4.0 nm.

The cytotoxic influence of synthesized CdS quantum dots on animal and plant test-systems was investigated. It is shown that the use of low concentrations of quantum dots does not have any negative effects on the morphology and viability of plant protoplasts. When using concentrations from 0.06 to 0.012 mg / mL, the percentage of intact protoplasts with normal morphology was within 80-90%. Ex-

cept the protoplasts, the effect of the synthesized quantum dots of CdS was investigated on HeLa cells. According to the results of the studies, the lowest toxic effect have CdS quantum dot in dilution 1:8 - 1:16. The percentage of living cells was 85 - 95%. With a gradual increasing of the concentrations (dilution 1:1 - 1:4), the proportion of living cells declined and was 42-80% depending on the biological matrix. The lowest toxic effect was demonstrated by the quantum dot CdS, which was synthesized using *P. ostreatus*. The study of the toxic effect of CdS quantum dots on the model organism *D. melanogaster* demonstrated that the concentrations of CdS quantum dots at 0.4 and 0.13 mg / mL do not significantly affect the viability of flies. CdS nanoparticles did not have any genotoxic or mutagenic effect on *D. melanogaster*.

It should be noted that inorganic cadmium sulfide at equimolar concentrations was extremely toxic to the studied organisms. The low toxicity of cadmium-containing nanoparticles is associated with the presence of a specific organic coating of biological origin around them, which plays a role as a natural stabilizer, and also prevents the direct contact of cadmium ions with living cells.

It was found that obtained CdS quantum dots have a high luminescence intensity, which in a combination with a size within 10 nm allows them to be used as fluorescent labels for lifetime cell imaging. Synthesized quantum dots have a luminescence in the range of visible light corresponding to blue color.

The process of functionalisation of produced CdS quantum dots is investigated using polyethelene glycol (PEG) and bovine serum albumin (BSA). Functionalization is necessary to minimize the undesirable effects of biological media, which served as matrixes for biosynthesis. An inert coating around the core of quantum dots is formed due to a functionalization. It is established that photoluminescence spectra of the functionalized CdS quantum dots have differences from the spectra of the initial CdS nanoparticles, namely, the appearance of a stretch maximum, which is absent in the spectra of initial nanoparticles is observed at the wavelength 460 – 470 nm. In addition, the resulted spectra do not contain the maxima, which

are observed for initial solutions of PEG and BSA, indicating the transition of PEG and BSA molecules to a bound state with CdS nanoparticles.

Thus, the thesis proposed new methods of "green" synthesis of CdS quantum dots. The resulting nanoparticles can be used in further research, which is related to bioimaging of cell structures, the creation of bioconjugates of quantum dots with proteins, DNA, and antibodies for immunohistochemical analyzes. Synthesized quantum dots are a new generation of safe luminescent nanoprobes.

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

#### Список публікацій за темою дисертаційної роботи

##### Статті:

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.
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.
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.B. Blume, A.I. Yemets // Nanoscale Res.Lett. - 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 1 – 7.
4. Borovaya M.N. Biosynthesis of cadmium sulfide quantum dots using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. / M.N. Borovaya, Ya.V. Pirko, T.A. Krupodорова, A.P. Naumenko, Ya.B. Blume, A.I. Yemets // Biotechnol. & Biotec. Eq.– 2015. – Vol. 29, № 6. – P.1156 – 1163.
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.

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. – т. 4. – С.111 – 117.

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. – т. 5. – С.117 – 124.

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 (Розділ у монографії).

Тези:

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, 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, 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. Пирко, А.И.

Емец, Я.Б. Блюм // IV Международная научная конференция «Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии», 19 – 22 ноября 2013, Киев, Украина. – 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. Ємец, Я.Б. Блюм // International online Conference & 2nd Conference of Young Scientists "Plant biology and biotechnology", 23 – 24 грудня 2013, 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 FESPB/EPSO 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.B. Blume, A.I. Yemets // International research and practice conference: «Nanotechnology and nanomaterials», 23 – 30 серпня 2014, 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, 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, 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 // In-

ternational research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials», 24 – 27 серпня 2016, Львів, Україна. – С. 446.

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

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



**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ТОРО – три-*n*-октилфосфіноксид

ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія

МТТ – 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразоліум бромід

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота

ПЕГ – поліетиленгліколь

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ДМСО – диметилсульфоксид

ПЙ – пропідіум йодид

## ВСТУП

**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 сульфїду 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 .

Важлива особливість квантових точок визначається існуванням квантово-розмірних ефектів, які проявляються при зменшенні розмірів наночастинок  $\leq 10$  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. За умови набуття нанорозмірів квантові точки CdS виявляють нові фізичні властивості. Просторове обмеження, що виникає у частинках розміром  $< 10$  нм, впливає на довжину де-бройлівської хвилі електронів, зменшуючи її у порівнянні з монокристалами CdS. Даний ефект лежить в основі специфічних оптичних та фізичних властивостей наночастинок CdS, його визначають як квантово-розмірний ефект [1].

На початку розвитку напряму нанотехнологій основна увага приділялася, передусім, фізико-хімічним способам отримання наночастинок із заданими властивостями. У 1980-х роках було запропоновано два основні хімічні підходи до синтезу квантових точок з високим квантовим виходом люмінесценції. Зокрема, це органометалевий синтез, що відбувається за умов кипіння високотоксичних органічних розчинників, таких як три-*n*-октилфосфін оксид, триоктилфосфін або гексадециламін. Експериментально другий метод хімічного синтезу є також високотемпературним і вимагає введення інертного газу

одночасно зі швидким вприскуванням нагрітих прекурсорів металів. Вказані методи потребують для виконання спеціальних лабораторних установок, а також надзвичайно токсичних хімічних агентів: летких прекурсорів металів, диметилукадмію ( $\text{Cd}(\text{Me})_2$ ), газофазних халькогенідів ( $\text{H}_2\text{Te}$ ) тощо. Саме тому на даний час актуальним питанням є пошук та розвиток альтернативних екологічно безпечних, надійних, відтворюваних, економічно виправданих та менш енергозатратних методів синтезу напівпровідникових наноматеріалів.

Серед відомих технологій синтезу квантових точок CdS розрізняють також молекулярно-променеву епітаксію та літографію та 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. 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. 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 рамках проекту «Розроблення дослідно-промислової технології синтезу точкових наночастинок за допомогою фітоємкостей та ку-

льтури клітин рослин для візуалізації субклітинних структур (2010–2014 р.р., ДР № 0110U004665), а також за підтримки проекту 3/28 «Розробка нанобіотехнологічних підходів отримання квантових точок сульфїду кадмію та дослідження їх біологічної активності» (2014-2016 р.р.) відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при Національній академії наук України (РК 0114U003873).

**Мета і 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 в 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 сироваткового 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 одержаних 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.** Ідея дослідження, постановка наукових завдань, наступна інтерпретація отриманих результатів, розробка структури дисертаційної роботи, а також публікація наукових статей була здійснена спільно з науковим керівником. Автором особисто опрацьовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, проведено основні експериментальні дослідження, викладено основні положення та узагальнення дисертаційної роботи.

**Апробація результатів дослідження.** 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, в тому числі 7 статей у фахових наукових виданнях (3 статті у закордонних фахових виданнях, що входять до наукометричних баз даних), 11 тез, які опубліковані у матеріалах конференцій та 1 розділ у монографії.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота обсягом 155 сторінок складається зі 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.

Автор висловлює щирю подяку академіку НАН України Блюму Ярославу Борисовичу за надзвичайно актуальну ідею наукового дослідження, а також за всебічну підтримку та сприяння даній роботі. Здобувач щиро вдячна науковому керівникові члену-кореспонденту НАН України, професору, доктору біологічних наук Ємець Аллі Іванівні за цінні наукові рекомендації при

плануванні та виконанні експериментів, досвід, поради й підтримку при підготовці фахових статей та дисертаційної роботи. Крім того, дисертантка висловлює вдячність к.ф.м.н., с.н.с. Інституту проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича Даниленко Миколі Івановичу та к.ф.м.н., с.н.с. фізичного факультету Київського національного університету ім. Тараса Шевченка Науменко Антоніні Прокопівні за допомогу при проведенні досліджень методами ТЕМ та оптичної спектрофотометрії.



# РОЗДІЛ 1

## ВЛАСТИВОСТІ, МЕТОДИ СИНТЕЗУ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ КАДМІЙ-ВМІСНИХ КВАНТОВИХ ТОЧОК (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1. Загальна характеристика та класифікація квантових точок

Люмінесцентні напівпровідникові наночастинки відомі в літературі як квантові точки. Квантову точку визначають як фрагмент напівпровідника, носії заряду якого (електрони чи дірки) обмежені у просторі в усіх трьох напрямках [1]. Як наслідок, квантові точки мають проміжні властивості між об'ємними напівпровідниками і дискретними молекулами. Їх часто називають «штучними атомами», тому що для квантових точок властиві дискретні рівні енергії, а ширина їх забороненої зони може змінюватися через варіювання їх розмірів [1, 2]. Такі нанокристали, часто сферичні за морфологією, мають напівпровідникове ядро, що утворене елементами II-VI або III-V груп періодичної системи, оточене оболонкою, яка складається з інших напівпровідникових матеріалів. Зазвичай квантові точки містять від 100 до 10 000 атомів та мають діаметр в межах 2-10 нм [2]. До типових напівпровідникових нанокристалів відносять ZnS, CdS, CdSe, CdTe та InP, InAs. Зазначені наночастинки характеризуються унікальними оптичними та оптоелектронними властивостями для широкого діапазону застосування. Зокрема, напівпровідникові наночастинки співставні за розмірами з біологічними макромолекулами, що дозволяє застосовувати їх у біологічних системах [3].

Важливо відмітити, що існує декілька класифікацій квантових точок залежно від їх складу, форми, методів отримання тощо. За складом (матеріалом напівпровідника) розрізняють широкозонні напівпровідники (оксиди ZnO, TiO<sub>2</sub>) – ультрафіолетовий діапазон випромінення; середньозонні напівпровідники (халькогеніди кадмію) – видимий діапазон випромінення та вузькозонні напівпровідники (наприклад, халькогеніди свинцю) – мають ближній інфрачервоний діапазон випромінення [4]:

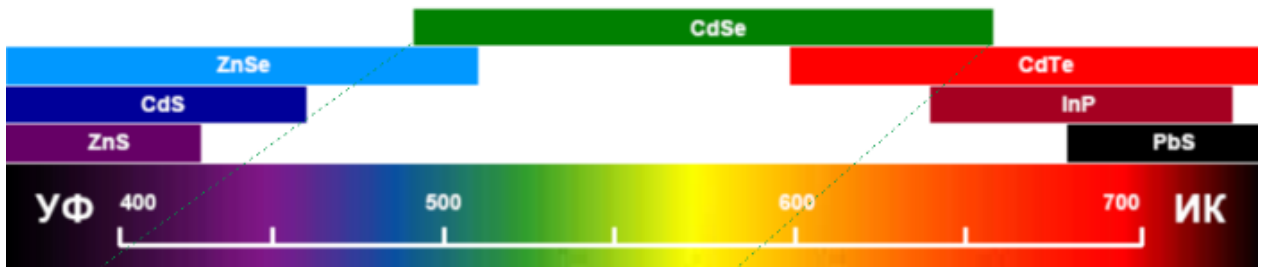


Рис. 1.1. Діапазони довжин хвиль випромінення колоїдних квантових точок різних напівпровідникових матеріалів (шкала довжин хвиль у нм) [4]

Форма нанокристалів також може впливати на їх властивості. За формою нанокристали поділяють на сферичні (власне квантові точки), що мають широке практичне застосування, та еліпсоїдні – видовжені вздовж одного з напрямків. Даний клас квантових точок використовують як джерело поляризованого випромінювання, їх часто називають нанострижнями. Відзначають також нанокристали зі складною геометрією – кубічні або зіркоподібні структури, які знаходять практичне застосування, зокрема, у відображувальній техніці. До багатоконпонентних квантових точок належать леговані напівпровідникові нанокристали. Основними легуючими домішками є марганець або мідь [4]. Для квантових точок можливе утворення твердих розчинів напівпровідників, якщо спостерігається взаєморозчинність матеріалів в об'ємному стані. Крім того, існують квантові точки на основі гетеропереходів. Даний підхід реалізується в квантових точках типу ядро-оболонка. Квантові точки такої структури, у свою чергу, поділяються на два типи: тип I – широкозонний напівпровідник є оболонкою, вузькозонний – ядром. Тип II – ширини заборонених зон напівпровідників збігаються, але краї зон зсунуті один відносно одного [4]. За методом створення квантові точки поділяють на колоїдні – тип синтезу, за якого речовини змішуються в розчині, та епітаксіальні – кристали нарощуються на поверхні підкладки [4].

Фундаментальною особливістю наносистем і, зокрема, квантових точок, є існування квантово-розмірних ефектів. Під квантово-розмірними ефектами

розуміють зміну фізичних властивостей кристалу, коли щонайменше один з його геометричних розмірів стає співмірним з довжиною хвилі де Бройля електрона [5],

$$\lambda_A = \frac{h}{p} = \frac{h}{mV}, \quad (1.1.)$$

де  $p = mV$  – імпульс електрона. Зокрема, у напівпровідниках  $\lambda_A \approx 100$  нм, у металах  $\lambda_A \approx 1$  нм. Якщо для характерного розміру кристалу ( $d$ ) у деякому напрямку виконується умова  $d \leq \lambda_A$ , то рух електрона у цьому напрямку є просторово обмеженим і подібним до руху у потенціальній ямі шириною  $d$ . Тоді, енергія електрона ( $E_n$ ) набуває дискретних значень і визначається характерним розміром  $d$ :

$$E_n = \frac{\pi^2 \hbar^2 n^2}{2md^2}, \quad (1.2)$$

де  $\hbar = 1,054 \cdot 10^{-34}$  Дж·с – стала Планка,  $m$  - маса електрона,  $n = 1, 2, 3, \dots$ , - квантове число.

Напівпровідникові квантові точки є системами, у яких рух носіїв заряду – електронів та дірок, обмежений за трьома координатними напрямками і тому енергії електронів ( $E_n^{(e)}$ ) і дірок ( $E_n^{(h)}$ ) обернено-пропорційні квадрату діаметру ( $D$ ) квантової точки [6, 7]:

$$E_n^{(e)} = \frac{\pi^2 \hbar^2 n^2}{2m_e D^2}, \quad E_n^{(h)} = \frac{\pi^2 \hbar^2 n^2}{2m_h D^2}, \quad (1.3)$$

де  $m_e$ ,  $m_h$  - ефективні маси відповідно електрона та дірки у кристалі. Отже, згідно з (1.3) енергетичний спектр електронно-діркових пар у квантових точках визначається діаметром квантових точок.

Важливим проявом такого квантово-розмірного ефекту є зміна ширини забороненої зони кристалу залежно від розміру квантової точки. У роботі [8]

вперше було показано, що при зменшенні діаметру квантової точки ширина забороненої зони зростає і дорівнює:

$$\Delta E_g^{(nano)} = \Delta E_g^{(bulk)} + \frac{2\pi^2\hbar^2}{D^2} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right) - \frac{3,6e^2}{\epsilon D} - \frac{0,124e^4}{\hbar^2\epsilon^2} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right) \quad (1.4)$$

де  $\Delta E_g^{(bulk)}$  - ширина забороненої зони напівпровідника макроскопічних розмірів,  $\Delta E_g^{(nano)}$  - ширина забороненої зони квантової точки,  $\epsilon$  - діелектрична проникність напівпровідника,  $D$  - діаметр квантової точки,  $e$  - заряд електрона. Наприклад, для кристалів CdS ширина забороненої зони зростає від  $\Delta E_g^{(bulk)} = 2,58$  еВ ( $T = 0$  К) до  $\Delta E_g^{(nano)} = 3,01$  еВ для квантової точки діаметром  $D = 4$  нм.

Таким чином, у напівпровідникових квантових точках електрони демонструють властивості, подібні до електронів в ізольованому атомі. Загалом розрізняють два типи розмірних ефектів: внутрішні та зовнішні. Внутрішні пов'язані зі специфічними змінами об'ємних, поверхневих та хімічних властивостей як індивідуальних частинок, так і отриманих внаслідок самоорганізації їх ансамблів. Внутрішній розмірний ефект може виникати при зміні структури частинки і локалізації електронів під впливом поверхні. Зовнішній ефект є розмірно-залежним відгуком на зовнішнє поле або дію сил, незалежних від внутрішнього ефекту [9].

## 1.2. Оптичні властивості квантових точок

Зазначені квантово-розмірні ефекти у напівпровідникових квантових точках визначають їх унікальні оптичні та електронні властивості, що надає їм суттєвих переваг у порівнянні із загальнозживаними флуорохромами, зокрема, з органічними барвниками, флуоресцентними білками, хелатами лантанових іонів тощо [10]. Типові спектри оптичного поглинання та фотолюмінесценції

(далі – люмінесценції) кадмійвмісних квантових точок CdS, CdTe, CdSe різних розмірів наведено на рис. 1.2 [11]. Уздовж осей абсцис відкладено довжину хвилі світла (нм), уздовж осей ординат – інтенсивності спектрів поглинання та люмінесценції у відповідних відносних одиницях. Як видно з рисунка, для квантових точок цих типів властиві широкі спектри поглинання, а випромінюють вони у вузькому діапазоні довжин хвиль (вузький симетричний спектр фотолюмінесценції). Важливо, що спектри люмінесценції квантових точок CdS, CdTe, CdSe мають високі рівні фотостабільності та яскравості [11, 12]. На рис. 1.2 для квантових точок CdS нижні спектри відповідають діаметру 2,9 нм, середні – діаметру 4,1 нм, а верхні – діаметру 5,7 нм. Очевидно, спостерігається помітний зсув

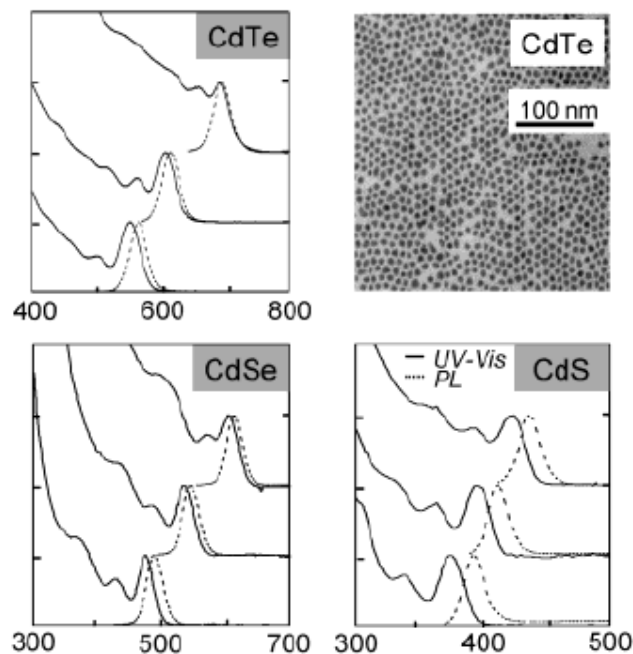


Рис. 1.2. Спектри оптичного поглинання (суцільні лінії) та люмінесценції (штрихові лінії) квантових точок CdS, CdTe, CdSe різних розмірів [11]

максимумів спектрів поглинання та люмінесценції у короткохвильову область ("блакитний зсув") при зменшенні діаметру квантової точки. Причина цього явища зумовлена двома факторами: зростанням ширини забороненої

зони у квантовій точці – рівняння (1.4), та виникненням дискретних енергетичних рівнів електронів та дірок у такій системі – рівняння (1.3). Тоді, при зменшенні розмірів квантової точки зростатимуть величина розщеплення енергетичних рівнів електронів і дірок та ширина забороненої зони. Головному максимуму у спектрі поглинання відповідає перехід електрона з енергетичних рівнів біля вершини валентної зони на енергетичні рівні біля дна зони провідності, а у випадку люмінесценції – перехід електрона з зони провідності у валентну зону, який супроводжується рекомбінацією з діркою та випроміненням фотона. При зменшенні розмірів квантової точки енергії вказаних переходів зростають, що проявляється у зменшенні довжини хвилі люмінесценції – колір люмінесценції змінюється від червоного до синього. Рис. 1.3 ілюструє вказаний ефект [4]:

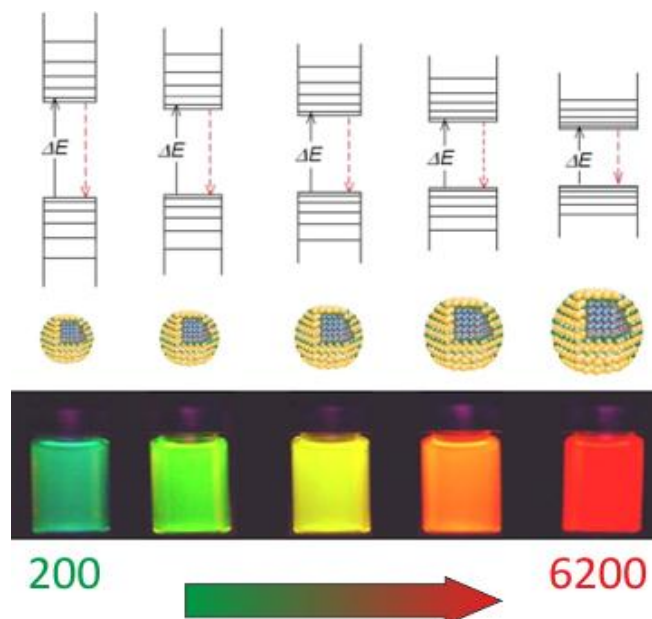


Рис. 1.3. Залежність системи енергетичних рівнів електронів та дірок від розмірів кадмійвмвсної квантової точки

Існування ефекту "блакитного зсуву" дозволяє оцінити розміри кадмійвмісних КТ за положенням першого максимуму поглинання ( $\lambda_m$ ). У роботі [11] було отримано емпіричні формули, які дозволяють оцінити діаметр КТ за величиною  $\lambda_m$ :

$$\begin{aligned}
\text{CdS: } D &= (-6,6521 \cdot 10^{-8})\lambda_m^3 + 1,9557 \cdot 10^{-4}\lambda_m^2 - 9,2353 \cdot 10^{-2}\lambda_m + 13,29 \\
\text{CdSe: } D &= 1,6122 \cdot 10^{-9}\lambda_m^4 + (-2,6575 \cdot 10^{-6})\lambda_m^3 + 1,6242 \cdot 10^{-3}\lambda_m^2 \\
&\quad - 0,4277\lambda_m + 41,57 \\
\text{CdTe: } D &= 9,8127 \cdot 10^{-7}\lambda_m^3 - 1,7147 \cdot 10^{-3}\lambda_m^2 + 1,0064\lambda_m - 194,84
\end{aligned}
\tag{1.4}$$

Крім того, використання формули (1.3) дозволяє визначити енергії низькоенергетичних переходів  $1_{se} - 1_{sh}$ , які відповідають першому максимуму спектра поглинання. Згідно з (1.3) енергія таких переходів

$$E(1_{se} - 1_{sh}) = \Delta E_g^{(bulk)} + \frac{2\pi^2 \hbar^2}{D^2} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right) - \frac{3,6e^2}{\epsilon D}
\tag{1.5}$$

На основі формули (1.5) для квантових точок CdS, ZnS та PbS було побудовано залежності енергії переходів  $E(1_{se} - 1_{sh})$ , а фактично, енергії першого низькоенергетичного максимуму у спектрі поглинання, від діаметра КТ (рис. 1.4) [13].

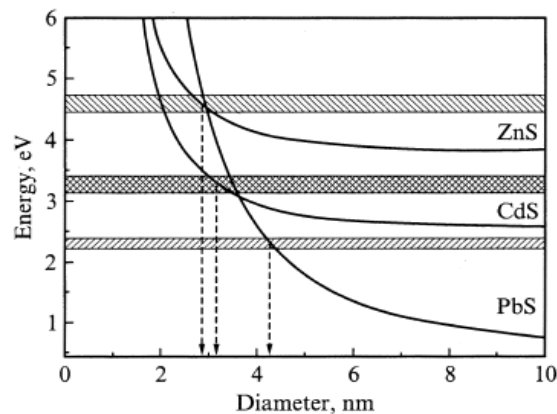


Рис. 1.4. Залежність енергії переходів  $E(1_{se} - 1_{sh})$  від діаметру квантових точок CdS, ZnS та PbS

Отже, дослідження спектрів поглинання та люмінесценції кадмійвмісних КТ, зокрема, визначення енергій та довжин хвиль, що відповідають максимумам у таких спектрах, відкриває можливості оптичної діагностики розмірів КТ. Важливо відзначити, що довжина хвилі випромінювання квантових то-

чок не залежить від довжини хвилі збуджуючого світла. Це означає, що квантові точки різного діаметру можуть збуджуватися світлом однієї довжини до-ти, доки ця довжина хвилі є меншою, ніж довжина хвилі, що відповідає краю поглинання. Ця оптична властивість квантових точок знаходить своє засто-сування у мультиплексній візуалізації, де численні квантові точки різного ді-аметру з дискретними піками випромінювання, і відповідно, з різними кольо-рами люмінесценції можуть одночасно збуджуватися світлом з єдиною дов-жиною хвилі [12].

### 1.3. Фізичні методи синтезу квантових точок

**Молекулярно-променева епітаксія.** Однією з найбільш розповсю-джених технологій отримання напівпровідникових квантових точок є моле-кулярно-променева епітаксія [14]. Даний метод дозволяє вирощувати кванто-ві точки на ретельно очищених підкладках. Згідно з даною технологією ви-рощування квантових точок здійснюється у високовакуумній установці шля-хом осадження атомів або молекул однієї речовини на поверхні іншої (підк-ладці). Вакуум в установках молекулярно-променевої епітаксії становить  $10^{-11}$ - $10^{-10}$  мм рт ст. [15]. Слід відмітити, що даний метод найбільш успішно за-стосовували до сполук III-V груп періодичної системи. Цей клас напівпрові-дників ефективно використовується для створення швидкодіючих високочас-тотних приладів. Першими були синтезовані такі сполуки, як GaAs, GaP,  $\text{GaAs}_x\text{Sb}_{1-x}$  [15]. Рушійною силою утворення квантових точок у даному випа-дку є зменшення енергії деформації. Тобто, якщо на підкладці з арсеніду галію нарощувати шар з арсеніду індію, то виникнуть пружні напруги, які призведуть до росту острівців (квантових точок) InAs на поверхні GaAs. По-верхня таким чином вкривається пірамідками InAs розміром у кілька десятків ангстрем [16]. Стосовно кадмійвмісних квантових точок варто зазначити, що описано метод нарощування CdS на підкладці з ZnSe методом молекулярно-променевої епітаксії. При цьому форма синтезованих у такий спосіб кванто-



вих точок CdS відрізнялася залежно від температури. При 220°C спостерігали утворення сферичних квантових точок, тоді як при 280°C формувалися видовжені квантові точки прямокутної форми [17]. Тонкі плівки з CdS мали виражену кристалічну структуру, що підтверджено методом атомно-силової мікроскопії, діаметр сформованих острівців квантових точок CdS знаходився у діапазоні 80 – 120 нм, а їх висота відповідала розмірам 10 – 20 нм. Положення максимуму у спектрі люмінесценції визначалося умовами нарощування кадмійвмісних квантових точок. Зокрема, для квантових точок CdS, які осаджувалися товстішим шаром на підкладку з ZnSe, у спектрах люмінесценції спостерігали помітний зсув у червоний діапазон випромінення [17].

**Газофазна епітаксія.** При застосуванні газофазної епітаксії гетероструктури вирощуються в газофазному реакторі за атмосферного тиску. Газовою фазою у таких реакторах зазвичай є гарячий потік водню, що змішується з атомами речовини, яка осаджується [18]. У даному методі на кристалічну підкладку осаджується потрібна речовина, яку отримують з газової фази в результаті хімічної реакції [15, 18]. Даний метод описаний для нанокристалів III-V груп. Осадження GaAs відбувається за температури 650°C. В даному методі квантові точки утворюються за аналогічної причини – зменшення енергії системи за рахунок зменшення енергії пружної деформації [15]. З використанням зазначеного методу можна отримати не лише квантові точки InAs на підкладці з GaAs, але й такі квантові точки, як InAs на InP, Ge на Si, CdSe на ZnS. Зокрема, описано метод синтезу острівців CdS на підкладці з ZnS за допомогою газофазної епітаксії. Діаметр сформованих острівців CdS дорівнював 15 нм, а висота 2,5 нм. Для синтезованих квантових точок CdS була характерною інтенсивна люмінесценція у синьому діапазоні спектру. Сформовані острівці квантових точок CdS привертають увагу як матеріал для створення нового класу напівпровідникових лазерів [19]. Таким чином, формування квантових точок у напружених гетероепітаксціальних шарах є загальним фізичним явищем.

**Літографія.** Літографічні методи отримання наноструктур поділяються за принципом перенесення рисунка на підкладинку, в основі якого лежать випромінювання, механічний або іонний вплив. Суть *електронно-променевої літографії* полягає в опроміненні зразка, який вкрито шаром, чутливим до опромінення, крізь певний шаблон (маску). У подальшому шаблон видаляють, а на поверхні за допомогою хімічної обробки формують наноструктуру. Спершу поверхню зразка вкривають радіаційно-чутливим шаром – резистом [20]. Далі, опромінюючи електронним пучком крізь маску з рисунком, наносять зображення майбутньої наноструктури. Опромінені ділянки характеризуються вищою хімічною активністю і розчиняються у спеціально підібраному проявнику. У подальшому утворені заглиблення у чутливому шарі заповнюють спеціальною речовиною – маскою травлення. На завершальному етапі повністю видаляють резист, а також незакриті маскою ділянки шару квантової ями [20].

За допомогою літографії можна отримувати складні багат шарові квантові точки, нанодоти та інші наноструктури, що необхідні для виготовлення електронних схем, точкових лазерів, високоефективних напівпровідникових джерел світла тощо. Роздільна здатність електронно-променевої літографії складає близько 10 нм [21]. При *УФ-літографії* напівпровідниковий зразок опромінюють лазерним променем, що дозволяє отримати попередньо сплановану конфігурацію схеми. Роздільна здатність визначається довжиною хвилі лазера і може досягати 100 нм. Однак, така технологія є досить складною, дорогавартісною і тому не завжди зручна для широкомасштабного виробництва наноструктур [20, 21].

*Рентгенівська літографія* дозволяє отримувати рисунки на поверхні з розділенням до 20 нм, але її технології, в яких використовуються високоточні маски, трафарети та опромінюючі системи, також складні у виконанні та дорогі для практичного застосування. Рентгенівська та електронно-променева літографії не є високопродуктивними, що необхідно враховувати для широкомасштабного виробництва [20].

Крім того, описано спосіб літографії, який пов'язаний з механічним перенесенням рисунка – *нанолітографія (імпринтинг-літографія)* [22]. У методі імпринтинг-літографії зображення формується за рахунок фізичної деформації резиста прес-формою, а не за рахунок модифікації хімічної структури резиста опроміненням, як у наведених вище методах. У даному випадку резист – це м'яке покриття, в яке вдавлюється трафарет із зображенням наноструктури. Після того, як трафарет видаляють, здійснюється травлення матеріалу, що залишився в стиснутих ділянках. Трафаретом є штамп, виготовлений з металу, діелектрика або напівпровідника методами високоточної літографії. Нанолітографія дозволяє отримувати зображення з розділенням до 10 нм [20].

У літературі зазначено метод синтезу квантових точок CdSe методом УФ – літографії. При цьому як прекурсори для синтезу використовували  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  та  $\text{H}_2\text{NCSeNH}$ . Як стабілізуючі агенти застосовували цитрат та тіогліцерол. За даними оптичного аналізу показано, що у спектрах люмінесценції квантових точок CdSe, які стабілізовані цитратом спостерігається протяжний максимум у діапазоні 570 – 580 нм, тоді як для квантових точок вкритих тіогліцеролом характерні максимуми люмінесценції у діапазоні 430 – 440 нм. Діаметр утворених квантових точок від 2 до 5 нм [23]. Отже, літографічні методи дозволяють отримувати кадмійвмісні квантові точки, які мають високу інтенсивність люмінесценції. Проте, певним недоліком літографічних методів є полідисперсність отриманих квантових точок. Для усунення проблеми полідисперсності варто використовувати матриці з чітко контрольованим розміром пор [23].

#### **1.4. Хімічні методи синтезу кадмій-вмісних квантових точок**

**Органометалевий синтез.** На сьогоднішній день відомі різноманітні хімічні методи синтезу напівпровідникових нанокристалів. Можна використовувати

підходи, оснований як на подрібленні речовини (зверху-вниз), так і на вирощуванні нанокристалів (знизу-вверх) [24]. Найефективнішим хімічним методом синтезу квантових точок вважається високотемпературний органометалевий метод або метод нарощування у неполярних середовищах [25]. У такий спосіб вперше були отримані, люмінесцентні квантові точки CdSe. Схема синтезу виглядає наступним чином: розчини  $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$  і три-*n*-октилфосфінселеніда впорскуються у гарячий три-*n*-октилфосфіноксид (ТОРО) за температури 120 – 300 °С. Контроль розмірів частинок здійснюють варіюванням температури синтезу: при вищій температурі утворюються наночастинки більших розмірів. Органометалевий синтез з використанням ТОРО має деякі переваги над іншими фізико-хімічними методами, а саме характеризується високою монодисперсністю та можливістю отримувати значну кількість речовини за один синтез (у межах декількох грамів). Але цей метод має також суттєві недоліки, найвагоміший з яких це необхідність використання отруйних сполук, таких як диметилкадмію, небезпека якого підвищується при високих температурах [26]. Для органометалевого синтезу необхідною умовою є наявність прекурсора, органічного сурфактанта та розчинника. Даний метод синтезу складається з трьох стадій: нуклеації, росту зародків та стадії дозрівання Оствальда. Зародки кадмій-вмісних нанокристалів вирощують за температури понад 300°C, варіюючи час їх росту від хвилин до годин залежно від бажаного розміру наночастинок [27]. Окрім розміру зазначена технологія дозволяє контролювати форму наночастинок. За умови високої загальної швидкості росту нанокристали витягуються та формують нанострижні, так звані квантові стрижні (quantum rods) [28]. Необхідною умовою формування нанокристалів сферичної форми є невисока швидкість їх росту. Більш складні форми нанокристалів отримують, підбираючи умови, за яких кристалічна структура зародку відрізняється від гексагональної. Таким чином забезпечується ріст кристалів одразу в трьох напрямках.

У роботі [29] розглянуто можливість отримання квантових точок CdTe з використанням високотемпературного методу. При цьому діапазон темпера-

тур становив 150 - 220°C. У результаті було отримано квантові точки розміром 2,5 – 7 нм. У спектрах фотолюмінесценції спостерігали помітний зсув від зеленого до червоного діапазону довжин хвиль з поступовим збільшенням розмірів наночастинок CdTe. Максимуми люмінесценції знаходились у межах 520 – 650 нм [29].

**Синтез у водних розчинах.** Іншим методом хімічного синтезу квантових точок є синтез у водних розчинах з використанням таких стабілізуючих агентів, як тіогліцерин та поліфосфат [30]. За допомогою зазначеного методу були отримані квантові точки складу CdS, CdSe, CdTe [26]. Використання в даному підході глутатіону – компоненту, який знешкоджує важкі метали у рослинних клітинах, допомогло забезпечити успішне покриття поверхні кадмій-вмісних наночастинок та високі рівні їх фотолюмінесценції [31]. Важливо, що для отримання квантових точок CdS, CdSe, CdTe з високою ефективністю флуоресценції при синтезі у водному розчині необхідно дотримання великих значень рН = 11,2–11,8 [31].

Процес синтезу квантових точок CdS, CdSe, CdTe може, наприклад, відбуватися наступним чином: сіль кадмію  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  або  $\text{CdCl}_2$  розчиняють у воді, при інтенсивному перемішуванні у розчин додають тіольний стабілізатор (L-тіогліцерол). На наступному етапі через розчин при постійному перемішуванні пропускають газ  $\text{H}_2\text{S}$  – для отримання CdS;  $\text{H}_2\text{Te}$  – для отримання CdTe;  $\text{NaHSe}$  – для синтезу CdSe [26, 32]. На цій стадії прекурсори CdS, CdSe, CdTe за допомогою додаткової обробки перетворюють у квантові точки потрібного розміру [32]. Крім того, описано синтез у водному розчині квантових точок структури ядро-оболонка CdSe/CdS. Зазначені напівпровідникові наночастинок були отримані шляхом введення газу  $\text{H}_2\text{Se}$  у водний розчин, що містив іони  $\text{Cd}^{2+}$  [33]. Покриття оболонкою з CdS підвищило квантовий вихід даних наночастинок шляхом пасивування дефектів поверхні ядра CdSe. Описані квантові точки залишалися стабільними у водному розчині протягом кількох місяців без помітного осаду або втрати своїх характеристик. Розміри зазначених квантових точок CdSe/CdS згідно з результатами

ТЕМ-аналізу знаходилися в межах 3,0 – 3,5 нм. Спостерігали максимум випромінювання таких квантових точок при 478 нм за кімнатної температури. Загалом, синтезовані за описаним механізмом квантові точки CdSe/CdS завдяки своїм властивостям можуть бути використані для різноманітних біологічних застосувань, зокрема, для мічення макромолекул, а також для візуалізації клітин і тканин [33]. Іншими авторами розроблено метод синтезу у водному розчині квантових точок CdS [34]. З метою синтезу використовували відповідні сполуки Cd ( $\text{ClO}_4$ )<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, L-тіогліцерол. рН доводили до рівня 11,2. Розмір наночастинок CdS контролювали кількістю доданого H<sub>2</sub>S та тривалістю подальшого нагріву. Методом ТЕМ було визначено, що діаметр синтезованих квантових точок CdS знаходиться у межах 1,3 – 3,9 нм [34].

**Золь-гель метод.** Терміном «золь-гель метод» називають технологію отримання цінних неорганічних та органо-неорганічних матеріалів (каталізатори, адсорбенти, мембрани, кераміка, нанокомпозити) на основі переходу гомогенного розчину в золь, а потім у гель. У золь-гель технології золь є дисперсною системою з рідким дисперсним середовищем і твердою нанодисперсною фазою [35, 36]. У результаті гідролітичної поліконденсації молекул прекурсору утворюються наночастинки (тверда фаза), розмір яких зазвичай знаходиться у діапазоні 1 – 100 нм.

За цією технологією виконують синтез квантових точок складу CdS, CdSe, CdTe. За результатами дослідження їх оптичних та структурно-морфологічних характеристик показано, що середні розміри отриманих наночастинок CdS знаходяться в межах 2,0 – 4,0 нм [37, 38]. Авторами було виявлено, що дифракційні максимуми наночастинок CdS відповідають кристалічній структурі вюрциту. Аналіз оптичних властивостей квантових точок продемонстрував, що зі зростанням діаметру квантових точок CdS у спектрах поглинання спостерігається чіткий зсув до червоної області спектру. [37]. У роботі [39] показано синтез однорідних квантових точок CdSe діаметром 2,2 – 2,6 нм з використанням золь-гель технології. Було зазначено, що морфологію синтезованих наночастинок можна контролювати, змінюючи час ре-

акції, молярне співвідношення Cd та Se у реакційному середовищі, а також температуру під час реакції [37]. В іншому дослідженні [40] розроблено синтез квантових точок CdTe за використання золь-гель методу. Дані квантові точки вкриті покриттям SiO<sub>2</sub>. За результатами оптичного аналізу показано, що у спектрах люмінесценції спостерігається характерний максимум при 550 нм. Для них притаманна сферична морфологія та діаметр у середньому 70 нм [40].

Перетворення золів у гелі – основа нових нанотехнологій отримання світлодіодів, керамічних ультрафільтраційних мембран, фотоматеріалів та інших речовин з унікальними властивостями та регульованою структурою. Золь-гель процеси лежать в основі гідротермальної обробки кремнієвмісної сировини [36, 41].

## **1.5. Особливості біологічного синтезу кадмій-вмісних квантових точок**

### **1.5.1. Біологічний синтез квантових точок за використання бактерій**

Біологічні системи використовуються для внутрішньоклітинного синтезу та позаклітинного синтезу квантових точок. Останнім часом значна увага сконцентрована на синтезі за допомогою біологічних систем нанокристалів на основі Cd. Типовим прикладом сульфідних наночастинок є CdS, який було синтезовано за допомогою мікроорганізмів [42]. Авторами було встановлено, що бактерія *Clostridium thermoaceticum* здатна виділяти сульфід кадмію на поверхню клітин під час культивування у середовищі з CdCl<sub>2</sub> у присутності цистеїну. В даному випадку цистеїн у середовищі був джерелом сірки [43].

Крім того, вперше доведено здатність бактерії *Escherichia coli* внутрішньоклітинно синтезувати квантові точки CdS при інкубуванні з неорганічними солями CdCl<sub>2</sub> та Na<sub>2</sub>S [44]. Нанокристали CdS мали структуру вюрцита, діапазон їх розмірів знаходився у межах 2 – 5 нм. Важливо зазначити, що процес формування нанокристалів суттєво залежав від фази росту клітин бактерії. А саме, коли *E. coli* перебувала у стаціонарній фазі росту, цей процес

підсилювався приблизно у двадцять разів у порівнянні з пізньою логарифмічною фазою росту бактерії. Крім того, авторами [44] було встановлено, що генетичні відмінності між різними штамми *E. coli* можуть суттєво впливати на здатність до формування нанокристалів. Також у цій роботі було прослідковано певну кореляцію між формуванням у клітинах нанокристалів та внутрішньоклітинним вмістом тіолових компонентів, зокрема глутатіону, однак прямого взаємозв'язку між цими факторами виявлено не було. Для ефективного біологічного синтезу квантових точок використовують різні співвідношення протекторних агентів, що допомагає синтезувати стабільні наночастинки різних форм (зірки, стрижні). Таким чином, змінюючи відносні співвідношення тіолів, поліфосфатів, жирних кислот у клітинах *E. coli*, напевно, стане можливим контролювати кристалічність, форму, розподіл за розмірами, а також оптичні властивості наночастинок [44].

В іншій роботі [45] наночастинки сульфід кадмію були успішно синтезовані за використання *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* та *Lactobacillus acidophilus* позаклітинним шляхом. Отримані наночастинки мали переважно сферичну форму, максимуми поглинання наночастинок знаходились на 420 нм (*E. coli*), 382 нм (*B. subtilis*) та 363 нм (*L. acidophilus*). Максимуми люмінесценції також виявилися типовими для нанорозмірного сульфід кадмію. Зокрема, для наночастинок, синтезованих за використання *E. coli* та *L. acidophilus*, пік люмінесценції знаходився на довжині хвилі 440 нм, а при використанні *B. subtilis* пік люмінесценції відповідав 450 нм. Зсув на 10 нм автори пояснюють більшими розмірами синтезованих частинок CdS [45]. У даному випадку для синтезу квантових точок CdS використовували середовище, в якому культивували бактерії протягом 24 год. Аналіз наночастинок за допомогою TEM показав, що їх розміри знаходяться у межах 2,5 – 5,5 нм [45].

Можливість синтезу наночастинок CdS за допомогою фотосинтезуючої бактерії *Rhodospseudomonas palustris* було доведено у роботі [46]. При цьому розчин сульфату кадмію інкубували з *R. palustris*. Тривалість біосинтезу CdS



становила 48 год. Біосинтез відбувався внутрішньоклітинно. Авторами було виявлено, що максимум поглинання наночастинок CdS знаходився на довжині хвилі 425 нм. Утворення кристалів CdS також було підтверджено за допомогою рентгенівської дифракції. За результатами TEM встановили, що отримані частинки мають переважно сферичну форму та розміри у межах  $8,01 \pm 0,25$  нм. Крім того, було показано, що фермент C-S-ліаза (цистеїн-десульфогідраза) має здатність контролювати ріст кристалів, оскільки за рахунок активності даного ферменту збагачені цистеїном білки здатні продукувати іони  $S^{2-}$  [47]. Виявилось, що зазначений фермент локалізований у цитоплазмі клітини. Автори припустили, що саме наявність C-S-ліази у клітинах бактерії *R. palustris* регулює формування нанокристалів CdS. Важливо, що вміст C-S-ліази залежить від фази росту бактеріальних клітин, тобто найвища кількість ферменту спостерігається під час стаціонарної фази росту клітин. Також слід зазначити, що *R. palustris* здатна ефективно транспортувати наночастинки CdS за межі клітини. Таким чином, зазначений метод є ефективним для біосинтезу сульфідних наночастинок [46].

Науковий інтерес також зосереджено на біосинтезі наночастинок CdSe. Напівпровідникові наночастинки CdSe знаходять своє застосування як випромінюючі для фотонних приладів або як кольорові зонди різних білків для біомедичних досліджень, які вимагають яскравих люмінесцентних випромінювань у вузькому діапазоні [48]. Частинок селеніду кадмію можна отримати різними хімічними методами, про які згадувалося вище, а саме, шляхом колоїдного синтезу [49], з використанням ультразвукових хвиль та гамма-опромінення [50, 51]. Однак, у більшості випадків отримані таким чином нанокристали мають значний розподіл за розмірами та формою. Крім того, часто хімічні реакції синтезу потребують спеціальних установок, високих температур, тиску, а також використання токсичних реагентів або стабілізаторів. Тому більш безпечною та швидкою технологією отримання нанорозмірних частинок CdSe є синтез за допомогою біологічних систем [48].

Сферичні наночастинки CdSe були успішно отримані за допомогою грам-негативної бактерії *Escherichia coli* [52]. Як матрицю для біосинтезу було обрано саме цю бактерію, оскільки вона є модельним об'єктом для багатьох молекулярно-біологічних застосувань, лабораторні штами *E. coli* є непатогенними, бактерія швидко наростає в асептичних умовах. Під час біосинтезу до культури *E. coli* додавали  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  та  $\text{CdCl}_2$ . Здатність *E. coli* до біосинтезу квантових точок ймовірно пов'язана з механізмом детоксикації від важких металів. При цьому ключову роль у процесі біосинтезу відіграє фаза розвитку культури бактерії, рівень рН, а також концентрація важких металів у реакційному середовищі [53]. В подальшому утворені нанокристали CdSe попередньо центрифугували для видалення залишків середовища та досліджували за допомогою спектрофотометричного аналізу. Морфологію нанокристалів визначали методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Автори спостерігали зростання інтенсивності флуоресценції квантових точок залежно від фази розвитку бактеріальної культури: інтенсивність зростала від ранньої логарифмічної фази до стаціонарної [52]. Внутрішньоклітинні реакції, опосередковані відповідними глутатіон-зв'язаними ферментами забезпечували формування наночастинок CdSe всередині бактеріальних клітин [54]. За даними оптичного аналізу було показано, що максимум у сектрі фотолюмінесценції зразків CdSe дещо зсувався у діапазоні від 495 до 510 нм зі зростанням періоду інкубування бактерії із солями  $\text{CdCl}_2$ . У спектрі поглинання зразків CdS спостерігався чіткий пік на довжині хвилі 430 нм. Крім того, за допомогою методу ТЕМ було охарактеризовано розподіл квантових точок CdS за розмірами. Показано, що їх діаметр знаходиться у діапазоні 7 – 13 нм. Таким чином, продемонстровано можливість внутрішньоклітинного синтезу люмінесцентних квантових точок CdSe [52].

Крім того, іншими авторами розроблено метод позаклітинного синтезу квантових точок CdTe за допомогою *Escherichia coli*. У зазначеному експерименті *E. coli* культивували із солями  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$  та  $\text{CdCl}_2$  у присутності меркаптобурштиної кислоти (MSA) як стабілізатора [55]. Детальний аналіз на-

ночастинок CdTe з використанням ТЕМ показав, що більшість отриманих квантових точок мали діаметр у середньому 2,0 – 3,2 нм. Спектр фотолюмінесценції характеризувався зсувом у діапазоні довжин хвиль 488 – 551 нм (зелена люмінесценція) залежно від розмірів наночастинок, як прояв квантово-розмірного ефекту. Отримані наночастинки CdTe були однорідними, мали сферичну морфологію та кубічну структуру кристалічної ґратки (сфалерит) [55]. У даній роботі порівнювали властивості квантових точок CdTe, що вкриті білковою та тіол-вмісною оболонкою. Виявилось, що наночастинки, які мають покриття білкової природи є більш біосумісними у порівнянні з CdTe, що містять на своїй поверхні тіолові групи. Хімічний склад оболонок CdTe визначали за допомогою ІЧ спектроскопії Фур'є. Таким чином, у роботі [55] розроблено позаклітинний одностадійний метод біосинтезу квантових точок CdTe. Показано, що їх можна застосовувати як люмінесцентні мітки у клітинах HeLa. Завдяки білковому покриттю отримані квантові точки є біосумісними та менш токсичними у порівнянні з хімічно синтезованими частинками CdTe.

### **1.5.2. Синтез квантових точок за використання дріжджів**

У перших роботах з біосинтезу напівпровідникових наночастинок CdS автори використовували дріжджі *Saccharomyces pombe* та *Candida glabrata* [56], які культивували у присутності солей кадмію. Короткі хелатуючі пептиди, що мали структуру  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , контролювали процес внутрішньоклітинного формування наночастинок CdS, які ізолювали з клітин. За допомогою ТЕМ було виявлено, що утворені щільні агрегати наночастинок мали діаметр 2 нм. Також було встановлено, що отримані квантові точки CdS мали значно вужчий діапазон розмірів, ніж такі ж частинки, отримані хімічним шляхом. Отримані наночастинки CdS мали максимум люмінесценції на довжині хвилі 460 нм, були сферичними за морфологією та мали кристалічну структуру модифікації вюрцит [56].

Було запропоновано швидкий та ефективний метод біосинтезу квантових точок CdTe за використання дріжджів [57]. Такі нанокристали CdTe були отримані позаклітинно, шляхом інкубування неорганічних солей CdCl<sub>2</sub> та NaTeO<sub>3</sub> з культурою дріжджів. Для утворених наночастинок CdTe спостерігали вузький пік поглинання при 440 нм, а також гострий максимум люмінесценції при 492 нм. Вузькі симетричні максимуми поглинання та люмінесценції свідчать про однорідність квантових точок за розмірами [57]. Морфологію та кристалічну структуру отриманих квантових точок було досліджено методом ТЕМ. Діаметр синтезованих квантових точок CdTe знаходився у діапазоні 3,0 – 4,0 нм. За даними рентгенівської дифрактометрії було визначено кристалічну будову отриманих квантових точок CdTe. Для них притаманна кубічна структура кристалічної ґратки. Слід відмітити, що варіювання розмірів даних наночастинок призводило до змін діапазону люмінесценції в межах від 490 до 560 нм. Наночастинок CdTe, вкриті білковими молекулами, характеризувалися високою біосумісністю, були локалізовані у клітинах дріжджів, що дозволило досягти чіткої візуалізації цих клітин [57]. Також продемонстровано біосинтез квантових точок CdSe у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Як прекурсори для квантових точок використовували неорганічні солі Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> та CdCl<sub>2</sub> [58]. Виявлено, що у спектрах фотолюмінесценції спостерігали максимуми у діапазоні від 506 до 562 нм. Наночастинок CdSe були сферичними та однорідними за розмірами. Їх діаметр знаходився у межах 15 – 20 нм. Біосинтез CdSe у даному випадку був опосередкований внутрішньоклітинними білками, які забезпечували досить інтенсивну люмінесценцію, а також сприяли зниженню токсичності утворених квантових точок у порівнянні з наночастинками CdSe, які синтезовані гідротермічним методом. [58].

### **1.5.3.1. Синтез квантових точок за використання багатоклітинних організмів**

Автори роботи [59] показали можливість внутрішньоклітинного біологічного синтезу напівпровідникових наночастинок CdTe з використанням *Lumbricus rubellus*. Цей організм здатний накопичувати кадмій до рівнів, які у тисячу разів перевищують його вагу. Це відбувається за рахунок металотіонеїнів – родини збагачених цистеїном білків, функція яких полягає у транспортуванні важких металів до хлорогенових клітин (клітини, подібні до клітин печінки у хребетних тварин), де відбувається нейтралізація токсинів [60]. Хоча система детоксикації кадмію у дощових черв'яків добре вивчена, дуже мало інформації щодо динаміки поглинання, розподілу та зберігання телуру. Автори припускають, що солі телуру відновлюються за участі ферментів глутатіонредуктаз, що відновлюють NADPH (нікотинамід аденін динуклеотид фосфат) та глутатіон через комплекс GS–Te–SG до H<sub>2</sub>Te – попередника Te, і, таким чином, телуріти здатні вступати в реакцію з іонами Cd<sup>2+</sup> [59]. Було продемонстровано, що для квантових точок CdTe властива смуга поглинання при 450 нм. Спостерігали також люмінесценцію у зеленому діапазоні при 520 нм [59]. За допомогою енергороздільної рентгенівської спектроскопії було визначено елементний склад даних наночастинок. Зокрема, у зразку переважали елементи Cd та Te, а також були наявні Fe, Cl, S. Яскраво-зелений край емісії корелює з тіоловим покриттям зазначених квантових точок [59]. За допомогою TEM високого розділення було підтверджено, що синтезовані наночастинки мають кристалічну структуру та значення діаметру  $2,33 \pm 0,59$  нм [59]. Варто зауважити, що за використання кільчастих черв'яків було синтезовано лише квантові точки CdTe. Дані щодо можливості подібного біосинтезу нанорозмірних напівпровідників інших типів (CdS, CdSe) залишаються нез'ясованими.

### **1.5.3.2. Синтез квантових точок за використання діатомових водоростей**

Описано також метод біологічного синтезу наночастинок CdS за допомогою фітохелатинів за використання морської фітопланктонної водорості

*Phaeodactylum tricornutum* [61]. Структура фітохелатинів розглянута у роботі [56]. Зазначені пептиди задіяні у процесах детоксикації клітин рослин, грибів та водоростей від важких металів за рахунок утворення стабільних комплексів з йонами Cd, Pb, Zn та Cu [62, 63]. Зазвичай розрізняють дві форми комплексів Cd-фітохелатин у деяких рослин та дріжджів: низькомолекулярні, в яких Cd зв'язаний з тіоловими групами, та високомолекулярні, в яких іони ( $S^{2-}$ ) включені до їх структури, що дозволяє формувати нанокристали CdS [64, 65]. Включення іонів сульфідів до комплексу Cd-фітохелатин є результатом Cd-індукованого підвищення внутрішньоклітинного вмісту  $S^{2-}$ , що у свою чергу походить від цистеїну [64, 66]. Формування вкритих фітохелатином наночастинок CdS та їх детальна характеристика були описані у роботах [61, 67].

В експерименті за використання *P. tricornutum* було виявлено, що максимум поглинання утворених нанокристалів CdS знаходився у межах 290-260 нм, розмір частинок 0,9 нм – 1,1 нм, молярне співвідношення сульфід/кадмій коливалося від 0,89 до 0,26 у різних фракціях [61]. Крім того, автори встановили, що отримані наночастинок CdS були стабільними за значень рН у межах 8 – 6 та проявляли часткову дисоціацію за рН – 4,9. Також у роботі досліджувалася можливість використання вільних від сульфідів комплексів Cd-фітохелатин для синтезу *in vitro* нанокристалів CdS при додаванні  $Na_2S$  [61]. У результаті за допомогою спектроскопії поглинання утворених фракцій було підтверджено формування наночастинок CdS *in vitro*. Таким чином, автори виявили, що морська діатомова водорість *P. tricornutum* здатна включати йони  $S^{2-}$  до комплексів Cd-фітохелатин, що призводить до формування наночастинок CdS (процес біомінералізації) [61]. Можливо, саме формування вкритих фітохелатинами кристалів CdS пояснює низьку чутливість зазначеної водорості до іонів Cd у порівнянні з іншими діатомовими водоростями [68].

### 1.5.3.3. Синтез квантових точок за використання грибів

Для позаклітинного біосинтезу нанокристалів CdS та інших напівпровідникових наночастинок також використовували гриби, зокрема, *Fusarium oxysporum* [69]. У даному випадку біосинтез відбувався виключно ензиматичним шляхом, за рахунок специфічних редуктаз, які секретуються грибом назовні. В результаті, це дозволяє отримати наночастинок різного хімічного складу, а саме, взаємодія продуктів життєдіяльності *F. oxysporum* з іонами  $\text{Cd}^{+2}$  та  $\text{SO}_4^{2-}$  призводить до формування стабільних наночастинок CdS у розчині [69]. У результаті експерименту авторами було встановлено, що розміри окремих нанокристалів CdS знаходяться у межах 5 – 20 нм, а максимум поглинання отриманих частинок знаходиться на довжині хвилі 450 нм. При цьому пік на довжині хвилі 280 нм свідчить про наявність додаткових білків у реакційному середовищі [69].

Окрім наночастинок CdS, було розроблено метод отримання квантових точок CdSe за допомогою цього ж гриба [70]. Синтез відбувався позаклітинно, отримані в результаті синтезу квантові точки виявилися розчинними у воді, високостабільними та люмінесцентними. Для цього культуру *F. oxysporum* інкубували з солями  $\text{CdCl}_2$  та  $\text{SeCl}_4$  протягом 96 год. Процес біосинтезу забезпечували ферменти вказаного гриба, як і під час вищеописаного синтезу наночастинок CdS [69]. У результаті фізичного аналізу утворених нанокристалів CdSe було виявлено, що частинки є високостабільними, мають розмір  $11 \pm 2$  нм та характеризуються широким максимумом фотолюмінесценції. Максимум люмінесценції частинок CdSe знаходився на довжині хвилі 440 нм. За морфологією отримані наночастинок були переважно сферичної форми. Таким чином, було вперше продемонстровано ефективний шлях біосинтезу напівпровідникових наночастинок CdSe [70].

Біосинтез наночастинок CdS здійснювали також за використання гриба-сапрофіта *Coriolus versicolor* [71]. Автори зазначають, що формування наночастинок сульфїду кадмію відбувається за допомогою ферментів. Отримані

наночастинки CdS були охарактеризовані за допомогою скануючої електронної мікроскопії. Було показано, що за морфологією вони нагадують наносфери, мають діаметр 100 – 200 нм. Результати атомно-силової мікроскопії показали, що середній діаметр окремих наночастинок в межах наносфер становить 8 нм. Наявність краю поглинання на 280 нм у реакційному середовищі свідчить про залучення білків у процес біосинтезу наночастинок [71]. Колоїдний розчин отриманих наночастинок CdS виявився надзвичайно стабільним і не мав ознак агрегації навіть через 10 місяців зберігання. Спектр поглинання характеризувався широкою смугою з протяжним максимумом у діапазоні 350 – 460 нм, що може свідчити про суттєвий розкид наночастинок за розмірами [71]. У роботі також були представлені спектри люмінесценції синтезованих наночастинок. У спектрі спостерігається чіткий пік на довжині хвилі 450 нм. Однак, додатково з'являється смуга випромінювання при 500 нм (збудження лазером при 300 нм), що є характерним саме для наночастинок сульфїду кадмію [71]. Піки випромінювання при 365 нм та 390 нм вказують на наявність залишків триптофану і тирозину, що, ймовірно, виконують функцію стабілізуючих агентів наночастинок. Тіолова SH-група цистеїну у *S. versicolor* відіграє ключову роль у зв'язуванні іонів Cd<sup>2+</sup> та у формуванні нанорозмірного CdS. Важливо, що описаний процес біосинтезу відбувався позаклітинно – це суттєво полегшуватиме подальше використання отриманих наночастинок [71].

#### **1.5.3.4. Синтез квантових точок за використання рослинних екстрактів**

Використання рослин для біологічного синтезу напівпровідникових наночастинок має певні переваги у порівнянні з мікроорганізмами, зважаючи на наявність різноманітних вторинних метаболітів рослин, які формують захисне органічне покриття, що перешкоджає агрегації квантових точок [72]. Застосування рослинних екстрактів є найбільш безпечним, екологічним та доступним підходом до отримання наночастинок. При цьому для приготу-



вання екстрактів використовують різні частини рослин: листки, плоди, шкірку, суцвіття тощо [72]. Зокрема, у літературі описаний новий метод «зеленого» синтезу напівпровідникових наночастинок CdS з використанням екстракту шкірки банану [73]. Подрібнені частини шкірки банану заливали 200 мл дистильованої води, нагрівали до 80° С, отриманий розчин охолоджували, відфільтровували декілька разів для видалення надлишкової біомаси та використовували для біосинтезу CdS. А саме, в отриманий екстракт додавали такі неорганічні солі: Na<sub>2</sub>S та Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> [73]. Автори підкреслюють, що інтенсивність люмінесценції сформованих наночастинок CdS суттєво залежала від рН вихідного розчину. Було показано, що за умов рН 7 – 8 інтенсивність люмінесценції частинок була найвищою, тоді як у кислих або слабо кислих умовах (рН 3 – 4; 5 – 6) інтенсивність люмінесценції була дуже слабкою. Утворені наночастинок CdS характеризувалися вираженим максимумом поглинання у діапазоні довжин хвиль 425 нм – 475 нм, таке положення піку поглинання притаманне частинкам, розміри яких < 10 нм. За результатами ІЧ спектроскопії Фур'є було встановлено, що оболонка синтезованих наночастинок має складну органічну природу, зокрема наявні –CH<sub>2</sub>, N-H, C = O, NH та COOH функціональні групи, які мають стабілізуючий вплив на наночастинок. Крім того, методом ТЕМ було встановлено, що отримані у згаданий спосіб наночастинок CdS були сферичні за морфологією та мали діаметр у середньому 1,4 нм. Отже, показано, що екстракти шкірки є біологічними емоностями для синтезу наночастинок CdS з діаметром < 2 нм [73].

Також запропоновано метод «зеленого» синтезу наночастинок CdS з використанням екстракту *Aloe vera*. Автори встановили, що у даному випадку біосинтез наночастинок опосередковано поліфенолами, які є відновниками сульфатних груп [74]. Як прекурсор для наночастинок CdS використовували сіль CdSO<sub>4</sub>. За даними оптичного аналізу автори показали, що у спектрі поглинання синтезованих зразків квантових точок CdS спостерігається максимум на довжині хвилі 472 нм. Для сформованих наночастинок сульфиду кадмію була притаманною кубічна структура кристалічної ґратки. Крім того, си-

нтезовані наночастинки були сферичними, мали вузький розподіл за розмірами, їх діаметр знаходився у межах 3 – 5 нм [74].

Іншими авторами було розроблено та запропоновано метод біосинтезу наночастинок CdS за використання екстракту листя рослини *Asparagus racemosus* [75]. Спектрофотометричні дослідження зразку наночастинок CdS підтвердили, що через 12 год інкубування спостерігався максимум поглинання на довжині хвилі 290 нм. Також незначний підйом інтенсивності було зафіксовано при 320 нм, що, можливо, обумовлено неоднорідністю розмірів наночастинок у процесі синтезу. Спектри фотолюмінесценції вимірювали при збудженні ультрафіолетом на довжині хвилі 295 нм. Максимум люмінесценції отриманих наночастинок спостерігався при 495 нм [75]. За допомогою ТЕМ автори встановили, що діаметр отриманих наночастинок сульфїду кадмію знаходиться у межах 2 – 8 нм. Була також підтверджена кристалїчна структура даних наночастинок. За допомогою ІЧ спектроскопї Фур'є автори визначили, що саме взаємодїя функціональних груп, які входять до складу листового екстракту, а також відповідних неорганїчних іонів призводить до формування стабільних наночастинок CdS. Показано, що у процесї біосинтезу задїяні О-Н, С-Н та N-Н групи. Отже, вперше описано ефективний швидкий та відтворюваний метод біологїчного синтезу наночастинок сульфїду кадмію з використанням екстракту *A. racemosus*. Показано, що отриманї наночастинки є стабільними, водорозчинними, володїють значно меншою токсичнїстю у порівнянні з хїмічно синтезованими частинками такого складу. Крім того, завдяки вираженим люмінесцентним властивостям вони є перспективними для біомедичних застосувань [75].

Крім того, нещодавно було отримано напівпровідниковї квантовї точки CdS за використання листового екстракту *Mimosa pudica*. Для отримання CdS рослинний екстракт інкубували з неорганїчними солями CdCl<sub>2</sub> та Na<sub>2</sub>S [76]. За результатами оптичного аналізу отриманих зразків квантових точок CdS автори показали, що у спектрі поглинання спостерігався характерний максимум на довжинї хвилї 379 нм. У середньому розмір синтезованих нано-

частинок знаходився у межах 5 – 6 нм, для них була притаманною сферична форма. Отже, у зазначеній роботі [76] продемонстровано можливість біосинтезу квантових точок CdS за допомогою екстракту лікарської рослини. Антибактеріальні властивості обраного екстракту були підтверджені у цьому дослідженні. Наявність у рослинному екстракті вторинних метаболітів, алкалоїдів, фенольних сполук опосередковує відновлення сульфатних груп, що є ключовим механізмом формування квантових точок. Слід зазначити, що на даний час існують лише літературні дані щодо біосинтезу CdS за допомогою рослинних екстрактів. Для отримання квантових точок складу CdSe, CdTe переважно застосовують інші типи біологічних матриць.

#### **1.6. Викорстання квантових точок як люмінесцентних міток для візуалізації внутрішньоклітинних структур та процесів у живих клітинах**

На сьогоднішній день напівпровідникові квантові точки привертають значну увагу через можливість їхнього використання для маркування біооб'єктів, оскільки зазначені наночастинки мають високу інтенсивність флуоресценції та стійкість до фотовицвітання [3]. Поширений спосіб маркування специфічних молекул або клітинних органел за допомогою квантових точок полягає у прямій флуоресценції, коли мітка, часто у комплексі із стрептавідином, зв'язується з молекулами, що потрібно детектувати [77].

Зокрема, у роботі [77] було продемонстровано процес самозбірки тубуліну у флуоресціюючих мікротрубочках. З цією метою, вкриті Si оболонкою квантові точки були кон'юговані з тубуліном. В подальшому для візуалізації перебудов мікротрубочок протягом клітинного циклу використовували мічені квантовими точками антитіла (пряму імунофлуоресценцію) [77]. У даному випадку для маркування застосовували люмінесцентні наночастинки CdSe/ZnS, вкриті кремнієвим шаром та бичим сиворотковим альбуміном (БСА) для стабілізації наночастинок. Мікротрубочки досліджували у суспен-

зійній культурі *Nicotiana tabacum L.* У результаті було прослідковано клітинний цикл з використанням двох підходів: для отримання переривчастого сигналу від квантових точок, асоційованих з мікротрубочками, використовували нанокристали, вкриті БСА. Для прямої імуофлуоресценції було сформовано комплекс нанокристал-антитубулінові антитіла [77]. Для отримання суцільного сигналу використовували квантові точки, вкриті кремнієвою оболонкою [77, 78]. Важливо відмітити, що при порівнянні флуоресценції родаміноміченого тубуліну з тубуліном, міченим квантовими точками, було показано, що для квантових точок не спостерігається фотовицвітання протягом тривалого періоду часу, в той час як для родаміну фіксували поступове вицвітання протягом часу спостереження [78]. Далі квантові точки CdSe/ZnS об'єднували з антитубуліновими антитілами та застосовували для прямої імуофлуоресценції в інтерфазних та мітотичних клітинах тютюну. У результаті автори встановили, що у премітотичних інтерфазних клітинах сигнали від кон'югатів антитубулін-нанокристал локалізувались по периферії клітин. Протягом мітотичної профазі нанокристали оточували веретено поділу, що починало формуватися на цій стадії. На наступній стадії – метафазі, сигнал від наночастинок відповідав хромосомам, що розміщувалися в екваторіальній площині клітини. На стадії телофазі (завершальній) сигнал від нанокристалів спостерігався у сформованих ядерних оболонках дочірніх ядер та у ділянці фрагмопласта. Таким чином, розподіл кон'югатів нанокристал-антитіла у клітинах точно відображає поведінку мікротрубочок протягом мітозу [77].

Оскільки квантові точки зазвичай досить яскраві та фотостабільні, вони можуть використовуватись як відслідковуючі мітки у деяких рецептор-опосередкованих динамічних процесах, властивих живим клітинам. Мічені квантовими точками комплекси переважно потрапляють до живих клітин або шляхом ендоцитозу, або через прикріплення до поверхневих білків мембрани [79]. Так, наприклад, квантові точки, кон'юговані з епідермальним фактором росту (EGF) можуть використовуватися для спостереження димеризації рецептора EGF та його здатності виявляти події сигнальної трансдукції [80]. В

іншій роботі [81] автори використовували кон'югати квантових точок з епідермальним фактором росту для виявлення ранніх стадій тирозинкіназо-залежного сигнального шляху в клітинах. Було встановлено, що квантові точки виявилися високоспецифічними та здатними до взаємодії з EGF-рецептором erbB1 та до його активації.

Приєднання квантових точок до фактору росту нервів (NGF) може використовуватись для візуалізації у реальному часі внутрішньоклітинної поведінки NGF рецепторів [82]. Також слід відзначити, що в одному з експериментів  $\alpha$ -бунгаротоксин було приєднано до кон'югату стрептавідин-квантові точки для можливості охарактеризувати процеси, що відбуваються під час формування кластерів ацетилхолінового рецептора на постсинаптичній мембрані. Таким чином, використання квантових точок дозволяє визначати локалізацію рецепторів та відстежувати внутрішньоклітинні динамічні процеси [83]. Експерименти на живих клітинах передбачають мічення клітин за допомогою квантових точок у цілому; маркування лише мембран-зв'язаних білків або цільове мічення клітинних ядер. Зокрема, було продемонстровано, що квантові точки, приєднані до транспортерного білка, здатні бути ефективними люмінесцентними мітками для клітин кісткового мозку та клітин зародкової крові людини. Флуоресцентні клітини можна відслідковувати тривалий час через багато клітинних поділів [84]. В іншій роботі [85] було показано, що об'єднання квантових точок з RGD-пептидами (послідовність аргінін-гліцин-аспартат) можна використовувати для мічення мезенхімальних стовбурових клітин людини під час їх диференціації в остеобласти, хондроцити та адипоцити, за відсутності жодних негативних впливів на нормальну активність стовбурових клітин.

Слід зауважити, що часто квантові точки використовують у клітинній біології як біодетектори. Зокрема, квантові точки можуть бути ефективними ДНК-сенсорами. Так, авторами [3] було продемонстровано, що за допомогою флуоресцентних квантових точок можна визначити позицію окремих нативних молекул ДНК у клітині за використання флуоресцентної мікроскопії [86].

Крім того, квантові точки можна використовувати для детекції мутацій в молекулі ДНК. В роботі [87] був запропонований метод визначення точкової мутації в ДНК з використанням наночастинок CdS.

Ще один аспект застосування квантових точок полягає у детекції специфічних білків та дослідженні білкової активності. Технологія маркування квантовими точками дуже зручна та ефективна для дослідження динаміки білків у клітині, що особливо важливо у нейрофізіології. Зокрема, приєднання квантових точок до амілоїдного білка синуклеїну продемонструвало можливість їх застосування для визначення амілоїдних агрегатів у клітинах, що необхідно для діагностики ряду захворювань [88].

Підсумовуючи вищевикладене, варто зазначити, що використання методів «зеленого» синтезу є альтернативою до отримання напівпровідникових наночастинок фізико-хімічними методами. Наведений спосіб синтезу наноматеріалів є значно менш дорогим, простішим у виконанні та безпечним для оточуючого середовища, оскільки не супроводжується утворенням токсичних побічних продуктів. Живі організми мають унікальний потенціал отримання наночастинок різного розміру та форми, як внутрішньо-, так і позаклітинно. Проте, більш ефективно використовувати саме позаклітинний метод біосинтезу квантових точок. Оскільки, у такому випадку утворені наночастинок не потребують додаткових складних підходів щодо їхнього виділення з клітин, очищення, диспергування тощо. Позаклітинний синтез дозволяє одноетапно отримати якісні зразки наночастинок, придатних до подальших застосувань. Крім того, «зелений» синтез передбачає використання широкого спектру біологічних ресурсів для утворення стабільних розчинів квантових точок. Важливо, що швидкість відновлення неорганічних іонів металів значно вища при застосуванні біологічних матриць, а ніж за умов хімічного синтезу.

Таким чином, метою дисертаційної роботи було обґрунтування та розробка відтворюваних методик «зеленого» синтезу наночастинок CdS за допомогою різних біологічних матриць, зокрема, бактерій *Escherichia coli*, міце-

лію базидіальних грибів *Pleurotus ostreatus* і рослинних культур *Linaria maroccana* та *Nicotiana tabacum* (BY-2), дослідження люмінесцентних й структурно-морфологічних властивостей отриманих квантових точок, вивчення їх цито- та генотоксичності для оцінки можливостей подальшого використання у клітинно-біологічних дослідженнях.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Об'єкти досліджень

З метою синтезу квантових точок сульфїду кадмію у дослідах вико- ристовували 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., отриману, як опи- сано в роботі [89];
- суспензійну культуру тютюну *Nicotiana tabacum* (BY-2)

#### 2.2. Реактиви, що були застосовані у роботі

У роботі використовували реактиви виробництва наступних компаній:

1. «Sigma-Aldrich» (США) – сульфат кадмію ( $\text{CdSO}_4$ ), сульфід натрію дев'ятиводний ( $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ ), дріжджовий екстракт, пептон, міо-інозитол, ні- котинова кислота (вітамін РР), біотин (вітамін Н), Са-пантотенат, амінобен- зойна кислота, фолієва кислота, піридоксин-НСІ (вітамін В6), рибофлавін (вітамін В2), тіамін-НСІ (вітамін В1), вітамін В12, 2,4-Д, БСА, комерційне середовище RPMI, що містило у своєму складі неорганічні солі  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 L-амінокислот, D-глюкоза, холін, відновлений глутатіон, целюлоза, дрицелаза, цитрат натрію 0,1 %, Triton X-1000 0,1 %.
2. «Біофарма» (Україна) – натрію хлорид ( $\text{NaCl}$ ).
3. «Хіммед» (Україна) – калій азотнокислий ( $\text{KNO}_3$ ), калій фосфорнокислий однозаміщений ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), натрій молібденовокислий ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4\times 2\text{H}_2\text{O}$ ), бор- на кислота ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), марганець сірчаноокислий п'ятиводний ( $\text{MnSO}_4\times 5\text{H}_2\text{O}$ ), кобальт хлористий шестиводний ( $\text{CoCl}_2\times 6\text{H}_2\text{O}$ ), кальцій хлорид двоховодний



( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), кальцій хлорид ( $\text{CaCl}_2$ ), цинк сірчаноокислий семиводний ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), гідроксид натрію ( $\text{NaOH}$ ), калій фосфорноокислий двозаміщений ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

4. «POCH» (Польща) – сульфат магнію семиводний ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ).

5. «Макрохім» (Україна) – амоній азотноокислий ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), мідь сірчаноокисла п'ятиводна ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ).

6. «Dushefa» (Нідерланди) – ЕДТА- $\text{Na}_2$ , (етилендіамінтетраацетат натрію двозаміщений), середовище МС (Murashige & Skoog, 1962), глюкоза.

7. ООО «Реактив» (Україна): залізо сірчаноокисле семиводне ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ).

8. «Merck» (Німеччина) – сахароза, мікробіологічний агар.

9. «Ferak» (Німеччина) – поліетиленгліколь 15 000 (ПЕГ).

10. «Serva» (Німеччина) – целюлоза «Onozuka» R-10.

Ступінь чистоти реактивів був класифікований як ч.д.а. та о.с.ч.

### 2.3. Умови культивування біологічних об'єктів

Біологічні об'єкти культивували у живильних середовищах наступного складу: середовище LB для вирощування *E. coli* – пептон – 10 г/л; дріжджовий екстракт – 5 г/л; хлорид натрію – 10 г/л (рН 7). Міцелій гриба *P. ostreatus* культивували з використанням глюкозопептоннодріжджового середовища (ГПД), що містило глюкозу – 25,0 г/л; пептон – 3,0 г/л; дріжджовий екстракт – 2,0 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0 г/л;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0 г/л;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25 г/л (рН 5,5 – 6,0). Культуру «бородатих» коренів *L. maroccana* вирощували в рідкому середовищі МС, що складалося з макроелементів МС – 100 мл/л; мікроелементів МС – 2 мл/л; вітамінів Мореля 1 мл/л; сахарози – 20 г/л; хелату заліза – 5 мл/л (рН 5,6 – 5,8). Суспензійну культуру тютюну *Nicotiana tabacum* (BY-2) вирощували на середовищі МС, що містило  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 200 мг/л; сахарозу – 30 г/л; базову суміш макро- та мікроелементів МС – 200 мг/л з додаванням тіаміну, міо-інозитулу – 2 мл/л та 2,4 Д – 1 мл/л (рН 5,6 – 5,8). Живильні середовища автоклаували при 1 атм. протягом 25 хв.

#### 2.4. Синтез квантових точок CdS за допомогою біоматриць

Для синтезу квантових точок CdS як матриці використовували бактерію *E. coli*, міцелій гриба *P. ostreatus* та рослинні культури.

**Синтез квантових точок CdS за використання *E. coli*.** З метою синтезу квантових точок CdS використовували бактерію *E. coli*, яку культивували на середовищі LB, склад якого описано в 2.3. Після стерилізації живильного середовища у конічні колби об'ємом 250 мл вносили культуру *E. coli*, попередньо вирощену на чашках Петрі на агаризованому середовищі LB аналогічного складу. Бактерію культивували за температури 37°C протягом 24 год при постійному перемішуванні на роторному шейкері (135 об/хв.). Для синтезу квантових точок CdS культуру *E. coli* центрифугували 10 хв при 5000 об./хв. Потім 50 мл супернатанту переносили в окрему чисту конічну колбу об'ємом 100 мл, куди додавали 2 мл 0,025 М водного розчину CdSO<sub>4</sub> та залишали на 1 год за температури 28°C при постійному перемішуванні. Після цього повільно додавали 500 мкл свіжевиготовленого 0,5 М водного розчину Na<sub>2</sub>S та залишали на 30 хв за температури 28°C на роторному шейкері (135 об/хв). Потім відбирали 2 мл отриманого розчину та центрифугували протягом 10 хв при 5000 об/хв. Далі осад обережно ресуспендували до набуття однорідності в об'ємі 100 мкл. Отриманий колоїдний розчин стерилізували через нітроцелюлозні фільтри Millipore (США) (діаметр пор 0,45 мкм). Тривалість синтезу становила 25,5 год з урахуванням періоду культивування бактерії. При цьому за основу було взято методичку, описану в роботі [45].

**Синтез квантових точок CdS за допомогою *P. ostreatus*.** Міцелій *P. ostreatus* вирощували у термостаті протягом 10 діб за температури 28°C. Далі стерильно відокремлювали поверхневий міцелій *P. ostreatus* від середовища та ретельно промивали його бідистильованою водою (не менше 5 разів по 100 мл), щоб позбутися залишків живильного середовища. Далі міцелій переносили у колбу, що містила 50 мл стерильної бідистильованої води та ку-

льтивували за температури 28°C протягом 4 діб. Для синтезу квантових точок CdS в колби з міцелієм гриба *P. ostreatus* додавали 2 мл 0,025 М розчину CdSO<sub>4</sub> та культивували протягом 24 год. Після цього до реакційного середовища додавали 500 мкл 0,5 М розчину Na<sub>2</sub>S та залишали на 1 год. Далі відбирали 2 мл отриманого розчину та центрифугували протягом 10 хв при 5000 об/хв. Отриману надосадову рідину фільтрували через нітроцелюлозні фільтри Millipore (США) (діаметр пор 0,45 мкм) для стерилізації досліджуваного розчину. Тривалість синтезу становила 11 діб з урахуванням часу культивування міцелію.

**Синтез квантових точок CdS за допомогою *L. maroccana*.** Рослинну культуру вирощували за температури 28°C протягом 10 діб. Далі культуру «бородатих» коренів п'ятикратно промивали у стерильній дистильованій воді з метою видалення залишків живильного середовища. Після цього отриману біомасу коренів подрібнювали за допомогою скальпеля, доливали 50 мл бідистильованої води та нагрівали до 60°C. Після охолодження біомасу коренів *L. maroccana* фільтрували через стерильний фільтрувальний папір для отримання водного екстракту. Для синтезу квантових точок CdS 2 мл 0,025 М водного розчину CdSO<sub>4</sub> додавали до 50 мл водного екстракту, отриманого з культури «бородатих» коренів *L. maroccana* та залишали на 24 год при 28°C. Далі до розчину додавали 500 мкл 0,5М Na<sub>2</sub>S та залишали на 1 год. Відбирали 2 мл отриманого розчину та центрифугували при 5000 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину фільтрували через нітроцелюлозні фільтри Millipore (США) (діаметр пор 0,45 мкм) для стерилізації. Тривалість синтезу становила 11 діб з урахуванням періоду культивування коренів.

**Синтез квантових точок CdS за допомогою *N. tabacum* (BY-2).** Культуру *N. tabacum* (BY-2) вирощували за температури 28°C протягом 7 діб. Далі суспензійні клітини фільтрували через стерильний фільтрувальний папір для видалення залишків живильного середовища. Після цього біомасу клітин переносили у конічну колбу об'ємом 100 мл зі стерильною бідистильованою водою та інкубували при 28°C на роторному шейкері (135 об/хв) протягом 24

год. Для отримання квантових точок CdS за використання як матриці суспензійної культури *N. tabacum* (BY-2), клітини переносили у стерильну бідистильовану воду (об'єм 50 мл). Через 24 год до клітин додавали 2 мл 0,025 М водного розчину CdSO<sub>4</sub> та залишали на 24 год. Далі вносили 500 мкл 0,5М розчину Na<sub>2</sub>S та залишали на 1 год. З метою видалення залишків клітин BY-2 отриманий розчин центрифугували при 5000 об/хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину фільтрували через нітроцелюлозні фільтри Millipore (США) (діаметр пор 0,45 мкм) з метою стерилізації наночастинок. Синтез квантових точок CdS проводили у трьох повторностях. Тривалість синтезу складала 9 діб з урахування періоду культивування суспензійної культури BY-2.

## **2.5. Дослідження оптичних характеристик біосинтезованих квантових точок CdS**

Спектри оптичного поглинання отриманих зразків наночастинок CdS вимірювали на спектрофотометрі Specord UV-VIS «Analytik Jena AG» (Німеччина). Запис спектрів поглинання розчинів проводили в стандартних кварцових кюветах товщиною 1 см (діапазон пропускання 170÷1000 нм). Похибка запису хвильових чисел становила за паспортом 20 см<sup>-1</sup>, але з урахуванням похибки при цифровій обробці та випадкових факторів реальною є похибка до 80 см<sup>-1</sup>. Значення оптичної густини визначали з точністю до 1% довжини оптичної шкали в діапазоні оптичної густини від 0 до 1,4. Спектрограму, записану самописцем Specord UV VIS, сканували комп'ютерним сканером і перетворювали у формат jpeg-файлу. Далі отриманий jpeg-файл обробляли програмним пакетом GetData, в результаті чого спектр було отримано у числовому вигляді dat-файлу. Числові дані обробляли з використанням прикладного програмного пакету (Origin Pro 8.0).

Спектри люмінесценції вимірювали на серійному спектрофлуориметрі Cary Eclipse «Varian, Agilent Technologies» (США). Максимальна роздільна здатність цього приладу складає 1,5 нм, що визначається апаратною функці-

єю та найменшою шириною щілини. Обрана спектральна ширина щілини для вимірів становила 5 нм. Похибка запису довжини хвилі становила 0,05 нм, а похибка визначення інтенсивності не перевищувала 1%. Джерелом світла даного приладу слугувала імпульсна ксенонова лампа. Оптичний діапазон збудження був наступним: від 200 нм до 900 нм, емісія від 200 нм до 900 нм. Максимальна швидкість сканування 24000 нм/хв. Для врахування спектральної чутливості фотоелектронного помножувача, що використовується у флуориметрі, у програмному забезпеченні приладу передбачена можливість корекції спектрів. Для спектральних вимірювань використовували стандартні кварцеві кювети розміром  $1 \times 1 \times 3$  см<sup>3</sup>. Для коректного визначення локалізації максимумів спектральний масив було поділено на компоненти з використанням програмного пакета для оптичної спектروفотометрії (PeakFit 4.11). Дослідження спектрів поглинання та фотолюмінесценції проводили на базі фізичного факультету Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

## **2.6. Трансмісійна електронна мікроскопія, електроннографія та рентгеноспектральний мікроаналіз зразків синтезованих квантових точок CdS**

Характеризацію структури та морфології синтезованих квантових точок CdS здійснювали за допомогою просвічувальної 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. Діаметр пор мідної сітки складав 100 мкм, товщина мідної сітки – 25 – 30 мкм, тоді як товщина аморфної вуглецевої плівки-підкладки – 5 мкм [90].

Метод електроннографії використовували для дослідження кристалічної будови синтезованих наночастинок CdS. Дослідження проводили на елект-

ронному мікроскопі JEOL, JEM-2100F (Японія), що оснащений спектрометром з енергетичною дисперсією JED-2300T. Електронограми зразків, осаджених на мідьвуглецевій сітці, отримували при енергії електронного пучка  $E = 100$  кеВ, довжина хвилі електронів  $\lambda = 0,012$  нм. Область локалізації пучка на зразку складала 200 нм. Інтенсивність дифракційних кілець оцінюють візуально. Визначалися міжплощинні відстані, які відповідають кільцевим максимумам. Ідентифікацію досліджуваної речовини за допомогою кільцевих електронограм проводили з використанням таблиць ASTM (American Society for Testing and Materials, Powder Diffraction File).

При рентгеноспектральному мікроаналізі аналізували елементний склад мікрооб'єму, в якому відбувалося збудження рентгенівського випромінювання (область генерації) електронним пучком. Розміри такого мікрооб'єму визначали діаметром електронного пучка та властивостями досліджуваної речовини. Мінімальний розмір області генерації становив близько 1 мкм і не змінювався при подальшому зменшенні діаметру пучка. Таким чином, рентгеноспектральний мікроаналіз дозволив дослідити хімічний склад зразку з мікронним розділенням. Завданням кількісного рентгеноспектрального мікроаналізу було визначення всіх хімічних елементів, які входять до складу досліджуваного зразка [91]. Досліджуваний зразок бомбардувався високоенергетичними електронами (10 – 15 кеВ), у результаті чого у ньому генерувалося рентгенівське випромінювання. При аналізі характеристичного рентгенівського випромінювання визначали, які хімічні елементи входять до складу зразка, а також їх кількісне співвідношення (частка у зразку) [91]. Зазначеним методом енергороздільної рентгенівської спектроскопії визначали процентний вміст елементів у полі зору, ширина якого становила 70-150 нм, залежно від ділянки зразка. Фіксували інтенсивність максимумів рентгенівського  $K\alpha_{1,2}$  випромінювання елементів у досліджуваній пробі. Описані електронно-мікроскопічні дослідження проводили на базі Інституту проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича НАН України.

## 2.7. Методика функціоналізації квантових точок CdS

Функціоналізацію синтезованих наночастинок CdS проводили з метою утворення навколо їхньої поверхні реакційноздатного органічного покриття. Для цього використовували водні розчини поліетиленгліколю (ПЕГ) (10 мг/мл) та бичачого сивороткового альбуміну (БСА) (10 мг/мл). При відпрацюванні методики враховували розробки інших авторів, що присвячені функціоналізації квантових точок подібними сполуками [92, 93].

Колоїдний розчин люмінесцентних наночастинок додавали до відповідних полімерів у співвідношенні 2:1, а саме, 10 мл колоїдного розчину наночастинок CdS та 5 мл ПЕГ чи БСА. Далі отримані зразки досліджували методом оптичної спектрофотометрії. Для порівняння досліджували також спектри фотолюмінесценції вихідного розчину синтезованих наночастинок CdS без покриття, а також спектри люмінесценції водних розчинів ПЕГ та БСА.

## 2.8. Люмінесцентна мікроскопія досліджуваних клітин

З метою оцінки можливості застосування синтезованих нами квантових точок CdS як люмінесцентних міток у рослинних та тваринних клітинах використовували метод люмінесцентної мікроскопії. Об'єктами дослідження були епідермальні клітини цибулі *Allium cepa*, клітини коренів *L. taroccana*, а також клітини лінії HeLa (клітини раку шийки матки). Клітини обробляли квантовими точками CdS протягом 24 год. Діапазон досліджуваних концентрацій квантових точок становив 0,75 – 3,75 мг/мл, що відповідає розведенням: 1:1 – 1:4. Як контроль використовували необроблені клітини. Спостереження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопу Axioskop 40 ("Carl Zeiss", Німеччина), об'єктив 20X. Комп'ютерну обробку мікрофотографій виконували з використанням програмного забезпечення AxioVision LE

4.8.2.0 (“Carl Zeiss MicroImaging GmbH”, Німеччина, 2010). Довжина хвилі світлофільтру складала 420 нм. Збудження випроміненням ртутної лампи у діапазоні довжин хвиль 340 – 380 нм. Візуалізацію клітин HeLa проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа AxioVert-40 з програмним забезпеченням AxioVision «CarlZeiss», Німеччина. Фотографування препаратів клітин проводили з використанням цифрової фотокамери DigitalStillCamera з об’єктивом CarlZeissVario-Sonar. Довжина хвилі збуджуючого випромінення 540 – 570 нм.

## **2.9. Дослідження впливу отриманих квантових точок CdS на рослинні та тваринні моделі**

### **2.9.1. Вплив квантових точок CdS на протопласти *Nicotiana tabacum***

**Культивування рослин *N. tabacum* в умовах *in vitro*.** Для отримання асептичного рослинного матеріалу насіння тютюну (стерилізували у 5%-му водному розчині гіпохлориту натрію (NaOCl) протягом 15 хв. Після цього проводили відмивання насіння стерильною дистильованою водою три рази та висаджували його на агаризоване живильне середовище МС [94]. Насіння пророщували протягом двох тижнів за температури 24°C при 16-годинному фотоперіоді у чашках Петрі до утворення проростків довжиною 1-1,5 см. Проростки переносили у стерильні скляні циліндричні ємності із ідентичним за складом живильним середовищем МС для нарощування рослинного матеріалу та культивували за аналогічних умов. Асептичні рослини тютюну розмножували мікроклонально. З дорослих рослин скальпелем ізолювали ділянки пагонів, що містили пазушні бруньки, та переносили експланти у стерильні ємності зі свіжим середовищем МС. Протопласти з мезофілу асептичних рослин *N. tabacum* отримували методом ферментативного розщеплення клітинної стінки, як описано [95].

**Ізолювання протопластів тютюну *N. tabacum*.** Для виділення протопластів молоді листки тютюну (загальною масою 2-3 г) нарізали смужками



від центральної жилки за допомогою тонкого леза та поміщали у 10 мл суміші ферментів, що містила 0,6% целюлази, 0,3% дрицелази, 0,5 М сахарози та 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Суміш ферментів готували безпосередньо перед використанням та стерилізували за допомогою мембранного фільтру (Millipore, США) з діаметром пор 0,45 мкм. Ферментацію проводили при кімнатній температурі у темряві протягом 16-20 год. Після ферментації протопласти фільтрували через нейлоновий фільтр з діаметром пор 0,5 мм для видалення залишків тканин листка. Фільтрат (близько 9 мл) збирали у стерильну пробірку і по стінці нашаровували зверху 2 мл розчину W5 (154 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 125 мМ CaCl<sub>2</sub>; 5 мМ глюкози; рН 5,7) таким чином, щоб нижній і верхній розчини не змішувалися. Центрифугували при 1000 об/хв 20 с і обережно відбирали шар живих протопластів, що, по градієнту, розташовувався на межі двох розчинів. Обережно ресуспендували відібрані протопласти у 10 мл розчину W5 для відмивання від залишків ферментної суміші та центрифугували 20 с при 1000 об/хв. Після цього, відбирали надосадову рідину та ресуспендували протопласти у рідкому живильному середовищі Km8p, що містило суміш макросолей 100 мл/л, мікросолі – 10 мл/л, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 28 мг, міоїнозитол – 100 мг, нікотинову кислоту – 1 мг, піридоксин-HCl – 1 мг, тіамін-HCl – 1 мг, Са-пантотенову кислоту – 1 мг, фолієву кислоту – 0,4 мг, біотин – 0,01 мг, холін хлорид – 1 мг, рибофлавін – 0,2 мг, аскорбінову кислоту 2 мг, вітамін В<sub>12</sub> – 2 мг, 2,4Д – 0,2 мг, зеатин – 0,5 мг, сахарозу – 250 мг/л, глюкозу – 68,4 г/л (рН – 5,6) загальна кількість протопластів складала  $\approx 2 \times 10^5$  на 1 мл. Ізольовані протопласти використовували для дослідження впливу квантових точок CdS.

**Дослідження впливу квантових точок CdS на протопласти.** Концентрація маточному розчину наночастинок CdS, синтезованих за використання суспензійної культури *N. tabacum* (BY-2), складала 0,193 мг/мл. З метою оцінки токсичної дії квантових точок CdS на протопласти тютюну вихідний розчин наночастинок розводили 1:2 (0,097 мг/мл), 1:4 (0,049 мг/мл), 1:8 (0,025 мг/мл), 1:16 (0,012 мг/мл), 1:32 (0,006 мг/мл) та 1:64 (0,003 мг/мл). Концент-

рації наночастинок CdS визначали у маточному розчині, який отримували після синтезу за використання певної біоматриці. Масу частинок визначали у фіксованому об'ємі (10 мл), для цього випаровували рідину та зважували агреговані наночастинок, осаджені на скельце. Подібна методика визначення концентрацій описана для наночастинок золота у роботі [96]. Розчини наночастинок CdS додавали до свіжоізольованих протопластів тютюну. Обробка протопластів наночастинками тривала 24 год.

Морфологію протопластів досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопу Axioskop 40 ("Carl Zeiss", Німеччина). Комп'ютерну обробку мікрофотографій проводили з використанням програмного забезпечення AxioVision LE 4.8.2.0 ("Carl Zeiss MicroImaging GmbH", (Німеччина, 2010). Частоту виживання протопластів визначали як відношення кількості неушкоджених протопластів до загальної кількості досліджуваних протопластів  $\times 100$  %. При візуальній ідентифікації морфологічного стану протопластів враховували, що життєздатні протопласти мають ідеальну сферичну форму, непошкоджену мембрану [97]. Зміна ж сферичної форми чи руйнування мембрани свідчить про ушкодження протопластів. Кількість протопластів підраховували за допомогою камери Горяєва.

### **2.9.2. Вплив квантових точок CdS на пухлинні клітини лінії HeLa**

**Умови культивування клітин HeLa.** Клітини HeLa культивували в живильному середовищі RPMI-1640 наступного складу:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 L-амінокислот, D-глюкоза, вітаміни (амінобензойна кислота, біотин, фолієва кислота, ніацин, пантотенова кислота, піридоксин-HCl, рибофлавін, тіамін-HCl, вітамін B12), міо-інозитол, холін, відновлений глутатіон. Частоту виживання клітин визначали як співвідношення живих та мертвих клітин  $\times 100$  % після зафарбовування останніх трипановим синім.

Для дослідження токсичної дії квантових точок CdS використовували трансформовані клітини лінії HeLa (рак шийки матки людини). Клітини культивували за стандартних умов у термостаті при 37°C за вологих умов, 5% CO<sub>2</sub>; у зазначеному вище живильному середовищі RPMI з додаванням 10 % ETC (ембріональної телячої сировотки). Обробку клітин HeLa квантовими точками CdS здійснювали протягом 48 год при 37 °C.

**МТТ-колориметричний метод оцінки кількості живих клітин.** Кількість живих клітин після обробки квантовими точками CdS оцінювали за допомогою МТТ-тесту [98]. В основу методу покладено здатність мітохондріальних ферментів живих клітин перетворювати 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразоліум бромід (МТТ) – сіль жовтого кольору в кристалічний МТТ-формазан лілового кольору. Для цього у лунки 96-лункової планшети додавали 20 мкл розчину МТТ «Sigma», (США) (5 мг/мл фосфатно-сольового буферу) та інкубували за тих же умов протягом 3-х годин. Після центрифугування (1500 об/хв, 5 хв), планшет за допомогою полуавтоматичного відсмоктувача видаляли супернатант. Для розчинення кристалів формазану у кожен лунку додавали 100 мкл диметилсульфоксиду «Serva» (Німеччина). Величину оптичного поглинання розчину вимірювали за допомогою мультилункового спектрофотометра «Labsystems Multiskan PLUS» (Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм (ОП<sub>540</sub>). Для визначення виживаності клітин HeLa за впливу синтезованих наночастинок CdS використовували метод рутинного підрахунку клітин в камері Горяєва після фарбування клітин барвником трипановим синім, який проникає лише в мертві клітини. Виживаність клітин визначали за відсотком живих клітин після дії наночастинок CdS та в порівнянні з неорганічним сульфідом кадмію, який застосовували як контроль, та відносно бактеріальної, грибною та рослинної матриць, які використовували для синтезу квантових точок CdS.

**Цитофлюориметричний аналіз.** ДНК клітин для аналізу фарбували флюорохромним барвником пропідіум йодидом (ПЙ), що селективно з'єднується з інтеркалюючими сайтами в ДНК. Фарбування клітин за допо-

могою флуорохромного барвника ПЙ включало наступні етапи: клітини у кількості  $10^6$  на пробу після однократного відмивання в 5 мл забуференого фізіологічного розчину при 1000 об/хв протягом 10 хв ресуспендували в 1 мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1 % цитрат натрія, 0,1 % Triton X-100, 5 мкг/мл ПЙ). Після обережного струшування клітини інкубували при 22-25 °С протягом 30 хв у темряві. Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу ( $G_{1/0}$ , S,  $G_2 + M$ ) гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh.

Метод визначення апоптозу базувався на факті втрати клітинами в процесі програмованої клітинної загибелі частини ДНК внаслідок її міжнуклеосомної фрагментації. При цьому за допомогою проточної цитометрії визначали відсоток клітин, що містяться в гіподиплоїдній зоні гістограми (вона виявляється у вигляді фракції, що розташована лівіше основного піка, який відповідає диплоїдним клітинам), в якій збираються клітини, що втрачають ДНК, тобто, для яких був характерним апоптоз.

Аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу визначали за допомогою проточної цитометрії, відокремлюючи за допомогою спеціальних DDM-параметрів приладу окремі клітинні ядра. Суть методу полягає в наступному: клітини в  $G_2 + M$  фазі клітинного циклу містять подвійну кількість ДНК, а отже, і флуорохрому, порівняно з клітинами, що знаходяться у фазі  $G_0$ . Клітини в S-фазі містять ДНК, що поступово збільшуються, саме це і фіксується приладом. На осі ординат реєструється число імпульсів на канал: чим вище крива в будь-якій точці, тим більше збирається клітин з відповідним вмістом ДНК в даному каналі.

Всі проточно-цитометричні дослідження виконували на приладі FACS Calibur ("BectonDickinson", США), що оснащений двома лазерами (з довжиною хвилі 488 та 625 нм), з використанням спеціалізованих математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh

для накопичення та аналізу даних. Для детекції флюоресценції ПЙ використовували вузькосмуговий фільтр 585/42 нм.

Цитофлюориметричний аналіз проводили за люб'язної згоди зав. НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку д.б.н. Храновської Н.М. та старшого наукового співробітника лабораторії Скачкової О.В.

#### **Визначення сумарного адгезивного потенціалу пухлинних клітин.**

Визначення адгезивних характеристик клітин проводили згідно методики [99], що базується на визначенні адгезивних властивостей макрофагів. Клітини HeLa після впливу наночастинок CdS відмивали двічі фізіологічним розчином і фіксували досліджувані клітини, прикріплені до субстрату, 70%-ним етанолом. Після висушування препарати фарбували барвником фіолетовим кристалічним протягом 15-30 хв, після чого промивали клітини тричі фізіологічним розчином. Барвник розчиняли в ДМСО і визначали оптичне поглинання при довжині хвилі 570 нм. Таким чином, мірою адгезивності вважали інтенсивність колориметрії, яка прямо залежала від кількості прикріплених клітин.

Зазначені вище дослідження впливу синтезованих квантових точок CdS на пухлинні клітини проводили на базі кафедри біохімії «ННЦ Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

#### **2.10. Вплив синтезованих квантових точок CdS на *Drosophila melanogaster***

Для оцінки впливу синтезованих наночастинок CdS використовували маточні розчини, які містили 3,75 мг/мл квантових точок CdS, отриманих за використання *P. ostreatus*, 3,6 мг/мл квантових точок CdS, отриманих за допомогою *E. coli* та 1,2 мг/мл квантових точок CdS, отриманих за допомогою *L. taroccana*. Досліджували вплив наступних концентрацій наночастинок: CdS (*P. ostreatus*): 1,87 (розведення 1:1); 1,25 (1:2); 0,75 (1:4); 0,42 мг/мл (1:8); CdS

(*E. coli*): 1,8 (розведення 1:1); 1,2 (1:2); 0,72 (1:4); 0,4 мг/мл (1:8); *CdS (L. marocana)*: 0,6 (розведення 1:1); 0,4 (1:2); 0,24 (1:4); 0,13 (1:8) мг/мл. Для порівняльного аналізу використовували розчин CdS, який отримували внаслідок хімічної реакції  $\text{CdSO}_4 + \text{Na}_2\text{S} \rightarrow \text{CdS} + \text{Na}_2\text{SO}_4$  за аналогічних умов у бідистильованій воді без застосування біологічних матриць, і концентрація якого складала 4 мг/мл. Як контроль також використовували біологічні матриці, що були обрані для синтезу квантових точок, які додавали до живильного середовища для вирощування *D. melanogaster*, до складу якого входило: 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 [100].

З метою встановлення впливу досліджуваних квантових точок та контрольних зразків визначали їх вплив на виживаність мух, час розвитку та плодючість (кількість отриманих особин імаго в F1 дрозофіл. Генотоксичність досліджуваних розчинів визначали у «wing spot» тесті [101]. Для цього схрещували самців лінії *Oregon R* з самками *mei-9 mei-41<sup>D5</sup> / FM7c; mwh*. Аналізували морфологію волосків на крилах імаго F1, гетерозиготних за мутантним алелем. Для цього робили постійні препарати крил, після чого волоски міжжилкового простору вивчали під мікроскопом, оцінюючи кількість мутантних подій на крило. Для вирощування мух у «wing spot» тесті використовували 0,4 мг/мл наночастинок CdS, синтезованих з використанням *E. coli* та 0,42 мг/мл CdS, синтезованих з використанням *P. ostreatus* відповідно, оскільки така концентрація виявилася не токсичною *in vivo*. Статистичний аналіз проводили за методикою [102].

## 2.11. Статистична обробка даних

Методи математичної статистики використовували при оцінці токсичних ефектів різних концентрацій синтезованих квантових точок CdS на рослинні та тваринні клітини. Графіки залежності рівня виживання клітин від концен-

трації досліджуваних квантових точок були побудовані за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Office Excel 2010 та Origin Pro 8.0. Використовували загальновідомий метод статистичної обробки даних [103]. Спочатку обчислювали середнє арифметичне вибірки  $\langle x \rangle$ . Далі обчислювали значення середнього квадратичного відхилення ( $S_n$ ) за формулою:

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\langle x \rangle - x_i)^2}{n(n-1)}} \quad (2.1)$$

$\langle x \rangle$  – середнє арифметичне вибірки клітин

$x_i$  – значення показника в точці

$n$  – об'єм вибірки

$$\Delta x = S_n \cdot t \quad (2.2)$$

$S_n$  – середнє квадратичне відхилення

$t$  – коефіцієнт Стюдента (для довірчої ймовірності  $\alpha = 0,95$ ) [103].

### РОЗДІЛ 3

## СИНТЕЗ КВАНТОВИХ ТОЧОК CdS ЗА ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЇ *E. COLI*

Розвиток екологічних технологій синтезу наноматеріалів сьогодні є надзвичайно важливим для розширення можливостей їх застосування у різних напрямках біологічних досліджень. Незважаючи на те, що зараз існує досить велика кількість фізичних та хімічних методів отримання наночастинок різного складу, необхідність використання шкідливих хімічних реактивів та різних типів токсичних стабілізаторів під час хімічного синтезу суттєво обмежує подальше застосування таких систем, зокрема, в біомедичній сфері [104]. Крім того, фізико-хімічні методи синтезу наноматеріалів вимагають дорогоцінного обладнання, пов'язані з утворенням токсичних побічних продуктів. Тому, «біогенний» підхід до отримання наночастинок вважають більш ефективним [43].

Мікроорганізми достатньо широко використовують для отримання наночастинок різного хімічного складу. Перевагою мікроорганізмів порівняно з іншими біологічними об'єктами є їхня здатність існувати в навколишньому середовищі за стресових умов, зокрема, за наявності високих концентрацій металів, а також за різких змін температури, рН та тиску. Відповідно наночастинки, які утворюються за допомогою бактерій, характеризуються вищою каталітичною реактивністю, більшою питомою поверхнею та активною взаємодією між ферментом та металом [105]. Слід відмітити, що наночастинки починають утворюватись, коли мікроорганізми чи клітини еукаріотичних організмів захоплюють цільові іони із зовнішнього середовища та перетворюють іони металів на елементарний метал за рахунок активності власних ферментів [43, 106]. Бактерії є досить продуктивними біологічними матрицями й у випадку синтезу напівпровідникових квантових точок. З метою подолання проблем, пов'язаних з виділенням утворених наночастинок з мікробних клітин та їх очищенням, нами було розроблено одну етапну методику позаклі-



тинного біосинтезу квантових точок CdS за допомогою бактерій. У літературі зазначається, що наявність ферментів 5'-аденилсульфатредуктаз у сульфатасимілюючих бактерій забезпечує детоксикацію від іонів кадмію шляхом формування наночастинок CdS позаклітинно [107]. Крім того, позаклітинний синтез CdS опосередкований ферментами NADH-залежними редуктазами та хінонами, а також активацією ліаз [46]. Бактерії *E. coli* містять сульфотрансферазу, фермент, що опосередковує утворення тіосульфата, і є частиною сульфат-відновлюючого шляху в цих бактеріях [108].

Враховуючи вищевикладене, метою першого етапу роботи була розробка відтворюваного методу отримання квантових точок сульфід кадмію за допомогою бактеріальної культури *E. coli*, дослідження їх оптичних та структурно-морфологічних характеристик, а також часової стабільності.

### **3.1. Оптичні властивості квантових точок CdS, синтезованих за використання *E. coli***

Як зазначалося, напівпровідникові квантові точки являють собою нанокристали, розміри яких в усіх трьох напрямках менші радіусу екситону Бора для даного матеріалу [1]. В таких об'єктах спостерігається розмірний ефект: оптичні властивості, зокрема, ширина забороненої зони, довжина хвилі емісії, та коефіцієнт екстинкції залежать від розміру наночастинок та їхньої форми [109]. Слід зауважити, що для подальших біологічних застосувань особливо важлива часова стабільність отриманих розчинів наночастинок [109, 110].

Стабільність наночастинок CdS, синтезованих нами з використанням *E. coli*, оцінювали за змінами спектрів поглинання з часом. Спектри записували одразу після синтезу, через 10 діб, 1 місяць та 3 місяці (рис. 3.1). На рис. 3.1 наведено спектри поглинання, що відповідають свіжосинтезованим зразкам (крива 1) та зразкам, що зберігалися протягом 10 діб (крива 2). У роботі [111] було запропоновано метод, який дозволяє оцінити діаметр наночастинок CdS

за положенням максимуму у їх спектрі поглинання. Зокрема, наведено емпіричну формулу для визначення діаметру наночастинок за довжиною хвилі ( $\lambda$  нм), яка відповідає піку поглинання:

$$d(\text{nm}) = -6,65 \cdot 10^{-8} \lambda^3 + 1,96 \cdot 10^{-4} \lambda^2 - 9,24 \cdot 10^{-2} \lambda + 13,29 \quad (3.1)$$

Цей метод оцінки розмірів наночастинок CdS за спектром поглинання на сьогодні є загальноприйнятим [112]. Для свіжосинтезованих зразків характерні широкий максимум в області довжин хвиль 420 нм – 440 нм та вузький пік при 368 нм (рис. 3.1, крива 1, стрілка). Розрахунок за формулою (3.1) показує, що вказаним максимумам відповідають наночастинок діаметром 2,5 нм та 5,5 нм. Необхідно відзначити, що вузький максимум при довжині хвилі 368 нм зумовлений екситонним поглинанням, яке проявляється при розмірах наночастинок, менших за 3 нм [113].

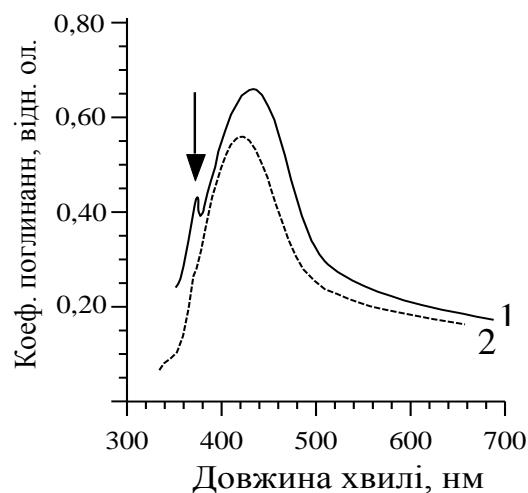


Рис. 3.1. Спектри поглинання квантових точок CdS (*E. coli*): 1 – спектр, що відповідає свіжосинтезованому зразку; 2 – спектр зразка, що зберігається 10 діб; стрілка ілюструє екситонне поглинання, яке властиве квантовим точкам  $\leq$  за 3 нм

Смуга, яка характерна для 10-денних зразків (рис. 3.1, крива 2), дещо вузюча, а ніж у випадку свіжовиготовлених, що свідчить про поступове злипання

окремих квантових точок. Важливо, що при реєстрації спектрів поглинання вказаного зразка через 10 діб після синтезу спостерігалось зникнення вузького піку, що свідчить про поступову агрегацію утворених квантових точок у кластери більших розмірів. Максимуму поглинання наночастинок CdS при 430 нм, згідно з (3.1), відповідає фракція наночастинок діаметром 4,5 нм. Отримані дані добре узгоджуються з результатами інших авторів. Зокрема, у роботах [44, 114], де для біосинтезу CdS автори також використовували *E. coli*, діапазон поглинання наночастинами сульфиду кадмію зафіксовано у межах 400-450 нм. Крім того, нами встановлено, що спектри поглинання, отримані через 30 діб та 3 місяці після біосинтезу, подібні до спектрів, отриманих через 10 діб. Таким чином, об'єднання найменших квантових точок (діаметр  $\leq 3$  нм) у кластери спостерігалось саме у перші 10 діб після синтезу, а у подальшому розчин квантових точок CdS був стабілізованим і зберігав свої оптичні властивості навіть протягом 3 місяців після синтезу.

На рис. 3.2 представлено спектри фотолюмінесценції, які відповідають свіжосинтезованим зразкам (суцільна крива 1) та 10-денним зразкам (суцільна крива 2). Спектри вимірювали за кімнатної температури при збудженні випромінюванням  $\lambda = 340$  нм. Спектральний контур було розділено на компоненти, які описуються лоренціанами однакової ширини. Для коректного поділу спектрів виявилось мінімально достатнім чотири лоренціани, кожен з яких відповідає люмінесценції наночастинок певного діаметру. Як видно з рис. 3.2, спектр люмінесценції свіжосинтезованих зразків має форму широкої смуги з максимумами на довжинах хвиль 422 нм та 470 нм, причому з чотирьох спектральних компонентів найбільш інтенсивним є лоренціан з максимумом при 417 нм (фракція наночастинок найменших розмірів). Спектр наночастинок має вигляд більш вузької симетричної смуги з максимумом вже на довжині хвилі 443 нм через 10 діб після синтезу. В цьому випадку спостерігається перерозподіл інтенсивності спектральних компонентів, так що найбільш інтенсивним стає лоренціан з максимумом при 459 нм.

Такий перерозподіл інтенсивностей вказує на поступове об'єднання наночастинок CdS, при якому збільшується фракція наночастинок у середньому більшого діаметру. Про агрегацію квантових точок свідчить і звуження спектральної ширини кривої 2 (Рис. 3.2), що відповідає зменшенню розкиду значень розмірів наночастинок.

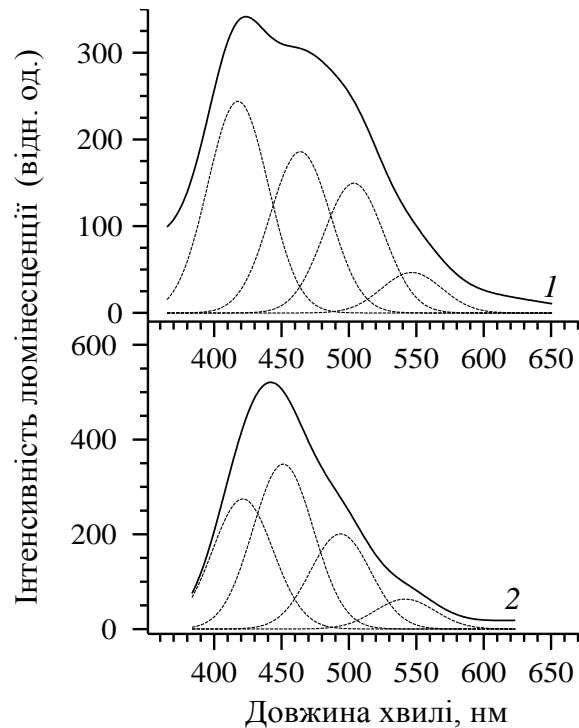


Рис. 3.2. Спектри фотолюмінесценції квантових точок CdS (*E. coli*) : 1 – спектр люмінесценції CdS одразу після синтезу; 2 – спектр люмінесценції через 10 діб після синтезу. Пунктир – складові спектру (лоренціани)

Нами було встановлено, що синтезовані квантові точки є стабільними протягом 10 діб, 30 діб та 3 місяців після біосинтезу (спектр фотолюмінесценції залишається незмінним).

Отримані дані узгоджуються з результатами інших авторів. А саме, при використанні генетично трансформованого штаму *E. coli* як матриці для внутрішньоклітинного біосинтезу квантових точок CdS [115] було встановлено, що у їх спектрах поглинання спостерігається максимум на довжині хвилі 420 нм. Однак, спектр фотолюмінесценції мав вигляд вузької куполоподібної симетричної кривої з гострим максимумом при 500 нм. Важливо, що такий

«червоний зсув» автори пояснюють наявністю певних білків, що локалізовані в бактеріальних клітинах та задіяні у процесі біосинтезу CdS. Крім того, автори використовували штам бактерії, трансформований генетичною конструкцією, яка містить ген, що кодує гістидин-збагачений білок CDS 7, що зв'язується з попередниками CdS і опосередковує синтез наночастинок шляхом кепінгу на поверхні квантових точок CdS [115, 116]. Діаметр зазначених наночастинок був близько 6 нм [115].

В іншій роботі також досліджено оптичні характеристики квантових точок сульфїду кадмію, внутрішньоклітинно синтезованих за використання *E. coli* [117]. Автори встановили, що при збудженні зразків випроміненням з довжиною хвилі  $\lambda=350$  нм, спостерігається поява інтенсивного піку на довжині хвилі 470 нм. Крім того, за умови збудження отриманих наночастинок CdS в ультрафіолетовому діапазоні (330 – 384 нм) була зафіксована помітна блакитна флуоресценція таких наночастинок. Авторами проаналізовано декілька факторів, що здатні оптимізувати процес біосинтезу, підвищити його продуктивність, а також впливати на інтенсивність флуоресценції синтезованих наночастинок. Серед них заміна живильного середовища для культивування бактерії на свіже перед початком біосинтезу, відбір зрілих клітин та мінімізація токсичності реакційного середовища шляхом додавання джерела кадмію невеликими порціями у певні визначені проміжки часу [117]. Було встановлено, що саме заміна культурального середовища на свіже суттєво посилює інтенсивність флуоресценції отриманих наночастинок. У даному випадку підвищується їх відтворюваність, оскільки свіже живильне середовище стимулює ріст бактерії *E. coli*, що у свою чергу сприяє утворенню та накопиченню нових квантових точок у разі внутрішньоклітинного синтезу [117]. У даній роботі також показано, що інтенсивність флуоресценції корелює з фазами росту бактеріальної культури. Максимум інтенсивності люмінесценції наночастинок досягається через 10 – 12 год культивування, тобто саме у стаціонарній фазі розвитку клітини бактерії найбільш ефективно продукують квантові точки CdS [117]. Також, як зазначено вище, автори роботи [45] підтверджують, що при використанні *E. coli* для біосинтезу наночастинок сульфїду

кадмію, у спектрах поглинання зафіксовано максимум на довжині хвилі 420 нм, тоді як у спектрах люмінесценції спостерігається симетричний пік при 440 нм, що узгоджується з отриманими нами результатами.

### **3.2. Структурно-морфологічні властивості квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *E. coli***

За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії високого розділення було досліджено морфологію, особливості структури, а також розподіл за розмірами синтезованих нами квантових точок CdS. Краплину (0,5 мл) досліджуваного розчину наночастинок наносили на мідну сітку з тонким вуглецевим напиленням. Електронні мікрофотографії представлено на рис. 3.3 (а,б). Крім того, нами було встановлено, що синтезовані квантові точки CdS мають форму, близьку до сферичної, характеризуються гладкою поверхнею без поверхневих дефектів та переважно мають діаметр у діапазоні 5 – 10 нм. Також на рис. 3.3 (а) можна спостерігати кристалічну структуру отриманих квантових точок. При значному збільшенні показана кристалічна ґратка окремих досліджуваних наночастинок сульфїду кадмію, що позначено стрілками на мікрофотографії. Спираючись на дані електронно-мікроскопічного аналізу зразків було побудовано діаграму розподїлу наночастинок за розмірами (рис. 3.4). У середньому загальна кількість обрахованих квантових точок у полі зору становила 130. Гїстограму побудовано з використанням комп'ютерної програми «Grapher 8.0». У результатї було показано, що у синтезованому зразку переважала фракція квантових точок з діаметром у межах від 6 до 8 нм. Частка зазначених наночастинок складає 18 % та 17 % відповідно. У той же час, у зразку виявлено фракцію наночастинок меншого діаметру. Зокрема, наночастинок CdS з діаметром 4 – 5 нм складають 8 % від їх загальної кількості у полі зору. Фракція наночастинок, діаметр яких 3 – 4 нм складає 4%, а фракція 2 – 3 нм досягає 2 % в отриманому зразку. Також у зразку наявні наночастинок з діаметром 10 – 12 нм, їх частка разом становить 10 % від загальної кількості наночастинок.

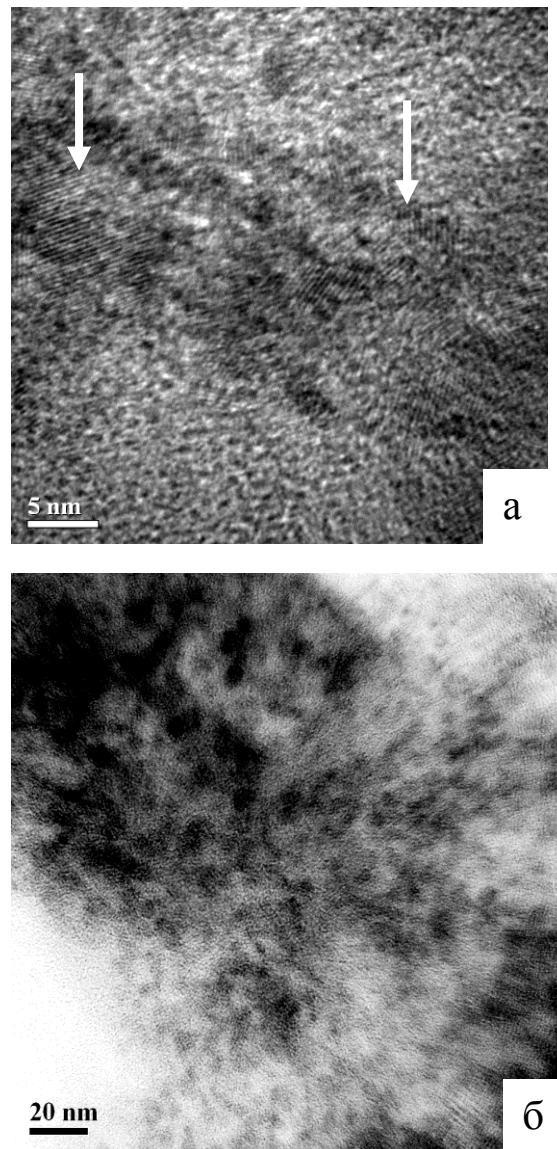


Рис. 3.3. Електронні мікрофотографії квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *E. coli*: а – структура кристалічної ґратки при масштабі 5 нм; б – морфологія окремих квантових точок при масштабі 20 нм

Варто відмітити, що розподіл наночастинок за розмірами, отриманий за даними TEM, дав дещо вищі значення діаметру наночастинок 6,0 – 8,0 нм порівняно з оцінкою, виконаною на основі спектрів поглинання 4,0 – 5,5 нм, що відображує відмінності використаних методів.

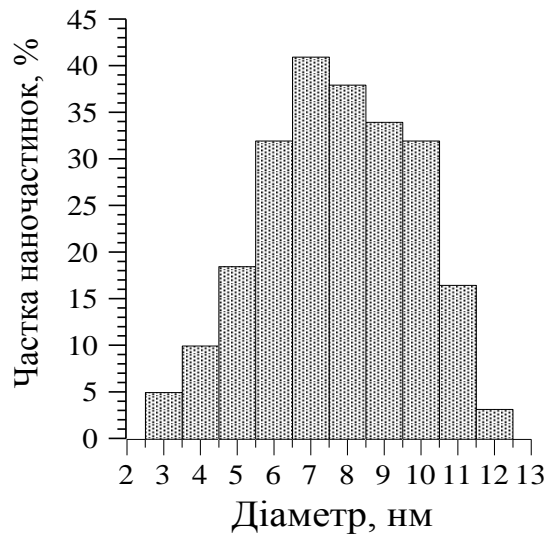


Рис. 3.4. Розподіл за розмірами синтезованих квантових точок CdS, що синтезовані за використання *E. coli*

### 3.3. Електронографія та елементний рентгеноспектральний мікроаналіз квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *E. coli*

Нами були отримані електронограми зразків CdS, осаджених на мідьвуглецевий сітці. Електронограма квантових точок наведена на рис. 3.5. Представлені дифракційні максимуми 1, 2 та 3 відповідають міжплощинним відстаням 0,341 нм, 0,209 нм та 0,187 нм, що узгоджується з даними [118].

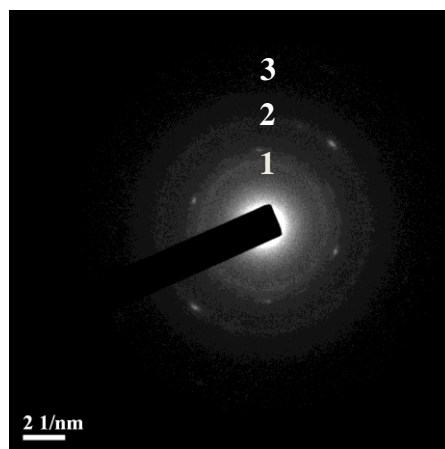


Рис. 3.5. Електронограма квантових точок CdS синтезованих за використання *E. coli*



Вказані міжплощинні відстані відповідають кристалам CdS, модифікація вюрцит (відбивання від атомних площин (002), (110) та (103)). Поодинокі світлі плями на дифракційних колах відображують дифракцію електронів на окремих мікрочастинках CdS, які присутні у синтезованому зразку.

Результати рентгеноспектрального мікроаналізу свідчать про наявність в зразках елементів Cd та S, вміст яких у полі зору становить: Cd (30,81 %) та S (25,61 %) (об'ємна концентрація) (табл. 3.1). Вміст інших хімічних елементів у полі зору, а саме Na (21,45 %) та Cl (22,13 %), ймовірно обумовлений наявністю у середовищі для культивування *E. coli* залишків хімічних речовин, які входили до складу живильного середовища. Оскільки квантові точки отримували в асептичних умовах, потрапляння до досліджуваного зразка сторонніх іонів як зовнішніх домішок можна виключити.

Таблиця 3.1

Елементний рентгеноспектральний мікроаналіз отриманих квантових точок CdS, атомних %

Na	S	Cl	Cd
21,45	25,61	22,13	30,81

Отримані дані електронно-мікроскопічних досліджень та рентгеноспектрального аналізу узгоджуються у певній мірі з деякими подібними роботами. Зокрема, у роботі [115] автори відзначають, що отримані з використанням *E. coli* квантові точки сульфід кадмію мають характерну кристалічну структуру та середній розмір 6 нм. Рентгеноспектральний мікроаналіз зразків наночастинок виявив чіткі сигнали від елементів Cd та S. Сигнал від Cu був зумовлений мідною підкладкою, на яку попередньо нанесено досліджуваний зразок. Слід зазначити, що автори роботи [115] запропонували метод внутрішньоклітинного синтезу наночастинок CdS. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії було підтверджено локалізацію даних наночастинок у цитоплазмі клітин бактерії. Однак, внутрішньоклітинний синтез

вимагає подальшого трудомісткого виділення наночастинок з клітин, що потребує окремої методики [115].

У роботі [117] також описано внутрішньоклітинний біосинтез наночастинок CdS за допомогою *E. coli*. Автори зазначеної роботи встановили, що синтезовані наночастинок CdS є однорідними за розмірами, мають сферичну морфологію, їхній діаметр не перевищує 10 нм. Дифракційні максимуми отриманих квантових точок відповідають стандартній кристалічній структурі, характерній для нанокристалів CdS [117]. У роботі [114] автори використовували для біосинтезу CdS штами ентеробактерій *E. coli* (PTCC 1533) та *Klebsiella pneumonia* (PTCC 1053). У результаті електронно-мікроскопічних досліджень було встановлено, що отримані наночастинок CdS є полідисперсними, мають діаметр у межах від 5 нм до 200 нм [114]. В основі мікробного синтезу квантових точок CdS лежать процеси детоксикації важких металів. Ці процеси, у свою чергу, відбуваються кількома шляхами: позаклітинної біомінералізації, біосорбції, комплексоутворення, осадження або внутрішньоклітинної біоаккумуляції [114]. Позаклітинний спосіб формування квантових точок є більш привабливим у багатьох аспектах. Наночастинок, що отримані позаклітинно, не потребують розробки додаткової методики ізолювання їх з клітин бактерій та подальшого очищення. Крім того, у випадку позаклітинного синтезу наночастинок є більш однорідними за розмірами та формою, що важливо враховувати при їх подальших застосуваннях.

Отже, у результаті здійснення нами позаклітинного синтезу квантових точок сульфїду кадмію доведено, що бактерія *E. coli* є ефективною біологічною матрицею для отримання напівпровідникових наночастинок. Важливо зауважити, що нами не лише синтезовано позаклітинним шляхом квантові точки CdS, а й вперше досліджено їх стабільність. Дані спектрального оптичного аналізу засвідчують, що синтезовані наночастинок CdS зберігають свою стабільність навіть протягом трьох місяців після їх отримання. Також встановлено, що свіжосинтезовані напівпровідникові наночастинок CdS мають розміри у діапазоні 2,5 – 2,6 нм і протягом 10 діб вони об'єднуються у кластери

розміром 5 – 10 нм. Така фракція наночастинок зберігається у вигляді колоїдного розчину протягом 3 місяців без жодних змін люмінесцентних властивостей.

Таким чином, основні результати розділу полягають у наступному:

1. Розроблено та відпрацьовано методику синтезу квантових точок CdS з використанням бактерії *E. coli* за позаклітинним механізмом.
2. У результаті дослідження спектрів поглинання та фотолюмінесценції синтезованих наночастинок CdS, показано, що у спектрах оптичного поглинання спостерігаються максимум на довжині хвилі 430 нм. Особливістю спектрів поглинання наночастинок CdS, синтезованих за допомогою *E. coli* є пік екситонного поглинання (368 нм), який відповідає наночастинкам, меншим за 3 нм.
3. Спектри фотолюмінесценції синтезованих наночастинок CdS мають максимуми в області 422 – 470 нм, які є характерними для квантових точок CdS. Отримані наночастинки зберігають люмінесцентні властивості протягом, трьох місяців після приготування зразків.
4. Досліджено структурно-морфологічні особливості синтезованих наночастинок CdS за допомогою методів TEM та електроннографії. За даними TEM було визначено розподіл квантових точок CdS за розмірами: максимум розподілу наночастинок відповідає розмірам 6 – 8 нм.

Результати представлених досліджень опубліковано в роботі [119].

## РОЗДІЛ 4

### СИНТЕЗ КВАНТОВИХ ТОЧОК CdS, ЗА ВИКОРИСТАННЯ БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА *P. OSTREATUS*

Вищі гриби також розглядають як ефективні «нанофабрики», оскільки вони мають власні ферменти – сульфатредуктази, які при виділенні у середовище, за наявності відповідних солей металів, здійснюють відновлення сульфатних груп, що врешті призводить до отримання наночастинок CdS позаклітинним шляхом. Гриби активно секретують у позаклітинне середовище значну кількість білків у процесі культивування, що сприяє високому виходу наночастинок [120]. Гриби як матриці для синтезу наночастинок мають певні переваги у порівнянні з іншими організмами, оскільки їх 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 [121]. 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 [122]. Було підтверджено, що у процесі синтезу напівпровідникових халькогенідів задіяні білки, які секретуються грибами під час росту. Білки гідролізують прекурсори халькогенідів, а також забезпечують відновлення сульфатних груп, що призводить до формування квантових точок CdS [69].

#### **4.1. Характеристика люмінесцентних властивостей квантових точок CdS, синтезованих за використання *P. ostreatus***

Варто зазначити, що люмінесцентні властивості наночастинок сульфід кадмію значною мірою залежать від стану їхньої поверхні. Це пов'язано з тим, що інтенсивність люмінесценції напівпровідникових наночастинок обумовлена процесами передачі енергії збудження центру люмінесценції. При

цьому можливий процес дисипації даної енергії з поверхні наночастинки в оточуюче середовище [123]. У результаті є ймовірним явище згасання люмінесценції або певна зміна оптичних характеристик. Для мінімізації таких небажаних ефектів необхідно стабілізувати стан поверхні наночастинок. Саме застосування грибного міцелію як матриці для синтезу нанорозмірного CdS створює органічне покриття на поверхні квантової точки, що сприяє максимальній стабілізації даних наночастинок. Загалом, спектри поглинання та люмінесценції квантових точок залежать від ряду факторів: хімічного складу наночастинок, їх розмірів та структури, взаємодії поверхні з оточенням, а також взаємодії окремих наночастинок між собою. На рис. 4.1. наведено спектри поглинання квантових точок CdS, утворених в результаті синтезу за допомогою міцелію гриба *P. ostreatus* (крива 2) та спектри поглинання вихідного розчину, який утворився після культивування зазначеної культури без додавання неорганічних солей CdSO<sub>4</sub> і Na<sub>2</sub>S (крива 1).

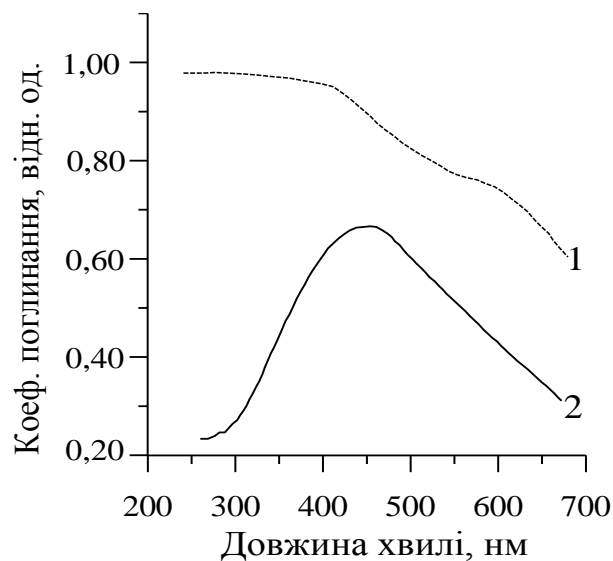


Рис. 4.1. Спектр поглинання 1 – матриці *P. ostreatus*; 2 – спектр поглинання квантових точок CdS, синтезованих за використання *P. ostreatus*

Відомо, що спектроскопія оптичного поглинання є ефективним методом як встановлення самого факту наявності наночастинок у досліджуваних зраз-

ках, так і оцінки розміру цих частинок [124]. Зокрема, відносно великі кристали (>10 нм) характеризуються поглинанням, близьким до монокристалів. Менші наночастинки виявляють блакитний зсув краю поглинання, що відображує варіацію ефективної ширини забороненої зони [125].

Як видно з рисунка 4.1., для квантових точок CdS, отриманих за допомогою біологічних матриць, спектр поглинання має вигляд широкої куполоподібної смуги з максимумом  $\lambda_{\max} \approx 453$  нм. Відзначимо, що для монокристалів ця величина становить  $\approx 515$  нм, у той час як саме для квантових точок CdS з урахуванням «блакитного зсуву» характерним є максимум у межах 450 – 470 нм [45, 114]. Оцінка за формулою (3.1) показує, що максимуму в області 450 нм відповідають наночастинки діаметром 5,0 нм. Те, що смуга є доволі широкою, вказує на певний розкид наночастинок за розмірами. Крім того, важливо, що вказані спектри поглинання принципово відмінні від спектрів поглинання біоматриці *P. ostreatus* (рис. 4.1., крива 1).

Характеризуючи фотолюмінесценцію наночастинок CdS, необхідно відзначити, що зміна розмірів наночастинок в межах 2-10 нм призводить до зміни ширини забороненої зони від 4,3 до 2,5 еВ, а отже, й краю поглинання [126]. Такі зміни ширини забороненої зони істотно впливають на форму та параметри спектрів люмінесценції. На рис. 4.2. наведений спектр фотолюмінесценції, отриманий в нашій роботі при збудженні випромінюванням з довжиною хвилі  $\lambda=340$  нм, для зразків, що містять квантові точки CdS (крива 2), у порівнянні зі спектром фотолюмінесценції розчину матриці *P. ostreatus* (крива 1). Власне свічення матриці характеризується широкою куполоподібною смугою, тоді як люмінесценція синтезованого зразка має суттєво складніший характер. Зокрема, на широкій смузі спостерігаються декілька чітких максимумів при 431, 462, 486, 524 нм, які відповідають екситонним смугам наночастинок різного діаметру. Пік на довжині хвилі 524 нм свідчить про наявність у зразку монокристалів CdS [125]. Було встановлено, що при збудженні  $\lambda = 340$  нм (3,65 еВ), такі максимуми відповідають оптичним перехо-

дам  $1_{se} - 1_{sh}$  між рівнями розмірного квантування у наночастинок CdS різного діаметру [127].

Враховуючи взаємозв'язок між енергією оптичних переходів  $1_{se} - 1_{sh}$  та діаметром наночастинок, який детально проаналізовано у роботі [127], нами показано, що отримані максимуми люмінесценції – 431 нм (2,88 еВ), 462 нм (2,68 еВ) та 486 нм (2,55 еВ) відповідають оптичним переходам, які притаманні наночастинам CdS з діаметром 4,7; 5,2, та 6,8 нм відповідно.

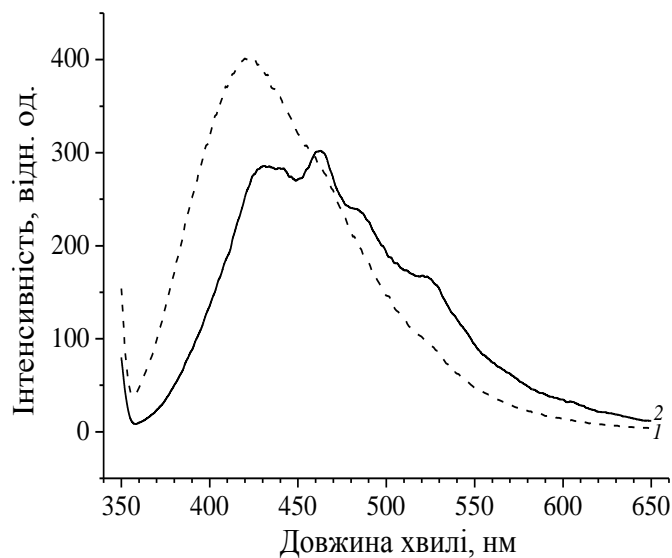


Рис. 4.2. Спектр фотолюмінесценції: 1 – біоматриці *P. ostreatus*; 2 – спектр фотолюмінесценції квантових точок CdS, отриманих за допомогою біоматриці *P. ostreatus*

Крім того, варто зазначити, що у спектрах люмінесценції хімічно синтезованих наночастинок спостерігаються деякі відмінності від спектрів люмінесценції біосинтезованих наночастинок, отриманих у нашій роботі. Зокрема, автори роботи [128] виявили особливості спектру люмінесценції наночастинок сульфїду кадмію, отриманих методом хімічного осадження, при збудженні на довжинах хвиль 300 (4,1 еВ), 240 (5,1 еВ) та 230 нм (5,4 еВ). У спектрах, що походять від більш високих енергій збудження (230 нм, 240 нм) спостерігалася широка смуга з центральним піком у зеленому діапазоні при

519 нм. Додатково на цій смузі спостерігали бічні максимуми у короткохвильовому діапазоні на довжинах хвиль 493, 482, 470 та 450 нм. Збудження зразка наночастинок при 300 нм виявилось неефективним, оскільки спектр характеризувався низькою інтенсивністю [128]. В іншій роботі [129] напівпровідникові наночастинки CdS також синтезували методом хімічного осадження, однак, з використанням тіофенолу як стабілізуючого агента. Авторами було встановлено, що розмір таких наночастинок у середньому складає 2,52 нм. Було показано, що при збудженні ультрафіолетом з довжиною хвилі  $\lambda = 328$  нм спостерігаються максимум люмінесценції на довжині хвилі  $\lambda = 410$  нм. Тобто, на характер спектру люмінесценції суттєво впливає енергія випромінювання, яке збуджує фотолюмінесценцію досліджуваного зразка [129].

Якщо співставити отримані нами результати оптичного аналізу з оптичними характеристиками біологічно синтезованих квантових точок CdS, визначеними у роботах інших авторів, то можна простежити узгодження цих даних. Наприклад, у роботі [130] автори використовували як матрицю для синтезу квантових точок CdS гриб *Phanerochaete chrysosporium*. Отримані квантові точки у середньому мали розміри 2,56 нм. Для таких дрібних частинок був характерним зсув краю поглинання до короткохвильового діапазону. А саме, максимум поглинання відповідав довжинам хвиль 296 – 298 нм. Крім того, у спектрі фотолюмінесценції спостерігався характерний максимум при 458 нм. Така інтенсивна блакитна люмінесценція є типовою для квантових точок CdS розмірами до 5 нм. Варто відзначити, що отримані квантові точки, завдяки біологічному синтезу виявилися надзвичайно стабільними, без ознак агрегації протягом 2 місяців після синтезу [130]. Отримані нами оптичні характеристики наночастинок узгоджуються з роботою [71], у якій для біосинтезу наночастинок CdS використовували гриб *Coriolus versicolor*. Аналіз спектрів фотолюмінесценції показав, що при збудженні випромінюванням  $\lambda = 300$  нм для синтезованих наночастинок характерний максимум люмінесценції при 450 нм. У спектрах також зафіксували появу плеча інтенсивності в обла-



сті 500 нм, що пояснюється особливостями внутрішнього характеру даних наночастинок [71].

#### **4.2. Структурно-морфологічні особливості квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *P. ostreatus***

Найбільш розповсюдженим та точним методом оцінки розмірів квантових точок сульфід кадмію є пряма візуалізація їх структури за допомогою електронної мікроскопії (як скануючої, так і просвічувальної). Даний метод дозволяє визначити не лише розподіл за розмірами, але й оцінити ступінь агрегації наночастинок [127, 112]. Достовірність отриманих результатів щодо розмірів квантових точок можна підтвердити, спираючись на аналіз спектрів їхнього поглинання та люмінесценції. У комплексі ці методи найбільш точно характеризують морфологічні та структурні особливості синтезованих квантових точок CdS. Тому за допомогою методу просвічувальної електронної мікроскопії високого розділення нами було встановлено, що окремі квантові точки CdS мають сферичну або еліптичну форму та однорідну структуру поверхні. Нами встановлено, що діаметр синтезованих квантових точок знаходиться в межах від 4 до 7 нм (рис. 4.3). Отримані дані щодо розмірів наночастинок сульфід кадмію добре узгоджуються з результатами оптичного аналізу досліджуваних зразків. Як зазначалося, попередній аналіз спектрів люмінесценції підтверджує, що розміри отриманих напівпровідникових наночастинок знаходяться у діапазоні 4,7 нм – 6,8 нм. Крім того, важливо відмітити, що на рис. 4.3 (а) стрілками позначено структуру кристалічної ґратки, яка характерна саме для квантових точок CdS.

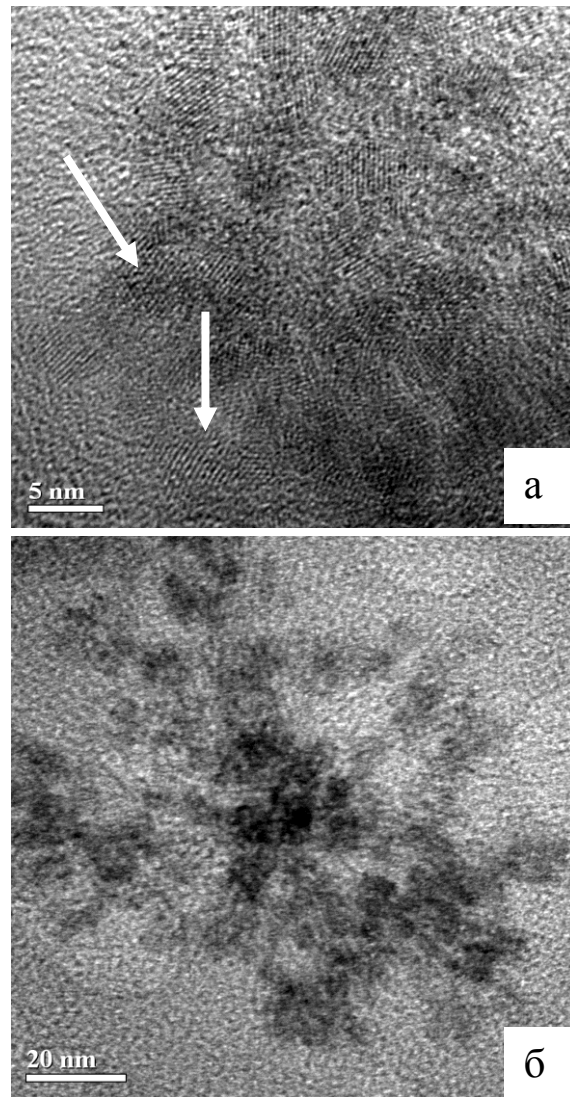


Рис. 4.3. Електронні мікрофотографії синтезованих квантових точок CdS, за використання *P. ostreatus*: а – структура кристалічної ґратки при масштабі 5 нм; б – морфологія окремих квантових точок при масштабі 20 нм

Використовуючи дані TEM, нами було побудовано діаграму розподілу наночастинок за розмірами (рис. 4.4). Встановлено, що максимум розподілу припадає на частинки з діаметром в інтервалі 4,0 – 5,5 нм. Частка зазначених наночастинок становила разом 56%. Діапазон розмірів наночастинок CdS у полі зору складав 2 – 9 нм. При цьому частка квантових точок діаметром 2 –3 нм становила близько 5 %.

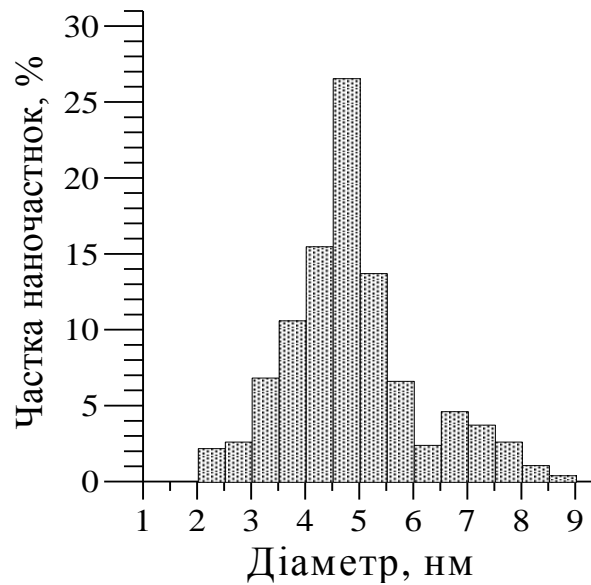


Рис. 4.4. Розподіл за розмірами квантових точок CdS, що синтезовані з використанням *P. ostreatus*

#### 4.3. Електронографія та елементний рентгеноспектральний мікроаналіз синтезованих квантових точок CdS

За допомогою методу електронографії нами було отримано електронограми зразків квантових точок CdS, синтезованих з використанням *P. ostreatus*. Отримана електронограма наведена на рис. 4.5.

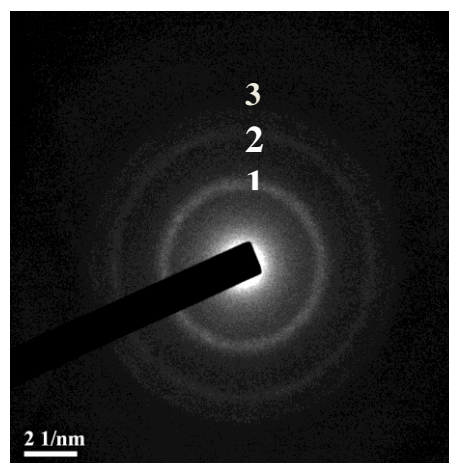


Рис. 4.5. Електронограма синтезованих квантових точок CdS, синтезованих за використання *P. ostreatus*

Отримані результати рентгеноспектрального аналізу свідчать про наявність в зразках елементів Cd та S, вміст яких у полі зору становить 26-29 % (об'ємна концентрація) (табл. 4.1). Крім того, слід відмітити, що в полі зору були наявні й інші елементи, зокрема O (39,24 %), Si (1,53 %), Fe (0,52 %), P (3,62 %). Їх присутність зумовлена передусім біологічною активністю культури гриба *P. ostreatus*, який забезпечує формування нанорозмірного CdS.

Таблиця 4.1

Елементний рентгеноспектральний мікроаналіз отриманих за допомогою *P.ostreatus* квантових точок CdS, %

O	Fe	P	S	Si	Cd
39,24	0,52	3,62	29,17	1,53	26,66

Результати електронографії та елементного рентгеноспектрального мікроаналізу наночастинок CdS, отриманих у нашій роботі, узгоджуються з роботами, які присвячені особливостям біосинтезу зазначених наночастинок з використанням грибів. Зокрема, автори роботи [130] показали, що квантові точки сульфїду кадмію, отримані з використанням *P. chrysosporium* мають характерну кубічну кристалічну структуру. А саме, на електронограмі спостерігалися широкі піки при 26,58°, 43,968°, 52,138°, що відповідають площинам (111), (220) та (311) кубічної кристалічної ґратки, притаманної квантовим точкам CdS. Середній розмір даних наночастинок становив 2,56 нм [130]. Крім того, у дослідженні [131], де для синтезу наночастинок CdS використовували нижчий гриб *Aspergillus versicolor*, було встановлено, що розмір отриманих наночастинок не перевищував 3 нм. Також в зазначеній роботі досліджували елементний склад отриманих зразків. Автори показали, що у зразках крім основних елементів Cd та S були наявні такі хімічні елементи, як C, N, O, Na, Ca. Їх наявність можливо зумовлена карбоксильними групами та білковими молекулами, що оточували поверхню грибного міцелію *A. versicolor* [131]. У роботі з біосинтезу CdS за допомогою *F. oxysporum* також було виявлено схожі характеристики даних наночастинок. Зокрема, їх розмір

знаходився у межах 5 – 20 нм. Метод електроннографії дозволив виявити і наночастинки CdS з гексагональною структурою [69].

Таким чином, основні результати розділу полягають у наступному:

1. Вперше розроблено методику синтезу квантових точок CdS за допомогою базидіального гриба *P. ostreatus* за позаклітинним механізмом.
2. Досліджено оптичні властивості синтезованих квантових точок. Показано, що у спектрах оптичного поглинання спостерігається максимум на довжині хвилі 453 нм, які характерні для систем наночастинок розміром 4,5 нм – 5,5 нм. Спектри фотолюмінесценції синтезованих наночастинок CdS мають максимуми у діапазоні 430 – 486 нм.
3. За допомогою методів TEM та електроннографії досліджено структурно-морфологічні особливості синтезованих наночастинок CdS та встановлено, що максимум розподілу відповідає наночастинкам діаметром 4 – 5,5 нм.

Результати представлених досліджень опубліковано у роботах [132, 133].

## РОЗДІЛ 5

### СИНТЕЗ КВАНТОВИХ ТОЧОК CdS, ОТРИМАНИХ ЗА ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИННИХ МАТРИЦЬ

На сьогоднішній день напівпровідникові наночастинки знаходять широке застосування у багатьох галузях біотехнології, фізики та оптоелектроніки. Неодноразово підтверджено, що розміри досліджуваних наночастинок визначають їхні властивості [134,135]. Сульфід кадмію є напівпровідником II-VI груп періодичної системи з енергією забороненої зони 2,42 eV [136]. За умови набуття нанометрових розмірів цей матеріал знаходиться на проміжному рівні між атомним, молекулярним та рівнем монокристалів, виявляючи нові фізичні властивості [135]. Макроскопічні фізичні властивості наночастинок CdS та нанокристалів, діаметр яких не перевищує 10 нм відповідають законам квантової механіки. Просторове обмеження наночастинок впливає на довжину хвилі електронів, зменшуючи її у порівнянні з монокристалами. Дане явище визначають як квантово-розмірний ефект [136]. Квантові точки CdS є надзвичайно перспективними для використання у фотохімічному каталізі, як елементи сонячних батарей, різного роду люмінесцентних приладів, а також як флуоресцентні зонди для дослідження структури ДНК або локалізації окремих білків у клітині [137].

Слід відзначити, що деякі живі організми мають унікальний потенціал щодо формування та накопичення наночастинок різного хімічного складу, форми та розмірів. Однак, дослідження механізмів утворення наночастинок, зокрема, особливостей ферментативних процесів, до недавнього часу було сфокусовано лише на мікроорганізмах, а саме на плісневих грибах та дріжджах [56, 69, 138]. Між тим, нещодавно було показано, що рослини мають певні переваги перед мікроорганізмами, які стосуються синтезу наночастинок. Рослинний матеріал більш доступний для лабораторного впровадження, безпечний, крім того, містить значну кількість вторинних метаболітів: алкалоїдів, терпеноїдів, фенолів, флаваноїдів, які опосередковують процес біоло-

гічного синтезу наночастинок [139]. Тому, досить новим та малодослідженим підходом вважають синтез наночастинок сульфід кадмію з використанням рослинних об'єктів як нанофабрик. Зараз існує недостатньо даних щодо взаємодії між рослинними біомолекулами та іонами  $\text{Cd}^{2+}$ . Отже, важливо зрозуміти особливості процесу і методології біологічного синтезу квантових точок CdS, що відбувається за участі рослинних матриць. Тому, метою наступного етапу наших досліджень було розробити та відпрацювати методику позаклітинного, легко відтворюваного синтезу квантових точок сульфід кадмію з використанням культури «бородатих» коренів *Linaria maroccana* та суспензійної культури *Nicotiana tabacum* (BY-2), а також дослідити їх оптичні та структурно-морфологічні властивості.

### **5.1. Аналіз оптичних властивостей квантових точок CdS, синтезованих за використання *L. maroccana***

Як вже зазначалося, максимум в спектрі оптичного поглинання для монокристалів CdS знаходиться у межах 515 – 520 нм [124, 125]. За умови зменшення діаметру частинок CdS до 1 – 10 нм проявляється квантово-розмірне уширення забороненої зони матеріалу напівпровідника. Як відзначалося, це призводить до «блакитного» зсуву у спектрах поглинання наночастинок CdS [111, 140]. Саме «блакитний» зсув свідчить про наявність наночастинок у системі [113]. Спектр оптичного поглинання отриманих нами квантових точок CdS, синтезованих з використанням *Linaria maroccana* L, характеризувався двома чіткими максимумами та протяжною структурою в інтервалі між ними (рис. 5.1). Для коректного визначення довжин хвиль, що відповідають центрам таких максимумів, було виконано поділ спектру на три компоненти, форма яких описувалася функцією Лоренца (рис. 5.1, пунктирні криві). При варіюванні пікові інтенсивності, ширини та положення максимумів компонентів були змінними. Загальний синтезований спектр представлено на рис. 5.1.

пунктирною лінією. Виявлено, що центрам трьох піків відповідають довжини хвиль 362, 398 та 464 нм.

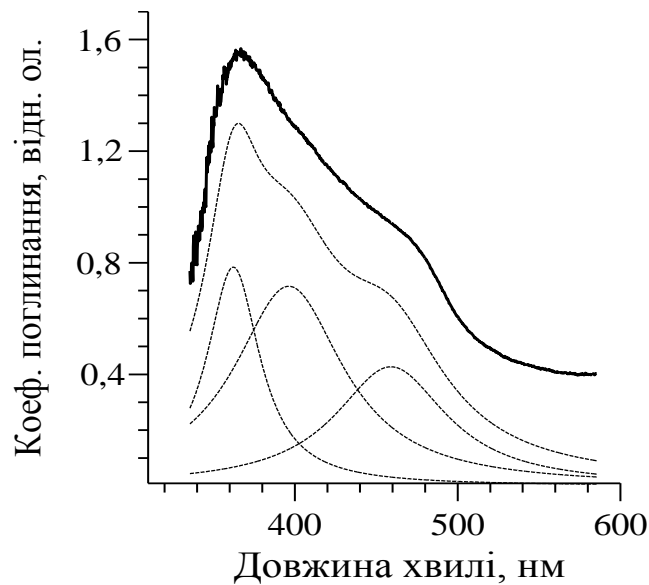


Рис. 5.1. Спектр поглинання квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *L. tarosana*. Складові спектру (штрихові лінії) – лоренціани

За формулою (3.1) оцінювали діаметр отриманих квантових точок. Встановлено, що піку на довжині хвилі 362 нм відповідає фракція наночастинок розміром 2,5 нм. Максимуму при 398 нм відповідає фракція частинок, діаметр яких 3,4 нм, а максимуму поглинання при 464 нм відповідає фракція наночастинок з діаметром 6,0 нм. Відзначимо, що такий результат добре корелює з розподілом наночастинок за розмірами, отриманим за допомогою ТЕМ. Варто відмітити, що характер спектрів поглинання та люмінесценції напівпровідникових наночастинок залежить від хімічного складу наночастинок, їх розмірів та особливостей поверхні. Зокрема, було показано, що більшість поверхневих дефектів наночастинок, а саме, сторонні адсорбовані атоми або точкові дефекти структури можуть виступати в ролі потенціальних ям або бар'єрів для дірок й електронів [123].

Спектр люмінесценції синтезованих наночастинок CdS ілюструє рис. 5.2, який відповідає збудженню свіжосинтезованого зразка випроміненням ртутної лампи з довжиною хвилі  $\lambda = 340$  нм. Наведений спектр є типовим для



квантових точок CdS, що отримані біологічним методом синтезу [75, 141]. Він містить три помітних максимуми, що перекриваються. Як і у випадку спектрів поглинання, для коректного визначення довжин хвиль, які відповідають положенням центрів таких максимумів, було виконано поділ спектрального масиву на три компоненти (штрихові лінії на рис. 5.2). Форма компонентів також описувалася функцією Лоренца; ширини, пікові інтенсивності та положення центрів компонентів варіювалися в процесі підгонки (синтезований спектр наведено на рис. 5.2. штриховою лінією). Показано, що центрам максимумів компонентів відповідають довжини хвиль 425 нм, 462 нм та 500 нм.

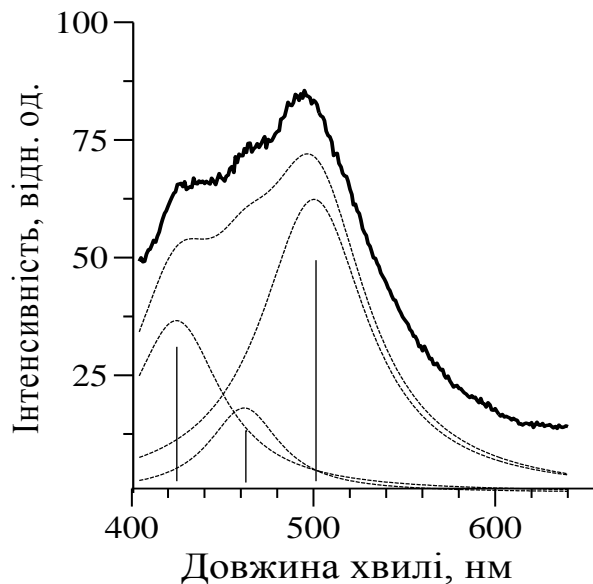


Рис. 5.2. Спектр фотолюмінесценції квантових точок CdS. Складові спектру (штрихові лінії) – лоренціани

Можна вважати, що при збудженні випромінюванням  $\lambda = 340$  нм (3,65 eV) такі максимуми відповідають оптичним переходам типу  $1_{se} - 1_{sh}$  між рівнями розмірного квантування в наночастинках CdS різного діаметру. Використовуючи зв'язок між енергією оптичного переходу  $1_{se} - 1_{sh}$  та діаметром наночастинок CdS, встановлений в роботі [127], виявлено, що максимумам 425 (2,92 eV), 462 (2,68 eV) та 500 нм (2,48 eV) відповідають переходи

$I_{se} - I_{sh}$  в наночастинках CdS діаметром 3,8, 5,2 та 6,9 нм. Крім того, той факт, що спектр в області 460 – 500 нм є достатньо широким, якраз і вказує на наявність у синтезованому зразку значної кількості наночастинок CdS діаметром від 5 до 7 нм.

Отримані результати оптичного аналізу можна співставити, передусім, з даними роботи [75], яка також присвячена синтезу наночастинок CdS з використанням рослинної матриці. У даній статті використовували екстракт з листя, *Asparagus racemosus*, який був основою синтезу та відігравав роль стабілізуючого агента. При дослідженні спектрів поглинання автори спостерігали зазначений вище «блакитний» зсув у діапазоні 290 нм, 350 нм. Поява максимуму при 320 нм свідчила про певну неоднорідність наночастинок за розмірами у процесі синтезу [75]. У той же час, у спектрі фотолюмінесценції спостерігався характерний для квантових точок CdS максимум на довжині хвилі 495 нм. Результати, отримані в роботі [75], добре узгоджуються з нашими даними оптичних досліджень. Крім того, автори роботи [142] при використанні рослинного екстракту для отримання наночастинок CdS виявили, що у спектрі поглинання спостерігається протяжний максимум в області 410 нм – 490 нм. Спектри люмінесценції характеризуються високою інтенсивністю та мають гострий максимум на довжині хвилі 489 нм [142]. Зазначені особливості спектрів поглинання та люмінесценції підтверджують наявність в отриманому зразку наночастинок сульфїду кадмію. Слід відмітити, що отримані нами результати оптичного аналізу зразків CdS, які синтезовані за допомогою *L. taroccana* як матриці підтверджуються також результатами роботи [143], що присвячена особливостям біосинтезу наночастинок сульфїду кадмію на основі рослинного екстракту. Авторами було зафіксовано характерний максимум поглинання на довжині хвилі 484 нм (2,57 eV), що відповідає присутності у синтезованому зразку нанорозмірних частинок сульфїду кадмію.

В іншій роботі [144] автори використовували для внутрішньоклітинного біосинтезу CdS культуру «бородатих» коренів *Solanum lycopersicum*. Встано-

влено, що зазначена рослинна система забезпечує формування наночастинок CdS, які мають підвищену фотостабільність та інтенсивність флуоресценції у порівнянні з культурою дріжджів як матрицею для синтезу такого типу наночастинок. Водночас, у роботі показано, що для квантових точок, отриманих при використанні «бородатих» коренів, спостерігаються характерні максимуми поглинання (270 – 280 нм), а також максимуми люмінесценції у діапазоні 420 – 480 нм (довжина хвилі збуджуючого випромінювання  $\lambda = 320$  нм). При цьому розміри синтезованих наночастинок знаходяться у межах 4 – 10 нм і є дещо більшими за наночастинки, отримані при використанні інших культур, зокрема, дріжджів. Отже, в даній роботі підтверджено, що культура «бородатих» коренів є ефективною біологічною матрицею для синтезу квантових точок CdS, які характеризуються підвищеним квантовим виходом флуоресценції та підвищеною фотостабільністю [144].

## **5.2. Структура та морфологія квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *L. maroccana***

За допомогою методу TEM нами було досліджено форму синтезованих наночастинок CdS та їх розподіл за розмірами. Характерні електронні мікрофотографії представлено на рис. 5.3 (а, б). За даними електронної мікроскопії було виявлено, що отримані наночастинки мають еліптичну та наближену до сферичної форму і не містять значних дефектів структури поверхні. При побудові діаграми розподілу наночастинок за розмірами загальна кількість обрахованих наночастинок у полі зору становила 305. Досліджуваний об'єм зразка складав 50 мкл.

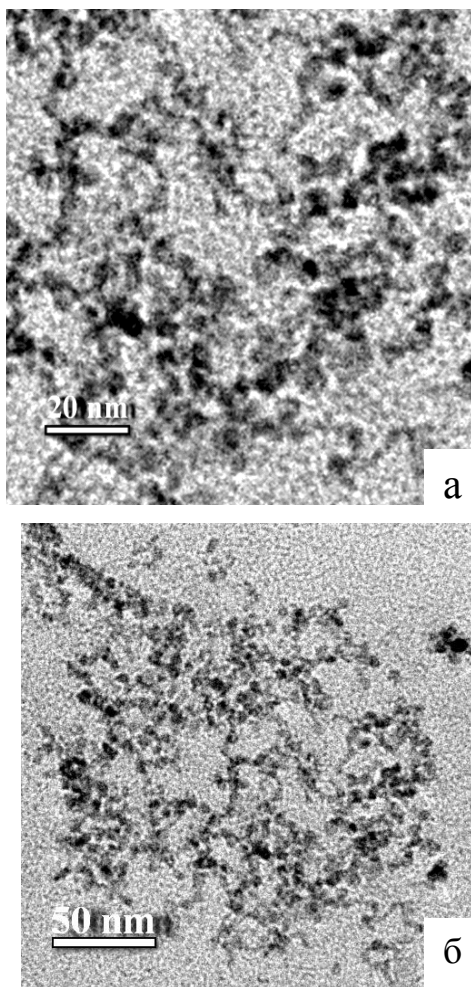


Рис. 5.3. Електронні мікрофотографії синтезованих квантових точок CdS, за використання *L. taroccana*: а – морфологія окремих квантових точок при масштабі 20 нм; б – квантові точки при масштабі 50 нм

З діаграми (рис. 5.4) випливає, що у досліджуваному зразку переважає фракція наночастинок діаметром 5,5 – 6,5 нм, частка яких у полі зору становила 30 %. Також спостерігалася значна кількість наночастинок діаметром 2,0 – 5,5 нм. Процентний вміст зазначених наночастинок разом становив близько 61 % (рис. 5.4). Найменша за кількістю фракція квантових точок відповідає розмірам 7,0 – 8,5 нм. Загалом частка наночастинок зазначеного діаметру була в межах 6 %. Важливо зазначити, що оцінка розмірів наночастинок, синтезованих з використанням культури *L. taroccana*, яка виконана за структурою спектрів поглинання, добре корелює з даними TEM-розподілу частинок за розмірами. Зокрема, наявність у спектрі поглинання трьох максимумів

мів, яким відповідають наночастинки діаметром 2,5, 3,4 та 6,9 нм, узгоджується з широким розподілом (рис. 5.4), який відображує присутність фракцій у діапазоні розмірів 2 – 7 нм.

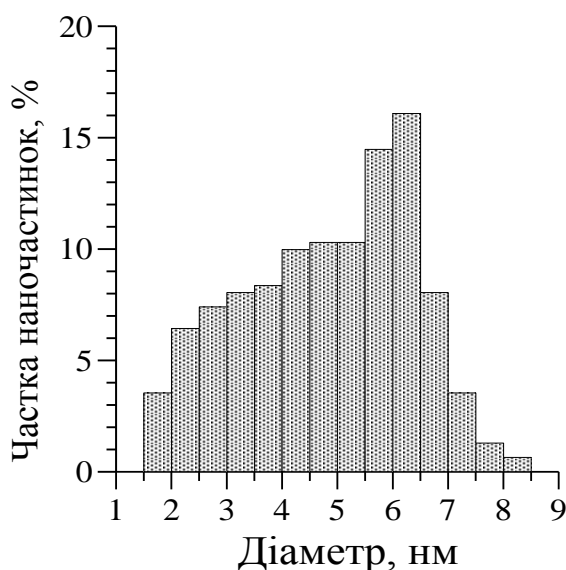


Рис. 5.4. Розподіл за розмірами квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *L. maroccana*

Отримані результати структурно-морфологічних досліджень можна порівняти з даними роботи [75], де автори підтверджують, що для наночастинок CdS, що отримані за допомогою рослинного екстракту, характерні розміри знаходяться у межах від 2 до 8 нм; наночастинки мають кубічну кристалічну структуру, про що свідчать значення міжплощинних відстаней [75]. Крім того, з отриманими нами результатами узгоджуються і дані роботи [145], в якій наночастинки CdS, синтезовані з використанням рослинного екстракту, мали виражену сферичну форму, середній діаметр 2,7 нм та характерну кристалічну структуру. У порівнянні з іншим дослідженням, у якому наночастинками CdS були синтезовані хімічним шляхом, з використанням поліетиленеміна як стабілізуючого агента, було показано, що розміри наночастинок становлять 2 – 4 нм, проте, без застосування хімічного стабілізатора вони утворюють щільні агрегати [146].

### 5.3. Електроннографія та локальний рентгеноспектральний аналіз квантових точок CdS, синтезованих за використання *L. maroccana*

Методом електроннографії були отримані електроннограми зразків CdS. Типова електроннограма наведена на рис. 5.5. Представлені дифракційні максимуми 1, 2 відповідають міжплощинним відстаням 0,338 нм та 0,184 нм (відбивання від атомних площин (110) та (103)), що узгоджується з даними [118]. Вказані міжплощинні відстані відповідають кристалам CdS, структурна модифікація вюрцит.

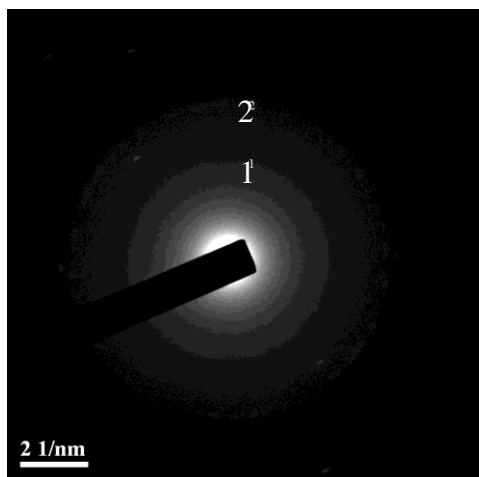


Рис. 5.5. Електроннограма синтезованих квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *L. maroccana*

Було проведено рентгеноспектральний аналіз отриманих нами зразків наночастинок CdS. Показано, що у синтезованих зразках спостерігається високий вміст елементів Cd та S, а також наявні елементи F, Si (рис. 5.6). Процентний вміст елементів Cd та S у полі зору знаходився у межах 23 – 28 %. У той час, як вміст фтору, кремнію та кисню складав 19, 3,65 та 26,19 % (Додаток Б). Порівнюючи отримані результати з роботою [75], можна підтвердити, що у досліджуваних зразках переважає вміст кадмію та сірки. Крім того, автори роботи [75] показали, що у зразках містились також O (11 %), Na (8 %), Cl (6 %), C (3 %). Наявність додаткових хімічних елементів є невід’ємною

складовою процесу біосинтезу наночастинок. Саме взаємодія між функціональними групами, які входять до складу рослинних екстрактів, та іонами кадмію, що вносяться у реакційне середовище як зовнішнє джерело цього елемента, призводить до формування стабільних наночастинок CdS [75].

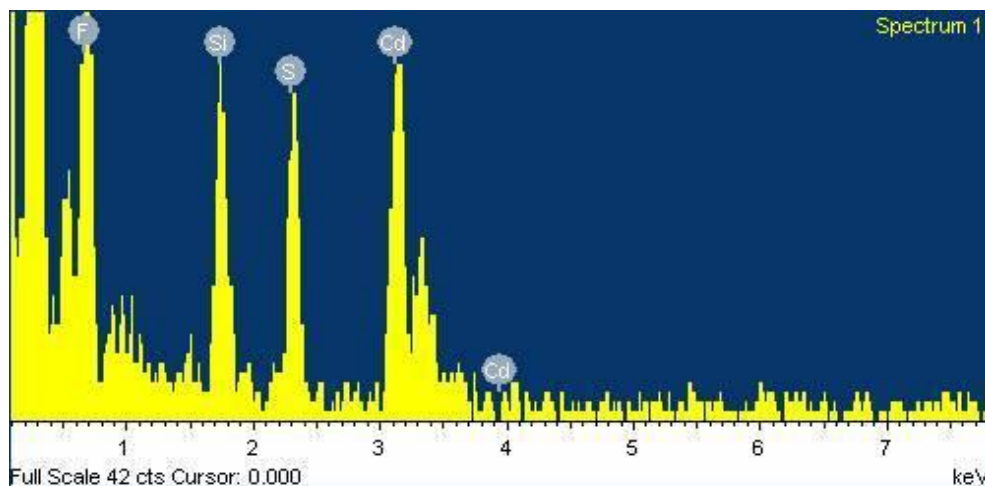


Рис. 5.6. Рентгенівський емісійний спектр квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *L. maroccana*

Таким чином, нами вперше здійснено синтез квантових точок CdS за використання культури коренів *L. maroccana*. Обрана матриця характеризується швидким приростом біомаси *in vitro*, а також через значну кількість вторинних метаболітів, що секретуються у позаклітинне середовище під час культивування, і які, ймовірно, беруть участь у формуванні та стабілізації квантових точок CdS.

#### 5.4. Особливості оптичних характеристик квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *N. tabacum* (BY-2)

На рис. 5.7 представлено спектр оптичного поглинання зразків, синтезованих за допомогою суспензійної культури *N. tabacum* (BY-2). Пік поглинання отриманих квантових точок лежить у короткохвильовій області спектру і відповідає довжині хвилі 292 нм. Даний максимум отримано шляхом ви-

окремлення монотонно спадаючого фону (рис. 4.7, крива 2) з експериментального контуру (рис. 5.7, крива 3). Оцінка діаметру наночастинок CdS, виконана за емпіричною формулою (3.1) дає значення 1,5 нм.

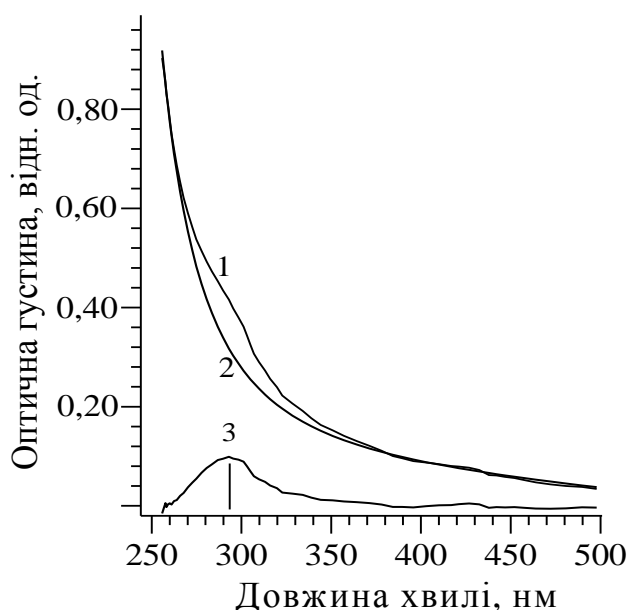


Рис. 5.7. Спектр поглинання квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *N. tabacum* (BY-2): 1 – експериментальний контур; 2 – монотонно спадаючий фон; 3 – максимум поглинання синтезованих квантових точок CdS (292 нм)

Варто підкреслити, що отримані дані корелюють з результатами роботи [75], у якій, як відзначалося, квантові точки CdS отримано за використання рослинного екстракту *A. racemosus*. Зокрема, у спектрі поглинання було зафіксовано максимум на довжині хвилі 290 нм [75]. Крім того, в іншій роботі [147] представлено синтез квантових точок CdS *in vitro* з використанням сульфитредуктаза у присутності ко-фактору  $\alpha$ -NADPH та фітохелатинів. Відповідно до [70], сульфитредуктаза була виділена з живильного середовища, в якому культивували гриб *Fusarium oxysporum*. Результати оптичного аналізу підтвердили, що у спектрі поглинання спостерігається характерний для даних квантових точок максимум на довжині хвилі 340 нм. При цьому також була зафіксована смуга поглинання у діапазоні 260 нм – 270 нм. Автори [147]



припускають, що наявність такої смуги зумовлена саме активністю відповідних ферментів, які входять до складу реакційного середовища і забезпечують формування наночастинок. Утворений розчин наночастинок виявився надзвичайно стабільним, без ознак агрегації частинок щонайменше протягом 1 місяця після їх синтезу. Важливо, що за відсутності сульфїтредуктаз та  $\alpha$ -NADPH не спостерігався зазначений пік при 340 нм. Отже, це дозволяє зробити висновок, що в основі утворення наночастинок сульфїду кадмію лежать окисно-відновні реакції, які відбуваються під дією вказаних ферментів. При цьому сформовані кристали CdS залишалися у наномасштабі завдяки наявності білків фітохелатинів, які перешкоджали нарощуванню та агрегації цих кристалів. Показано, що фітохелатини є короткими пептидами, що діють як стабілізуючі агенти під час синтезу наночастинок CdS [148].

Спектр фотолюмінесценції матриці *N. tabacum* (BY-2, а також спектр люмінесценції утворених квантових точок CdS представлено на рис. 5.8 (а,б). Отримані спектри люмінесценції було поділено на чотири спектральні компоненти, які описуються функціями Лоренца (штрихові лінії, рис. 5.8). З рисунка 5.8 випливає, що спектри люмінесценції квантових точок CdS відрізняються від спектру вихідної культури тютюну. У спектрі люмінесценції наночастинок спостерігається наявність плеча інтенсивності у діапазоні 380 – 400 нм. Спектр люмінесценції квантових точок також було поділено на спектральні компоненти. Було виділено максимум люмінесценції (крива 3, рис. 5.8б), який відповідає довжині хвилі  $\lambda = 381$  нм і характеризує люмінесценцію саме отриманих квантових точок (3,25 eV). Відомо, що при такій довжині хвилі пік люмінесценції відповідає оптичним переходам  $1_{se} - 1_{sh}$  між рівнями розмірного квантування у наночастинках CdS різного діаметру. Використовуючи зв'язок між енергією оптичних переходів  $1_{se} - 1_{sh}$  і діаметром наночастинок, встановлений у роботі [127], нами було визначено, що при енергії фотона 3,25 eV діаметр наночастинок складає 3,4 – 3,5 нм.

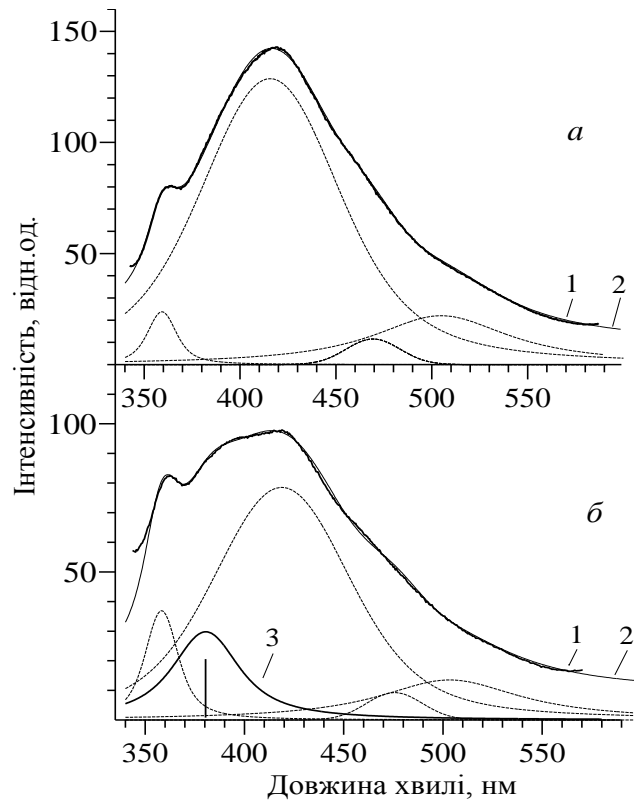


Рис. 5.8. Спектр фотолюмінесценції: а – матриці культури ВУ-2; б – спектр люмінесценції квантових точок CdS, синтезованих за допомогою ВУ-2

Таким чином, підтверджується висновок про деякий зсув максимуму люмінесценції до більш довгохвильового діапазону внаслідок збільшення розмірів квантових точок CdS [149].

### 5.5. Аналіз структурно-морфологічних особливостей квантових точок CdS, синтезованих за використання *N. tabacum* (ВУ-2)

Метод трансмісійної електронної мікроскопії підтвердив формування квантових точок CdS у досліджуваних зразках. Для утворених наночастинок властива переважно сферична морфологія та однорідність – рис. 5.9. (а,б). Поверхня наночастинок не мала помітних структурних дефектів. На основі даних ТЕМ було побудовано діаграму розподілу наночастинок за розмірами.

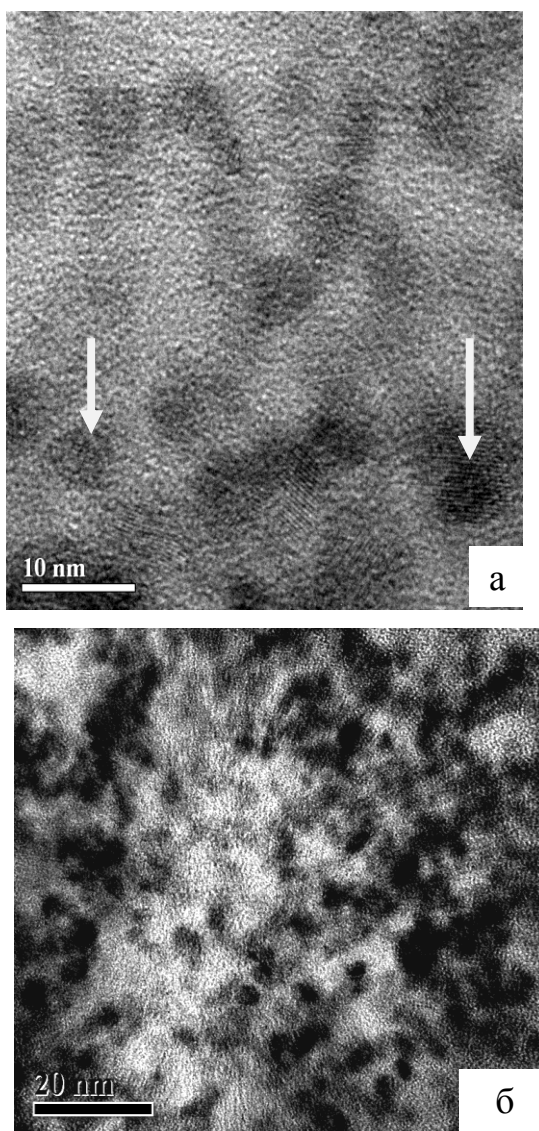


Рис. 5.9. Електронні мікрофотографії квантових точок CdS, синтезованих за допомогою ВУ-2: а – структура кристалічної ґратки при масштабі 10 нм; б – морфологія окремих квантових точок CdS при масштабі 20 нм

Загальна кількість обрахованих наночастинок у полі зору складала 243 (рис. 5.10). З діаграми випливає, що максимум розподілу наночастинок за розмірами припадає на область 3 – 4 нм. У сумі частка наночастинок такого діаметру становила 49 %. У той же час, кількість наночастинок меншого діаметру (1,0 – 2,5 нм) у процентному відношенні складала у сумі 6 %. Частка квантових точок, розміри яких 5 – 7 нм, у синтезованому зразку становила близько 12 %. Зауважимо, що як і у випадку з наночастинками, синтезованими з ви-

користанням *E. coli*, спостерігається певна відмінність оцінок розмірів наночастинок за спектрами поглинання та TEM-розподілом. Зокрема, за даними спектрів поглинання характерні розміри наночастинок складають 1,5 нм, у той час як TEM-розподіл мав максимум в області 3 – 4 нм.

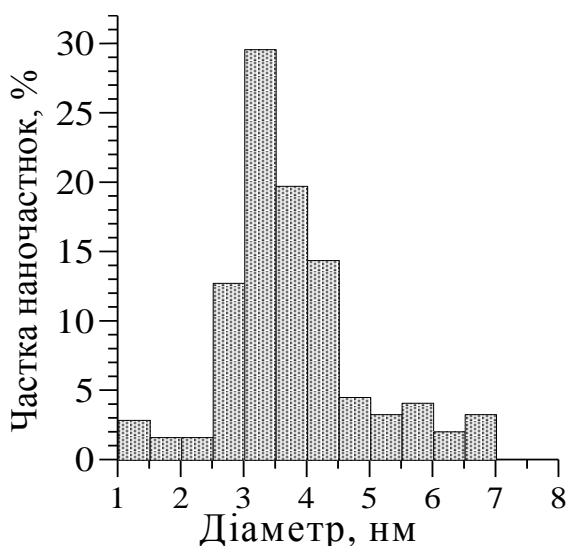


Рис. 5.10. Розподіл за розмірами квантових точок CdS, що синтезовані за використання ВУ-2

Отримані результати можна співставити з роботою [150], що присвячена особливостям біосинтезу CdS за використання бактерії *Stenotrophomonas maltophilia*. У зазначеній роботі автори дійшли висновку, що для синтезованих наночастинок характерна структура кристалічної ґратки, що відповідає структурній модифікації вюрцит нанокристалів CdS. Крім того, виходячи з даних TEM, було показано, що для отриманих квантових точок характерна сферична форма та середній розмір у межах 2,8 нм – 3,4 нм [150]. Крім того, результати TEM можна порівняти також з роботою [145], у якій для утворення стабільних квантових точок CdS було використано рослинний екстракт. Автори підтверджують, що рослинна фітоємність дозволяє отримувати наночастинки розмірами 2,3 – 3,2 нм [145].

## 5.6. Електроннографія та елементний рентгеноспектральний мікроаналіз квантових точок CdS, синтезованих за допомогою ВУ-2

За допомогою методу електроннографії було отримано електроннограми зразків квантових точок CdS (рис. 5.11). Дифракційні максимуми 1,2,3 відповідали міжплщинним відстаням 0,334, 0,205 та 0,188 нм, що узгоджується з даними [118] і свідчить про гексагональну структуру нанокристалів сульфїду кадмію (вюрцит).

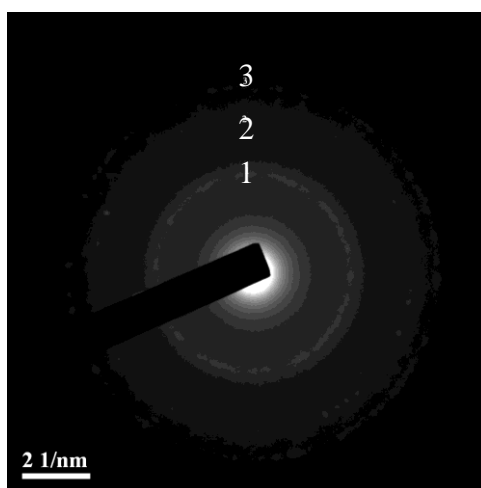


Рис. 5.11. Електроннограма квантових точок CdS, синтезованих за допомогою ВУ-2

Крім того, нами було здійснено рентгеноспектральний аналіз отриманих зразків наночастинок. Показано, що переважаючими у зразку є елементи Cd та S (рис. 5.12). Присутність атомів Na у досліджуваному зразку можна пояснити як побічний продукт хімічної реакції, оскільки Na входить до складу солі  $\text{Na}_2\text{S}$ , що залучена до біосинтезу CdS як зовнішнє джерело сірки. Наявність атомів K та Cl, ймовірно, спричинена виділенням у позаклітинне середовище біологічних компонентів клітин суспензійної культури тютюну.

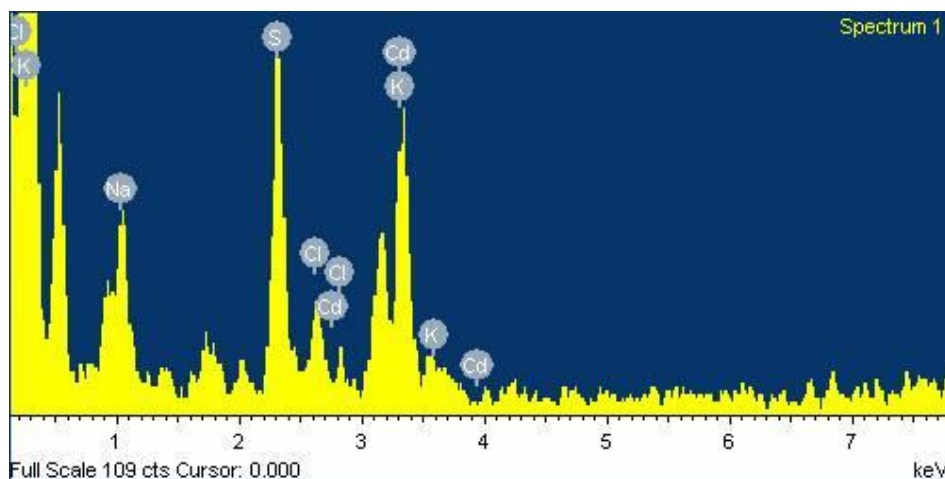


Рис. 5.12. Елементний рентгеноспектральний мікроаналіз зразків квантових точок CdS, синтезованих за допомогою BY-2

Як зазначалося, додаткові неорганічні елементи є невід’ємною складовою процесу біосинтезу квантових точок. Однак, слід враховувати, що неорганічні домішки впливають на чистоту зразка, тому для подальших застосувань утворених наночастинок CdS краще мінімізувати наявність сторонніх елементів. У нашому дослідженні показано, що вміст елементів кадмію та сірки становить 27,2 % та 24,5 %. Тоді як вміст натрію, хлору та калію загалом знаходиться у межах 18 %. Отримані дані електронографії та рентгеноспектрального аналізу можна співставити з роботою [147], у якій наводиться синтез наночастинок CdS, опосередкований ферментами сульфїтредуктазами. Відповідно до отриманих електронограм, спостерігали дифракційні максимуми від сімейств площин (111), (101), (202), (220). Такі рефлекси є характерними саме для нанокристалів CdS [151]. Також у зазначеній роботі за допомогою рентгеноспектрального мікроаналізу виявлено, що у полі зору наяві атоми C, O, N, Na. При цьому наявність атомів вуглецю, кисню та азоту може бути зумовлена вільними карбоксильними та аміногрупами, що входять до фітохелатинів, які у даному випадку відіграють роль стабілізуючих агентів [147]. Крім того, у роботі [150] наведено дані рентгенівської дифрактометрії, згідно з якими підтверджується кристалічна будова наночастинок CdS, що відпові-

дає модифікації вюрцит. А також за результатами рентгеноспектрального аналізу встановлено, що крім переважаючих елементів кадмію та сірки, у зразку присутні атоми кисню, фосфору та міді. Автори інтерпретують сигнали від кисню та фосфору як такі, що надходять з залишків фосфатних груп, які входять до складу живильного середовища M9, в якому культивували бактерію. Сигнал від міді походить від мідної сітки, на яку наносили досліджуваний зразок для електронної мікроскопії [150].

Підсумовуючи, слід відзначити, що нами вперше показано можливість отримання квантових точок CdS позаклітинно з використанням як матриці культури тютюну ВУ-2. Отримані квантові точки мали характерні люмінесцентні властивості, а їх розподіл за розмірами був з максимумом в області 3 – 4 нм при загальній ширині розподілу 1– 7 нм. Специфічні фізичні властивості, що виникають через зменшення розмірів матеріалу до наномасштабів, дозволяють використовувати утворені напівпровідникові наночастинки для флюоресцентного мічення клітин.

Таким чином, основні результати розділу є наступними:

1. Вперше розроблено методики синтезу квантових точок CdS за використання таких рослинних матриць, як культури «бородатих» коренів *L. maroccana* та культури суспензійних клітин *N. tabacum* (ВУ-2).
2. Досліджено спектри поглинання та фотолюмінесценції синтезованих наночастинок при збуджуючому випроміненні  $\lambda=340$  нм та показано, що для наночастинок CdS, синтезованих за використання *L. maroccana*, характерні три максимуми поглинання з довжинами хвиль 362, 398 та 464 нм, яким відповідають фракції наночастинок з розмірами 2,5, 3,4 та 6,0 нм. Квантові точки, що отримані за допомогою *N. tabacum* (ВУ-2) мають протяжний максимум поглинання, який відповідає довжині хвилі 292 нм.
3. Встановлено, що у спектрах фотолюмінесценції квантових точок (*L. maroccana*) спостерігаються три максимуми у діапазоні довжин хвиль 425 – 500 нм, що відповідають наночастинкам з розмірами в інтервалі 4 – 7 нм. Характерною особливістю спектрів люмінесценції квантових точок CdS, синте-

зованих за допомогою ВУ-2 є поява плеча інтенсивності з максимумом на довжині хвилі 381 нм, що зумовлено зменшенням розмірів синтезованих частинок до 3,5 нм.

4. За результатами дослідження структурно-морфологічних особливостей синтезованих наночастинок CdS за допомогою методів TEM та електроннографії встановлено, що для квантових точок CdS (*L. maroccana*) розподіл за розмірами має максимум в області 6 – 7 нм і охоплює діапазон 2 – 8 нм. Для наночастинок CdS (*N. tabacum*) максимум розподілу відповідає розмірам 3 – 4 нм, а розподіл характеризується загальним інтервалом значень розмірів 1 – 7 нм.

Результати представлених досліджень опубліковано у роботах [152, 153].



## РОЗДІЛ 6

### ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНИХ ВПЛИВІВ СИНТЕЗОВАНИХ КВАНТОВИХ ТОЧОК СУЛЬФІДУ КАДМІЮ

Сфера нанотехнологій на даний час знаходить безліч застосувань у повсякденному житті. Зокрема, такі наноструктурні матеріали, як наночастинки, фулерени, нановолокна, квантові точки потенційно можуть використовуватись у виробництві споживчих товарів, фармацевтичній промисловості, а також у сфері біотехнологій, адресної доставки ліків тощо [154]. Зважаючи на те, що наноматеріали контактують з оточуючими живими клітинами та тканинами, проблеми нанотоксикології та біобезпеки нанорозмірних систем в останні роки виходять на одне з перших місць за актуальністю [154,155]. Переважно токсичність наноструктурних матеріалів залежить від специфічних властивостей останніх, таких як розмір, форма, концентрація, розчинність, наявність покриття, стабільність. Токсичність наносистем включає в себе фізіологічні, фізико-хімічні та молекулярні аспекти [154].

Слід відмітити, що останнім часом особливу увагу привертають напівпровідникові наночастинки CdS, які завдяки своїм флюоресцентним властивостям, високому рівню яскравості та стійкості до фотовицвітання часто використовують для флюоресцентного мічення білків, нуклеїнових кислот, або як високочутливі біосенсиори [10]. Однак, наявність в їх складі важкого металу  $Cd^{2+}$ , який характеризується токсичною дією при взаємодії з живими клітинами та тканинами, вимагає ретельної перевірки впливу різних концентрацій кадмій-вмісних наночастинок на живі клітини та організми [156]. Оскільки квантові точки CdS, отримані за допомогою хімічного синтезу, виявляють токсичний вплив на клітини, доцільним є порівняння токсичних ефектів подібних наночастинок, отриманих за допомогою «зеленого» синтезу за використання біологічних матриць.

### 6.1. Визначення цитотоксичності квантових точок CdS на протопласти *N. tabacum*

Через відсутність клітинної стінки протопласти являють собою високочутливу рослинну тест-систему, що використовується для дослідження дії різних сигнальних шляхів та стресових чинників [157]. Нами було проаналізовано вплив квантових точок CdS, отриманих за використання біоматриць, на мезофільні протопласти тютюну *Nicotiana tabacum* L. Даний етап роботи був орієнтований на оцінку можливості створення підходів щодо використання синтезованих за запропонованою нами «зеленою» технологією нанокристалів для біовізуалізації клітинних структур та елементів. При цьому особливо важливо звернути увагу на те, що, оскільки, квантові точки CdS контактують з внутрішнім середовищем клітин при проникненні, дослідження їх біобезпечності є обов'язковим елементом для подальшого використання їх в якості люмінесцентних міток.

Було показано, що наявність широкого діапазону біологічно сумісних концентрацій квантових точок, а саме 2 – 49 мкг/мл та 30 – 750 мкг/мл не спричиняли істотного негативного впливу на виживання протопластів тютюну. Ізольовані неушкоджені протопласти *N. tabacum* наведено на рис. 6.1.

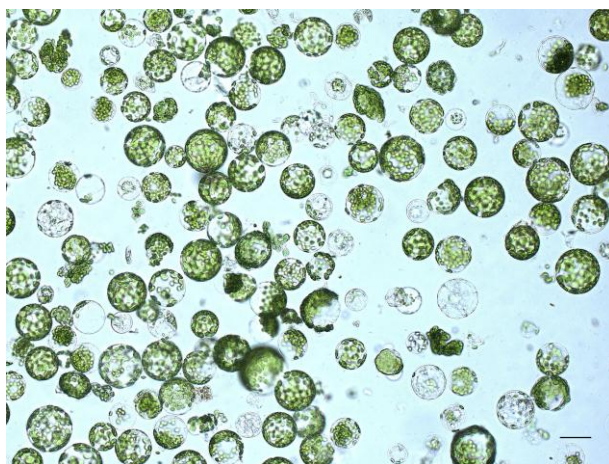


Рис. 6.1. Свіжоізольвані мезофільні протопласти *N. tabacum*. Масштабна одиниця – 20 мкм

Вихідні концентрації наночастинок склали 193 мкг/мл для наночастинок, які були синтезовані допомогою культури ВУ-2 та 3,75 мкг/мл для квантових точок, отриманих за використання *P. ostreatus*. Діапазон досліджуваних концентрацій становив 3 – 49 мкг/мл для квантових точок, що отримані за використання ВУ-2 та 30 – 750 мкг/мл для квантових точок CdS, які синтезовані за допомогою міцелію *P. ostreatus*. Відмінність у концентраціях пов'язана з особливостями методики їх синтезу. Оскільки квантові точки вкриті органічною оболонкою різного біологічного походження (грибна або рослинна матриця), що осаджується під час випаровування, маси квантових точок, синтезованих на основі різних матриць, помітно відрізняються.

За результатами оцінки впливів квантових точок CdS, які синтезовані з використанням культури ВУ-2, на протопласти показано, що у концентраціях 2 – 12 мкг/мл квантові точки CdS не виявляли токсичного ефекту. Відсоток неушкоджених протопластів з нормальною морфологією становив при цьому 90 – 79 % (рис. 6.2). При обробці рослинних клітин децю вищими концентраціями наночастинок, а саме, 25 – 49 мкг/мл спостерігали зниження частки неушкоджених протопластів до значень 40 – 8 % відповідно (рис. 6.2). Як контроль використовували біологічну матрицю ВУ-2 без додавання квантових точок.

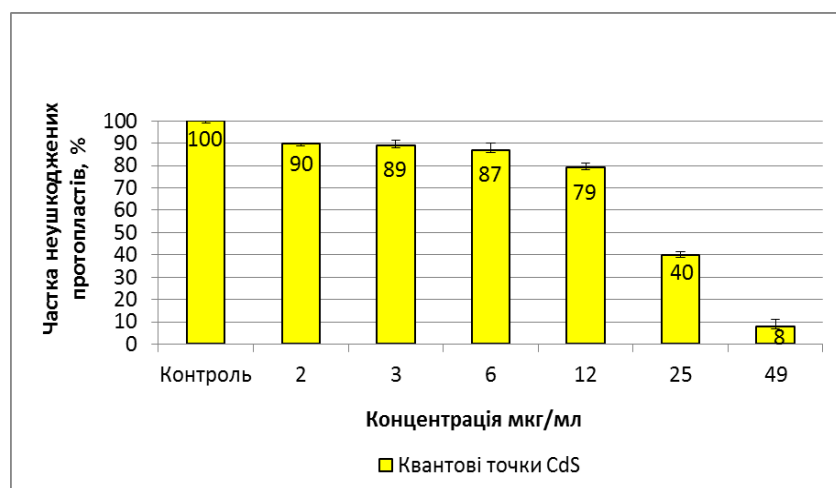


Рис. 6.2. Результати впливу різних концентрацій квантових точок CdS, синтезованих за використання ВУ-2, на протопласти *N. tabacum*

Інкубування протопластів тютюну з квантовими точками у низьких концентраціях не змінювало нормальної морфології рослинних клітин (рис. 6.3).

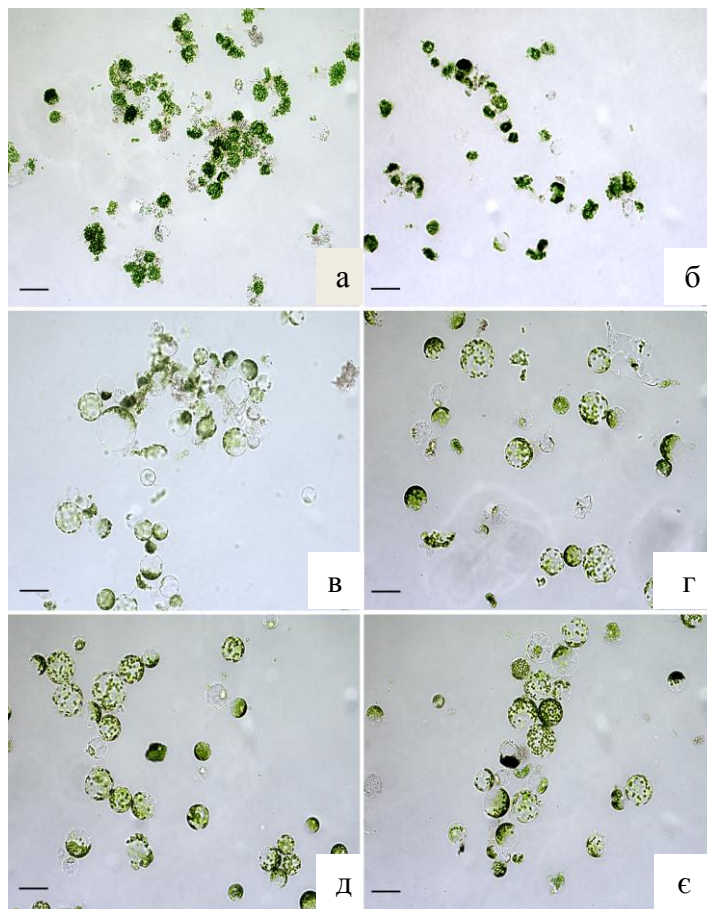


Рис. 6.3. Морфологія протопластів *N. tabacum*, оброблених протягом 24 год різними концентраціями квантових точок CdS (BY-2). А – 97 мкг/мл; б – 49 мкг/мл; в – 25 мкг/мл; г – 12 мкг/мл; д – 6 мкг/мл; є – 3 мкг/мл. Масштабна одиниця – 20 мкм

Крім того, було досліджено вплив квантових точок CdS, отриманих за допомогою *P. ostreatus*, на протопласти *N. tabacum*. Як зазначалося, інтервал досліджуваних концентрацій був у межах 30 – 750 мкг/мл, що відповідало розведенням 1:4 – 1:128. 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 част-

ки протопластів з нормальною морфологією. Зокрема, за впливу 400 мкг/мл відсоток життєздатних протопластів становив 58 %, за впливу 750 мкг/мл наночастинок частка нормальних протопластів відповідала 49 % (Рис. 6.4). При цьому як контроль використовували біологічну матрицю *P. ostreatus*.

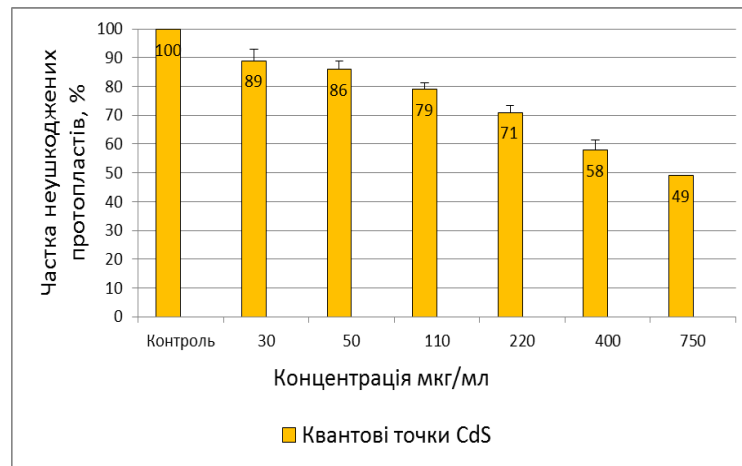


Рис. 6.4. Результати впливу різних концентрацій квантових точок CdS, синтезованих за використання *P. ostreatus*, на протопласти *N. tabacum*

Отже, проаналізовано вплив різних концентрацій квантових точок CdS, синтезованих за допомогою грибної та рослинної матриць на морфологію рослинних протопластів. З отриманих результатів випливає, що найменш токсичними виявилися квантові точки, які отримано з використанням *P. ostreatus*. Зокрема, вплив 50 мкг/мл квантових точок, синтезованих за використання грибного міцелію, не призводив до суттєвих морфологічних порушень протопластів тютюну, частка протопластів з неушкодженою морфологією складала 86 % (рис. 6.4). Тоді як вплив цієї ж концентрації – 49 мкг/мл у випадку квантових точок, синтезованих за допомогою культури ВУ-2, виявився найбільш токсичним. Частка протопластів з нормальною морфологією становила лише 8 % (рис. 6.2).

Отримані результати можна порівняти з роботою [158], у якій автори оцінювали токсичний вплив різних концентрацій хімічно синтезованих квантових точок сульфід кадмію на рослину *Spirodela polyrrhiza*. При цьому діапа-

зон 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. Також змінювалася активність відповідних ферментів [158]. Слід відмітити, що іншими авторами показано токсичний вплив наночастинок CdS на проростки *Eruca sativa* Mill. Наночастинки отримували методом хімічного синтезу при нагріванні до 170°C. Розмір отриманих наночастинок знаходився у межах 5 – 15 нм, їх концентрація становила 3 мг/л. У результаті показано, що наночастинки меншого діаметру виявилися значно більш токсичними, ніж ті, розмір яких перевищував 5 нм. У роботі оцінювали плоїдність клітин за впливу вказаних наночастинок. Відповідно, було встановлено, що у контрольних зразках до 94 % клітин зберігали диплоїдний набір хромосом, у той час як внаслідок обробки наночастинками CdS кількість тетраплоїдних та міксоплоїдних клітин зростала на 15 та 20 %. Водночас спостерігали зниження мітотичного індексу клітин, інкубованих з наночастинками. Зниження мітотичного індексу ймовірно зумовлене впливом наночастинок на мікротрубочки під час клітинного поділу [159].

Таким чином, авторами цієї роботи виявлено генотоксичний ефект хімічно синтезованих наночастинок CdS на рослинні клітини. Важливо зауважити, що у нашому дослідженні зазначені концентрації напівпровідникових наночастинок виявилися нетоксичними для рослинних клітин. Зокрема, діапазон досліджуваних нами концентрацій був на порядок вищим, а ніж у згаданих роботах. За впливу квантових точок в інтервалі концентрацій 2 – 12 мг/л не спостерігали виражених морфологічних порушень протопластів. У той час, як у роботах [158, 159] рослини виявилися чутливими до наночастинок CdS у діапазоні концентрацій 1 – 3 мг/л. Отже, негативні ефекти квантових точок сульфїду кадмію, які синтезовані з використанням біологічних систем є суттєво нижчими у порівнянні з хімічно синтезованими частинками. Можна припустити, що під час біологічного синтезу навколо квантових точок фор-

мується захисне органічне покриття, що перешкоджає вивільненню і прямо-му негативному впливу іонів  $Cd^{2+}$  на життєздатність клітин. Це узгоджується з даними роботи [160], в якій оцінювали токсичні ефекти наночастинок CdS, оточених різними типами органічних лігандів. Загалом, застосування «зеленого» синтезу є значно безпечнішим підходом, що дозволяє отримувати наночастинок, які не мають токсичних ефектів на рослинні клітини, особливо у низьких концентраціях.

## **6.2. Дослідження токсичної дії квантових точок CdS на пухлинні клітини лінії HeLa**

Для порівняння токсичного впливу квантових точок CdS, отриманих за допомогою різних біологічних систем, нами спочатку було проведено окреме дослідження впливу безпосередньо бактеріальної, грибною та рослинної матриць на виживаність клітин HeLa. Було встановлено, що матриці, на основі яких здійснювали біологічний синтез квантових точок не чинять цитотоксичної/цитостатичного впливу на ці пухлинні клітини. Тому метою наступного етапу було дослідження впливу квантових точок CdS, які синтезовані за використання бактеріальної, грибною та рослинної матриць, на клітини HeLa та неорганічного сульфід кадмію, що входить до солі CdS.

Концентрація наночастинок CdS, отриманих за допомогою *E. coli*, в матричному розчині становила 3,6 мг/мл, за допомогою *P. ostreatus* – 3,75 мг/мл та *L. maroccana* – 1,2 мг/мл. Для оцінки токсичності квантових точок, використовували наступні розведення вихідних розчинів наночастинок: 1:1 (1,87), 1:2 (1,25), 1:4 (0,75), 1:8 (0,4), 1:16 (0,22), 1:32 (0,11) мг/мл для квантових точок, отриманих за використання грибною матриці. Діапазон досліджуваних концентрацій для квантових точок, отриманих за використання бактеріальною матриці становив 0,1 – 1,8 мг/мл. Вплив квантових точок CdS, синтезованих за використанням *L. maroccana* досліджували в інтервалі концентрацій: 0,03 – 0,6 мг/мл. Як контроль використовували зазначені вище біологічні матриці.

Застосування різних концентрацій квантових точок CdS виявило зменшення їх токсичності. Оптимальне розведення для квантових точок, отриманих за допомогою різних біологічних матриць, без зафіксованого цитотоксичного ефекту становило 1:8, що відповідало концентрації 0,4 мг/мл у випадку квантових точок, які отримані за допомогою *P. ostreatus* та *E.coli* та 0,13 мг/мл для квантових точок, що отримані з використанням *L. maroccana*. Табл. 6.1. ілюструє виживаність культури клітин HeLa за дії квантових точок CdS, отриманих за допомогою різних типів зазначених біологічних матриць. Як свідчать наведені дані (рис. 6.5), квантові точки CdS, отримані за використання бактеріальної та грибною матриць, не чинять цитотоксичного/цитостатичного ефекту на клітини. Водночас, квантові точки CdS, отримані за допомогою культури «бородатих» коренів *L. maroccana*, виявляли проапоптичний ефект.

Таблиця 6.1.

Співвідношення живих та мертвих клітин HeLa (%) за впливу різних розведень квантових точок CdS, синтезованих за використання бактеріальної, грибною та рослинної матриць

Розведення	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
Контроль	90:10	89:11	87:13	93:7	95:5
CdS ( <i>E. coli</i> )	51:49	60:40	69:31	92:8	95:5
CdS ( <i>P. ostreatus</i> )	68:32	75:25	80:20	94:5,9	96:4
CdS ( <i>L. maroccana</i> )	42:58	53:47	68:32	85:15	87:13

Зокрема, вони інгібували проліферативну активність пухлинних клітин відносно контролю та виявили апоптичну і цитостатичну дію. Показано зростання кількості апоптичних клітин майже в 2 рази порівняно з контролем (рис. 6.5).



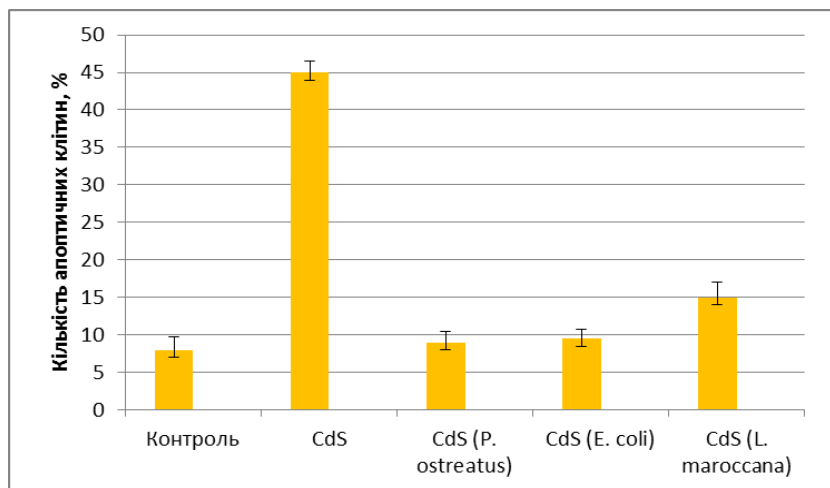


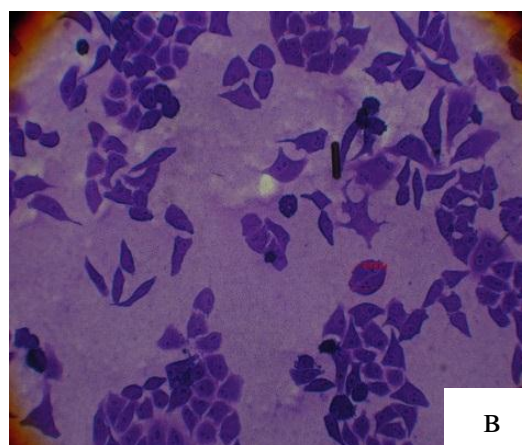
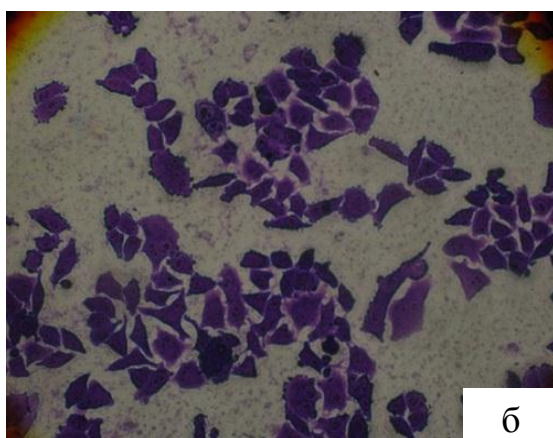
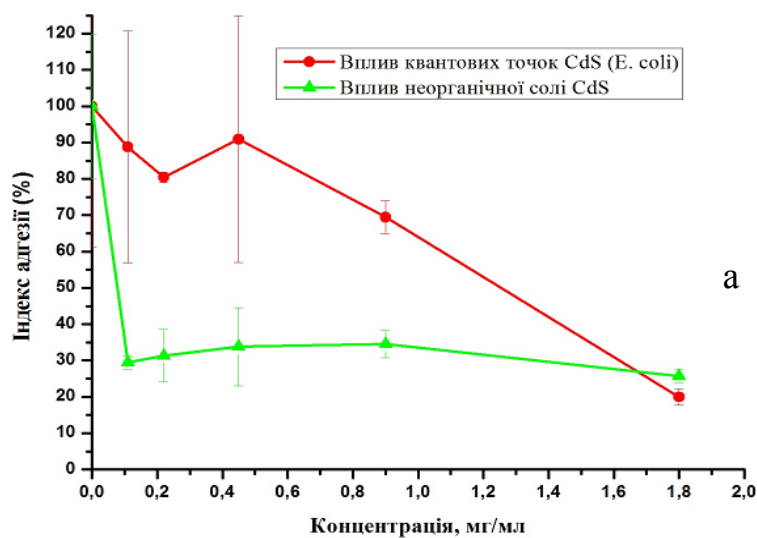
Рис. 6.5. Результати впливу неорганічного сульфід кадмію (0,4 мг/мл); квантових точок CdS, отриманих за використання *P. ostreatus* (CdS (*P.ostreatus*) - 0,4 мг/мл); *E. coli* (CdS(*E.coli*) - 0,4 мг/мл); *L. maroccana* (CdS (*L.maroccana*) - 0,13 мг/мл) на клітини HeLa

Однак, найбільш токсичним виявився неорганічний сульфід кадмію. Для обробки клітин було обрано концентрацію 0,4 мг/мл, що відповідає розведенню 1:8, оскільки інкубування клітин саме з цією концентрацією не виявило суттєвих токсичних впливів при обробці квантовими точками. При такій концентрації частка живих клітин становила 75 – 94%. На противагу квантовим точкам, обробка клітин HeLa 0,4 мг/мл неорганічного CdS призводила до зростання кількості апоптичних клітин приблизно до 45%, що у 3 рази вище, ніж обробка квантовими точками, отриманими за допомогою рослинної матриці, та у 5 разів вище, порівняно з контролем та обробкою квантовими точками, отриманими за використання бактеріальної та грибнової матриць. При порівнянні співвідношення живих та мертвих клітин HeLa після обробки квантовими точками CdS різного походження та неорганічним сульфідом кадмію, було встановлено, що найменш токсичними виявилися квантові точки, отримані за допомогою грибнової матриці (Рис. 6.5, табл. 6.1). Подібний цитостатичний ефект продемонстрували квантові точки, отримані за допомогою бактеріальної та рослинної матриць. Кількість мертвих клітин після їх обробки збільшувалась приблизно у 2,8 разів порівняно з контролем (Рис. 6.5).

Отже, за результатами проведених досліджень можна стверджувати, що квантові точки CdS, отримані шляхом біологічного синтезу, не виявляють вираженого токсичного впливу, на відміну від неорганічного сульфід кадмію. Найменш токсичними серед них виявилися квантові точки, синтезовані за допомогою міцелію гриба *P. ostreatus*.

Важливим показником функціонального стану ракових клітин є здатність до міжклітинної адгезії, що обумовлює їх інвазивність та сприяє розвитку метастазів. Зменшення адгезивного потенціалу пухлинних клітин, ймовірно, означає зменшення ступеня злоякісності клітин [161]. Тому наступним завданням дослідження було виявити адгезивний потенціал клітин HeLa за дії досліджуваних наночастинок CdS. Адгезивний потенціал, визначений для пухлинних клітин є інтегральним показником, який характеризує параметри міжклітинної взаємодії клітин з білками позаклітинного матриксу. З іншого боку, субстрат-залежний ріст пухлинних клітин є мірою їх онкогенності, оскільки клітини, що відкріпляються від матриксу і мають мутогенні властивості являють собою субпопуляцію, що є основою метастазування.

У порівняльному дослідженні використовували субпопуляцію клітин без впливу наночастинок – позитивний контроль, та за впливу неорганічного CdS – негативний контроль. Крім того, досліджували вплив біоматриць, у результаті було виявлено наступне: квантові точки, які отримані за допомогою *E. coli* виявили зниження адгезивних властивостей клітин HeLa за високих концентрацій. А саме, адгезивний потенціал клітин знижувався з поступовим підвищенням концентрацій наночастинок у межах 20-89% (рис. 6.6). Квантові точки CdS, отримані за використання *P. ostreatus* також знижують рівень адгезії клітин HeLa в порівнянні з неорганічним CdS. Адгезивний потенціал поступово знижується у межах 55 – 25% з підвищенням досліджуваних концентрацій квантових точок (рис. 6.7). Тоді як суттєве підвищення адгезивного потенціалу клітин HeLa спостерігалось під впливом квантових точок CdS, що отримані з використанням *L. maroccana*, рівень адгезії досягав 85% (Рис 6.8).



6.6. Адгезивні властивості клітин HeLa, оброблених квантовими точками CdS (*E. coli*) та неорганічним сульфідом кадмію – а; клітини HeLa після обробки матрицею *E. coli* – б; клітини HeLa після обробки квантовими точками CdS (*E. coli*) – в

Токсичність квантових точок CdS скоріше всього пов'язана з вивільненням іонів кадмію в оточуюче середовище. На ступінь токсичності напівпровідників значно впливають розміри частинок, а також особливості хімії поверхні. У дослідженні [156] автори перевіряли цитотоксичність хімічно синтезованих квантових точок CdS на гемоцитах мідії. Було показано, що життєздатність клітин починає знижуватися вже при дії 0,01 мг/л наночастинок. Обробка клітин *Mytilus galloprovincialis* квантовими точками сульфід кадмію у діапазоні концентрацій від 0,01 до 1 мг/л призводила до утворення активних форм кисню, ушкодження структури ДНК, зростання активності лізосомної

кислої фосфатази, що є загальною реакцією на гострий токсичний вплив. Крім того, в іншій роботі автори показали генотоксичні та цитотоксичні властивості квантових точок CdS на клітини форелі райдужної [162]. Результати підтвердили, що хімічно синтезовані квантові точки CdS виявилися надзвичайно токсичними при концентраціях 10 та 50 мкг/мл, а також для них була властива дозозалежна генотоксичність у діапазоні концентрацій 0,01–1 мкг/мл після 24 год інкубування [162].

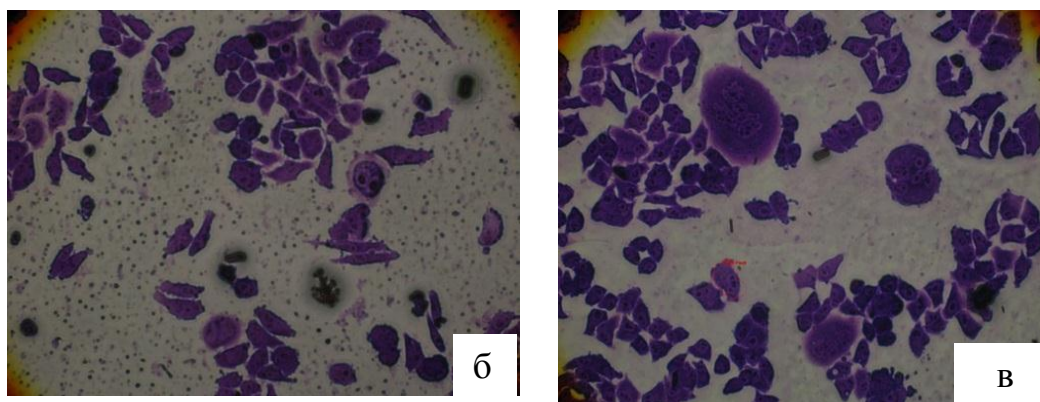
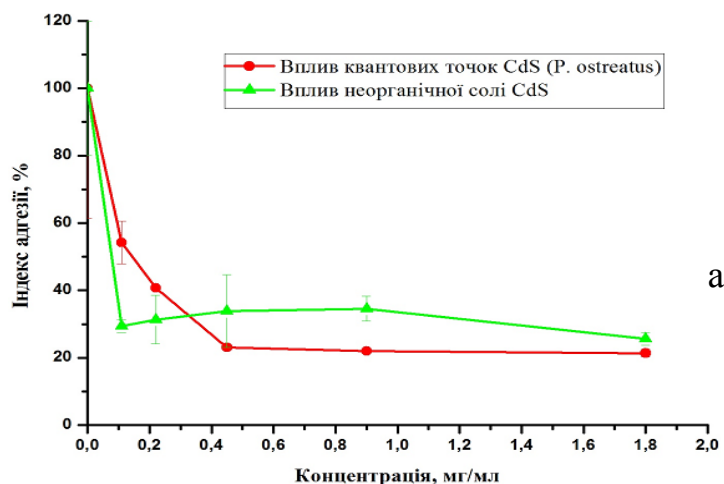


Рис. 6.7. Адгезивні властивості клітин HeLa, оброблених квантовими точками CdS (*P. ostreatus*) та неорганічним сульфідом кадмію – а; клітини HeLa після обробки *P. ostreatus* – б; клітини HeLa після обробки квантовими точками CdS (*P. ostreatus*) – в

У роботах встановлено, що вивільнення іонів кадмію спричинює порушення оксидативного стану клітин, що лежить в основі відповідних токсичних ефектів кадмієвмісних наночастинок [163, 164]. В іншій роботі [165]

представлено оцінку токсичного впливу хімічно синтезованих наночастинок CdS на клітини *E. coli* та HeLa. Зокрема, продемонстровано, що життєздатність пухлинних клітин помітно знижувалася зі зростанням концентрації наночастинок. При обробці наночастинами сульфід кадмію клітини HeLa характеризувались зміненою морфологією, конденсованим або фрагментованим ядром [165].

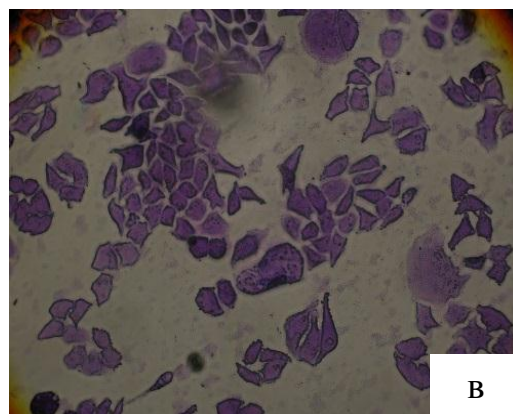
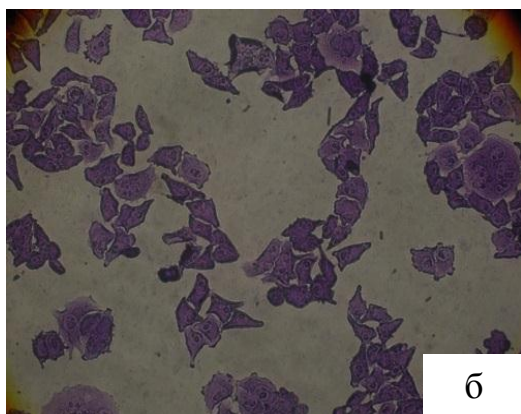
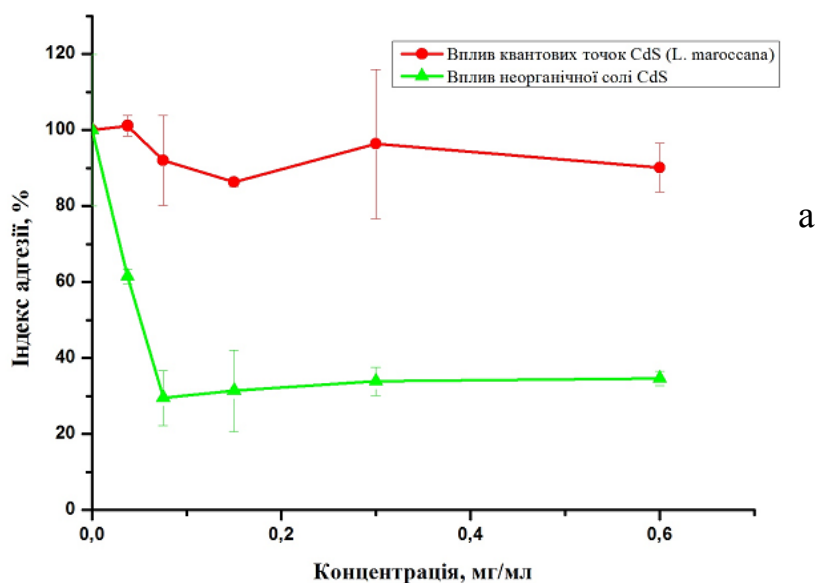


Рис. 6.8. Адгезивні властивості клітин HeLa, оброблених квантовими точками CdS (*L. maroccana*) та неорганічним сульфідом кадмію – а; клітини HeLa після обробки матрицею *L. maroccana* – б; клітини HeLa після обробки квантовими точками CdS (*L. maroccana*) – в

Варто відмітити, що у випадку оцінки цитотоксичності визначальним фактором був час інкубування клітин. Показано, що життєздатність вказаних клітин суттєво знижувалася при зростанні часу експозиції [165]. Таким чином, можна зробити висновок, що хімічно синтезовані квантові точки CdS чинять виражену цитотоксичність, внаслідок чого відбувається інгібування росту клітин, а також внутрішньоклітинне підвищення рівня активних форм кисню. Крім того, описані токсичні ефекти спостерігали у концентраціях, які є на порядок нижчими, ніж ті, що використані нами для оцінки токсичності квантових точок на тваринних клітинах.

Отже, в результаті представленого дослідження на клітинах лінії HeLa було встановлено, що квантові точки CdS, синтезовані з використанням біологічних матриць, у діапазоні концентрацій 0,1 – 1,8 мг/мл не мають цитотоксичного впливу та проявляють незначний цитостатичний та проапоптичний ефект. Водночас для клітин, оброблених квантовими точками, синтезованих за допомогою *L. maroccana*, у діапазоні концентрацій 0,03 – 0,6 мг/мл власне підвищення частки апоптичних клітин. Найбільш виражений цитотоксичний вплив був характерним для неорганічного сульфід кадмію. Встановлено, що квантові точки CdS, отримані методами «зеленого» синтезу за використання *P. ostreatus* та *E. coli* знижують рівень адгезії клітин HeLa в порівнянні з неорганічним CdS, тоді як за використання *L. maroccana* – підвищують адгезію клітин до субстрату. Виявлені нами цитостатичні, проапоптичні та адгезивні ефекти квантових точок, отриманих в біологічних матрицях *P. ostreatus*, *E. coli* та *L. maroccana* відносно пухлинних клітин HeLa можуть бути залучені як додаткові чинники пригнічення пухлинного росту та метастазування.

### **6.3. Вплив синтезованих квантових точок CdS на *Drosophila melanogaster***

Останнім часом більшість нанотоксикологічних досліджень проводили з використанням модельних клітинних культур в умовах *in vitro* [166]. Однак,

результати цих досліджень є недостатніми і вимагають перевірки в експериментах на багатоклітинному організмі. У природних умовах тваринні біологічні системи надзвичайно складні і взаємодія нанорозмірних компонентів з нуклеїновими кислотами, білками і клітинами організмів, призводить до їх специфічного розподілу в тканинах та викликає певні реакції живої системи, тому розуміння взаємозв'язку між фізичними та хімічними властивостями наноструктур та їхньою локалізацією *in vivo* є основою для оцінки відповіді організму на токсичний вплив [166]. У зв'язку з цим актуальним на сьогоднішній день залишається дослідження дії наночастинок на тваринний організм.

Отже, метою даного етапу роботи було оцінити токсичність та генотоксичність квантових точок CdS, синтезованих за допомогою біологічних матриць, а саме бактерії *E. coli*, гриба *P. ostreatus*, та рослинної матриці *L. taroccana* на тваринній тест-системі – *D. melanogaster*. У результаті проведених досліджень було встановлено, що в культурах мух, яких вирощували на середовищі з додаванням квантових точок CdS, синтезованих за допомогою *E. coli*, в концентраціях 1,8 та 1,2 мг/мл спостерігали низьку виживаність особин, що не досягала навіть 5 імаго, тоді як у контролі середня кількість мух, які вижили знаходилась у межах 28 – 30 особин (рис. 6.9).

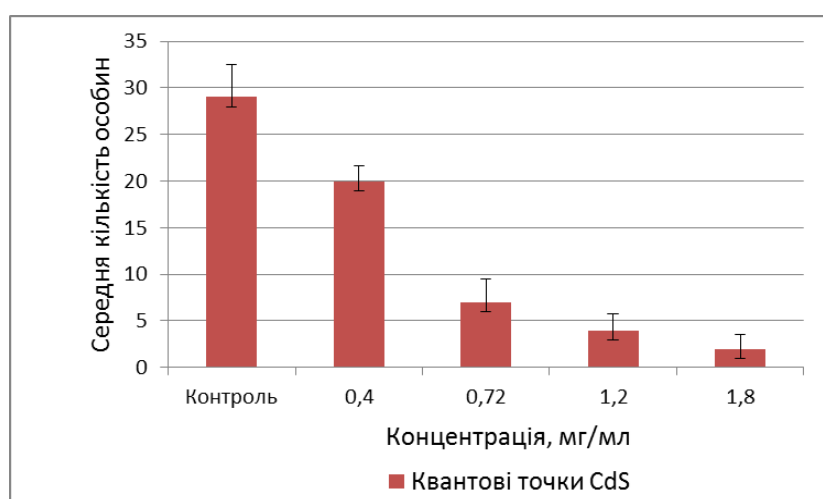


Рис. 6.9. Середня кількість особин імаго, вирощених на середовищах з додаванням наночастинок CdS, отриманих за допомогою *E. coli*

При використанні концентрації 0,4 мг/мл було відмічено достовірне зниження токсичного впливу квантових точок CdS. Зокрема, рис. 6.9. ілюструє, що при додаванні квантових точок сульфиду кадмію у зазначеній концентрації кількість життєздатних мух складала 20 особин. Також для вказаних концентрацій зафіксовано різницю в часі появи перших особин імаго між дослідом і контролем, яка становила 10 діб, що є значною затримкою розвитку для дрозофіли, у якої в нормі весь життєвий цикл займає до двох тижнів при температурі 25°C [167]. Слід зауважити, що при вирощуванні мух на середовищі з додаванням отриманого за хімічною реакцією розчину CdS, спостерігалася 100% загибель мух, що свідчить про надзвичайно високу токсичність сульфиду кадмію, як неорганічної солі.

При дослідженні токсичності квантових точок CdS, отриманих за використання міцелію гриба *P. ostreatus*, показано, що при концентраціях розчину 1,8 мг/мл та 1,25 мг/мл спостерігалася низька виживаність мух у порівнянні з контролем (рис. 6.10).

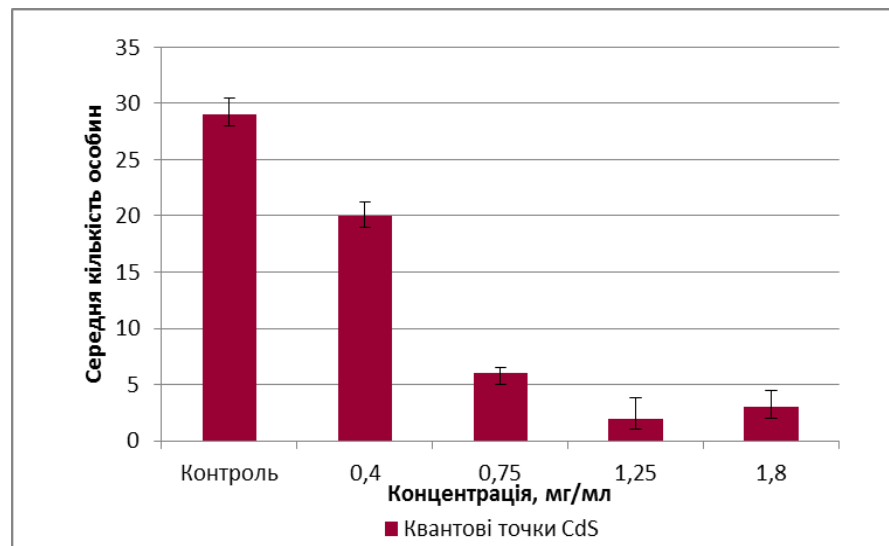


Рис. 6.10. Середня кількість особин імаго, вирощених на середовищах з додаванням наночастинок CdS, отриманих за допомогою *P. ostreatus*



Зокрема, рівень виживаності не перевищував в середньому 5 особин. У той час, як у контрольних зразках рівень виживаності мух складав 29 особин. При використанні концентрації 0,4 мг/мл наночастинок CdS їх токсичний ефект значно знижувався, а саме середня кількість життєздатних мух зростає до 20 особин. При застосуванні квантових точок, що отримані з використанням *L. taroccana* виявлено, що концентрація 0,4 мг/мл є більш токсичною, у порівнянні з наночастинками, синтезованими за допомогою бактеріальної та грибною матриці. Оскільки вирощування мух на середовищі з квантовими точками у такій концентрації призводить до зниження їх життєздатності до 5 особин. Нетоксичною ж є концентрація 0,13 мг/мл, при вирощуванні мух на середовищі з квантовими точками у такій концентрації виживаність мух є найвищою і досягає у середньому 25 особин (рис. 6.11).

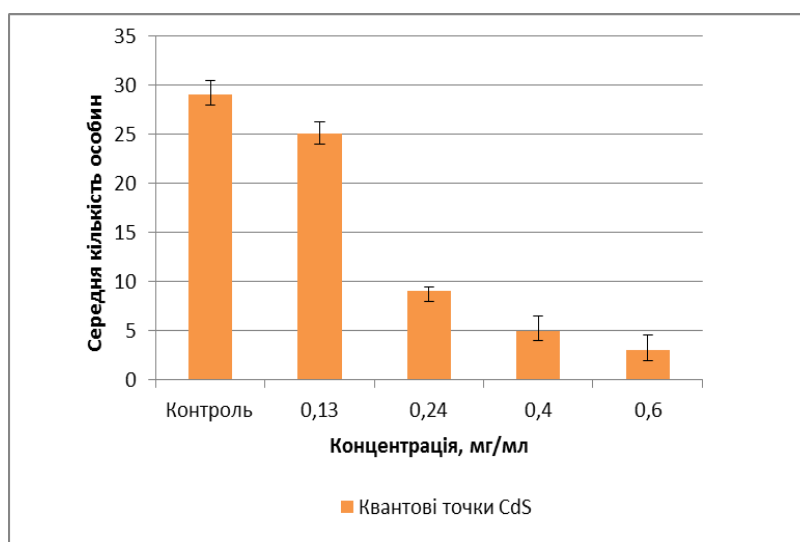


Рис. 6.11. Середня кількість особин імаго, вирощених на середовищах з додаванням наночастинок CdS, отриманих за допомогою *L. taroccana*

У роботі [168] також використовували *D. melanogaster* як модельний об'єкт для оцінки токсичного впливу хімічно синтезованих кадмій вмісних частинок типу CdSe–ZnS, що мали різні полімерні оболонки навколо них. У своєму дослідженні автори дійшли висновку, що токсичність іонів Cd<sup>2+</sup> суттєво знижується за рахунок покриття поверхні наночастинок біомолекулами, що у свою чергу призводить до зниження біоаккумуляції квантових точок у

досліджуваних живих організмах. Отже, отримані нами результати підтверджують зниження токсичного ефекту квантових точок CdS, яке спостерігається при зменшенні їх концентрацій *in vivo*. Крім того, у результаті оцінки генотоксичності досліджуваних зразків квантових точок нами не було виявлено статистично достовірних відхилень від негативного контролю (Додаток А), що свідчить про відсутність генотоксичності у напівпровідникових наночастинок CdS, синтезованих за допомогою «зеленого» синтезу. Отриманий результат свідчить про те, що при біологічному синтезі квантових точок спостерігається зниження токсичних властивостей кадмію, що узгоджується з літературними даними [168].

Таким чином, дослідження токсичного ефекту квантових точок CdS, отриманих за допомогою грибного міцелію *P. ostreatus*, бактерії *E. coli* та рослини *L. maroccana* на класичному модельному організмі *D. melanogaster* продемонструвало, що концентрації CdS 0,13 та 0,4 мг/мл не впливають суттєво на життєздатність мух. Однак, при цьому слід відмітити, що дрозофіла є більш резистентним організмом у порівнянні з хребетними до різних токсичних впливів [169]. Проте, нами були використані наночастинок, синтезовані за використання біологічних матриць. Наявність навколо кадмійвмісних квантових точок специфічного покриття з біологічного походження може відігравати важливу роль у зниженні рівня їхньої токсичності. Таким чином, отримані методом «зеленого» синтезу напівпровідникові наночастинок CdS мають широкі можливості застосування, як в експериментах *in vivo* на тваринних організмах, так і в певних галузях клітинної біології та біомедичних дослідженнях.

Підсумовуючи отримані результати щодо оцінки впливів синтезованих нами квантових точок CdS на різні біологічні тест-систем слід зазначити, що найбільш чутливим модельним об'єктом виявилися рослинні протопласти. Така сприйнятливості їх до зовнішніх чинників пов'язана з відсутністю клітинної стінки [157]. Необхідно зауважити, що використання більш високих концентрацій наночастинок CdS (1,8, 1,25 мг/мл) викликало повну загибель

протопластів. Тому в експерименті були відібрані концентрації у діапазоні 0,03 – 0,75 мг/мл, та 2 – 49 мкг/мл, що відповідають розведенням 1:4 – 1:128 і які є нетоксичними для рослинних клітин. Було показано, що за таких концентрацій частка неушкоджених протопластів становить 90 – 40%. У випадку застосування пухлинних клітин HeLa концентрації, що не чинили токсичних ефектів: 0,1 – 1,8 мг/мл. При цьому було встановлено, що для квантових точок властивий цитостатичний ефект, а також зростання адгезивного потенціалу пухлинних клітин за умови збільшення концентрацій. При оцінці токсичних ефектів отриманих квантових точок *ex vivo* було показано, що *D. melanogaster* залишається життєздатною при концентрації 0,4 мг/мл наночастинок.

Таким чином, основні результати розділу полягають у наступному:

1. У результаті дослідження цитотоксичного впливу квантових точок CdS на рослинні клітини встановлено, що квантові точки, отримані за використання рослинної матриці є більш токсичними у порівнянні з квантовими точками, отриманими при використанні гриба *P. ostreatus*. Протопласти *N. tabacum* досить чутливі до впливу кадмійвмісних наночастинок. Однак, їх використання у концентраціях 30 – 220 мкг/мл не викликає суттєвих морфологічних порушень рослинних клітин.

2. Встановлено, що квантові точки CdS, отримані за використання *P. ostreatus*, *E. coli* та *L. maroccana* не виявляють вираженого цитотоксичного ефекту. Частка апоптичних клітин при обробці квантовими точками CdS у розведенні 1:8 становить 8 – 15% порівняно з неорганічним сульфідом кадмію. Для квантових точок також було характерним зниження адгезивних властивостей пухлинних клітин HeLa.

3. Встановлено, що *D. melanogaster* є найбільш стійкою моделлю до впливу квантових точок CdS. При вирощуванні мух на середовищі з додаванням квантових точок, що отримані за допомогою *E. coli* та *P. ostreatus* було визначено, що нетоксичною концентрацією є 0,4 мг/мл наночастинок, а при застосуванні квантових точок, що синтезовані за допомогою *L. maroccana*, концентрація, яка не викликає суттєвої загибелі особин була 0,13 мг/мл.

Також продемонстровано, що квантові точки CdS не чинять генотоксичного впливу на *D. melanogaster*.

Результати досліджень щодо аналізу цитотоксичних ефектів отриманих квантових точок опубліковано у роботах [153, 170, 171].

#### 6.4. Внутрішньоклітинна локалізація синтезованих квантових точок CdS

Як зазначалося, одним з найбільш розповсюджених застосувань квантових точок є флуоресцентне мічення клітинних структур. При цьому неперервне збудження органічних барвників зазвичай призводить до помітного фототицвітання та затухання фотолюмінесценції протягом короткого періоду часу (декілька секунд або хвилин). Це явище суттєво обмежує час спостереження, який необхідний для аналізу проб. Тому, враховуючи унікальні оптичні властивості квантових точок CdS, що зумовлені квантово-розмірним ефектом, високою яскравістю флуоресценції, довготривалою фотостабільністю, їх розглядають як новий клас флюороохромів [172].

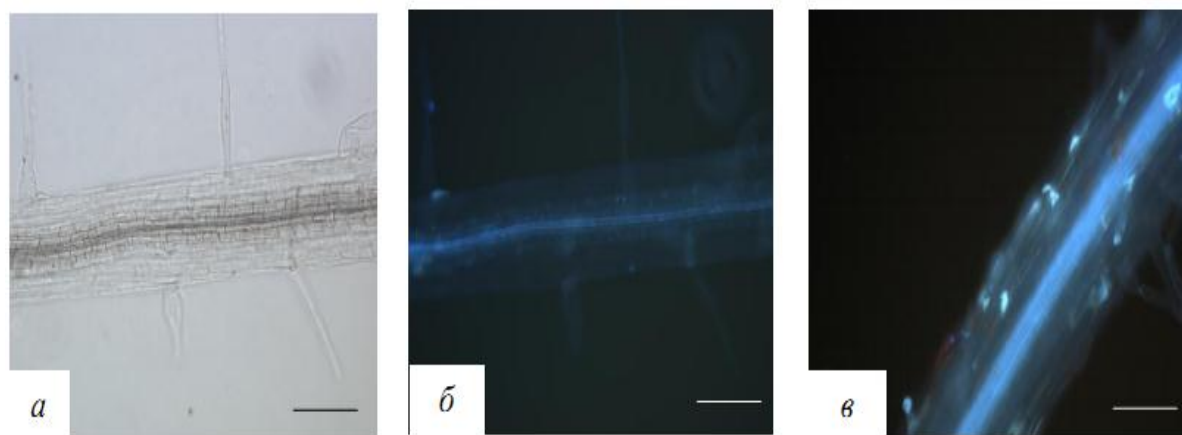


Рис. 6.12. Мікрофотографії клітин кореня *L. maroccana*: а – прохідне світло; б – контроль (необроблені клітини); в – клітини, оброблені квантовими точками CdS, синтезованими за використання *P. ostreatus*. Масштаб 20 мкм

Для дослідження проникнення та локалізації квантових точок CdS використовували клітини коренів *L. maroccana*, епідермальні клітини *A. sera*, а також клітини лінії HeLa. Рис. 6.12. ілюструє використання квантових точок CdS, що отримані нами за допомогою зазначених живих систем, для прижиттєвої візуалізації епідермальних клітин кореня *L. maroccana*. Як видно з рисунка, у контрольних зразках (рис. 6.12 б) не спостерігалось вираженої люмінесценції епідермальних клітин кореня. У той же час, після 24-годинної обробки квантовими точками CdS, синтезованих з використанням грибної та рослинної матриць, спостерігалась виражена люмінесценція епідермальних клітин у діапазоні довжин хвиль 420 – 485 нм. Це корелює зі спектральними характеристиками квантових точок CdS.

Крім того, було показано проникнення та локалізацію отриманих нами квантових точок на ядрах епідермальних клітин *A. sera* (рис. 6.13). При цьому у контрольних зразках (рис. 6.13б) не спостерігалось чіткої візуалізації ядер. Однак, після 24-годинної обробки епідермальних клітин *A. sera* розчином квантових точок CdS (3,75 мг/мл) спостерігалась люмінесценція ядер у діапазоні довжин хвиль 420 – 485 нм. Оскільки, довжина хвилі збуджуючого

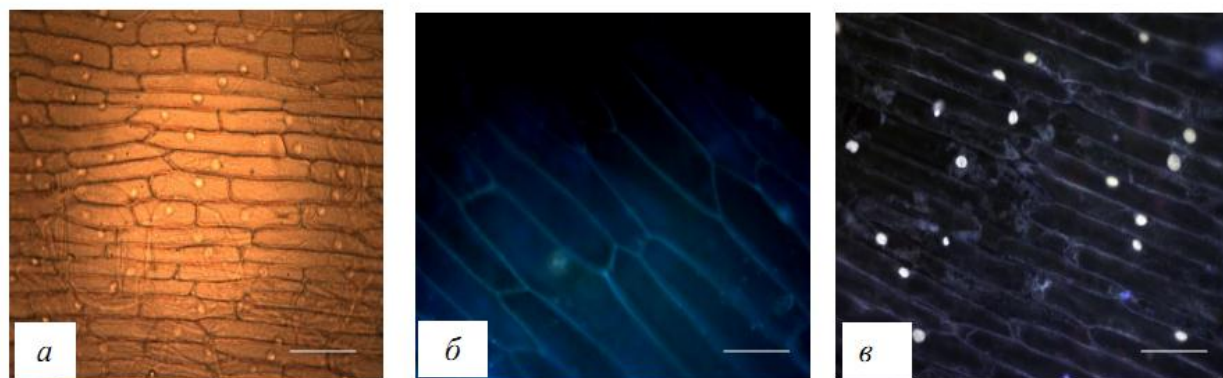


Рис. 6.13. Мікрофотографії клітин *A. sera*: а – прохідне світло; б – контроль (необроблені клітини); в – клітини, оброблені квантовими точками CdS синтезованими за використання *P. ostreatus*. Масштаб 200 мкм

випромінення складала 340 – 380 нм, то люмінесценція знаходилася в області видимого світла, що відповідає синьому та блакитному кольорам. Важливими параметрами при використанні квантових точок у клітинній візуалізації є стабільність, розмір, хімічний склад, наявність специфічних оболонки навколо ядра квантових точок.

Останнім часом проведено значну кількість досліджень, результатом яких стала розробка високо люмінесцентних водорозчинних зондів на основі напівпровідникових квантових точок [173]. Однак, варто зазначити, що переважна більшість комерційних квантових точок, що знаходять своє застосування як люмінесцентні маркери отримані хімічними методами. Нами ж вперше показана і підтверджена можливість використання кадмій-вмісних квантових точок, що синтезовані за використання біологічних об'єктів, як люмінесцентних проб для мікроскопічних досліджень. При візуалізації наночастинок у клітинах важливо враховувати їх розміри, діапазон розмірів частинок у межах 2 – 8 нм є оптимальним при їх проникненні через мембрану досліджуваних нами клітин. На рис. 6.14 показано результати скануючої тунельної мікроскопії клітин HeLa, що експресують химерний ген GFP (зеленого флуоресцентного білка), злитий з геном білка ендоплазматичного ретикулула, оброблених квантовими точками CdS, синтезованих за допомогою *P. ostreatus*. Встановлено, що синтезовані квантові точки проникають у клітини HeLa, та локалізуються переважно на ендоплазматичному ретикулумі, що позначено стрілками на мікрофотографії (результати спільних досліджень, проведених з д.б.н. Р. Білим (Інститут біології клітини НАН України). Як зазначалося, синтез квантових точок за допомогою біологічних матриць зумовлює формування навколо кадмій-вмісної квантової точки біологічного покриття, що сприяє підвищенню їх біологічної сумісності та суттєвому зниженню токсичних впливів [168]. Отримані методом «зеленого» синтезу квантові точки CdS є стабільними протягом 3 місяців, а також водорозчинними, на відміну від нанокристалів, синтезованих методами хімічного синтезу, отримані нами

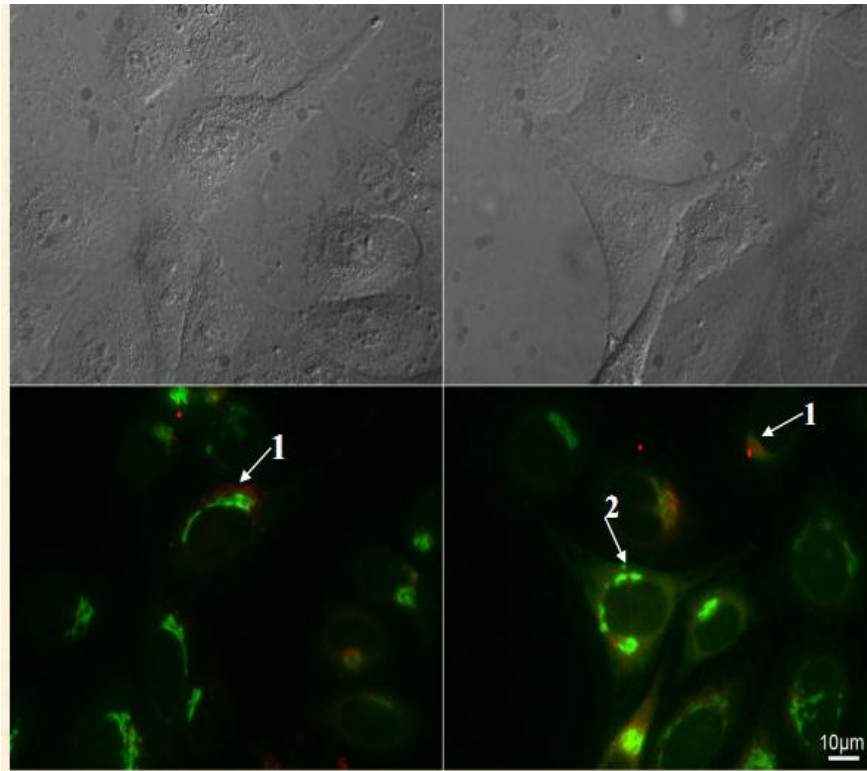


Рис. 6.14. Ко-локалізація синтезованих квантових точок CdS: 1 – квантові точки CdS; 2 – зелений флюоресцентний білок (GFP), асоційований з білком ендоплазматичного ретикулума. Масштаб 10 мкм

квантові точки не потребують додаткових модифікацій, спрямованих на переведення їх у водорозчинну форму. Для них характерна висока інтенсивність люмінесценції у діапазоні довжин хвиль видимого світла, який відповідає синьому та блакитному кольорам.

Для візуалізації біологічних об'єктів або процесів квантові точки можна вводити в об'єкт як безпосередньо без жодних кон'югатів, або з кон'югованими молекулами, зазвичай це антитіла, олігонуклеотиди тощо. Нанокристали проникають та розподіляються в об'єкті відповідно до своїх властивостей. Оскільки розмір визначає колір флюоресценції нанокристалів, різні складові клітини або цілого організму забарвлюються неоднаково [12].

Вже показано можливість застосування квантових точок різного складу, а саме PbS, CdTe, CdSe/ZnS для візуалізації клітин *in vitro*. Зокрема, CdTe ви-

користували як мітки у клітинах *Salmonella typhimurium*. За допомогою квантових точок CdSe/ZnS було візуалізовано клітини HeLa. Було встановлено, що квантові точки акумулюються у везикулах, поглинаючи їх шляхом ендоцитозу [12]. Апоптичні клітини також можна візуалізувати за допомогою квантових точок. Функціоналізовані квантові точки CdTe використовують для маркування внутрішньоклітинних білків. Зокрема, квантові точки, кон'юговані зі стрептавідином використовують як люмінесцентні маркери для поверхневиз рецепторів клітин. Завдяки своїм люмінесцентним властивостям квантові точки є ефективними мітками для моніторингу та діагностики пухлинних клітин [12].

Отже, синтезовані нами квантові точки сульфїду кадмію характеризуються люмінесцентними властивостями, низькою токсичністю, що у поєднанні з нанорозміром дозволяє застосовувати їх як безпечні флюоресцентні зонди нового покоління.



## РОЗДІЛ 7

### ФУНКЦІОНАЛІЗАЦІЯ ПОВЕРХНІ КВАНТОВИХ ТОЧОК CdS

Важливо відзначити, що для подальших практичних застосувань квантових точок необхідною умовою є дослідження процесу біофункціоналізації їхньої поверхні, оскільки наночастинки, функціоналізовані специфічними лігандами, мають спорідненість до цільових клітинних структур. Вважають, що завдяки нанорозміру та унікальним флюоресцентним властивостям напівпровідникові наночастинки можуть потенційно бути застосованими у каталізі як чутливі елементи, у медицині як біосенсори, а також як засоби адресної доставки ліків або як мітки для визначення локалізації пухлин [174]. Полімери широко використовуються для створення захисного покриття навколо наночастинок через те, що контакт Cd-вмісних наночастинок з біологічним середовищем здійснюється саме через їхню поверхню. Органічні матеріали обумовлюють розчинність та підвищену оптичну стабільність квантових точок у воді. У той же час, полімерні матеріали є носіями іонних або реакційноздатних функціональних груп, які забезпечують використання біосумісних квантових точок для біовізуалізації та детектування клітинних структур [175]. Зокрема, потенційними гідрофільними лігандами для функціоналізації є аміно-ліганди, у яких N-донори взаємодіють з поверхнею наночастинок [176]. Також широко розповсюдженим методом функціоналізації наночастинок є використання інертного гідрофільного покриття з поліетиленгліколю (ПЕГ). Модифіковані ПЕГ наночастинки неімуногенні для біологічної тест-системи, окрім того, ПЕГ перешкоджає агрегації квантових точок та суттєво знижує їх токсичність [177].

Отже, даний етап роботи був орієнтований на розробку методики модифікації поверхні наночастинок CdS за допомогою різних хімічних агентів. У результаті проведеного дослідження було проаналізовано характер спектрів люмінесценції функціоналізованих наночастинок сульфїду кадмію у порівнянні з вихідними колоїдними розчинами наночастинок CdS.

## 7.1. Оптична спектроскопія наночастинок CdS, функціоналізованих за допомогою ПЕГ

Функціоналізація поверхні наночастинок є необхідною передумовою для їх впровадження у клітинно-біологічні та біомедичні застосування. Основною вимогою до синтезованих наночастинок є їх гомогенність та розчинність у воді. Наночастинки функціоналізують з метою надання їм наступних властивостей: підвищеної стабільності у водних розчинах протягом тривалого часу, наявності на поверхні наночастинок стерично-доступних функціональних груп для біокон'югації, біосумісності та неімуногенності у живих системах [178]. Існують два основні підходи до модифікації поверхні квантових точок, які базуються на гідрофобних взаємодіях амфіфільних молекул з квантовими точками та на взаємодіях полярних груп органічного покриття з поверхнею квантової точки (обмін лігандами) [179]. Відповідно, запропоновано включення квантових точок у фосфоліпідний шар ліпосом [180] чи покриття поверхні квантових точок гідрофільними лігандами, амфіфільними полімерами або оксидом кремнія [179].

Покриття поверхні наночастинок гідрофільними незарядженими молекулами поліетиленгліколю (ПЕГ) є досить розповсюдженим методом функціоналізації. Даний полімер, огортаючи поверхню квантових точок, значно підвищує їх колоїдну стабільність та біосумісність, перешкоджає додатковій агрегації частинок. У випадку застосування таких кон'югатів *in vivo* ПЕГ не викликає імунної відповіді. Тому нами було здійснено модифікацію поверхні квантових точок CdS, що синтезовані з використанням грибного міцелію *P. ostreatus*, за допомогою ПЕГ. При цьому ставилося на меті максимально зберегти люмінесцентні властивості функціоналізованих наночастинок. Адже саме оптична спектроскопія є ключовим методом дослідження взаємодії полімерів з поверхнею квантових точок.

На рис. 7.1 наведено спектри фотолюмінесценції квантових точок CdS, вихідного водного розчину ПЕГ та функціоналізованих ПЕГ квантових точок CdS при збудженні випроміненням з довжиною хвилі  $\lambda=340$  нм.

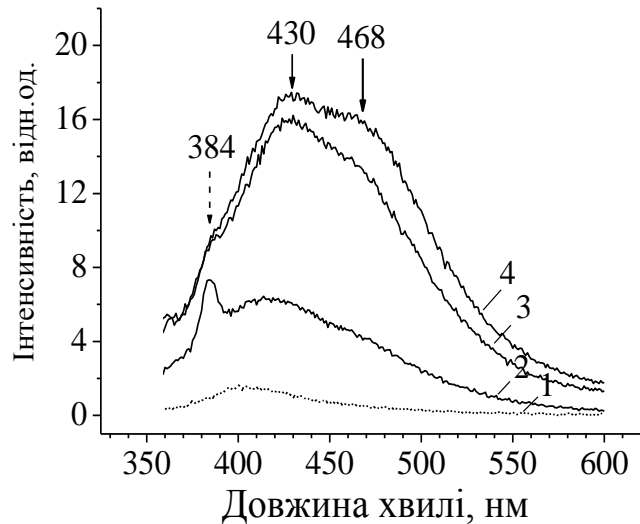


Рис. 7.1. Спектри фотолюмінесценції наночастинок CdS (*P. ostreatus*): 1 – вода; 2 – ПЕГ; 3 – квантові точки CdS; 4 – функціоналізовані квантові точки CdS. Збудження  $\lambda=340$  нм

Спектр люмінесценції вихідного розчину ПЕГ має виражений гострий пік на довжині хвилі 384 нм та розмитий максимум від 400 нм до 500 нм (рис. 7.1, крива 2). Спектр люмінесценції вихідних квантових точок CdS характеризується широкою куполоподібною смугою з вираженим максимумом в області 430 нм (рис. 7.1, крива 3) і має досить високу інтенсивність. Такий максимум є характерним саме для біосинтезованих наночастинок сульфїду кадмію. Крива 4 на рис. 7.1 демонструє спектр наночастинок сульфїду кадмію, функціоналізованих ПЕГ.

У результаті функціоналізації інтенсивність люмінесценції дещо зростає. Для цього спектру характерною є певна зміна форми, а саме, підйом інтенсивності в області довжин хвиль 460 – 470 нм, який відсутній у вихідному розчині наночастинок CdS. Важливо підкреслити, що спектр системи, утвореної

в наслідок функціоналізації, відрізняється від спектрів вихідних компонентів – розчинів ПЕГ та наночастинок CdS. Це підтверджується і відсутністю максимуму при  $\lambda=384$  нм, характерного для вихідного розчину ПЕГ. Отже, експериментальний спектр (рис 7.1, крива 4) свідчить про утворення зв'язаного стану ПЕГ та наночастинок CdS.

На рис. 7.2. наведено спектр фотолюмінесценції цих же сполук при збудженні випроміненням з довжиною хвилі  $\lambda=380$  нм.

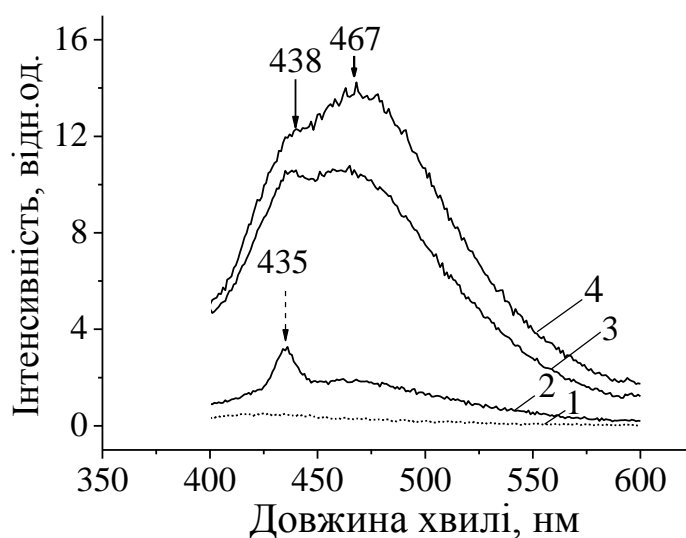


Рис. 7.2. Спектри фотолюмінесценції наночастинок CdS (*P. ostreatus*): 1 – вода; 2 – ПЕГ; 3 –квантові точки CdS; 4 – функціоналізовані квантові точки CdS. Збудження  $\lambda=380$  нм

Як видно з рисунка, і при цьому збудженні спостерігається та ж сама якісна картина змін у спектрі люмінесценції наночастинок CdS, функціоналізованих ПЕГ спостерігається поява протяжного максимуму у діапазоні довжин хвиль 450 – 475 нм. Отже, ефект, що обговорюється, не пов'язаний з особливістю селективного збудження певною фіксованою довжиною хвилі, а спостерігається у деякому спектральному діапазоні світла, яке збуджує спектри фотолюмінесценції досліджуваних речовин.

## 7.2. Оптична спектrophотометрія наночастинок CdS, функціоналізованих за використання БСА

Окрім ПЕГ для біофункціоналізації наночастинок CdS нами також було використано бичачий сировотковий альбумін (БСА), який являє собою низькомолекулярний протеїн крові, що складається з 580 амінокислотних залишків [181]. В літературі описано деякі методи синтезу напівпровідникових квантових точок CdS з використанням БСА як захисного компонента, що стабілізує та знижує токсичність кадмієвмісних наночастинок [182, 183]. За рахунок зв'язування білкових молекул з поверхнею наночастинок досягається стерична стабілізація нанорозмірного CdS. З іншого боку, амінокислотні залишки, що входять до структури БСА, можуть формувати на поверхні наночастинок центри зв'язування з молекулами білкової природи, що є передумовою для створення біокон'югатів для подальших біологічних застосувань.

На рис. 7.3. представлено спектри фотолюмінесценції вихідних розчинів – квантових точок CdS та водного розчину БСА, а також функціоналізованих за допомогою БСА квантових точок CdS. Спектр люмінесценції вихідного розчину БСА (рис.8.3. крива 4) має певні особливості, а саме, помітний пік люмінесценції у короткохвильовій області при 384 нм та виражений протяжний максимум при 430 нм, що плавно спадає. Спектр люмінесценції вихідного розчину наночастинок CdS є типовим для наночастинок такого складу (рис. 7.3, крива 2). Варто підкреслити, що як і у випадку системи «наночастинок CdS – ПЕГ», результуючий спектр функціоналізованих наночастинок (рис. 7.3, крива 3) не зводиться до суми спектрів компонентів. Спостерігається перерозподіл інтенсивності люмінесценції: поява плеча інтенсивності в області  $\lambda=467$  нм та згладжування піку у короткохвильовому діапазоні при  $\lambda=384$  нм. Як і у випадку наночастинок, функціоналізованих ПЕГ, зазначені спектральні особливості свідчать про перехід БСА у зв'язаний стан з поверхнею квантових точок CdS, що змінює спектр люмінесценції наночастинок CdS. Важливо, що як ПЕГ, так і БСА схожим чином

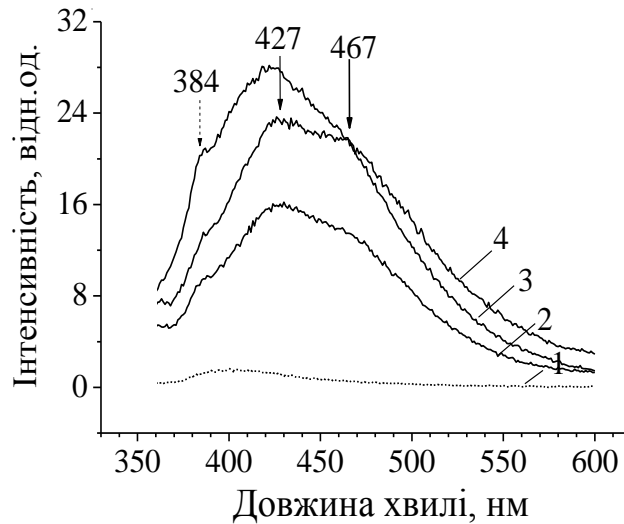


Рис. 7.3. Спектри фотолюмінесценції наночастинок CdS (*P. ostreatus*): 1 – вода; 2 – вихідні квантові точки CdS; 3 – функціоналізовані БСА квантові точки CdS; 4 – розчин БСА. Збудження  $\lambda=340$  нм

модифікують спектр люмінесценції квантових точок CdS – і в одному, і в іншому випадках зростає інтенсивність спектру в області 460 нм – 470 нм.

На рис. 7.4. представлено спектри фотолюмінесценції вихідних компонентів та функціоналізованих БСА квантових точок CdS при збудженні випромінюванням з довжиною хвилі  $\lambda=380$  нм. Подібно до збудження наночастинок CdS, функціоналізованих ПЕГ, цією довжиною хвилі, також спостерігається поява розмитого максимуму в області 455 – 470 нм.

Таким чином, експериментальне дослідження спектрів фотолюмінесценції функціоналізованих ПЕГ квантових точок CdS та функціоналізованих БСА квантових точок CdS при двох енергіях збуджуючого випромінювання дозволило виявити зміни спектрів їх люмінесценції у порівнянні зі спектрами люмінесценції вихідних компонентів. Основний експериментальний результат полягає у тому, що в спектрах вказаних систем виникає протяжний максимум в області 455 – 470 нм не залежно від типу функціоналізатора (ПЕГ чи БСА). Оскільки спектри функціоналізованих наночастинок не містять особливостей, характерних для спектрів вихідних розчинів сполук ПЕГ та БСА (максимуми при 384 та 435 нм), то можна вважати, що функціоналізуючі агенти

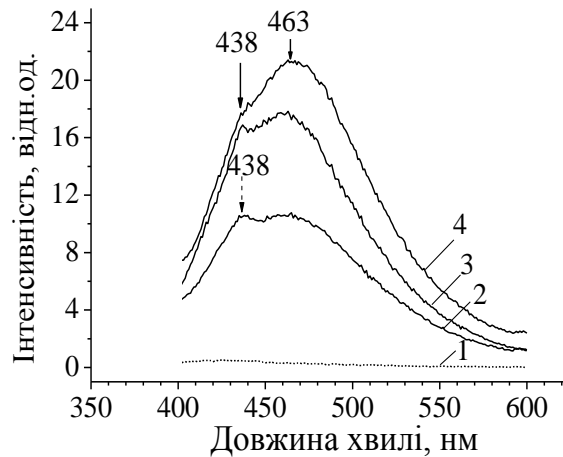


Рис. 7.4. Спектри фотолюмінесценції наночастинок CdS (*P. ostreatus*): 1 – вода; 2 – вихідні квантові точки CdS; 3 – розчин БСА; 4 – функціо-  
налізовані БСА квантові точки CdS. Збудження  $\lambda=380$  нм

перейшли у зв'язаний стан з поверхнею наночастинок CdS. Однак, у попередніх роботах [133, 153] було показано, що наночастинки, синтезовані у присутності біологічних матриць, мають властивості, відмінні від наночастинок, синтезованих поширеними хімічними методами. Це проявляється у зміні їх оптичних характеристик та цитотоксичності. Отже, наночастинки CdS, отримані за допомогою біоматриць, вже мають складний характер поверхневого шару, в морфології якого відіграють роль елементи, пов'язані з матрицями. Тому функціоналізація таких поверхонь з використанням ПЕГ та БСА повинна включати як взаємодію цих речовин з компонентами поверхні біологічного походження, так і з CdS-ядром наночастинок. Поява максимуму в спектрах люмінесценції функціоналізованих систем у більш довгохвильовій області порівняно з основним максимумом вихідних наночастинок може відображувати утворення на поверхні наночастинок CdS видовжених ланцюгів з комплексів «ПЕГ, БСА – біологічне покриття – наночастинка CdS», яким відповідають більш низькочастотні оптичні переходи при зовнішньому збудженні.

Таким чином, показано, що

1. Спектри фотолюмінесценції функціоналізованих наночастинок CdS мають відмінності від спектрів вихідних наночастинок CdS, а саме, в області довжин хвиль 460 – 470 нм спостерігається поява протяжного максимуму, відсутнього у спектрах вихідних наночастинок.
2. Спектри не містять максимумів, характерних для вихідних розчинів ПЕГ та БСА, що свідчить про перехід молекул ПЕГ та БСА у зв'язаний стан з наночастинками CdS.
3. Відбувається формування модифікованого молекулами ПЕГ та БСА поверхневого шару квантових точок CdS з утворенням комплексів «ПЕГ, БСА – біологічне покриття – наночастинка CdS». Варіювання складу функціоналізуючих речовин та біологічних матриць, обраних для синтезу квантових точок CdS, відкриває можливості спрямованих змін поверхнево-чутливих властивостей, зокрема, поверхневої адгезії, створених нами квантових точок CdS.



## УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті виконання дисертаційної роботи було розроблено легко відтворювані методики «зеленого» синтезу напівпровідникових наночастинок CdS за використання біологічних матриць (*Escherichia coli*, *Pleurotus ostreatus*, *Linaria maroccana*, *Nicotiana tabacum*), які є більш доступними, швидкими, їх виконання не супроводжується утворенням токсичних відходів. Водночас, проведення біологічного синтезу не потребує високих температур, тиску, а також токсичних хімічних розчинників та стабілізаторів. Отже, нами вперше продемонстровано можливість синтезу квантових точок CdS, за допомогою таких об'єктів, як базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus*, та рослинні екстракти – культуру «бородатих» коренів *Linaria maroccana*, суспензійну культуру клітин тютюну *Nicotiana tabacum* (BY-2).

Бактерію *E. coli* було обрано, спираючись на опубліковані раніше роботи, які підтверджують ефективність застосування мікроорганізмів для отримання стабільних розчинів напівпровідникових наночастинок з вираженими люмінесцентними властивостями [44, 114, 115]. Крім того, через доступність, та легкість культивування *E. coli* вважається широковживаним об'єктом для різних біологічних досліджень. Як відомо, біосинтез квантових точок умовно поділяють на внутрішньоклітинний та позаклітинний, відповідно до місця локалізації сформованих наночастинок [43]. В основу внутрішньоклітинного синтезу покладено транспорт відповідних іонів металів всередину клітин та подальше формування наночастинок у клітинах під впливом бактеріальних ферментів. З іншого боку, позаклітинний синтез квантових точок відбувається шляхом захоплення цільових іонів металів на поверхні живих клітин з подальшим відновленням відповідних іонів у присутності ферментів [43]. При цьому слід підкреслити, що перевага надається саме позаклітинному механізму біосинтезу наночастинок, оскільки сформовані у такий спосіб напівпровідникові наночастинок не потребують розробки додаткових методик щодо

їхнього виділення з клітин та очищення від біоматриксу для подальших практичних застосувань.

Отримані нами результати підтверджують, що використання біоматриці на основі *E. coli* дозволяє отримувати нанорозмірні квантові точки сульфід кадмію позаклітинно. Варто зауважити, що у більшості подібних робіт описано формування квантових точок всередині бактеріальних клітин [44, 114]. Нами показано, що максимум люмінесценції синтезованих квантових точок CdS знаходиться на довжині хвилі 443 нм, що є типовим для наночастинок сульфід кадмію, синтезованих з використанням мікроорганізмів. Крім того, за допомогою оптичного спектрального аналізу вперше досліджено стабільність утворених квантових точок. Встановлено, що наночастинок CdS з часом частково агломерують в колоїдному розчині, однак зберігають здатність до незмінної люмінесценції протягом трьох місяців після синтезу. З використанням методу трансмісійної електронної мікроскопії продемонстровано, що квантові точки мають форму близьку до сферичної, не мають поверхневих дефектів та мають діаметр від 5 нм до 10 нм.

Наступним завданням представленої роботи була розробка методики біологічного синтезу квантових точок CdS за використання як матриці базидіального гриба *P. ostreatus* (гливи). Грибні системи є досить ефективними, оскільки вони мають власні ферменти – сульфатредуктази, які при виділенні у середовище, за наявності відповідних солей металів, здійснюють відновлення сульфатних груп, що врешті призводить до синтезу наночастинок CdS позаклітинним шляхом. Також суттєво, що гриби набагато ефективніше, у порівнянні з бактеріями, секретують у середовище білки, що сприяє отриманню високого виходу наночастинок [120]. Крім того, вибір зазначеного гриба (родина *Pleurotaceae*) був обумовлений тим, що він є їстівним грибом, одночасно характеризується антибактеріальною та протипухлинною активністю, тому його екстракти є важливою сировиною для виготовлення деяких медичних препаратів [184].

Методом біологічного синтезу під час культивування міцелію гриба *P. ostreatus* із солями  $\text{CdSO}_4$  та  $\text{Na}_2\text{S}$  нами позаклітинним шляхом було отримано квантові точки CdS. За допомогою спектрального аналізу встановлено, що отримані піки поглинання (453 нм) та люмінесценції (462 нм) синтезованих квантових точок є типовими для наночастинок CdS. Використовуючи метод трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) продемонстровано, що отримані квантові точки у середньому мають діаметр 3,5 нм – 5,5 нм. Методом електроннографії встановлено, що для біосинтезованих наночастинок CdS характерною є структура кристалічної ґратки, яка відповідає модифікації вюрцит.

У той же час, нещодавно було показано, що саме рослинні екстракти мають певні переваги як матриці для біосинтезу квантових точок у порівнянні з мікроорганізмами. Культури рослин є доступним екологічним матеріалом, який дозволяє отримати високий приріст рослинної біомаси у контрольованих умовах. Крім того, деякі рослинні екстракти містять велику кількість органічних біомолекул, а саме, алкалоїди, терпени, феноли, флаваноїди, що опосередковують синтез наночастинок, перешкоджаючи їх агрегації [139]. Таким чином, зважаючи на переваги рослинних фітоємностей, нами було розроблено технологію позаклітинного біологічного синтезу напівпровідникових наночастинок CdS шляхом культивування біоматриці, отриманої на основі культури «бородатих» коренів *Linaria maroccana* L з неорганічними солями  $\text{CdSO}_4$  та  $\text{Na}_2\text{S}$ . За допомогою оптичного спектрального аналізу встановлено, що піки поглинання квантових точок CdS відповідають довжинам хвиль 362, 398 та 464 нм, у той час як максимумами люмінесценції знаходяться на довжинах хвиль 425, 462 та 500 нм. При використанні методу ТЕМ було виявлено, що синтезовані наночастинки мають розміри в діапазоні 5 – 7 нм та не містять помітних поверхневих дефектів. Отримані результати вперше характеризують особливості біосинтезу квантових точок за використання культури «бородатих» коренів.

Крім того, нами запропоновано нову методику біологічного синтезу нанорозмірних частинок CdS за використання суспензійних клітин тютюну *N.*

*tabacum* (BY-2). Було встановлено, що у спектрі поглинання отриманих зразків спостерігається максимум, який відповідає довжині хвилі 292 нм. У спектрі фотолюмінесценції було зафіксовано пік на довжині хвилі 381 нм. Дані TEM добре узгоджуються з результатами оптичного аналізу зразків. Зокрема, виявлено, що максимум розподілу наночастинок CdS за розмірами припадає на область 3,0 – 4,0 нм (Додаток Б). Виражені люмінесцентні властивості, а також стабільність утворених зразків протягом щонайменше місяця зумовлюють можливість використання квантових точок CdS у ролі люмінесцентних зондів для візуалізації клітин або як чутливих біосенсорів для визначення окремих біомолекул (ДНК, білків, тощо) у клітині.

Для цього було досліджено можливий цитотоксичний вплив квантових точок на клітини, що саме визначає можливості подальшого практичного застосування таких квантових точок. Відомо, що цитотоксичність залежить від ряду фізико-хімічних параметрів, зокрема, особливостей хімічного стану поверхні, розміру квантових точок, їх заряду, стабільності у розчині [185]. При цьому токсичні ефекти напівпровідникових наночастинок зумовлені не лише хімічними властивостями самих наночастинок, але й взаємодією їх з оточуючим середовищем та функціональними групами органічних лігандів, що оточують їхню поверхню [186]. Оскільки до складу квантових точок входить кадмій, що має токсичний вплив на живі організми, важливим завданням є оцінка цитотоксичних ефектів наночастинок сульфід кадмію, синтезованих за розробленими методиками.

У результаті проведених досліджень нами було показано, що використання низьких концентрацій квантових точок не має жодних негативних впливів на морфологію та життєздатність рослинних клітин (на прикладі рослинних протопластів, як найбільш чутливої моделі) При використанні квантових точок CdS у концентраціях 6 – 12 мкг/мл відсоток неушкоджених протопластів як найбільш чутливої моделі рослинних тест-систем, знаходився у межах 80 – 90 %. При цьому варто відзначити, що використання квантових точок, що отримані хімічними методами у діапазоні зазначених концентрацій, виявило-

ся надзвичайно токсичним для досліджуваних організмів. Негативні ефекти проявлялися у зростанні активності антиоксидантних ферментів, зміні морфології клітин, фрагментації ядер [162, 164, 165]. Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що органічне покриття біологічного походження, яке скоріше за все створюють ферменти, вторинні метаболіти, що секретуються у позаклітинне середовище під час біосинтезу наночастинок, сприяє зниженню їх цитотоксичності, а також додатково стабілізує утворений колоїдний розчин квантових точок, перешкоджаючи їх передчасній агрегації. При цьому, отримані нами дані корелюють з роботою [160], автори якої також дійшли висновку щодо зниження негативних ефектів квантових точок за умови їх оточення різними типами органічних лігандів. Подібні результати отримані нами не лише на рослинних клітинах, а й на пухлинних клітинах епітеліального походження HeLa. Виявлено, що квантові точки CdS, отримані за допомогою трьох різних біологічних матриць, не є вкрай токсичними відносно клітин HeLa. Найменш токсичними виявилися наночастинок, синтезовані за допомогою грибною матриці. Крім того, було показано, що отримані нами квантові точки CdS, знижують адгезивні властивості пухлинних клітин HeLa. Особливо даний ефект виражений також для квантових точок, синтезованих за використання *P. ostreatus*. Отриманий результат визначає важливу властивість синтезованих наночастинок CdS, може спричиняти зниження злоскісності пухлинних клітин.

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 у концентраціях 0,13 та 0,4 мг/мл не впливають суттєво на життєздатність мух. Наночастинок CdS не чинили генотоксичного або мутагенного впливу на *D. melanogaster*. Середня кількість життєздатних особин становила 20 – 25 у порівнянні з контролем (28 життєздатних особин). Отримані результати свідчать про те, що при такому біологічному синтезі квантових точок спостерігається суттєве зниження токсичних власти-

востей кадмію. Низький токсичний вплив кадмієвмісних наночастинок пов'язують з наявністю специфічних біомолекул навколо них, які відіграють важливу роль під час біосинтезу.

Крім того, показано можливість подальшого використання синтезованих нами квантових точок CdS як люмінесцентних міток у клітинно-біологічних розробках. Наночастинки завдяки нанорозмірам здатні легко проникати всередину клітин, локалізуватися переважно в області ядра у клітинах *A. sera*, в епідермальних клітинах кореня *L. maroccana*, а також зв'язуватися з ендоплазматичним ретикулулом клітин HeLa, що підтверджено даними люмінесцентної та лазерної скануючої мікроскопії. Слід зазначити, що така локалізація квантових точок CdS залежить від типу матриці, що була використана при їх синтезі.

Нами також розроблено методику функціоналізації синтезованих квантових точок, оскільки відомо, що функціоналізовані наночастинки можуть цілеспрямовано зв'язуватися з біомолекулами (ДНК, білками, тощо) завдяки наявності на поверхні відповідних функціональних груп. Крім того, наночастинки, які оточені полімерами, характеризуються підвищеною проникністю через клітинні мембрани. У той же час, полімерні матеріали є носіями іонних або реакційноздатних функціональних груп, які забезпечують використання біосумісних квантових точок для візуалізації та детектування внутрішньоклітинних структур [175]. Функціоналізацію квантових точок CdS (*P. ostreatus*) проводили за використання ПЕГ та БСА. Досліджено спектри фотолюмінесценції наночастинок CdS, функціоналізованих ПЕГ та наночастинок CdS, що функціоналізовані БСА при двох довжинах хвиль збуджувального випромінювання 340 та 380 нм. Встановлено, що спектри фотолюмінесценції функціоналізованих наночастинок CdS мають відмінності від спектрів вихідних наночастинок CdS, а саме, в області довжин хвиль 460 – 470 нм спостерігається поява протяжного максимуму, відсутнього у спектрах вихідних наночастинок. Крім того, спектри не містять максимумів, характерних для вихідних розчинів ПЕГ та БСА, що свідчить про перехід молекул ПЕГ та БСА у

зв'язаний стан з наночастинками CdS. Функціоналізація розширює можливості модифікації поверхні кадмій-вмісних квантових точок. Це, у свою чергу, є необхідним для подальших біологічних застосувань даних наночастинок як люмінесцентних зондів, оскільки створює на їх поверхні інертне покриття визначеного хімічного складу, що є передумовою для взаємодії функціоналізованих наночастинок CdS із цільовими молекулами (олігонуклеотидами, білками, антитілами, тощо).

## 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 *Escherihia 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» *Linar-ia 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.

6. 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.

7. 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.

Розроблені відтворювані методики позаклітинного «зеленого» синтезу напівпровідникових наночастинок CdS є більш доступними швидкими та безпечними у порівнянні з хімічно синтезованими квантовими точками CdS.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Klimov VI. Spectral and dynamical properties of multiexcitons in semiconductor nanocrystals. *Annu Rev. Phys. Chem.* 2007 Dec;58(1): 635-673.
2. Valizadeh A, Mikaeili H, Samiei M, Farkhani S, Zarghami N, Kouhi M, et al. Quantum dots: synthesis, bioapplications and toxicity. *Nanoscale Res Lett.* 2012 Aug 28;7(1):1-14.
3. Li J, Wu D, Miao Z, Zhang Y. Preparation of quantum dot bioconjugates and their applications in bio-imaging. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010 Sep 1;11(6): 662-671.
4. Кравцова АН, Грибкова НС, Лесняк ВИ. Электронное учебное пособие “Полупроводниковые коллоидные квантовые точки”. Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета; 2017. 31 с.
5. Моисеев СГ, Виноградов СВ. Основы нанофизики. Ульяновск: УЛГТУ; 2010. 40 с.
6. Парфенов ВВ. Квантово-размерные структуры в электронике: опто-электроника. Казань: КПФУ; 2007. 16 с.
7. Федоров АВ, Рухленко ИД, Баранов АВ, Кручинин СЮ. Оптические свойства полупроводниковых квантовых точек. Санкт-Петербург: Наука; 2011. 188 с.
8. Brus LE. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *J. Chem Phys.* 1984 Jan;80(9):4403-09.
9. Sergeev GB, Klabunde KJ. *Nanochemistry*. 2nd ed: Elsevier; 2013. 372 p.
10. Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, Pocock R, Imani M, Seifalian AM. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials.* 2007 Jul 10;28(31): 4717-32.

11. Yu W, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* 2003 Apr; 15(14): 2854-60.
12. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science.* 2005 Jan;307(5709):538-544.
13. Милехин АГ, Свешникова ЛЛ, Репинский СМ, Гутаковский АК, Фридрих М, Цан ДРТ. Оптические колебательные моды в квантовых точках (Cd, Pb, Zn)S в матрице Ленгмюра–Блоджетт. *ФТТ.* 2002 Сен;44(10):1884-87.
14. Franchi S, Trevisi G, Seravalli L, Frigeri P. Quantum dot nanostructures and molecular beam epitaxy. *Prog Cryst Growth Charact Mater.* 2003 Dec; 47 (2–3):166-195.
15. Кульбачинский В.А. Полупроводниковые квантовые точки. *Соросовский образовательный журнал.* 2001;7(4):98-104.
16. Bru-Chevallier C, El Akra A, Pelloux-Gervais D, Dumont H, Canut B, Chauvin N, et al. In-GaAs quantum dots grown by molecular beam epitaxy for light emission on Si substrates. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Oct; (10):9153-9159.
- 17 Kobayashi M., Nakamura S., Wakao K., Yoshikawa A. Molecular beam epitaxy of CdS self-assembled quantum dots on ZnSe. *J Vac Sci Technol B.* 1998 Dec;16 (3):1316-20.
18. Lavrent'eva LG. Kinetics of gallium arsenide doping in gas-phase epitaxy. Chapter. *Growth of Crystals.* Springer Book. ed by K.S. Bagdasarov et al. Springer. New York; 1991. 141-153.
19. Meyne C, Pohl UW, Richter W, Straburg M, Hoffmann A, Turck V, Bimberg D, et al. Quantum island formation in CdS/ZnS heterostructures grown by MOVPE. *J Cryst Growth.* 2000 Jun;214:722-726.
20. Levinson H.J. *Principles of lithography* 3rd ed. Washington: SPIE Press; 2010. 504 p.

21. Altissimo M. E-beam lithography for micro-/nanofabrication. *Biomicrofluidics*. 2010 Jun 15;4 (2):1-6.
22. Chou SY, Krauss PR, Renstrom PJ. Nanoimprint lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B*. 1996 Aug 17;14(6): 4129-33.
23. Bertino MF, Gadipalli RR, Martin LA, Rich LE, Yamilov A, Heckman BR, et al. Quantum dots by ultraviolet and x-ray lithography. *Nanotechnology*. 2007 Jul;18(31):1 – 6.
24. Zhang Y, Clapp A. Overview of stabilizing ligands for biocompatible quantum dot nanocrystals. *Sensors*. 2011 Nov;11(12):11036-055.
25. Murray CB, Norris DJ, Bawendi MG. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* 1993 Mar;115(19): 8706-15.
26. Farkhani SM, Valizadeh A. Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots. *IET Nanobiotechnology*. 2012 Nov 29; 8(2): 59-76.
27. Peng XG, Wickham J, Alivisatos AP. Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: "Focusing" of size distributions. *J Am Chem Soc*. 1998 May;120(21):5343-44.
28. Bailey RE, Smith A, Nie S. Quantum dots in biology and medicine. *Physica E*. 2004 Jul;25(1):1-12.
29. Talapin DV, Haubold S, Rogach AL, Kornowski A, Haase M, Weller H. A novel organometallic synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals. *J Phys Chem B*. 2001 Sep;105:2260-63.
30. Gaponik N, Talapin DV, Rogach AL, Hoppe K, Shevchenko EV, Kornowski A, et al. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: An alternative to organometallic synthetic routes. *J Phys Chem*. 2002 Jun;106(29):7177-85.
31. Qian H, Dong C, Weng J, Ren J. Facile one-pot synthesis of luminescent, water-soluble, and biocompatible glutathione-coated CdTe nanocrystals. *Small*. 2006 Apr;2(6):747-51.

32. Бричкин СБ, Черных ЕВ. Гидрофильные полупроводниковые квантовые точки. *Химия высоких энергий*. 2011 Ил;45 (1):3-15.
33. Rong XL, Zhao Q, Tao HG. Aqueous synthesis of CdSe and CdSe/CdS quantum dots with controllable introduction of Se and S sources. *Chin Chem Lett*. 2012 Aug;23(8):961-64.
34. Vossmeier T, Katsikas L, Giersig M, Popovic IG, Diesner K, Chemseddine A, et al. CdS nanoclusters: synthesis, characterization, size dependent oscillator strength, temperature shift of the excitonic transition energy, and reversible absorbance shift. *J Phys Chem*. 1994 May;98(31):7665-73.
35. Brinker CJ, Scherer GW. *The physics and chemistry of sol-gel processing*. Sol-Gel Science. San Diego: Academic Press Inc; 1990. 908 p.
36. Danks AE, Hall S R, Schnepf Z. The evolution of 'sol-gel' chemistry as a technique for materials synthesis. *Mater. Horiz*. 2016 Sep;3: 91-112.
37. Takada T, Li CY, Tseng JY, Mackenzie JD. Control of particle size distribution of CdS quantum dots in gel matrix. *J Sol-Gel Sci Technol*. 1994 Jan;1(2):123-32.
38. Duchaniya R.K. Optical studies of chemically synthesis CdS nanoparticles *IJMMME*. 2014 Jan;2 (2):54-56.
39. Cuong KC, Thien TD, Nga PT, Minh NV, Hung NV. Sol-gel synthesis and particle size characterization of CdSe quantum dots. *J Sci Math Phys*. 2009 Dec;25(4):207-11.
40. Li H, Qu F. Synthesis of CdTe quantum dots in sol-gel-derived composite silica spheres coated with calix[4]arene as luminescent probes for pesticides. *Chem Mater*. 2007 Jul;19(17): 4148-54.
41. Reifeld R, Saraidarov T. Innovative materials based on sol-gel technology. *Opt Mater*. 2006 Jun;28(1):64-70.
42. Sinha Sh, Pan I, Chanda P, Sen SK. Nanoparticles fabrication using ambient biological resources. *JABS*. 2009 Jul;19:1113-30.

43. Li X, Xu H, Chen Zh-Sh, Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J Nanomater.* 2011;2011:1-16.
44. Sweeney RY, Mao C, Gao X. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chem Biol.* 2004 Nov;11(11):1553-9.
45. El-Shanshoury AER, Elsilk SE, Ebeid ME. Rapid biosynthesis of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles using culture supernatants of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079T. *Afr J Biotechnol.* 2012;11(31):7957-65.
46. Bai HJ, Zhang ZM, Guo Y, Yang GE. Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009 Apr 1;70(1):142-6.
47. Wang CL, Maratukulam PD, Lum AM, Clark DS, Keasling JD. Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium on the cell surface. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Oct;66(10):4497-502.
48. Yan YZ, Ai X, Su Y, Liu X, Shan X, Wu S. Intracellular biosynthesis of fluorescent CdSe quantum dots in *Bacillus subtilis*: A strategy to construct signaling bacterial probes for visually detecting interaction between *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Microsc Microanal.* 2016 Feb;22(1):13-21.
49. Aydamp H, Karim MR, Balaban M, Unlu H. Colloidal synthesis and characterization of CdSe quantum dots: role of Cd:Se molar ratio and temperature. *Int J Sci Technol Res.* 2016 Jan;5(1):66-70.
50. Azizian Y, Khodayari A. Ultrasound-assisted preparation of CdSe nanocrystals in the presence of Polyvinyl alcohol as a capping agent. *Mater Sci Semicond Process.* 2010 Jan 12;13(4):225-30.
51. Chang SQ, Dai YD, Kang B, Han W, Chen D. Gamma-radiation synthesis of silk fibroin coated CdSe quantum dots and their biocompatibility and photostability in living cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2009 Oct;9(10):5693-700.

52. Yan Z, Qian J, Gu Y, Su Y, Ai X, Wu S. Green biosynthesis of biocompatible CdSe quantum dots in living *Escherichia coli* cells. *Mater Res Express*. 2014 March;1(1):1-14.
53. Silver S. Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. *Gene*. 1996 Nov;179(1):9-19.
54. Braga P, Montes-Bayón M, Alvarez J, López JM, Sanz-Medel A. Characterization, biological interactions and *in vivo* detection of selenotrisulfide derivatives of glutathion, cysteine and homocysteine by HPLC-ICP-MS. *J Anal At Spectrom*. 2004 Aug;19:1128-33.
55. Bao H, Lu Z, Cui X, Qiao Y, Guo J, Anderson JM, Li CM. Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta Biomater*. 2010 Sep;6(9):3534-41.
56. Dameron CT, Reese RN, Mehra RK. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature*. 1989 Apr; 338(13): 596-597.
57. Bao H, Hao N, Yang Y, Zhao D. Biosynthesis of biocompatible cadmium telluride quantum dots using yeast cells. *Nano Res*. 2010 May 11;3:481-489.
58. Wu SM, Su Y, Liang R, Ai X, Qian J, Wang C, et al. Crucial factors in biosynthesis of fluorescent CdSe quantum dots in *Saccharomyces cerevisiae*. *RSC Advances*. 2015 Sept 7;5:79184-91.
59. Sturzenbaum SR, Hockner M, Panneerselvam A, Levitt J, Bouillard S, Taniguchi S, et al. Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm. *Nat Nanotechnol*. 2013 Jan;8(1):57-60.
60. Sturzenbaum SR, Georgiev O, Morgan AJ, Kille P. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells. *Environ Sci Technol*. 2004 Dec;38(23):6283-9.
61. Scarano G, Morelli E. Properties of phytochelatin-coated CdS nanocrystallites formed in marine phytoplanktonic alga *Phaeodactylum tricorutum*, Bohlin in response to Cd. *Plant Sci*. 2003 Oct;165(4): 803- 810.

62. Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*. 1985 Nov 8;230(4726):674-6.
63. Rauser WE. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol*. 1995 Dec;109(4):1141-49.
64. Dunleavy R, Li L, Kiely CJ, McIntosh S, Berger BW. Single-enzyme biomineralization of cadmium sulfide nanocrystals with controlled optical properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 May 10;113(19):5275-80.
65. Kneer R, Zenk MH. The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry*. 1997 Jan; 44(1):69-74.
66. Vandeweghe JG, Ow DV. Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires. *Mol Microbiol*. 2001 Oct;42(1): 29-36.
67. Hu S, Law KWK, Wu M. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci*. 2001 Oct;161(5):987-996.
68. Torres E, Cid A, Fidalgo P, Herrero C, Abalde J. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquat Toxicol*. 1997 Nov;39(3-4): 231 - 246.
69. Ahmad A, Mukherjee P, Mandal D, Senapati S, Khan MI, Kumar R, et al. Enzyme-mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*. *J Am Chem Soc*. 2002 Oct 16;124(41):12108-9.
70. Kumar SA, Ansary AA, Ahmad A, Khan MI. Extracellular biosynthesis of CdSe quantum dots by the fungus, *Fusarium oxysporum*. *J Biomed Nanotechnol*. 2007 June; 3(2):190-194.
71. Sanghi R, Verma P. A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus. *Chem Eng J*. 2009 Dec;155:886-891.
72. Kavitha KS, Baker S, Rakshith D, Kavitha HU, Yashwantha RHC, Harini BP, et al. Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. *Int Res J Biol Sci*. 2013 Apr;2(6):P. 66-76.



73. Zhou G J, Li SH, Zhang YC, Fu YZ. Biosynthesis of CdS nanoparticles in banana peel extract. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014 Jun;14(6):4437-42.
74. Reddy KR, Anila P, Rao SG, Sai Ram PVS, Jyothi KN, Bhavani KG. Green synthesis, morphological and spectral properties of CdS nanoparticles. *Indian J Res Pharm Biotechnol*. 2016 Nov-Dec;4 (6):271-273.
75. Kumar SP, Tapan A, Saloni K, Madhu K, Kaliaperumal S. Synthesis of water soluble CdS nanoparticles and study of their DNA damage activity. *Arab J Chem* 2014 May;10:1-7
76. Raziya S, Durga B, Ganesh RS, Govind B, Annapurna N. Synthesis and characterization of CdS nanoparticles from *Mimosa Pudica* plant extract. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2017 March-Apr; 8(2):2196 -2203.
77. Eggenberger K, Merkulov A, Darbandi M, Nann T, Nick P. Direct immunofluorescence of plant microtubules based on semiconductor nanocrystals. *Bioconjug Chem*. 2007 Nov-Dec;18(6):1879-86.
78. Riegler J, Nick P, Kielmann U, Nann T. Visualize the self-assembly of tubulin with luminescent nanorods. *J Nanosci Nanotechnol*. 2003 Oct;3(5):380-5
79. Barroso MM. Quantum dots in cell biology. *J Histochem Cytochem*. 2011 Mar;59(3):237-51.
80. Danglot L, Chaineau M, Dahan M, Gendron MC, Boggetto N, Perez F, et al. Role of TI-VAMP and CD82 in EGFR cell-surface dynamics and signaling. *J Cell Sci*. 2010 Mar;123(5):723-35.
81. Lidke DS, Nagy P, Heintzmann R, Arndt-Jovin DJ, Post JN, Grecco HE, et al. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol*. 2004 Feb;22(2):198-203.
82. Rajan SS, Liu HY, Vu TQ. Ligand-bound quantum dot probes for studying the molecular scale dynamics of receptor endocytic trafficking in live cells. *ACS Nano*. 2008 Jun;2(6):1153-66.
83. Geng L, Zhang HL, Peng HB. The formation of acetylcholine receptor clusters visualized with quantum dots. *BMC Neurosci*. 2009 Jul 16;10:1-15.

84. Garon EB, Marcu L, Luong Q, Tcherniantchouk O, Crooks GM, Koeffler HP. Quantum dot labeling and tracking of human leukemic, bone marrow and cord blood cells. *Leuk Res.* 2007 May;31(5):643-51.
85. Shah BS, Clark PA, Moioli EK, Stroschio MA, Mao JJ. Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots. *Nano Lett.* 2007 Oct;7(10):3071-9.
86. Crut A, Geron-Landre B, Bonnet I, Bonneau S, Desbiolles P, Escude C. Detection of single DNA molecules by multicolor quantum dot end-labeling. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jun 20;33(11):1-9.
87. Ye M, Zhang Y, Li H, Tan P, Tang H, Yao S. A novel method for the detection of point mutation in DNA using single-base-coded CdS nanoprobe. *Biosens. Bioelectron.* 2009 Apr 15;24(8):2339-45.
88. Roberti MJ, Morgan M, Menendez G, Pietrasanta LI, Jovin TM, Jares-Erijman EA. Quantum dots as ultrasensitive nanoactuators and sensors of amyloid aggregation in live cells. *J Am Chem Soc.* 2009;131(23):8102-07.
89. Matvieieva NA, Vasylenko MY, Shakhovsky AM, Kuchuk NV. *Agrobacterium*-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with genes coding bacterial antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cytol Genet.* 2009 Apr; 43(2):94-98.
90. Шиммель Г. Методика электронной микроскопии. Москва: Мир; 1972. 300 с.
91. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, et al. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York: Plenum Publishers, 2003. 379 p.
92. Suh J, Choy KL, Lai SK, Suk JS, Tang BC, Prabhu S, et al. PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport. *Int J Nanomedicine* 2007;2(4):735-41.
93. Deepak P, Singh RB. Synthesis, characterization and photocatalytic application of bovine serum albumin capped cadmium sulphide nanoparticles. *Chalcogen Lett.* 2011 Jun;8(6):396-404.

94. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962 Jul;15(3):473-497.
95. Potrykus I, Shillito RD. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymol*. 1986;118:549-578.
96. Westcott SL, Oldenburg SJ, Lee TR, Halas NJ. Formation and adsorption of clusters of gold nanoparticles onto functionalized silica nanoparticle surfaces. *Langmuir*. 1998;14(19):5396-5401.
97. Loyola-Vargas VM, De la Pena C, Galaz-Avalos RM, Quiroz-Figueroa FR. Plant Tissue Culture. *Biologia Plantarum*. 2008;19(6):875-904.
98. Kong B, Seog JH, Graham LM, Lee SB. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011;Jul;6(5):929-41.
99. Nikolaenko T, Senchylo N, Garmanchuk L, Nikulina V. Teichoic acid modulates the adhesive properties of MCF-7 tumor. *The Breast*. 2013 Mar;22(1):28-29.
100. Dermerec M. *Biology of Drosophila*. New York: John Wiley and Sons; 2008. 632 p.
101. Ashburner M. *Drosophila: A laboratory handbook*(2<sup>nd</sup> ed.) M. Ashburner, K. G. Golic, R. S. Hawley // CSHL Press. – 2005. – New York. – 238 p.
102. Frei H, Würzler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res*. 1988 Aug;203(4):297-308.
103. Лакин ГФ. Биометрия. Москва: Высшая школа; 1990. 352 с.
104. Zhou J, Yang Y, Zhang C. Toward biocompatible semiconductor quantum dots: from biosynthesis and bioconjugation to biomedical application. *Chem Rev* 2015 Nov 11;115(21):11669-717.
105. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2008. Aug 17;60 (11):1289-306.

106. Luechinger NA, Grass RN, Athanassiou EK, Stark WJ. Bottom-up fabrication of metal/metal nanocomposites from nanoparticles of immiscible metals. *Chem Mater* 2010. Dec 7;22 (1):155-160.
107. Bick JA, Dennis JJ, Zylstra GJ, Nowack J, Leustek T. Identification of a new class of 5'adenylsulphate reductases from sulphate assimilating bacteria. *J Bacteriol* 2000. Jan;182 (1):135-142.
108. Tsang ML, Schiff JA. Sulfate-reducing pathway in *Escherichia coli* involving bound intermediates. *J Bacteriol.* 1976 Mar;125(3):923-33.
109. Knoss RW. Quantum dots: research, technology and applications. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2008. 691 p.
110. Yu WW. Semiconductor quantum dots: synthesis and water-solubilization for biomedical applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Oct;8(10):1571-81.
111. Yu WW, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem Mater.* 2003 Jun 7;15(14):2854 -60.
112. Morozov PV, Grigor'ev EI, Zav'yalov SA. Rectification effect in poly-p-xylylene-cadmium sulfide graded nanocomposites. *Phys Solid State.* 2012 Nov;45(11):2291-95.
113. Асаула ВН, Мирная ТА, Яремчук ГГ. Наноструктурированные жидкокристаллические системы алканоатов металлов с наночастицами CdS. *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии* 2012;10(1):193-201.
114. Mousavi RA, Akhavan SA, Fazeli MR. Biosynthesis, purification and characterization of cadmium sulfide nanoparticles using *Enterobacteriaceae* and their application. *Nanomater Appl Proper.* 2012;1(1):1-5.
115. Mi C, Wang Y, Zhang J, Huang H, Xu L, Wang S, et al. Biosynthesis and characterization of CdS quantum dots in genetically engineered *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2011 May 20;153(3-4):125-32.

116. Peelle BR, Krauland EM, Wittrup KD, Belcher AM. Design criteria for engineering inorganic material-specific peptides. *Langmuir*. 2005 Jul;21(15):6929-33.
117. Zheng-Yu Y, Qing-Qing D, Jing Q, Dong-Yu W, Sheng-Mei W. Eco-friendly intracellular biosynthesis of CdS quantum dots without changing *Escherichia coli*'s antibiotic resistance. *Enzyme Microb Technol*. 2017 Jan;96:96-102.
118. Миркин ЛИ. Справочник по рентгеноструктурному анализу поликристаллов. Москва: Гос. изд-во физ.-мат. лит.; 1961. 863 с.
119. Борова ММ, Науменко АП, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Стабільність квантових точок CdS, синтезованих за допомогою бактерії *Escherichia coli*. Доп НАН України. 2014;7:145-151.
120. Gupta S, Sharma K, Sharma R. Myconanotechnology and application of nanoparticles in biology. *Rec Res Sci Technol*. 2012;4(8):36-38.
121. Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Jan;69(5):485-92.
122. Bhattacharya, D, Gupta, RK. Nanotechnology and potential of microorganisms. *Crit Rev Biotechnol*. 2005 Oct-Dec;25(4):199-204.
123. Kochubey V, Kochubey D, Konyukhova Yu, Volkova EK. Optical characteristics of cadmium sulfide nanoparticles synthesized in polyethylene matrix and Ortho-xylene solution. *Optics and Spectroscopy*. 2010 Aug;109(2):154-161.
124. Martínez-Castañón GA, Loyola-Rodríguez JP, Reyes-Macías JF. Synthesis and optical properties of functionalized CdS nanoparticles with different sizes. *Superficies y vacío*. 2010 Dec;23(4):1-4.
125. Rossetti R, Ellison JL, Gibson JM, Brus LE. Size effects in the excited electronic states of small colloidal CdS crystallites. *J Chem Phys*. 1984 Jan; 80(9):4464-69.

126. Lakowicz JR, Gryczynski I, Gryczynski Z, Murphy CJ. Luminescence spectral properties of CdS nanoparticles. *J Phys Chem B*. 1999 Aug 12;103(36):7613-20.
127. Radchenko M, Lashkarev V, Sichkovskyi GV, Yurkov GYu. Nanomaterials based on CdS nanoparticles in polyethylene matrix. *Inorg Mater*. 2009 May;45(5):468-473.
128. Rajeev RP, Khadar MA. Characterization of chemically synthesized CdS nanoparticles. *Pramana J Phys*. 2005 Nov;65(5):801-07.
129. Rao BS, Kumar BR., Reddy VR, Rao TS. Preparation and characterization of CdS nanoparticles by chemical co-precipitation technique. *Chalcogenide Lett*. 2011 Mar;8(3):177-185.
130. Chen G, Yi B, Zeng G, Niu Q, Yan M, Chen A, et al. Facile green extracellular biosynthesis of CdS quantum dots by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*/ *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 May;117:199-205.
131. Das SK, Shome I, Guha AK. Surface functionalization of *Aspergillus versicolor* mycelia: in situ fabrication of cadmium sulphide nanoparticles and removal of cadmium ions from aqueous solution, *RSC Adv*.2012;2: 3000-07.
132. Борова ММ, Науменко АП, Пірко ЯВ, Круподьорова ТА, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Отримання квантових точок CdS з використанням гриба *Pleurotus ostreatus*. Доп НАН України. 2014;2:153-59.
133. Borovaya M, Pirko Y, Krupodorova T, Naumenko A, Blume Y, Yemets A. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum dots by using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. *Biotechnol & Biotec Eq*. 2015 Jun 16; 29(6):1156-63.
134. Yoffe AD. Semiconductor quantum dots and related systems: electronic, optical, luminescence and related properties of low dimensional systems. *Adv Phys*. 2001;50(1):1-208.
135. Schmid G. Nanoparticles: from theory to application. 2-nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, Verlag; 2004. 500 p.

136. Hooi LL, Issam AM, Belmahi M, Alnot M. Thermal and optical properties of CdS nanoparticles in thermotropic liquid crystal monomers. *Mater.* 2010 Mar;3(3):2069-86.
137. Favero PP, Souza-Parise M, Fernandez JLR, Miotto R. Surface properties of CdS nanoparticles. *Braz J Phys.* 2006 Sept;36(3B):1032-34.
138. Korbekandi H, Iravani S, Abbasi S. Production of nanoparticles using orgaisms. *Crit Rev Biotechnol.* 2009;29(4):279-306.
139. Kavitha KS, Baker S, Rakshith D, Satish S. Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. *Int Res J Biological Sci.* 2013 June;2(6):66-76.
140. Chukwuocha EO, Onyeaju MC, Harry TST. Theoretical studies on the effect of confinement on quantum dots using the brus equation. *World J Condens Matter Phys.* 2012;2(2):96-100.
141. Wang L, Wang L, Zhu C, Wei XW, Kan X. Preparation and aplication of functionalized nanoparticles of CdS as a fluorescence probe. *Anal Chim Acta.* 2002 Sept 10;468(1):35-41.
142. Zhou GJ, Li SH, Zhang YC, Fu YZ. Biosynthesis of CdS nanoparticles in banana peel extract. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014 Jun;14(6):4437-42.
143. Lakshmipathy R, Sarada NC, Chidambaram K, Pasha SK. One-step, low-temperature fabrication of CdS quantum dots by watermelon rind: a green approach. *Int J Nanomedicine.* 2015 Oct 1;10 Suppl 1:183-8.
144. Al-Shalabi Z, Doran PM. Biosynthesis of fluorescent CdS nanocrystals with semiconductor properties: comparison of microbial and plants production systems. *J Biotechnol.* 2016 Apr 10;223:13-23.
145. Bhuvaneswari G, Radjarejri S. Green synthesis and characterization of CdS quantum dots. *Int J Chem Tech Res.* 2015 Jan;8(5):104-8.
146. Rayevska OE, Grodzyuk GYa, Dzhagan VM, Stroyuk OL, Kuchmiy SYa, Plyusnin VF, et al. Synthesis and characterization of white-emitting CdS quantum dots stabilized with polyethylenimine. *J Phys Chem C.* 2010 Dec 7;114(51):22478-86.

147. Ansary AA, Kumar SA, Krishnasastry MV, Abyaneh MK, Kulkarni SK, Ahmad A, et al. CdS quantum dots: enzyme-mediated *in vitro* synthesis, characterization and conjugation with plant lectins. *J Biomed Nanotechnol.* 2007 Dec;3(4):406-13.
148. Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW. Transport of metal binding peptides by HMT-1, a fission yeast ABC type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4721-8.
149. Beato-López JJ, Fernández-Ponce C, Blanco E, Barrera-Solano C, Ramírez-del-Solar M, Domínguez M, et al. Preparation and characterization of fluorescent CdS quantum dots used for the direct detection of GST fusion proteins. *Nanomater Nanotechnol.* 2012 Jan 1;2:1-9.
150. Yang Z, Lu L, Bernard VF, He Q, Kiely CJ, Berder BW, et al. Biomanufacturing of CdS quantum dots. *Green Chem.* 2015;7:3775-82.
151. Colvin VL, Goldstein AN, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals covalently bound to metal surfaces with self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc.* 1992 June;114(13):5221-30.
152. Borovaya MN, Naumenko AP, Matvieieva NA, Blume YaB, Yemets AI. Biosynthesis of luminescent CdS quantum dots using plant hairy root culture. *Nanoscale Res Lett.* 2014 Dec 18;9(1):686-693.
153. Borovaya MN, Burlaka OM, Naumenko AP, Blume YaB, Yemets AI. Extracellular synthesis of luminescent CdS quantum dots using plant cell culture. *Nanoscale Res Lett.* 2016 Dec;11(1):100.
154. Singh S, Nalwa HS. Nanotechnology and health safety – toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007 Sep;7(9):3048-70.
155. Zieziulewicz TJ, Unfricht DW, Hadjout N, Lynes MA, Lawrence DA. Shinking the biologic world –nanobiotechnologies for toxicology. *Toxicol Sci.* 2003 Aug;74(2):235-44.



156. Katsumiti A, Gilliland D, Arostegui I, Cajaraville MP. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 2014 Aug;153:39-52.
157. Sheen J. Signal transduction in maize and arabidopsis mesophyll protoplasts / J Sheen *Plant Physiol*. 2001 Dec;127(4):1466-75.
158. Khataee A, Movafeghi A, Nazari F, Vafaei F, Dadpour RM, Hanifehpour Y. The toxic effects of L-cysteine-capped cadmium sulfide nanoparticles on the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza*. *J Nanopart Res*. 2014 Dec;16:2774.
159. Kokina I, JahundoviIa I, MickeviIa I, Sledevskis E, Ogurcovs A, et al. The Impact of CdS nanoparticles on ploidy and DNA damage of rucola (*Eruca sativa* Mill.) plants. *J Nanomater*. 2015 Nov 9; 2015:1-7.
160. Galeone A, Vecchio G, Malvindi MA, Brunetti V, Cingolani R, et al. In vivo assessment of CdSe-ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. *Nanoscale*. 2012 Oct 21;4(20):6401-7.
161. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:1-10.
162. Munari M, Sturve J, Frenzilli G, Sandersd MB, Brunelli A, Marcomini A, et al. Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag<sub>2</sub>S nanoparticles in fish cell lines (RTG-2). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014 Dec;775-776:89-93.
163. Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Röder B, Hackbarth S, et al. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir*. 2007 Feb 13;23(4):1974-80.
164. Li KG, Chen JT, Bai SS, Wen X, Song SY. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulphide quantum dots. *Toxicol In Vitro*. 2009 Sep;23(6):1007-13.

165. Hossain ST, Mukherjee SK. Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells. *J Hazard Mater*. 2013. Sep;260:1073-82.
166. Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for *in vivo* study. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Dec;18(6):565-71.
167. Ashburner M, Golic KG, Hawley RS. *Drosophila: A laboratory handbook*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: CSHL Press; 2005. 238 p.
168. Galeone A, Vecchio G, Malvindi MA, Brunetti V, Cingolani R, Pompa PP. *In vivo* assessment of CdSe-ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. *Nanoscale*. 2012 Oct 21;4(20):6401-7.
169. Mitchell ChL, Yeager RD, Johnson ZJ, D'Annunzio StE, Vogel KR, Werne TS. Long-Term Resistance of *Drosophila melanogaster* to the Mushroom Toxin AlphaAmanitin. *PLOS ONE*. 2015 May 15;1-19.
170. Ніколаєнко ТВ, Нікуліна ВВ, Петрук НА, Присяжнюк АІ, Скачкова ОВ, Борова ММ и др. Вплив на пухлинні клітини квантових точок сульфїду кадмію, синтезованих з використанням різних біологічних систем. Доп НАН України. 2016;5:117-24.
171. Проценко ОВ, Дудка ОА, Козерецька ІА, Іномістова МВ, Борова ММ, Пірко ЯВ и др. Оцінка токсичності та генотоксичності квантових точок CdS, синтезованих за допомогою біологічних матриць. Доп НАН України. 2016;4:111-7.
172. Jin S, Hu Y, Gu Z, Liu L, Wu HC. Application of quantum dots in biological imaging. *J Nanomater*. 2011 Jun 2;2011:1-13.
173. Kairdolf BA, Smith AM, Stokes TH, Wang MD, Young AN, Nie S. Semiconductor quantum dots for bioimaging and biodiagnostic applications. *Annu Rev Anal Chem* 2013;6:143-62.
174. Rosentha SJ, Chang JC, Kovtun O, McBride JR, Tomlinson ID. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chem Biol*. 2011 Jan 28;18(1):10-24.

175. Shen L. Biocompatible polymer/quantum dots hybrid materials: current status and future developments. *J Funct Biomater*. 2011 Dec 2;2(4):355-372.
176. Kumar S, Singhal M, Sharma JK. Functionalization and characterization of ZnS quantum dots using biocompatible L-cysteine. *J Mater Sci*. 2013 Oct;24(10):3875-80.
177. Jia H, Titmuss S. Polymer-functionalized nanoparticles: from stealth viruses to biocompatible quantum. *Nanomedicine*. 2009 Dec;4(8):951-66.
178. Байрамов ФБ, Полоскин ЕД, Корнев АА, Чернев АЛ, Топоров ВВ и др. Функционализация полупроводниковых квантовых точек nc-Si/SiO<sub>2</sub> олигонуклеотидами. *Физика и техника полупроводников*. 2014 апр 8;48(1):1521-25.
179. Bilan R, Fleury F, Nabiev I, Sukhanova A. Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging. *Bioconjug Chem*. 2015 Apr;26(4):609-24.
180. Muthu MS, Kulkarni SA, Raju A, Feng SS. Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. *Biomaterials*. 2012 Apr;33(12):3494-501.
181. Ge S, Kojio K, Takahara A, Kajiyama T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(2):131-50.
182. Shang L, Wang Y, Jiang J, Dong S. pH-dependent protein conformational changes in albumin-gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study. *Langmuir*. 2007 Jan 24;23(5):2714-21.
183. Meziani MJ, Pathak P, Harruff BA, Hurezeanu R, Sun Y-P. Direct conjugation of semiconductor nanoparticles with proteins. *Langmuir*. 2005 Feb;21(5):2008-11.
184. Gregori A, Svagelj M, Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol Biotechnol*. 2007;45(3):238 -249.

185. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 2004 Dec 10;4(1):11-18.
186. Chen N, Huang Q, He Y, Su Y, Li X, et al. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials.* 2012 Feb;33(5):1238-44.

Частота виникнення *mwh* плям за дії біосинтезованих квантових точок

CdS на личинки *D. melanogaster*

Варіанти до- сліду	Невеликі одиночні плями (1-2 клітини) (m=2)			Великі одиночні плями (>2 клітин) (m=5)			Всього плям (m=5)		
	№	Fr	D	№	Fr	D	№	Fr	D
Позитивний кон- троль	10	4,1	+	10	0,5	+	10	4,6	+
CdS( <i>E. coli</i> )	50	0,36	-	50	0,02	-	50	0,38	-
CdS( <i>P. ostreatus</i> )	50	0,46	-	50	0,04	-	50	0,5	-
Негативний кон- троль ( <i>E. coli</i> )	100	0,28	-	100	0,01	-	100	0,41	-
Негативний кон- троль( <i>P. os- treatus</i> )	100	0,21	-	100	0,03	-	100	0,24	-

## Характеристика отриманих квантових точок CdS

Тип культури	Максимум розподілу за розмірами (нм)	Максимуми люмінесценції (нм)	Елементний аналіз зразків CdS (атомні %)								
			Cd	S	Na	Cl	O	Si	F	P	K
<i>Escherichia coli</i>	6,0 – 8,0	422 – 470	30,81	25,61	21,45	22,13	–	–	–	–	–
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,0 – 5,5	431 – 486	26,6	29,17	–	–	39,24	1,53	–	3,62	8,79
<i>Linaria maroccana</i>	6,0 – 7,0	425 – 500	28,03	23,16	–	–	26,19	3,65	19,0	–	–
<i>Nicotiana tabacum</i> (BY-2)	3,0 – 4,0	380 – 390	27,17	24,50	8,70	7,71	–	–	–	–	3,02