

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕПАРТАМЕНТ ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ  
ВИКОНАВЧОГО ОРГАНУ КИЇВСЬКОЇ МІСЬКРАДИ  
(КИЇВСЬКОЇ МІСЬКОЇ ДЕРЖАВНОЇ АДМІНІСТРАЦІЇ)

КИЇВСЬКЕ ТЕРИТОРІАЛЬНЕ ВІДДІЛЕННЯ МАН УКРАЇНИ  
(КИЇВСЬКА МАЛА АКАДЕМІЯ НАУК УЧНІВСЬКОЇ МОЛОДІ)

**відділення:** екології та аграрних наук  
**секція:** екологія  
**базова дисципліна:** хімія

## НОВІ БІОСУМІСНІ ФЛУОРЕСЦЕНТНІ КАРБОНОВІ НАНОЧАСТКИ: СИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ, ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

**Роботу виконав:**

Статус у МАН

(слухач, кандидат, дійсний член МАН)

Головань Денис Романович

повна дата народження

учень 11 класу середньої

загальноосвітньої школи

I-III ступенів № 201 м. Києва,

Дніпровський район

домашня адреса

контактні телефони (домашній, мобільний)

електронна адреса

**науковий керівник**

Назаренко Володимир Іванович,

к.б.н., провідний науковий співробітник

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

академік Української академії наук

контактний телефон

**педагогічний керівник:**

(прізвище ім'я по батькові (повністю),

вчене звання, місце роботи посада,

науковий ступінь, контактні телефони)

**НОВІ БІОСУМІСНІ ФЛУОРЕСЦЕНТНІ КАРБОНОВІ  
НАНОЧАСТКИ: СИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ, ЕКОЛОГІЧНІ  
АСПЕКТИ**

# НОВІ БІОСУМІСНІ ФЛУОРЕСЦЕНТНІ КАРБОНОВІ НАНОЧАСТКИ: СИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ, ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

**Автор роботи:** Головань Денис Романович, Київське територіальне відділення МАН України, лабораторія нанобіотехнологій Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, 11 клас ЗОШ I-III ступенів школи № 201 м. Києва

**Науковий керівник:** Назаренко Володимир Іванович, к.б.н., провідний науковий співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

## ТЕЗИ

Актуальність теми пов'язана з тим, що активний розвиток нанотехнологій та впровадження нових наноматеріалів супроводжуються значними екологічними ризиками для навколишнього середовища та людини. Науковці наголошують, що виявлені за останнє десятиліття хімічні та патофізіологічні ефекти окремих наноматеріалів свідчать про те, що виживання людства в XXI столітті значною мірою буде залежати від безпеки нанотехнологій і наноматеріалів.

Основною метою роботи є пошук екологічно безпечних наноматеріалів, які можуть стати перспективною альтернативою високотоксичним нанофлуорофорам (вуглецевим нанотрубкам, фулеренам, квантових наноточкам з оксидів важких металів тощо) з їх доведеною руйнівною дією на біооб'єкти – ДНК і клітини, а також екологічною небезпекою під час процесу виробництва та застосування.

Основними завданнями дослідження є:

1) Синтезування нових зразків біосумісних флуоресцентних наноматеріалів класу вуглецевих наночасток.

2) Вивчення фізико-хімічних властивостей новосинтезованих наночасток гел'єхромографічним, електрофоретичним, спектрофлуориметричним методами (розмірів отриманих часток, наявність електричного заряду, спектру їх флуоресценції), а також встановлення залежності характеристик флуорофорів від умов їх отримання.

3) Визначення параметрів токсичності методом біотестування на біооб'єктах *Daphnia magna* і клітинах лінії HeLa, а також перспектив використання для біовізуалізації *in vivo*.

У результаті дослідження запропоновано новий метод отримання біосумісних флуоресцентних карбонівих наночасток з простих органічних речовин. Такі наноматеріали відносно легко синтезуються гідротермічним методом, мають незвичайні характеристики світіння і можуть бути використані для створення перспективних біосумісних екологічно безпечних флуоресцентних маркерів. У роботі вивчені основні параметри отриманих зразків нанофлуорофорів, такі як маса, заряд, спектральні характеристики, токсичність для живих організмів. Продемонстровано можливість використання для біовізуалізації на прикладі рачків *Daphnia magna* і клітин лінії HeLa.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП .....</b>	<b>5</b>
<b>РОЗДІЛ I. СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ НАНОМАТЕРІАЛІВ.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Екологічні аспекти нанотехнологій: фактори ризику.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Сучасні дослідження в вітчизняній нанобіотехнологічній галузі .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Основні типи вуглецевих наноматеріалів та їх структури.....</b>	<b>9</b>
<b>РОЗДІЛ II. ДЕЯКІ ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ МАТЕРІАЛІВ .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Принцип дії гель-хроматографії.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Принцип дії методу електрофорезу.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Принцип дії спектрофлуометричного методу.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4. Принцип визначення токсичного ефекту методом біотестування.....</b>	<b>12</b>
<b>РОЗДІЛ III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Підготовка дослідних зразків флуоресцентних наноматеріалів.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Дослідження карбонових точок методом гель-хроматографії.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1. План роботи.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2 Хід роботи.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3. Результати дослідження та їх обговорення.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Фракціонування зразків методом горизонтального електрофорезу..</b>	<b>19</b>
<b>3.3.1. План роботи.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.2. Хід роботи.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.3. Результати дослідження та їх обговорення.....</b>	<b>20</b>

<b>3.4. Динаміка формування карбонових частинок.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.1. План роботи.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.2 Хід роботи.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.3. Результати дослідження та їх обговорення.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Вивчення впливу карбонових частинок на біооб'єкт <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.1. План роботи.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2 Хід роботи.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.3. Результати дослідження та їх обговорення.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6. Вивчення впливу карбонових часток на клітини лінії HeLa.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.1. План роботи.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.2.. Хід роботи.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.3. Результати дослідження та їх обговорення.....</b>	<b>29</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>30</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>31</b>

## ВСТУП

**Актуальність теми:** Головні недоліки сучасних флуоресцентних наноматеріалів (напівпровідникових квантових точок з оксидів важких металів, вуглецевих нанотрубок та ін.), які широко використовуються в медико-біологічних та екологічних дослідженнях, – їх гостра токсичність, руйнівна дія на ДНК і клітини [1], а також екологічна небезпека під час процесу виробництва та використання [2].

При цьому в останнє десятиліття науковці США, Китаю та Індії повідомили про відкриття нового класу флуоресцентних вуглецевих наноточок (C-dots) [4], отриманих досить простим гідротермічним методом [5] з органічних речовин [6] і навіть відходів природних продуктів, зокрема, меленої кави [7] і соєвого молока [8].

Результати досліджень вчених свідчать про біосумісність і екологічну безпеку цих матеріалів [9] при наявності унікальних флуоресцентних якостей [10]. При цьому лишається чимало невивчених питань щодо властивостей нових наноматеріалів: невивчена природа свічення цих структур, недостатньо відпрацьовані методи їх синтезу, немає даних щодо їх модифікації та біотехнологічного застосування. Саме з цим пов'язана актуальність дослідження нового класу вуглецевих наноматеріалів. Враховуючи біосумісність, гарну флуоресцентну відповідь та легку доступність різноманітної сировини органічного походження – усе це дозволяє сподіватися, що ці наноструктури можуть бути перспективними флуорофорами для широкого застосування в біомедичних та екологічних дослідженнях, зокрема, задля одержання клітинних зображень *in vivo*.

**Об'єкт дослідження:** флуоресцентні наноматеріали на основі вуглецю.

**Предмет дослідження:** фізико-хімічні та біотоксикологічні властивості флуоресцентних наноматеріалів на основі вуглецю.

**Мета:** вивчення та практичне застосування методів синтезу вуглецевих наночасток, дослідження їх фізико-хімічних, біотоксикологічних властивостей та перспектив застосування для біовізуалізації *in vivo*.

**Методи дослідження:** гель-хроматографія, електрофорез, спектрофлуориметрія, біотестування на визначення токсичності.

**У результаті дослідження:**

1) Вперше розроблено та запроваджено методи отримання нових зразків біосумісних наноматеріалів класу карбонових наночасток з потужними флуоресцентними властивостями;

2) Досліджено фізико-хімічних властивостей новосинтезованих наночасток гель-хроматографічним, електрофоретичним, спектрофлуориметричним методами (розмірів отриманих часток, наявність електричного заряду, спектру їх флуоресценції), а також встановлення залежності характеристик флуорофорів від умов їх отримання.

3) Визначено параметри токсичності методом біотестування на біооб'єктах *Daphnia magna* і клітинах лінії HeLa, а також показано перспективи використання для біовізуалізації *in vivo*.

**Наукова новизна:** Вперше отримано та досліджено нові зразки наноматеріалів – «сині», «фіолетові» та «зелені» флуоресцентні наноточки на основі вуглецю, що мають потужні флуоресцентні властивості, показана екологічна безпечність, відсутність токсичного ефекту на тестові біооб'єкти *Daphnia magna* і клітини лінії HeLa.

**Наукові публікації за результатами дослідження:** Про результати даного дослідження автор доповідав на наукових конференціях, зокрема XVII Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Екологія. Людина. Суспільство» [11], Всеукраїнському біологічному форумі учнівської та студентської молоді «Дотик природи» [12], Всеукраїнському етапі конкурсу наукових робіт INTEL ISEF-2016.

**Практична цінність дослідження:** Використання нового класу флуорофорів на основі вуглецю має величезний потенціал для біомедичних та екологічних застосувань. У перспективі флуоресцентні біосумісні наночастки можуть бути використані для безпечних прижиттєвих досліджень живих організмів, адресної доставки ліків до клітин-мішеней, що дозволить ефективно боротися з поширеними хворобами людства. Отримані біосумісні флуоресцентні карбонові наночастки також можуть знайти втілення при створенні нового класу аналітичних біосенсорних пристроїв з надвисокою чутливістю та оперативністю для визначення екологічного забруднення.

## РОЗДІЛ І

### СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ НАНОМАТЕРІАЛІВ

У науковій літературі є декілька визначень нанотехнології. Спеціалісти державної програми США «Національна нанотехнологічна ініціатива» наводять таке визначення нанотехнології: «Нанотехнологія – це дослідження і технологічні розробки на атомному, молекулярному чи макромолекулярному рівнях у шкалі розмірів приблизно від 1 до 100 нм, що проводяться для одержання фундаментальних знань про природу явищ та властивостей матеріалів у наношкالی, а також для створення і використання структур, приладів і систем, що набувають нових якостей завдяки своїм маленьким розмірам. Нанотехнологічні дослідження та розробки включають контрольовані маніпуляції нанорозмірними структурами та їх інтеграцію у більш великі компоненти, системи і архітектури» [13].

Розвиток нанотехнологій визначається тим, що проведення досліджень у нанометровому діапазоні суттєво змінює фізичні, хімічні, фізико-хімічні властивості наноречовин і наноматеріалів, зокрема, міцність, електропровідність, термостійкість, магнітні властивості, коефіцієнт оптичного заломлення світла, фоновий спектр, теплоємність, вплив на організм людини та ін.

#### **1.1. Екологічні аспекти нанотехнологій: фактори ризику**

Оскільки речовина у вигляді наночастинок і наноматеріалів має властивості, які кардинально відрізняються від їх аналогів у формі макроскопічних дисперсій або суцільних фаз, наноматеріали являють собою принципово новий фактор, що впливає на організми і середовище їх існування. Це обумовлює виникнення складних наукових проблем, пов'язаних з впливом нанотехнології на організм людини і навколишнє середовище. На сьогодні недостатньо вивчені потенційні екологічні наслідки використання наноматеріалів. Враховуючи унікальні властивості наноматеріалів, необхідно розробити методи оцінки ризику можливого негативного впливу нанотехнологій та наноматеріалів на здоров'я людини та екосистеми. І саме



тому особливу актуальність мають дослідження щодо пошуку альтернатив і заміни токсичних та екологічно небезпечних наноматеріалів – на біосумісні та екологічно безпечні.

### **1.2. Сучасні дослідження в вітчизняній нанобіотехнологічній галузі**

Інтенсивний розвиток досліджень з нанотехнологій сприяв створенню практично у всіх країнах світу нових спеціальних лабораторій, центрів, інститутів, де досліджуються різні аспекти таких технологій. В Україні Національною академією наук розроблена комплексна програма з нанотехнологій, до виконання якої залучені різні наукові установи держави. Інститутом хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України спільно з вітчизняними науково-медичними закладами вперше у світі розроблено, досліджено та впроваджено в медичну практику новий препарат сорбційно-детоксикаційної дії «Силікс» на основі нанокремнезему [13]. У міжнародному центрі електронно-променевої технології Інституту електрозварювання ім. Є.О. Патона НАН України тривалий час проводяться дослідження з розробки сучасних нанотехнологій, результати яких впроваджені в авіаційну промисловість, космічну галузь, а в останні роки — і біологію та медицину [13]. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України відомий дослідженнями зі створення біосенсорів, розроблених на основі нанотехнологій. Дослідження з нанотехнологій в Інституті загальної та неорганічної хімії ім. В.І Вернадського НАН України проводять більше 50 років, зокрема розроблено технологію синтезу «дрібнодисперсних систем з сажі», яку пізніше назвали нанотрубки, а також методику розчинення металів у полімерному середовищі, що згодом почали застосовувати в магнітному записі інформації, та хімічних засобів одержання наночастинок [13].

### **1.3. Основні типи вуглецевих наноматеріалів та їх структури**

Флуоресцентні вуглецеві наноструктури, такі як наноалмази, фулерени, вуглецеві нанотрубки і графен є новими типами матеріалів, у яких високе відношення поверхні до об'єму є тим головним чинником, що визначає їх властивості. Вони можуть містити різні комбінації основних структурних елементів

(з графеноподібними  $sp^2$  і алмазоподібними  $sp^3$ -гібридизаціями), які можуть бути синтезовані і далі модифіковані полярними групами [15]. Ці групи вводять під час або після синтезу цих наночастинок, адже вони можуть бути розчинені в полярних розчинниках, у тому числі воді. Основні графенові 2D і 3D алмазні структури разом з оксид-графеновими GO-точками, вуглецевими нанотрубками і C-точками схематично представлена на рис. 1.1.

**Двовимірний графен** і тривимірний алмаз в основному нефлуоресцентні. Випромінювання у графена з'являється із зменшенням його розмірів до декількох нанометрів і збільшенням шляхом приєднання полярних груп до його країв. У оксиду графену полярні групи зв'язані у всій площині, формуючи елементи структури, які є флуоресцентними випромінювачами..

**Флуоресцентні наноточки вуглецю** є універсальними матеріалами, які привертають увагу багатьох дослідників через їх відносно простий синтез, доступні для багатьох методики багатьох вихідних матеріалів. Зокрема, вони можуть бути отримані шляхом простого спалювання в мікрохвильовому нагріванні органічної речовини і навіть відходів природних продуктів, таких як мелену каву і соєве молоко. На стадії їх синтезу отримані частинки можуть включати гідроксильні, карбонільні і карбоксильні групи, які визначаються у сформованих наноструктурах. Це значно полегшує їх функціоналізацію [15].

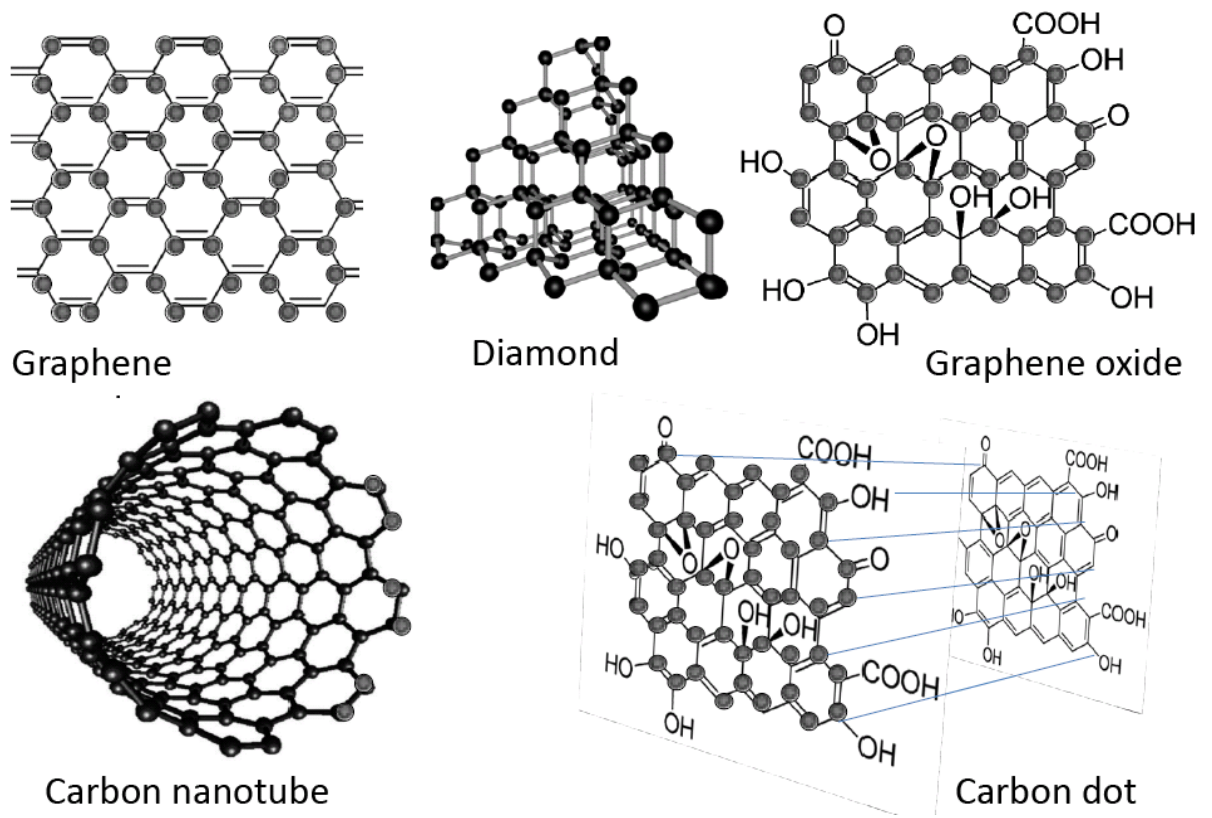


Рис. 1.1. Структури нанорозмірних вуглецевих матеріалів [15].

## РОЗДІЛ II

### ДЕЯКІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ НАНОМАТЕРІАЛІВ

#### 2.1. Принцип дії методу гель-хроматографії

Враховуючи, що нанотехнологія – міждисциплінарна наука, для проведення наукових досліджень використовують методи класичної біології, хімії, фізики, екології.

Метод гель-фільтрації є одним з методів колонкової хроматографії. Принципова відмінність гель-фільтрації від всіх інших методів хроматографії полягає в тому, що молекули, які розділяються при гель-фільтрації, не сорбуються всередині гранул і взагалі ні фізично, ні хімічно не взаємодіють з їх матеріалом. Весь процес фракціонування ґрунтується виключно на співвідношенні розмірів молекул фільтрованої суміші і пор у гранулах [16].

Розділення молекул за розмірами і формою заснована на властивостях молекулярного сита, які мають чимало пористих матеріалів. Найчастіше для цієї мети застосовують органічні полімери з тривимірною сітчастою структурою, що надає їм властивостей гелів. Метод дослідження розподілу речовин за допомогою гелів, заснований на відмінностях у розмірі молекул, називається гель-фільтрацією.

Хроматографічну колонку заповнюють набряклим гелем і врівноважують за допомогою відповідного розчинника. Великі молекули, не проникають в пори сита, проходять між частинками гелю, в той час як невеликі молекули «застрягають» у них і рухаються з меншою швидкістю. Три стадії такого поділу схематично зображені на рис. 2.1.

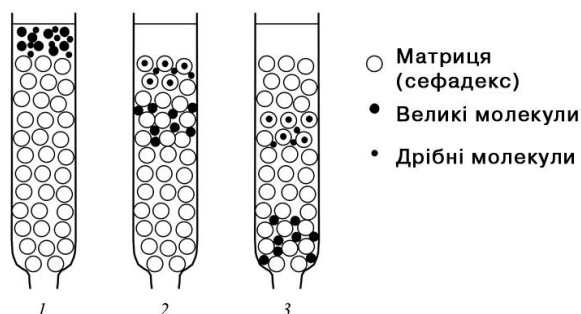


Рис .2.1. Поділ речовин методом гель-фільтрації: 1 - момент внесення суміші на колонку; 2 - початок фракціонування; 3 - початок виходу з колонки фракції найбільш великих молекул [16].

## 2.2. Принцип дії методу електрофорезу

Чимало важливих у біологічному відношенні молекул, таких як амінокислоти, пептиди, білки і нуклеїнові кислоти, містять іонізуючі групи, тому в розчині вони можуть існувати в зарядженій формі, у вигляді катіонів (+) або аніонів (-). Крім того, молекули з близькими за величиною зарядами, але різною молекулярною вагою, відрізняються одна від одної відношенням заряду до маси. На всіх цих відмінностях засновано поділ іонів при русі їх у розчині під дією електричного поля; в цьому і полягає **принцип методу електрофорезу** [16].

## 2.3. Принцип дії методу спектрофлуориметрії

На сьогодні методи флуориметрії широко застосовується в біохімічних та екологічних дослідженнях завдяки високій роздільній здатності, чутливості та відтворюваності отриманих результатів, а також простоті проведення аналізу. Вимірювані характеристики зразків – спектри збудження і випромінення є основними параметрами для флуорофорів, та дають змогу опосередковано зробити висновки про будову досліджуваних зразків. Загальна схема показана на рис. 2.2.

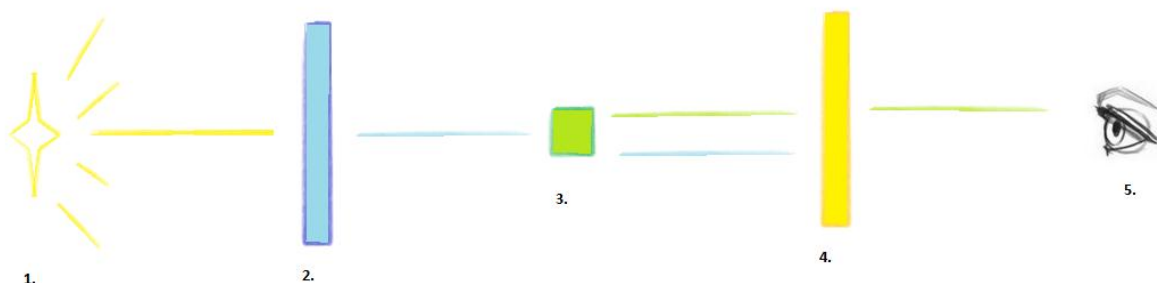


Рис. 2.2. Загальна схема детекції флуоресценції.

Позначення: 1. Джерело світла. 2. Синій фотофільтр. 3. Дослідний зразок. 4. Світло-жовтий фотофільтр. 5. Око (або фотоелектронний детектор).

## 2.4. Визначення токсичного ефекту на біоб'єкти методом біотестування

Під час біотестування досліджується токсичний ефект речовини на організми.

Токсичний ефект - це зміна будь-якого показника життєдіяльності або функцій організму під впливом токсиканта. Залежить від особливостей отрути, специфіки

метаболізму організму, факторів зовнішнього середовища (вміст кисню, рН, температури та ін.).

Під токсичністю середовища розуміють здатність хімічних речовин проявляти пошкоджуючу або летальну дію на живі організми. Речовина, що надає токсичну дію, називається токсикантом, а процес впливу токсиканта на організм - токсикацією (на екосистему - токсифікацією).

Показник «виживання / летальність» є найважливішим і саме з нього зазвичай починають оцінку токсичності речовин і розчинів. Для біотестування за допомогою тест-об'єктів *Daphnia Magna* використовується лабораторна культура партеногенетических самок, які кожні 8-14 день народжують молодь, яка відрізняється від дорослих самок тільки розмірами. Це дозволяє вивчати вплив окремих речовин в ряді поколінь, що є важливим для прогнозування наслідків потрапляння в навколишнє середовище тих чи інших токсикантів.

## РОЗДІЛ III

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

**Експериментальна робота** виконувалась на базі лабораторії нанобіотехнологій Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

#### **3.1. Підготовка дослідних зразків флуоресцентних наноматеріалів**

На цей час у лабораторії відпрацьована методика отримання карбонових точок декількох типів, які відрізняються між собою за своїми флуоресцентними властивостями. Флуоресцентні наноматеріали були отримані методом гідротермічної обробки різноманітних органічних сполук, зокрема: аланіну, гліцерину, цукрози, лимонної кислоти, карбаміду. Одним із визначних фактів є отримання вуглецевих точок з різними флуоресцентними можливостями завдяки використанню різних типів розчинників. Зокрема, при використанні дистильованої води пік флуоресценції зміщується в бік ультрафіолетового діапазону спектру порівняно з розчинниками, у яких присутня значна кількість солей кальцію, калію та магнію. У ході дослідження за методиками лабораторії були отримані вуглецеві наночастки широкого спектру флуоресценції.

Основні спектри поглинання і флуоресценції реєстрували на спектрофотометрі Lambda Bio (Perkin Elmer) і спектрофлуориметрі Quanta Master (Фотон Technology International), відповідно. Отримані дані заносимо до таблиці 3.1.

#### **3.2. Дослідження карбонових точок методом гель-хроматографії**

Для визначення молекулярної маси чотирьох відібраних для даного дослідження зразків карбонових наноточок (BG-CD, Blu-CD, Green-CD, Violet-CD) застосовувався метод гель-хроматографії з наповнювачем сефадекс з різнорозмірними білками в якості свідків.

##### **3.2.1. План роботи**

1. За допомогою блакитного декстрану визначаємо вільний об'єм колонки ( $V_0$ ), заповненої гелем сефадексу.



Фото 3.1. Флуоресценція отриманого зразка BG-CD



2. Складаємо калібрувальний графік відповідності об'єму елюції та молекулярної маси відомих білків різної молекулярної маси. Для цього визначаємо об'єм елюції ( $Ve_1$ ) БСА (бичачий сироватковий альбумін – білок плазми крові великої рогатої худоби з визначеною молекулярною масою **64 кДа**, одноланцюговий, що складається з 582 амінокислотних залишків), визначаємо об'єм елюції ( $Ve_2$ ) СТГ (соматотропний гормон, або соматотропін, що містить 191 амінокислоту та має визначену молекулярну масу **21,6 кДа**), визначаємо об'єм елюції ( $Ve_3$ ) апротинина (одноланцюговий білок плазми крові крупного рогатої худоби з визначеною молекулярною масою **7.25 кДа**, що містить 58 амінокислот).

3. Визначаємо об'єм елюції ( $Ve_4$ ) фіолетового флуоресцентного вуглецевого наноматеріалу та об'єм елюції ( $Ve_3$ ) синього флуоресцентного вуглецевого наноматеріалу. На основі калібрувального графіка визначаємо їх молекулярну масу.

4. Досліджуємо спектри поглинання та флуоресценції чотирьох зразків карбонових наноточок (BG-CD, Blu-CD, Green-CD, Violet-CD) та робимо висновки щодо їх залежності від молекулярної маси.

### 3.2.2 Хід роботи

**Для приготування гелю:** Сефадекс G100 (15 г) замочуємо в 250 мл дистильованої води з додаванням азиду натрію (125 мг) в склянці і залишаємо для набухання на 20 хв. Отриманий гель-сефадекс тримаємо на водяній бані 30 хв для стерилізації. Після цього промиваємо сефадекс 50%-азиду натрію (50 мл) для запобігання розвитку мікрофлори.

Попередньо поклавши за допомогою пінцету фільтрувальний папір діаметром, що дорівнює діаметру колонки, вливаємо гель сефадексу в колонку, одночасно даючи можливість водному буферу витікати через нижній адаптер. Частинки гелю осідають і формують безперервний стовпчик гелю. Поступово, у міру виходу розчинника, вливаємо в колонку нові порції гелю до утворення стовпчика гелю висотою приблизно 30 см, слідкуючи на гомогенність розчину. Після формування стовпчика гелю колонку заповнюємо доверху дистиллятом і за допомогою пінцета поміщаємо на поверхню рідини фільтрувальний папір розміром, рівним діаметру колонки. Далі зливаємо буфер до рівня гелю, в результаті чого фільтрувальний папір

розташовується на поверхні гелю і оберігає його від каламучення при подальшому додаванні суміші досліджуваних речовин і дистилляту.

Після приготування колонки дослідний зразок у 0,5 мл обережно розподіляється по усій поверхні верхнього фільтрувального паперу. Після проходження зразків у гель, у колонку заливається буфер в об'ємі 10 мл. Рівень буферу над гелем підтримується на сталому рівні до повного проходження зразка.

Дослід проводиться по чергово для кожного з 4 зразків.

### **Визначення вільного об'єму колонки ( $V_0$ )**

Для вимірювання вільного об'єму колонки ( $V_0$ ) зливаємо буфер до рівня гелю і вносимо піпеткою в колонку 2 мл розчину блакитного декстрину (1%). Відкриваємо нижній вихід колонки і, коли блакитний декстран увійде в гель, перекриваємо нижній вихід колонки. Зверху доливаємо буферний розчин, відкриваємо нижній вихід колонки, а розчин, що витікає, збираємо в пробірки по 1 мл. Після виходу блакитного декстрану вимірюємо оптичну щільність фракцій на спектрофотометрі при довжині хвилі 595 нм і будуємо графік гель-фільтрації. Для визначення вільного об'єму колонки ( $V_0$ ) орієнтуємося на першу забарвлену фракцію.

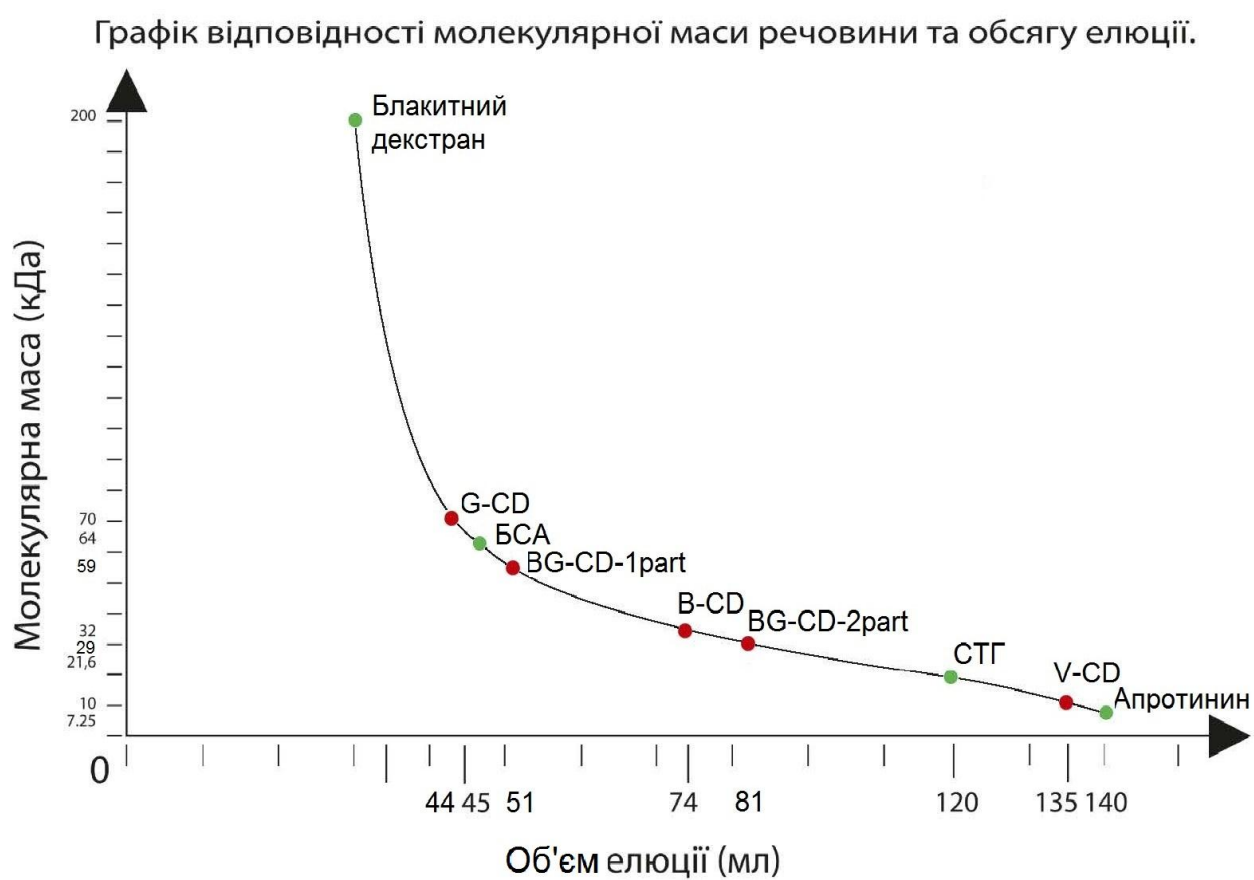
**Складаємо калібрувальну сітку за допомогою визначення об'ємів елюції кількох різнорозмірно-молекулярних білків: ( $V_{e1}$ ) БСА, ( $V_{e2}$ ) СТГ та ( $V_{e3}$ ) аprotинина.**

Готуємо розчини БСА (0,2% розчину), СТГ (0,3% розчину) та аprotинина (0,5% розчину). 2 мл розчину БСА (бичачий сиворотковий альбумін) наносимо на гель-хроматографічну колонку. Промиваємо колонку дистиллятним буфером і збираємо фракції по 1 мл. Після проходження вільного об'єму вимірюємо оптичну щільність розчинів на спектрофотометрі (фракції, що містять білок, вимірюємо при довжині хвилі 420 нм) і заносимо дані до таблиці результатів гель-фільтрації. Визначаємо обсяг елюції білка. Для цього орієтуємося на «пікову» фракцію, що містить максимальну кількість відповідного білка.

Для СТГ та аprotиніна дослід повторюємо аналогічно.

Складаємо калібрувальний графік відповідності молекулярної маси білків та об'ємів елюції.

Графік 3.1.



Визначаємо об'єми елюції отриманих речовин флуоресцентних вуглецевих наноматеріалів та заносимо дані до таблиці та складаємо калібрувальний графік (об'єм елюції записуємо для фракцій із піковим значенням флуоресценції, для зразка BD-CD, що показав два пікових значення, фіксуємо обидва значення, позначивши їх відповідно як BD-CD-1 part, BD-CD-2 part). Визначаємо відповідні значення молекулярних мас нових речовин.

### **3.2.3. Результати дослідження та їх оцінка**

Отримані зразки флуоресцентних наноматеріалів Blu-CD, Green-CD, Violet-CD проходили крізь гель-хроматографічну колонку загалом гомогенно із розподіленням 5-7 фракцій. Зразок BD-CD був фракціонований на 16 фракцій.

Усі результати заносимо до загальної таблиці (Таблиця 3.1).

У результаті дослідження була встановлена одна з основних характеристик речовини – молекулярна маса досліджуваних зразків, а також встановлена відповідність спектром флуоресценції та молекулярною масою. Встановлено, що зразки з «зеленим» спектром флуоресценції мають більшу молекулярну масу, з «синім» спектром – середню, «фіолетовим» - найменшу з досліджуваних зразків.

## **3.3. Фракціонування С-точок методом горизонтального електрофорезу.**

### **3.3.1. План роботи**

- 1) Приготування Трис-НСІ буфера та розчину агарози.
- 2) Формування агарозного блоку.
- 3) Нанесення зразків у лунки.
- 4) Запуск апарату електрофорезу.
- 5) Збір та аналіз даних експерименту
- 6) Занесення даних до таблиці

### **3.3.2. Хід роботи**

1. Для приготування розчину Трис НСІ у 50-ти мілімолярній концентрації: змішуємо 200 мл (що відповідає сумарному об'єму буферної камери та ізолюючої пластини) дистилляту та 1.57г Трис НСІ.

2. Для приготування 1%-го розчину агарози: 30 мл буфера змішуємо з 0.33г агарози та ставимо розчин на водяну баню до повного розчинення речовини.
3. Вимірюючи температуру розчину агарози, проводимо формування агарозного блоку (розміри 10.5 см на 7.5см на 0.4 см) при температурі 50С на ізолюючу пластину із гребінцем для формування лунок.
4. Після застигання агарозного гелю, виймаємо гребінець та саплером наносимо 0.1 мл досліджуваного зразка флуоресцентних наноматеріалів у кожен лунку.
5. Заливаємо 170 мл буфера у відсіки буферної камери та роз'єднуємо їх перемикачем.
6. Встановлюємо ізолюючу пластинку з носієм, встановлюємо фільтри-містки, закриваємо кришкою електрофоретичний блок.
7. Електроди під'єднуються до джерела живлення, прилад вмикається при 60А, 0.03V на 2 години.

### **3.3.3. Результати досліду та їх оцінка**

Після закінчення досліду спостерігали такі результати:

1. G-CD: основна фракція знаходиться в діапазоні від 1,7 см до 2,9 см у бік аноду.
2. BG-CD-1 part: основна фракція знаходиться в діапазоні від 2 см до 3.5 см у бік аноду.
3. B-CD: основна фракція знаходиться в діапазоні від 0 см до 0.5 см у бік катоду.
4. BG-CD-2 part; основна фракція знаходиться в діапазоні від 0 см до 1 см у бік катоду.
5. V-CD; фракція гомогенно розподілилася від 0 см до 3 см.

За допомогою методу горизонтального електрофорезу на агарозі вдалося встановити наявність поверхневих полярних груп атомів у досліджуваних зразках – флуоресцентних вуглецевих наночастках.

При цьому наявність негативно заряджених іонів характерна для наноточок із «зеленим» спектром флуоресценції, а для наноточок із «синім» та «фіолетовим» спектром флуоресценції – наявність позитивно заряджених іонів.

Наявність к досліджуваних карбонових наноточках полярних груп атомів є важливим чинником для їх подальшої функціоналізації.

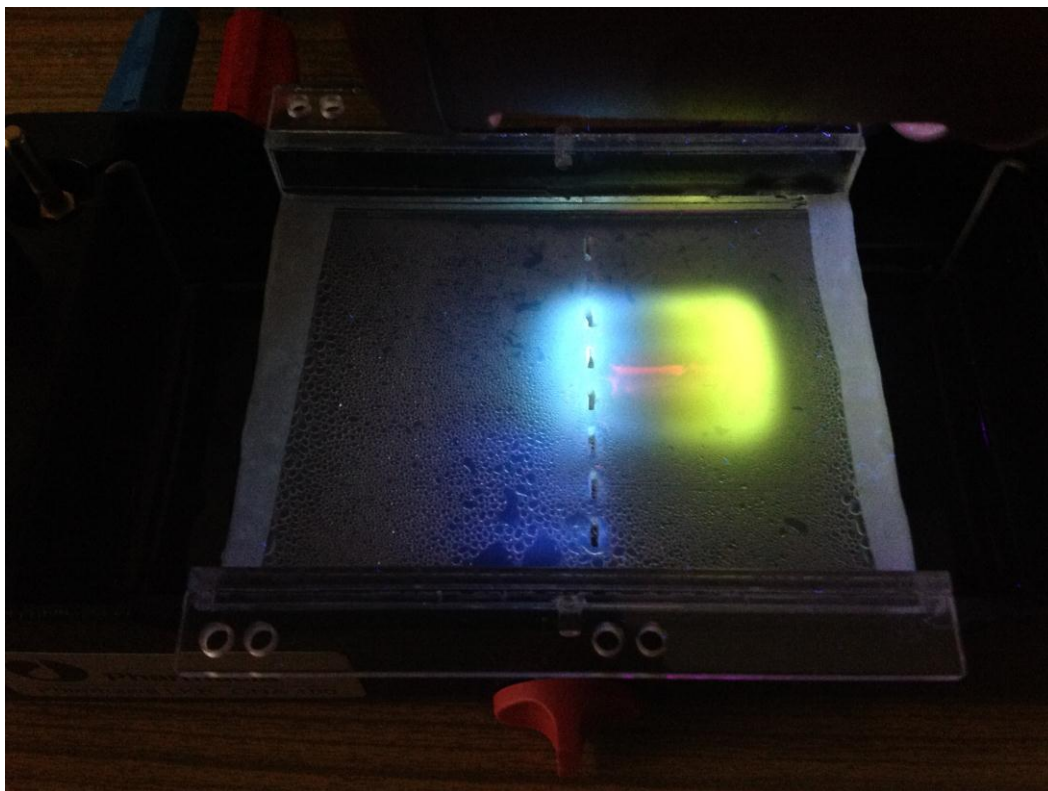


Фото 3.2. Фракціонування флуоресцентних наночасток методом горизонтального електрофорезу. Спектр збудження 370 нм

Таблиця 3.1.

Результати дослідження зразків флуоресцентних наноматеріалів

Речовина	Молекулярна маса (кДа)	Обсяг елюції (мл)	Спектр збудження $\lambda_{ex}^{max}$ (нм)	Спектр емісії $\lambda_{em}^{max}$ (нм)	Електричний заряд
Блакитний декстран	200	35			
<b>G-CD</b>	$X_1= 70$	44	425	530	–
БСА	64	45			
<b>BG-CD-1 part</b>	$X_2= 59$	51	405	525	–
<b>B-CD</b>	$X_3= 32$	74	350	445	+
<b>BG-CD-2 part</b>	$X_4= 29$	83	350	440	+
СТГ	21.6	120			
<b>V-CD</b>	$X_5=10$	135	335	405	+
Апротинин	7.25	140			

### **3.4. Динаміка формування карбонових частинок**

#### **3.4.1. План роботи**

- 1) Приготування зразків для дослідів.
- 2) Термічна обробка зразків.
- 3) Виділення наночасток.
- 4) Запис спектрів емісії та абсорбції зразків.
- 5) Аналіз отриманих даних.

#### **3.4.2. Хід роботи**

1) Для приготування суміші лимонної кислоти та карбаміду у молярному співвідношенні 1:3 відповідно, беруться наважки для дев'яти зразків: в кожному випадку зважується 0.258 г лимонної кислоти та 0.242 г сечовини, загалом в кожному із зразків міститься 0.5 г суміші, котра вноситься у термостійкий тигель із темного скла об'ємом 2 мл. Кожний тигель закривається алюмінієвою фольгою.

2) Після розігріву сушильної шафи, всередину вносяться 9 зразків на металевому тримачі. Зразки виймаються по чергово через 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 хв відповідно.

4) Зразки були розведені до об'єму 2 мл та доведені до гомогенного стану ультразвуковим диспергатором УЗДН-А150, і центрифуговані (центрифуга Eppendorf AG 22331, 5 хв, 10 тис. обертів) зі збором супернотанту.

5) Візуально детектована наявність флуоресценції у зразках (фото 3).

6) На спектрофлуориметрі були виміряні спектри випромінення та поглинання отриманих зразків за допомогою спектрофлуориметра Quanta Master (Фотон Technology International), оброблені програмою Origin.

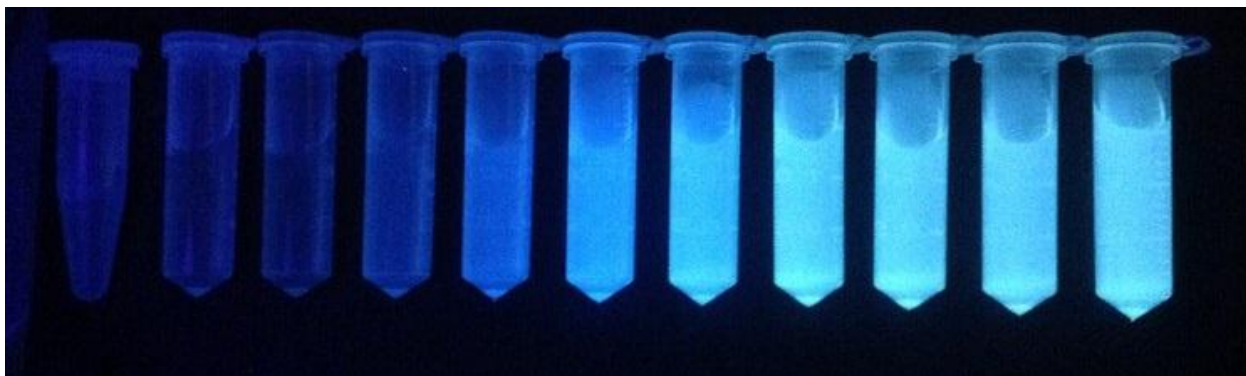


Фото 3.3. Отримані зразки карбонових флуоресцентних наночасток, фракціонованих за часом температурної обробки. Спектр збудження 370 нм.

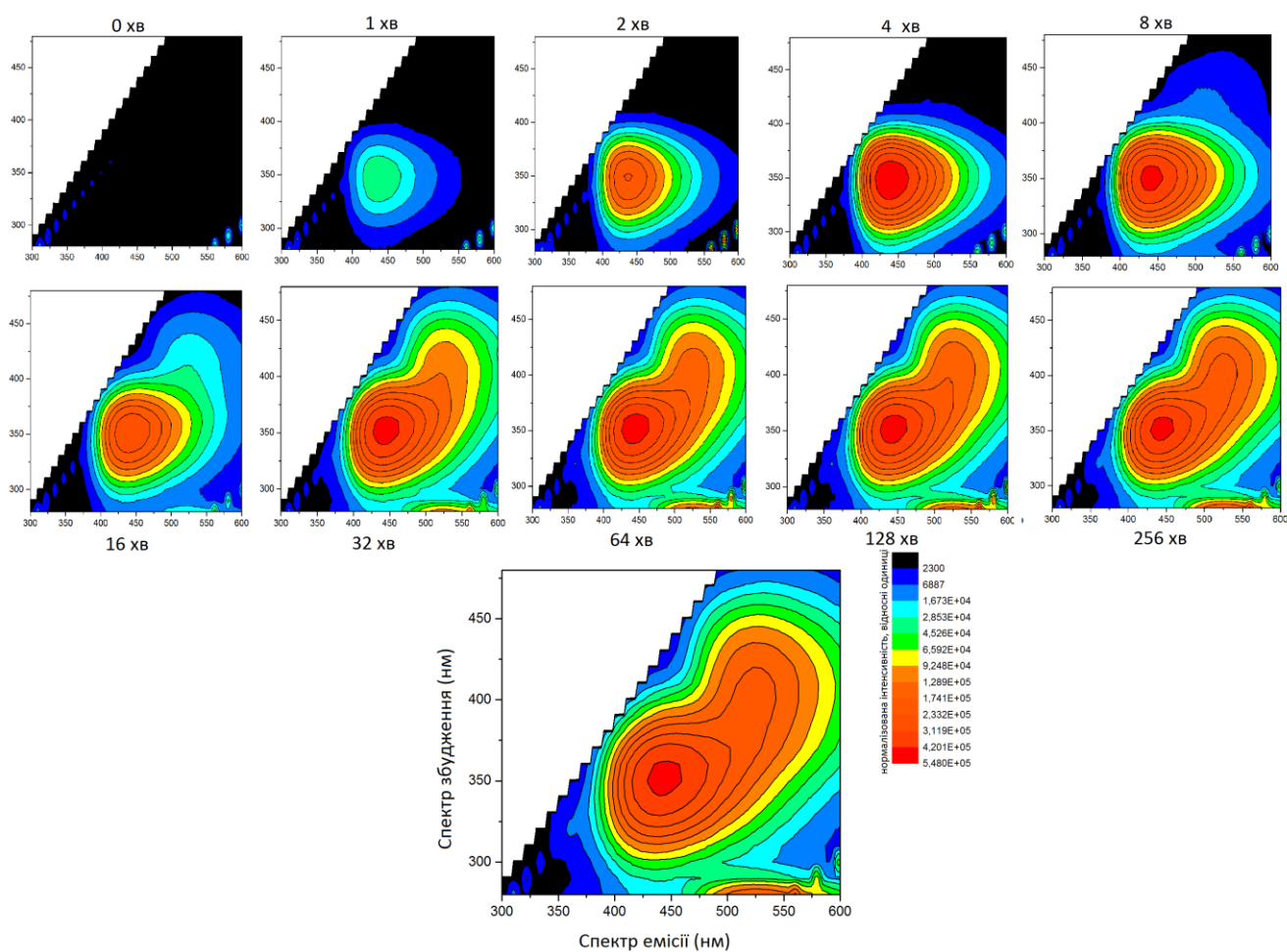


Рис. 3.1. Залежність спектру та інтенсивності випромінювання від часу обробки.



### **3.4.3. Результати дослідження та їх обговорення**

Отримано 9 зразків флуоресцентних матеріалів, флуоресцентні характеристики яких залежать від ступеня обробки.

Результати спектрофлуориметричного дослідження були відображені графічно на рис. 3.1.:

До 4-ї хвилини спостерігається швидке підвищення флуоресценції у області збудження: 360 нм, випромінювання: 440 нм, що свідчить про утворення певної, здатної до флуоресценції речовини. За нашим припущенням існує імовірність утворення із лимонної кислоти та сечовини нової гетероциклічної сполуки – цитразинової кислоти, здатної до флуоресценції [17].

Надалі спостерігається виникнення нової області флуоресценції [18] – із піком при збудженні: 415 нм, випромінюванні: 530 нм, який зростає впродовж нагрівання можливо завдяки утворенню карбонового ядра через полімеризацію [19], що і визначає здатність до флуоресценції карбонових точок [18].

## **3.5. Вивчення впливу карбонових частинок на біооб'єкт *Daphnia magna***

### **3.5.1. План роботи**

- 1) Підготування об'ємів із зразкам, контролю.
- 2) Внесення у дослідні об'єми дафній.
- 3) Оцінка кількості дафній після дослідження, математична обробка даних.
- 4) Визначення можливості флуоресцентного забарвлення дафній карбоновими частками

### **3.5.2. Хід роботи**

Зразки відповідного розведення наливаються у скляні ємності об'ємом 100 мл. Для приготування контролю наливають 100 мл відфільтрованої води з ємностей, де культивуються дафнії. Повторюваність у досліді та контролі - потрібна.

У кожному дослідному і контрольному ємності вміщують по 10 дафній у віці до 24 годин. Їх швидко переносять скляною трубкою діаметром 5-7 мм, зануривши у воду.

- 1) Тривалість біотестування на визначення гострої токсичності становить 96 годин.

Під час біотестування дафній не годують. Наприкінці біотестування візуально визначають кількість живих та іммобілізованих дафній. (Дафнія вважається живою, якщо вона здатна вільно переміщуватись у товщі воді або підійматись із дна посудини не пізніше 15 секунд після легкого струшування). Інші дафнії вважаються загиблими.

Засновуючись на даних результатів трьох паралельних визначень кількості живих дафній у контролі знаходять середнє арифметичне кількості дафній за формулою 3.1. [20]:

$$\bar{X}_{k(\text{ок})} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(\text{ок})i}}{I},$$

формула (3.1.)

де:  $\bar{X}_{k(\text{ок})}$  - результат і-го виміру кількості живих дафній у контролі. (і – номер виміру кількості живих дафній у контролі,  $i = 1, \dots, I$ ; I – кількість паралельних вимірів кількості живих дафній у контролі,  $I = 3$ ).

Розрахунок відношення у відсотках кількості загиблих дафній у досліді до кількості дафній у контролі за формулою 3.2.:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{\text{ок}}}{\bar{X}_k} \cdot 100.$$

формула (3.2.)

Висновок про наявність чи відсутність гострої летальної токсичності

досліджуваного розчину роблять, засновуючись на величині А. Якщо величина А становить 50% дафній і більше вважають, що аналізована проба виявляє гостру летальну токсичність.

Контроль: за час досліду (96год) середнім значенням кількості дафній у контролі прийнято  $X_{\text{ave}}=10$

Таблиця 3.2.

### Результати біотестування на *Daphnia Magna*

П/н досліду	Кіль-ть дафній у контролі (після проходження досліду – з 10)	мл стокового розчину взято на 100 мл води	Xalive (к-ть живих)	% іммобілізованих
1	10	10	10	0
2	10	100	9	10
3	9	1000	10	0
4	10	5000	9	10

#### 3.5.3. Результати досліду та їх обговорення.

При короткочасному біотестування (до 96 годин), яке дозволяє визначити гостру токсичну дію карбонових наночасток, виживання дафній у дослідних зразках не змінилася. Критерієм токсичності є загибель 50% і більше відсотків дафній за період часу до 96 годин у тестовому розчині в порівнянні з контролем. Звідси можна зробити висновок, що досліджувані наночастки не мають гострої токсичної дії на тест-об'єкт.

Таким чином, досліджувані флуорофори, вірогідно, можна використовувати для візуалізації клітин та живих об'єктів. Було проведено експериментальне дослідження щодо профарбовування живих дафній із застосуванням конфокального епіфлуоресцентного мікроскопу. Для цього дафнії занурювали у розчин з карбоновими частками в концентрації, яка суттєво не впливає на життєздатність (1000 мкл/100мл) на різні проміжки часу (від 1 години до 3 тижнів). З'ясувалося, що витримування рачків у досліджуваному розчині дає задовільні результати візуалізації їх внутрішніх структур приблизно за 10 годин (фото 3.4). Це дає підстави для оптимістичного заключення про можливість використання карбонових часток у якості флуоресцентних репортерів при вивченні живих істот як в інтактному стані, так і при дії пошкоджуючих чинників – токсинів, отрут, вірусів та інших забруднювачів. Візуальне спостереження пошкодження структур клітини або організму може свідчити про несприятливий екологічний стан довкілля.

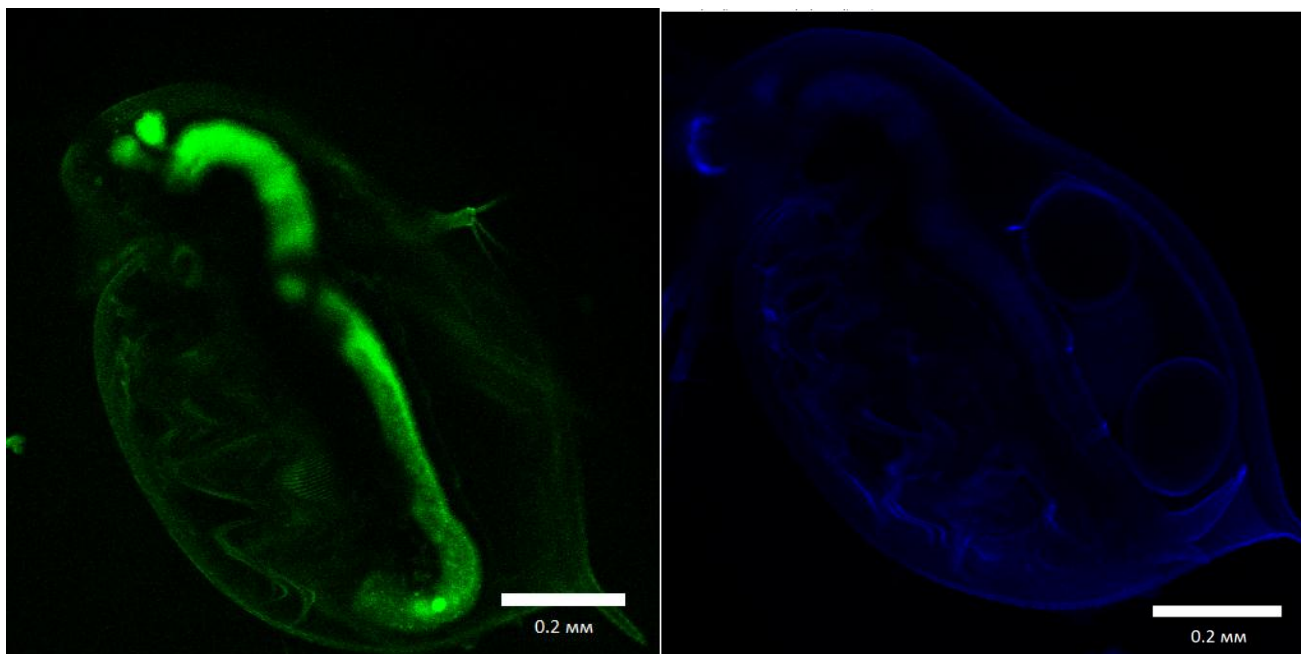


Фото 3.4. Конфокальна мікроскопія. Об'єкт *Daphnia Magna* – флуоресценція карбонових наноточок. Спектр збудження 405 нм. Емісії 525 нм і 440 нм.

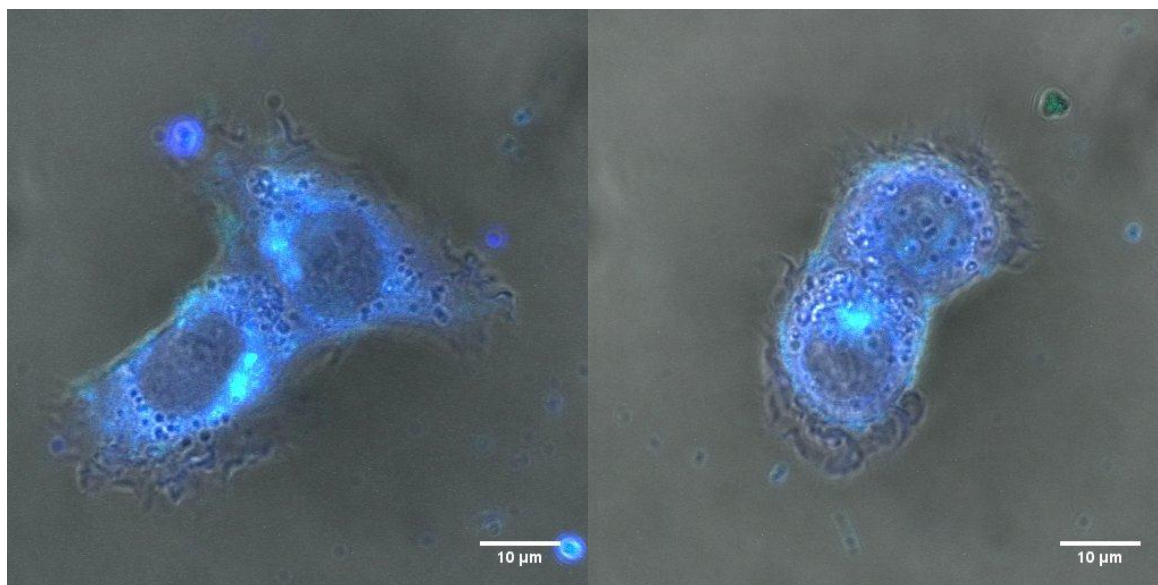


Фото 3.5. Конфокальна мікроскопія. Об'єкт клітини лінії HeLa – флуоресценція карбонових наноточок. Спектр збудження 405 нм.

## **3.6. Вивчення впливу карбонових часток на клітини лінії HeLa**

### **3.6.1. План роботи**

- 1) Інкубування клітин лінії HeLa з карбовоними частками, підготування для дослідження.
- 2) Визначення токсичності карбовоних часток для клітин лінії HeLa.
- 3) Визначення можливості флуоресцентного забарвлення клітин лінії HeLa карбовоними частками

### **3.6.2. Хід роботи**

У ході дослідження вивчалась можливість застосування створених наночасток в якості барвників для клітин на базі клітинних культур лінії HeLa.

Було проведено дослідження токсичності вуглецевих точок трьох типів для живих клітин. Протягом 24 та 48 годин клітини інкубувались з карбовоними точками у концентрації 10 мкг/мл. при температурі 37<sup>0</sup>С, далі відмивалися у аннексин-зв'язуючому буфері при центрифугуванні протягом 10 хв (2500 об/хв) 2 рази. Детекція стану клітин проводилася методом проточної цитофлуориметрії за наявності GFP міченого аннексину. Як позитивний контроль була використана проба клітин, що інкубувалася з актиноміцином Д (викликає апоптоз у 50-60% клітин).

Отримані результати засвідчили, що у зразках з вуглецевими точками спостерігалось 6-10% загиблих клітин; це не перевищує кількість загиблих клітин у контрольних групах (інкубація без C-dots). Таким чином це може свідчити про нетоксичність вуглецевих флуорофорів (VCD, BCD, B1CD) за тривалого часу інкубації.

Для встановлення можливості використання вуглецевих точок для візуалізації клітин були проведені наступні експерименти. Клітини були проінкубовані з вуглецевими точками протягом 1 години у клітинному середовищі, після цього піддавалися двократному відмиванню від надлишку точок та фіксації на склі за допомогою параформальдегіду. Зображення були зроблені за допомогою конфокального епіфлуоресцентного мікроскопу (фото 3.5.).

### **3.6.3. Результати дослідження та їх обговорення**

Отримані результати свідчать, що вуглецеві точки можуть вільно проникати у середину клітини за досить короткий час без будь-яких додаткових обробок клітин. Вірогідно, ці наноструктури забарвлюють лізосоми та ендосомальні везикули, що корелює з теоретично передбаченим механізмом проникнення вуглецевих точок у середину клітин. При цьому не спостерігалось ніяких змін, які б свідчили про несприятливу дію наночасток на клітини. Якщо передбачити, що всі негативні чинники можуть здійснювати руйнівний вплив на структурні компоненти клітини, та застосовані карбонові наночастки можуть бути свідками таких пошкоджень і, звідси, надавати інформацію про негативні умови довкілля в конкретному випадку.

## ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження:

1. Вперше синтезовано нові зразки біосумісних флуоресцентних вуглецевих наночасток гідротермічним методом з простих органічних речовин – лимонної кислоти, карбаміду, аланіну тощо. Встановлено їх розмір, заряд, спектральні властивості та визначено біотоксикологічні характеристики.

2. Експериментально встановлено залежність флуоресцентних характеристик від умов отримання. Показано динамічну залежність флуоресцентних властивостей проміжних продуктів в процесі термічної обробки вихідних речовин, що вірогідно обумовлено поступовою карбонізацією молекул із утворенням карбонового ядра шляхом полімеризації. Флуоресцентні властивості створеного карбонового ядра відрізняються від властивостей проміжних похідних, що може свідчити про їх структурні перебудови на певних етапах синтезу.

3. Показано відсутність гострої летальної токсичності на тестові біооб'єкти у концентраціях, які достатні для застосування карбонових часток у якості флуоресцентного маркера на прикладі дослідження біооб'єктів *Daphnia Magna* та клітин лінії HeLa. Експериментально показана перспективна можливість практичного використання досліджуваних наночасток для візуалізації клітин та живих об'єктів.

Новостворені флуоресцентні біосумісні вуглецеві наночастки можуть бути використані для безпечних прижиттєвих досліджень живих організмів, адресної доставки ліків до клітин-мішеней, що дозволить ефективно боротися з поширеними хворобами людства, зокрема, онкологічними, вірусними тощо, а також можуть бути широко застосовані в багатьох сферах життєдіяльності без екологічних ризиків.

Подальші дослідження мають на меті створення та виробництво максимально однорідних зразків карбонових точок з вузьким розподілом за розмірами, а також їх функціоналізація для практичного тестування.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Занина К. А. Влияние нанотехнологий и наноматериалов на человека и остальной живой мир / К. А. Занина, А. П. Цуркин // Технические науки: традиции и инновации: материалы II междунар. науч. конф. (г. Челябинск, октябрь 2013 г.). – Челябинск, 2013. – С. 21-24.
2. Прилуцька С. В., Ротко Д. М., Прилуцький Ю. І., Рибальченко В. К. Токсичність вуглецевих наноструктур у системах *in vitro* та *in vivo* // Совр. пробл. токсикол. – 2012. – № 3–4. – С. 49–57.
3. Мищенко С.В., Ткачев А.Г. Углеродные наноматериалы. Производство, свойства, применение. – М.: Машиностроение, 2008. – 320 с.
4. S.N. Baker and G.A. Baker, "Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights." *Angewandte Chemie International Edition*. vol. 49, no.38, pp. 6726-6744, 2010
5. H. Liu, T. Ye, and C. Mao, "Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot." *Angew Chem Int Ed Engl*. vol. 46, no.34, pp. 6473-5, 2007
6. S. Chandra, S.H. Pathan, S. Mitra, B.H. Modha, A. Goswami, and P. Pramanik, "Tuning of photoluminescence on different surface functionalized carbon quantum dots." *RSC Advances*. vol. 2, no.9, pp. 3602-3606, 2012
7. P.C. Hsu, Z.Y. Shih, C.H. Lee, and H.T. Chang, "Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots." *Green Chemistry*. vol. 14, no.4, pp. 917-920, 2012
8. J. Zhou, Z. Sheng, H. Han, M. Zou, and C. Li, "Facile synthesis of fluorescent carbon dots using watermelon peel as a carbon source." *Materials Letters*. vol. 66, no.1, pp. 222-224, 2012
9. P-C. Hsu, P.-C. Chen, C.-M. Ou, H.-Y. Chang, and H.-T. Chang, "Extremely High Inhibition Activity of Photoluminescent Carbon Nanodots toward Cancer Cells." *J. Mater. Chem. B*. 2013
10. Ray S. C., Saha A., Jana N. R., Sarkar R., Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application // *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 18546–18551



11. Головань Д.Р. Дослідження фізико-хімічних властивостей флуоресцентних наноматеріалів на основі вуглецю // Збірка тез доповідей XVII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Екологія. Людина. Суспільство» (м. Київ) / Укладач Д.Е. Бенатов.– К.: НТТУ «КПІ, 2014. – С. 84–85.
12. Головань Д.Р. Дослідження фізико-хімічних властивостей флуоресцентних наноматеріалів на основі вуглецю // Збірка тез Всеукраїнський біологічний форум учнівської та студентської молоді «Дотик природи» за заг. редакцією д.п.н., проф. В.В. Вербицького. – Київ: НЕНЦ, 2014. – С. 244–246.
13. Чекман І.І. Нанонаука, нанотехнологія, нанофармакологія: історичний аспект // Мистецтво лікування. - 2009. - № 2. - С. 48-51.
14. Bernard Valeur *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. — Wiley-VCH Verlag GmbH
15. Alexander P. Demchenko *Introduction to Fluorescence Sensing*. — Springer Science + Business Media B.V., 2009
16. Williams Bryan L., William K. *A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. – Edward Arnold, London, 1975
15. Демченко О.П., Назаренко В.І., Нанобіотехнологія: шлях у новий мікросвіт, створений синтезом хімії та біології // Біотехнологія. - Т. 5, №2, 2012
16. Демченко О.П., Назаренко В.І., Нанодіаманти для флуоресцентних клітинних і сенсорних нанотехнологій // *Biotechnologia ACTA*. - V. 6, No 5, 2013.
17. Evan E. Bolton, Yanli Wang, Paul A. Thiessen, Stephen H. Bryant (2008). „Chapter 12 PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities”. *Annual Reports in Computational Chemistry* 4: 217-241.
18. Reckmeier C. J., Schneider J., Susha A. S., Rogach A. L. Luminescent colloidal carbon dots: optical properties and effects of doping [Text] / Reckmeier C. J. // *Optical Society of America*. – 2015. - №2. – P. 10-25;
19. Kasprzyk W., Bednarza S., Żmudzki P., Galica M., Bogdała D. Novel efficient fluorophores synthesized from citric acid [Text] / Kasprzyk W. // *RSC Adv*. - 2015. - №5. - P. 34795-34799;

