

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.Н. КАРАЗІНА

ГНАТЮК ОЛЕНА ПЕТРІВНА

УДК 577.32

**СПЕКТРОСКОПІЧНІ МАРКЕРИ ВЗАЄМОДІЇ БІОЛОГІЧНИХ
МАКРОМОЛЕКУЛ, КЛІТИН ТА ТКАНИН З ПРОТИПУХЛИННИМИ
ПРЕПАРАТАМИ ТА НАНОСТРУКТУРАМИ**

03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки)

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті фізики НАН України.

Науковий консультант:

доктор фізико-математичних наук, професор,

ДОВБЕШКО Галина Іванівна

Інститут фізики НАН України,

головний науковий співробітник

Офіційні опоненти:

член – кореспондент НАН України,

доктор фізико-математичних наук,

ТРУСОВА Валерія Михайлівна

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

завідувач кафедри медичної фізики та біомедичних нанотехнологій.

доктор фіз.-мат. наук, старший науковий співробітник,

БРИЖИК Лариса Свиридівна,

Інститут теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова,

завідувач відділу теорії нелінійних процесів в конденсованих середовищах.

доктор фіз.-мат наук, старший дослідник

ДОРОШЕНКО Ірина Юрївна

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,

фізичний факультет,

провідний науковий співробітник.

Захист відбудеться “ 28 ” вересня 2021 року о 15:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий “ 25 ” серпня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Володимир БЕРЕЗТ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Спектроскопія біологічних макромолекул є важливим напрямком в біофізиці, оскільки, завдяки високій специфічності коливальних спектрів, їх конформаційній чутливості, дозволяє без додаткового використання міток на молекулярному рівні виявити відмінності у структурній організації ДНК, білків, ліпідів, визначити конформаційні стани біомолекул, структурні перебудови у клітинній мембрані, зміни молекулярного складу тканин, відрізнити норму від патології, тощо, з точністю, що не доступна іншим методам.

Сучасний стан розвитку біонанотехнологій потребує відповіді на питання, як взаємодіють білки, ДНК, ліпіди з іншими молекулами, наноструктурами, клітинами, вірусами, які зміни відбуваються під впливом зовнішніх електромагнітних полів тощо. Використання методів коливальної спектроскопії для цих задач є ефективною і перспективною але не простою задачею, що потребує достатніх наробок та знань в розшифровці спектрів складних біологічних молекул, а саме, визначення маркерів конформаційних станів та різних структур, які, наприклад для різних білків однієї конформації можуть відрізнятися, це ж відноситься і до маркерів взаємодій складних біомолекул з різними чинниками [C1].

Спектральні маркери можна визначити як набір найбільш характеристичних смуг в ІЧ спектрі, що відповідають поглинанню певних молекулярних груп в досліджуваному зразку, та є чутливими до впливів агентів, зовнішніх факторів, патологій, які ми досліджуємо, а саме вплив наночастинок, лікарських засобів, протоколів лікування, ступенів захворювання тощо) у порівнянні з еталонним зразком (контроль, без впливу препаратів, норма).

Особливого розвитку спектральні методи набули для ранньої діагностики патологічних станів за умови відсутності симптомів, зокрема для діагностики нейрогенеративних захворювань [C2], онкологічних захворювань [C3, C4], а також успішно використовуються для диференціювання апоптозу клітин від некрозу [C5] моніторингу росту та диференціювання клітин [C6], виявлення особливостей стовбурових клітин [C7], візуалізації клітинних органел [C8] тощо. Дані спектрального аналізу зразків тканин, біологічних рідин, дозволяють переосмислити численні етапи клінічного процесу від діагностики до оцінки ефективності лікування [C9]. Однак широке впровадження ІЧ спектральних методів дослідження для задач біології, біохімії, а також клінічну практику стикається з певними труднощами через складність ідентифікації та розшифровки спектральної інформації [C10].

Тому розширення спектральної бази даних та визначення **спектральних маркерів** для ідентифікації біологічних об'єктів та дослідження конформаційного складу нуклеїнових кислот, білків, структурних перебудов у клітинній мембрані, а також морфологічних особливостей клітин, клітинних органел та тканин є важливим як з фундаментальної так і з прикладної точки зору. Зокрема дослідження вторинної структури колагену у складі сполучної тканини дозволяє оцінити

ефективність проведеної терапії, а конформаційний аналіз лізоциму – ідентифікувати наявність фібрилярних структур та визначити умови їх утворення. Аналіз фазового складу штучної фосфоліпідної мембрани дозволяє визначити молекулярні механізми вбудовування лікарських засобів.

Актуальним також є і пошук специфічних підходів для реєстрації спектрів, зокрема пошук підсилюючих оптичні сигнали поверхонь та структур, що дозволить використовувати меншу кількість речовини, збільшити чутливість методу, а також візуалізувати досліджувані об'єкти. З цією метою успішно використовується класична мікро-Раман спектроскопія, що завдяки фокусуванню лазерного променя збудження на площі порядку 1 мкм дає можливість отримати сигнал розсіювання від окремих компонентів клітини. Суттєвою перевагою Раман спектроскопії є можливість реєструвати сигнал від живих клітин у фізіологічних умовах через слабе розсіювання молекулами води [C11].

Для візуалізації біологічних об'єктів успішно використовуються методи сучасної нелінійної спектроскопії, зокрема CARS – когерентна антистоксова Раман спектроскопія, що дозволяє одночасно і зареєструвати власне коливальний спектр, і провести візуалізацію досліджуваних систем на характеристичних коливальних частотах. CARS (когерентна антистоксова Раман спектроскопія) - це процес вимушеного Раманівського розсіяння, коли молекулярні коливання фазуються зовнішнім випромінюванням і розсіюються в антистоксову область. Цілий ряд переваг цього методу (неінвазивність, рівень сигналу в CARS може бути в 10^4 - 10^5 разів вищий ніж в Раманівській спектроскопії, частота ν_{CARS} набагато більша ніж ν_p і ν_s , що дозволяє використовувати фільтри і відсікати падаюче лазерне випромінювання, а також можливу флуоресценцію, мала розбіжність пучка, що дозволяє отримати гарне просторове розділення) зумовлює дуже стрімкий розвиток цього методу у напрямку дослідження біомолекул, клітин та тканин [C12-C14], однак тут все ще залишається широке поле для досліджень, зокрема в області аналізу CARS спектрів ДНК та клітин. Також одним з мінусів CARS спектроскопії є висока вартість необхідного обладнання та дуже обмежене коло фахівців в галузі CARS спектроскопії біологічних молекул.

Спектральний аналіз може бути застосований для дослідження впливу на культури клітин наночастинок різного типу з метою їх практичного застосування. Незважаючи на те, що шляхом модифікації наноструктур за допомогою біомолекул (біопокриття, ліпосомальні форми) вдалося зменшити небезпечні побічні ефекти для систем *in vivo*, дотепер клінічне використання нанопрепаратів є обмеженим в першу чергу через питання біобезпеки [C15]. Перспективними матеріалами для таких задач є сучасні 2D-наноматеріали – наночастинки, що утворені з шаруватих кристалічних структур, унікальні властивості яких зумовлені переходом від макроскопічного стану до наноструктурованого. Саме такого типу наночастинки через їх низьку цитотоксичність, порівняно з вуглецевими, металевими, оксидними, мають потенціал для створення систем доставки ліків з метою підвищення ефективності та специфічності методів лікування важких захворювань [C16]. Також, з огляду на люмінесцентні властивості деяких 2D матеріалів, вони можуть розглядатись як

нетоксичні маркери для візуалізації біологічних об'єктів та для підсилення ефективності оптичних процесів в спектроскопії.

Таким чином, актуальність запропонованого дослідження спектроскопічних маркерів взаємодії біологічних молекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наночастинками визначається необхідністю мати детальну базу даних для виявлення взаємозв'язку між спектральними маркерами та конформаційними і структурними властивостями досліджуваних об'єктів з метою їх практичного застосування для задач біомедичної діагностики, та для фундаментальних досліджень.

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

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планами наукової діяльності відділу фізики біологічних систем Інституту фізики НАН України в рамках наступних тем:

- “Дослідження фізичних властивостей і структурної динаміки біологічних макромолекул та наноконструкцій на їх основі” (2008-2012 рр., 1.4.В/150, № держреєстрації 0108U000253).
- “Дослідження структурних та динамічних властивостей природних та штучних наносистем, що містять біологічні макромолекули та їх комплекси” (2013-2017 рр., 1.4.В/173, № держреєстрації 0113U000838).
- “Фізичні ефекти та механізми взаємодії біологічних молекул та надмолекулярних біологічних систем з наночастинками та наноструктурованими середовищами” (2018-2022 рр., 1.4.В/196, № держреєстрації 0118U003377).
- “Розробка дешевих та підсилюючих наноструктурованих поверхонь для прикладних задач біохімії” 5525 УНТЦ – НАНУ, 2012-2013.
- “Дослідження динаміки репараційно-регенеративних процесів в дегенеративно-дистрофічно ушкоджених сухожиллях за умов введення мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку” № 84/11-44 НАНУ, 2011-2012.
- “Дослідження особливостей взаємодії та біосумісності нанорозмірних часток з культивованими клітинами” № 83/11-44 НАНУ, 2011-2012.
- “Графеноподібні матеріали та наноконструкції на їх основі: механохімічне одержання, будова, властивості, функціональне використання” 6175 УНТЦ-НАНУ, 2016-2018.
- “Вплив асиметрії та кривизни клітинної мембрани на функціонування мембранних білків та транспорт терапевтичних препаратів”, H2020-MSCA-RISE-2015, 690853 — assymcurv H2020-MSCA-RISE-2015 2016-2019.
- “Взаємодія наночастинок нітриду бору і скваленів з біологічними мембранами: спектроскопічні дослідження і комп'ютерне моделювання” Українсько – Литовський науково-дослідний проєкт 2018 – 2019.
- “Оптичні властивості вуглецевих наноструктур в обмеженому об'ємі фотонних кристалів” Українсько – Польський науково-дослідний проєкт, 2018 – 2019.
- “Новий метод детектування біозабруднень” NATO SPS G5291 2017-2019.
- Цільова програма наукових досліджень НАН України “Розробка 2D-матеріалів та “розумних” сенсорів медико-біологічного призначення на їх основі” 2018-2022 рр.

– “Вплив противірусних та тромболітичних препаратів на модельні мембрани вірусних частинок та клітин еукаріот” 2020.01/0043, НФДУ 2020-2021.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було визначення спектроскопічних маркерів та молекулярних механізмів впливу вуглецевих 1D наноструктур (одностінні та багатостінні вуглецеві нанотрубки), вуглецевих 2D наноструктур (графен, графенові наночастинки) та фулерену, 2D напівпровідникових (дисульфід вольфраму WS_2) та діелектричних (нітрид бору BN) наночастинок на конформаційні властивості біологічних молекул (ДНК, тимін, білки, ліпіди), а також на морфологічні та функціональні властивості культур клітин (фібробласти, пухлинні клітини аденокарциноми простати людини LNCaP, карциноми легені Льюїс LLC/R9). Оцінка ефективності проведеної терапії пошкоджених тканин Ахіллового сухожилля та твердої мозкової оболонки (ТМО) після черепно-мозкової травми та визначення спектроскопічних маркерів вторинної структури колагену на різних етапах регенерації тканин.

Для досягнення даної мети розв’язувались наступні завдання:

- 1) Аналіз спектральних характеристик синтезованих модифікованим механохімічним методом 2D наночастинок нітриду бору, а також дослідження їх цитотоксичного впливу на культури нормальних і пухлинних тканин. Вивчення молекулярних механізмів взаємодії 2D-BN наночастинок з клітинною мембраною та процесів їх проходження через мембрану. Аналіз морфологічних особливостей пухлинних клітин методом конфокальної мікроскопії до та після обробки наночастинками 2D-BN. Дослідження можливості утворення комплексів 2D-BN наночастинок з доксорубіцином. CARS мікроскопічні дослідження сквалену та нітриду бору як ймовірних прекурсорів для систем доставки ліків.
- 2) Аналіз спектральних характеристик синтезованих модифікованим механохімічним методом 2D наночастинок дисульфиду вольфраму, а також дослідження їх цитотоксичного впливу на культури пухлинних тканин при інкубації впродовж однієї доби і двох діб. Вивчення молекулярних механізмів впливу 2D наночастинок WS_2 на культури клітин карциноми легені Льюїс *in vitro*. Аналіз морфологічних особливостей пухлинних клітин методом конфокальної мікроскопії до та після обробки наночастинками WS_2 . Конформаційний аналіз білка лізоциму при взаємодії з 2D- WS_2 наночастинками. Чи індують наночастинки 2D- WS_2 формування амілоїдних фібрилярних структур?
- 3) Дослідження конформаційного складу фосфоліпідів з пухлинних тканин чутливих та резистентних штабів та визначення їх спектральних маркерів. Розробка модельних структур різного фосфоліпідного складу для дослідження взаємодії протипухлинних препаратів з ліпідною мембраною. Отримання ліпосом різного типу – з вбудованим в мембрану препаратом, та з препаратом на поверхні мембрани. Визначення спектральних маркерів та конформаційного складу таких структур.

- 4) Визначення унікального набору ІЧ спектральних маркерів з метою аналізу та характеристики якісного складу вуглецевих наноструктур різного типу – фулерени, квантові точки, одностінні та багатостінні вуглецеві нанотрубки. Контроль технологічного процесу синтезу та контроль якості отриманих вуглецевих наноструктур, кореляція з даними Раман спектроскопії.
- 5) Дослідження можливості використання графенової підложки для CARS спектроскопії ДНК, визначення CARS маркерів ДНК та порівняльний аналіз їх з даними Раман спектроскопії. Вивчення молекулярних механізмів взаємодії біомолекул з одностінними вуглецевими нанотрубками та графеном, визначення спектроскопічних маркерів та конформаційний аналіз біомолекул.
- 6) Визначення спектральних маркерів вторинної структури колагену у складі регенеруючої тканини твердої мозкової оболонки (ТМО) та тканин Ахіллового сухожилля, а також колагену у складі рубцевої тканини. Аналіз на молекулярному рівні ефективності проведеної терапії.

Об'єктом дослідження були біологічні макромолекули ДНК, лізоцим, колаген (першого і другого типу), DOPC (діолеїлфосфатидилхолін), молекула тиміну, загальна фракція ліпідів, виділена з пухлинних тканин, культури клітин (фібробласти, пухлинні клітини аденокарциноми простати людини LNCaP, карциноми легені Льюїс LLC/R9) до та після дії наноструктур різної природи та протипухлинних препаратів, зрізи тканин твердої мозкової оболонки до та після застосування терапії.

Предметом дослідження є спектральні маркери, що визначають особливості молекулярної структури біологічних молекул та її зміни під впливом наноструктур різної природи та протипухлинних препаратів, а також характер такого впливу на морфологічні та функціональні властивості клітин та тканин.

Методи дослідження

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FTIR - Fourier transform infrared) в геометрії пропускання, порушене повне внутрішнє відбивання (FTIR-ATR attenuated total reflectance), спектроскопія комбінаційного розсіяння світла (КРС або Раман спектроскопія), когерентна антистоксова Раман спектроскопія CARS (Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy), конфокальна мікроскопія для візуалізації досліджуваних зразків культур клітин та зрізів тканин, МТТ – колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин та для визначення цитотоксичності/цитостатичності досліджуваних наночастинок та лікарських засобів, флуоресцентна спектроскопія для дослідження комплексів доксорубіцину з нітридом бору, ультрафіолетова (УФ) спектроскопія для перевірки чистоти препаратів нуклеїнових кислот та білків, а також для розрахунку концентрацій розчинів біологічних молекул, аналіз тонкої структури спектрів за допомогою розкладу спектрального контуру на компоненти за алгоритмом Левенберга-Марквардта, квантовохімічні розрахунки на основі теорії функціоналу густини за допомогою програмного пакету QUANTUM-ESPRESSO.

Наукова новизна одержаних результатів

- Вперше показана можливість використання CARS спектроскопії для візуалізації біомолекул та вуглецевих наноструктур. Визначено CARS-спектральні маркери молекул ДНК та проведено їх порівняльний аналіз з даними КР спектроскопії. Показано, що метод нанесення ДНК на підложку з одношарового графену, дозволяє отримати контрастне CARS зображення молекул ДНК на частотах СН валентних коливань (2760 см^{-1} , 2900 см^{-1}), а у випадку використання скляної підложки – на частотах валентних коливань ОН (3400 см^{-1}) та на частотах $1625\text{--}1632\text{ см}^{-1}$, що відносяться до валентних коливань C=O та деформаційних коливань NH основ ДНК.
- Показано, що багатошаровий графен можна використовувати як підложку для інфрачервоної спектроскопії з метою підсилення сигналу від біомолекул та клітин в ІЧ спектрах поглинання та розсіяння. За допомогою графенової підложки вдалося зафіксувати присутність наночастинок WS_2 в культурі клітин, а також на моделі молекули тиміну визначити спектральні маркери взаємодії тиміну з одностінними вуглецевими нанотрубками, графеном та оксидом графену.
- Вперше показано можливість використання 2D наночастинок нітриду бору для підсилення оптичного сигналу в Раман спектрах. Місця локалізації наночастинок в клітині можуть слугувати підсилюючими центрами для незначного (у 3-5 разів) підсилення оптичних сигналів та дозволяють зареєструвати Раман спектри різних компонент клітини (мембрани, цитоплазми, ядра). Ці дані в подальшому можуть бути використані для цитологічного аналізу клітин.
- Вперше визначено спектральні маркери комплексів 2D-BN наночастинок, отриманих модифікованим механохімічним методом, з доксорубіцином. Вперше встановлено протекторну дію 2D-BN наночастинок в складі таких комплексів, а саме 10% зменшення цитотоксичного впливу комплексу на нормальні клітини, порівняно з чистим доксорубіцином, при незмінній ефективності доксорубіцину в комплексі з нітридом бору на пухлинні клітини.
- Зафіксовано впорядковану гел-фазу в загальній фракції фосфоліпідів з резистентного штаму пухлинних клітин при кімнатній температурі та визначено спектроскопічні маркери цієї фази. Для фосфоліпідів з чутливого штаму пухлинних клітин вперше виявлено неупорядковану рідкокристалічну фазу та встановлено відповідні спектроскопічними маркерами.
- Запропоновано два адаптовані протоколи для отримання модельних везикул (ліпосом) різного фосфоліпідного складу з метою дослідження взаємодії клітинної мембрани з лікарськими засобами. Як результат, було отримано два типи структур - із вбудованим у мембрану лікарським засобом (препарат був доданий у процесі приготування ліпосом) та адсорбованим на мембрані (препарат додавали після утворення ліпосом). Визначено набір інфрачервоних спектроскопічних маркерів модельних ліпосом із вбудованим у мембрану та адсорбованими на мембрані препаратами оксаліплатином та карбоплатином, охарактеризовано вторинну структуру отриманих систем.

- Вперше визначено набір спектроскопічних маркерів для конформаційного аналізу вторинної структури колагену у складі тканин Ахіллового сухожилля після застосування клітинної терапії, та у складі тканин твердої мозкової оболонки (ТМО) після застосування терапії полімерними плівками. Проведена оцінка ефективності терапії та аналіз структури відновлених тканин на молекулярному рівні.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що в дисертаційній роботі встановлено ряд характерних *спектральних маркерів* біомолекул, клітин та тканин при їх взаємодії з наночастинками, протипухлинними препаратами та проведено кореляцію цих маркерів з конформаційним складом біомолекул і морфологічними особливостями клітин та тканин. Зокрема встановлено спектроскопічні маркери взаємодії клітин з 2D наночастинками BN та WS₂, показано можливості їх застосування для практичних задач, пов'язаних з візуалізацією досліджуваних об'єктів. Показано можливість використання 2D-BN наночастинок як платформи для створення системи доставки ліків. Визначено спектроскопічні маркери та проведено конформаційний аналіз лізоциму при взаємодії з 2D-WS₂ наночастинками та вуглецевими нанотрубками, показано відмінності їх впливу на процеси формування амілоїдних фібрил. Визначено спектральні маркери модельних ліпідних везикул при їх взаємодії з протипухлинними препаратами, що має безпосереднє прикладне значення для створення систем доставки ліків та генетичного матеріалу. Показано можливість використання графену для дослідження біомолекул та клітин в CARS та Раман спектроскопії з підсиленням оптичного сигналу та покращенням контрасту зображення. Проаналізовано конформаційний склад колагену з регенеруючих тканин ТМО після черепно-мозкової травми, а також з пошкоджених тканин Ахіллового сухожилля, проведено оцінку ефективності застосованої терапії. Визначено спектроскопічні маркери нормальної ТМО та рубцевої тканини та показано можливості ІЧ спектроскопії для вирішення прикладних медичних задач.

Публікації.

Основні результати дисертації опубліковано у 52 роботах, в тому числі 19 статей у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України та у наукових періодичних закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus (з них 11 робіт у виданнях, що входять до перших двох квартилів (Q1/Q2) за класифікацією SCImago Journal and Country Rank), 2 розділи у колективних монографіях та в 31 роботі, що видані за матеріалами конференцій.

Особистий внесок здобувача. В опублікованих зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає:

у роботах [7, 8, 39, 40, 43, 47, 48, 50] здобувачем була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, проведена обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, аналіз Раман спектрів,

визначено CARS маркери досліджуваних зразків, проведена підготовка матеріалів до публікації;

у роботах [5, 9, 31, 33, 34] здобувачем була розроблена концепція дослідження, проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів, аналіз Раман спектрів, досліджуваних культур клітин до та після обробки наночастинками, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення отриманих результатів та підготовка матеріалів до публікації;

у роботах [10, 18, 19, 41, 42, 44, 45] здобувачем була розроблена концепція дослідження, методика приготування експериментальних зразків, проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, проведена підготовка матеріалів до публікації;

у роботах [1, 4, 12, 13, 16, 22-25, 27-30, 32] здобувачем була розроблена концепція дослідження, методика приготування досліджуваних комплексів, проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку;

у роботах [6, 11, 46, 51] здобувач приймала участь в аналізі, обробці та представленні експериментальних даних, підготовці матеріалів до публікації.

у роботах [2, 3] здобувачем була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів зразків досліджуваних вуглецевих матеріалів, визначення спектральних маркерів для аналізу зразків, підготовка матеріалів для друку;

у роботах [14, 15, 35-38] здобувачем була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, визначено спектральні маркери ліпідів з чутливих і резистентних штамів пухлинних тканин, вірусів, штучних мембран, проведено огляд літератури за темою роботи та підготовку матеріалів до публікації;

у роботах [20, 21, 26, 49, 52] здобувачем була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зрізів тканин, визначено спектральні маркери колагену регенеруючих тканин, проведено аналіз даних конфокальної мікроскопії, надано рекомендації щодо ефективності проведеної терапії, проведена підготовка матеріалів до публікації;

у роботі [17] здобувачем була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, дослідження можливостей використання наноструктурованої позолоченої підложки в конфокальної мікроскопії.

Апробація результатів дисертації.

Результати дисертації було представлено на міжнародних конференціях: Ukrainian-German symposium on physics and chemistry of nanostructures and on nanobiotechnology, The Crimea, Ukraine, 6-10 September, 2010. XX International School-Seminar of Galyna Puchkovska “Spectroscopy of Molecules and Crystals”, Beregove, Crimea, Ukraine, 20-27 September, 2011. Electronic and related properties of organic systems ERPOS-12, Vilnius, Lithuania, 11-13 July, 2011. International Conference “Physical Research Methods in Medicine”, Tbilisi, Georgia, 2011. NANOTECHNOLOGY: from fundamental research to innovations, Bukovel, Ukraine, 26 August – 2 September, 2012. 13-th International Young Sciences Conference Optics and

High Technology Material Science SPO 2012, Kyiv, Ukraine, 25-28 October, 2012. Fundamental and Applied NanoElectroMagnetics FANEM-12, Minsk, Belarus, May 22-25, 2012. XXI International School-Seminar of Galyna Puchkovska "Spectroscopy of Molecules and Crystals", Beregove, Crimea, Ukraine, 22-29 September 2013. IV International Conference NANOBIOPHYSICS 2015: Fundamental and Applied Aspects, Kyiv, Ukraine, 1-4 October, 2015. XV international conference Physics and technology of thin films and nanosystems, Ivano-Frankivsk, Ukraine, 11-16 May, 2015. The Jubilee 10-th International Conference «Electronic processes in organic and inorganic materials», Ternopil, Ukraine, 23–27 May, 2016. 5th International Conference NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects, Kharkiv, Ukraine, 2-5 October, 2017. International Young Scientists Conference Optics and High Technology Material Science - SPO 2017, Kyiv, Ukraine, October 26-29, 2017. Ukrianian-Polish Scientific Conference «Membrane and sorption processes and technologies», Kyiv, Ukraine, December 12-14, 2017. The 19th International Young Scientists Conference Optics and High Technology Material Science SPO 2018, Kyiv, Ukraine, October 25-28, 2018. Advanced properties and Processes in optoelectronic materials and systems – apropos 16, Vilnius, Lithuania. October 10-12, 2018. Nanomaterials: Application & Properties, Zatoka, Odesa region, Ukraine, 9-14 September, 2018. XXIV Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of molecules and crystals", Odesa, Ukraine, August 25-30, 2019. 1st International Conference on Innovative materials and nanoengineering (IMNE-2019), Brenna, Poland. 27-29 August, 2019. XVth International Conference on Molecular Spectroscopy, Wojanow, Wroclaw, Poland, September 15-19, 2019. International conference Nanobiophysics: fundamental and applied aspects, Kyiv, Ukraine, October 1-4, 2019. XII International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" (ICEPOM-12), Kamianets-Podilskyi, Ukraine, June 1-5, 2020. VII З'їзд нейрохірургів України з міжнародною участю, Сіде, Туреччина, 11 - 18 травня, 2021.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацією є сукупність наукових статей. Дисертація складається з вступу, основної частини та висновків. До основної частини, що складається з п'яти розділів. Дисертація викладена на 275 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету та задачі дослідження, визначено методи, об'єкт та предмет дослідження, а також новизну отриманих результатів та їх практичну цінність. Визначено особистий внесок здобувача, надано перелік публікацій здобувача та наведено дані щодо апробації результатів.

У розділі 1 «2D наночастинки нітриду бору(BN) та дисульфід вольфраму (WS₂) як платформа для дослідження культур клітин та біомолекул» представлено дослідження впливу 2D наночастинок BN та WS₂ на культури клітин (NIH3T3 – фібробласти миші, модель нормальних клітин, LNCaP –аденокарциноми простати та LLC/R9 – карциноми легені Льюїс як моделі пухлинних клітин) та

конформаційні властивості лізоциму. Досліджувані наночастинки були отримані модифікованим механохімічним методом (Інститут фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського) без додаткового застосування поверхнево-активних речовин, а як розшаровуючий агент використано NaCl. Це дозволяє отримати чисті водні суспензії наночастинок, які можна додавати до поживного середовища при культивуванні клітин. Розміри наночастинок, отриманих таким чином, варіюють в межах від одиниць нанометрів до 250 нм, а концентрація суспензій становить 0,1-0,3 мг/мл. Спектроскопічний ІЧ маркер наночастинок 2D-BN це смуга валентних коливань B-N в області 1368 см^{-1} , тоді як в Раман спектрі це E_{2g} мода на 1362 см^{-1} для нітриду бору (аналогічно в CARS спектрі спостерігаємо моду 1360 см^{-1} [7]) та дві фотонні моди для WS_2 з частотами 355 см^{-1} (E_{2g}^1) та 419 см^{-1} (A_{1g}).

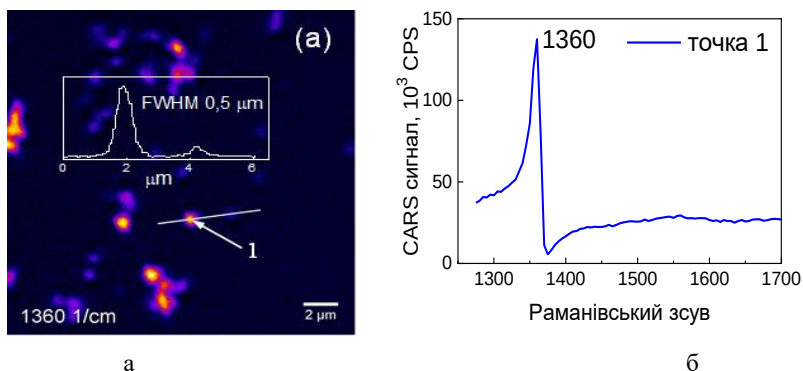


Рис.1. (а) CARS зображення зареєстровані на резонансній частоті 1360 см^{-1} та (б) CARS спектр порошку BN. Розмір зображень $20 \times 20\text{ μm}$. Профіль інтенсивності CARS, наведено білою суцільною лінією на зображенні. Спектр записаний на ділянці, що позначена стрілкою на зображенні (а).[7]

2D-BN наночастинки мають інтенсивний CARS резонансний сигнал на частоті 1360 см^{-1} , що узгоджується з даними ІЧ та Раман спектроскопії (рис.1).

Для аналізу впливу даних наночастинок на культури клітин, відповідні суспензії додавали до поживного середовища. Методом МТТ тесту було показано, що 2D-BN наночастинки в широкому діапазоні концентрацій не знижують життєздатності клітин фібробластів за умови одно- і дводобової інкубації. На відміну від 2D- WS_2 наночастинок, які на другу добу знижують кількість живих клітин на 30 відсотків.

З аналізу даних ІЧ спектроскопії (рис.2) було показано, що в залежності від тривалості інкубації 2D-BN наночастинки можуть проникати в цитоплазму та в область ядра клітини пухлини шляхом ендоцитозу та/або локалізуватись в області мембрани під час інкубації *in vitro*, при чому вже через 1 годину (бордова крива) спостерігаємо зміни в області валентних СН коливань в бік зростання вкладу CH_3 , а також бачимо появу плеча смуги коливань молекулярних груп P-O-C з максимумом на 1122 см^{-1} , що свідчить про вплив наночастинок на клітинну мембрану. Однак через 10 годин інкубації ці зміни вже не спостерігаються і спектр стає максимально подібним до контрольного. Через одну добу інкубації максимальні зміни

спостерігаються в області асиметричних (1242 см^{-1}) та симетричних (1085 см^{-1}) коливань PO_2 - груп нуклеїнових кислот, а саме спостерігаємо уширення та високочастотний зсув смуги 1242 см^{-1} , та появу додаткових плечей на частотах 1310, 1286 та 1267 см^{-1} . Такі зміни спектру свідчать про можливу дію наночастинок на клітинне ядро [5].

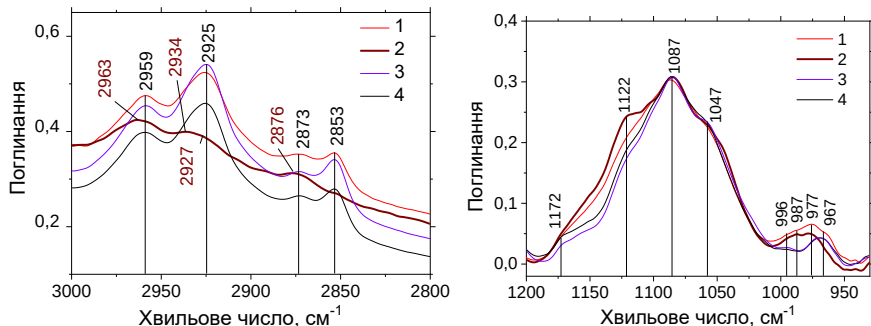


Рис.2. ІЧ-спектри поглинання культур пухлинних клітин, оброблених наночастинками BN з різним часом культивування. 1 - контроль, 1 доба культивування без використання наночастинок, 2 – 1 година культивування, 2- 2 години культивування, 3- 10 годин культивування.

Проаналізувавши Раман спектри пухлинних клітин LNCaP до та після обробки 2D-BN наночастинками, вдалося зафіксувати присутність наночастинок нітриду бору всередині клітини за маркерною модою E_{2g} в області 1364 см^{-1} , що слугує додатковим підтвердженням проникнення наночастинок в клітину. Окрім того, через присутність в клітині наночастинок 2D-BN, поверхня яких в даному випадку виступала як локальна підсилююча поверхня, вдалося зафіксувати Раман спектри різних компонент клітин (мембрани, цитоплазми, ядра), що свідчить про різні місця локалізації 2D-BN наночастинок в клітині в залежності від часу інкубації.

Дослідження взаємодії нітриду бору з доксорубіцином (DOX) свідчить про можливість утворення стійких нековалентних комплексів. А саме, за даними квантово-механічного моделювання методом теорії функціоналу густини показано, що після процесу релаксації положення рівноваги молекули DOX міститься на відстані $h = 2,44\text{ Å}$ від поверхні BN та найближчими атомами водню, при чому бензолні кільця DOX розташовані паралельно поверхні, а зв'язок C-N, орієнтований у напрямку протилежному від поверхні. Розрахований розподіл електронної густини не вказує на наявність будь-яких ковалентних зв'язків між атомами DOX та поверхнею BN, окрім сил ван-дер-Ваальса, що мають ключову роль у досліджуваному процесі адсорбції, та не залежать від початкової планарної орієнтації молекули DOX. Визначено також спектроскопічні маркери утворених комплексів та показано, що основні зміни при цьому відбуваються в області валентних C=O, C-O та C-C коливань.

Показано можливості CARS мікроскопії для реєстрації зображення клітин без додаткового використання барвників. Показано (рис. 3 а), що пухлинні клітини

LLC/R9 до (контроль) та після обробки комплексом доксорубіцину з нітридом бору мають різну морфологію. В контрольному зразку особливо чітко виділяється клітинна мембрана та ядро, при чому видно неоднорідності в структурі мембрани, які можуть бути зумовлені різним фосfolіпідним складом. Клітин після обробки виглядають як однорідні структури (рис. 3 б), однак після повторного сканування тої самої клітини спостерігається поява яскравих об'єктів люмінесцентної природи (рис. 3 в). Можна припустити, що при цьому вивільнились молекули з флуоресцентними властивостями, наприклад такі як цитохром С.

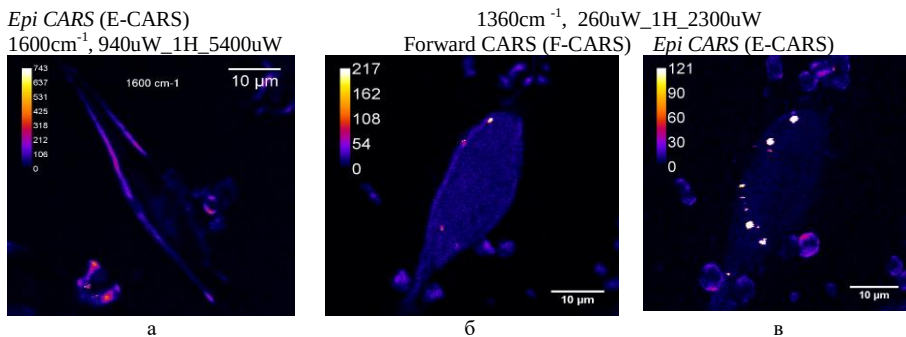
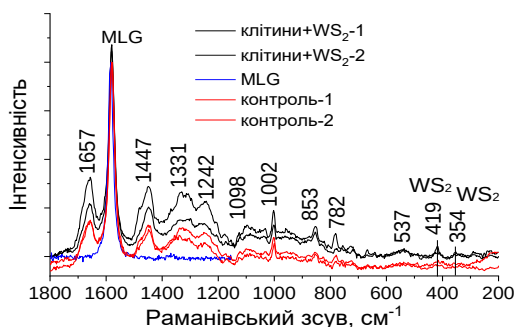


Рис.3. CARS зображення клітин LLC/R9 контроль (а), та оброблених Дох 5 мг/мл +BN 0.1 (б, в)

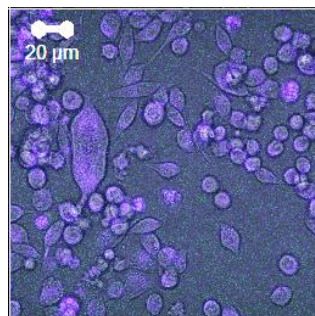
Основна відмінність наночастинок 2D-WS₂ від 2D-BN полягає у тому, що нітрид бору як масивний так і у вигляді наночастинок – є класичним діелектриком з шириною забороненої зони порядку 5 еВ, тоді як сульфід вольфраму – напівпровідник, при чому ширина забороненої зони WS₂ змінюється від 1,4 еВ в масивному (непрямозонний напівпровідник) до 2 еВ (прямозонний напівпровідник) в наноструктурованому стані. У моношаровій формі WS₂ під дією видимого світла протягом доби окислюється, при цьому продукти реакції включають оксид вольфраму та сірчану кислоту. Саме ці процеси окислення і зумовлюють його токсичний вплив на клітини на другу добу інкубації.

За даними Раман та ІЧ спектроскопії, наночастинок 2D-WS₂ також можуть проникати в цитоплазму клітин LLC/R9 або локалізуватись на мембрані, та спричиняти зміну клітинах на молекулярному рівні. Про це свідчать смуги в області 354 см⁻¹ та 419 см⁻¹, які є характеристичними E_{2g} та A_{1g} модами WS₂ (рис. 4 а). Для реєстрації Раман спектрів клітини були нанесені на підложку з багатшарового графену (MLG) і саме завдяки процесам підсилення вдалося зафіксувати коливальні моди як наночастинок так і клітин. Аналіз ІЧ спектрів поглинання клітин LLC/R9 до та після обробки наночастинок 2D-WS₂ дозволив виявити вплив 2D-WS₂ на конформаційний стан білкової фракції та нуклеїнових кислот. А саме звуження маркерної смуги Амід І через зменшення вкладу плеча на 1635 см⁻¹ (β-структури) свідчить про конформаційні зміни в білках, зменшення інтенсивності та звуження смуг в області 1239 см⁻¹ та 1084 см⁻¹, що відносяться відповідно до асиметричних та симетричних коливань молекулярних груп PO₂⁻ в

мембранних фосфоліпідів та цукрофосфатному остові і нуклеїнових кислот. Це може бути пов'язано з впорядкуванням ліпідів та білків поблизу поверхні наночастинок [9]. Аналіз даних конфокальної мікроскопії вказує на ще одну важливу властивість наночастинок 2D-WS₂ – їх люмінесценцію.



а



б

Рис.4. а - Раман спектри пухлинних клітин LLC/R9 після обробки наночастинками 2D-WS₂ (чорні криві, два спектри) та без обробки (контроль, червоні криві, два спектри). Синя крива – спектр підложки з багатошарового графену (MLG). б – конфокальне зображення клітин LLC/R9 після обробки наночастинками 2D-WS₂, об'єктив LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Когт, лазерне збудження 488нм T1 50,0%, 405 нм T2 30,0%.

Підвищена інтенсивність люмінесценції у синій спектральній області пухлинних клітин, оброблених цими наночастинками дозволяє запропонувати їх як маркер для підвищення контрастності зображення з метою візуалізації біологічних об'єктів. З морфологічної точки зору, після обробки 2D-WS₂ в полі зору спостерігається більша кількість клітин округлої форми та з пошкодженнями цілісності мембрани, порівняно з контролем.

Подібний ефект впорядкування структури білка лізоциму ми спостерігали досліджуючи утворення амілоїдних фібрил при взаємодії з 2D-WS₂ наночастинками за умови низьких значень рН. Саме при рН=2,0 та різних концентраціях розчину лізоциму (1 мг/мл, 20 мг/мл) ми спостерігали зростання вкладу смуг в області 1625 см⁻¹ та 1680 см⁻¹, що відповідають антипаралельним β-шарам. Однак при рН=11,5 спостерігаються протилежні ефекти, а саме при концентрації розчину 1 мг/мл присутність наночастинок навпаки перешкоджає утворенню фібрил, про що свідчить зменшення вкладу антипаралельних β-шарів. Таким чином 2D-WS₂ має різний вплив на вторинну структуру лізоциму в залежності від рН та концентрації вихідного розчину білка.

У розділі 2 «Вуглецеві наноструктури як платформа для дослідження біомолекул та культур клітин» представлені результати дослідження взаємодії біологічних молекул з вуглецевими наноструктурами (графен, наночастинок графену та оксиду графену, вуглецеві нанотрубки та фулерени), а також можливості

використання таких наноструктур як підложок для спектроскопії та мікроскопії з метою підсилення оптичних процесів.

Підложка з одношарового графену була використана для отримання CARS зображення та спектрів ДНК. Завдяки нелінійним властивостям графену вдалося отримати контрастне зображення молекул ДНК на частотах валентних СН коливань в області 2900 cm^{-1} (рис 5, б). Також було визначено CARS спектральні маркери молекул ДНК та показана подібність характеристикних смуг ДНК в спектрах Раман та CARS, однак положення смуг в спектрах CARS зсунуте у низькочастотну область порівняно зі Раман спектрами, при чому в високочастотній області валентних коливань водневопов'язаних NH та СН груп на $10\text{--}15\text{ cm}^{-1}$, а в області $1800\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ (область валентних коливань подвійних зв'язків C=O, C=N, C=C та СН-деформаційних коливань) – зсунуті на $10\text{--}20\text{ cm}^{-1}$, що узгоджується з теоретичними розрахунками (рис 5 а). [8]

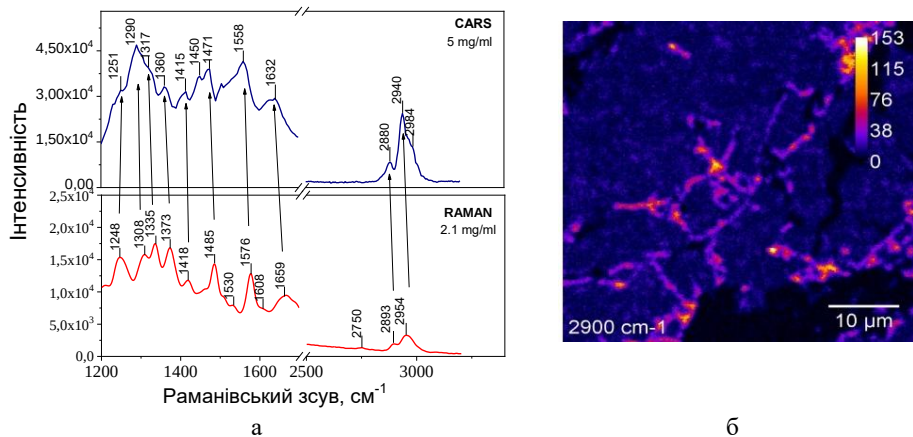


Рис.5. а- Порівняльний аналіз спектрів CARS та Раман ДНК. б – CARS зображення молекул ДНК, нанесених на підложку з одношарового графену на склі. ДНК відображається у вигляді яскравих видовжених об'єктів. Графен – темно-синій фон. Потужність Стокс $300\text{ }\mu\text{W}$ начки $170\text{ }\mu\text{W}$

Окрім графенових шарів, були досліджені також наночастинки графену та оксиду графену як потенційні поверхні для підсилення оптичних сигналів, а також з метою дослідження спектральних маркерів їх взаємодії з біологічними молекулами. Як досліджувані молекули були вибрані основи тимін та аденін, що мають в своїй структурі π -системи. Було показано частотну залежність коефіцієнту підсилення для різних наночастинок.

Згідно розрахункових даних взаємодія між нуклеїновими основами та вуглецевими нанотрубками відбувається саме за рахунок π - π стегінгу, при чому кільця основи розміщуються паралельно чи під невеликим кутом до поверхні нанотрубки. Щодо можливих механізмів підсилення, то це локальне підсилення поля на кінцях нанотрубок, де збільшена густина поверхневого заряду індукує сильне електричне поле. Коефіцієнти підсилення в ІЧ спектрах системи тимін-вуглецева нанотрубка реєструються в межах 3-5 разів (для смуг C-H, C-OH, C-N) без

суттєвих частотних зсувів основних смуг поглинання, окрім області 1770 cm^{-1} , де низькочастотний зсув смуги $\text{C}_2=\text{O}$ імовірно може бути зумовлений утворенням водневих зв'язків. У випадку комплексу тиміну з графеном максимальний коефіцієнт підсилення зафіксовано порядку 3-4 рази в області $980\text{--}474\text{ cm}^{-1}$, де знаходяться деформаційні коливання C-N , C-O , N-H груп (рис 6 а). Загалом, коефіцієнти підсилення для одностінних нанотрубок та графенових наночастинок мають однаковий характер, що може бути пов'язано з подібним механізмом підсилення.

Підсилення ІЧ поглинання на наночастинках оксиду графену має інші особливості, зокрема для тиміну більші значення отримали в області $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, а для аденіну вдалося отримати коефіцієнт підсилення в області $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ порядку 10 разів для валентних коливань $\text{C}=\text{O}$ (рис 6 б). У випадку оксиду графену основний вклад в підсилення можуть вносити процеси переносу заряду. [4]

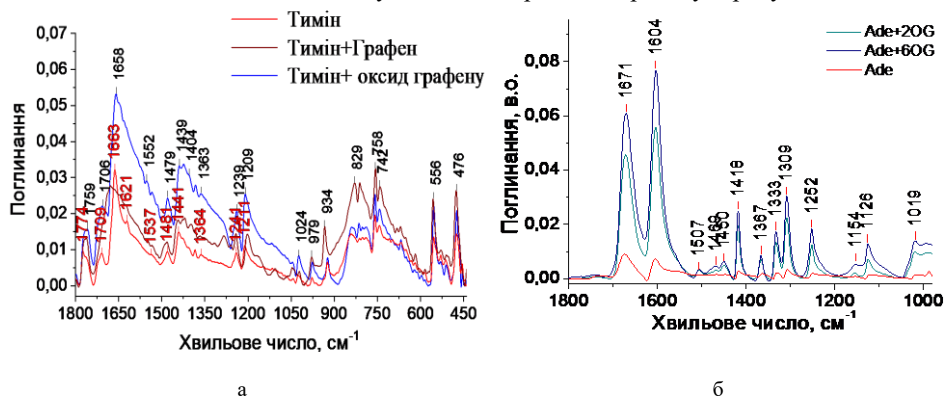


Рис.6. а - FTIR спектри тиміну та комплексу тиміну з наночастинками графену та оксиду графену. б - FTIR спектри аденіну та комплексу аденіну з наночастинками оксиду графену в різній концентрації.

Саме процеси переносу заряду відіграють основну роль в такій системі як наночастинки $\text{CeO}_{2-x}/\text{графен}$. Ця нанокompозитна система цікава тим, що може стати основою для розробки газових датчиків чи каталізаторів. Для отримання нанокompозиту $\text{CeO}_{2-x}/\text{графен}$ спочатку проводили синтез водної суспензії графенових наночастинок методом електрохімічної експлоатації терморозширеного графіту, яку потім навантажували оксидом церію. За даними Раман спектроскопії з розрахунку співвідношення між інтенсивностями характеристичних смуг I_{2D}/I_G графену, утворені таким чином графенові наночастинок мають кількість шарів 2-3 та відстань між шарами 3-10 нм. Особливістю оксиду церію є те, що при переході до наноструктурованого стану з розміром частинок менше 5 нм відбувається видалення частини кисню з ґратки через зміну ступеня окислення церію з Ce^{+4} до Ce^{+3} та зростання кількості кисневих вакансій, а також збільшення сталої ґратки, порівняно з масивним CeO_2 . [6]

При реєстрації Раман спектрів наноккомпозитів $\text{SeO}_{2-x}/\text{графен}$ за умови потужності лазерного збудження більше 5 мВт реєструється F_{2g} мода SeO_2 в області 460 cm^{-1} , яка була відсутня за умови нижчих потужностей збудження. Під дією лазерного випромінювання за умови присутності графену (на поверхні графену) відбувається заповнення кисневих вакансій та окислення Се до Se^{+4} . При більшій потужності збудження відбувається зменшення напівширини смуги F_{2g} та її височастотний зсув. Суттєві зміни при цьому відбуваються і в спектрах самого графену. По-перше це положення G-смуги графену в області 1585 cm^{-1} та її напівширина, а також відношення інтенсивності I_D/I_G , що підтверджує процеси переносу заряду.

В роботі було досліджено вплив вуглецевих нанотрубок на конформаційний стан білка лізоциму та показана можливість формування амілоїдних фібрилярних структур без застосування високих температур при різних значеннях рН. При цьому, окрім зовнішніх чинників, (концентрація білка, рН розчину та температура інкубації) важливу роль відіграє діаметр та структура нанотрубок (одностінні чи багатостінні). На конфокальному зображенні зразка лізоциму з багатостінними вуглецевими нанотрубками (рис 7 б) видно характерні видовжені структури довжиною порядку 50-100 мкм. [10]

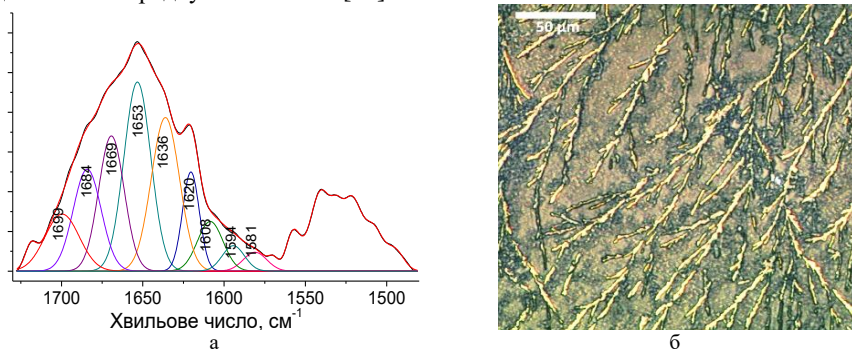


Рис.7. а – Розклад смуги Амід I лізоциму+MWCNT, рН=5,5. б- Конфокальне зображення структур утворених при взаємодії лізоциму з MWCNT при рН=11,5.

За даними ІЧ спектроскопії, маркерами амілоїдних фібрил є наявність характерних смуг, що відносяться до β -антипаралельної конформації лізоциму в області Аміду I $1687\text{--}1695 \text{ cm}^{-1}$ та $1615\text{--}1625 \text{ cm}^{-1}$ (рис.7 а). Ці додаткові смуги відсутні в вихідному зразку лізоциму. Для розкладу смуги Амід I на окремі компоненти за літературними даними була вибрана наступна модель структури складових компонентів цієї смуги поглинання з наступними характеристичними частотами окремих функціональних фрагментів: бічні групи – 1614 cm^{-1} , β - структура паралельна – $1628\text{--}1635$, $1680\text{--}1690 \text{ cm}^{-1}$, β - структура антипаралельна – $1615\text{--}1630 \text{ cm}^{-1}$, $1687\text{--}1695 \text{ cm}^{-1}$, α -спіраль – $1649\text{--}1655 \text{ cm}^{-1}$, неупорядкована структура – 1660 cm^{-1} . Слід зазначити, що для кожного білка такий компонентний склад потрібно підбирати окремо. Таким чином було показано, що при взаємодії лізоциму

з нанотрубками відбувається зростання вкладу β -антипаралельної конформації та зменшення вкладу α -спіралі. В даному випадку нанотрубки завдяки великій поверхневій енергії, виступають каталізаторами (центрами кристалізації) утворення структур, що мають характерні риси амілоїдних фібрил. Ці результати з одного боку розкривають один з механізмів цитотоксичності вуглецевих нанотрубок. З іншого, це дозволяє розробити методику моделювання структури з заданими властивостями.

Окрім вуглецевих наноструктур, з метою підсилення оптичних сигналів в конфокальній мікроскопії та спектроскопії, були досліджені наноструктуровані позолочені поверхні. Було показано можливість використання наноструктурованої позолоченої підложки для аналізу ІЧ спектрів культур клітин з врахуванням можливих частотних зсувів основних смуг поглинання в залежності від способу нанесення (вироснені чи нанесені). Було показано, що підвищена контрастність зображень клітин, вирощених на наноструктурованих позолочених поверхнях, що може бути зумовлена власною флуоресценцією шорсткої золотої плівки разом з підсиленням електромагнітного поля плазмонів, збуджених на шорсткій поверхні. Таким чином наноструктурована підложка, виготовлена у вигляді напиленого шару золота на скляну основу є зручною платформою для дослідження біологічних об'єктів, в якій поєднується власна флуоресценція з підсиленням оптичних процесів за рахунок підсилення поля плазмонними коливаннями. [17]

У розділі 3 «Коливальні маркери вуглецевих наноструктур» детально проаналізовано спектральні маркери (ІЧ та Раман) різних типів вуглецевих структур з метою їх подальшого використання для аналітичних задач та для контролю технологічних процесів синтезу наноструктур. Завдяки використанню підложок з наноструктурованого золота вдалося зареєструвати та розділити ряд характеристичних смуг. Відомо, що гексагональний графіт має групу симетрії D_{6h}^4 , незвідні представлення якої у центрі зони Бріллюена мають наступний вигляд: $\Gamma = 2E_{2g} + E_{1u} + 2B_{2g} + 2A_{2u}$. Згідно з правилами відбору, лише асиметричні коливання активні в ІЧ спектрах (E_{1u} та A_{2u}), однак ці моди активні у випадку тримірної структури і не активні для двомірних шарів графіту. При цьому мода A_{2u} поляризована в площині шару графіту та локалізована в області 1587 cm^{-1} , а мода E_{1u} поляризована в площині паралельній до шару графену та локалізована в області 868 cm^{-1} . Що стосується багатошарових нанотрубок, то вони мають подібні спектральні характеристики. Так, ми зареєстрували наступні моди: валентні коливання O-H (3460 cm^{-1}), C=O ($1740\text{--}1670 \text{ cm}^{-1}$); C=C ($1650\text{--}1480 \text{ cm}^{-1}$); C-H ($2900\text{--}3700, 1490\text{--}1420 \text{ cm}^{-1}$), а також широку смугу в області $1300\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$, що відноситься до деформаційних коливань C-O, C-C молекулярних груп (рис. 8). [2] Більшість смуг поглинання нанотрубок, які ми реєструємо, пов'язана з наявними дефектами в структурі, а також вказують на присутність кисневмісних молекулярних груп на поверхні нанотрубок, що свідчить про процеси окислення. Характеристичні смуги хлорвмісних вуглецевих нанотрубок з різних буферів (спирт і водна суспензія), подібні, однак відрізняються за інтенсивностями та мають деякі частотні зсуви залежно від реакційного буферу, а саме: $893 (912), 748 (747), 637 (642), 568 (556) \text{ cm}^{-1}$ (в дужках – з водної суспензії). Раман спектроскопія дозволяє за співвідношенням між інтенсивностями смуг визначати кількість шарів в графені та нанотрубках, а

також дефектність структур. Раман спектри багатопарових нанотрубок містять дві широкі характерні смуги в області 1599 та 1300 cm^{-1} .

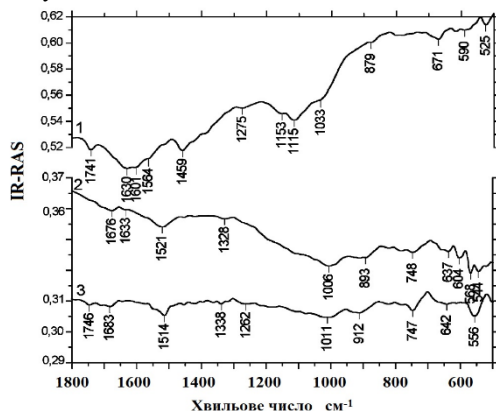


Рис.8. FTIR спектри сажі (крива 1) та хлорвмісних вуглецевих нанотрубок нанесених на наноструктуровану позолочену підложку зі етанолу (крива 2) та з водної суспензії (крива 3). Спектри зареєстровані в геометрії на відбивання

У розділі 4. «Спектральні маркери ліпідів з пухлинних тканин та модельних ліпосом різного складу при взаємодії з протипухлинними препаратами» опрацьовано два протоколи отримання фосфоліпідних модельних систем ліпосомального типу в комплексі з протипухлинним препаратами оксалиплатин та карбоплатин. В результаті виконання зазначених протоколів були отримані структури двох типів – з препаратом вбудованим в мембрану (препарат додавали в процесі приготування ліпосом) та з препаратом адсорбованим на поверхні мембрани (препарат додавали після формування ліпосом). Показано, що протокол приготування зразків з додаванням препарату в процесі формування ліпосом є більш ефективним для дослідження процесу взаємодії мембрани з препаратами.

Визначено набір ІЧ-спектроскопічних маркерів модельних іммобілізованих ліпосом, за допомогою яких можна охарактеризувати дію препарату на їх структуру. До цих маркерів можна віднести наступні смуги: валентні коливання CH_2 - груп в області 2925 cm^{-1} , валентні коливання C=O в області 1735 cm^{-1} , а також смуги валентних асиметричних коливань PO_2^- молекулярних груп. Показано, що протипухлинні препарати взаємодіють з фосфоліпідами через утворення водневих зв'язків між C=O та N-H групами фосфоліпідів та препаратів, про що свідчать зміни в області поглинання C=O та PO_2^- молекулярних груп фосфоліпідів. За рахунок такої взаємодії відбувається структурування мембрани та упаковка ліпідів стає більш впорядкованою.

Всі особливості упаковки фосфоліпідів в клітинній мембрані, фазові стани та фазові переходи мають свої характерні особливості в спектрах ІЧ поглинання. Зміни параметрів основних смуг ІЧ поглинання (положення смуги, відносна інтенсивність, зміна напівширини) свідчать про утворення тої чи іншої просторової упаковки. Положення валентних коливань CH_2 - 2920, 2850 cm^{-1} та CH_3 - 2950, 2880, cm^{-1} молекулярних груп свідчить про впорядкування у вуглеводневому ланцюгу (хвостах

фосфоліпідів) - височастотний зсув – зростання вкладу *gauche*-, низькочастотний зсув – зростання вкладу *trans*-.

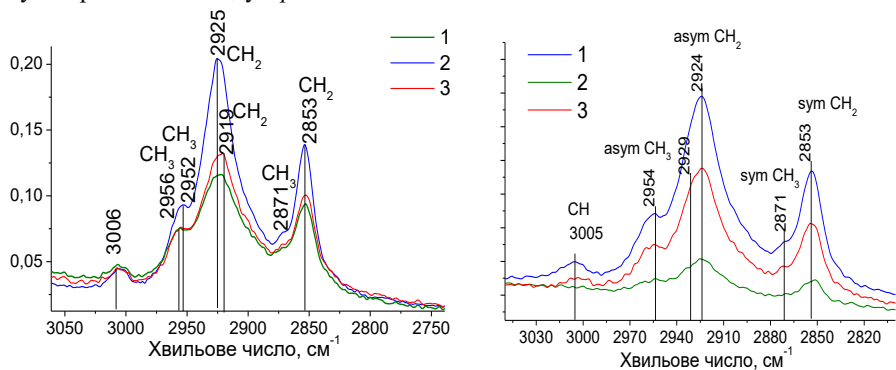


Рис.9. а - FT-IR спектри поглинання DOPC у комплексі з препаратом оксалиплатин в області 2800-3050 cm^{-1} : зелена крива (1) - DOPC з оксалиплатином при абсорбуванні препарату на поверхню міцели; синя крива (2) - DOPC з оксалиплатином при вбудовуванні препарату в міцелу; червона крива – контроль DOPC. Б - FT-IR спектри поглинання DOPC у комплексі з препаратом карбоплатин в області 2800-3050 cm^{-1} : зелена крива (1) - DOPC з карбоплатином при абсорбуванні препарату на поверхню міцели; синя крива (2) - DOPC з карбоплатином при вбудовуванні препарату в міцелу; червона крива (3) – контроль DOPC.

Деформаційні CH_2 коливання 1468 cm^{-1} – гексагональна фаза, а у випадку коли ми спостерігаємо розщеплення $1475, 1465 \text{ cm}^{-1}$, можна стверджувати про появу впорядкованої кристалічної фази.

При аналізі спектрів поглинання бачимо суттєві зміни в області поглинання валентних коливань молекулярних груп CH , що характеризують конформацію фосфоліпідних хвостів. У вихідній міцелі без препарату можемо відмітити наявність явно виражених двох плеч у смуги CH_2 на 2929 та 2924 cm^{-1} , що може свідчити про деяку конформаційну неоднорідність та певну розупорядкованість. У випадку вбудовування препарату в мембрану (сині криві) асиметрія смуги CH_2 зникає, тобто конформація хвостів стає визначеною і однаковою, мембрана відповідно більш щільною і впорядкованою. Крім того спостерігаємо зростання інтенсивності смуг CH . Такі зміни характерні для обох препаратів. При адсорбуванні препарату на поверхню міцели ефекти зовсім інші. Маємо зменшення інтенсивності CH – валентних коливань, та залишається асиметрія смуги (рис. 9). Було показано, що при вбудовування препарату в модельну мембрану смуга валентних симетричних коливань CH_2 -молекулярних груп зростає в інтенсивності та її контур стає більш симетричним. Це може свідчити про впорядкування фосфоліпідних алкільних ланцюгів та більш щільну їх упаковку в мембрані. Протипухлинні препарати взаємодіють з фосфоліпідами через утворення водневих зв'язків між C=O та N-H групами фосфоліпідів та препаратів, про що свідчать зміни в області поглинання C=O та PO_2^- молекулярних груп фосфоліпідів. За рахунок такої взаємодії

відбувається структурування мембрани та упаковка ліпідів стає більш впорядкованою.

Дослідження загальної фракції фосфоліпідів, виділених з резистентних штамів пухлинних клітин показало специфічні спектральні особливості, які раніше не вдавалося зафіксувати у інших зразках фосфоліпідів [13, 15].

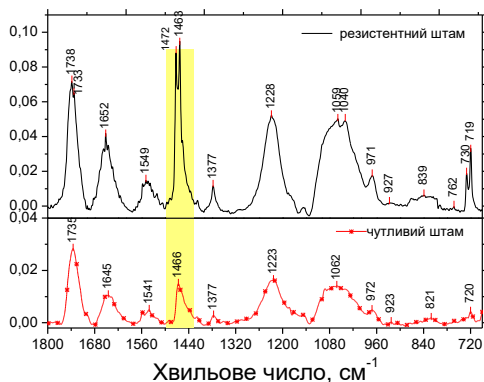


Рис.10. - FT-IR спектри поглинання загальної фракції фосфоліпідів, виділеної з резистентного(верхня крива) та чутливого (нижня крива) штаму пухлинних клітин.

А саме – розщеплення смуги валентних коливань $C=O$ 1738 cm^{-1} та 1733 cm^{-1} , деформаційних коливань молекулярних груп CH_2 - 1473 cm^{-1} та 1463 cm^{-1} та в області 719 cm^{-1} та 730 cm^{-1} (рис 10). Таке розщеплення свідчить про утворення впорядкованої рідкокристалічної фази. Як правило, така фаза для чистих фосфоліпідів є низькотемпературною, однак у випадку резистентного штаму, ми зафіксували її при кімнатній температурі. Тому це може свідчити про зміни фосфоліпідного складу плазматичної мембрани резистентних пухлинних клітин в сторону зростання вкладу холестеролу, що призводить до зростання мікров'язкості. Цей факт був підтверджений у нашій роботі [21], в якій окрім цього було показано зменшення вкладу ліпідів з ненасиченими зв'язками в резистентному штамі, що також спричиняє зростання мікров'язкості.

Іншою особливістю ІЧ спектрів фосфоліпідів з резистентних штамів є високочастотний зсув положення основних смуг поглинання порівняно з даними для чутливого штаму, а саме $1652\text{--}1645\text{ cm}^{-1}$, $1549\text{--}1541\text{ cm}^{-1}$, $1228\text{--}1223\text{ cm}^{-1}$, $927\text{--}923\text{ cm}^{-1}$, що свідчить про зростання вкладу гош-конформації

У розділі 5 «Спектральні маркери вторинної структури колагену регенованих тканин» було досліджено конформаційний склад колагену з регенеруючих тканин твердої мозкової оболонки після змодельованої черепно-мозкової травми та проведено оцінку ефективності терапії *in vivo*. Для терапії були використані полімерні плівки кількох різних типів – на основі колагену, на основі хітозану, окремо та разом з плівкою желатину. Для реєстрації спектрів поглинання

були зроблені тонкі зрізи тканин з області проведення імплантації через 3 і 6 тижнів після проведення операції [20, 21].

Спочатку були визначені спектроскопічні маркери нормальної тканини ТМО та рубцевої тканини. Було встановлено, що для рубцевої тканини характерне більш низькочастотне положення смуги Амід А, порівняно з контролем, (3289 та 3300 cm^{-1} відповідно). Інтенсивність смуг СН валентних коливань вища або порівняна з Амідом А, при цьому положення смуг валентних коливань CH_2 та CH_3 залишаються незмінними ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$), порівняно з контролем. В області деформаційних коливань CH_2 та CH_3 присутні додаткові моди на 1465 та 1378 cm^{-1} , які не спостерігаються в контролі. Також характерною особливістю рубцевої тканини є інтенсивна смуга $\text{C}=\text{O}$ на 1742 cm^{-1} . Окрім того, можна відмітити меншу напівширину смуги Амід І в рубцевій тканині за рахунок зменшення вкладу плеча в області 1632 cm^{-1} , що відповідає за потрійну спіраль. Відносна інтенсивність Амиду І до Амиду ІІ в контролі складає 1,25- 1,31, а в рубцевій тканині 1,54-1,72. Смуга Амід ІІІ в області 1237 cm^{-1} є не до кінця структурованою, а саме слабо виражені плечі на 1281 та 1204 cm^{-1} . Всі ці ознаки можуть бути основою для ідентифікації рубцевої тканини, або для виявлення характерних тенденцій до рубцювання після проведеної терапії (рис.11).

Найбільш показові спектральні ефекти були отримані в групах з хітозаном, оскільки хітозан має спектр поглинання, радикально відмінний від спектрів желатину, колагену та ТМО в цілому, тому присутність плівок на основі хітозану в зразках тканин можна безпомилково ідентифікувати. Хітозанова плівка з ПЕО за 6 тижнів не деградує, її залишки чітко ідентифікуються в ІЧ спектрах, а додаткове використання желатину прискорює процес деградації плівки хітозану і сприяє нормальному загоєнню травми. Застосування колагенових плівок дає позитивний ефект на ранніх стадіях загоєння, однак в подальшому спостерігається тенденція до утворення рубцевої тканини. Використання желатинової плівки паралельно з колагеновою сприяє повному відновленню ТМО без ознак утворення рубця. Аутопластика на пізніших етапах загоєння має незначні ознаки рубцювання.

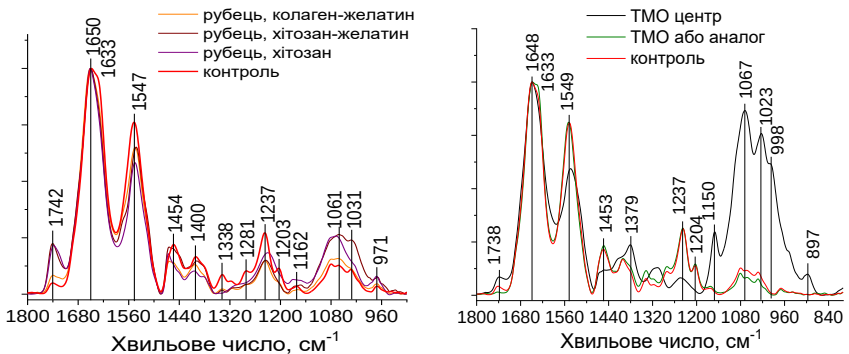


Рис.11. а – FTIR-ATR спектри рубцевої тканини, б – FTIR-ATR спектри тканини регенеруючої ТМО та інтактної ТМО (контроль), 6 тижнів після лікування з застосуванням плівки хітозан +ПЕО 70/30.

Висновки, зроблені за даними ІЧ спектроскопії корелюють з зображеннями, отриманими методом конфокальної мікроскопії (рис 12). Для реєстрації конфокальних зображень були використані зрізи тканин ТМО попередньо забарвлені за стандартною методикою еозином та гематоксиліном. На ранніх стадіях загоєння видно присутність тонких колагенових волокон, не зібраних в пучки, а також значку кількість клітин фібробластів в зоні загоєння.

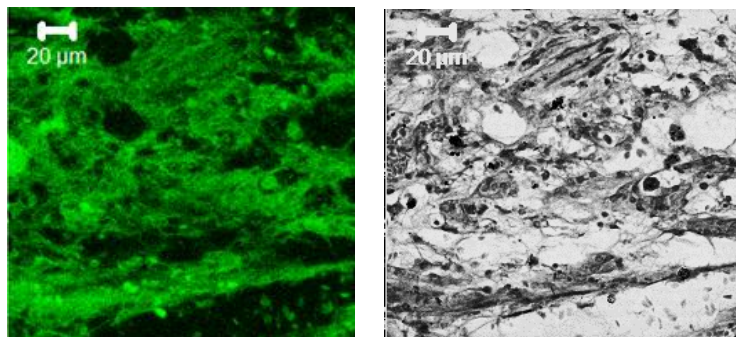


Рис.12. Конфокальні зображення зрізів тканин регенеруючої ТМО через 3 тижні після лікування з застосуванням плівки на основі колагену.

Натомість після 6 тижнів колаген формує товсті пучки, структура тканин стає більш впорядкованою, клітини в полі зору відсутні. Завдяки люмінесцентним властивостям колагену відновлена тканини ТМО має характерне світіння в зеленій і червоній області. Результати роботи дозволили зробити діагностику тканин після проведено терапії та запропонувати найбільш оптимальні протоколи лікування.

ВИСНОВКИ

Досліджено спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами та визначено взаємозв'язки між спектральним маркерами та конформаційними властивостями досліджуваних біологічних об'єктів з метою їх практичного застосування для задач біології, біохімії, медицини, діагностики, а також для фундаментальних досліджень.

1. Вперше визначено CARS спектральні маркери ДНК та проведено їх порівняльний аналіз з даними Раман спектроскопії. Показано, що положення основних маркерних смуг ДНК в CARS спектрі зсунуті в низькочастотну область, порівняно з даними КР, а саме в області NH-CH валентних водневопов'язаних коливань на $10-15\text{ см}^{-1}$, а в області $1800-1200\text{ см}^{-1}$, куди дають вклад C=O валентні, CH-деформаційні коливання та вклади основ ДНК – зсунуті на $10-20\text{ см}^{-1}$, що узгоджується з теоретичними розрахунками. Показано, що при нанесенні ДНК на підложку з одношарового графену, можна отримати контрастне CARS зображення ДНК на частотах CH валентних коливань $2760, 2900\text{ см}^{-1}$, а у випадку використання скляної підложки – на частотах OH валентних коливань 3400 см^{-1} та C=O 1625 см^{-1} .

2. Визначено ІЧ, Раман та CARS спектроскопічні маркери 2D наночастинок нітриду бору, отриманих вдосконалим механохімічним методом з масивного BN та показано стабільність водної суспензії таких наночастинок впродовж тривалого часу до пів року. Показано, що 2D-BN наночастинок мають інтенсивний CARS резонансний сигнал на частоті 1364 см^{-1} , що узгоджується з даними ІЧ та Раман спектроскопії.
3. Визначено спектроскопічні маркери нековалентних комплексів доксорубіцину з 2D-BN наночастинок, а саме зміщення смуги поглинання валентного коливання C-O з 1113 см^{-1} до 1119 см^{-1} , смуг поглинання C-C, C-O з 1082 см^{-1} до 1073 см^{-1} та деформаційних коливань N-H з 1286 см^{-1} до 1284 см^{-1} , порівняно з поглинанням доксорубіцину. Зміщення смуги валентних коливань C=O з 1709 см^{-1} до 1726 см^{-1} може свідчити про перебудову водневих зв'язків C=O...N-H у випадку утворення комплексу. Енергія зв'язування 2D-BN наночастинок з доксорубіцином порядку $-1,8\text{eV}$, що свідчить про стійкість таких комплексів.
4. Показано що водні суспензії 2D-BN наночастинок не виявляють цитотоксичного впливу на культури нормальних клітин в широкому діапазоні концентрацій, а у комплексі з доксорубіцином не змінюють ефективність впливу доксорубіцину на пухлинні клітини. Встановлено протекторну дію частинок нітриду бору на нормальні клітини, а саме 10 % зменшення цитотоксичного впливу доксорубіцину в комплексі з 2D-BN наночастинок на нормальні клітини.
5. Визначено, що в залежності від часу інкубації 2D-BN наночастинок можуть проникати в цитоплазму та в область ядра клітини пухлини шляхом ендоцитозу та/або локалізуватись в області мембрани під час інкубації *in vitro*. Показано, що через 1 годину інкубації 2D-BN наночастинок локалізуються на мембрані та визначено спектроскопічні маркери проходження наночастинок через мембрану, а саме перерозподіл вкладів СН валентних коливань в сторону зростання CH_3 , поява плеча P-O-C на 1122 см^{-1} . Місця локалізації наночастинок в клітині можуть слугувати підсилюючими поверхнями для незначного (3-5 разів) підсилення сигналів в Раман спектрів та дозволяють зареєструвати Раман спектри різних компонент клітин (мембрани, цитоплазми, ядра). Ці дані в подальшому можуть бути використані для цитологічного аналізу клітини.
6. Показано, що водна суспензія 2D-WS₂ наночастинок не виявляє цитотоксичного впливу на клітини карциноми легені Льюїса під час інкубації протягом 1 доби в широкому діапазоні концентрацій, однак за умови інкубації 2 доби демонструє залежне від концентрації зменшення кількості життєздатних клітин більш ніж на 30%. За даними КР спектроскопії в спектрах пухлинних клітин, оброблених 2D-WS₂ присутні смуги E_{2g}¹ та A_{1g} WS₂, що вказує на здатність наночастинок проникати в клітини пухлини та/або накопичуватися на їх поверхні під час інкубації *in vitro*. Показано підвищену люмінесценцію пухлинних клітин, інкубованих з 2D-WS₂ наночастинок у синій спектральній області, що дозволяє використовувати 2D-WS₂ як маркери для візуалізації клітин та клітинних органел.

7. Виявлено, що наночастинки 2D-WS₂ спричиняють незворотні конформаційні переходи білка лізоциму в залежності від концентрації вихідного розчину білка та від pH середовища. При концентрації білка 20 мг/мл і при pH = 2,0 та при концентрації білка 1 мг/мл і pH = 11,5 за даними розкладу на компоненти смуги поглинання Амід I, показано зростання вкладу антипаралельних β-шарів з маркерами на 1624 см⁻¹ та 1680 см⁻¹, що свідчить про утворення аміоїдних фібрилярних структур. Висновки корелюють з даними конфокальної мікроскопії. Наночастинки 2D-WS₂ можуть бути використані для отримання гібридних структур з заданими властивостями в матеріалознавстві, а спектроскопічні нароби – для діагностики хвороб, що корелюють з утворенням амілоїдних фібрил.
8. Показано, що графен можна використовувати як підложку для інфрачервоної спектроскопії з метою підсилення оптичних сигналів. На моделі тиміну визначено спектральні маркери взаємодії тиміну з одностінними вуглецевими нанотрубками, графеном та оксидом графену. Показано, що при взаємодії з нанотрубками фіксуються зсуви основних смуг поглинання в області C₂=O та C₄=O, що свідчить про можливість утворення комплексу тиміну з нанотрубками по типу π-π стекінгу та узгоджується з розрахунковими даними. Максимальний коефіцієнт підсилення порядку 5 раз. У випадку взаємодії тиміну з графеном спостерігається височастотний зсув смуг, коефіцієнт підсилення для яких більше 1,7 рази, зокрема C₂=O, деформаційні коливання C-H та C-N. В інших випадках фіксуємо низькочастотні зсуви порядку 1-5 см⁻¹. Максимальний коефіцієнт підсилення порядку 3,7 рази.
9. Визначено спектральні маркери фосфоліпідів, виділених з чутливих і резистентних штамів пухлинних клітин. Показано, що фосфоліпіди з резистентного штаму при кімнатній температурі утворюють впорядковану гель фазу, що характеризується розщепленням смуг деформаційних коливань СН на 1475, 1465 см⁻¹, та розщепленням смуги C=O на 1738 та 1733 см⁻¹, а також більш височастотним положенням смуги PO₂- на 1228 см⁻¹. Фосфоліпіди з чутливого штаму пухлинних клітин утворюють невпорядковану рідкокристалічну фазу та характеризуються більш низькочастотним положенням смуги PO₂⁻ на 1223 см⁻¹, положенням C=O на 1735 см⁻¹ та відсутністю розщеплення деформаційних коливань СН.
10. Розроблено два протоколи для отримання модельних везикул (ліпосом) різного фосфоліпідного складу з метою дослідження взаємодії з протипухлинними препаратами оксаліплатин та карбоплатин. Було отримано два типи структур - із вбудованим у мембрану лікарським засобом (препарат був доданий у процесі приготування ліпосом) та препаратом, адсорбованим на мембрані (препарат додавали після утворення ліпосом). Визначено набір інфрачервоних спектроскопічних маркерів модельних ліпосом, що включають смуги: валентні коливання CH₂-молекулярних груп в області 2925 см⁻¹, валентні коливання C=O молекулярних груп в області 1735 см⁻¹, а також смугу валентних асиметричних коливань PO₂⁻ молекулярні групи. Було показано, що протипухлинні препарати

взаємодіють з фосфоліпідною мембраною шляхом утворення водневих зв'язків між C=O та N-H групами фосфоліпідів та лікарських засобів, про що свідчать зміни в поглинанні молекулярних груп C=O та PO_2^- фосфоліпідів. Завдяки такій взаємодії упаковка ліпідів стає більш упорядкованою.

11. Вперше визначено набір спектроскопічних маркерів для аналізу вторинної структури колагену у складі тканин Ахіллового сухожилля та у складі тканин твердої мозкової оболонки (ТМО). Показано спектральні відмінності між зрізами тканин новоутвореної ТМО та рубцевої тканини, а також зафіксовано присутність залишків використаних для терапії плівок в зрізах тканин, відібраних через 3 тижні після лікування. Методом конфокальної мікроскопії показано різну морфологію колагенових волокон у зрізах тканин, відібраних через 3 та 6 тижнів після лікування за допомогою біополімерних плівок різного складу, що свідчить про різну тривалість процесу загоєння.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні наукові результати дисертації, опубліковані у фахових виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal & Country Rank:

1. Dovbeshko G., **Repynska O.**, Obraztsova E., Shtogun Y. DNA interaction with single-walled carbon nanotubes: a SEIRA study. *Chemical Physics Letters*. 2003. Vol. 372. P. 432-437. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(03\)00429-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(03)00429-9)
2. Brichka S., Prikhod'ko G., Sementsov Yu., Brichka A., **Paschuk O.**, Dovbeshko G. Synthesis of carbon nanotubes from chlorine-containing precursor and their properties. *Carbon*. 2004. Vol.42. P.2581-2587. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.05.040>
3. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Nazarova A., Sementsov Yu., Obraztsova E. Vibrational Spectra of Carbonaceous Materials: A SEIRA Spectroscopy versus FTIR and Raman, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2005. Vol. 13. P.393-400. <https://doi.org/10.1081/FST-200039387>
4. Dovbeshko G., Fesenko O., **Gnatyuk O.**, Rynder A., Posudievsky O. Enhancement of infrared absorption of biomolecules absorbed on single-wall carbon nanotubes and graphene nanosheets. *J. Nanophoton*. 2012. Vol. 6(1) P. 061711. <http://dx.doi.org/10.1117/1.JNP.6.061711>
5. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Yershov A., Karakhim S., Ilchenko O., Posudievsky O. 2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker and drug delivery system with protection properties. *RSC Advances*. 2018. Vol. 8. P. 30404–30411. <https://doi.org/10.1039/C8RA05085F>
6. Nikolenko A., Strelchuk V., **Gnatyuk O.**, Kraszkiewicz P., Boiko V., Kovalska E., Mista W., Klimkiewicz R., Karbivskii V., Dovbeshko G. In situ Raman study of laser-induced stabilization of reduced nanoceria (CeO_{2-x}) supported on graphene. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2019. Vol. 50(4). P. 490-498. <https://doi.org/10.1002/jrs.5542>
7. Dementjev A., **Gnatiuk O.**, Rutkauskas D., Karpicz R., Tutkus M., Dovbeshko G. Investigation by CARS microscopy of squalene and boron nitride as a precursor material for drug delivery carrier. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*:

- Chemistry*. 2019. Vol. 380 (1). P. 111863.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.111863>
8. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Dementjev A., Rutkauskas D., Kovalska E., Baldycheva A., Ilchenko O., Krasnenkov D., Kaplas T. Coherent anti-stokes Raman scattering spectroscopy (CARS) and imaging of DNA on graphene layers and glass covers. *FlatChem*. 2021. Vol. 27. P. 100243. <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100243>
 9. Kolesnik D., Pyaskovskaya O., **Gnatyuk O.**, Cherepanov V., Karakhim S., Polovii I., Posudievsky O., Konoshchuk N., Strelchuk V., Nikolenko A., Dovbeshko G. Solyanik G. The effect of 2D tungsten disulfide nanoparticles on Lewis lung carcinoma cells in vitro. *RSC Advances*. 2021. Vol. 11. P. 16142 – 16150.
<https://doi.org/10.1039/D1RA01469B>
 10. Polovyi I., **Gnatyuk O.**, Pyrshev K., Hanulia T., Doroshenko T., Karakhim S., Posudievsky O., Kondratyuk A., Koshechko V., Dovbeshko G. Dual effect of 2D WS₂ nanoparticles on the lysozyme conformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2021. Vol. 1869 (1). P. 140556.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140556>
 11. Danilov M., Fomanyuk S., Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Rusetskyi I., Kolbasov G. Graphene Quantum Dots from Partially Unzipped Multi-Walled Carbon Nanotubes: Promising Materials for Oxygen Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* 2021. Vol. 168. P. 044514. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abf4b3>

Розділи в колективних монографіях:

12. Dovbeshko G., Fesenko O., **Gnatyuk O.**, Rynder A., Posudievsky O. Comparative analysis of the IR signal enhancement of biomolecules adsorbed on graphene and graphene oxide nanosheets. In Book: Nanotechnology Imaging techniques Interface studies and Application. Springer. Chap 2 2012. P. 25-34.
13. Довбешко Г., Фесенко Е., **Гнатюк О.** Усиленная поверхностью колебательная спектроскопия. Киев. Наукова думка. 2014., 175 с.

Інші публікації у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України та у наукових періодичних закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus:

14. Dovbeshko G., **Repnytska O.**, Pererva T., Miruta M., Kosenkov D. Conformational Study of Virus Nucleic Acids: A SEIRA and Correlational Analysis Data. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2003. Vol 20(6). P. 851-852.
15. Chekhun V., Tryndiak V., Todor I., Mikhailenko V., Kondrychyn I., Dovbeshko G., **Repnytska O.**, Kulik G. The phospholipids and the cholesterol content of tumor cell plasma membranes with different sensitivity to doxorubicin. *Ukrainian Bio-chemical Journal*. 2003. Vol. 75(4). P. 120 – 125.
16. Заболотний М., Момот А., Довбешко Г., **Гнатюк О.**, Соляник Г., Дмитренко О., Куліш М., Федіна К.. Модифікація структури алкалоїдів препарату Conium фулеренами C60. *УФЖ*. 2012. Т.57(7). С. 739-745.
17. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Karakhim S., Doroshenko T., Romanyuk V. Surface enhanced imaging and IR spectroscopy of the biological cells on the nanostructured

- gold film. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics*. 2017. Vol. 20(2). P.159-167.
18. Boiko V., Romanyuk V., **Gnatyuk O.**, Ilchenko O., Karakhim S., Korovin A., Dovbeshko G. Vibrational spectra of DNA in the confined interglobular volume of photonic crystal. *J Biol Phys*. 2018. Vol. 44. P. 101-116.
 19. Olenchuk M., **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Polovyi I., Karakhim S. Do carbon nanotubes inhibit or promote amyloid fibrils formation? *Biophysical Bulletin*. 2019. Vol.42. P.49-60. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-04>
 20. Panteleichuk, A., Kadzhaya, N., Shmeleva, A., Malysheva, T., **Gnatyuk, O.**, Dovbeshko G. Theoretical substantiation of the efficiency of biopolymers application in experimental TBI (literature review and own results). *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2019. Vol 25(4). P. 64–71. <https://doi.org/10.25305/unj.184031>
 21. Panteleichuk A., Kadzhaya M., Biloschytsky V., Shmeleva A., Petriv T., **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Kozakevych R., Tyortyh V. Composite chitosan/polyethylene oxide film for duraplasty in traumatic brain injury model in rats. *Cell and Organ Transplantology*. 2020. Vol. 8(1). P.20-25. <https://doi.org/10.22494/cot.v8i1.105>

Публікації, що додатково засвідчують апробацію матеріалів дисертації

22. Dovbeshko G., Fesenko O., **Gnatyuk O.** Comparative study of interaction of poly-A, poly (dA-dT) and DNA with single wall carbon nanotubes. *Ukrainian-German symposium on physics and chemistry of nanostructures and on nanobiotechnology: Book of Abstract*, Beregove, The Crimea, Ukraine, 6-10 September, 2010, P. 205.
23. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Fesenko F., Goncharuk O., Pavlovich O., Gorchev V., Karachim S. SEIRA and enhanced imaging of living cells on the gold nanostructured surface. *XX International School-Seminar of Galyna Puchkovska "Spectroscopy of Molecules and Crystals"*, Book of Abstract, Beregove, Crimea, Ukraine, 20-27 September, 2011, P. 196.
24. Dovbeshko G., Fesenko O., **Gnatyuk O.**, Rynder A. Enhancement of IR signals of bioorganic molecules adsorbed at the surface of carbon nanostructures. *XX International School-Seminar of Galyna Puchkovska "Spectroscopy of Molecules and Crystals"*: Book of Abstract, Beregove, Crimea, Ukraine, 20-27 September, 2011, P. 165.
25. Ksenevich V., Shuba M., Paddudskaya A., Kuzhir P., Maksimenko S., Buka P., Veselova T., Dovbeshko G., Fesenko O., **Gnatyuk O.**, Yakovkin K. Electrical conductivity and optical transmittance of single-wall carbon nanotubes films. *Electronic and related properties of organic systems ERPOS-12: Book of Abstract*, Vilnius, Lithuania, 11-13 July, 2011, P. 123.
26. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Fesenko O., KosrtrubA., Blonskyi R., Goncharuk R. Vibrational spectroscopy as a new tool for study of cell therapy efficiency. *International Conference "Physical Research Methods in Medicine"*: Proceedings of the International Conference, Tbilisi, Georgia, 2011, P. 87-91.
27. Rynder A., Dovbeshko G., Fesenko O., **Gnatyuk O.**, Ivanchenko P., Posudievsky O. Enhancement of IR Signals of Biomolecules Absorbed on the Single Wall Carbon

- Nanotubes and Graphene Nanoparticles. *NANOTECHNOLOGY: from fundamental research to innovations*: Book of Abstract, Bukovel, Ukraine, 26 August – 2 September, 2012, P. 45.
28. Rynder A., Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Fesenko O., Fedorov V., Grayfer E. Enhancement of infrared signal of biomolecules adsorbed on graphene nanosheets. *13-th International Young Sciences Conference Optics and High Technology Material Science SPO 2012*: Book of Abstract, Kyiv, Ukraine, 25-28 October, 2012, P.48.
 29. Dovbeshko G., Fesenko O., **Gnatyuk O.**, Posudievsky O., Ivanchenko P., Rynder A. Comparative analysis of the effect of enhancement of IR signals of biomolecules absorbed on single wall carbon nanotubes and graphene nano plates. *Fundamental and Applied NanoElectroMagnetics FANEM-12*: Book of Abstract, Minsk, Belarus, May 22-25, 2012. P. 34.
 30. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Fesenko O. SEIRA and SERS spectroscopy: advantages and disadvantages. *XXI International School-Seminar of Galyna Puchkovska "Spectroscopy of Molecules and Crystals"*: Book of Abstract, Beregove, Crimea, Ukraine, 22-29 September 2013, P. 19.
 31. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Posudievsky O., Yershov A. FTIR spectroscopy study of BN nanoparticles interaction with cancer cells. *IV International Conference NANOBIOPHYSICS 2015: Fundamental and Applied Aspects*: Book of Abstract, Kyiv, Ukraine, 1-4 October, 2015, p.86.
 32. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.** Surface enhanced spectroscopy for application in nanotechnology. *XV international conference Physics and technology of thin films and nanosystems*; Book of Abstract, Ivano-Frankivsk, Ukraine, 11-16 May, 2015, P. 1219.
 33. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Posudievsky O., Ershov A. Interaction of BN and graphene nanoparticles with biological molecules and cells. *The Jubilee 10-th International Conference «Electronic processes in organic and inorganic materials»*: Book of Abstract, Ternopil, Ukraine, 23–27 May, 2016, P.50.
 34. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Neimash V., Posudievsky O., Pavlyshyn V., Kuziura O. BN nanoparticles interaction with DNA molecules during ionizing radiation. *5th International Conference NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects*: Book of Abstract, Kharkiv, Ukraine, 2-5 October, 2017, P-37, p.116.
 35. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Boiko V., Ivanchenko P., Martra G., Foley S., Bogdanov M. Vibrational "Signatures" of lipid cellular membrane mimetics. *5th International Conference NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects*: Book of Abstract, Kharkiv, Ukraine, 2-5 October. 2017. O-24, p.62.
 36. Cherpak O., **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Meyer S., Bogdanov M. The interaction of cell components with cisplatin derivatives. *International Young Scientists Conference Optics and High Technology Material Science - SPO 2017*: Book of Abstract, Kyiv, Ukraine, October 26-29, 2017, P. 229.
 37. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Tymchyshyn O., Nikolenko A., Cherpak O., Bogdanov M. The interaction of cell membrane with oxaliplatin. *Ukrainian-Polish Scientific Conference «Membrane and sorption processes and technologies»*: Book of Abstract, Kyiv, Ukraine, December 12-14, 2017.

38. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Nischuk A., Bogdanov M. FTIR spectroscopy study of closely modeled bacterial cell membranes with different phospholipid composition. *Ukrainian-Polish Scientific Conference «Membrane and sorption processes and technologies»*: Book of Abstract, Kyiv, Ukraine, December 12-14, 2017.
39. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Posidievsky O., Karpicz R., Dementjev A. 2D-BN nanoparticles as spectroscopic markers and drug delivery system for living cells: Raman, CARS, FTIR and luminescence signature. *The 19th International Young Scientists Conference Optics and High Technology Material Science SPO 2018*: Book of Abstract, Kyiv, Ukraine, October 25-28, 2018, P. 22-23.
40. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Posidievsky O., Kupchak I., Karpicz R., Dementjev A.. BN nanoparticles as spectroscopic marker and drug delivery system. *Advanced properties and Processes in optoelectronic materials and systems – apropos 16*: Book of Abstract, Vilnius, Lithuania. October 10-12, 2018, P. 34.
41. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Polovyi I., Ivanchenko P., Bogdanov M., Posudievsky O. WS₂ nanoparticles inhibit the formation of β -sheet amyloid fibrils. *Nanomaterials: Application & Properties*: Book of Abstract, Zatoka, Odesa region, Ukraine, 9-14 September, 2018, P. 04NNLS35-1.
42. Olenchuk M., **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Polovyi I., Karakhim S. Carbone nanotubes cause amyloid fibrils formation. *Nanomaterials: Application & Properties*: Book of Abstract, Zatoka, Odesa region, Ukraine, 9-14 September, 2018, P. 04NNLS34-1.
43. **Gnatyuk O.**, Dovbeshko G., Polovyi I., Kolesnik D., Pyaskovskaya O., Solyanik G., Dementjev A., Karpicz R., Posudievsky O. 2D-Boron Nitride Nanoparticles and Doxorubicin Interaction with Cancer Cells: CARS Imaging and FTIR Spectroscopy. *XXIV Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of molecules and crystals"*: Book of Abstract, Odesa, Ukraine, August 25-30, 2019, P.108.
44. Polovyi I., Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Hanulia T. The Effect of 2D WS₂ Nanoparticles on Protein Secondary Structure and Amyloid Formation. *XXIV Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of molecules and crystals"*: Book of Abstract, Odesa, Ukraine, August 25-30, 2019, P. 119.
45. Dovbeshko G., Polovyi I., **Gnatyuk O.** Do the 2D Graphene Type Nanoparticles Destroy Amyloid Fibrils Formation in Living Systems? *XXIV Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of molecules and crystals"*: Book of Abstract, Odesa, Ukraine, August 25-30, 2019. P. 14.
46. Nikolenko A., Strelchuk V., **Gnatyuk O.**, Kraszkiewicz P., Kovalska E., Mista W., Dovbeshko G. Mikro-Raman Spectroscopy of Laser-assisted Transformation of Cerium Oxide Nanoparticles on Graphene and Carbon Nanotubes Supports. *1st International Conference on Innovative materials and nanoengineering (IMNE-2019)*: Book of Abstract, Brenna, Poland. 27-29 August, 2019. P.2-10.
47. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Polovyi I., Dementjev A., Kupchak I., Posudievsky O. Optical Signal Enhancement of Biological Molecules with 2D Graphene-like Nanoparticles: Is it Possible., *XVth International Conference on Molecular*

- Spectroscopy: Book of Abstract*, Wojanow, Wroclaw, Poland, September 15-19, 2019. P.24.
48. Polovyi I., Pyrshev I., Cèpla V., Eimont R., Valiokas R., Dementjev A., **Hnatiuk O.**, Dovbeshko G. Spectroscopic markers for resolving collagen hydrogel structures. *International conference Nanobiophysics: fundamental and applied aspects: Book of Abstract*, Kyiv, Ukraine, October 1-4, 2019, P.73.
 49. **Hnatiuk O.**, Panteleichuk A., Shmeleva A., Kadzhaya M., Kozakevych R., Dovbeshko G. Chitosan and collagen as scaffold matrix for dura mater healing studied by vibrational spectroscopy. *International conference Nanobiophysics: fundamental and applied aspects: Book of Abstract*, Kyiv, Ukraine, October 1-4, 2019, P.47.
 50. Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Dementjev A. Coherent anti-stokes raman scattering spectroscopy and imaging of DNA on graphene layers *XII International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" (ICEPOM-12): Book of Abstract*, Kamianets-Podilskyi, Ukraine, June 1-5, 2020, p. 13.
 51. Danilov M., Fomanyuk S., Dovbeshko G., **Gnatyuk O.**, Rusetskii I., Kolbasov G., Yaremchuk G. Simple Method of Graphene Quantum Dots Preparation from Partially Unzipped Multi-Walled Carbon Nanotubes. *ECS Trans.* 2020. Vol.99. P.275. <https://doi.org/10.1149/09901.0275ecst>
 52. Пантелейчук А., Каджая М., Шмельова А., Васлович В., **Гнатюк О.**, Карахім С., Довбешко Г. Можливості конфокальної мікроскопії для оцінки ефективності пластики твердої мозкової оболонки біополімерами в експерименті. *VII З'їзд нейрохірургів України з міжнародною участю: Збірник тез*, Сіде, Туреччина, 11 - 18 травня, 2021, С. 091.

АНОТАЦІЯ

Гнатюк О.П. «Спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами» – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико – математичні науки), Інститут фізики Національної академії наук України; Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України. – Харків, 2021.

В дисертаційній роботі зібрано унікальну спектроскопічну базу даних для аналізу конформаційного стану біомакромолекул як окремих сполук, так і у складі тканин та клітин. Досліджено вплив 2D матеріалів 2D-BN та 2D-WS₂ на культури клітин. Через низьку цитотоксичність, 2D наночастинки розглядають як перспективні для створення систем доставки ліків та, з огляду на їх люмінесцентні властивості, як нетоксичні маркери для візуалізації біологічних об'єктів та підсилення оптичних сигналів в спектроскопії. В дисертаційній роботі досліджено спектральні маркери фосфоліпідів з чутливих і резистентних пухлинних тканин, а також модельні системи різного фосфоліпідного складу при їх взаємодії з

протипухлинними препаратами. Визначено CARS маркери ДНК на графеновій підложці та проведено їх порівняльний аналіз з даними Раман спектроскопії. Показано можливості CARS мікроскопії для аналізу культур клітин. Визначено спектральні маркери взаємодії біомолекул з одностінними вуглецевими нанотрубками, графеном та оксидом графену. Проведено оцінку конформаційного стану колагену в складі тканини Ахіллового сухожилля при його дегенеративному ушкодженні та після застосованої клітинної терапії. Досліджено конформаційний стан колагену в складі тканини твердої мозкової оболонки після проведеної терапії черепно-мозкової травми з застосуванням різних полімерних плівок.

Ключові слова: спектральні маркери, ІЧ спектроскопія, Раман спектроскопія, CARS спектроскопія, конфокальна мікроскопія, культури клітин, ліпідні везикули, зрізи тканин, 2D-WS₂ наночастинки, 2D-BN наночастинки.

ABSTRACT

O.P. Gnatyuk. «**Spectroscopic markers of biological macromolecules, cells and tissues interactions with antitumor drugs and nanostructures**» – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of doctor of science in physics and mathematics, specialty 03.00.02 – Biophysics. – Institute of physics of National Academy of Sciences of Ukraine; V. N. Karazin Kharkiv National University of Ministry of Education and Science of Ukraine. – Kharkiv, 2021.

Spectroscopic markers of the interaction of various biological macromolecules, such as proteins (lysozyme, collagen), phospholipids, nucleic acids, as well as cell cultures and tissue with antitumor drugs (doxorubicin, cisplatin derivatives) and different types of nanostructures (as 2D-BN and 2D-WS₂ nanoparticles, carbon nanotubes and graphene nanoparticles), were studied in this paper. The conformational state of biomacromolecules as single compounds, as well as in tissues and cells, is studied and summarized using a unique experimental spectroscopic data set. These findings will serve as the foundation for future infrared spectroscopy applications in biology, biochemistry, and diagnostic medicine.

The study of the interactions of 2D graphene-like materials (2D-BN and 2D-WS₂) with cell cultures is one of the key focuses of this research. 2D nanomaterials are nanoparticles made from layered crystalline formations that have distinctive properties due to the transition from a macroscopic to a nanostructured state. This type of nanoparticle is regarded promising for the development of drug delivery systems that could increase the effectiveness and specificity of therapies for important diseases due to their low cytotoxicity when compared to carbon, metal, oxide, and other nanoparticles. Some 2D materials due to the luminescent properties can also be employed as non-toxic markers for the imaging of biological items and for enhancing optical processes in spectroscopy.

Boron nitride is isoelectronic to carbon and can take on a variety of allotropic modifications based on two types of hybridization: sp², which corresponds to hexagonal and rhombohedral forms, and sp³, which corresponds to cubic and wurtzite forms. The

hexagonal and cubic kinds of BN are graphite and diamond analogues, respectively. The boron nitride layer can have a crystalline structure comparable to that of graphene, with the exception of the bandgap, which is 5 eV in boron nitride. At the same time, its physical properties have similar characteristics to diamond nanoparticles. Tungsten disulfide WS_2 is an indirect bandgap semiconductor with a bandgap of 1.4 eV in bulk, and a direct bandgap semiconductor with a bandgap of 2 eV in 2D nanostructures.

The widespread use of artificially created nanostructures requires a thorough study of all elements of their impact on living and inanimate nature, particularly biological molecules that enable the cell's regular functioning. This research focuses on the effect of 2D nanomaterials on protein conformational changes, which can be irreversible and lead to the development of amyloid fibrils under particular conditions (pH, initial protein solution concentration, incubation temperature). Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type II diabetes, cancer, amyloidosis, and other disorders are linked to abnormalities in the production of the protein's second structure, which leads to the formation of amyloids. The study of amyloid aggregations will help to understand the mechanism of amyloid fibrillogenesis and may also add to our understanding of the fundamental link between a protein's amino acid sequence and its structure.

Even though the cell nucleus and nucleic acids are the primary targets for many medications and nanoparticles, pharmaceuticals must pass (or not pass) through the cell membrane, which is a multi-component structure. According to current knowledge, the cell membrane is a completely dynamic, living system with lipid microdomains from cholesterol and sphingolipids microdomains on its surface, rather than a phospholipid matrix with membrane proteins spread randomly (lipid rafts). Rafts have a higher density and orderliness of structure than other structures (quasi-crystalline formations). According to this hypothesis, a completely new mechanism known as "lipid clustering" reduces resistance to antibiotics and medicines, when polycationic antibiotics are clustered with anionic lipids and separate anionic phospholipids (phosphatidylglycerol (PG) and cardiolipin (CL)) from zwitterionic phosphatidylethanolamine (PE). This lateral phase separation threatens the penetration of drugs into the cell. This reveals a new perspective on the process of acquiring resistance by tumour cells. The dissertation delves into the spectral markers of phospholipids from sensitive and resistant tumor tissues, as well as model systems with various phospholipid combinations and their interactions with anticancer medicines.

The studies that have direct application in medicine to determine the effectiveness of treatment at the molecular level are an essential aspect of this effort. The ability of infrared spectroscopy to detect the structural state of collagen in the Achilles tendon tissue during degenerative deterioration and after cell therapy was demonstrated in particular. Different methods of cell therapy are investigated, and the efficiency of treatment is assessed based on the secondary structure of collagen. The conformational state of collagen in the dura mater tissue (TMO) after traumatic brain injury therapy was also investigated utilizing various polymer films. The process of biodegradation of implanted films was tracked and the structure of collagen in the composition of reduced TMO was analyzed using the matching spectral markers.

Keywords: spectral markers, FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy, CARS spectroscopy, confocal microscopy, cell cultures, lipids vesicles, tissue sections, 2D-WS₂ nanoparticles, 2D-BN nanoparticles.

Список цитованої літератури:

- C1. McMurray C. Spectral Phenotyping. *J Biomol Tech.* 2019. Vol. 30(Suppl), S62.
- C2. Lovergne L., Ghosh D., Chuck R. et al. An infrared spectral biomarker accurately predicts neurodegenerative disease class in the absence of overt symptoms. *Sci Rep.* 2021. Vol.11. P. 15598. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93686-8>
- C3. Zelig U., Barlev E., Bar O. et al. Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study. *BMC Cancer.* 2015. Vol. 15. P.408. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1414-7>
- C4. Li L, Wu J, Yang L, Wang H, Xu Y, Shen K. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: An Innovative Method for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Cancer Manag Res.* 2021. Vol. 13. P. 2389-2399. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S291906>
- C5. Zelig U, Kapelushnik J, Moreh R, Mordechai S, Nathan I. Diagnosis of cell death by means of infrared spectroscopy. *Biophys J.* 2009. Vol.97 (7). P.2107–2114.
- C6. Zhou J, Wang Z, Sun S, Liu M, Zhang H. A rapid method for detecting conformational changes during differentiation and apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biotechnol Appl Biochem.* 2001. Vol 33(2). P.127–132.
- C7. Sule-Suso J., Forsyth N.R., Untereiner V., Sockalingum G.D. Vibrational spectroscopy in stem cell characterisation: is there a niche? *Trends Biotechnol.* 2014. Vol. 32(5). P.254–262.
- C8. Clede S, Policar C, Sandt C. Fourier transform infrared (FT-IR) spectromicroscopy to identify cell organelles: correlation with fluor-escence staining in MCF-7 breast cancer cells. *Appl Spectrosc.* 2014. Vol. 68(1). P.113–117.
- C10. Finlayson D., Rinaldi C., Baker M.J. Is Infrared Spectroscopy Ready for the Clinic? *Anal. Chem.* 2019, Vol 91, P. 12117. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02280>
- C11. Trevisan J., Park J., Angelov P.P., Ahmadzai A.A., Gajjar K., Scott A.D., Carmichael P.L., Martin F.L. Measuring similarity and improving stability in biomarker identification methods applied to Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. *J Biophotonics.* 2014. Vol. 7(3-4). P.254-65. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300190>
- C12. Smith R., Wright K.L., Ashton L. Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies. *Analyst.* 2016. Vol. 141. P. 3590-3600. <https://doi.org/10.1039/C6AN00152A>
- C13. Dementjev A., Mordas G., Ulevičius V., Gulbinas V. Investigation of microstructured chitosans by coherent anti-Stokes Raman microscopy. *Journal of Microscopy.* 2015. Vol. 257. P. 217-225. <https://doi.org/10.1111/jmi.12204>
- C14. Legesse F.B., Medyukhina A., Heuke S., Popp J. Texture analysis and classification in coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy images for automated detection of skin cancer. *Comput Med Imaging Graph.* 2015. Vol. 43. P.36-43. <https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2015.02.010>
- C15. Evans C.L., Xie X.S. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Annual review of analytical chemistry.* 2008. Vol.1. P. 883-909. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112754>
- C16. Alexis F., Pridgen E.M., Langer R., Farokhzad O.C. Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. *Drug Delivery. Handbook of Experimental Pharmacology.* 2010. Vol 197. P. 55-86. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_2
- C17. Weng Q., Wang B., Wang X., Hanagata N., Li X., Liu D., Wang X., Jiang X., Bando Y, Golberg D. Highly Water-Soluble, Porous, and Biocompatible Boron Nitrides for Anticancer Drug Delivery. *ACS Nano.* 2014. Vol 8(6). P.6123–6130. <https://doi.org/10.1021/nn5014808>

Підписано до друку 17.08.2021 р. Формат паперу 60х84/16
Папір офсетний 80 гр/м². Офсетний друк. Ум. –др. аркушів 2,09
Обл.-вид. аркушів 2,3. Тираж 100 примірників. Замовлення №17

03028, Інститут фізики НАН України,
Київ, Проспект Науки, 46