

ІНСТИТУТ ФІЗИКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені В.Н. КАРАЗІНА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

ГНАТЮК ОЛЕНА ПЕТРІВНА

УДК 577.32

ДИСЕРТАЦІЯ

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

Спеціальність 03.00.02 – «Біофізика»

(фізико – математичні науки)

подається на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук

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

_____ О.П. Гнатюк

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Гнатюк Олена Петрівна «Спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами» - кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

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.

Дисертацією є сукупність наукових статей за науковою тематикою із детальним аналізом сучасного стану наукової проблеми та запропонованих рішень щодо їх вирішення сукупністю експериментальних та розрахункових методик, в тому числі на спеціально розробленому обладнанні, що детально представлено в опублікованих працях.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню спектроскопічних маркерів взаємодії біологічних макромолекул, таких як білки (лізоцим, колаген), фосфоліпіди, нуклеїнові кислоти, а також культур клітин та тканин з протипухлинними препаратами (доксорубіцин, похідні цисплатину) та наноструктурами різної природи (2D наночастинками BN та WS_2 , вуглецевими нанотрубками та графеновими наночастинками). В роботі зібрано і узагальнено унікальну експериментальну спектроскопічну базу даних, що дозволяє проводити аналіз конформаційного стану біомакромолекул як окремих сполук, так і у складі тканин та клітин, та є основою для подальшого застосування методу інфрачервоної спектроскопії для прикладних задач біології, біохімії, діагностичних задач медицини.

Одним з основних напрямків в дисертаційній роботі є дослідження впливу 2D матеріалів з графеноподібною структурою (2D BN та 2D WS_2) на культури клітин. 2D-наноматеріали – це наночастинки, утворені з шаруватих

кристалічних структур, унікальні властивості яких зумовлені переходим від макроскопічного стану до наноструктурованого. Саме такого типу наночастинки через їх низьку цитотоксичність, порівняно з вуглецевими, металевими, оксидними та ін., розглядають як перспективні для створення систем доставки ліків, які могли би підвищити ефективність та специфічність терапевтичних методів лікування важких захворювань. Також, з огляду на люмінесцентні властивості деяких 2D матеріалів, вони можуть розглядатись як нетоксичні маркери для візуалізації біологічних об'єктів та для підсилення оптичних процесів в спектроскопії.

Так, нітрид бору є ізоелектронним до вуглецю і може утворювати ряд алотропних модифікацій відповідно до двох типів гібридизації – sp^2 , що відповідає гексагональній і ромбоєдричній ґратці, та sp^3 – що відповідає кубічній та ґратці в'юрцитового типу. Гексагональній і кубічній тип ґратки BN є аналогами графіту і алмазу відповідно. Унікальність шару нітриду бору полягає в тому, що він може мати кристалічну структуру, аналогічну шару графену, а також подібні фізичні властивості, за виключенням ширини забороненої зони – нітрид бору є типовим діелектриком із шириною забороненої зони 5 еВ. В той же час його фізичні властивості мають подібні характеристики до наночастинок алмазу. Дисульфід вольфраму WS_2 як об'ємний матеріал є непрямозонним напівпровідником з шириною забороненої зони 1,4 еВ, а при переході до 2D наноструктур він стає прямозонним з шириною забороненої зони 2 еВ.

Широке впровадження штучно отриманих наноструктур різного роду вимагає глибокого розуміння всіх аспектів їх впливу на живу і неживу природу, і зокрема на біологічні молекули, що забезпечують нормальне функціонування клітини. В дисертаційній роботі приділено увагу дослідженню впливу 2D-наноматеріалів на конформаційні переходи в білках, що за певних умов (рН середовища, концентрація вихідного розчину білка, температура інкубації) можуть мати незворотній характер та призводити до утворення амілоїдних фібрил. Більше як 20 хвороб людини пов'язані з аномаліями в формуванні

просторової структури білків, що призводить до утворення амілоїдів – це хвороба Альцгеймера, Паркінсона, цукровий діабет II типу, онкологія, амілоїдоз, та ін. Вивчення амілоїдних агрегацій не тільки допоможе зрозуміти механізм амілоїдного фібрилогенезу, але також розширити знання про базове співвідношення між послідовністю амінокислот білка та його структурою.

Не зважаючи на те, що основною мішенню для дії багатьох лікарських засобів та наночастинок вважають нуклеїнові кислоти, а отже клітинне ядро, на шляху до нього препарати повинні пройти (чи не пройти) через клітинну мембрану, що являє собою багатокомпонентну структуру. Згідно з сучасними уявленнями, клітинна мембрана, це не фосфоліпідний матрикс та мембранні білки, що розподілені випадковим чином, а це повністю динамічна, жива система, на поверхні якої утворюються збагачені холестеролом і сфінголіпідами ліпідні мікродомени (lipid rafts). Такі утворення характеризуються більш високою густиною та впорядкованістю структури (квазі- кристалічні утворення). Відповідно до цієї теорії, існує зовсім інший механізм зниження сприйнятливості до антибіотиків та препаратів, відомих як «ліпідна кластаризація» (а lipid clustering), коли полікатіонні антибіотики будуть кластеризуватися разом з аніонними ліпідами та відокремлювати аніонні фосфоліпіди (фосфатидилгліцерол (PG) та кардіоліпін (CL)) від цвіттерионного фосфатидилетаноламіну (PE). Такий латеральний поділ фази ставить під загрозу проникнення препаратів в клітину. Це розкриває новий погляд і на процес набування резистентності пухлинними клітинами. В дисертаційній роботі детально досліджено спектральні маркери фосфоліпідів з чутливих і резистентних пухлинних тканин, а також досліджені модельні системи різного фосфоліпідного складу при їх взаємодії з протипухлинними препаратами.

Важливою частиною дисертаційної роботи є результати, що мають пряме практичне застосування в медицині для оцінки ефективності лікування на молекулярному рівні. Зокрема було показано можливості інфрачервоної спектроскопії для оцінки конформаційного стану колагену в складі тканини Ахіллового сухожилля при його дегенеративному ушкодженні та після

застосованої клітинної терапії. Розглянуто різні типи клітинної терапії та відповідно до просторової структури колагену проведено оцінку ефективності лікування. Досліджено також конформаційний стан колагену в складі тканини твердої мозкової оболонки (ТМО) після проведеної терапії черепно-мозкової травми з застосуванням різних полімерних плівок. За відповідними спектральними маркерами, було відслідковано процес біодеградації імплантованих плівок та проведено оцінку структури колагену в складі відновленої ТМО.

Метою Метою роботи було визначення спектроскопічних маркерів та молекулярних механізмів впливу вуглецевих 1D наноструктур (одностінні та багатостінні вуглецеві нанотрубки), вуглецевих 2D наноструктур (графен, графенові наночастинки), молекули фулерену, 2D напівпровідникових (дисульфід вольфраму) та діелектричних (нітрид бору) 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 розв'язання поставлених задач у роботі використано низку експериментальних та розрахункових *методик*, а саме: Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є в геометрії на пропускання (FTIR) та відбивання (FTIR-ATR), спектроскопія комбінаційного розсіяння (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, білків та для розрахунку концентрацій розчинів біологічних молекул, аналіз спектрів за допомогою розкладу контуру на компоненти за алгоритмом Левенберга-Марквардта.

В дисертації були вперше сформульована і вирішена низка оригінальних наукових проблем, описаних нижче.

- Вперше показана можливість використання CARS спектроскопії для візуалізації біомолекул та вуглецевих наноструктур. Визначено CARS спектральні маркери 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 ДНК на частотах валентних СН коливань $2760, 2900 \text{ см}^{-1}$, а у випадку використання скляної підложки – на частотах ОН валентних коливань 3400 см^{-1} та $\text{C}=\text{O} 1625 \text{ см}^{-1}$
- Показано, що багат шаровий графен можна використовувати як підложку для інфрачервоної спектроскопії з метою підсилення оптичних сигналів від біомолекул та клітин. За допомогою графенової підложки вдалося зафіксувати присутність наночастинок WS₂ в культурі клітин, а також на моделі тиміну визначити спектральні маркери взаємодії тиміну з одностінними вуглецевими нанотрубками, графеном та оксидом графену.
- Вперше показана можливість використання 2D наночастинок нітриду бору для підсилення оптичних сигналів в Раман спектрах. Місця локалізації наночастинок в клітині можуть слугувати підсилюючими поверхнями для незначного (3-5 разів) підсилення оптичних сигналів та дозволяють зареєструвати Раман спектри різних компонент клітин (мембрани, цитоплазми, ядра). Ці дані в подальшому можуть бути використані для цитологічного аналізу клітини.
- 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 гелі-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 визначено невпорядковану рідкокристалічну фазу з відповідними 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 адсорбованим на мембрані 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.

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.

The dissertation is a set of scientific articles on scientific topics with a detailed analysis of the current state of the scientific problems and proposed solutions for their solving by a set of experimental and calculation methods, including specially designed equipment, which is presented in detail in published works.

In this paper the study of spectroscopic markers of the interaction of different 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) A unique experimental spectroscopic data that allows us to analyse the conformational state of biomacromolecules as single compounds, as well as in tissues and cells are collected and summarized. This data are the bases for the future infrared spectroscopy applications for different tasks of biology, biochemistry, and diagnostic medicine.

One of the main goals in in this work is the study of the interactions 2D graphene-like materials (2D BN and 2D WS₂) with cell cultures. 2D nanomaterials are nanoparticles that are taken from layered crystalline structures, the unique properties of which are due to the transition from the macroscopic state to the nanostructured. This type of nanoparticles due to their low cytotoxicity in contrast on carbon, metal, oxide, etc., is considered promising for the creation of drug delivery systems that could increase the effectiveness and specificity of treatments for serious diseases. Also, due to the luminescent properties of some 2D materials, they can be used as non-toxic

markers for the visualization of biological objects and for enhancing optical processes in spectroscopy.

Thus, boron nitride is isoelectronic to carbon and can form a number of allotropic modifications according to two types of hybridization - sp^2 , which corresponds to the hexagonal and rhombohedral form, and sp^3 - which corresponds to the cubic and wurtzite form. Hexagonal and cubic types form of BN are analogue of graphite and diamond, respectively. The boron nitride layer can have a crystalline structure similar to the graphene layer, except for the bandgap - boron nitride is a typical dielectric with a bandgap of 5 eV. At the same time, its physical properties have similar characteristics to diamond nanoparticles. Tungsten disulfide WS_2 as a bulk material is a indirect band gap semiconductor with a bandgap of 1.4 eV, and in 2D nanostructures it becomes a direct band gap semiconductor with a bandgap of 2 eV.

The extensive implementation of artificially obtained different types of nanostructures requires a deep understanding of all aspects of their impact on animate and inanimate nature, and in particular on biological molecules that ensure the normal functioning of the cell. This work is focused on the study of the 2D nanomaterials effect on conformational transitions in proteins, which under certain conditions (pH, concentration of the initial protein solution, incubation temperature) can be irreversible and lead to the formation of amyloid fibrils. More than 20 human diseases are associated with abnormalities in the formation of the proteins second structure, which leads to the formation of amyloids - Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type II diabetes, oncology, amyloidosis, and others. The study of amyloid aggregations will help us to understand the mechanism of amyloid fibrillogenesis and also could expand knowledge about the basic relationship between the amino acid sequence of a protein and its structure.

Despite the fact that the main target for the action of many drugs and nanoparticles is the cell nucleus and nucleic acids, on the way to it drugs must pass (or not pass) through the cell membrane, which is a multi-component structure. According to current understanding, the cell membrane is not just a phospholipid matrix with membrane proteins dispersed randomly, but a completely dynamic, living system with lipid

microdomains from cholesterol and sphingolipids microdomains on its surface (lipid rafts). Rafts are characterized by a higher density and orderliness of the structure (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. In the dissertation, spectral markers of phospholipids from sensitive and resistant tumour tissues are investigated in detail, and also model systems with different phospholipid combinations and their interaction with antitumor drugs are investigated.

An important part of this work is the results that have direct application in medicine to assess the effectiveness of treatment at the molecular level. In particular, the possibilities of infrared spectroscopy for assessing the conformational state of collagen in the Achilles tendon tissue during its degenerative damage and after applied cell therapy were shown. Different methods of cell therapy are investigated, and the efficiency of treatment is assessed based on the second structure of collagen. The conformational state of collagen in the dura mater tissue (TMO) after the therapy of traumatic brain injury by using of various polymer films was also studied. According to the corresponding spectral markers, the process of biodegradation of implanted films was monitored and the structure of collagen in the composition of reduced TMO was evaluated.

The goal of the dissertation is to determine spectroscopic markers and molecular mechanisms of influence of carbon 1D nanostructures (single-walled and multiwalled carbon nanotubes), carbon 2D nanostructures (graphene, graphene nanoparticles), fullerene, 2D semiconductor (tungsten disulfide) and dielectric (boron nitride) nanoparticles to the conformational states biological molecules (DNA, thymine, proteins, lipids), as well as on the morphological and functional properties of cell cultures (fibroblasts, tumor cells human prostate adenocarcinoma LNCaP, Lewis lung carcinoma LLC/R9).

Evaluation of the effectiveness of the therapy of damaged tissues of the Achilles tendon and dura mater after traumatic brain injury and determination of spectroscopic markers of the secondary structure of collagen at different stages of tissue regeneration.

To solve the tasks, a number of experimental and calculations *methods were used*, namely: Fourier Transform Infrared Spectroscopy in transmittance geometry (FTIR) and reflectance geometry (FTIR-ATR), Raman spectroscopy, Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy, confocal microscopy for visualization of the investigated samples of cell cultures and tissue, MTT - colorimetric test to assess the metabolic activity of cells and to determine the cytotoxicity/cytostaticity of the studied drugs, nanoparticles and nanoparticles complexes of doxorubicin with boron nitride, ultraviolet (UV) spectroscopy to verify the purity of nucleic acid preparations, proteins and to calculate the concentrations of solutions of biological molecules, spectrum analysis by deconvolutions of the spectral bands according to the Levenberg-Marquardt algorithm.

In the dissertation, several original scientific problems described below were formulated and solved for the first time.

– For the first time, the possibility of using CARS spectroscopy to visualize biomolecules and carbon nanostructures was shown. CARS spectral markers of DNA and their overtones in the region of stretching CH vibrations, which are a characteristic of CARS spectra, were determined. It is shown that the method of applying DNA to the single-layer graphene substrate allows to obtain a contrasting CARS image of DNA at the frequencies of stretching CH vibrations 2760 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} and in the case of using a glass substrate - at the frequencies of stretching vibrations OH 3400 cm^{-1} and C = O 1625 cm^{-1} .

– It is shown that multilayer graphene can be used as a substrate for infrared spectroscopy in order to slightly enhancement of optical signals from biomolecules and cells. It was feasible to determine spectrum markers of thymine interaction with single-walled carbon nanotubes, graphene, and graphene oxide in a thymine model using such a substrate.

– The ability to 2D boron nitride nanoparticles to enhance optical signals in Raman spectra was shown for the first time. The places of localizations of nanoparticles in the cell can serve as enhancing surfaces for a small (3-5 times) enhancement of optical signals and allow to register Raman spectra of different components of cells (membranes, cytoplasm, nucleus). These data can then be used for cytological analysis of the cell.

– It was determined for the first time the spectral markers of the complexes of the 2D-BN nanoparticles obtained by a modified mechanochemical method with doxorubicin. The protective effect of 2D-BN nanoparticles in such complexes was established, namely a 10% reduction in the cytotoxic effect of the complex on normal cells compared to pure doxorubicin, with constant efficacy of doxorubicin in combination with boron nitride on tumor cells.

– The presence of an ordered gel phase in the total fraction of phospholipids from a resistant strain of tumor cells was recorded for the first time at room temperature, and spectroscopic markers of this phase were determined. A disordered liquid crystal phase with relevant spectroscopic indicators was discovered for phospholipids from a sensitive strain of tumor cells.

– Two adapted protocols for obtaining model vesicles (liposomes) with different phospholipid composition have been proposed in order to study the interaction of the cell membrane with drugs. As a result, two types of structures were obtained - with a drug embedded in the membrane (the drug was added during the preparation of liposomes) and adsorbed on the membrane (the drug was added after the formation of liposomes). A set of infrared spectroscopic markers of model liposomes with oxaliplatin and carboplatin embedded in the membrane and adsorbed on the membrane was determined, and the secondary structure of the obtained systems was determined.

– For the first time, spectral differences between newly formed TMO tissues and scar tissue were shown, as well as differences in the structure of collagen fibers of regenerated TMO tissues after traumatic brain injury with biopolymer films based on chitosan and collagen. Three and six weeks after treatment, spectral markers of

utilized film fragments in tissue slices were recorded. It was first shown that the use of gelatin film in parallel with collagen promotes complete recovery of TMO without signs of scarring, as well as accelerates the degradation of chitosan film and promotes the normal healing of an injury.

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

1. Dovbeshko G., **Repnytska 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)

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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>

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів зразків досліджуваних вуглецевих матеріалів, визначення спектральних маркерів для аналізу зразків, підготовка матеріалів для друку)

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>

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів зразків досліджуваних вуглецевих матеріалів, визначення спектральних маркерів для аналізу зразків, підготовка матеріалів для друку)

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>

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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>

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних культур клітин до та після обробки наночастинками, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення отриманих результатів та підготовка матеріалів до публікації).

6. Nikolenko A., Strelchuk V., **Gnatyuk O.**, Kraszkievicz 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>

(Дисертант приймав участь в аналіз, обробці та представленні експериментальних даних, підготовці матеріалів до публікації)

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>

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

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>

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

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>

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних культур клітин до та після обробки наночастинками, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення отриманих результатів та підготовка матеріалів до публікації)

10. Polovyi I., **Gnatyuk O.**, Pyshev 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>

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації)

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>

(Дисертант приймав участь в аналіз, обробці та представленні експериментальних даних, підготовці матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

13. Довбешко Г., Фесенко Е., **Гнатюк О.** Усиленная поверхностью колебательная спектроскопия. Киев. Наукова думка. 2014., 175 с.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, визначено спектральні маркери ліпідів з чутливих і резистентних штабів пухлинних тканин, вірусів, штучних мембран, проведено огляд літератури за темою роботи, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом 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, підготовка матеріалів до публікації)

16. Заболотний М., Момот А., Довбешко Г., **Гнатюк О.**, Соляник Г., Дмитренко О., Куліш М., Федіна К.. Модифікація структури алкалоїдів препарату Copium фулеренами C60. *УФЖ*. 2012. Т.57(7). С. 739-745.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації)

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>

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації)

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>

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зрізів тканин, визначено спектральні маркери колагену регенеруючих тканин, проведено аналіз даних конфокальної мікроскопії, надано рекомендації щодо проведеної терапії, підготовка матеріалів до публікації)

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>

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зрізів тканин, визначено спектральні маркери колагену регенеруючих тканин, проведено аналіз даних конфокальної мікроскопії, надано рекомендації щодо проведеної терапії, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних

зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зрізів тканин, визначено спектральні маркери колагену регенеруючих тканин, проведено аналіз даних конфокальної мікроскопії, надано рекомендації щодо проведеної терапії, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних культур клітин до та після обробки наночастинками, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення отриманих результатів та підготовка матеріалів до публікації).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних культур клітин до та після обробки наночастинками, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення отриманих результатів та підготовка матеріалів до публікації).

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних культур клітин до та після обробки наночастинками, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення отриманих результатів та підготовка матеріалів до публікації).

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.

(Особисто дисертантом 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, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом 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, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом 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, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом 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, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

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.*

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації)

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.*

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації)

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.*

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS

спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації)

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.

(Дисертант приймав участь в аналіз, обробці та представленні експериментальних даних, підготовці матеріалів до публікації)

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.

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

48. Polovyi I., Pырshev I., Сepla 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.*

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

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.*

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зрізів тканин, визначено спектральні маркери колагену регенеруючих тканин, проведено аналіз даних конфокальної мікроскопії, надано рекомендації щодо проведеної терапії, підготовка матеріалів до публікації)

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.*

(Особисто дисертантом була розроблена концепція дослідження, підхід до приготування експериментальних зразків, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації)

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>

(Дисертант приймав участь в аналіз, обробці та представленні експериментальних даних, підготовці матеріалів до публікації)

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.*

(Особисто дисертантом була проведена реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зрізів тканин, визначено спектральні маркери колагену регенеруючих тканин, проведено аналіз даних конфокальної мікроскопії, надано рекомендації щодо проведеної терапії, підготовка матеріалів до публікації).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	30
ВСТУП	31
РОЗДІЛ 1. 2D наночастинки нітриду (BN) бору та дисульфиду вольфраму (WS₂) як платформа для дослідження культур клітин та біомолекул	77
1.1. Дослідження методом CARS мікроскопії сквалену та нітриду бору як прекурсорів для систем доставки ліків	78
1.2. 2D-BN наночастинки як спектроскопічні маркери та система доставки ліків з протекторними властивостями	83
1.3. Вплив 2D наночастинок дисульфиду вольфраму на культури клітин карциноми легені Льюїс <i>in vitro</i> .	91
1.4. Подвійний ефект 2D WS ₂ наночастинок на конформаційні властивості лізоциму.	100
РОЗДІЛ 2. Вуглецеві наноструктури як платформа для дослідження біомолекул та культур клітин	116
2.1. Когерентна анти-стоксова Раман спектроскопія (CARS) та візуалізація ДНК на графенових шарах та склі.	117
2.2. Підсилення ІЧ поглинання біомолекул на одностінних вуглецевих нанотрубках і графенових наносферах.	125
2.3. <i>In situ</i> дослідження Раман маркерів наночастинок (CeO _{2-x}) нанесених на графенову підложку	144
2.4. Взаємодія вуглецевих нанотрубок з ДНК та лізоцимом	153
2.5. Модифікація структури алкалоїдів препарату Conium фулеренами C ₆₀	171
2.6. Підсилена поверхнею візуалізація на ІЧ поглинання культур клітин на наноструктурованій золотій поверхні	178
Розділ 3. Коливальні маркери вуглецевих наноструктур	189
3.1. Коливальні спектри вуглецевих матеріалів: SEIRA спектроскопія та FTIR і Raman спектроскопія	190
3.2. Синтез вуглецевих нанотрубок з хлоридвмісних прекурсорів та їх Властивості	201
3.3. Простий метод отримання графенових квантових точок з частково розкритих багатостінних вуглецевих нанотрубок.	207

РОЗДІЛ 4. Спектральні маркери ліпідів з пухлинних тканин та модельних ліпосом різного складу при взаємодії з протипухлинними препаратами	215
4.1 Структурні переходи в ліпідах з пухлинних тканин при взаємодії з протипухлинними препаратами.	216
4.2 Спектральні маркери модельних клітинних мембран різного складу та їх взаємодія з протипухлинними препаратами	222
РОЗДІЛ 5. Спектральні маркери вторинної структури колагену регенерованих тканин	238
5.1 Композитна плівка хітозану / поліетиленоксиду для дурапластики в моделі черепно-мозкової травми у щурів	239
5.2 Теоретичне обґрунтування ефективності застосування біополімерів при експериментальній черепно-мозковій травмі (огляд літератури та власні результати)	245
5.3 Можливості конфокальної мікроскопії для оцінки ефективності пластики твердої мозкової оболонки біополімерами	252
5.4 Клітинна терапія при дегенеративних ушкодженнях сухожиль	255
ВИСНОВКИ	262
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	266
ДОДАТОК. Список публікацій за темою дисертації	268

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІЧ – інфрачервоний;

FTIR – (Fourier-transform infrared) – інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є;

CARS – Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy – когерентна антистоксова Раман спектроскопія;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

BN – нітрид бору;

WS₂ – дисульфід вольфраму;

НІНЗТЗ – штам клітин фібробластів миші як модель нормальних непухлинних клітин миші (Ембріональна клітинна лінія Блобласт, Каролінський інститут, Стокгольм, Швеція) ;

LNCaP – штам пухлинних клітин андроген-чутливої аденокарциноми простати людини як модель пухлинних клітин;

LLC/R9 – (Lewis lung carcinoma cells) –резистентний до *цис*-платину штам клітин карциноми легені Льюїс, одержаний з вихідного штаму (LLC) в результаті 9-ти послідовних курсів хіміотерапії цисплатином;

DOPC – фосфоліпід диолеїлфосфатидилхолін (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine);

DOX – доксорубіцин;

СПЕВ (SPEV) – клітинна лінія нирок ембріона свині

АЗТП – аутологічна збагачена тромбоцитами плазма

АМСК – аутологічні мезенхімальні стовбурові клітини

АФ – аутологічні фібробласти

ТМО – тверда мозкова оболонка

ThT – тіофлавіну Т

ВСТУП

Дисертаційна робота присвячена дослідженню спектроскопічних маркерів взаємодії біологічних молекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наночастинками, використовуючи сучасні спектроскопічні методики FTIR та CARS, встановленню відповідності цих маркерів змінам у вторинній структурі біомолекул, а також у морфологічних та функціональних властивостях клітин та тканин.

Дисертацією є **сукупність наукових статей за науковою тематикою** із детальним аналізом сучасного стану наукової проблеми та запропонованих рішень щодо її вирішення теоретичними підходами, моделюванням і експериментальними дослідженнями, що детально представлено в опублікованих працях.

Обґрунтування вибору теми дослідження

Значний прогрес у синтезі/виготовленні та характеристичній наночастинок вимагає ґрунтовних досліджень молекулярних механізмів їх взаємодії з біологічними молекулами, клітинами та тканинами. Застосування наночастинок для прикладних задач біології та медицини має кілька важливих фундаментальних напрямків – (i) люмінесцентні маркери для візуалізації досліджуваних об'єктів, (ii) платформи для підсилення оптичних сигналів від об'єктів, нанесених на ці структури, а також (iii) системи для створення нових гібридних матеріалів з заданими властивостями. В межах цих задач необхідним є визначення конформаційних перебудов в біомолекулах, структурних перебудов на рівні клітинної мембрани та інших органел під дією наночастинок, та визначення маркерів цих змін на молекулярному рівні.

Не менш важливим залишається питання можливостей клінічних застосувань наночастинок та створення систем доставки ліків на їх основі. 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 через ряд причин: (i) біобар'єри на шляху до місця призначення, (ii)

їх дія безпосередньо в місці захворювання та (iii) питання біобезпеки. Тому пошук нових перспективних структур з більш високими показниками ефективності та меншими негативними наслідками є важливим завданням. І тут основними питаннями є токсичність матеріалів, можливість їх біодеградації та виведення з клітини, а також можливість зв'язати більшу кількість корисного препарату.

З іншого боку, залишається багато прикладних проблем біофізики, біохімії, біології і медицини, де фізичні методи дослідження є незамінними. Це зокрема і питання діагностики та визначення причин таких тяжких захворювань як онкологія, хвороби Паркінсона та Альцгеймера, оцінки ефективності методів лікування та механізми впливу лікарських засобів. Відповіді на ці питання намагаються шукати на молекулярному рівні, зокрема досліджуючи конформаційний склад нуклеїнових кислот, білків, структурні перебудови у клітинній мембрані, а також морфологічні особливості клітин, клітинних органел та тканин.

Коливальна спектроскопія (ІЧ та Раман) завдяки своїй високій чутливості та специфічності, є одним з небагатьох неінвазивних фізичних методів дослідження, що здатний на молекулярному рівні виявити відмінності у вторинній структурі біомолекул, визначити конформаційні стани біомолекул, структурні перебудови у клітинній мембрані, зміни молекулярного складу тканин, тощо. В останні десятиліття значно зросла кількість досліджень, що пропонують використовувати спектроскопічні методи для вирішення не тільки фундаментальних задач, але і прикладних біологічних і навіть клінічних задач. Однак, з огляду на складність біологічних об'єктів, інтерпретація отриманих результатів потребує обробки і узагальнення великої кількості саме експериментальних даних, оскільки розрахункові методи в даному випадку мають цілий ряд наближень та обмежень.

Не зважаючи на те, що досягнуто значного прогресу в інтерпретації ІЧ спектрів тканин, цей напрямок потребує більш ґрунтовних досліджень, зокрема що стосується спектроскопічних маркерів клітинних органел, конформаційного

стану ліпідів клітинної мембрани, специфічних маркерів різних типів тканин, різних штамів клітин, тощо.

Наприклад, одним з білків, який грає важливу роль в структурі та функціонуванні різних тканин, є колаген, він становить близько 90% позаклітинного матриксу та близько 30% від загальної маси білка. Тривимірна структура колагенової сітки істотно відрізняється залежно від локалізації і біологічного призначення тканин, до складу яких входить колаген. Колагенові волокна в твердій мозковій оболонці (ТМО) утворюють шарувату структуру з різним напрямком волокон, і таких шарів виділяють до п'яти. Колагенові волокна шкіри не мають переважного напрямку. Тому дослідження вторинної структури та визначення спектроскопічних маркерів колагену на різних стадіях формування тканини та після впливу лікування, має пряме клінічне і фундаментальне значення.

Актуальним також є і пошук специфічних підходів для реєстрації спектрів, зокрема пошук підсилюючих поверхонь та структур, що дозволить використовувати меншу кількість речовини, отримати підсилені оптичні сигнали, а також візуалізувати досліджувані об'єкти. З цією метою успішно використовується класична мікроРаман спектроскопія, що завдяки локалізації лазерного променя збудження на площі порядку 1 мкм дає можливість отримати сигнал від окремих компонент клітини. Також успішно використовуються методи сучасної нелінійної спектроскопі, зокрема CARS – когерентна антистоксова Раман спектроскопія, що дозволяє одночасно і зареєструвати власне коливальний спектр, і провести візуалізацію на коливальних частотах. CARS – це процес вимушеного Раманівського розсіяння, коли молекулярні коливання фазуються зовнішнім випромінюванням і розсіюються в антистоксову область. Коли на нелінійне середовище з відмінною від нуля нелінійною сприйнятливостю χ падають дві когерентні в часі і просторі світлові хвилі ($E(\nu_p)$ – більшої частоти, накачка та $E(\nu_s)$ – меншої частоти, стокс) то виникає «биття», стояча хвиля, на частоті $\nu_p - \nu_s$. А коли ця різниця відповідає коливальній частоті ν_{vib} , то відбувається розсіяння другого фотона накачки, але вже зі збудженого

коливального рівня $E(v_{\text{vib}})$ з генерацією хвилі з частотою $v_{\text{cars.}} = v_p - v_s$). Таким чином, CARS спектроскопія дозволяє заходити на «поле діяльності» класичної лінійної спектроскопії і дає можливість отримати інформацію про структуру спектральних ліній, молекулярні рівні енергії, та ін.

Цілий ряд переваг цього методу (неінвазивний як і Раман, при чому рівень сигналу в CARS може бути в 10^4 - 10^5 разів вищий ніж в Рамані, частота v_{cars} набагато більші ніж v_p і v_s , що дозволяє використовувати фільтри і відсікати падаюче лазерне випромінювання і можливу флуоресценцію, мала розбіжність пучка дозволяє отримати гарне просторове розділення, можна просканувати поверхню на певній частоті та отримати візуальне зображення) зумовлює його дуже стрімкий розвиток у напрямку дослідження біомолекул, клітин та тканин, однак тут все ще залишається широке поле для досліджень. Зокрема в області аналізу CARS спектрів ДНК та клітин.

Таким чином, актуальність запропонованого дослідження спектроскопічних маркерів взаємодії біологічних молекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наночастинкам визначається необхідністю мати більш широку базу даних щодо взаємозв'язку між спектральним маркерами та конформаційними властивостями досліджуваних об'єктів з метою їх прямого практичного застосування для задач діагностики, клінічних, а також для фундаментальних досліджень.

Метою роботи Метою роботи було визначення спектроскопічних маркерів та молекулярних механізмів впливу вуглецевих 1D наноструктур (одностінні та багатостінні вуглецеві нанотрубки), вуглецевих 2D наноструктур (графен, графенові наночастинки), молекули фулерену, 2D напівпровідникових (дисульфід вольфраму) та діелектричних (нітрид бору) 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 цитотоксичних властивостей 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 наночастинами 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 цитотоксичних властивостей 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 наночастинами WS_2 . Конформаційний аналіз білка лізоциму при взаємодії з 2D- WS_2 наночастинами. Чи індукують наночастинки 2D- WS_2 формування амілоїдних фібрилярних структур?
- 3) Дослідження конформаційного складу фосфоліпідів з пухлинних тканин чутливих та резистентних штамів 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 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, тимін, лізоцим, колаген (першого і другого типу), DOPC (диолеїлфосфатидилхолін) 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 спектральні маркери, що визначають особливості молекулярної структури біологічних молекул під впливом наноструктур різної природи та протипухлинних препаратів, а також характер їх впливу на морфологічні та функціональні властивості клітин та тканин.

Методи дослідження:

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є в геометрії на пропускання (FTIR) та відбивання (FTIR-ATR), спектроскопія комбінаційного розсіяння (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, білків та для розрахунку концентрацій розчинів біологічних молекул аналіз спектрів за допомогою розкладу контуру на компоненти за алгоритмом Левенберга-Марквардта.

Наукова новизна отриманих результатів:

- Вперше показана можливість використання CARS спектроскопії для візуалізації біомолекул та вуглецевих наноструктур. Визначено CARS спектральні маркери 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 ДНК на частотах валентних СН коливань $2760, 2900 \text{ см}^{-1}$, а у випадку використання скляної підложки – на частотах ОН валентних коливань 3400 см^{-1} та $\text{C}=\text{O} 1625 \text{ см}^{-1}$
- Показано, що багат шаровий графен можна використовувати як підложку для інфрачервоної спектроскопії з метою підсилення оптичних сигналів від біомолекул та клітин. За допомогою графенової підложки вдалося зафіксувати присутність наночастинок WS_2 в культурі клітин, а також на моделі тиміну визначити спектральні маркери взаємодії тиміну з одностінними вуглецевими нанотрубками, графеном та оксидом графену.
- Вперше показана можливість використання 2D наночастинок нітриду бору для підсилення оптичних сигналів (в 3-5 разів) в Раман спектрах з метою аналізу стану клітинних органел (мембрани, цитоплазми, ядра), шляхом різного часу інкубації наночастинок з клітинами, що призводить до різних місць локалізації 2D-BN. Показник заломлення більший ніж в клітини
- Вперше показано можливість утворення нековалентних 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 гель-фазу в загальній фракції фосфоліпідів з резистентного штаму пухлинних клітини при кімнатній температурі та визначено спектроскопічні маркери цієї фази. Для фосфоліпідів з чутливого штаму пухлинних клітин визначено невпорядковану рідкокристалічну фазу з відповідними спектроскопічними маркерами.
- Запропоновано два адаптовані протоколи для отримання модельних везикул (ліпосом) різного фосфоліпідного складу з метою дослідження взаємодії клітинної мембрани з протипухлинними препаратами оксаліплатин та карбоплатин. Як результат, 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 та охарактеризовано вторинну структуру отриманих систем.
- Вперше методом ІЧ спектроскопії досліджено вторинну структуру 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 структури відновлених тканин.

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 наноконкомплексів 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 наноконкомпозити 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.

Практичне значення отриманих 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 клітин при взаємодії 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 різний характер 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 та оксиду графену для дослідження біомолекул та клітин в CARS та Раман спектроскопії з підсиленням оптичних сигналів. Проаналізовано конформаційний склад колагену з регенеруючих тканин ТМО після черепно-мозкової травми та пошкоджених тканин Ахіллового сухожилля, проведено оцінку ефективності терапії. Визначено спектроскопічні маркери нормальної ТМО та рубцевої тканини та показано можливості ІЧ спектроскопії для прикладних медичних задач.

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, обробка та аналіз даних CARS спектроскопії та CARS зображень, визначено CARS маркери досліджуваних зразків, підготовка матеріалів до публікації;
- у роботах [5, 9, 31, 33, 34] здобувачем була розроблена концепція дослідження, реєстрація та аналіз FTIR 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, приготування експериментальних зразків, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, аналіз зображень конфокальної мікроскопії, узагальнення всіх експериментальних даних, підготовка матеріалів до публікації;
- у роботах [1, 4, 12, 13, 16, 22-25, 27-30, 32] здобувачем була розроблена концепція дослідження, приготування досліджуваних комплексів, реєстрація та аналіз FTIR спектрів досліджуваних зразків, обговорення та аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку;
- у роботах [6, 11, 46, 51] здобувач приймав 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, підготовка 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 проведеної терапії, підготовка матеріалів до публікації;
- у роботах [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.

Ukrainian-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.

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 кварталів (Q1/Q2) за класифікацією SCImago Journal and Country Rank), 2 розділи у колективних монографіях та в 31 роботі, що видані за матеріалами конференцій.

У першому розділі «2D наночастинки нітриду (BN) бору та дисульфиду вольфраму (WS_2) як платформа для дослідження культур клітин та біомолекул» представлено дослідження впливу 2D наночастинок BN та WS_2 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.

Характеризація наночастинок. Водні суспензії досліджуваних наночастинок 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 таки чином, варіюють в межах від 0,1-0,2 нм до 250 нм, а концентрація суспензій порядку 0,1-0,3 мг/мл (рис.1).

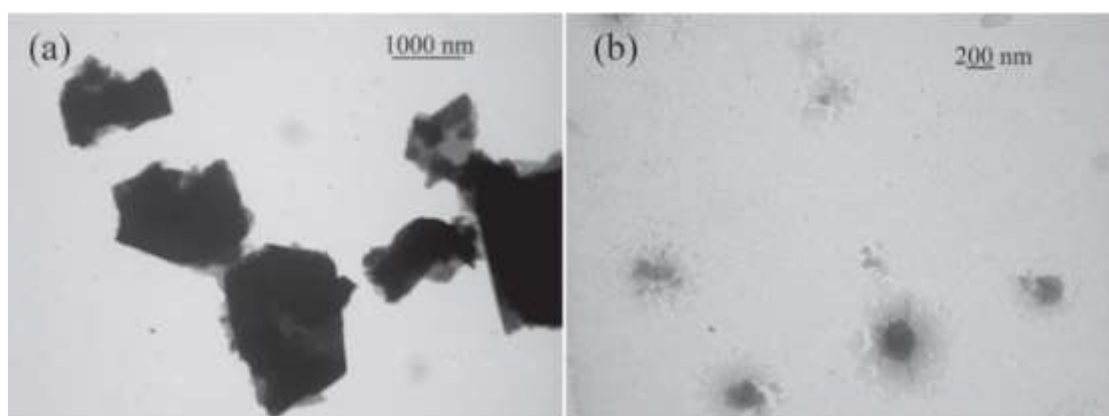


Рис. 1. TEM зображення частинок WS_2 до та після проведення процедури механохімічної обробки. [S1]

На тем зображеннях частинок WS_2 до проведення процедури механохімічної обробки видно об'єкти розміром порядку 1-2 μm . Тоді як після обробки розміри частинок є порядку 200 нм і менше.

ІЧ маркер наночастинок BN це смуга B-N в області 1368 cm^{-1} , в Раман спектрі це E_{2g} мода на 1362 cm^{-1} для нітриду бору (аналогічно в CARS спектрі спостерігаємо моду 1360 cm^{-1}) та дві моди для WS_2 355 cm^{-1} (E_{12g}^1) та 419 cm^{-1} (A_{1g}). (рис.2).

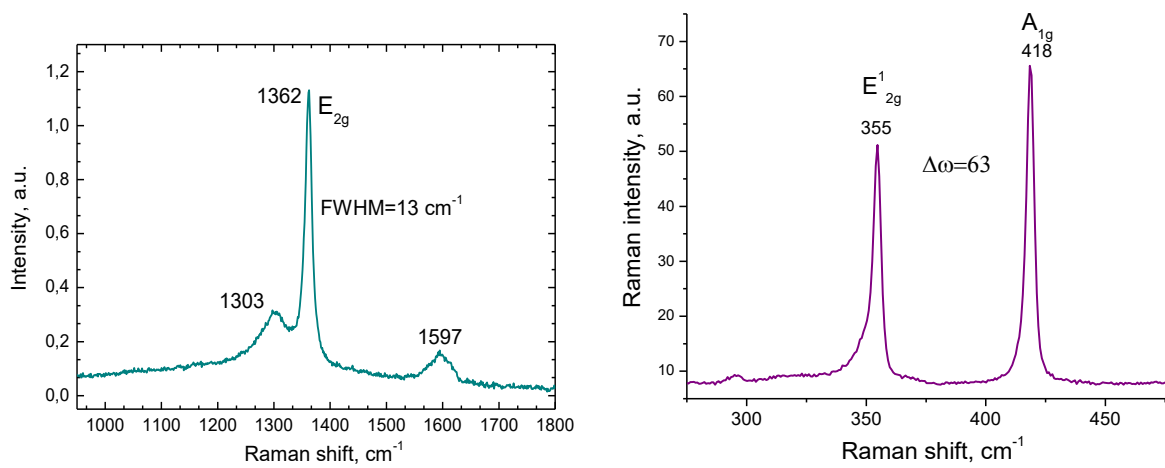


Рис. 2 Раман спектри водної суспензії наночастинок 2D-BN (а) та 2D-WS₂ (б), отриманих механохімічним способом.

2D-BN наночастинок мають інтенсивний CARS резонансний сигнал на частоті 1364 cm^{-1} , що узгоджується з даними ІЧ та Раман спектроскопії (рис. 3) [7, 39].

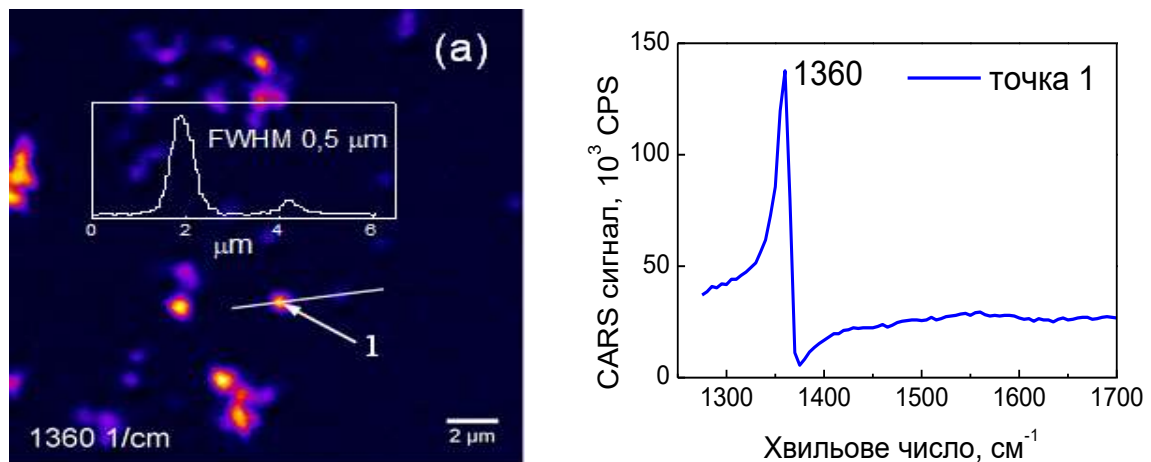


Рис.3. CARS зображення та спектри порошку BN, записані на 1360 cm^{-1} . Розмір зображень 20x20 μm . Профіль інтенсивності КАРС, наведено білою суцільною лінією на зображенні. Спектр записаний на ділянці, що позначена стрілкою на зображенні [7].

Для аналізу цитотоксичності наночастинок 2D-BN використовувались культури клітин фібробластів NIH3T3 миші (як моделі нормальних непухлинних клітин). Показано, що нітрид бору не впливає на життєздатність клітин аж до концентрації 100 mg/ml та не призводить до зростання фракції мертвих клітин порівняно з живими (рис. 4 а). Окрім того, на культурах пухлинних клітин LLC/R9 теж було показано відсутність цитотоксичного впливу водної суспензії наночастинок 2D-BN за умови одно та дводобової інкубації. Такий результат є

сам по собі дуже цікавим, оскільки, більшість наночастинок є токсичними і тому виникають складнощі у використанні їх для створення систем доставки ліків [5]. Для наночастинок 2D-WS₂ в першу добу інкубації не було виявлено цитотоксичного впливу, однак на другу добу кількість живих клітин знизилась на 30 відсотків. Максимальний ефект - зменшення кількості життєздатних клітин на 47% - був зафіксований при концентраціях 2D-WS₂ близьких до 2 мкг/мл, при чому при подальшому збільшенні концентрації наночастинок цитотоксичний ефект не посилюється, кількість життєздатних клітин залишається на рівні 55%-65% від такої в контролі (рис. 4 б). Такий ефект може бути пов'язаний з гетерогенністю розмірів наночастинок в суспензії, коли частинки меншого розміру можуть вплинути на життєздатність пухлинних клітин шляхом нейтралізації активних форм кисню, [S2]. Більш великі за розміром наночастинок WS₂ можуть взаємодіяти з макромолекулами пухлинних клітин, такими як ДНК та білки (особливо мембранотропні), викликаючи або загибель клітин, або пригнічуючи їх проліферативну активність. З іншого боку, це може бути пов'язано з процесами окислення WS₂ у водному середовищі та зниженням рН середовища [9].

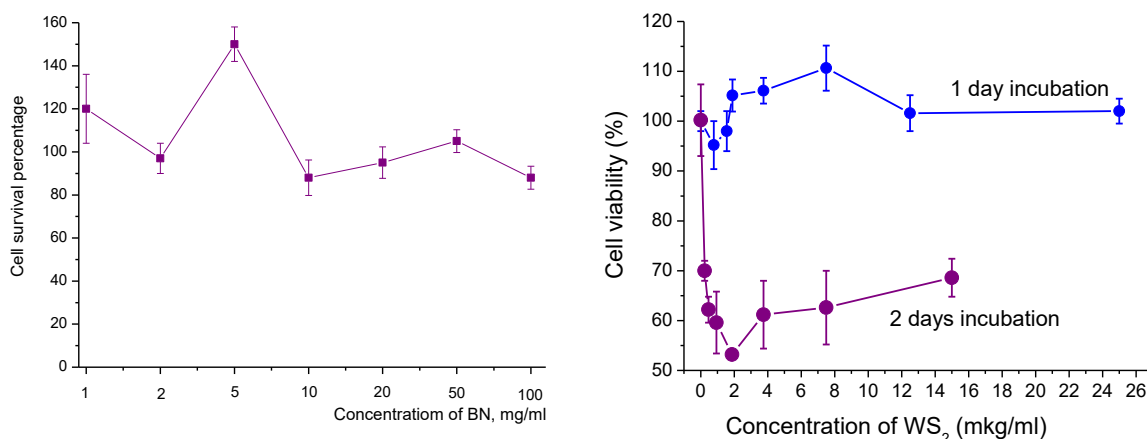


Рис. 4. Залежність життєздатності клітин NIH3T3 від концентрації 2D-BN та LLC/R9 від концентрації 2D-WS₂.

Взаємодія 2D нітриду бору з культурами клітин. За даними ІЧ спектроскопії було показано, що в залежності від тривалості 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*, при чому вже через 1 годину (бордова крива) спостерігаємо зміни області валентних СН коливань в бік зростання вкладу CH_3 , а також бачимо появу плеча Р-О-С на 1122 см^{-1} , що свідчить про вплив на клітинну мембрану (рис. 5). Однак через 10 годин інкубації ці зміни вже не спостерігаються і спектр стає максимально подібним на контрольний. Через одну добу інкубації максимальні зміни спостерігаються в області асиметричних (1242 см^{-1}) та симетричних (1085 см^{-1}) коливань PO_2^- молекулярних груп, що відносимо до нуклеїнових кислот, а саме спостерігаємо уширення та високочастотний зсув смуги 1242 см^{-1} , та появу додаткових плеч на 1310 , 1286 та 1267 см^{-1} . Це може свідчити про дію наночастинок на клітинне ядро [5].

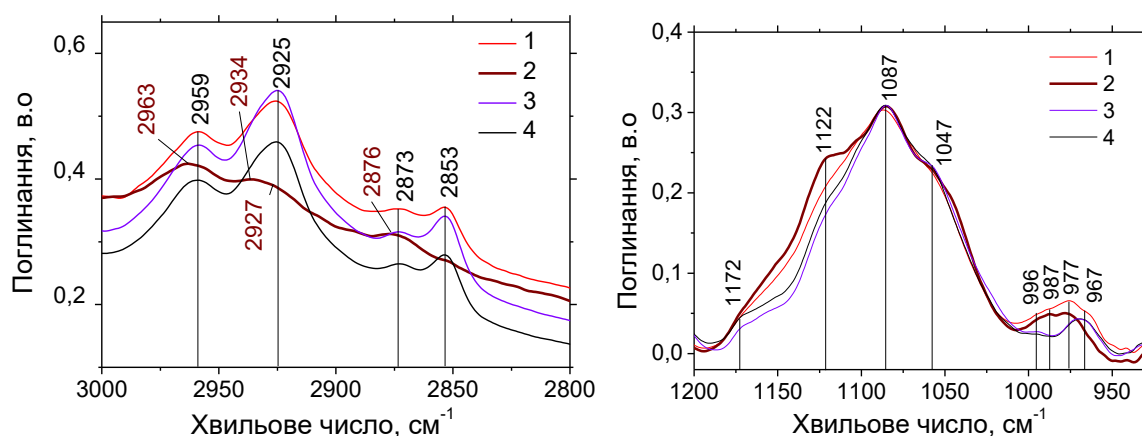


Рис. 5. ІЧ-спектри поглинання культур пухлинних клітин, оброблених наночастинками BN з різним часом культивування. 1 -контроль, культивування 1 доба без використання наночастинок, 2 – 1 година культивування, 2- 2 години культивування, 3- 10 годин культивування.

Проаналізувавши Раман спектри пухлинних клітин LNCaP до та після обробки 2D-BN наночастинками, вдалося зафіксувати присутність наночастинок нітриду бору в клітині за маркерною модою E_{2g} 1364 см^{-1} (відсутня в контролі), що слугує додатковим підтвердженням проникнення наночастинок в клітину. Смуга на 1001 см^{-1} відноситься до поглинання фенілаланіну і є характерною для спектру будь-яких клітин. 1657 см^{-1} це теж характеристична смуга Амід I, однак сюди може давати вклад і ДНК. Поява смуги на 1338 см^{-1} та інших смуг поблизу, віднесених до аденіну, а також смуги на 780 см^{-1} дозволяє припустити, що місцем

у клітині, з якого зареєстрований спектр, є ядро клітини або область поблизу. 1606 cm^{-1} віднесемо до поглинання $\text{C}=\text{C}$ молекулярних груп амінокислот, зокрема фенілаланіну, разом з поглинанням NH_2 основ амінокислот. 1447 cm^{-1} – CH_2 деформаційні коливання фосфоліпідів [S3, 14, 18]. Окрім того, через присутність в клітині наночастинок 2D-BN, які в даному випадку виступали як локальні підсилюючі поверхні, 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 [5, 34].

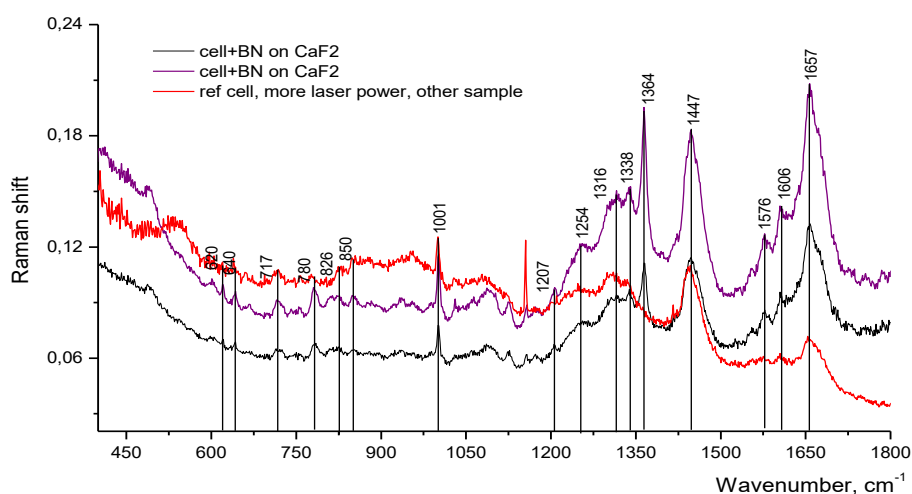


Рис. 6. Раман спектри культур пухлинних клітин LNCaP до та після обробки 2D-BN наночастинками.

Дослідження впливу комплексу комплексу 2D-BN наночастинок з доксорубіцином на культури клітин. Комплекс 2D-BN наночастинок з протипухлинним препаратом доксорубіцином готували шляхом змішування 12,5 мкл дисперсії 2D-BN (0,3 мг/мл) з 5 мкл розчину DOX та 82,5 мкл фосфатного буфера з подальшою інкубацією протягом 24 годин, центрифугуванням при 5500 об/хв протягом 90 хвилин і 10000 об/хв впродовж 1 хв. Об'єм розчину відновили додаванням 100 мкл фосфатного буфера. Були проаналізовані FTIR спектри отриманих комплексів. Смуга на частоті 1375 cm^{-1} відноситься до валентних коливань BN, тому при зростанні концентрації BN в комплексі спостерігається значний вклад поглинання на цій частоті, однак із явним високочастотним зсувом до 1379 cm^{-1} . У випадку комплексу з максимальною концентрацією BN високочастотний зсув спостерігається для смуги валентних коливань $\text{C}=\text{O}$ з 1709

см⁻¹ до 1726 см⁻¹, що може свідчити про перебудову водневих зв'язків C=O...H-O. Спостерігається зміщення смуги поглинання валентного C-O 1113 см⁻¹ до 1119 см⁻¹, а деформаційні C-C, C-O зміщені в другу сторону – у низькочастотний бік – з 1082 см⁻¹ до 1073. Зміщені деформаційні N-H з 1286 см⁻¹ до 1284 см⁻¹. Однак смуги 1614 та 1580, які можна віднести до дихальних кільцевих мод чи деформаційних NH та C=C, залишаються без змін. Можна припустити можливість взаємодії через молекулярні групи позначені на рис. червоним квадратом [40, 43].

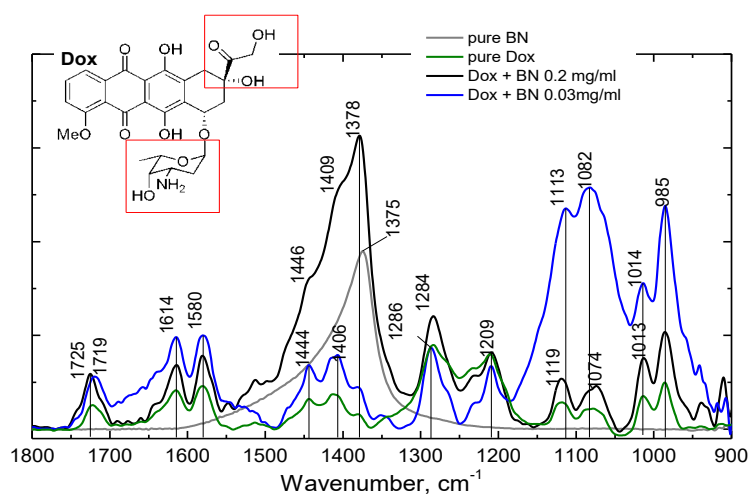


Рис.7. FTIR спектри доксорубіцину (концентрація 1 мг/мл) в комплексі з наночастинками 2D-BN різної концентрації.

Таблиця 1.

Положення смуг поглинання доксорубіцину та комплексу доксорубіцину з нітридом бору.

Dox	DOX+BN 0,03	DOX+BN 0,2	Assignment
1722	1719	1725	C=O carboxylic
1615	1614	1614	C=O quinine, C=C, C=N
1580	1580	1580	C=C, C=N
1444	1444	1446	C-H def
1412	1416	-	C-H def
1406	1406	1408	C-H def
-	-	1378	B-N str
1283	1286	1284	N-H def
1209	1209	1209	C-O-C
1119	1113	1119	C-O str
1078	1082	1074	N-H def
1012	1014	1013	C-O
986	985	985	C-O

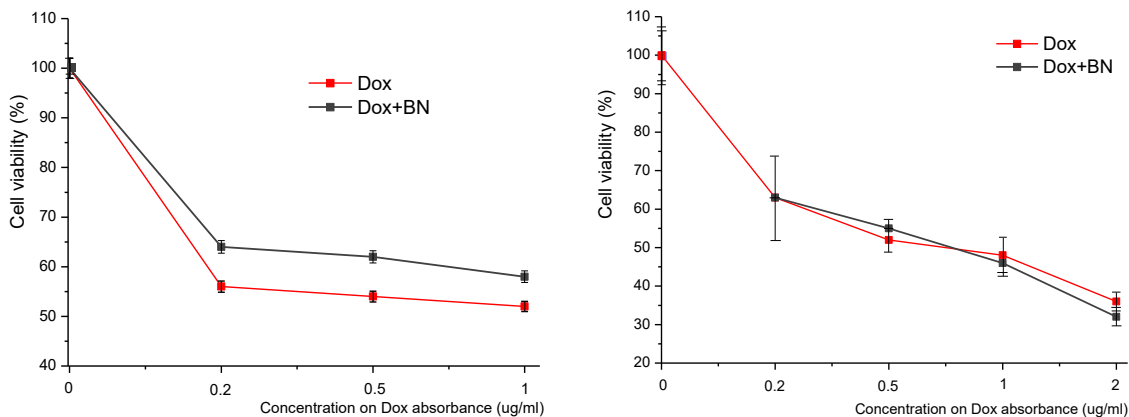


Рис.8. Вплив BN на цитотоксичність Dox для клітин NIH3T3 (а) та LNCaP (б). Життєздатність виражена як процентне співвідношення живих клітин, оброблених комплексом BN:Dox, і необроблених контрольних клітин. Стандарти відхилення наведені для трьох повторів.

Для аналізу впливу даних наночастинок на культури пухлинних клітин, відповідні суспензії додавали до поживного середовища. За даним МТТ тесту було показано, що для пухлинних клітин цитотоксичність доксорубіцину в чистому вигляді та в комплексі з наночастинами нітриду бору практично не змінилась. Доксорубіцин характеризується достатньо високою токсичністю для даної клітинної лінії навіть при малих концентраціях порядку 0,2 мкг/мл, і присутність наночастинок ніяк на це не впливає. Інша картина спостерігається у випадку нормальних клітин фібробластів. Незначна на перший погляд (порядку 10%) відмінність у показниках життєздатності клітин, оброблених чистим доксорубіцином і комплексом з наночастинами може мати важливе практичне значення, оскільки практично за присутності наночастинок ми знизили токсичність доксорубіцину для нормальних клітин (рис 8. а) не зменшуючи при цьому токсичності для пухлинних клітин (рис.8 б) [5, 31, 33].

За даними квантово-механічного моделювання методом теорії функціоналу густини показано, що після процесу релаксації положення рівноваги молекули DOX отримують на відстані $h = 2,44 \text{ \AA}$ між поверхнею BN та найближчими атомами водню, при чому бензолні кільця стають паралельні поверхні, а зв'язок C-N, орієнтований від поверхні. Розрахований електронний розподіл густини заряду 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 залежить від початкової планарної орієнтації молекули DOX [40, 47]. Визначено також спектроскопічні маркери утворених комплексів та показано, що основні зміни зафіксовано в області C=O, C-O та C-C коливань.

Показано можливості CARS мікроскопії для реєстрації зображення клітин без додаткового використання барвників. Показано, що пухлинні клітини LLC/R9 до (контроль) та після обробки комплексом доксорубіцину з нітридом бору мають різну морфологію. В контролі особливо чітко виділяється клітинна мембрана та ядро, при чому видно неоднорідності в структурі мембрани, які можуть бути зумовлені різним фосфоліпідним складом (рис. 9 а). Клітин після обробки виглядають як однорідні структури (рис. 9 б), однак після повторного сканування тої самої клітини спостерігається поява яскравих об'єктів люмінесцентної природи (рис. 9 в). Можна припустити, що при цьому вивільнились молекули з флуоресцентними властивостями, наприклад цитохром С [39, 47, 50].

Epi CARS (E-CARS)
 1600cm^{-1} ,
 $940\text{uW}_1\text{H}_15400\text{uW}$

1360cm^{-1} , $260\text{uW}_1\text{H}_12300\text{uW}$
 Forward CARS (F-CARS) *Epi CARS (E-CARS)*

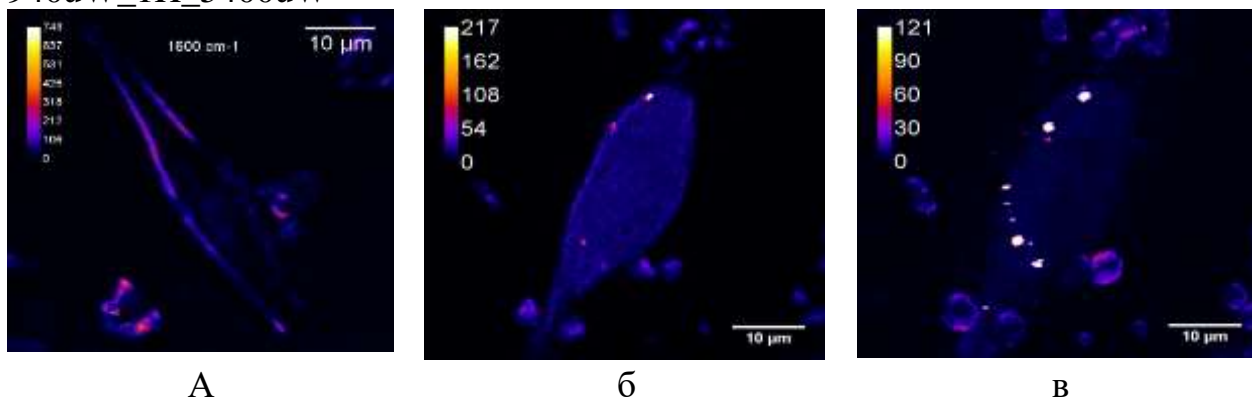


Рис.9. CARS зображення клітин LLC/R9 контроль (а), та оброблених Дох 5 мг/мл +BN 0.1 (б, в)

Дослідження впливу наночастинок 2D-WS₂ на культури пухлинних клітин.
 Основною відмінністю наночастинок 2D-WS₂ від 2D-BN є те, що нітрид бору і масивний і у вигляді наночастинок – класичний діелектрик з шириною забороненої зони порядку 5 еВ. Тоді як сульфід вольфраму – напівпровідник, при

чому ширина забороненої зони змінюється від 1,4 еВ в масивному WS_2 (непрямозонний напівпровідник) до 2 еВ (прямозонний напівпровідник) в наноструктурованому. У моношаровій формі WS_2 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, наночастинки 2D- WS_2 теж можуть проникати в цитоплазму клітин LLC/R9 або локалізуватись на мембрані, та спричиняти зміни на молекулярному рівні. Про це свідчать смуги в області 354 cm^{-1} та 419 cm^{-1} , які є характеристичними E_{2g}^1 та A_{1g} модами WS_2 (рис. 10). Для реєстрації Раман спектрів клітини були нанесені на підложку з багатошарового графену (MLG) і саме завдяки процесам підсилення вдалося зафіксувати і моди наночастинок і клітин. Аналіз ІЧ спектрів поглинання клітин LLC/R9 до та після обробки 2D- WS_2 показав вплив наночастинок на конформаційний стан білкової фракції та нуклеїнових кислот [9].

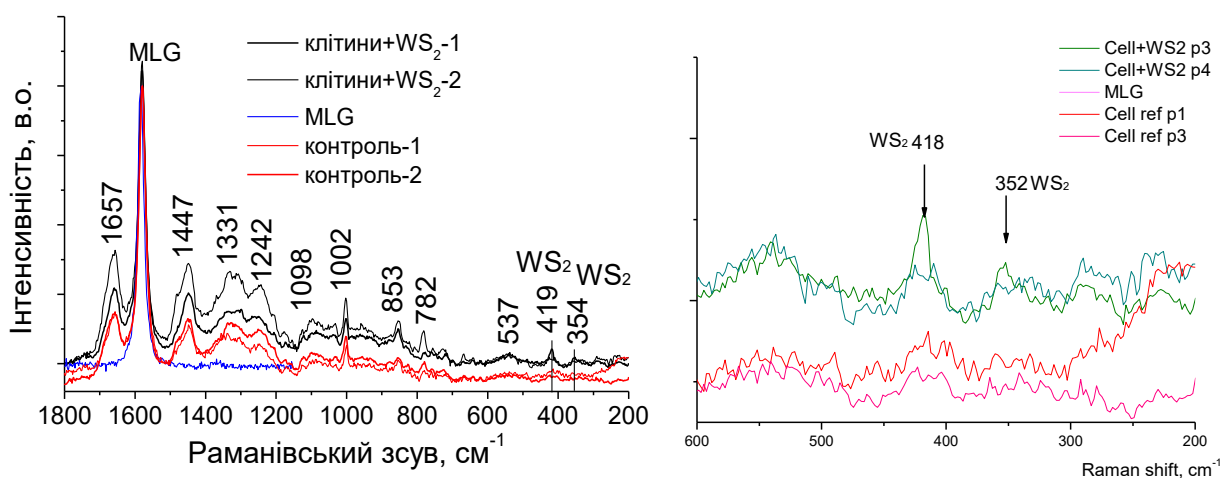


Рис.10. Раман спектри пухлинних клітин LLC/R9 після обробки наночастинками 2D- WS_2 (чорні криві, два спектри) та без обробки (контроль, червоні криві, два спектри). Синя крива – спектр підложки з багатошарового графену (MLG).

Звуження смуги Амід I через зменшення вкладу плеча на 1635 cm^{-1} (β -структури) свідчить про конформаційні зміни в білках, а також зменшення інтенсивності та звуження смуг в області 1239 cm^{-1} та 1084 cm^{-1} , що відносяться відповідно до асиметричних та симетричних коливань молекулярних груп PO_2^- в

мембранних фосфоліпідах та цукрофосфатному остові і нуклеїнових кислотах. Це може бути пов'язано з впорядкуванням ліпідів та білків поблизу поверхні наночастинок.

Аналіз зображень, отриманих за допомогою конфокальної мікроскопії, показав, що пухлинні клітини, оброблені 2D-WS₂ наночастинами (рис. 11, а), за морфологією істотно не відрізняються від контрольних клітин (рис. 11, б). В обох випадках переважна більшість клітин була візуально життєздатною, видовженої форми, прикріплені до пластику. Однак у випадку клітин, оброблених 2D-WS₂, кількість округлих клітин стає більшою, ніж у контролі. Крім того, збільшення інтенсивності люмінесценції клітин, інкубованих з наночастинами в синій області, свідчить про те, що частинки або впливають на біохімічні процеси в клітині, або проявляють люмінесцентні в діапазоні 380-480 нм. Останнє твердження справедливо для дуже дрібних частинок (наноточки) розміром порядку 1-2 нм [S4]. Враховуючи їх легше проникнення в клітину через їх невеликий розмір, можна припустити, що такі маленькі наночастинок можуть проникати в цитоплазму клітини і локалізуватися навколо клітинного ядра, про що свідчить детальний аналіз зображення. В роботі [S5] показало можливість люмінесценції 2D-WS₂ у червоній області, однак це може залежати від розміру та структури наночастинок, а також від довжини хвилі збудження [S6].

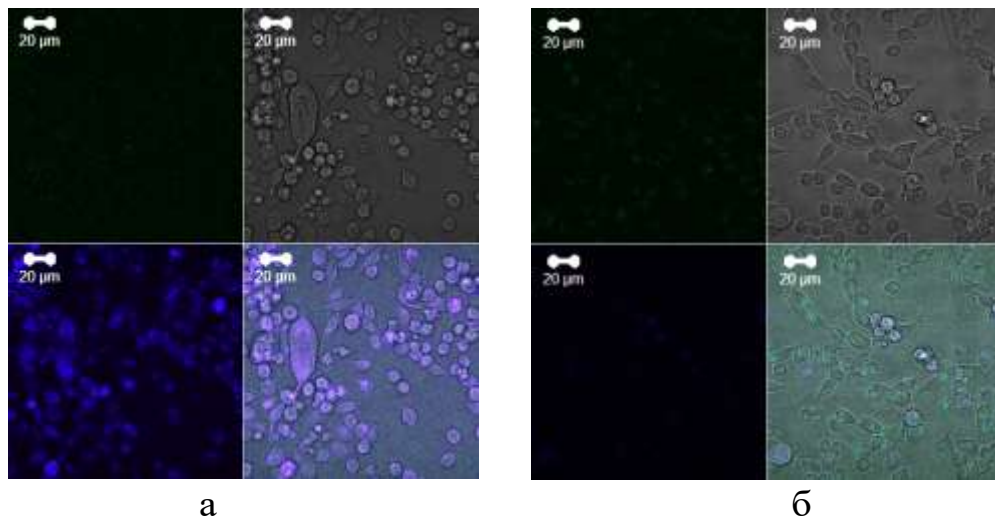


Рис.11. Конфокальні зображення клітин LLC/R9 після обробки наночастинами 2D-WS₂ (а) та без обробки (б). Об'єктив LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Corr, збудження лазери 488нм T1 50,0%, 405 нм T2 30,0%.

Дослідження впливу 2D-WS₂ наночастинок на конформаційний стан білка лізоциму. Показано, що при взаємодії лізоциму з 2D-WS₂ наночастинок за умови низьких рН спостерігали утворення амілоїдних фібрил. Амілоїдні фібрили являють собою структури, утворені у результаті незворотніх конформаційних переходів у молекулі білка, що можуть мати місце за певних зовнішніх умов. Амілоїдні фібрили не кристалічні та нерозчинні, і, отже, вони не піддається аналізу за допомогою звичайної рентгенівської кристалografії та ЯМР розчину. Тому докладний опис утворення амілоїду на молекулярному рівні залишається складним. Як показали дослідження [S7- S9], такі структури характеризуються підвищеним вмістом антипаралельних β-шарів, розміщених перпендикулярно осі фібрили.

В даній роботі при рН 2,0 та різних концентраціях розчину лізоциму (1 мг/мл, 20 мг/мл) ми спостерігали зростання вкладу смуги 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.

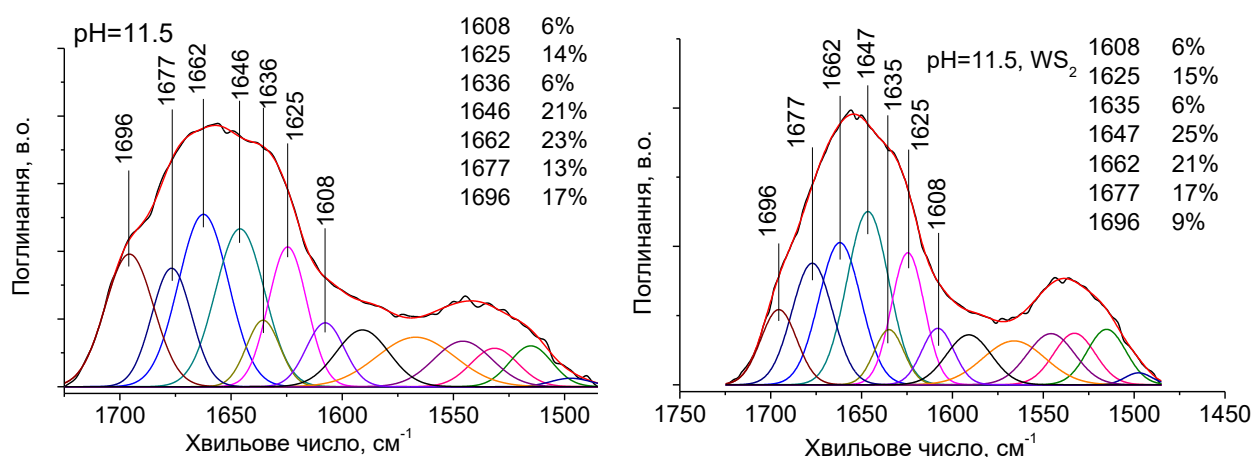


Рис.12. Розклад на компоненти смуги Амід I лізоциму та лізоциму в комплексі з 2D-WS₂ при рН=11.5.

Розклад смуги Амиду I у FTIR спектрах зразків лізоциму та лізоциму в комплексі з 2D-WS₂ на компоненти дозволив оцінити внесок кожної конформації у

вторинну структуру лізоциму. Цю процедуру проводили згідно з [S10-S12], використовуючи наступну модель та розподіл компонентів: 1649 см^{-1} - α -спіраль, 1659 см^{-1} - неупорядкована форма, 1632 см^{-1} - β -шари, 1695 та 1620 см^{-1} - антипаралельні β - шари, 1615 см^{-1} - бічні групи (рис.12) [10, 41, 44].

Застосування тіофлавіну Т (ThT) вважається класичним підходом для дослідження амілоїдних фібрил. При утворенні амілоїдних фібрил тіофлавін Т зв'язується з відповідними структурами, що супроводжується процесом гасіння флуоресценції. Оскільки ThT - це флуоресцентний барвник, ми застосували відповідний флуоресцентний аналіз, щоб визначити наявність амілоїдних структур. Дійсно, збільшення концентрації ThT призводить до збільшення його флуоресцентного сигналу, тоді як 2D-WS₂ наночастинки зменшують випромінювання ThT залежно від концентрації. Однак в даному випадку можливою причиною гасіння флуоресценції може бути безпосереднє зв'язування 2D-WS₂ наночастинок з тіофлавіном Т, що може призводити до хибнопозитивного результату [S13]. Тому в даному випадку для аналізу впливу 2D-WS₂ на процеси утворення амілоїдних структур варто використовувати інші підходи, наприклад ІЧ спектральний аналіз.

У розділі 2 «Вуглецеві наноструктури як платформа для дослідження біомолекул та культур клітин» представлені результати дослідження взаємодії біологічних молекул з вуглецевими наноструктурами (графен, наночастинки 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.

На рис 13 продемонстровано CARS зображення моношару графену, зареєстроване на частотах валентних коливань СН молекулярних груп, а саме на 2850 та 2900 см^{-1} при відносно низькій потужності збудження (до 150 мВт). CARS сигнал дозволяє візуалізувати лист графену, Характер цього сигналу на частоті $\omega_{AS} = 2\omega_r - \omega_S$ нерезонансний, він складається з нерезонансних CARS та сигналів люмінесценції. При потужності імпульсу накачування 370 Вт і більше

до CARS сигналу графену додається люмінесценція від скляної підложки. На рис. 13 б яскраві плями, рівномірно розподілені по зображенню, належать графену [8].

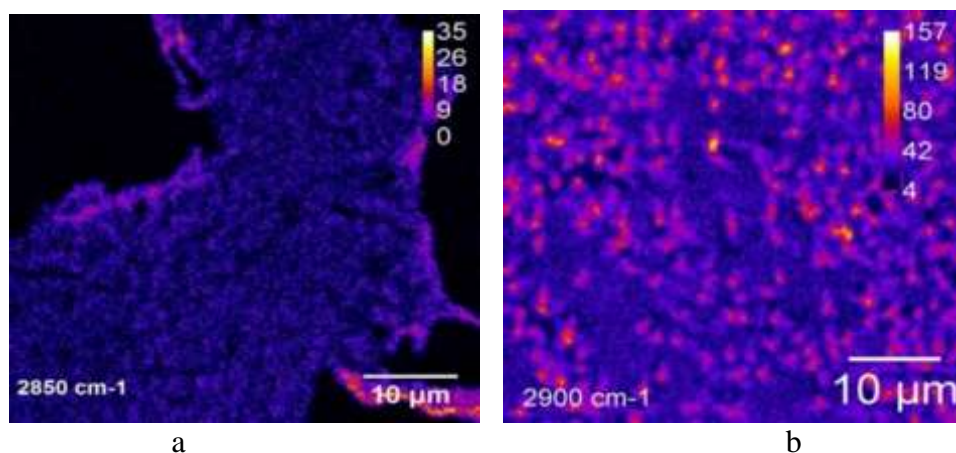
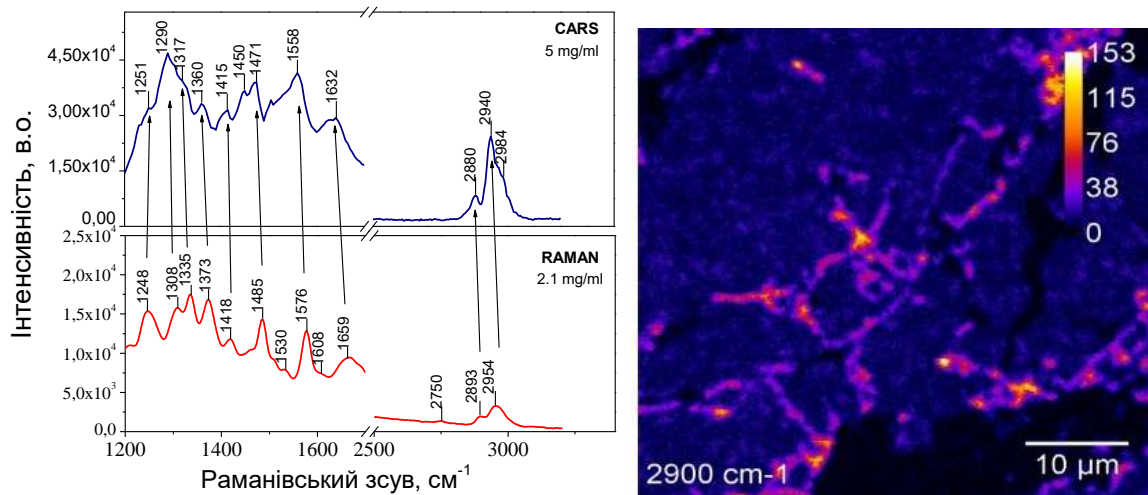


Рис. 13. а) CARS зображення моношару графену на скляній підложці, зареєстроване на частоті 2850 cm^{-1} , потужність збудження $50\text{ }\mu\text{W}$ (Стокс) та $100\text{ }\mu\text{W}$ (накачка), краї графенового шару більш яскраві; б) CARS зображення двошарового графену на скляній підложці зареєстроване на частоті 2900 cm^{-1} , потужність збудження $70\text{ }\mu\text{W}$ (Стокс) та $370\text{ }\mu\text{W}$ (накачка). Більш яскравий відтінок пікселя відповідає більшій амплітуді вимірюваного сигналу.

Підложка з одношарового графену була використана для отримання CARS зображення та спектрів ДНК і завдяки нелінійним властивостям графену вдалося отримати контрастне зображення ДНК на частотах валентних СН коливань в області 2900 cm^{-1} (рис 14, б). Також було визначено CARS спектральні маркери ДНК та показана подібність характеристичних смуг ДНК в спектрах Раман та CARS, однак положення смуг в CARS зсунуте у низькочастотну область порівняно зі спектрами Раман, при чому в області NH-СН валентних водневопов'язаних коливань на $10\text{-}15\text{ cm}^{-1}$, а в області $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (область подвійних зав'язків C=O, C=N, C=C валентних, СН-деформаційних коливань) – зсунуті на $10\text{-}20\text{ cm}^{-1}$, що узгоджується з теоретичними розрахунками (рис 14, а). Смуги в CARS спектрі, які відсутні в Рамані, можуть бути віднесені до обертонів. CARS сигнал ДНК на графеновій підложці за умови низької концентрації ДНК (1 mg/ml) частотах валентних коливань СН 2760 cm^{-1} а на 2900 cm^{-1} перекривається з люмінесцентними та нерезонансними сигналами CARS від графену. Однак яскраві об'єкти на зображенні можна віднести до молекул ДНК.



а

б

Рис.14. а- порівняльний аналіз спектрів CARS та Раман ДНК. б – CARS зображення ДНК (1 мг/мл), нанесеної на підложку з одношарового графену на склі. ДНК відображається у вигляді яскравих видовжених об'єктів. Графен – темно-синій фон. Stokes power was 300 μW and Pump power was 170 μW

Дослідження взаємодії вуглецевих наночастинок з тиміном та аденіном.

Окрім графенових шарів, як підложки були досліджені також наночастинок 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.

Ефект SERS (підсилене поверхнею раманівське розсіювання), як і SEIRA (підсилена поверхнею інфрачервона спектроскопія) пояснюються електромагнітним механізмом та хімічним механізмом [S14, S15]. Електромагнітний механізм пов'язаний зі значним збільшенням локального електричного поля поблизу молекули і викликаний, як правило плазмонним резонансом в нанорозмірних частинках. Хімічний механізм базується на зростанні поляризованості молекули, адсорбованої на наноструктурованій поверхні та переносі заряду між досліджуваною молекулою та підсилюючою поверхнею. Здатність графена та деяких інших матеріалів збільшувати інтенсивність сигналів молекул адсорбованих на ці поверхні відома.

Для матеріалів на основі графену, внаслідок того, що поверхневий плазмон у графені знаходиться в діапазоні терагерц, а не в області видимого світла [S16], імовірно ефект підсилення більше пов'язаний з хімічним механізмом. Однак у випадку кластерів графену або оксиду графену, кисневовмісні групи можуть створювати сильне локальне електричне [S17] поле при лазерному збудженні, тому велика поляризованість графенових доменів викликає появу додаткового локального електричного поля і збільшує інтенсивність сигналів адсорбованих молекул.

Експериментально було вивчено підсилення оптичних сигналів аденіну, адсорбованого на частинки оксиду графену різного ступеня окислення та графенові флейки. Було показано, що максимальне збільшення сигналів в спектрах комбінаційного розсіяння є порядку 80 для молекули аденіну адсорбованого на оксиді графену, та 5-9 для графену, у випадку інфрачервоного поглинання це 10 раз на оксиді графену для валентних коливань C=O та 2-3 рази на графені (рис. 15 б). [4]

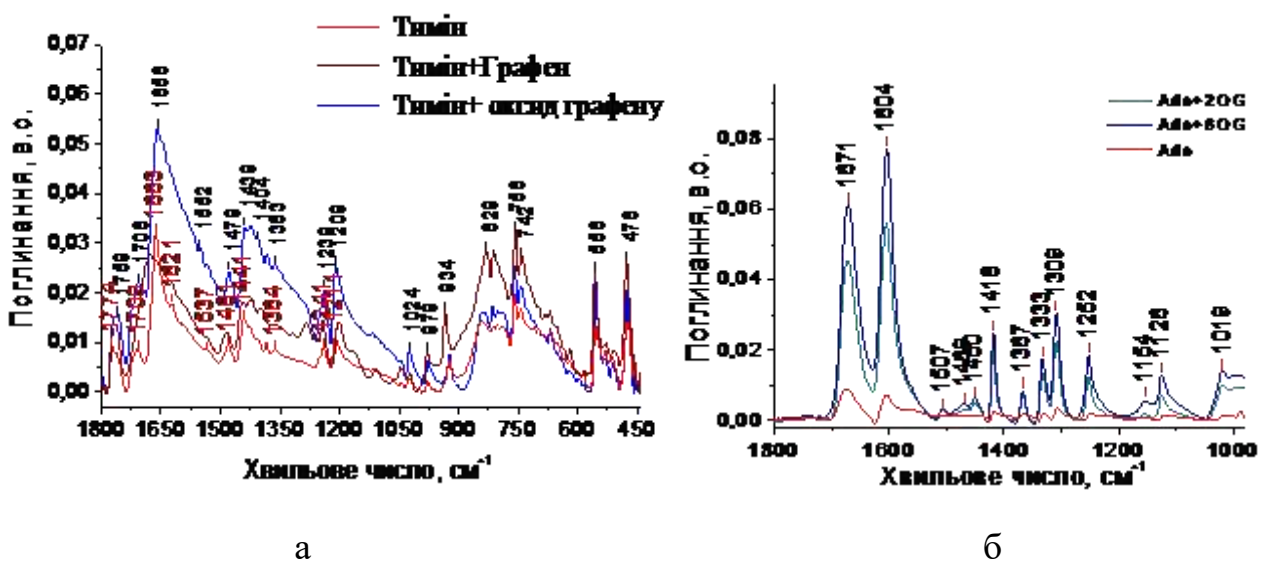


Рис.15. а - FTIR спектри тиміну та комплексу тиміну з наночастинками графену та оксиду графену. б - FTIR спектри аденіну та комплексу аденіну з наночастинками оксиду графену в різній концентрації.

У випадку комплексу Тиміну з графеном максимальний коефіцієнт підсилення зафіксовано порядку 3-4 рази в області 980-474 cm^{-1} , де знаходяться деформаційні коливання C-N, C-O, N-H молекулярних груп (рис 15 а). Загалом,

коефіцієнти підсилення для одностінних нанотрубок та графенових наночастинок мають однаковий характер, що може бути пов'язано з подібним механізмом підсилення [12].

Згідно розрахункових даних взаємодія між нуклеїновими основами та вуглецевими нанотрубками відбувається саме за рахунок π - π стекингу, при чому кільця основи розміщуються паралельно чи під невеликим кутом до поверхні нанотрубки [1]. Щодо можливих механізмів підсилення, то це локальне підсилення поля на кінцях нанотрубок, де збільшена густина поверхневого заряду індукує сильне електричне поле [27-29]. Коефіцієнти підсилення в ІЧ спектрах системи Тимін-SWNT 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 зав'язків. [22, 24, 25]

Саме процеси переносу заряду відіграють основну роль в такій системі як наночастинок CeO_{2-x} /графен. Ця нанокompозитна система цікава тим, що може стати основою для розробки газових датчиків чи каталізаторів. Для отримання нанокompозиту CeO_{2-x} /графен спочатку проводили синтез водної суспензії графенових наночастинок методом електрохімічної ексfolіації терморозширеного графіту, яку потім навантажували оксидом церію. За даними Раман спектроскопії з розрахунку співвідношення між інтенсивностями смуг I_{2D}/I_G , утворені таким чином графенові наночастинок мають кількість шарів 2-3 та відстань між ефектами 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, 46].

При реєстрації Раман спектрів нанокompозитів CeO_{2-x} /графен за умови потужності збудження більше 5 мВт реєструється F_{2g} мода CeO_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 +4. При більшій потужності збудження відбувається зменшення напівширини смуги F_{2g} та її високочастотний 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 I_D/I_G , що підтверджує процеси переносу заряду.

Вплив вуглецевих нанотрубок на конформаційний стан білка лізоциму. 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). Для експериментального дослідження процесу формування амілоїдних фібрил як правило використовують низькі (сильно кислотні) значення рН та високі температури (порядку $60-70^\circ\text{C}$), що дуже далеко від нормальних фізіологічних умов. Однак можливість утворення таких структур в живому організмі свідчить про те, що цей процес можливий і при дії інших факторів. Присутність вуглецевих нанотрубок може бути одним з таких факторів.

За даними ІЧ спектроскопії, маркерами амілоїдних фібрил є наявність характерних смуг, що відносяться до β -антипаралельної конформації лізоциму в області Амід I $1687-1695\text{ cm}^{-1}$ та $1615-1625\text{ cm}^{-1}$ (рис.7 а). Ці плечі відсутні в вихідному зразку лізоциму. Для розкладу смуги Амід I за літературними даними була вибрана наступна модель: бічні групи – 1614 cm^{-1} , β -структура паралельна – $1628-1635, 1680-1690\text{ cm}^{-1}$, β -структура антипаралельна – $1615-1625\text{ cm}^{-1}$, $1687-1695\text{ cm}^{-1}$, α -спіраль – $1649-1655\text{ cm}^{-1}$, неупорядкована структура – 1660 cm^{-1} (рис.16). 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 [42, 45].

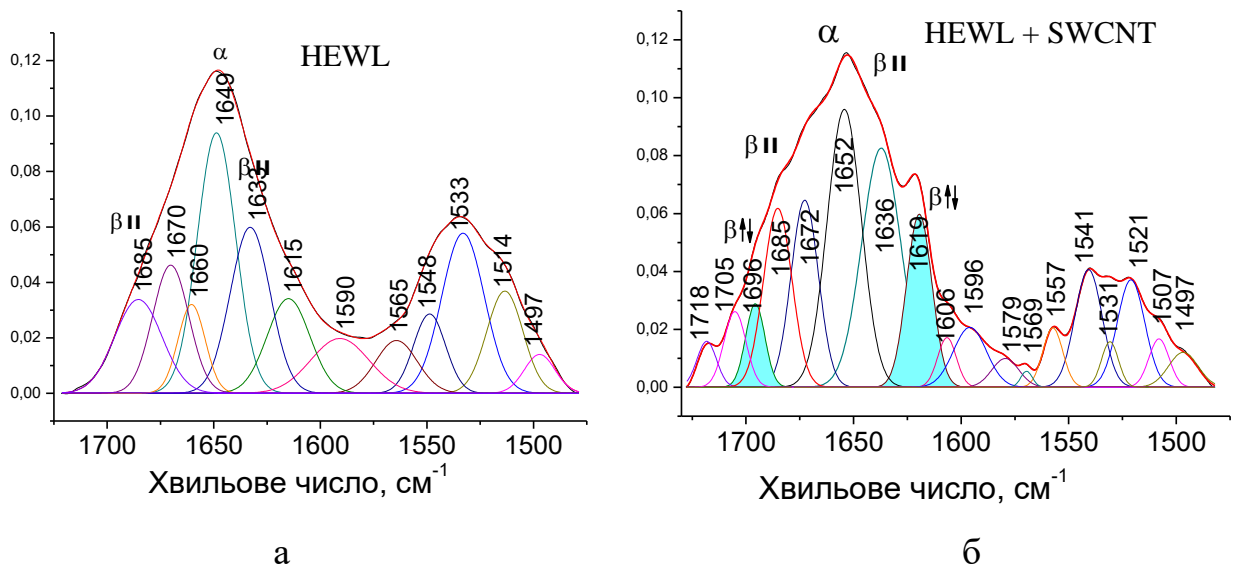


Рис.16. а – Розклад смуги Амід І лізоциму (а) та лізоциму+MWCNT, рН 5,5.

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 [19].

На конфокальному зображенні зразка лізоциму з багатостінними вуглецевими нанотрубками (рис 17 б) видно характерні видовжені структури довжиною порядку 1-100 мкм.

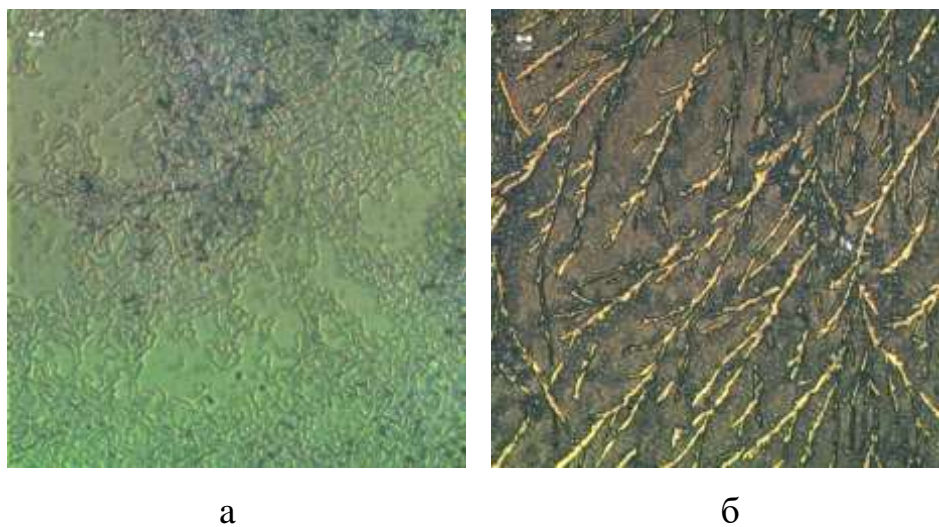


Рис.17. Конфокальні зображення лізоциму при рН=11,5 (а) та структур утворених при взаємодії лізоциму з MWCNT при рН 11,5 (б). Мітка 5 мкм.

Спектральні маркери комплексу коніуму з фулеренами C₆₀. Коніум - це препарат на рослинній основі (екстракт з Болиголову), який досліджується як можливий протипухлинний лікарський засіб. У своєму складі містить ряд алкалоїдів, основними з яких є коніїн (C₈H₁₇N), N-метилконіїн (C₉H₁₉N), γ-коніциїн (C₈H₁₅N), конгідрин (C₈H₁₇NO) і псевдоконгідрин (C₈H₁₇NO). Лише γ-коніциїн має подвійний зв'язок C=N та розглядається перспективним для утворення комплексів. З метою модифікації його терапевтичних властивостей, підвищення ефективності та зниження токсичності, запропоновано використати фулерени C₆₀, який за попередніми даними може суттєво підвищити протипухлинний потенціал коніуму [S18]. Суміш фулерену з коніумом готувалася шляхом змішування вихідних речовин в наступних співвідношеннях C₆₀ до Коніуму: 0,2мл/0,05мл, 0,2мл/0,1мл, 0,2мл/0,2мл з подальшим їх перемішуванням в ультразвуковій мішалці впродовж 30 хв при кімнатній температурі. Зразки для реєстрації ІЧ-спектрів поглинання готувалися у вигляді таблеток на основі КВг.

При утворенні комплексу коніуму з фулеренами замість двох смуг в області 1600-1700 см⁻¹ з'являється одна смуга на 1633 см⁻¹. Це може свідчити про взаємодію між C₆₀ і препаратом з утворенням нового зв'язку найімовірніше в γ-коніцеїні. В області 3500-3400 см⁻¹ так само залишається один максимум 3435 см⁻¹ (в зразках з меншою кількістю фулерену всі ці смуги дещо ослаблені, але присутні, зі збільшенням вмісту фулерену в досліджуваному зразку (0,05 мл коніуму + 0,2 мл C₆₀) вони зникають зовсім. Смуги фулерену (це чотири маркерні смуги в області 1429 см⁻¹, 1182 см⁻¹, 576 см⁻¹, 527 см⁻¹ [S19]) майже не змінюються, хоча в комплексі спостерігається деяке високочастотне зміщення смуг фулерену порядку 1-2 см⁻¹ (рис.18) [16].

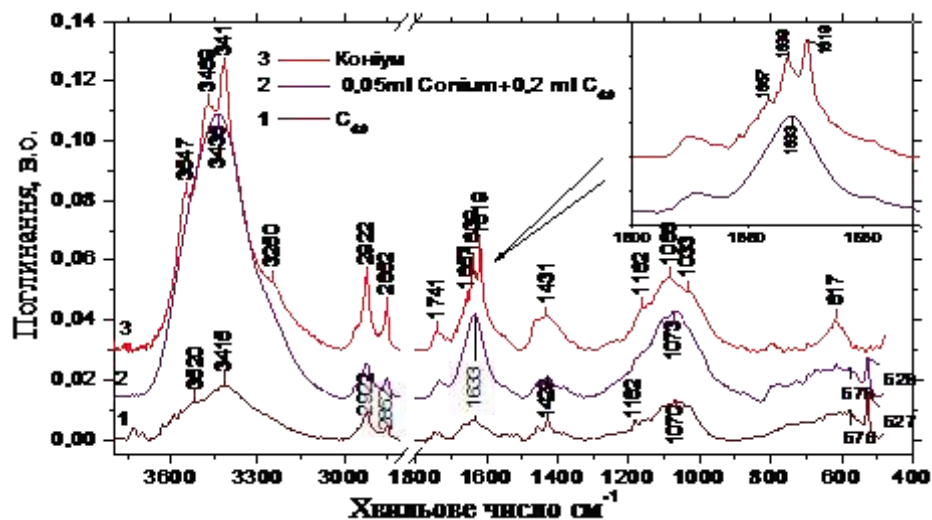


Рис. 18. ІЧ-Фур'є спектри препарату Коніум, фулерену і комплексу коніуму з фулеренами.

Наноструктуровані позолочені поверхні як платформи для підсилення оптичних сигналів в спектроскопії та мікроскопії. Окрім вуглецевих наноструктур, з метою підсилення оптичних сигналів в конфокальній мікроскопії та спектроскопії, були досліджені наноструктуровані позолочені поверхні. Була проведена послідовна методична робота для того, щоб визначити умови використання таких поверхонь для реєстрації FTIR спектрів клітин та для мікроскопічних досліджень. Для цього був проведений аналіз FTIR спектрів культури клітин СПЕВ вирощених безпосередньо на наноструктурованій позолоченій поверхні, та вирощених у скляній чашці Петрі, а потім перенесених на золоту підложку у вигляді суспензії. Основна відмінність між спектрами зразків клітин, приготованих таким способом, спостерігалася в області валентних коливань $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$, в області амідних смуг Amid I, Amid II та в області $500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. Для клітин СПЕВ, вирощених на золотій підложці зафіксовано зсув різних смуг на $4\text{-}7\text{ cm}^{-1}$ у низькочастотну область, порівняно зі зразками клітин, нанесених із суспензії (рис. 19). Смуги валентних коливань CH були зміщені на 4 cm^{-1} , Амід I - на 6 cm^{-1} ($1648, 1654\text{ cm}^{-1}$) Амід II - на 4 cm^{-1} ($1540, 1544\text{ cm}^{-1}$), а інтенсивності смуг Amid I та Amid II порівняно з Амідом A (3295 cm^{-1}) вищі для зразків нанесених із суспензії. У клітинах СПЕВ із суспензії, аналіз конформації білкових смуг показав переважний вклад α -

спіралі ($1653\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$), а положення смуги асиметричних коливань PO_2^- свідчить про ДНК в А-формі ($1237\text{-}1241\text{ cm}^{-1}$). Таким чином, було показано можливість використання наноструктурованої позолоченої підложки для аналізу ІЧ спектрів культур клітин з врахуванням можливих частотних зсувів в залежності від способу нанесення (вирощені чи нанесені).

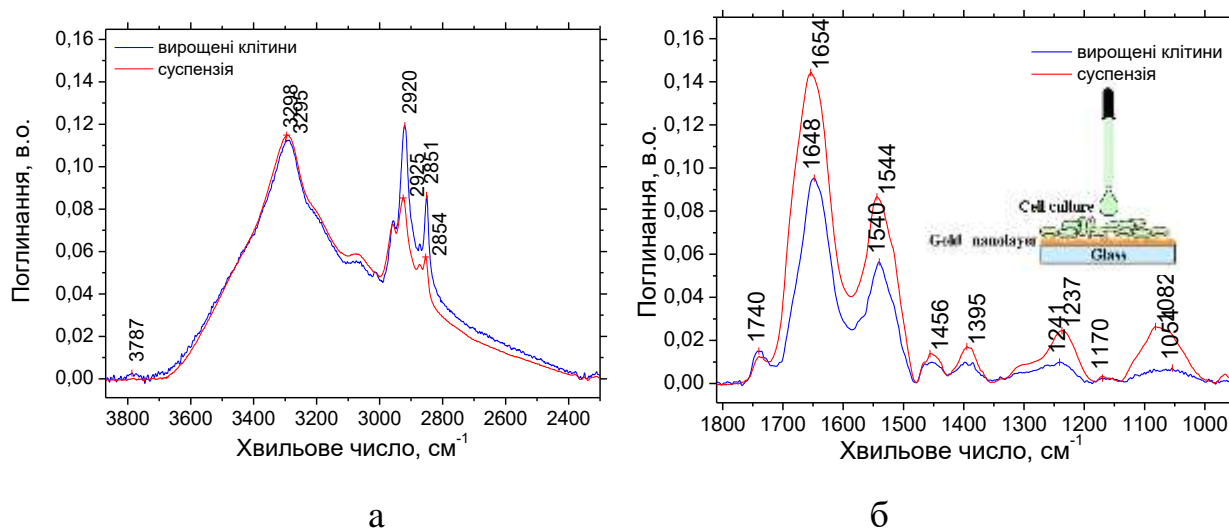


Рис. 19. FTIR спектри культури клітин СПЕВ на позолоченій наноструктурованій підложці, вирощених та нанесених із суспензії. а) спектральний діапазон $3850 - 2350\text{ m}^{-1}$, б) спектральний діапазон $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$.

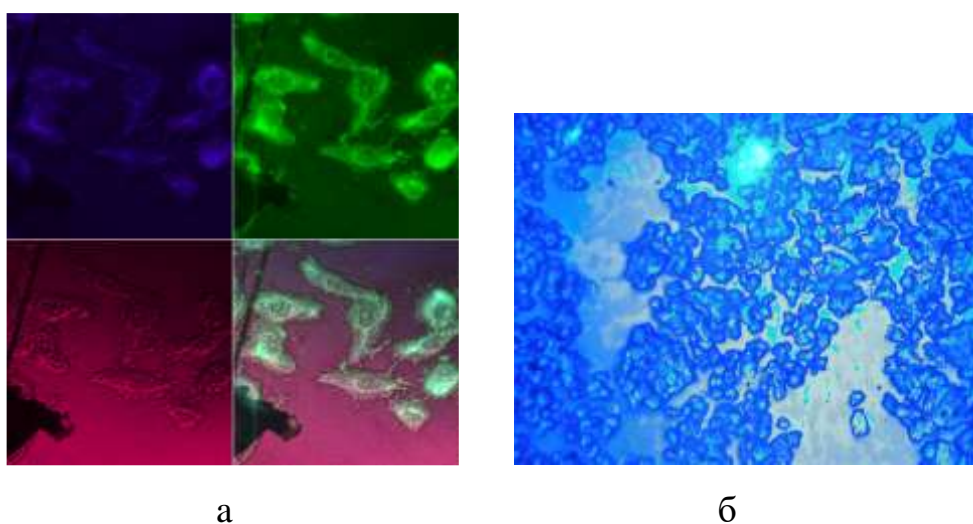


Рис. 20. а) Конфокальне зображення (мікроскоп Carl Zeiss LSM-510 META з об'єктивом Plan-Neofluar 40x/0.6 Corr, та кольоровою відеокамерою Zeiss AxioCam) культур клітин СПЕВ на позолоченій наноструктурованій підложці, зареєстровані при збудженні лазерами з довжинами хвиль $405, 488$ та 543 nm з використанням емісійних світлофільтрів ВР $420\text{-}480, \text{ ВР } 505\text{-}570$, б)

Люмінесцентне зображення культур клітин фібробластів отримані при збудженні УФ лампою UV HBO 100 з синім фільтром FSet01 [17, 23]

Було показано 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 в 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 [30, 32].

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 [11, 51]. Завдяки використанню підложок з наноструктурованого золота вдалося зареєструвати та розділити ряд характеристичних смуг. Відомо, що гексагональний графіт має D_{6h}^4 групу симетрії, незвідні представлення центру 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 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} [3]. Що стосується багатошарових нанотрубок, то вони мають подібні спектральні характеристики. Так, ми зареєстрували наступні моди 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 поглинання C-O, C-C молекулярних груп (рис. 19). Більшість смуг поглинання нанотрубок, які ми реєструємо, пов'язана з наявними дефектами в структурі, а також фіксуємо присутність кисневмісних молекулярних груп на поверхні

нанотрубок, що свідчить про процеси окислення [11]. Характеристичні смуги хлорвмісних вуглецевих нанотрубок з різних буферів (спирт і водна суспензія), подібні, однак відрізняються за інтенсивностями та мають деякі частотні зсуви 893 (912), 748 (747), 637(642), 568 (556) 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. Багатошарові нанотрубки містять дві широкі смуги в області 1599 та 1300 cm^{-1} . [2]

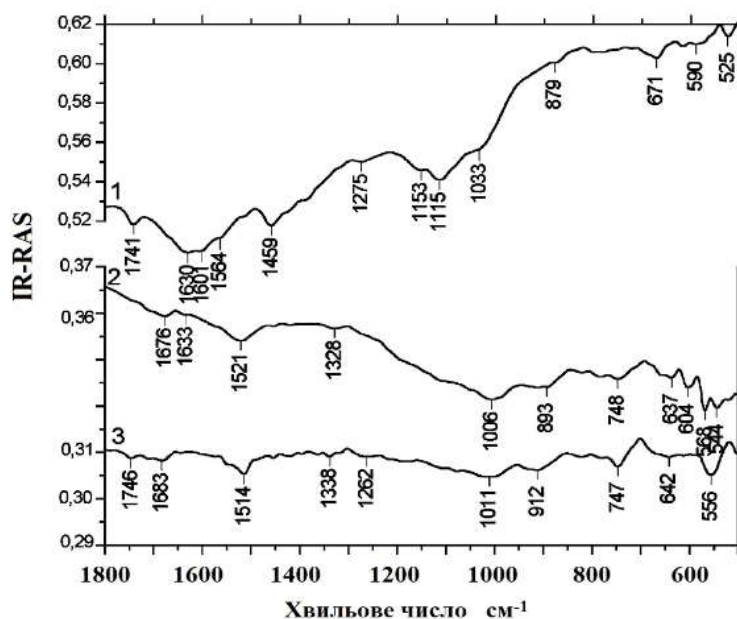


Рис.21. FTIR спектри сажі (крива 1) та хлорвмісних вуглецевих нанотрубок нанесених на наноструктуровану позолочену підложку зі спирту (крива 2) та з водної суспензії (крива 3). Спектри зареєстровані в геометрії на відбивання

У розділі 4 «Спектральні маркери ліпідів з пухлинних тканин та модельних ліпосом різного складу при взаємодії з протипухлинними препаратами» опрацьовано два протоколи отримання фосfolіпідних модельних систем ліпосомального типу в комплексі з протипухлинним препаратами оксаліплатин 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 мембрану (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 -молекулярних груп в області 2925 cm^{-1} , валентні коливання $\text{C}=\text{O}$ молекулярних груп 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 $\text{C}=\text{O}$ та $\text{N}-\text{H}$ групами фосфоліпідів та препаратів, про що свідчать зміни в області поглинання $\text{C}=\text{O}$ та PO_2^- молекулярних груп фосфоліпідів. За рахунок такої взаємодії відбувається структурування мембрани та упаковка ліпідів стає більш впорядкованою.

Для реєстрації FTIR спектрів розчини були висаджені на підложки у вигляді капель і висушені ліофільно при кімнатній температурі. Не зважаючи на те, що досліджувані протипухлинні препарати мають різну структуру, при взаємодії їх з модельними мембранами виявилися подібні тенденції.

При аналізі спектрів поглинання бачимо суттєві зміни в області поглинання валентних коливань молекулярних груп CH , що характеризують конформацію фосфоліпідних хвостів. У вихідній ліпосомі 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. Асиметрія смуги зберігається і у зразках з препаратом, адсорбованим на мембрану. (зелені криві). 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. 22).

Таким чином 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 $\text{C}=\text{O}$ та $\text{N}-\text{H}$ групами фосфоліпідів та препаратів, про що свідчать зміни в області поглинання $\text{C}=\text{O}$ та PO_2^- молекулярних груп фосфоліпідів. За рахунок такої взаємодії відбувається структурування мембрани та упаковка ліпідів стає більш впорядкованою [35-38].

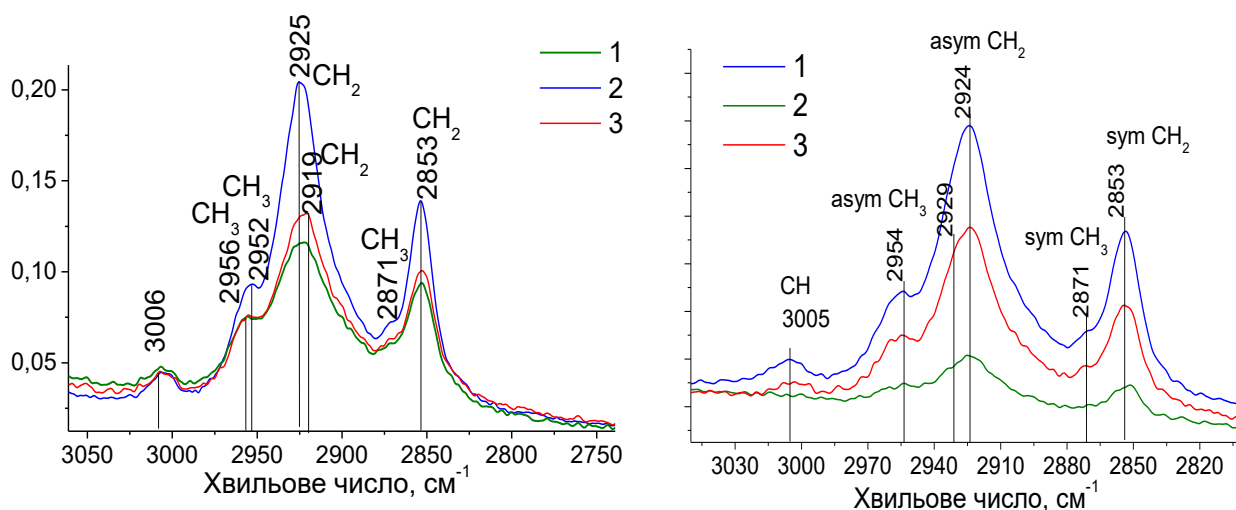


Рис.22. а - FT-IR спектри ліпосом з DOPG у комплексі з препаратом оксаліплатин в області $2800\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$: зелена крива (1) - DOPG з оксаліплатином при абсорбуванні препарату на поверхню міцели; синя крива (2) - DOPG з оксаліплатином при вбудовуванні препарату в міцелу; червона крива – контроль DOPG. б - FT-IR спектри ліпосом з DOPC у комплексі з препаратом карбоплатин в області $2800\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$: 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.

В області валентних коливань $\text{C}=\text{O}$ молекулярних груп (рис. 23) спостерігається подібна тенденція – у випадку додавання препарату в процесі утворення ліпосом інтенсивність смуги 1638 cm^{-1} зростає, в іншому випадку –

зменшується. Спостерігається також низькочастотний зсув цієї смуги. Це свідчить про те, що взаємодія між препаратами і ліпідами проходить в тому числі і через C=O групи. Крім того, у випадку додавання препарату після утворення ліпосом бачимо зростання смуги в області 1648-1646 cm^{-1} , яку можемо віднести до деформаційних коливань ОН, однак в цю область може давати вклад і C=O ліпідів та препаратів [36,37].

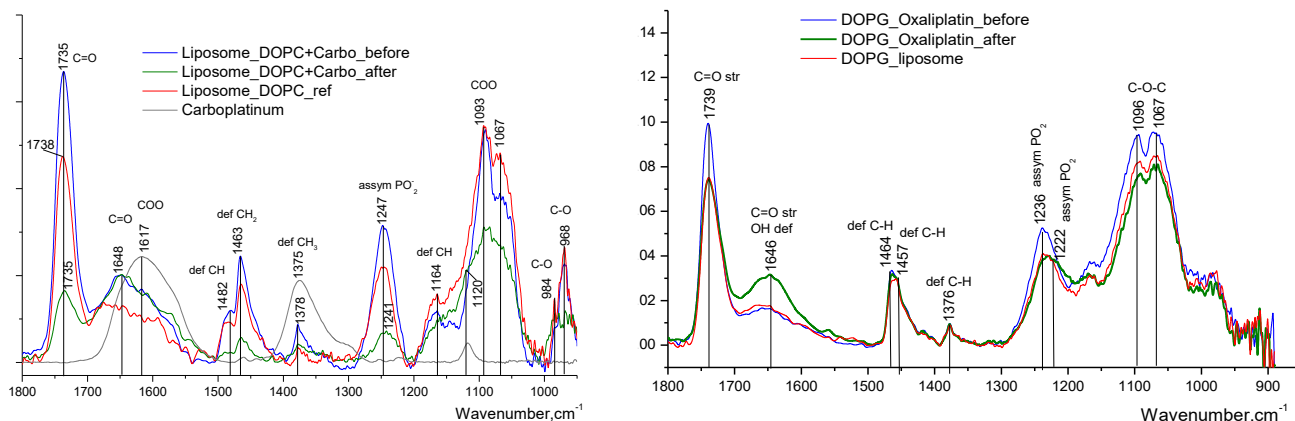


Рис. 23. FTIR спектри ліпосом з DOPC та DOPG фосфоліпідів та їх комплексів з препаратами в області 1800-900 cm^{-1}

Таблиця 2

Положення смуг поглинання ліпосом з DOPC та DOPG фосфоліпідів та їх комплексів з препаратами

ДОРС з карбоплатином при вбудов.	ДОРС з карбоплатино м при абсорб.	ДОРГ з оксаліплатино м при вбудовув.	ДОРГ з оксаліплатином при абсорб.	Віднесення
3005	3005	3006	3006	СН-кільцеві
2954	2954	2952	2956	СН ₃
2924	2925	2925	2925	СН ₂
2871	2870			СН ₃
2853	2857	2853	2853	СН ₂
1736	1735	1739	1739	С=О валентне
1649	1649	1646	1646	С=О валентне
1640	1640			деф. О-Н води
1482	1486			деформаційне СН
1463	1464	1464	1457	деформаційне СН ₂
1378	1378	1376	1376	деформаційне СН ₂
1247	1247	1236	1222	вал. асим. PO ₂ ⁻
1164				деформаційне С-Н
1090	1092	1096	1096	С-О-С
1067	1067	1067	1067	С-О
982	984			С-О
964	967			С-О

В області деформаційних коливань СН також спостерігається зміна інтенсивності без зсувів по частотах. В області симетричного коливання молекулярної групи PO_2^- спостерігається плече на 1120 cm^{-1} , що може бути віднесене до карбоплатину.

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 - $2920, 2850 \text{ cm}^{-1}$ та CH_3 - $2950, 2880, \text{ cm}^{-1}$ молекулярних груп свідчить про впорядкування у вуглеводневому ланцюгу (хвостах фосфоліпідів) - високочастотний зсув – зростання вкладу *gои*-, низькочастотний зсув – зростання вкладу *транс*-. 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.

Дослідження загальної фракції фосфоліпідів, виділених з резистентних штамів пухлинних клітин показало специфічні спектральні особливості, які раніше не вдавалося зафіксувати у інших зразках фосфоліпідів. А саме – розщеплення смуги валентних коливань $\text{C}=\text{O}$ 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 24). 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 мікрров'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 мікрров'язкості. Іншою особливістю ІЧ спектрів фосфоліпідів з резистентних штамів є високочастотний зсув положення

основних смуг поглинання порівняно з даними для чутливого штаму, а саме $1652-1645\text{ см}^{-1}$, $1549-1541\text{ см}^{-1}$, $1228-1223\text{ см}^{-1}$, $927-923\text{ см}^{-1}$, що свідчить про зростання вкладу гош-конформації [13, 15].

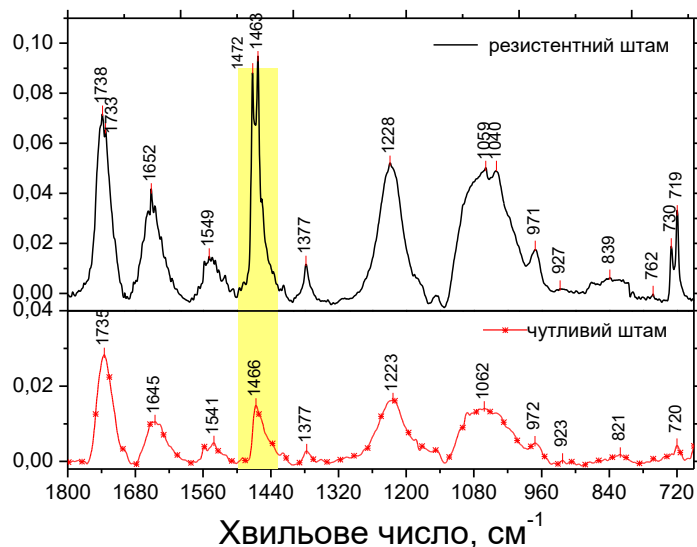


Рис.24. - FT-IR спектри поглинання загальної фракції фосфоліпідів, виділеної з резистентного(верхня крива) та чутливого (нижня крива) штаму пухлинних клітин.

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.

Спочатку був проведений спектральний аналіз та віднесення коливань плівок хітозану, колагену та желатину, що використовували як імпланти в даному експерименті (Рис. 25.). Хітозан відноситься до класу полісахаридів з мономерною ланкою N-ацетил-1,4-β-D-глюкопіранозамин. ІЧ спектр чистого (нативного) хітозану має характерні смуги поглинання в області 3400 см^{-1} , що відносяться до ОН водневопов'язаних молекулярних груп, валентні коливання

СН в області 2900-2800 cm^{-1} . Поглинання в області 1658 cm^{-1} відноситься до С=О валентних коливань разом з незначним вкладом деформаційних коливань NH_2 , а смугу в області 1584 cm^{-1} відносимо до NH_2 cm^{-1} деформаційних коливань. Область 1400-1300 cm^{-1} є характерною для деформаційних коливань молекулярних груп СН. Область 1200-800 cm^{-1} відноситься до поглинання молекулярних груп С-О, С-С. У плівці з ПЕО спостерігаємо зростання вклад валентних коливань СН в області 2800-2900 cm^{-1} та деформаційних СН в області 1400-1300 cm^{-1} , а також зменшення вкладу в області 1093 та 1036 cm^{-1} . Тому можна припустити, що взаємодія між компонентами відбувається по цих молекулярних групах [20, 21].

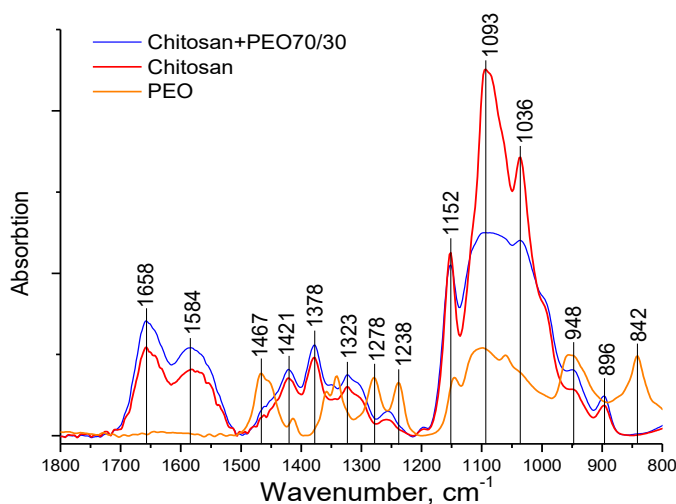


Рис. 25. FTIR спектри ПЕО, хітозану та хітозану з ПЕО.

Були визначені також спектральні маркери тканини ТМО без оперативного втручання (контроль) (Рис.26). Для цієї групи зразків зрізи тканин були відібрані з протилежної від травми півкулі головного мозку. Віднесення коливань зроблено за роботами [S20-S26]. Смуги амід А і амід В та їх зміни при утворенні водневого зв'язку є важливими для дослідження, вони відповідають валентним коливанням груп NH (зв'язаних водневим зв'язком) і проявляються в області 3300 і 3100 cm^{-1} відповідно. Плече в області 3400 cm^{-1} відповідає валентним водневопов'язаним коливанням молекулярних груп ОН. Ці смуги є конформаційно чутливими та чутливими до зміни вологості досліджуваних зразків, зокрема при переході нативний колаген – денатурований колаген відбувається низькочастотний зсув максимуму. Положення смуг валентних

коливань CH_2 (2921 та 2851 cm^{-1}) та CH_3 (2956 та 2873 cm^{-1}) є дуже стабільними, однак може різко змінюватись їх відносна інтенсивності, що може свідчити про перебудови у вторинній структурі досліджуваних зразків.

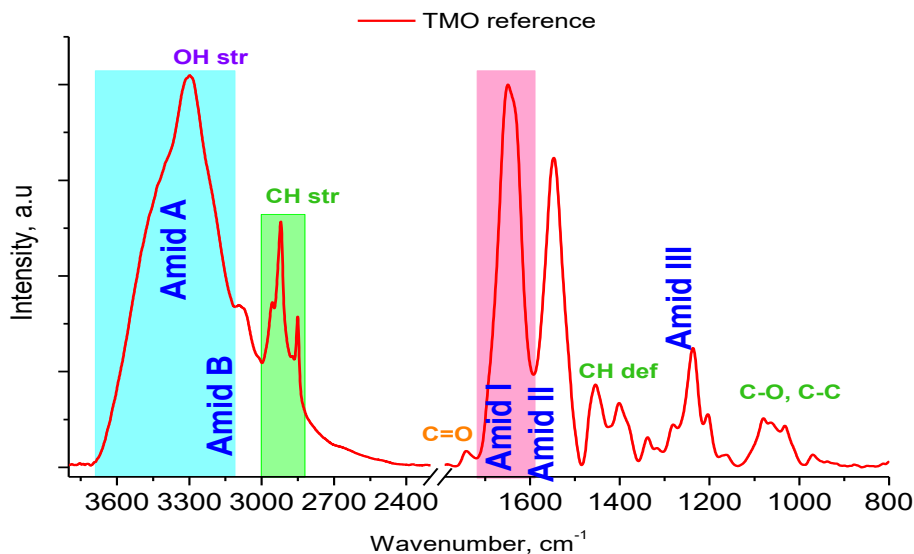


Рис.26. FTIR спектри тканини твердої мозкової оболонки (ТМО) (контроль).

Смуга Амід I теж є конформаційно чутливою. В цю область вносять вклад коливання валентні $\text{C}=\text{O}$ (80%), валентні $\text{C}-\text{N}$ (10%), деформаційні $\text{N}-\text{H}$ (10%) При утворенні водневого зв'язку положення смуги Амід I зміщується у низькочастотну область, а саме з $1670-1700 \text{ cm}^{-1}$, що відповідають коливанням вільних груп $\text{C}=\text{O}$, до $1630-1680 \text{ cm}^{-1}$. Внаслідок специфічної взаємодії між сусідніми пептидними групами Амід I розщеплюється на кілька складових з різними частотами та інтенсивностями. Методом розкладу цієї смуги на компоненти можна розрахувати вклад різних конформацій білка. Конформаційний склад смуги Амід I можна визначити як [S21]: α -спіраль (1650 cm^{-1}), β -шари ($1679, 1626 \text{ cm}^{-1}$), β -повороти ($1,691 1669 \text{ cm}^{-1}$), потрійна спіраль (1637 cm^{-1}), бокові ланцюги (1608 cm^{-1}), неупорядкована структура (1647 cm^{-1}).

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 CH 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 I в рубцевій тканині за рахунок зменшення вкладу плеча в області 1632 cm^{-1} , що відповідає за потрійну спіраль. Відносна інтенсивність Амиду I до Амиду II в контролі складає 1,25- 1,31, а в рубцевій тканині 1,54-1,72. Смуга Амід III 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.27) [48,49].

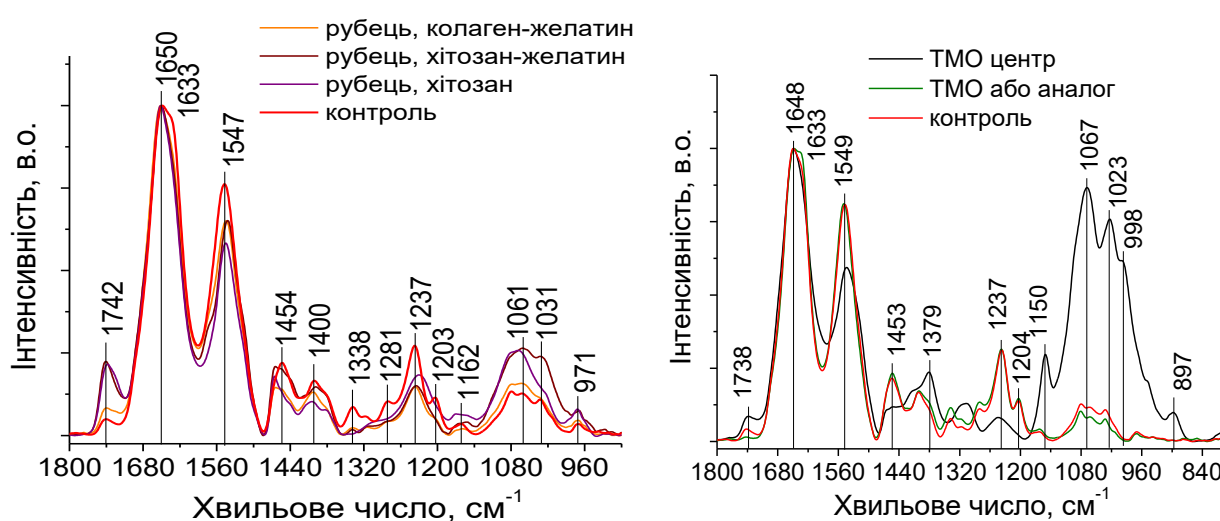


Рис.27. а – FTIR спектри рубцевої тканини, б - FTIR спектри тканини регенеруючої ТМО та інтактної ТМО (контроль), 6 тижнів після лікування з застосуванням плівки хітозан +ПЕО 70/30.

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.

Висновки, зроблені за даними ІЧ спектроскопії корелюють з зображеннями, отриманими методом конфокальної мікроскопії (рис 28). 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. 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 свічення в зеленій і червоній області. Результати роботи дозволили зробити діагностику тканин після проведено терапії та запропонувати найбільш оптимальні протоколи лікування [52].

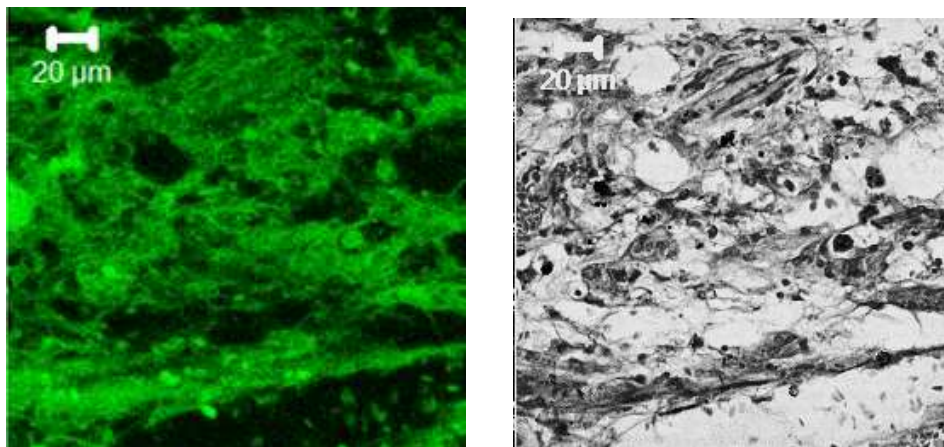


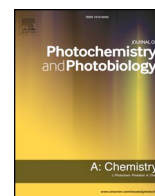
Рис.28. Конфокальні зображення зрізів тканин регенеруючої ТМО через 3 тижні після лікування з застосуванням плівки на основі колагену.

Проведено аналіз вторинної структури колагену у складі тканини Ахіллового сухожилля в процесі її регенерації з застосування клітинної терапії для лікування дегенеративного пошкодження сухожиль. Конформаційний аналіз проводився за смугою поглинання Амід І. Для розкладу смуги на компоненти була використана наступна модель: 1695 см^{-1} віднесли до антипаралельних β -шарів, 1680 см^{-1} до β -поворотів та неупорядкованої форми, 1660 см^{-1} до потрійної

спіралі колагену, 1649 см^{-1} до β -поворотів та неупорядкованої форми, 1630 до β -шарів. Віднесення коливань проводили за роботами [SS]. Аналіз усіх отриманих спектроскопічних даних доводить, що застосування культур АМСК та АФ значно покращує процеси реабілітації в тканині сухожилля, ураженого дегенеративним ушкодженням. Практично повне відновлення вторинної структури колагену, зменшення внеску ліпідних фракцій та збільшення води в міжклітинному матриксі відбуваються на 45 -й день після його введення. Введення АЗТП дає порівняно хороший результат на 7 -й день спостереження, але через обмежений час активності виявляється недостатнім для повного відновлення тканини сухожилля, ураженої дегенеративними змінами. Тому результати проведеного дослідження довели, що інфрачервона спектроскопія є високоінформативним методом для аналізу специфіки молекулярної структури тканини ахіллового сухожилля та міжклітинного матриксу, а також конформаційного аналізу колагену. Аутологічні мезенхімальні стовбурові клітини та аутологічні фібробласти для терапії дегенеративного пошкодження Ахіллового сухожилля найефективніше сприяє регенерації структурної організації тканини сухожилля вже 7 та 21 днів, та з практично повною регенерацією структури тканини сухожилля на 45-й день спостереження. Застосування плазми, багатой тромбоцитами, характеризується менш вираженим регенеративним ефектом. У контрольній групі тварин (без лікування) патологічний процес мав тенденцію до прогресування [26].

Розділ 1

2D наночастинки нітриду (BN) бору та дисульфиду вольфраму (WS₂) як платформа для дослідження культур клітин та біомолекул



Investigation by CARS microscopy of squalene and boron nitride as a precursor material for drug delivery carrier

Andrej Dementjev^{a,*}, Olena Gnatiuk^b, Danielis Rutkauskas^a, Renata Karpicz^a, Marijonas Tutkus^a, Galina Dovbeshko^b

^a Center for Physical Sciences and Technology, Sauletekio ave. 3, Vilnius, LT, 10257, Vilnius, Lithuania

^b Institute of Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Nauki Ave, Kyiv, 03680, Ukraine



ARTICLE INFO

Keywords:

Squalene
Boron nitride
Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy
Drug carrier

ABSTRACT

Recently organic squalene and inorganic boron nitride have been considered as precursor materials for drug delivery systems. Drug carriers introduced in the organism need to be monitored to control the drug release within the body. Squalene or boron nitride-based prodrugs usually form nanoparticles or micelles which can be monitored by optical microscopy utilizing fluorescence light originating from drug molecules or dye molecules intentionally introduced for imaging purposes. Coherent anti-stokes Raman scattering (CARS) microscopy is an alternative approach to visualize such particles without labeling. This label-free imaging, based on molecular vibrations is a promising technique in cases where the dye staining cannot be used because of its toxicity or bio-incompatibility. In this paper, we present the CARS microspectroscopy study of squalene and boron nitride materials providing their spectra and images within the fingerprint region.

1. Introduction

The delivery of bio-active compounds or pharmaceuticals to the site of disease in the body is determined by the chemistry, morphology, and mobility of the drug delivery systems (DDS). In this regard, considerable attention is paid to the means to track the drug carriers. To perform tracking, among the various imaging methods, a number of optical microscopy techniques have been developed and successfully employed. The most popular technique is fluorescence microscopy [3,4] used to visualize DDSs labelled with fluorescent markers [1,2]. Fluorescent labels such as dyes [5], gold nanoparticles [6], and quantum dots [7] enabled monitoring the trajectory and final localization of the drug carriers in the target tissue. However, labelling of DDS with fluorescent labels can be cumbersome. Furthermore, it is known that photobleaching, phototoxicity limit the use of some of the fluorescent labels as a contrast agent in bio-imaging. It is therefore highly desirable to have other means of DDSs imaging without the use of extraneous labels.

Raman scattering - inelastic scattering of light on molecular vibrations, is an alternative physical phenomenon that can be employed to image the biological samples. The main advantage of Raman imaging is that it does not require labeling of the sample because the intrinsic molecular vibrations of a sample are exploited as a contrast mechanism. It should be mentioned that two types of Raman microscopy are used –

spontaneous and stimulated Raman scattering. Both of these techniques have been successfully applied in the field of drug delivery [8–10]. For imaging of bio-samples the stimulated Raman scattering is preferable because it provides fast imaging thanks to the much stronger response compared to spontaneous Raman scattering [11,12]. In this work, we tested a coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscope as an imaging tool to visualize squalene and boron nitride materials as precursors for DDS.

Recently organic squalene [13] and inorganic boron nitride (BN) [14] were introduced as materials for DDS due to their high bio-compatibility. Squalene, covalently bonded to therapeutic agent forms a pro-drug and functions as a ready-to-use drug carrier without the need of other materials [15]. Moreover, these squalene-drug bio-conjugates tend to form self-assembled nanoparticles [16,17] that can be visualized after administration. In vivo, nanoparticles made of the squalene-gemcitabine bioconjugate have been monitored utilizing fluorescence-based Förster resonance energy transfer (FRET) [18]. Despite its effectiveness, FRET involves the use of dyes and therefore suffers from disadvantages inherent to fluorescence markers. Label-free identification of intracellular squalene using CARS microscopy was recently published [19] illustrating effectiveness of the CARS method in detecting small amounts of squalene.

Application of BN for DDS has been recently studied theoretically

* Corresponding author.

E-mail address: andrej.dementjev@ftmc.lt (A. Dementjev).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.111863>

Received 24 January 2019; Received in revised form 14 May 2019; Accepted 15 May 2019

Available online 16 May 2019

1010-6030/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Raman bands of squalene.

ν , cm^{-1}	Vibrational mode
1281 m	$\delta(\text{CH}_3)$, $\tau(\text{CH}_2)$
1330 ms	$\delta(\text{CH}_3)$, $\omega(\text{CH}_2)$, $\omega_s(\text{CH})$
1382 s	$\delta(\text{CH}_3)$, $\omega_s(\text{CH})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$
1451 ms	$\delta(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CH}_2)$
1668 vvs	$\nu(\text{C}=\text{C})$

[20] and experimentally [21] and was summarized by Gianni Ciofani [22]. BN as a material for nanomedicine is usually used in the form of nanotubes [23,24]. In the cellular tissue, such nanoparticles of BN were monitored utilizing fluorescent labeling with quantum dots [25]. To our knowledge, the imaging of boron nitride nanoparticles using Raman scattering as a contrast mechanism has not yet been realized. In the current work, we present CARS micro-spectroscopic study of boron nitride providing CARS-spectra and images.

2. Materials and methods

We have prepared the squalene-water emulsion containing squalene vesicles according to the previously published protocol [26]. Briefly, during this procedure we have prepared 500 μL of 1 mg/mL squalene solution in the buffer (33 mM Trizma-base (Sigma-Aldrich), 66 mM K-Acetate (Carl-Roth, Germany), pH = 7.8, at 25 °C). Next, we have vortexed this solution for 5 min at a moderate speed (~1500 rpm). This results in the formation of polydispersed squalene vesicle solution. Before the imaging, this solution of vesicles was diluted 100 times in the same buffer and incubated on a glass coverslip (170 μm thickness, # 1.5, Menzel-Glasser, Germany) coated with poly-L-lysine (P4707-50ML, Sigma-Aldrich).

Sample of BN particles was prepared by depositing a powder (255475-50 G, Sigma-Aldrich) on coverslip surface. A sample of water solution of BN was prepared in 0.1 mg/mL concentration and dropped on the coverslip glass.

For imaging experiment a home-built CARS microscope [27] with a simple and compact laser source (EKSPLA Ltd.) was used. Briefly, the laser is a picosecond frequency doubled Nd:YVO₄ pump laser with the pulse repetition rate of 1 MHz equipped with a traveling wave optical parametric generator (OPG) which enables probing the 700–4500 cm^{-1} range of the vibration frequencies. For CARS implementation a signal radiation from the OPG (6 ps) and fundamental wavelength (1064 nm) were used as Pump (ω_p) and Stokes (ω_s) excitation beams, respectively. The spectroscopy study in the fingerprint region was carried out within the range from 1200 to 1700 cm^{-1} . For this, the OPG was tuned from 942 to 900 nm and the resulting CARS signal from 845 to 782 nm was detected. A typical spectral recording rate of 5 cm^{-1} per second enabled data acquisition time of approximately two minutes. The exciting light was focused on the sample with an oil-immersion objective (Olympus,

Plan Apochrom., 60X, NA 1.42). In the forward detection scheme (F-CARS), the light was collected by another objective with NA 0.4. For polarization sensitive detection (P-CARS) the linear polarization of Stokes beam was turned 72 degrees with respect to Pump beam utilizing half-wave and quarter-wave plates. An analyzer in the detection branch was inserted to suppress the non-resonant contribution in P-CARS. Long-pass (cut-off 860 nm) and short-pass (cut-off 780 nm) filters were used to spectrally separate the CARS signal. The CARS signal was detected with the avalanche photodiode (SPCM-AQRH-14, Perkin Elmer), connected to a multifunctional PCI board (7833R, National Instruments). A piezo scanning system (P-517.3CL, Physik Instrumente GmbH & Co) was used for raster-scanning of the sample. Excitation powers of 0.5 mW and 2.5 mW were used for pump and Stokes beams, respectively. The scanning, data processing and laser wavelength detuning were controlled from a computer.

3. Results and discussion

3.1. Squalene

According to the published results [28], squalene has several Raman bands within fingerprint region exhibiting relatively high intensity (Table 1).

The most pronounced 1668 cm^{-1} band associated with double carbon-carbon bond is a tentative candidate for a detectable CARS signal from a relatively low quantity of squalene. Previously, it was shown [19] that squalene is reliably detected by hyperspectral CARS microscopy at a concentration existing in the unicellular microalgae. In the current study, we prepared samples from liquid squalene (S3625-10ML, Sigma-Aldrich) and measured their F-CARS response (Fig. 1a).

The spectrum contains one distinct peak at 1660 cm^{-1} and several strongly distorted bands near 1375 and 1425 cm^{-1} . The corresponding P-CARS spectrum (Fig. 1b) exhibits four resonant bands at 1276, 1320, 1379, 1428, 1666 cm^{-1} corresponding reasonably well to the frequencies presented in Table 1, indicating therefore that these bands originate from the squalene vibrations.

The intensity of the strongest 1660 cm^{-1} band was expected to exceed the non-resonant background sufficiently and thus enable high-quality imaging. Images of squalene vesicles obtained in F-CARS and P-CARS modes are presented in Fig. 2. The F-CARS amplitude of the signal at frequencies of on/off-resonance (at 1660 cm^{-1} /1695 cm^{-1}) was 2250 and 600 counts, respectively, while the water-associated background intensity was 250 counts. These signal levels correspond to the spectral contrast of 3.8:1 and to the image contrast of 9:1. In P-CARS both spectral and image contrast are much higher: 1:10 and 1:30, respectively. However, although the F-CARS yields lower contrast, its absolute signal is 30 times higher than in P-CARS. Therefore, the F-CARS is preferable for the detection of small particles. On the other hand, despite weaker (30 times) signal the P-CARS detection may be instrumental in cases where other constituents containing C=C bond

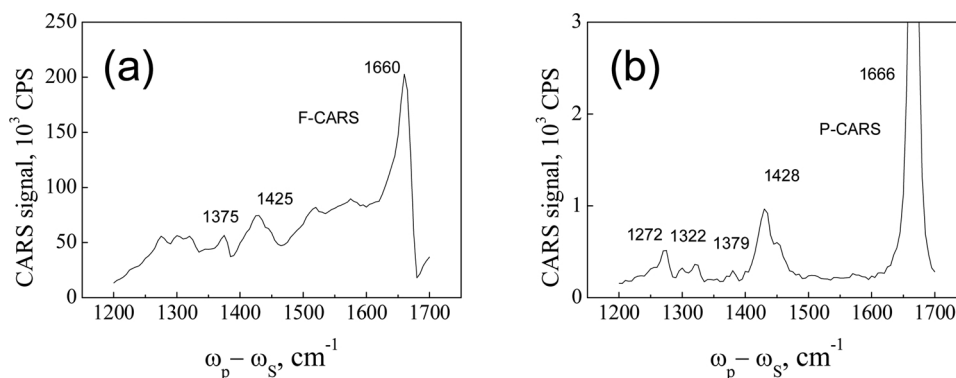


Fig. 1. CARS spectra of liquid squalene. F-CARS (a), P-CARS (b).

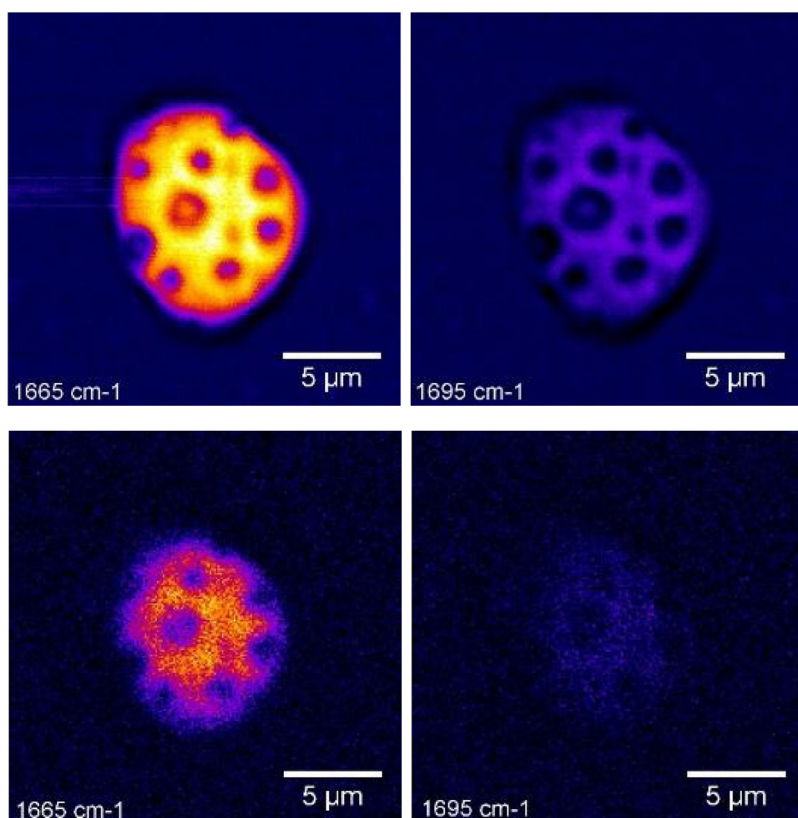


Fig. 2. F-CARS (top) and P-CARS (bottom) images of squalene vesicle at 1665 cm^{-1} (left)/ 1695 cm^{-1} (right). The vesicle is about $9\text{ }\mu\text{m}$ in diameter and contains several cavities. At the resonance wavenumber of 1665 cm^{-1} the contrasts of the images are 1:9 for F-CARS (top left) and 1:10 for P-CARS (bottom left), respectively. With respect to non-resonance image (bottom right) the P-CARS (bottom left) has a high spectral selectivity, but low absolute amplitude. While the F-CARS being high in amplitude has a low spectral selectivity (top left vs top right).

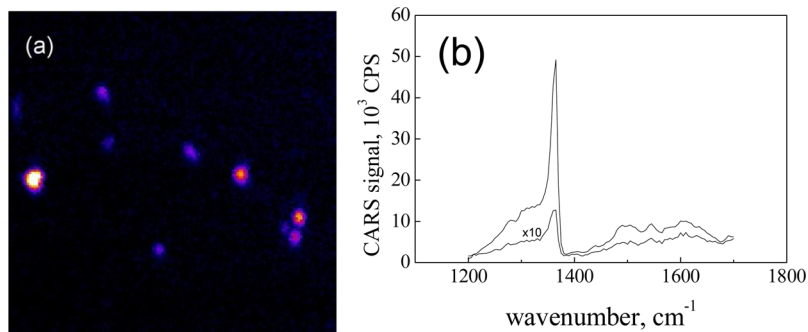


Fig. 3. F-CARS image of boron nitride powder deposited on cover glass (a), image size $15 \times 15\text{ }\mu\text{m}$, acquisition time 20 s. F-CARS spectra measured at spots of moderate and minor brightness (b).

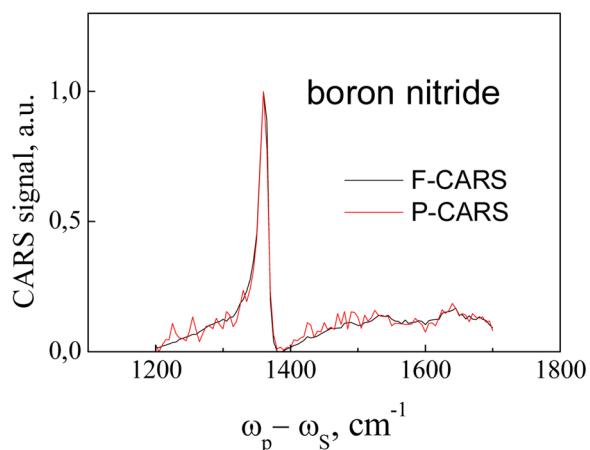


Fig. 4. Normalized spectra of boron nitride particle measured under F-CARS and P-CARS schemes.

contribute to the 1660 cm^{-1} band [19].

At present we have shown, that individual squalene vesicles of several microns in size can be reliably visualized using F-CARS. However, it should be noted that coexistence of other components containing C=C with the same resonance frequency may significantly limit the ability to separate squalene from the surroundings.

3.2. Boron nitride

Boron nitride has a single Raman-active vibrational mode in the fingerprint region [29]. Denoted as E_{2g} , this phonon mode is caused by B–N bond vibration with an energy of 1364 cm^{-1} . In this work, we probed two types of samples: a powder and a water solution of boron nitride. F-CARS image of powder deposited on a glass coverslip surface is presented in Fig. 3a.

The acquired image exhibits several bright spots of about $0.4\text{ }\mu\text{m}$ in diameter, which is close to the size of the point spread function (measured FWHM $\sim 0.4\text{ }\mu\text{m}$) of the optical system in use. It can therefore be concluded that individual BN particles are of sub-diffractive size, and

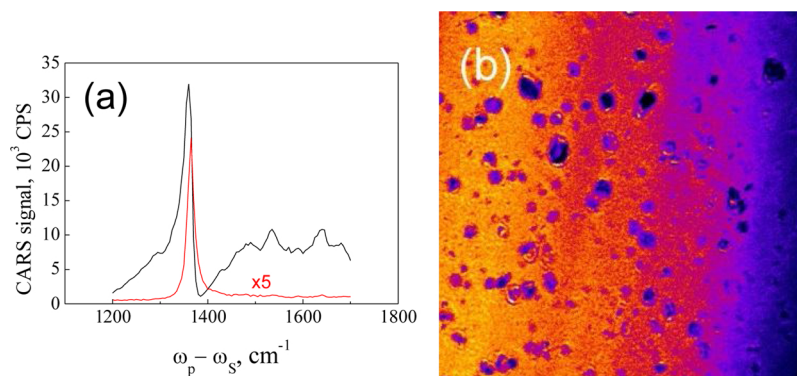


Fig. 5. F-, P-CARS spectra of water solution of boron nitride (a). Image of the drop of a water solution of boron nitride (b). Image size 20 x 20 μm , acquisition time 20 s.

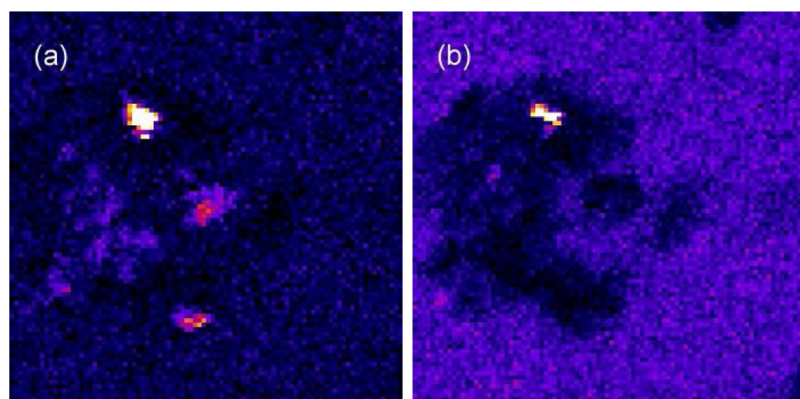
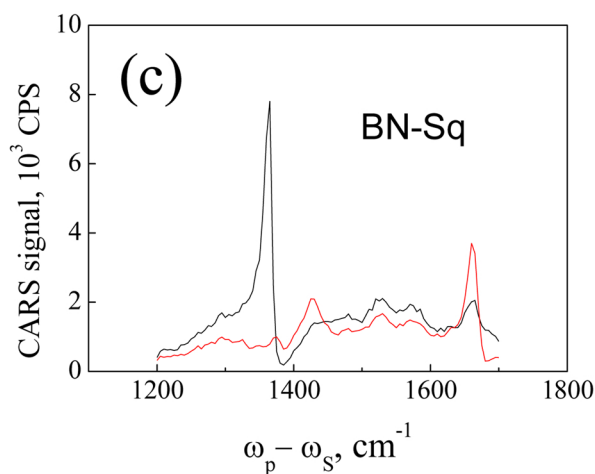


Fig. 6. Squalene-Boron nitride suspension drop deposited between cover slips. Images recorded at 1365 cm^{-1} (a) and 1660 cm^{-1} (b) wavenumber. Image size is 20 x 20 μm , acquisition time 20 s. CARS spectra measured at a bright spot in (a) belongs to BN (black) and measured in the right-bottom corner belongs to squalene (red).



their actual size is associated with the observed particles' brightness. To identify BN, the F-CARS spectra at the spots of moderate and minor brightness were measured (Fig. 3b). The obtained spectra contain a single resonance peak with the maximum at 1365 cm^{-1} , indicative of BN. Thus, it can be concluded that nano-sized BN particles are reliably detected by CARS microscopy. It has to be noted that smaller particles exhibit approximately equal amplitudes of resonance and non-resonance contributions in the fingerprint region. The latter originates from the coverslip glass substrate, on which BN particles are attached. It should be noted that F-CARS and P-CARS spectra are very similar, containing the same contribution of non-resonant background (Fig. 4). Therefore the P-CARS does not yield considerable advantages in this context.

A sample of a water solution of boron nitride excludes the

contribution to CARS from the coverslip glass and emulates the environment which is closer to the conditions of biological tissue. Fig. 5a shows the scanned image of the edge of a drop of BN solution. The drop contains a large number of cavities which are visible in the image and are attributed to impurities. Nevertheless, a solution of BN gives excellent contrast with other substances. Spectroscopy measurements show that for this sample, F-CARS and P-CARS spectra differ radically (Fig. 5b). In the F-CARS the non-resonance contribution of the water solution is comparable with the resonance contribution at 1365 cm^{-1} . In turn, the P-CARS, possessing 7 times weaker signal, completely suppresses non-resonant background revealing Raman-like peak at 1365 cm^{-1} . Therefore in P-CARS the losses in intensity are not so significant and allow using it for visualization purposes.

For both, powder and solution of boron nitride the F-CARS, despite

its non-resonant background, being more intense in amplitude than the P-CARS, gives acceptable spectral selectivity and image contrast. Thus it is ideal for visualization of small particles.

3.3. Mixed squalene-boron nitride sample

Finally, to test whether CARS microscopy is suitable for visualization of small quantities of the materials of interest, we mixed boron nitride powder with squalene (1 mg BN in 1 mL squalene). This mixture was deposited in approximately 3 μm thick layer between two coverslips and visualized using our CARS setup.

Fig. 6 shows F-CARS images of the suspension in which a cluster of BN particles surrounded by squalene is distinguishable. In the image recorded at boron nitride resonance (1365 cm^{-1}) bright spots belonging to BN particles have a larger amplitude than the amplitude of the surrounding squalene. At the squalene resonance frequency of 1660 cm^{-1} the image is inverted, showing bright areas filled by squalene and the dark area of BN particles. This example demonstrates the high chemical selectivity of CARS imaging enabling discrimination of different chemicals. Fig. 6c presents F-CARS spectra of a BN particle and squalene filling obtained in the image (Fig. 6a, b) thus confirming the earlier assignments. In sum, these observations demonstrate the ability of the CARS microscopy to visualize the structure of the multi-component object.

Organic squalene and inorganic boron nitride are well studied as promising materials for drug delivery. Typically, drug carriers based on these materials are stained with fluorescent dyes and visualized using a fluorescence microscope. However, not always such materials can be loaded with fluorescent contrast agent due to bio-incompatibility issues. Here, we demonstrated that CARS microscopy works well as a label-free imaging technique enabling visualization of such particles without staining. Both F-CARS and P-CARS schemes of the signal acquisition allowed high contrast imaging of squalene and boron nitride. Spectroscopic measurements have confirmed the assignment of the obtained images to squalene and boron nitride structures. Sub-micron particles of boron nitride could be detected with satisfactory contrast. This result demonstrates that CARS technology can be used to visualize nano-sized structures. In the future, we plan to apply CARS to track squalene or boron nitride-based drug carriers within a living cell. We also believe that this technique can be extended for other materials that are utilized for drug delivery systems.

Acknowledgment

Research Council of Lithuania Foundation (S-LU-18-6).

References

- [1] J.W. Lichtman, J.A. Conchello, *Fluorescence microscopy*, *Nat. Methods* 2 (2005) 910–919.
- [2] S.W. Paddock, *Principles and practices of laser scanning confocal microscopy*, *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 127–149.
- [3] V. Ntziachristos, *Fluorescence molecular imaging*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 (2006) 1–33.
- [4] O.S. Wolfbeis, *An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging*, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4743–4768.
- [5] Y. Pu, R. Tang, J.P. Xue, W.B. Wang, B.G. Xu, S. Achilefu, *Synthesis of dye conjugates to visualize the cancer cells using fluorescence microscopy*, *Appl. Opt.* 53 (2014) 2345–2351.
- [6] P. Huang, J. Lin, S. Wang, Z. Zhou, Z. Li, Z. Wang, C. Zhang, X. Yue, G. Niu, M. Yang, D. Cui, X. Chen, *Photosensitizer-conjugated silica-coated gold nanoclusters for fluorescence imaging-guided photodynamic therapy*, *Biomaterials* 34 (2013) 4643e4654.
- [7] X.H. Gao, S.M. Nie, *Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots*, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 371–373.
- [8] Geoffrey P.S. Smith, Cushla M. McGovern, Sara J. Fraser, Keith C. Gordon, *Raman imaging of drug delivery systems*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 89 (2015) 21–41.
- [9] Birthe Kanna, Herman L. Offerhaus, Maïke Windbergsa, Cees Otto, *Raman microscopy for cellular investigations — from single cell imaging to drug carrier uptake visualization*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 89 (2015) 71–90.
- [10] Andrew L. Fussell, Floris Grasmeijer, Henderik W. Frijlink, Anne H. de Boer, Herman L. Offerhaus, *CARS microscopy as a tool for studying the distribution of micronised drugs in adhesive mixtures for inhalation*, *J. Raman Spectrosc.* 45 (2014) 495–500.
- [11] Luis G. Rodriguez, Stephen J. Lockett, Gary R. Holtom, *Coherent anti-stokes raman scattering microscopy: a biological review*, *Cytom. Part A* 69A (2006) 779–791.
- [12] Chi Zhang, Delong Zhang, Ji-Xin Cheng, *Coherent Raman scattering microscopy in biology and medicine*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 17 (2015) 415–445.
- [13] Jiao Feng, Sinda Lepetre-Mouelhi, Patrick Couvreur, *Design, preparation and characterization of modular squalene-based nanosystems for controlled drug release*, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 2849.
- [14] Gianni Ciofani, *Potential applications of boron nitride nanotubes as drug delivery systems*, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (8) (2010) 889–893.
- [15] Dunja Sobot, Simona Mura, Semen O. Yesylevskyy, Laura Dalbin, Fanny Cayre, Guillaume Bort, Julie Mouglin, Didier Desmaële, Sinda Lepetre-Mouelhi, Gregory Pieters, Bohdan Andreiuk, Andrey S. Klymchenko, Jean-Louis Paul, Christophe Ramseyer & Patrick Couvreur, *Conjugation of squalene to gemcitabine as unique approach exploiting endogenous lipoproteins for drug delivery*, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15678.
- [16] P. Couvreur, et al., *Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue*, *Small* 4 (2008) 247–253.
- [17] Elise Lepeltier, Claudie Bourgaux, Véronique Rosilio, Jacques H. Poupaert, Florian Meneau, Fatima Zouhiri, Sinda Lepêtre-Mouelhi, Didier Desmaële, Patrick Couvreur, *Self-assembly of squalene-based nucleolipids: relating the chemical structure of the bioconjugates to the architecture of the nanoparticles*, *Langmuir* 29 (2013) 14795–14803.
- [18] Fanny Cayre, Simona Mura, Bohdan Andreiuk, Dunja Sobot, Sandrine Gouzou, Didier Desmaële, Andrey S. Klymchenko, Patrick Couvreur, *In vivo FRET imaging to predict the risk associated with hepatic accumulation of squalene-based prodrug nanoparticles*, *Adv. Healthcare Mater.* (2017) 1700830.
- [19] Kei Ishitsuka, Masahiro Koide, Masaki Yoshida, Hiroki Segawa, Philippe Leproux, Vincent Couderc Makoto M. Watanabe, Hideaki Kano, *Identification of intracellular squalene in living algae, *Aurantiochytrium mangrovei* with hyperspectral coherent anti-Stokes Raman microscopy using a sub-nanosecond supercontinuum laser source*, *J. Raman Spectrosc.* 48 (2017) 8–15.
- [20] Hong Xu, Qi Wang, Guohong Fan, Xiangfeng Chu, *Theoretical study of boron nitride nanotubes as drug delivery vehicles of some anticancer drugs*, *Theor. Chem. Acc.* 137 (104) (2018).
- [21] O.P. Gnatyuk, G.I. Dovbeshko, A. Yershov, S.O. Karakhim, O. Ilchenko, O. Yu. Posudievsky, *2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker and drug delivery system with protection properties*, *R. Soc. Chem. Adv.* 8 (2018) 30404–30411.
- [22] Gianni Ciofani, *Potential applications of boron nitride nanotubes as drug delivery systems*, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (8) (2010) 889–893.
- [23] G. Ciofani, V. Raffa, A. Menciassi, A. Cuschieri, *Boron nitride nanotubes: an innovative tool for nanomedicine*, *Nano Today* 4 (2009) 8–10.
- [24] T.H. Ferreira, P. Silva, R. Santos, E. Sousa, *A novel synthesis route to produce boron nitride nanotubes for bioapplications*, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 2 (2011) 426–434.
- [25] G. Ciofani, V. Raffa, A. Menciassi, P. Dario, *Preparation of boron nitride nanotubes aqueous dispersions for biological applications*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8 (2008) 6223–6231.
- [26] Marijonas Tutkus, Parveen Akhtar, Jevgenij Chmeliov, Fanni Görföl, Gediminas Trinkunas, Petar H. Lambrev, Leonas Valkunas, *Fluorescence microscopy of single liposomes with incorporated pigment-proteins*, *Langmuir* 34 (47) (2018) 14410–14418.
- [27] A. Dementjev, V. Gulbinas, A. Serbenta, M. Kaucikas, G. Niaura, *Coherent anti-stokes raman scattering spectroscopy/microscope based on a widely tunable laser source*, *J. Mod. Opt.* 57 (2010) 503–509.
- [28] Hye Jin Chun, Taylor L. Weiss, Timothy P. Devarenne, Jaan Laane, *Vibrational spectra and DFT calculations of squalene*, *J. Mol. Struct.* 1032 (2013) 203–206.
- [29] S. Reich, A.C. Ferrari, R. Arenal, A. Loiseau, I. Bello, J. Robertson, *Resonant Raman scattering in cubic and hexagonal boron nitride*, *Phys. Rev. B* 71 (2019) 205201.



Cite this: *RSC Adv.*, 2018, 8, 30404

2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker and drug delivery system with protection properties†

O. P. Gnatyuk,^{ID}*^a G. I. Dovbeshko,^{ID}*^a A. Yershov,^{ID}^b S. O. Karakhim,^c
 O. Ilchenko^{ID}^d and O. Yu. Posudievsky^{ID}^e

An application of 2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker, weak luminescent marker and anticancer drug (doxorubicin, DOX) delivery system with protection properties was studied for the LNCaP strains of cancer cells using FTIR and Raman spectroscopy for analysing the cancer cells, cells with BN, the cancer cells with DOX, and the cancer cells with BN nanoparticles loaded by DOX. Study of IR absorption and Raman spectra of the LNCaP strains of cancer cells incubated with 2D-BN nanoparticles for 1 hour showed that the 2D-BN nanoparticles could pass through the cell membrane and localize inside the membrane or close to the membrane in the cytoplasm of the cells. We registered the spectra of the disturbed lipids during the DOX-2D-BN passing through the membrane. After incubation for 2 hours and more, spectral changes in other structural components of the cell (nuclei, cytoplasm, mitochondria) can be registered. Confocal microscopy showed that a gold nanostructured support enhances the fluorescence of the cancer cells with 2D-BN as well as that with DOX, however the double action of 2D-BN and DOX on the cancer cells aggravates the emission property of the studied system. An MTT test showed that the toxicity of DOX on the 2D-BN nanoparticles is less than that on the reference cells, and at the same time the efficiency of the DOX action on the cancer cells does not change.

Received 13th June 2018
 Accepted 13th August 2018

DOI: 10.1039/c8ra05085f

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Despite the significant progress achieved in the treatment of various forms of cancer, the problem of acquired resistance of tumor cells due to the use of chemotherapeutic agents is still relevant, as is the issue of developing drug delivery systems that could improve the efficiency and specificity of therapeutic cancer treatment methods.

The possibility of using nanoparticles to solve these problems has been studied for many years, and the spectrum of the nanoparticles is the most extensive – from metal (Au, Cd, Fe) to nonmetallic (Fe₂O₃, SiO₂, TiO₂, Al₂O₃) and carbon (fullerenes, graphene, nanotubes).^{1–3} However, these numerous studies did not lead to significant progress; many developments still remain at the stage of laboratory research and are not being

introduced into clinical practice. The main obstacle is the high cytotoxicity of nanoparticles, both in relation to tumour cells and normal healthy cells. When penetrating through cell membranes, nanoparticles can form complexes with biological molecules (proteins and DNA, as well as with the cell membrane itself), thus impeding normal functioning of the biomolecules.

Biological nanoparticles (DNA and RNA molecules, viruses, enzymes, ribosomes, vesicles *etc.*) as well as complexes of organic polymers with medicinal preparations have proven to be better. But there are limitations associated with the possible change in the structure of the medication, and therefore the change in its properties and efficacy in this case.

An active study of graphene has stimulated interest in research of other kinds of 2D nanomaterials, a unique place among which is possessed by boron nitride (BN). The uniqueness of BN monolayer is that it may have a crystal structure similar to that of graphene, as well as similar physical properties, with the exception of the band gap width – BN is a typical dielectric with a band gap of ~5 eV. This is due to the ionic nature of this material. At the same time, its physical properties and intrinsic luminescence have characteristics similar (close) to those of diamond nanoparticles.⁴ The absence of absorption in the visible range could be one of the advantages of this material for biological applications.

For example, hexagonal BN, h-BN, in contrast to the above-mentioned nanoparticles, did not exhibit cytotoxicity to a number of cell cultures, as shown in several studies. In

^aDepartment of Physics of Biological Systems, Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Prospekt Nauki 46, Kiev 03039, Ukraine. E-mail: hrysantemka@gmail.com

^bInstitute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Zabolotnogo Str. 150, Kyiv 03680, Ukraine

^cPalladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Leontovycha Street 9, Kyiv 01601, Ukraine

^dDepartment of Micro & Nanotechnology, Technical University of Denmark, Denmark. E-mail: olil@nanotech.dtu.dk

^eL.V. Pizarzhevsky Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Prospekt Nauki 31, Kyiv 03028, Ukraine

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8ra05085f



particular, BN nanoparticles of 100–200 nm size are not cytotoxic to the cell line of osteoblasts,⁵ while BN nanotubes do not exhibit cytotoxicity to the neuroblastoma and are able to penetrate into the cell *via* phagocytosis.^{6,7} Also, attempts to use BN nanoparticles for the development of drug delivery systems⁸ and antitumour therapy^{9,10} are described literature.^{11,12}

BN is isoelectronic to carbon and can form a number of allotropic modifications – hexagonal graphite-like and cubic diamond-shaped – according to two types of hybridization – sp^2 corresponding to hexagonal and rhombohedral crystal lattices, and sp^3 corresponding to cubic and wurtzite-like ones. The hexagonal and cubic type of BN lattice are analogues of graphite and diamond, respectively. During synthesis of 2D-BN nanoparticles by chemical vapor deposition, different allotropic modifications can be formed such as amorphous and cubic BN, additional impurities could be included too. This synthesis procedure itself requires the use of high temperatures, pressures and significant energy costs.^{13–15}

In the present paper we propose the use of 2D-BN nanoparticles prepared by liquid exfoliation of the preliminary solvent-free mechanochemically delaminated bulk h-BN. Our objective was to study the biophysical properties of the prepared nanoparticles, to test their cytotoxicity and to analyze their effect on the cell components, as well as to define the possibility of their use as fluorescent markers for insertion of non-luminescent antitumour drugs into the cell that would point on the location of 2D-BN as well indicate a place of location of the cell component near the 2D-BN. The aim of the work was also the visualization of the presence of antitumour drug (*e.g.* doxorubicin) in the cells without additional use of dyes and other fluorescent labels. We used infrared spectroscopy to evaluate molecular interaction of 2D-BN nanoparticles with the cell components (lipids, proteins, DNA *etc.*) and Raman spectroscopy for visualization of BN nanoparticles inside the cell indicated on the component cell.

Preparation of 2D-BN nanoparticles

A dry mixture of 50 mg of h-BN (#10043-11-5, Alfa Aesar) and 2 g of NaCl (#S7653, Aldrich) used as the delamination agent was mechanochemically treated in an argon atmosphere using an agate grinding bowl of a planetary ball mill Pulverisette 6 (Fritsch) at a rotation rate of 500 rpm for 1 h. The weight ratio of reactants to milling media was about 1 : 20. The delamination agent was removed by washing with water, and the obtained product – nanostructured h-BN (nh-BN) – was dried in vacuum at 60 °C. The yield of nh-BN was 40 mg.¹⁶ The preparation of 2D-BN was carried out in water by ultrasonic disintegration (Sonopuls 2070) of nh-BN for 1 h. The resulting dispersions were purified by centrifugation (5430, Eppendorf) at 2000 rpm during 1.5 h. 2D-BN nanoparticles were characterized by a series of mutually complimentary experimental methods and the obtained data are summarized in ESI (Fig. S1–S6†).

Preparation of 2D-BN:DOX

2D-BN:DOX was prepared by mixing 12.5 μL of 2D-BN dispersion (0.3 mg mL^{-1}) with 5 μL of DOX solution, and 82.5 μL of

phosphate buffer, subsequent incubation during for 24 hours, centrifugation at 5500 rpm for 90 min and 10 000 rpm for 1 min. The volume of solution was restored by adding 100 μL of phosphate buffer. We tested optical absorbance at $\lambda = 496 \text{ nm}$ with Nanodrop 2000 (ThermoScientific, USA). The DOX optical absorbance was equal to 0.052 and that of 2D-BN:DOX to 0.019. For the estimation of cytotoxicity of 2D-BN:DOX (for reference and cancer cells). Comparative spectral characterization of 2D-BN and 2D-BN:DOX is shown in Fig. S7 and S8.†

Cell treatment with 2D-BN nanoparticles and sample preparation for vibrational spectroscopy

To study the effect of 2D-BN nanoparticles on living cells, the model line of LNCaP tumour cells was used. They were adherent epithelial cells of adenocarcinoma of human prostate gland, which are sensitive to androgen. It was believed that LNCaP reproduce the early stages of prostate cancer development.¹⁷ Their approximate size was 10–12 μm in an unattached state, and it could be larger when attached to the culture surface. The human prostate adenocarcinoma LNCaP cell line was kindly provided by Dr V. Kashuba, (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden).

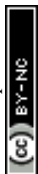
Two sets of experiments were carried out to analyze the effect of 2D-BN nanoparticles on the LNCaP cells. Within the first one, different times of the cells incubation with the nanoparticles (from one to ten hours) were used to detect time dependency, and the second one was based on one-day incubation. LNCaP cells were grown in a 6-cup plate in amount of 3×10^5 cells per cup (designated as “treated” and “reference” ones), and cultured under standard conditions (DMEM, 10% FBS, in 5% CO_2 atmosphere). The following day, 2D-BN aqueous dispersion was added to the cups (the final concentration in the nutrient medium was 0.3 mg mL^{-1}), and after the appropriate incubation time (the final cell number in the cell was 1×10^6) the nutrient medium was removed, washed twice with $1 \times \text{PBS}$, and then the cells were disconnected from the culture plastics during 5 min by a trypsin–EDTA mixture.

The cells were harvested by centrifugation in 1.5 mL test tubes at 13 000 rpm for 1 min followed by removal of supernatant, subsequent double washing with PBS (Sigma-Aldrich) and drying of the precipitate in vacuum. At the end of the cell treatment with 2D-BN, each cup of the tablet contained approximately 1×10^6 cells (3–4 mg).

2D-BN cytotoxicity assay and visualization of their in-cell location using dyes

For the cytotoxicity assay of 2D-BN nanoparticles, NIH3T3 mouse culture fibroblasts (as a model of normal non-tumour cells) were used. The mouse embryonic fibroblast NIH3T3 cell line was kindly provided also by Dr V. Kashuba, (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden).

The cells were scattered in a 96-well plate the day before their treatment in the amount of 2000 cells per well. An aqueous solution of 2D-BN was added to achieve a final concentration of 1, 2, 5, 10, 20, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The cell viability was measured using the MTT test (Fig. 1) as the percentage of 2D-



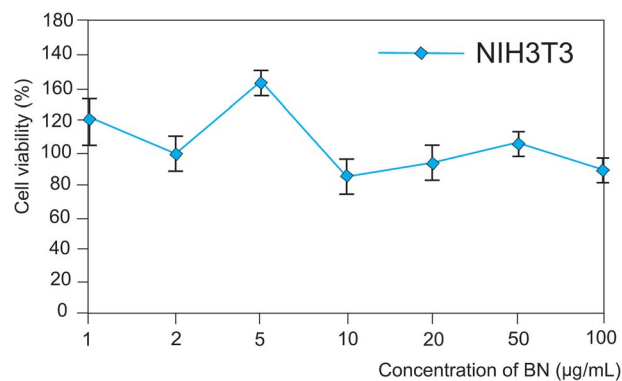


Fig. 1 The vitality of 2D-BN treated NIH3T3 cells.

BN-treated live cells against reference cells. Standard deviations were measured for each three repetitions.

To evaluate the effect of 2D-BN nanoparticles on cytotoxicity of the anticancer drug doxorubicin (Dox), the NIH3T3 (normal) or the LNCaP (tumour) cells were dispersed in a 96-well plates the day before their 2D-BN treatment in amount of 2000 cells per well. The 2D-BN:Dox complex (with optical absorption of 0.019–0.021) and Dox solution (12.5 mg mL⁻¹, optical absorption 0.020) of equivalent optical absorption were added per 200 mL of cell medium (DMEM) in the following amounts: 3.2, 8, 16 and 32 µL for achieving the final Dox concentration of 0.2, 0.5, 1 and 2 mg mL⁻¹. Cell viability was measured by MTT-test (Fig. 2) as a percentage of live cells treated with complex 2D-BN:Dox or pure Dox against reference cells. Standard deviations were measured for each three repetitions.

As could be seen in Fig. 2, 2D-BN does not inhibit the vitality of NIH3T3 cells, and an increase in its concentration in the nutrient medium up to 100 mg mL⁻¹ did not lead to an increase in the proportion of dead cells compared to the untreated ones. Similar studies carried out on the cell treated with 2D-BN:Dox complex allowed us to found out that addition of 2D-BN:Dox did not change the viability of the NIH3T3 and the LNCaP cells compared to the addition of the similar amounts of pure Dox. This allowed us to conclude that 2D-BN is non-toxic to cells and does not affect the toxicity of Dox within the prepared 2D-BN:Dox complexes in accord with Fig. S9.†

Vibrational spectroscopy investigation of 2D-BN nanoparticles interaction with LNCaP tumour cells

Raman and FTIR measurements. The FTIR spectra were collected in the 380–5300 cm⁻¹ region with an IFS-66 Bruker instrument. Deconvolution and decomposition of the bands was performed using Opus-4.0 program.

The Raman spectra of cell were obtained by home-made Raman instrument with verification of its ability for RS registration.¹⁸ In this study was used two lasers (532 and 785 nm) with power on sample about 10 mW µm⁻² at 532 nm and 20 mW µm⁻² at 785 nm. Dry objective Olympus Plan-Apochromat 40×/0.95 in inverted microscope configuration was used. Laser was focused on the cells placed directly on the CaF₂ surface.

Astigmatism-free Princeton Instruments Schmidt-Czerny-Turner spectrograph IsoPlane SCT-320 was used in our Raman system. Spectrograph has focal length 320 mm with aperture ratio f/4.6. Measurements were carried out on grating with 600 g mm⁻¹ (blaze angle at 860 nm), which provide spectral resolution about 5 cm⁻¹ in the ranges 100–3800 cm⁻¹ from laser wavelength 532 nm and 2.5 cm⁻¹ in the range 200–1900 cm⁻¹ from laser wavelength 785 nm. Spectra were collected with nitrogen cooled CCD PyLoN 400BR eXcelon (Princeton Instruments). Wavelength and spectral sensitivity calibration of the Raman system was done with neon lamp and calibrated 45 W quartz tungsten halogen lamp (model 63358 from Newport Corp.), respectively. Detailed description of the Raman system setup was described in (ref. 18). Wavelength calibration was done automatically during start of the system software and after every switch of gratings in the spectrograph. Spectral sensitivity calibration was done periodically every month. For the data analysis we used WiRE3.4 software.¹⁸

Time dependence of 2D-BN nanoparticles interaction with LNCaP tumour cells. To study the time dependence of 2D-BN nanoparticles interaction with tumour cells, we have carried out a set of experiments with different times of the cultivation of the tumour cells treated with nanoparticles. The cells were cultivated for 1, 2 and 10 h; the reference sample without nanoparticles was cultivated for 2 h and the corresponding FTIR data are presented in Fig. 3. The most interesting results were obtained for the sample after 1 h cultivation. As one could see from Fig. 3, upon the 2D-BN treatment, a significant

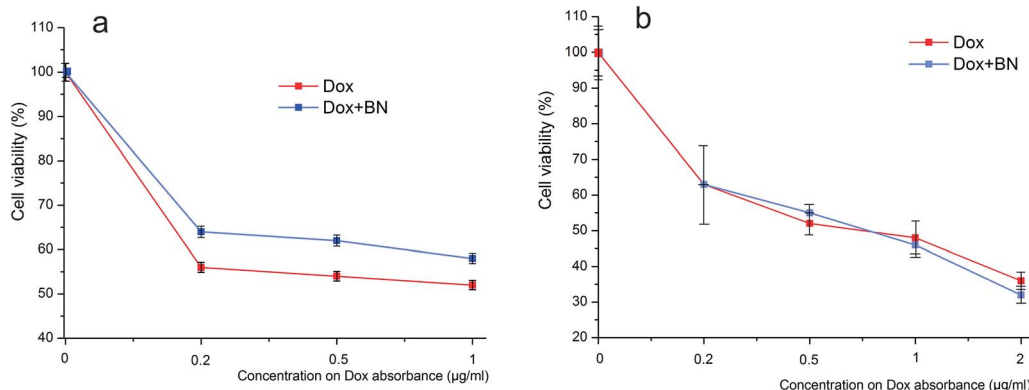


Fig. 2 The vitality of 2D-BN:Dox treated NIH3T3 (a) and LNCaP (b) cells.



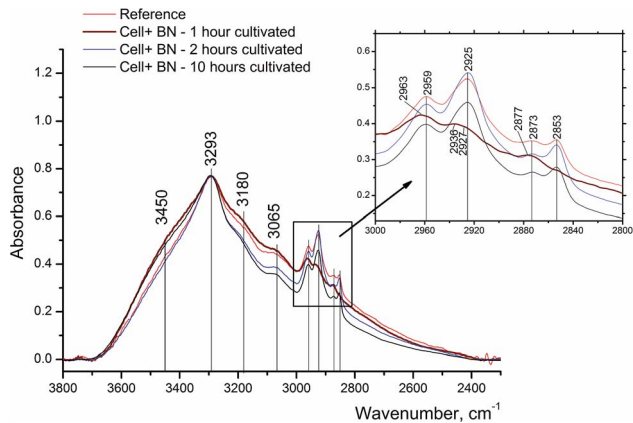


Fig. 3 FTIR absorption spectra of LNCaP cell cultures without (reference) and after treatment with 2D-BN nanoparticles using 1, 2 and 10 h incubation time in the region of 2400–3600 cm^{-1} .

redistribution in the intensity of phospholipid CH_3 (the absorption bands at 2959 and 2871 cm^{-1}) and CH_2 (the absorption bands at 2927 and 2853 cm^{-1}) groups in favour of the first is observed. In the control sample and in the samples after 2 and 10 hours of cultivation the absorbance of CH_2 groups was predominating.^{19–25}

Such intensity redistribution suggests an effective interaction of 2D-BN nanoparticles with cell membranes, whereby the spectral changes take place at the first hour after the cell treatment. In the FTIR spectrum of 2D-BN:LNCaP cells after 1 h of cultivation (Fig. 4) some changes in the amide vibration region are observed consisting in the low-frequency shift of Amide I maximum from 1654 cm^{-1} in the reference (α -spiral with signs of disordered form) to 1650 cm^{-1} (α -spiral proteins), and the shoulder emergence at 1639 cm^{-1} (β -conformation of proteins).^{19,20} The shoulder emergence at about 1120 cm^{-1} , which could be attributed to C–O and P–O–C phospholipid vibration, indicates the interaction of the nanoparticles with the cell membrane.^{21–25}

Thus, it could be concluded that the 2D-BN nanoparticles penetrate through the membranes into the cells very fast (within 1 hour), thereby altering significantly the cell membrane structure.

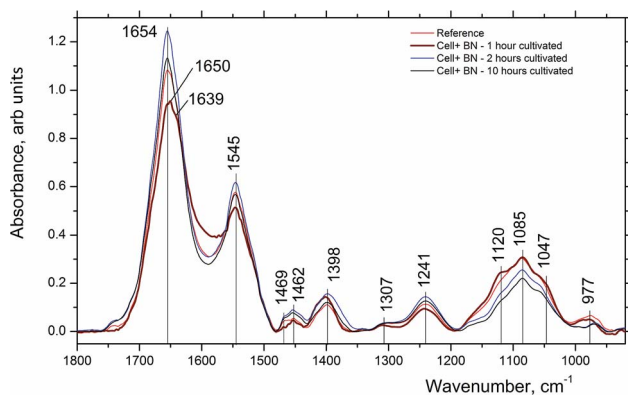


Fig. 4 FTIR absorption spectra of LNCaP cell cultures without (reference) and after treatment with 2D-BN nanoparticles for 1, 2 and 10 h incubation time in the region of 1000–1800 cm^{-1} .

Study of 2D-BN nanoparticles interaction with LNCaP tumour cells using Raman spectroscopy. After analyzing a number of micro-Raman spectra of the studied cells, we came to the conclusion that the position and intensity of the observed Raman bands essentially depends on the spectrum registration spot, which could be the cell nucleus, cytoplasm, cellular organelles (in particular, mitochondria), cell membranes, *etc.* When the 2D-BN nanoparticle occurs at the registration spot, the intensity of the Raman bands increased in 2–5 times, and the spectrum as a whole was recorded better. This could be due to reflection of the exciting radiation from the nanoparticle and its subsequent passage through the corresponding cellular organelle. In other words, the 2D-BN nanoparticles served as a reflecting mirror that multiply directs the excitatory light onto the cell components. Thus, when the 2D-BN nanoparticle after cell treatment is located on the cell membrane, then the registered Raman spectrum will be a characteristic of the membrane. Therefore it is difficult to reproduce these spectra, since it is difficult to direct the exciting light onto a certain cell organelle.

However, if one choose the right incubation time, it could be possible to estimate where the nanoparticles would be located. For example, the Raman spectrum of the LNCaP cell cultures enhanced by the 2D-BN nanoparticles located near or at the cell membrane is presented in Fig. 5. The sample was a thick drop of 2D-BN-treated LNCaP cells suspension at the time of scanning the cells deep into Z axis. It is seen from the figure that the main contribution to the spectrum is given by lipids and membrane proteins, with large advantage of the bands from the lipid fractions, cholesterol in particular. The Raman bands at 616, 1306, 1437, 1605 and 1656 cm^{-1} could be attributed to lipids, and the band at 1001 cm^{-1} probably refers to free phenyl alanine.²⁶

Other Raman spectra, which were reproduced with lesser changes when taken at different points of the sample, looked significantly different as compared to the above mentioned spectrum (Fig. 6). The band at 1657 cm^{-1} has a complex structure, since besides lipids and proteins, the DNA of the cell nucleus could also contribute to this band. This is evidenced by the appearance of the band at 1338 cm^{-1} and other bands in its vicinity, assigned to adenine, as well as new band at 780 cm^{-1} .

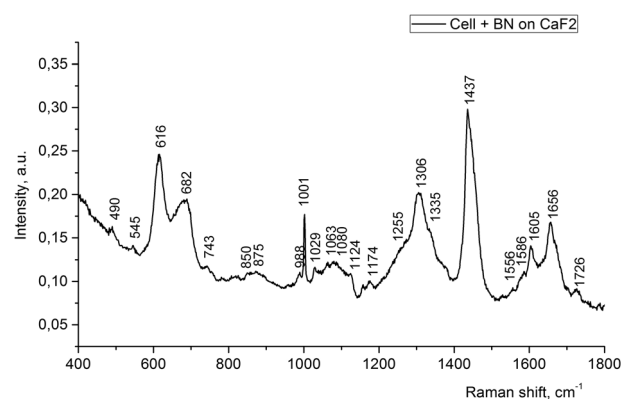


Fig. 5 Raman spectra of LNCaP cell cultures after treatment with 2D-BN nanoparticles (1 day incubation time).



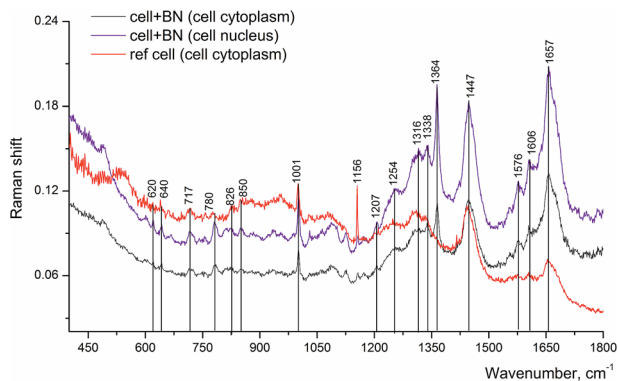


Fig. 6 Raman spectra of LNCaP cell cultures without (reference) and after processing with 2D-BN nanoparticles (1 day incubation time).

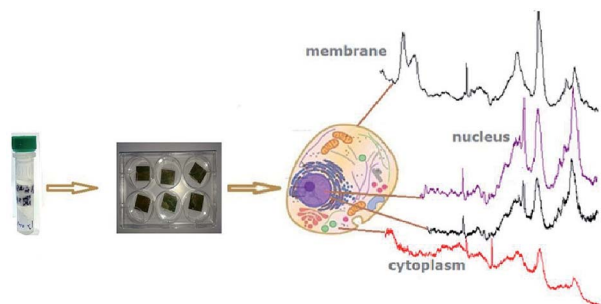


Fig. 7 Schematic representation of the cell cytological analysis using Raman spectroscopy.

Thus, we could assume that the place in the cell, from which we registered this spectrum, is the cell nucleus or the region nearby.

The Raman band at 1001 cm^{-1} is connected with phenylalanine and it is characteristic of the cell protein observed in the spectrum of any cell. The band at 1657 cm^{-1} is assigned to Amide I, the band at 1606 cm^{-1} could be attributed to C=C bonds of amino acids, in particular phenylalanine, as well as NH_2 groups; the band at 1447 cm^{-1} is probably due to CH_2 deformation vibrations of phospholipids.²⁶ With the use of Raman spectroscopy, it was possible to detect the presence of 2D-BN nanoparticles in the cell, as evidenced by characteristic 1364 cm^{-1} band. In the reference sample (tumour cells without 2D-BN nanoparticles treatment) this band was absent (Fig. 6).

The spectrum of reference cells (without treatment with 2D-BN nanoparticles) differs from the spectra of the 2D-BN treated cells by the intensity ratio between the Raman bands (Fig. 7).

Here, the band at 1447 cm^{-1} (CH deformation vibrations) is the most intense, and the bands at about $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ (characteristic bands of proteins and nucleic acid bases) are weaker, which suggests that the spectrum refers to the cytoplasm. In addition, the spectrum of the reference cells is characterized by a higher level of noise and a poorer separation of the fine structure of the bands.

Thus, using Raman spectroscopy, the spectra from different components of the cell and cellular organelles can be

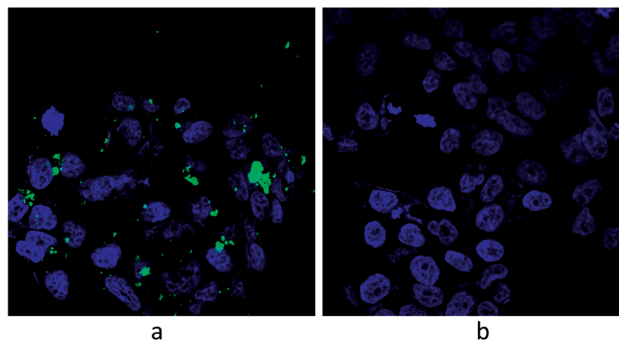


Fig. 8 Visualization of LNCaP cells by confocal microscopy: (a) cells treated with modified 2D-BN nanoparticles and (b) reference cells (green fluorescence – FITC, blue fluorescence – Hoechst 33258).

registered. The 2D-BN nanoparticles can enhance the scattering intensity without distorting the shape and frequency of the Raman bands. This could be due to dielectric property of 2D-BN nanoparticles which does not change the dielectric environment of the cell in contrast to metallic ones.

Visualization of FITC-modified 2D-BN nanoparticles in cells

LNCaP cells were grown on 1 cm^2 coated glass beads in a 24-cup plate in an amount of 5×10^4 cells per cup. The following day, FITC-modified 2D-BN dispersion (final concentration in the nutrient medium was $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) was added to the cups, and the medium was removed after 24 h incubation, washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde, washed 3 times for 5 min using PBS-T (PBS with 0.2% Triton X-100), stained with a 3258 (Sigma) dye for 5 min, washed with PBS-T, and visualized using a LSM 510 META (Zeiss) confocal microscope (Fig. 8).

Visualization of cells by confocal microscopy without dyes. Confocal images^{27–31} of LNCaP cells grown on different substrates (glass and gold) as well as those treated with the 2D-BN nanoparticles and Dox are shown in Fig. 9–12. Luminescence confocal images were obtained by a confocal laser scanning microscope Carl Zeiss LSM-510 META with Plan-Neofluar $63\times/0.75$ Korr and $40\times/0.6$ Korr objectives. The fluorescence images were registered by using Zeiss AxioCam digital camera. The PL excitation was carried out using an ultra-violet lamp HBO 100 and blue (Fset01 wf), green (Fset10 wf), or red (Fset20 wf) filters. It is seen that the cells possess non-specific luminescence, which is enhanced when the cells are grown on the gold substrates.

Dox itself demonstrates strong luminescent properties, and therefore cells treated with Dox are well visualized. In particular, condensed chromatin of various densities in the form of light spots is clearly visible in the image of LNCaP cells treated with Dox. The chromatin condensation process could indicate necrosis of LNCaP cells provoked by Dox.

Discussion

The vibrational spectra of the studied samples showed that 2D-BN nanoparticles strongly affect the structure of the cell



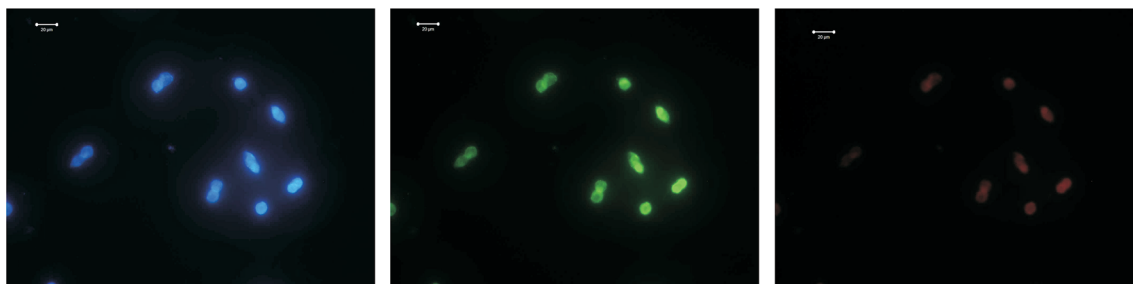


Fig. 9 Confocal microscopy images of LNCap cell treated with 2D-BN, on glass substrate.

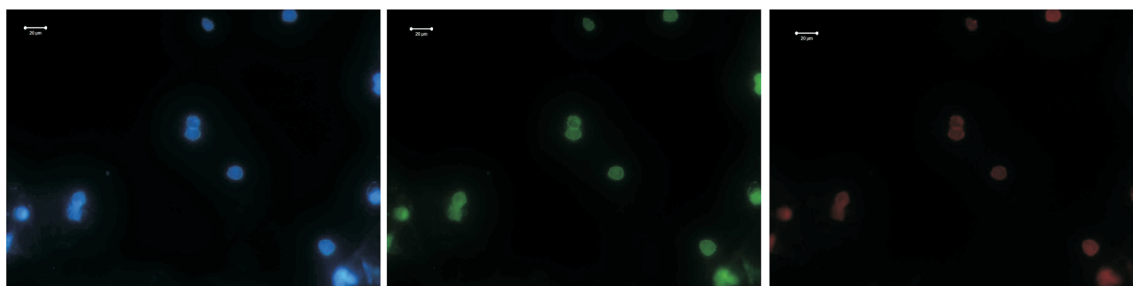


Fig. 10 Confocal microscopy images of LNCap cell treated with 2D-BN, on gold substrate.

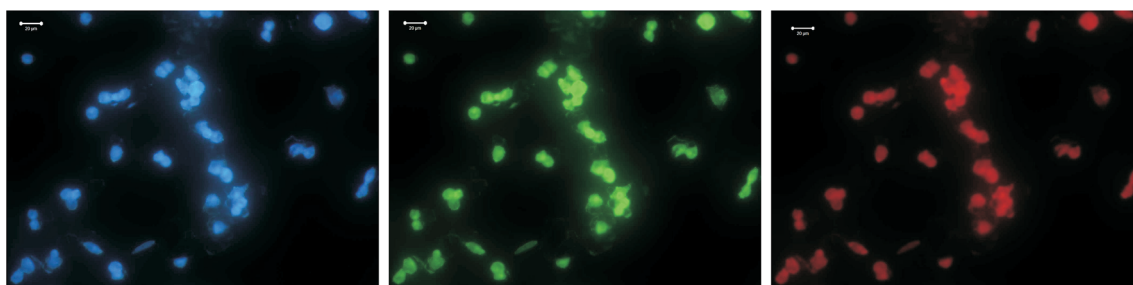


Fig. 11 Confocal microscopy images of LNCap cell treated with Dox on gold substrate.

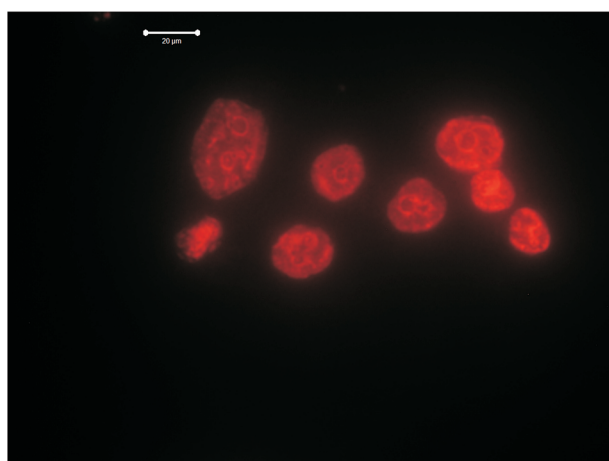


Fig. 12 Confocal microscopy images of LNCap cell treated with Dox on gold substrate.

membranes incubated for 1 hour. Strong variation in CH stretching vibrations of the cell membrane in the FTIR spectra, a significant reorganization of the Raman spectra of the cells after treatment, the confocal microscopy images showing the presence of the nanoparticles not only on the cell membrane, but also inside the cells, all confirm the interaction of the nanoparticles with the cell membrane.

Incubation of the 2D-BN-treated cells during longer periods of time did not lead to alike changes neither in FTIR or Raman spectra. That allowed one to suggest that the nanoparticles penetrate through the cell membrane and localize in the cell cytoplasm or even near the cell nucleus. The nanoparticles which do not pass through the membrane may be deposited on its surface; however this disturbs the cell membrane only slightly.

Of course, the mechanism of the nanoparticles penetration through the cell membrane remains unclear yet. We could assume the phagocytosis mechanism, because we managed to



register using Raman spectroscopy a strong perturbation of the cell membrane after the 2D-BN cell treatment which we believe could be recorded for strong membrane distortion state and even at the initial state of the nanoparticle-bearing ball separation from the membrane. At this very moment, the lipids in the examined site of the membrane are strongly disordered, some of the chemical bonds are broken and new hydrogen bonds are formed, which was indicated by the increase in the intensity of the symmetric phosphate absorption bands and the redistribution of the intensity ratio between the absorption bands assigned to different phosphate groups, as well as significant enhancement of intensity of the CH stretching vibrations (Fig. 3).

According to FTIR spectroscopy, strong membrane perturbation occurred during 1 h incubation. Further cells incubation did not cause such spectral changes.

Confocal microscopy data showed that the tumour cells exhibit insignificant level of fluorescence without dyes, but luminescence and contrast of the images increase for cells being adsorbed on the nanostructured gold surfaces. Labelling of the cells with 2D-BN nanoparticles enhanced the contrast under UV excitation and using blue and green filters. When the red filter was used, the image was barely visible. The fluorescence of 2D-BN was in the range of 350 nm and absorption of Dox approximately coincides with the fluorescence of gold (540 nm) that could cause an increase in the image contrast. The incubation of the cells resulted in a much more contrasting luminescence images in the red filter. More striking lines on the cell's image most likely referred to places of Dox localization in the cell. The image became less pronounced upon insertion of DOX and 2D-BN in the cells. We concluded that DOX and 2D-BN mutually quench fluorescence of each other in the presence of the gold nanostructured surface, and act collectively to quench the luminescent cell channels.

Based on the analysis of confocal images, we concluded that the cell fluorescence can be enhanced by using the gold surface. When the cell was incubated with DOX on the gold surface, the image obtained with the red filter was amplified. When the cell was incubated with 2D-BN, the image obtained using blue or green filter was amplified. When the cells are incubated with DOX and 2D-BN, the cell fluorescence is quenched. These evidences could indicate the DOX and 2D-BN entering into the

cell. Thus, both 2D-BN interaction with the cell and 2D-BN insertion into the cell could be used for more efficient cell labelling. The most interesting result here was that 2D-BN nanoparticles exhibit protective properties against Dox action on the normal cells when administered together with the nanoparticles. Meanwhile, the Dox drug effect on the malignant cells did not change.

Conclusions

It was shown that 2D-BN nanoparticles prepared by us do not exhibit cytotoxicity in relation to normal cells. In a complex with Dox, the nanoparticles did not change the effectiveness of the drug effect on the tumour cells.

We were able to register the moment of the tumour cell membrane perturbation by the 2D-BN nanoparticles using FTIR and Raman spectroscopy. The analysis of the spectra and confocal images showed that the nanoparticles pass into the cells, localize in the cytoplasm and come near the nucleus (Fig. 13). The details of the interaction of 2D-BN nanoparticles with the tumour cell components were analysed.

2D-BN nanoparticles, along with the nanostructured golden surface, can be used to enhance the contrast of the cell images in confocal microscopy, and can serve as markers to control the penetration of drugs into the cell, both normal and tumour. Cells labelled with Dox on the gold nanostructured surface produce enhanced fluorescence images when excited by ultra-violet light with the red filter.

The cells incubated with DOX and adsorbed on the gold surface can provide information in confocal microscopy on whether the DOX interacts with the cell and what changes in the structure occur there. The features of the luminescent cell images could be used for analytical purposes.

DOX modified with 2D-BN nanoparticles has the same efficiency on malignant cells as without nanoparticles, but its protective effect on normal cells increases.

The 2D-BN nanoparticles can be used to enhance the Raman scattering intensity from the cell components.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

This work has been supported by STCU 6175, NATO 5291, 690853-assymcurv-H2020-MSCA-RISE-2015/H2020-MSCA-RISE-2015, NASU "Development of 2D materials for smart sensors of biomedical application" projects.

Notes and references

- 1 F. Alexis, E. M. Pridgen, R. Langer and O. C. Farokhzad, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2010, **197**, 55.
- 2 A. Sharma, A. K. Goyal and G. Rath, *J. Drug Targeting*, 2017, **15**, 1.

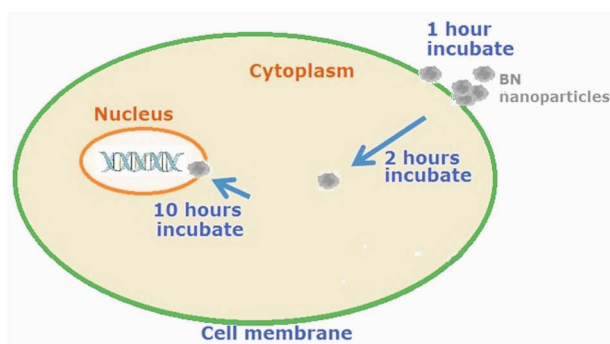


Fig. 13 Scheme of passing the nanoparticles through the cell membrane.



- 3 K. Hui Son, J. Hee Hong and J. Woo Lee, *Int. J. Nanomed.*, 2016, **11**, 5163.
- 4 S. Reich, A. C. Ferrari, R. Arenal, A. Loiseau, I. Bello and J. Robertson, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 2005, **71**, 205201.
- 5 Md. Alim Iftekhar Rasel, T. Li, T. Dung Nguyen, S. Singh, Y. Zhou, Y. Xiao and Y. Tong Gu, *J. Nanopart. Res.*, 2015, **17**, 441.
- 6 G. Ciofani, V. Raffa, A. Menciacchi and A. Cuschieri, *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, **101**, 850.
- 7 M. Emanet, Ö. Sen, Z. Cobandede and M. Culha, *Colloids Surf., B*, 2015, **134**, 440.
- 8 Q. Weng, B. Wang, X. Wang, N. Hanagata, X. Li, D. Liu, X. Wang, X. Jiang, Y. Bando and D. Golberg, *ACS Nano*, 2014, **8**, 6123.
- 9 T. J. Anchordoquy, Y. Barenholz, D. Boraschi, M. Chorny, P. Decuzzi and others, *ACS Nano*, 2017, **11**(1), 12.
- 10 I. V. Sukhorukova, I. Y. Zhitnyak, A. M. Kovalskii, A. T. Matveev, O. I. Lebedev, X. Li, N. A. Gloushankova, D. Golberg and D. V. Shtansky, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 17217.
- 11 M. Dalmark, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1981, **41**, 633.
- 12 G. Arancia, F. Bordi, A. Calcabrini, M. Diociaiuti and A. Molinari, *Pharmacol. Res.*, 1995, **32**, 255.
- 13 A. Pakdel, Y. Bando and D. Golberg, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 934.
- 14 R. V. Gorbachev, I. Riaz, R. R. Nair, R. Jalil, L. Britnell, B. D. Belle, E. W. Hill, K. S. Novoselov, K. Watanabe, T. Taniguchi, A. K. Geim and P. Blake, *Small*, 2011, **7**, 465.
- 15 Y. Lin and J. W. Connell, *Nanoscale*, 2012, **22**(4), 6908.
- 16 O. Yu Posudievsky, O. A. Khazieieva, V. V. Cherepanov, G. I. Dovbeshko, V. G. Koshechko and V. D. Pokhodenko, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 47112.
- 17 N. Sampson, H. Neuwirt, M. Puhr, H. Klocker and I. E. Eder, *Endocr.-Relat. Cancer*, 2013, **20**, R49.
- 18 O. Ilchenko, Y. Pilgun, T. Makhnii, R. Slipets, A. Reynt, A. Kutsyk, D. Slobodianiuk, A. Koliada, D. Krasnenkov and V. Kukharsky, *Vib. Spectrosc.*, 2016, **83**, 180.
- 19 E. Goormaghtigh, J.-M. Ruyschaert and V. Raussens, *Biophys. J.*, 2006, **90**(8), 2946.
- 20 Z. Movasaghi, S. Rehman and Dr I. ur Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2008, **43**(2), 134.
- 21 G. I. Dovbeshko, N. Ya. Gridina, E. B. Kruglova and O. P. Pashchuk, *Talanta*, 2000, **53**, 233.
- 22 O. P. Repnytska, G. I. Dovbeshko, V. P. Tryndiak, I. M. Todor and D. V. Kosenkov, *Faraday Discuss.*, 2004, **126**, 61.
- 23 G. Dovbeshko, V. Chegel, N. Gridina, O. Repnytska, Y. Shirshov, V. Tryndiak, I. Todor and G. Solyanik, *Biospectroscopy*, 2002, **67**, 470.
- 24 H. Arakawa, G. Dovbeshko, S. Diamantoglou and H.-A. Tajmir-Riahi, *DNA Cell Biol.*, 2010, **29**(8), 459.
- 25 D. R. Whelan, K. R. Bambery, L. Puskar, D. McNaughton and B. R. Wood, *Analyst*, 2013, **138**, 3891.
- 26 Z. Movasaghi, S. Rehman and Dr I. U. Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2007, **42**(5), 493.
- 27 W. Han, L. Liu, T. K. Sham and Z. Liu, *Nanoscale*, 2012, **4**, 6951.
- 28 S. Paddock, *Confocal microscopy methods and protocols*, Humana Press, Newcastle, 1998.
- 29 H. W. Robert, *Rep. Prog. Phys.*, 1996, **59**, 427.
- 30 R. Rowland and E. Nickless, *Bioscene*, 2000, **26**(3), 1.
- 31 P. Verveer, M. Gemkow and T. Jovin, *J. Microsc.*, 1999, **193**, 50.




 Cite this: *RSC Adv.*, 2021, **11**, 16142

The effect of 2D tungsten disulfide nanoparticles on Lewis lung carcinoma cells *in vitro*†

 D. L. Kolesnik,^a O. N. Pyaskovskaya,^a O. P. Gnatyuk,^{a,b} V. V. Cherepanov,^b S. O. Karakhim,^c I. O. Polovii,^b O. Yu. Posudievsky,^d N. V. Konoshchuk,^d V. V. Strelchuk,^e A. S. Nikolenko,^e G. I. Dovbeshko^b and G. I. Solyanik^a

The unique physicochemical properties of modern two-dimensional (2D) nanomaterials with graphene-like structures make them promising candidates for biology and medicine purposes. In this article, we investigate the influence of the two-dimensional tungsten disulfide (2D WS₂) water suspension nanoparticles obtained by an improved mechanochemical method from powdered WS₂ on morphological and structural characteristics of Lewis lung carcinoma cells using FT-IR, Raman spectroscopy, and confocal microscopy. The characterization of the 2D WS₂ nanoparticles by different physical methods is given also. We have highlighted that 2D WS₂ does not exert cytotoxic activity in the case of 1 day incubation with tumor cells. Prolongation of the incubation period up to 2 days has caused a statistically significant ($p < 0.05$) concentration-dependent decrease of the number of viable cells by more than 30% with the maximum cytotoxic effect at concentrations of 2D WS₂ close to 2 μg ml⁻¹. In the Raman spectra of 2D WS₂ treated cells the bands centered at 354 cm⁻¹ and 419 cm⁻¹, which are assigned to characteristics and modes of WS₂ nanoparticles were observed. The obtained data indicate, that the cytotoxic effect of 2D WS₂ on tumor cells in the case of long-term incubation is realized particularly through the ability of 2D WS₂ to enter tumor cells and/or accumulate on their surface, which gives a rationale to conduct further studies of their antitumor efficacy *in vitro* and *in vivo* when combined with chemotherapeutic drugs.

 Received 23rd February 2021
 Accepted 9th April 2021

DOI: 10.1039/d1ra01469b

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Modern graphene-like nanomaterials have many extraordinary physical and chemical properties, which makes them promising for solving various tasks in the fields of materials science, electronics, biology, medicine, *etc.*^{1–6} 2D materials can be produced as dispersions, which expands their potential applications to obtain coatings, nanocomposites, heterostructures, and for biomedical application also.

2D nanomaterials are two-dimensional crystals with a very small thickness, which can be several atom layers. Transition metal dichalcogenides such as (MoS₂, WS₂, MoSe₂, MoTe₂, *etc.*)

can form 2D materials due to their layered structure. Covalent bonds within a layer are much stronger than van der Waals' interaction between layers. Bulk materials WS₂ are semiconductors with an indirect band gap of approximately 1 eV, which becomes a direct bandgap of 1.8–2 eV upon the formation of nanosheets.^{7,8} It is accompanied by the appearance of luminescence, which is absent in the bulk material. The maximum luminescence significantly depends on the size distribution of the layers.

In biomedical practice, such 2D nanomaterials could be useful for the diagnosis and treatment of various pathological conditions, including cancer. The use of 2D nanomaterials for diagnosis may include fluorescence, MRT, CT, and photoacoustic imaging of the pathological process. Therapeutic applications of those nanoparticles can be focused on photothermal and photodynamic therapy, chemotherapy as well as synergistic therapy.

Nowadays there are data on high prospects for the use of 2D MoS₂ and WS₂ nanomaterials as a drug delivery carrier. Despite the success in the development of a drug delivery system using graphene-like nanomaterials, the big challenge is their toxicity to normal organs and tissues.^{9,10} Therefore, transition metal dichalcogenides (TMD) including molybdenum disulfide (MoS₂) and tungsten disulfide (WS₂) nanoparticles due to their

^aR. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, 45 Vasylykivska str., Kyiv, 03022, Ukraine

^bDepartment of Physics of Biological Systems, Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Prospekt Nauki 46, Kyiv 03028, Ukraine. E-mail: hrysantemka@gmail.com

^cPalladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Leontovicha Street 9, Kyiv 01601, Ukraine

^dL. V. Pisarzhevsky Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Prospekt Nauki 31, Kyiv 03028, Ukraine

^eV. E. Lashkaryev Institute of Semiconductor Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Prospekt Nauki 41, Kyiv 03028, Ukraine

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1ra01469b

layered structure and capability to be successfully loaded with anticancer drugs, have attracted considerable attention in recent years.^{11–13} An additional advantage of inorganic graphene-like 2D nanomaterials is their low toxicity to normal organs and tissues.^{14,15} In particular, an extremely high loading capacity of PEGylated 2D MoS₂ has been shown for the anticancer drug doxorubicin.¹⁶ 2D WS₂ nanoparticles have been also reported to possess a high loading capacity for chemotherapeutic drugs, as confirmed by Yong *et al.* with methylene blue as a photosensitizer.¹⁷ It has been shown that improvement in the therapeutic properties of WS₂ nanomaterials can be achieved by the fabrication of nanosheet-based nanocapsules with the inclusion of polyvinylpyrrolidone and iron(III).¹⁸ The whole new level for delivery of chemotherapeutic drugs to the tumor was opened with the development of hybrid nanomaterials based on WS₂ nanosheets and liposomes, which significantly increases their adsorption and drug delivery capacities.¹⁹

For oncological applications, such properties as a large surface area of 2D WS₂ nanoparticles enable for creation of a directed drug delivery system. Nanoparticle-based drug delivery systems are aimed at improving in delivering the chemotherapeutic drugs into the tumor, impaired due to aberrant tumor angiogenesis^{20,21} and, as a consequence, increasing the effectiveness of anticancer therapy.

It has been shown also that WS₂ in the form of quantum dots 1–1.5 nm in size can cause dissociation of hydrogen peroxide and exhibit catalytic properties in substrate oxidation through interaction with hydrogen peroxide (similar to natural peroxidases). Such peroxidase-like properties make WS₂ a promising material for biotechnology. The WS₂ nanoparticles themselves exhibit characteristic photoluminescence (PL) in the blue spectral region. The position of the luminescence maximum depends on the excitation wavelength and can appear in the range of 400–440 nm (*e.g.* at 420 nm under the excitation wavelength of 330 nm).²² In the same work,²² it was proposed to create a WS₂-based system for the determination of glucose levels by a proportional increase of the luminescence intensity.

The work²³ has shown the ability of WS₂ nanoparticles smaller than 5 nm in size to neutralize reactive oxygen species and significantly increase the survival rate of cells after their treatment with ionizing radiation. The protective effect of WS₂ nanoparticles against the action of gamma radiation has been confirmed in experiments performed on mice. It is noted that the WS₂ nanoparticles are easily excreted by the kidneys within 1 day and do not cause any toxic effect within 30 days after treatment.

It is known that for the successful use of potential medicinal products in oncology, including the nanomaterials for drug delivery applications they should not stimulate the growth and metastasis of malignant tumors and should not reduce the activity of the chemotherapeutics. One of the first and obligatory stages in the study of such agents is the analysis of their action on the viability and proliferative potential of tumor cells.

Therefore, the main objective of the present study was to investigate the effect of 2D tungsten disulfide nanoparticles on the viability and molecular-structural characteristics of Lewis lung carcinoma cells *in vitro*. We used 2D WS₂, obtained by the

improved mechanochemical method, having sizes as 10–200 nm with a particle's thickness of one or several atomic layers. Murine Lewis lung carcinoma cells were used as a tumor model, which makes it possible to further study *in vitro* and *in vivo* the antitumor efficacy of 2D WS₂ nanoparticles loaded with anticancer drugs.

Materials and methods

Experimental tumor models

A variant of Lewis lung carcinoma cells, LLC/R9, obtained *via* the multistage experimental progression of the parental strain (LLC) *in vivo* towards the development of cisplatin resistance, was used as a tumor cell model.²⁴ The cells were maintained *in vitro* in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) with the addition of 10% fetal bovine serum (Sigma, USA) and 40 μg ml⁻¹ gentamicin at 37 °C in humidified conditions with 5% CO₂.

Test agent 2D WS₂

Graphene-like 2D WS₂ materials obtained by an improved mechanochemical method from powdered WS₂ (99%, particle size < 2 μm, # 243639, Sigma-Aldrich) were used as the test agent.^{25,26} Physicochemical properties of WS₂ nanoparticles and the method of their production were described in detail *in*.²⁵ TEM images were obtained using a PEM125K (Selmi) microscope operating at 100 kV, using dispersions deposited on a copper mesh coated with a carbon film (Fig. 1).

AFM characterization of WS₂ nanoparticles was performed on the “Solver Pro M” system (NT-MDT, Russia). Particles from methanol solution were deposited as a drop onto an atomically smooth mica surface (SPI supplies, V-1 grade). The measurements were carried out after complete evaporation of the solvent in the semicontact (tapping) mode using probes of the type CSG30 (NT-MDT, 0.6 N m⁻¹, 48 kHz). AFM data showed that the particles were located on the substrate isolated from each other. The height of most of the particles was 1–10 nm, which corresponds to the thickness of 1–10 atomic layers of WS₂. Based on the analysis of the Z-profiles of particles, we estimated their lateral sizes as ≤ 200 nm after filter application (Fig. 2).²⁷

These data are well agreed with the result from zeta potential and particle size distribution measurement. We use the

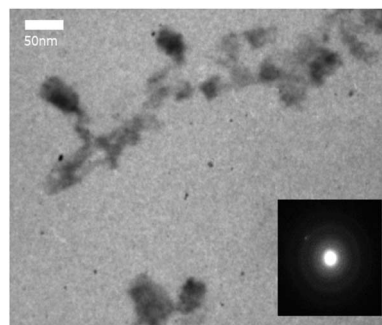


Fig. 1 TEM of WS₂ nanoparticles; SAED pattern (right lower corner).

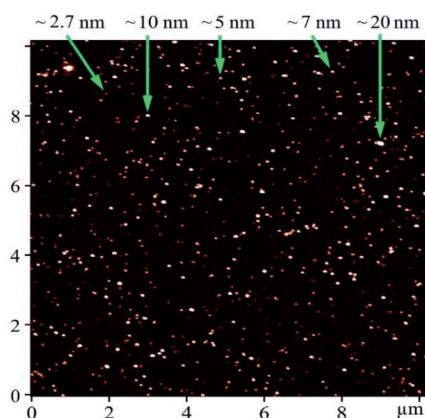


Fig. 2 AFM image of WS₂ particles deposited on mica substrate. Numbers with arrows show the height of objects.

ZETASIZER Nano Series (Malvern, UK). The value of zeta potential is about -34.0 mV which means that our aqueous 2D WS₂ suspension is stable and not prone to aggregation (Fig. 3).

Raman spectra of 2D WS₂ show two characteristic bands in the region of 355 cm^{-1} and 418 cm^{-1} , related to E_{2g}¹ and A_{1g} WS₂ vibrational modes respectively. In this study, an aqueous solution of nanostructured WS₂ at a concentration of 0.1 mg ml^{-1} (the maximum concentration at which the solution remained stable for a long time) was used. The differences between these two mode E_{2g}¹ and A_{1g} corresponds to few layers 2D WS₂ nanoparticles (Fig. 4).

According to our previous studies, the pH of just obtained 2D WS₂ aqueous suspension may decrease about one point for one day, from 3.7 to 3.0. The nanoparticles oxidation processes in the aqueous medium may be a consequence of it. The oxidation occurs quickly for the first few days, and then the suspension remains stable up to 6–9 months. This should be taken into account when 2D WS₂ nanoparticles will be used as drug delivery systems in complexes with anticancer drugs.

Assessment of cytotoxicity of 2D WS₂ against LLC/R9

LLC/R9 cells were seeded in the wells of a 96-well plate at a density of 1.0×10^4 cells per well. After preincubation of the cells for 16–18 hours, the medium was replaced with a fresh one, which contained the test agent at the concentration of 0–25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and incubation continued for 1 or 2 days. Before adding into the medium 2D WS₂ nanoparticles was filtered

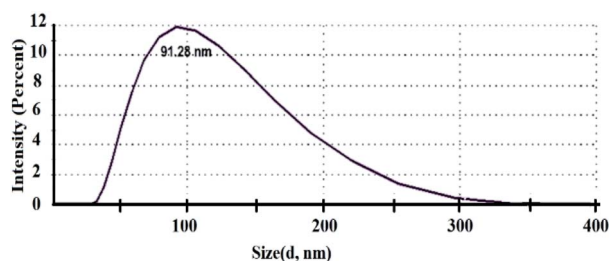


Fig. 3 Size distribution of 2D WS₂ nanoparticles.

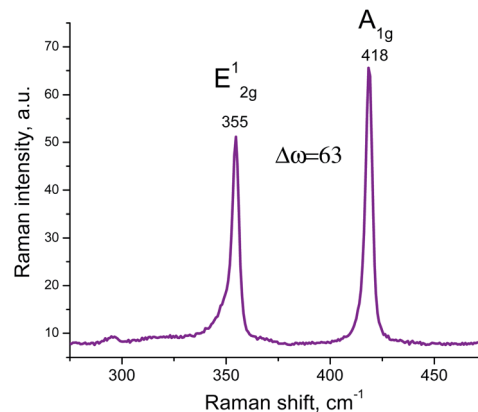


Fig. 4 Raman spectrum of the 2D WS₂ nanoparticles.

through polyethersulfone filter 0.2 micron (Sarstedt). Each concentration of the test agent was examined in triplicate. The cells incubated under the same conditions without treatment with the test agent were used as controls.

At the end of the incubation period, the cells were fixed in a cold 20% solution of trichloroacetic acid and stained with sulforhodamine B (Sigma, USA). The optical density of the test samples was evaluated using a plate reader Synergy HT (BioTek, USA) at a wavelength of 490 nm and used as an indicator of the number of viable LLC/R9 cells.

Investigation of vibrational spectra of tumor cells

For spectroscopic studies (FT-IR absorption and Raman scattering), the samples of tumor cells were incubated for 2 days with WS₂ nanoparticles. LLC/R9 cells were seeded in 35 mm Petri dishes in the quantity of 0.2 million cells per dish. At the end of the pre-incubation period, the medium was replaced with the fresh one with the addition of WS₂ at a final concentration of 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and the cells were incubated for 2 days. The cells incubated under the same conditions without the addition of WS₂ nanoparticles were used as control. After 2 days, the cells were mechanically removed from the plates, washed twice with PBS, pH 7.4, and resuspended in a small volume of H₂O. The resulting cell suspension was placed on a CaF₂ substrate transparent in the IR range and dried under a laminar air stream. The FT-IR spectra were registered with a Fourier IR spectrometer Bruker IFS-66 (Germany) in a wide spectral range from 3800 to 900 cm^{-1} . Assignment of the IR absorption bands to characteristic vibrations of the cells functional groups was done according to.^{28–33} For all IR absorption spectra, the baseline correction and band intensity normalization by the Amide I band centered at 1651 cm^{-1} has been carried out.

Analysis of Raman spectra of tumor cells

Raman spectra were registered with a Raman spectrometer Horiba Jobin-Yvon T64000 (Germany) under a laser excitation wavelength of 488 nm and an excitation power of 100 mW. The samples of tumor cells treated and not treated with WS₂ nanoparticles were deposited on multilayer graphene

substrates. Baseline correction was performed for all spectra. No normalization of the spectra intensity was carried out.

Confocal images of tumor cell cultures

To obtain confocal images, LLC/R9 cells were seeded in 35 mm Petri dishes on rounded coverslips at a density of 0.2 million cells per dish and incubated overnight under standard conditions. At the end of the preincubation period, the medium was replaced with a fresh one with the addition of 2D WS₂ nanoparticles at a final concentration of 6 μg ml⁻¹ and the incubation continued for 2 days. The cells incubated on coverslips under the same conditions without the addition of test nanoparticles were used as controls. Luminescence confocal images were obtained using a confocal laser scanning microscope Carl Zeiss LSM-510 META (Germany) with Plan-Neofluar 63x/0.75 Korr and 40x/0.6 Korr objectives. The fluorescence images were registered using Zeiss AxioCam digital camera. The PL excitation was carried out using a UV HBO 100 lamp with blue (Fset01 wf), green (Fset10 wf), or red (Fset20 wf) filters, or lasers with excitation wavelengths of 405 and 488 nm. For the fluorescence imaging, the tumor cells were left in the medium in the same Petri dishes, where they were cultured to maximize the preservation of viable cells. Parameters of confocal image registration were identical both for the control cells and those treated with WS₂ nanoparticles (Table 1).

Statistical analysis

Statistical processing of the obtained data was performed using descriptive statistics and non-parametric Mann-Whitney test using Microcal Origin and Statistica Software.

Results and discussion

Influence of WS₂ nanoparticles on the viability of LLC/R9 cells

Our study has shown that the effect of 2D WS₂ nanoparticles on the viability of Lewis lung cancer cells depends significantly on the concentration of this agent and the duration of its action. As can be seen in Fig. 5, under conditions of 1 day incubation, the test agent used in a wide range of concentrations has not caused a statistically significant decrease of the number of viable cells (compared to the corresponding control indices). This means that WS₂ nanoparticles incubated for 24 hours with tumor cells do not exert cytotoxic activity (*i.e.* do not cause tumor cell death during the incubation period) or cytostatic activity (do not inhibit the proliferation of these cells).

Prolongation of the incubation period of tumor cells with WS₂ nanoparticles up to 2 days has significantly changed their

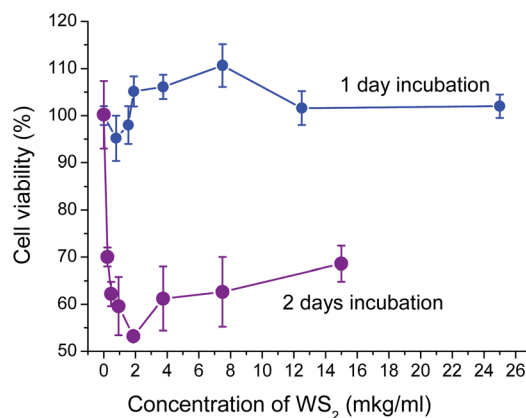


Fig. 5 Dependence of LLC/R9 cell viability on the concentration of 2D WS₂ nanomaterials in the culture medium under 1- and 2 days incubation.

impact on the viability of tumor cells and has caused a statistically significant ($p < 0.05$) concentration-dependent decrease in the number of viable cells by more than 30% (Fig. 5).

The maximum cytotoxic/cytostatic effect of the WS₂ nanoparticles (the reduction of the number of viable cells by 47%) was recorded at concentrations close to 2 μg ml⁻¹. At the nanoparticle concentration higher than 2 μg ml⁻¹, their cytotoxic/cytostatic effect has not been enhanced: the number of viable cells remained at the level of 55–65% of that in the control. This pattern of the test agent's effect on the tumor cell viability may be related either to the heterogeneity of the tumor cell population (the presence of LLC/R9 cells sensitive and resistant to cytotoxic/cytostatic action of the nanoparticles) and/or to different mechanisms of nanoparticles effect on tumor cell viability (cytotoxic/cytostatic mechanisms along with mechanisms of stimulating effect on cell proliferation). A prolonged incubation period contributes to the cytotoxic/cytostatic impact more than the increase of the agent concentration. It is possible that the existence of two antagonistic mechanisms of the effect of nanoparticles on the viability of tumor cells is related to not only the tumor cell heterogeneity but the heterogeneous size distribution of the nanoparticles.

According to literature data, the authors underline low toxicity of the WS₂ and MoS₂ nanoparticles.³⁴ However different particles could influence by different manner as well a protocol of toxicity studying is different. In our case smaller in size nanoparticles can more easily be internalized by tumor cells and affect their viability, in particular, by reactive oxygen species neutralizing, as has been shown for WS₂ nanodots.²⁵

Table 1 Parameters of confocal image registration

Scan Zoom	1.0
Objective	LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr
Average	Line 8
Pinhole	Ch2: 808 mkm
Filters	Ch2-1: BP 505–570 IR; Ch 2-2: BP 420–480
Beam splitters	MBS: HFT 405/488/543/633; DBS1: mirror; DBS2: mirror; FW1: none
Wavelength	488 nm T1 50.0%, 405 nm T2 30.0%

Larger in size WS₂ nanoparticles can interact with macromolecules of tumor cells, such as DNA and proteins (especially membranotropic ones), causing either cell death or inhibiting their proliferative activity. Such an interaction can significantly affect the structure and/or concentration of the macromolecules in the cell, the change of which could be the most sensitively assessed by spectroscopic methods.

Therefore, to investigate the possible mechanisms of cytotoxic/cytostatic action of 2D WS₂ nanoparticles, the analysis of vibrational spectra (Raman scattering and IR absorption) of LLC/R9 cells after their 2 day incubation with nanoparticles at a concentration of 6 μg ml⁻¹ (which reduces the number of viable cells approximately by 40%) has been performed.

Analysis of Raman spectra of tumor cells treated with WS₂ nanoparticles

The analysis of the Raman spectra of LLC/R9 cells has been performed after their 2 day incubation with WS₂ nanoparticles. A multilayer graphene substrate has been used for the spectra registration. Our previous studies^{35–37} have shown good prospects of graphene as substrates for SERS Raman spectroscopy, as they are characterized by minimum luminescence and, in contrast to usual glass coverslip substrates, provide enhancement of vibrational bands intensity of the studied biological objects without changing their line shapes and frequency positions. The Raman spectra of LLC/R9 cells after their incubation with the investigated nanoparticles are presented in Fig. 6 a–c.

A detailed analysis of the Raman spectra has revealed the presence of characteristic Raman bands of the cells; the data with their assignments are presented in Table 2.³⁸

In the Raman spectra of the cells treated with WS₂ nanoparticles, the bands centered at 354 cm⁻¹ and 419 cm⁻¹, which are assigned to characteristic and modes of WS₂ nanoparticles,^{39,40} are observed, that indicates the presence of test nanoparticles on the surface and/or inside the cells (Fig. 6 b and c). No other significant differences are observed between the spectra of cells treated and not treated with WS₂ nanoparticles, such as frequency shifts or band contour changes (Table 2).

Analysis of FT-IR spectroscopy data on the LLC/R9 cells after WS₂ treatment

In contrast to the Raman spectra, the analysis of the IR absorption spectra showed a pronounced effect of the WS₂ nanoparticles on the conformational state of the protein and nucleic acid fractions of the tumor cells.

In the region 1800–1500 cm⁻¹, the main contribution to the absorption is made by the total protein fraction (membrane proteins and proteins present in the cell). There are two clear absorption bands that refer to amide I (centered at 1650 cm⁻¹, stretching vibration C=O together with the deformation vibrations CN, NH) and amide II (centered at 1540 cm⁻¹, stretching vibrations CN, CHN, and deformation NH vibrations). The amide I band in our case has two shoulders 1651 cm⁻¹ and 1630 cm⁻¹, which can be assigned to the α-helical structures and the β-sheet structures of the protein

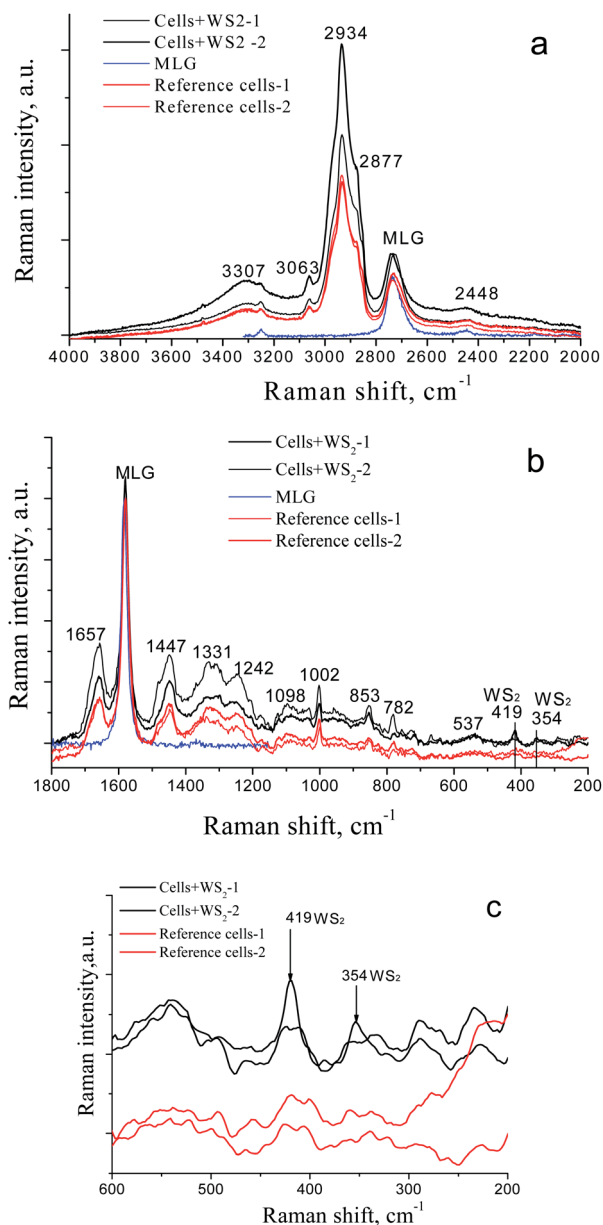


Fig. 6 Raman spectra of the LLC/R9 tumor cells in the different spectral regions, after (black curves, two spectra) and without treatment with 2D WS₂ nanoparticles (reference, red curves, two spectra). The blue curve is the Raman spectrum of the multilayer graphene (MLG) substrate. a – 4000–2000 cm⁻¹, b – 1800–200 cm⁻¹, c – 600–200 cm⁻¹.

fraction, respectively. After treatment of the cells with WS₂ nanoparticles, we registered the narrowing of the amide I band due to the reduction of contribution of the shoulder 1630 cm⁻¹ (β-structures), which indicates conformational changes of proteins (Fig. 7).

The bands at 1454 cm⁻¹ and 1395 cm⁻¹ can be assigned to asymmetric and symmetric deformation vibrations of CH groups of proteins. Frequency shifts in this area were not observed, but one could note the decrease of the intensity of these bands in the cell samples after treatment with WS₂ nanoparticles.

Table 2 Major Raman bands of the LLC/R9 cells and their assignment to functional groups vibrations

Peak position, cm^{-1}	Assignment
3307	OH stretching vibrations
3063	CH ring of lipids
2934	CH_3 symmetric band of lipids and proteins
2877	CH_2 asymmetric stretch of lipids and proteins
2732	2D-mode, multilayer graphene
2448	
1657	Amide I (α -helix)
1580	G- mode, multilayer graphene
1447	CH_2 deformation
1331	CH_3 DNA & phospholipids
1242	Asymmetric phosphate [PO_2^- (<i>asym.</i>)] stretching modes
1098	C-C vibration mode
1002	Phenylalanine
853	(C-O-C) skeletal mode
782	Thymine, cytosine, uracil
537	Cholesterol ester
419	A_{1g} of WS_2
354	E_{2g}^1 of WS_2

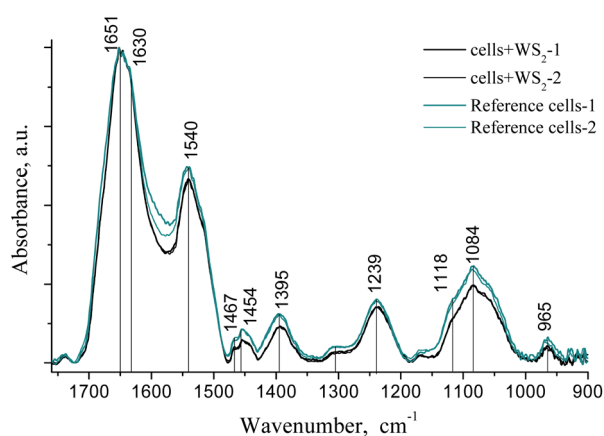


Fig. 7 FT-IR spectra of the LLC/R9 cells after 2D WS_2 treatment (two black lines) and without treatment (reference, two green lines).

In the range of $1350\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, we also observed a decrease in the intensity and the half-width of the bands in the IR absorption spectra of the samples after WS_2 treatment. In this region, the main contribution to the absorption is made by PO_2^- groups of membrane phospholipids and the sugar phosphate backbone of nucleic acids (asymmetric 1239 cm^{-1} and symmetric 1084 cm^{-1} stretching vibrations).

Narrowing of the phosphate and amide bands after incubation with 2D WS_2 nanoparticles could be associated with the ordering of lipids and proteins near the particle surface. We observed the same effect by studying the formation of amyloid fibrils during the interaction of the nanoparticles with lysozyme at low pH.⁴¹ No frequency shift of the main absorption bands was observed.⁴¹

Analysis of confocal images of tumor cells

Analysis of images obtained by confocal microscopy has shown that tumor cells treated with 2D WS_2 nanoparticles (Fig. 8a), do

not differ significantly by their morphology from the control cells (Fig. 8b). In both cases, the vast majority of the cells were visually viable and remained spread on the glass; the cell population consisted of heterogeneous subpopulations of fibroblast-like and rounded cells, which is characteristic of this culture.

However, in the case of cells treated with 2D WS_2 , the number of rounded cells was slightly more than in the control. Besides, the increase of the luminescence intensity from the cells incubated with nanoparticles in the blue region indicates that the particles either affect the biochemical processes in the cell or exert self-luminescence in the range of $380\text{--}480\text{ nm}$. The latter statement is valid for very small particles (nanodots) $1\text{--}2\text{ nm}$ in size, the presence of which cannot be excluded in a heterogeneous mixture of particles with a size of tens of nm. Given their easier penetration into the cell due to their small size, it can be assumed that such small nanoparticles can penetrate into the cytoplasm of the cell and be localized around the cell nucleus, as evidenced by detailed image analysis. The luminescence of 2D WS_2 nanoparticles in the blue region has been observed by us earlier, but the study⁴² showed the possibility of 2D WS_2 luminescence in the red region. The position of the luminescence band may depend on the size and structure of nanoparticles, as well as on the excitation wavelength.²³

According to the study,²³ the WS_2 nanodots can catalyze some transformations involving charges, promoting electron transfer, eliminating oxidation products, and performing protective functions toward the DNA and cell nucleus; indeed, they are mainly located around the cell nuclei in our confocal images. However, based on our data, the opposite scenario could not be excluded, and then it may indicate the initial stages of 2D WS_2 induced cell death by apoptosis and/or necrosis, which may be one of the mechanisms of cytotoxic action of the studied nanoparticles and requires further research.

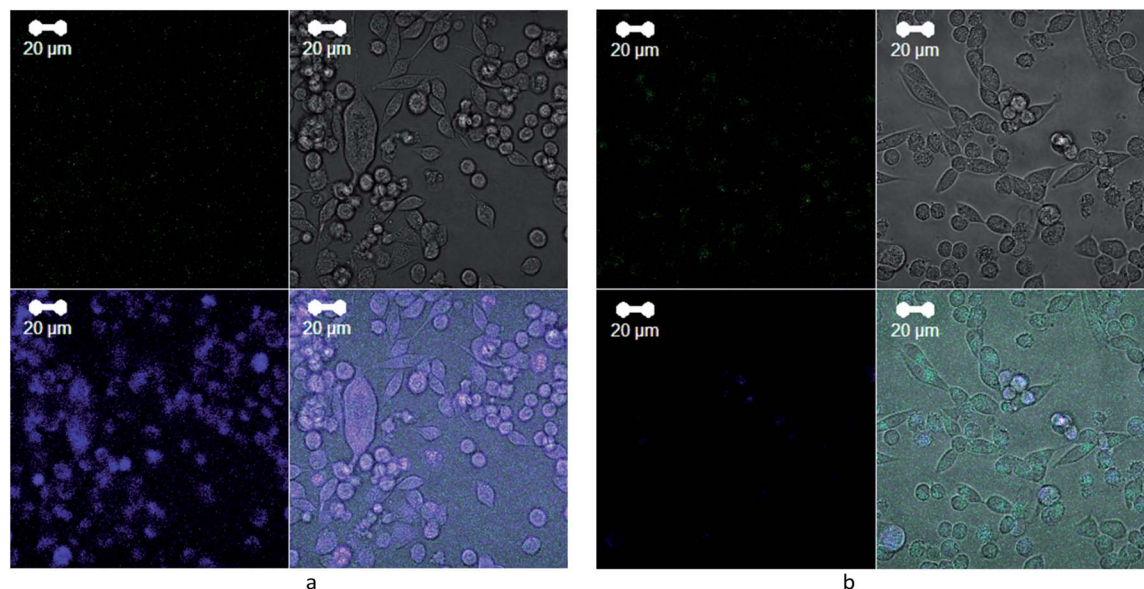


Fig. 8 Confocal microscopy images of LLC/R9 cells incubated for 2 days on glass coverslips: (a) with 2D WS₂ nanoparticles at a final concentration of 6 µg ml⁻¹ and (b) without treatment, reference.

Therefore, our study has shown that 2D WS₂ nanoparticles in the conditions of short-term incubation did not significantly affect the viability of tumor cells, but showed a cytotoxic/cytostatic effect after the prolonged incubation period. The cytotoxic effect of the studied 2D nanomaterials was at least in part, due to their ability to enter tumor cells (and/or adsorb on their surface), which was confirmed by the presence of characteristic bands in the Raman spectra of the tumor cell samples. The ability of WS₂-based 2D nanomaterials not only to accumulate in tumor cells but also to show cytotoxic activity against tumor cells gives a rationale to conduct further research of their antitumor efficacy *in vitro* and *in vivo* when combined with chemotherapeutic drugs.

Conclusions

(1) 2D WS₂ nanoparticles aqueous suspension were obtained by an improved mechanochemical method from powdered WS₂. The height of particles was 1–10 nm, which corresponds to the thickness of 1–10 atomic layers of WS₂, and their lateral sizes was up to 200 nm. The suspension remains stable up to 6–9 months without any changes of properties or aggregation. But for the first few days the oxidation processes may occurs. This fact should be taken into account when 2D WS₂ nanoparticles will be used as drug delivery systems in complexes with anti-cancer drugs.

(2) It is established that WS₂-based 2D nanomaterials don't show cytotoxic and/or cytostatic effects on Lewis lung carcinoma cells under 1 day incubation and show concentration-dependent more than 30% decrease of the number of viable cells during a long-term incubation period up to 2 days. The last data indicate the process of oxidation in the sites of WS₂ particle's location and cell degradation.

(3) The analysis of Raman spectra of tumor cells treated with 2D WS₂ nanoparticles showed the presence of E_{2g}¹ and A_{1g} modes of WS₂ indicating the ability of the nanoparticles to enter tumor cells and/or accumulate on their surface under their joint incubation *in vitro*.

(4) Multilayer graphene support was applied by us in Raman spectroscopy could be used as internal standard with good optical (strong reflectance, no fluorescence) and spectroscopic (accuracy of determination of wavenumber – 1580 cm⁻¹ for ideal graphene layer) properties.

(5) The increased luminescence intensity of tumor cells incubated with 2D WS₂ nanoparticles in the blue spectral region makes it possible to further assert their passage into the cells, which can be used as a luminescence marker of 2D WS₂ activity.

(6) This study gives a possibility to develop a strategy for further loading the WS₂ nanoparticles with a drug in the tumor theranostics as well in other disease treatment (*e.g.* amiloid-like diseases).

Author contributions

D. L. Kolesnik – investigation, writing – original draft, work with cell culture, cell viability investigation and analysis. O. N. Pyaskovskaya – original draft, work with cell culture, cell viability investigation and analysis. O. P. Gnatyuk – investigation, writing – original draft, FTIR spectra registration and analysis. V. V. Cherepanov – investigation, TEM and AFM images registration and analysis. S. O. Karakhim – investigation, confocal images registration and analysis. I. O. Polovii – formal analysis. O. Yu. Posudievsky – resources, 2D WS₂ nanoparticles production. N. V. Konoshchuk – investigation, 2D WS₂ nanoparticles production, V. V. Strelchuk – investigation, Raman spectra registration and analysis. A. S. Nikolenko – investigation, Raman spectra registration and analysis. G. I.

Dovbeshko – data curation, project administration, writing – review & editing. G. I. Solyanik – data curation, writing – review & editing, supervision.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

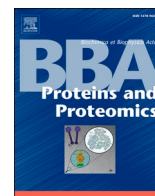
Acknowledgements

This work was supported by the Ukrainian-Poland Project “Development of enhanced substrates based on 2D nano-materials for fluorescent microscopy and spectroscopy”, 2018–2019. Project “Development of 2D materials and “smart” sensors for medical and biological purposes” 11/1–2019, 2020 NATO SPS 985291 “A novel method for the detection of biohazards”, 2017–2020. NRFU 2020.02/0027. We are thankful to Prof. V. A. Skryshevsky from the Taras Shevchenko National University of Kyiv, Faculty of Radiophysics, Electronics and Computer Systems for Zeta-potential measurement.

References

- 1 Z. Kou, X. Wang, R. Yuan, H. Chen, Q. Zhi, L. Gao, B. Wang, Z. Guo, X. Xue, W. Cao and L. Guo, *Nanoscale Res. Lett.*, 2014, **9**(1), 587, DOI: 10.1186/1556-276x-9-587.
- 2 P. T. Yin, S. Shah, M. Chhowalla and K.-B. Lee, *Chem. Rev.*, 2015, **115**(7), 2483, DOI: 10.1021/cr500537t.
- 3 Z. Fan, X. Huang, C. Tan and H. Zhang, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 95, DOI: 10.1039/c4sc02571g.
- 4 S. Ahmed and J. Yi, *Nano-Micro Lett.*, 2017, **9**, 50, DOI: 10.1007/s40820-017-0152-6.
- 5 W. Huang, Y. Sunami, H. Kimura and S. Zhang, *Nanomaterials*, 2018, **8**, 519, DOI: 10.3390/nano8070519.
- 6 L. Mei, S. Zhu, W. Yin, C. Chen, G. Nie, Z. Gu and Y. Zhao, *Theranostics*, 2020, **10**(2), 757, DOI: 10.7150/thno.39701.
- 7 T. P. Nguyen, W. Sohn, J. H. Oh, H. W. Jang and S. Y. Kim, *J. Phys. Chem. C*, 2016, **120**(18), 10078–10085, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01838.
- 8 Y. Chen and M. Sun, *Nanoscale*, 2021, **13**(11), 5594–5619, DOI: 10.1039/d1nr00455g.
- 9 O. Akhavan, E. Ghaderi and A. Akhavan, *Biomaterials*, 2012, **33**(32), 8017–8025, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.040.
- 10 K. P. Wen, Y. C. Chen, C. H. Chuang, H. Y. Chang, C. Y. Lee and N. H. Tai, *J. Appl. Toxicol.*, 2015, **35**(10), 1211–1218, DOI: 10.1002/jat.3187.
- 11 T. Liu, C. Wang, X. Gu, H. Gong, L. Cheng, X. Shi, L. Feng, B. Sun and Z. Liu, *Adv. Mater.*, 2014, **26**(21), 3433–3440, DOI: 10.1002/adma.201305256.
- 12 Y. Liu, J. Peng, S. Wang, M. Xu, M. Gao, T. Xia, J. Weng, A. Xu and S. Liu, *NPG Asia Mater.*, 2018, **10**, e458, DOI: 10.1038/am.2017.225.
- 13 V. Urbanová and M. Pumera, *Nanoscale*, 2019, **11**(34), 15770–15782, DOI: 10.1039/c9nr04658e.
- 14 J. Hao, G. Song, T. Liu, X. Yi, K. Yang, L. Cheng and Z. Liu, *Adv. Sci.*, 2017, **4**(1), 1600160, DOI: 10.1002/advs.201600160.
- 15 J. H. Appel, D. O. Li, J. D. Podlevsky, A. Debnath, A. A. Green, Q. H. Wang and J. Chae, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2016, **2**(3), 361–367, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5b00467.
- 16 V. Yadav, S. Roy, P. Singh, Z. Khan and A. Jaiswal, *Small*, 2019, **15**, e1803706, DOI: 10.1002/sml.201803706.
- 17 Y. Yong, L. Zhou, Z. Gu, L. Yan, G. Tian, X. Zheng, X. Liu, X. Zhang, J. Shi, W. Cong, W. Yin and Y. Zhao, *Nanoscale*, 2014, **6**, 10394–10403.
- 18 C. Wu, S. Wang, J. Zhao, Y. Liu, Y. Zheng, Y. Luo, C. Ye, M. Huang and H. Chen, *Adv. Funct. Mater.*, 2019, **29**, 1901722, DOI: 10.1002/adfm.201901722.
- 19 Y. Liu and J. Liu, *Nanoscale*, 2017, **9**, 13187–13194, DOI: 10.1039/c7nr04199c.
- 20 S. Azzi, J. K. Hebda and J. Gavard, *Front. Oncol.*, 2013, **3**, 211, DOI: 10.3389/fonc.2013.00211.
- 21 R. Lugano, M. Ramachandran and A. Dimberg, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2019, **77**, 1745, DOI: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- 22 M. Haddad Irani-Nezhad, A. Khataee, J. Hassanzadeh and Y. Orooji, *Molecules*, 2019, **24**, 689, DOI: 10.3390/molecules24040689.
- 23 X. Bai, J. Wang, X. Mu, J. Yang, H. Liu, F. Xu, Y. Jing, L. Liu, X. Xue, H. Dai, Q. Liu, Y.-M. Sun, C. Liu and X.-D. Zhang, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, **3**(3), 460, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00714.
- 24 G. I. Solyanik, A. G. Fedorchuk, O. N. Pyaskovskaya, O. I. Dasyukevitch, N. N. Khranovskaya, G. N. Aksenov and V. V. Sobetsky, *Exp. Oncol.*, 2004, **26**(4), 307.
- 25 O. Yu. Posudievsky, O. A. Khazieieva, A. S. Kondratyuk, V. V. Cherepanov, G. I. Dovbeshko, V. G. Koshechko and V. D. Pokhodenko, *Nanotechnology*, 2018, **29**, 085704, DOI: 10.1088/1361-6528/aaa381.
- 26 O. Yu. Posudievsky, O. A. Khazieieva, V. V. Cherepanov, G. I. Dovbeshko, A. G. Shkavro, V. G. Koshechko and V. D. Pokhodenko, *J. Mater. Chem. C*, 2013, **1**(39), 6411, DOI: 10.1039/c3tc30856a.
- 27 V. V. Cherepanov, A. G. Naumovets, O. Y. Posudievsky, V. G. Koshechko and V. D. Pokhodenko, *Nano Express*, 2020, **1**, 010004, DOI: 10.1088/2632-959x/ab763a.
- 28 Z. Movasaghi, S. Rehman and Dr I. ur Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2008, **43**(2), 134, DOI: 10.1080/05704920701829043.
- 29 G. I. Dovbeshko, N. Ya. Gridina, E. B. Kruglova and O. P. Pashchuk, *Talanta*, 2000, **53**(1), 233, DOI: 10.1016/S0039-9140(00)00462-8.
- 30 O. P. Repnytska, G. I. Dovbeshko, V. P. Tryndiak, I. M. Todor and D. V. Kosenkov, *Faraday Discuss.*, 2004, **126**, 61, DOI: 10.1039/b304904c.
- 31 G. Dovbeshko, V. Chegel, N. Gridina, O. Repnytska, Yu. Shirshov, V. Tryndiak, I. Todor and G. Solyanik, *Biopolymers*, 2002, **67**(6), 470, DOI: 10.1002/bip.10165.
- 32 O. P. Gnatyuk, G. I. Dovbeshko, A. Yershov, S. O. Karakhim, O. Ichenko and O. Yu. Posudievsky, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 30404, DOI: 10.1039/c8ra05085f.
- 33 K. Eberhardt, C. Matthaus, S. Marthandan, S. Diekmann and J. Popp, *PLoS One*, 2018, **13**(12), e0207380, DOI: 10.1371/journal.pone.0207380.

- 34 J. H. Appel, D. O. Li, J. D. Podlevsky, A. Debnath, A. A. Green, Q. H. Wang and J. Chae, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2016, **2**(3), 361–367, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5b00467.
- 35 L. Dolgov, D. Pidgirnyi, G. Dovbeshko, T. Lebedieva, V. Kiisk, S. Heinsalu, S. Lange, R. Jaaniso and I. Sildos, *Nanoscale Res. Lett.*, 2016, **11**, 197, DOI: 10.1186/s11671-016-1418-5.
- 36 O. Fesenko, G. Dovbeshko, A. Dementjev, Re. Karpicz, T. Kaplas and Y. Svirko, *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, **10**, 163, DOI: 10.1186/s11671-015-0869-4.
- 37 G. Dovbeshko, O. Gnatyuk, O. Fesenko, A. Rynder and O. Posudievsky, *J. Nanophotonics*, 2012, **6**(1), 061711, DOI: 10.1117/1.jnp.6.061711.
- 38 Z. Movasaghi, S. Rehman and Dr I. ur Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2007, **42**(5), 493, DOI: 10.1080/05704920701551530.
- 39 A. Berkdemir, H. Gutiérrez, A. Botello-Méndez, N. Perea-López, A. Elías, C.-I. Chia, B. Wang, V. Crespi, F. López-Urías, J.-C. Charlier, H. Terrones and M. Terrones, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 1755, DOI: 10.1038/srep01755.
- 40 X. Huang, Y. Gao, T. Yang, W. Ren, H.-M. Cheng and T. Lai, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 32236, DOI: 10.1038/srep32236.
- 41 I. O. Polovyi, O. P. Gnatyuk, K. O. Pyrshev, T. O. Hanulia, T. P. Doroshenko, S. A. Karakhim, O. Yu. Posudievsky, A. S. Kondratyuk, V. G. Koshechko and G. I. Dovbeshko, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2021, **1869**(1), 140556, DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140556.
- 42 X. H. Wang, J. Q. Ning, C. C. Zheng, B. R. Zhu, L. Xie, H. S. Wu and S. J. Xu, *J. Mater. Chem. C*, 2015, **3**, 2589, DOI: 10.1039/c5tc00016e.



Research Paper

Dual effect of 2D WS₂ nanoparticles on the lysozyme conformation

I.O. Polovyi^{a,*}, O.P. Gnatyuk^a, K.O. Pyrshev^{a,b}, T.O. Hanulia^{a,e}, T.P. Doroshenko^c, S. A. Karakhim^b, O.Yu. Posudievsky^d, A.S. Kondratyuk^d, V.G. Koshechko^d, G.I. Dovbeshko^a

^a Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Nauky avenue, 46, Kyiv 03028, Ukraine

^b O.V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Leontovycha street, 9, Kyiv 01054, Ukraine

^c V. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Nauky avenue, 41, Kyiv 03028, Ukraine

^d L.V. Pisarzhevsky Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Nauky avenue, 31, Kyiv 03028, Ukraine

^e Institute of Low Temperature and Structure Research of the Polish Academy of Sciences, Okolna street, 2, Wroclaw 50-422, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

α-Helix
β-Sheets (parallel and antiparallel)
Amyloid fibrils
Lysozyme
2D WS₂ particles
IR spectroscopy
Fluorescent spectroscopy

ABSTRACT

In the present work we studied the effect of 2D WS₂ nanoparticles on the conformational changes in lysozyme protein at different pH values (2.0–11.5). The contributions of various structural conformations (α-helix, β-sheets parallel and antiparallel, unordered structure and side groups) were determined by decomposition of Amid I absorbance bands. The 2D WS₂ were shown to have different impact on secondary structure depending on pH of the solution and protein concentration.

The amyloid fibril presence was confirmed with confocal microscopy enhanced by gold support, and fluorescent spectroscopy with amyloid-sensitive dye Thioflavin T. Our data show that WS₂ can both inhibit and stimulate amyloid formation. Additionally, we have also reported an unusual spectroscopic behavior displayed by lysozyme, indicated by narrowing of Amide I and Amide II bands at pH 2.5 and 3.5 when incubated with 2D WS₂ nanoparticles.

1. Introduction

Amyloid fibrils are highly ordered non-covalent protein aggregates that are formed in tissues of living organisms due to various pathologies: oncology, Alzheimer's and Parkinson's diseases, other neurodegenerative disorders, neuropathic amyloidosis, etc. [1]. Clinical symptoms do not usually appear until the last stages of these diseases, which most often occur in middle or old age. More than 20 types of proteins can form amyloids *in vivo*, which are localized in the extracellular as well as intracellular space [2]. The mechanism of fibrils formation and clarification of the interplay between the fibrils appearance and the disease occurrence, as well as the development of pathologies prevention methods are an important task. Amyloid fibrils are structures formed as a result of irreversible conformational transitions within a protein molecule under the influence of certain external conditions — temperature, pH, etc. [3]. The studies performed using various physicochemical methods [3–7] showed that such structures are characterized by an increased amount of antiparallel β-sheets oriented perpendicularly to the axis of the fibrils [8]. Experimental studies of the amyloid fibrils formation are usually carried out under conditions that significantly

differ from normal physiological conditions — low pH values [9], high temperatures (60–90 °C), etc. [10,11].

However, the formation of these structures in a living organism suggests that this process is also possible under other factors, and the presence of various nanoparticles could significantly effect on them.

In recent years, one could see an increased interest to the use of nanoparticles in various fields of biotechnology. Therefore, it became necessary to study their effects on staff, biological structures of various levels and their components, especially when they do not have a direct toxic effect on cell cultures. The nanoparticles are known to be able to change the conformation of biological molecules — proteins [12], DNA [13–15], affect the vital activity of the cells [16]. The data on the carbon nanotubes influence on the amyloid fibrils formation appeared to be controversial, since the results of calculations in [17] indicate the suppression of the fibrils formation, while the experimental data state the opposite [18–20].

Protein conformational changes induced by 2D MoS₂ nanoparticles were described [21] and are believed to be due to strong non-covalent interactions. Due to similar layered structure and properties of MoS₂ and WS₂, we could suppose that both might be able to interact with

* Corresponding author.

E-mail address: ipoliovy@gmail.com (I.O. Polovyi).

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140556>

Received 28 February 2020; Received in revised form 17 July 2020; Accepted 15 October 2020

Available online 17 October 2020

1570-9639/© 2020 Published by Elsevier B.V.

lysozyme molecules S—S bonds causing amyloid formation. In contrast to [22] it was shown that 2D WS₂ obtained with liquid exfoliation, can prevent the polymerization of the A β peptide molecules and destroy previously formed amyloid fibrils.

In this regard, the aim of the present work was to study the effect of WS₂ nanoparticles on the formation of lysozyme amyloids. Unlike most of previous studies, we used relatively low concentration of protein for incubation based on supposition that for initiation of amyloid aggregation small amount of proteins are required. We used hen egg white lysozyme that was previously shown to be suitable for similar tasks [23,24]. For this purpose, we studied the effect of the mechanochemically prepared 2D WS₂ nanoparticles on lysozyme protein as a model for fibrillation in vitro.

In order to detect amyloid structures, confocal microscopy and fluorescent analysis, as well as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) with decomposition of the characteristic bands into components were used to characterize their structure. We used confocal microscopy [25] and gold nanostructured support due to a possibility to obtain a more contrast image in comparison to conventional optical microscopy that was previously confirmed [20,26]. Earlier, in [26] authors obtained a good correspondence between the confocal images of fibrils and the data of atomic force and scanning tunneling microscopy even in the absence of fluorescent amino acids (Trp, Phe, Tyr) in the studied peptide (ValGlyGlyLeuGly), being able to distinguish the finest fibrils with a diameter of tens of nm (despite the fact that the resolution of a confocal microscope for a laser with a wavelength of 405 nm is about 214 nm [25]).

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Aqueous dispersions of 2D WS₂ particles were obtained by the mechanochemical method according to [27]. The 2D WS₂ nanoparticles produced in L.V. Pisarzhevsky Institute of Physical Chemistry of NAS of Ukraine were characterized with AFM microscopy [28]. The thickness of the nanoparticles was 0.6–2.5 nm, and the lateral size was up to 50 nm. As we can see on the confocal image under UV excitation, 2D WS₂ nanoparticles have luminescence in a blue region (Fig. 1 b). The Raman spectrum of 2D WS₂ nanoparticles has two characteristic bands at the 354.7 (A_{1g} mode) and 418.6 (E_{2g}¹ mode) cm⁻¹ region (Fig. 1, c).

Hen egg white lysozyme (HEWL) was obtained from Fluka and used without further purification. HEWL was dissolved in distilled water. The pH of the distilled water used for dissolving HEWL was 5.5. The change of the pH was not observed upon dissolving the protein in the water. Distilled water was purchased from “Darnitsa”.

Usually, high concentration of protein (20 mg/mL) is used for studying of the fibril formation process as described in [29]. It leads to prominent fibril manifestation. However, in real situation both small and big protein concentration could be realized in living organism leading to fibril formation under external or internal stimuli. According to our data at low pH a big protein concentration is preferable for modelling of fibril formation and for observing of 2D WS₂ nanoparticles influence on the process. In the study we compared the effect of the protein and WS₂ concentration on the fibril formation. In addition, samples with intermediate acidity, pH 2.5 and pH 3.5, were prepared (protein concentration 1 mg/mL).

Then aqueous HCl or KOH solution was added in order to change the pH to a certain value (2.0–11.5). For experiment, we used HCl with concentration of 0.1 M, and KOH with the concentration of 1 M. After setting the pH, a dispersion of 2D WS₂ particles (6 μ g/mL) was added to the HEWL solution, and then the solution was incubated at room temperature for 5 days at pH 11.5, 2.5 and 3.5. Next set of samples with pH 2.0 was incubated at 90 °C for 24 h according to [30].

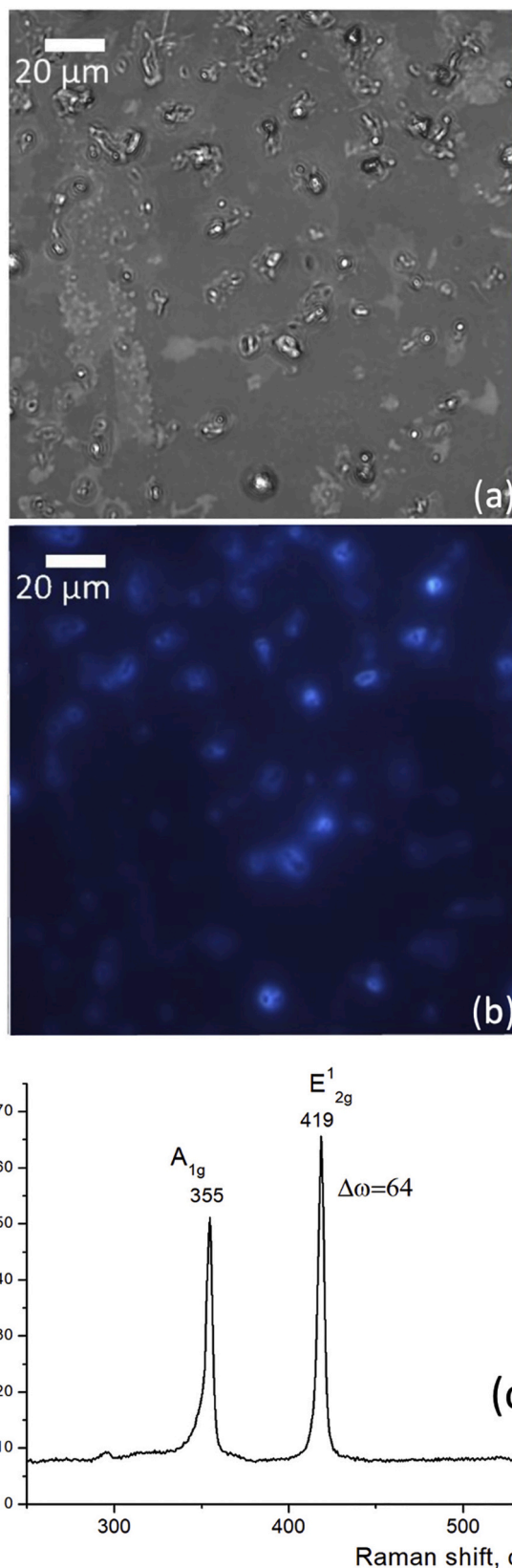


Fig. 1. Confocal microscopy images of WS₂ nanoparticles on a gold substrate; (a) transmission (excitation was provided by 405 nm diode laser) and (b) fluorescent (excitation 365 nm, Hg lamp HBO-100) images of 2D WS₂ nanoparticles; (c) Raman spectrum of 2D WS₂ nanoparticles, $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm.

2.2. Infrared spectroscopy

For spectral and microscopic studies, pure HEWL and HEWL@2D WS₂ samples were deposited on CaF₂ substrates (for FTIR spectroscopy) and then dried. FTIR spectra were registered at the 800–4000 cm⁻¹ region by IFS-66 Bruker spectrometer with resolution of 0.5 cm⁻¹. Reproducibility of the frequency and absorbance of the IR spectra was 0.5 cm⁻¹ and 0.05 respectively. Decomposition of the spectral bands was performed with PeakFit v4 software. We used the same model for fitting Amide bands for both proteins: with and without nanoparticles. The peak position of the absorption bands was estimated with the second derivative method and/or the standard method. All spectra were baseline-corrected and normalised by intensity of Amide I band about 1650 cm⁻¹.

2.3. Infrared spectra decomposition

Since band position of biological molecules for different conformations varies in range of 1–3 cm⁻¹, the redistribution of these molecular vibrations is of the most interest. The vibrational bands of biological molecules can be overlapped; therefore, the calculation of intensity and FWHM decomposition method was used. The calculation was performed with Levenberg–Marquardt algorithm.

The position of components was determined with second derivative method according to the features of the experimental curve. Assignment of protein secondary structure bands was performed according to [31–34]. For spectra fitting, the same decomposition model was used; however, the number of bands within the spectra was taken into account.

2.4. Confocal microscopy

Confocal laser scanning microscope Carl Zeiss LSM-510 META with LD Plan-Neofluor 40×/0.6 Korr air or 63×/0.75 Korr air objectives were used to obtain confocal images. For excitation ultraviolet mercury lamp HBO-103 W/2 or diode lasers ($\lambda = 405$ nm, 30 mW), Ar laser ($\lambda = 488$ nm, 30 mW) and HeNe lasers ($\lambda = 543$ nm, 1.2 mW and $\lambda = 633$ nm, 5 mW) were used. Emission signal was collected by band-pass filters of 420–480 nm, 505–570 nm, 561–615 nm, 657–754 nm.

For confocal microscopy, gold substrate is used for visualization of macromolecules (and for amyloid structures in particular [26,35]). Samples were deposited on rough gold substrate (glass scales covered with thin (20–30 nm) gold film) and dried. This layer is made by vacuum thermal deposition of pure gold (0.99999) on glass previously covered with 5 nm adhesive Chromium.

2.5. Fluorescence analysis

Thioflavin T (ThT) as a specific dye for amyloid fibrils was used. It provides an amyloid detection mechanism that differs from other fluorescent dyes. Unlike Congo red or methyl violet (so-called direct dyes), ThT has not only high affinity to amyloid structures, but also it changes its fluorescent properties upon binding with amyloid structures [36]. According to [37], at the excitation maximum of 350 nm and emission maximum of 438 nm ThT has faint fluorescence while in the absence of amyloids. However, when amyloid structures are present, excitation and emission maxima shift to 450 and 482 nm, respectively [38].

Thioflavin T (Sigma-Aldrich T3516) was kindly provided by Dr. Kanyuk M. I. (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine). After the incubation, samples were diluted to concentration of protein 7.5 mg/mL and ThT was added to the sample. The concentration of ThT in the sample was 4 μ M.

Then these samples were analyzed with PTI QuantaMaster 40 UV VIS spectrofluorometer. High power Xenon arc lamp served as a source of light with Czerny-Turner design monochromators. Emission range from 185 nm to 680 nm with wavelength accuracy of ± 0.5 nm was used. PTI

FelixGX software provided processing of acquired data.

To quantify the response of ThT in response to amyloid structures or 2D WS₂, the maximum of its fluorescence intensity was used.

Ezodo PP-203 with a flat electrode for analysis of low sample volumes was used for pH measurements with the precision of 0.01.

3. Results and discussion

3.1. Infrared spectroscopy

The FTIR spectroscopy data were analyzed in detail in the region of Amide I and Amide II bands accordingly to [31–34]. The amide group bonds contribute to these bands: Amide I band is mainly due to C=O stretching vibrations (up to 85%) and C–N (10–20%) bonds; for Amide II, the maximum contribution is made by the deformation vibrations of N–H (40–60%) and stretching vibrations of C–N (18–40%) bonds. These bands are conformational sensitive and are used to analyze three-dimensional structure of the protein. However, the Amide II band, due to its less intensity, is used rarely in conformational analysis [32]; moreover, Amide II band may even be absent in some cases [39]; however, it is still a point for discussion.

HEWL is a single-chained protein that has 129 amino acids. Secondary structure of native HEWL includes four alpha-helices (plus one 3₁₀ helix) and five antiparallel β -sheets [40]. In the Fig. 2, Amide I, II bands the FTIR spectra of native HEWL protein is presented. Alpha helix contributing is the most significant (1655 cm⁻¹), whereas β -sheet contribution is (1688 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹).

For amyloid fibrils acquisition two different pH were used: highly acidic medium (pH = 2), and alkaline medium (pH 11.5). pH 2 is a common condition for numerous amyloid fibrils acquisition techniques. pH = 11.5 was selected due to its proximity to HEWL isoelectric point (pH = 11.3). Amyloid fibrils are mostly antiparallel β -structures; therefore, signal from this particular conformation is the most important for amyloid fibrils presence monitoring. Protein antiparallel β -sheets has two characteristic regions within Amide I: 1619–1627 cm⁻¹ and 1692–1698 cm⁻¹ [31–34]. According to the FTIR data (Fig. 3) for both samples obtained at either pH = 2 or 11.5 the most predominant conformation is α -helix. However, in sample obtained at pH = 2, antiparallel β -structure has maximum at 1626 cm⁻¹ (Fig. 3 a and c), whereas at pH = 11.5, its maximum is at 1695 cm⁻¹ (Fig. 3b).

At pH = 2, protein samples incubated with WS₂ show significant difference between HEWL and HEWL@WS₂ (Fig. 3): the intensity of antiparallel β -sheet band was higher when WS₂ was present while incubation. It evidences that due to WS₂ nanoparticles, the amount of

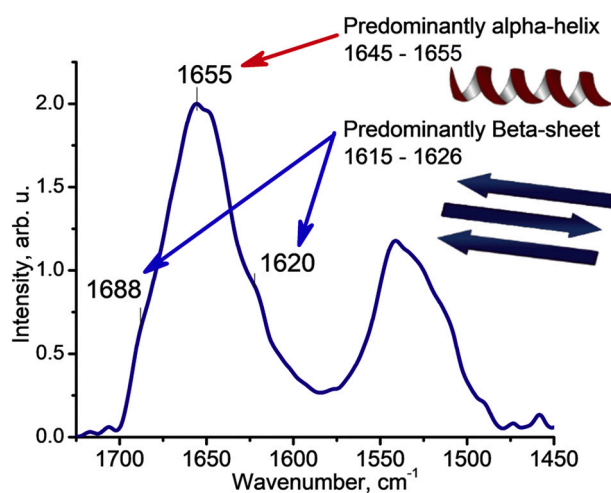


Fig. 2. Amide I and Amide II bands of native protein FTIR spectrum. Secondary structure of the protein.

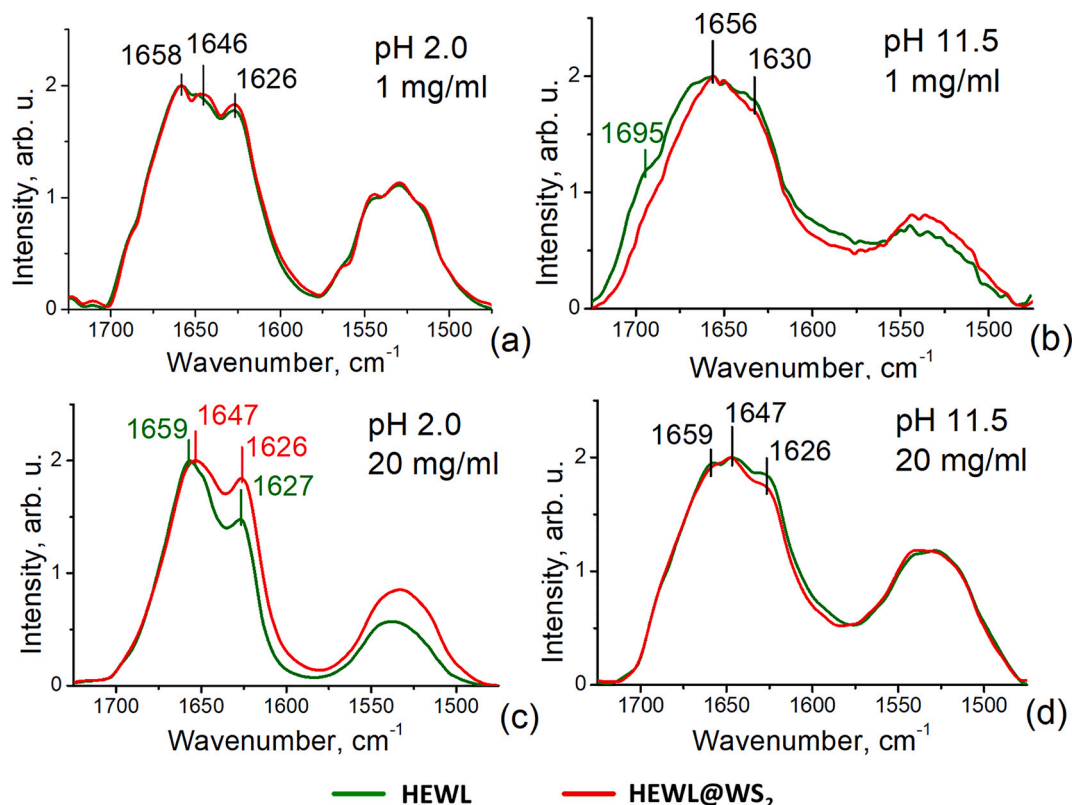


Fig. 3. FTIR spectra of HEWL and HEWL@WS₂ samples at pH = 2 and pH = 11.5, at different initial protein concentrations (1 mg/ml and 20 mg/ml).

antiparallel β -sheets was increased in the sample. At pH = 11.5 however, the reverse effect was observed: the characteristic band at 1695 cm^{-1} is almost absent when WS₂ nanoparticles was present while incubation.

3.2. FTIR spectra decomposition

The decomposition of Amide I band in the FTIR spectra of HEWL and HEWL@2D WS₂ samples into components allowed us to estimate the contribution of each conformation in the structure of HEWL. This procedure was carried out according to [31–34] as noted in Table 1. The results of this decomposition for the spectra are shown in Figs. 4 and 5. As it was stated above, the high amount of anti-parallel β -sheets is a distinctive feature of amyloid fibrils. Thus, the spectral bands related to this structure, are considered as the markers of amyloid fibrils.

The Amide I of the spectra was decomposed onto seven or six approximation curves according to model described in the previous Section 3.1. Each curve corresponds to certain conformational state of the polypeptide chain. Maximum position, FWHM, and relative height of each approximation curve were set in accordance to [31].

The contribution of antiparallel β -conformation was decreased at pH 11.5 at low and high concentration (for 3.3% and 2.18%, respectively); at pH 2.0 the contribution of antiparallel β -sheets was slightly decreased at low concentration (for 0.98%) and increased at high protein

Table 1

Assignment of absorbance bands to protein secondary structure a region of Amide I According to [31–34].

Secondary structure assigned	Frequency
α -Helix	1645–1655
Parallel β -sheet	1669–1678
Antiparallel β -sheet	1615–1626; 1687–1699
Unordered	1655–1665
Side groups	<1610; >1699

Bolded values indicates Antiparallel β -sheet

Table 2a

Secondary structure contribution of HEWL and HEWL@WS₂ at pH 2.0 (concentration 1 mg/mL).

Structure	HEWL	HEWL@WS ₂	Difference
α -Helix	20.26%	20.78%	0.52%
Antiparallel β -sheet	27.22%	26.24%	–0.98%
Parallel β -sheet	24.81%	25.47%	0.66%
Unordered	22.20%	23.08%	0.88%
Side groups	5.51%	4.60%	–0.91%

Bolded values indicates Antiparallel β -sheet

concentration for 2.85% (Table 4).

Results obtained with decomposition show difference in contribution of characteristic antiparallel β -structure while in the presence of WS₂. (Table 4). Inhibition of amyloid fibril formation with WS₂ was described in [41] and with similar 2D graphene-like material MoS₂ [24]. However, in mentioned works pH is not taken into an account.

Amyloid structure is considered to be the most energetically favorable conformation for a number of proteins at relatively high protein concentration [42,43] (See Fig. 6). According to nucleation theory [42], the initial stages of monomer association into small oligomers are energetically unfavorable, but only upon reaching sufficient size, the addition of following monomer becomes favorable. WS₂ nanoparticles can absorb proteins on its surface bringing together number of monomers, thus initial energetically unfavorable polymerization. We suppose that 2D WS₂ nanoparticles, similarly to graphene oxide [44], can form protein corona with high surface area.

3.3. FWHM narrowing

Intriguingly, full width at half maximum (FWHM) of the Amide I band for HEWL@2D WS₂ in separate cases is lower than those without WS₂ (Fig. 7). The narrowing of the band (up to 25%) was observed in the

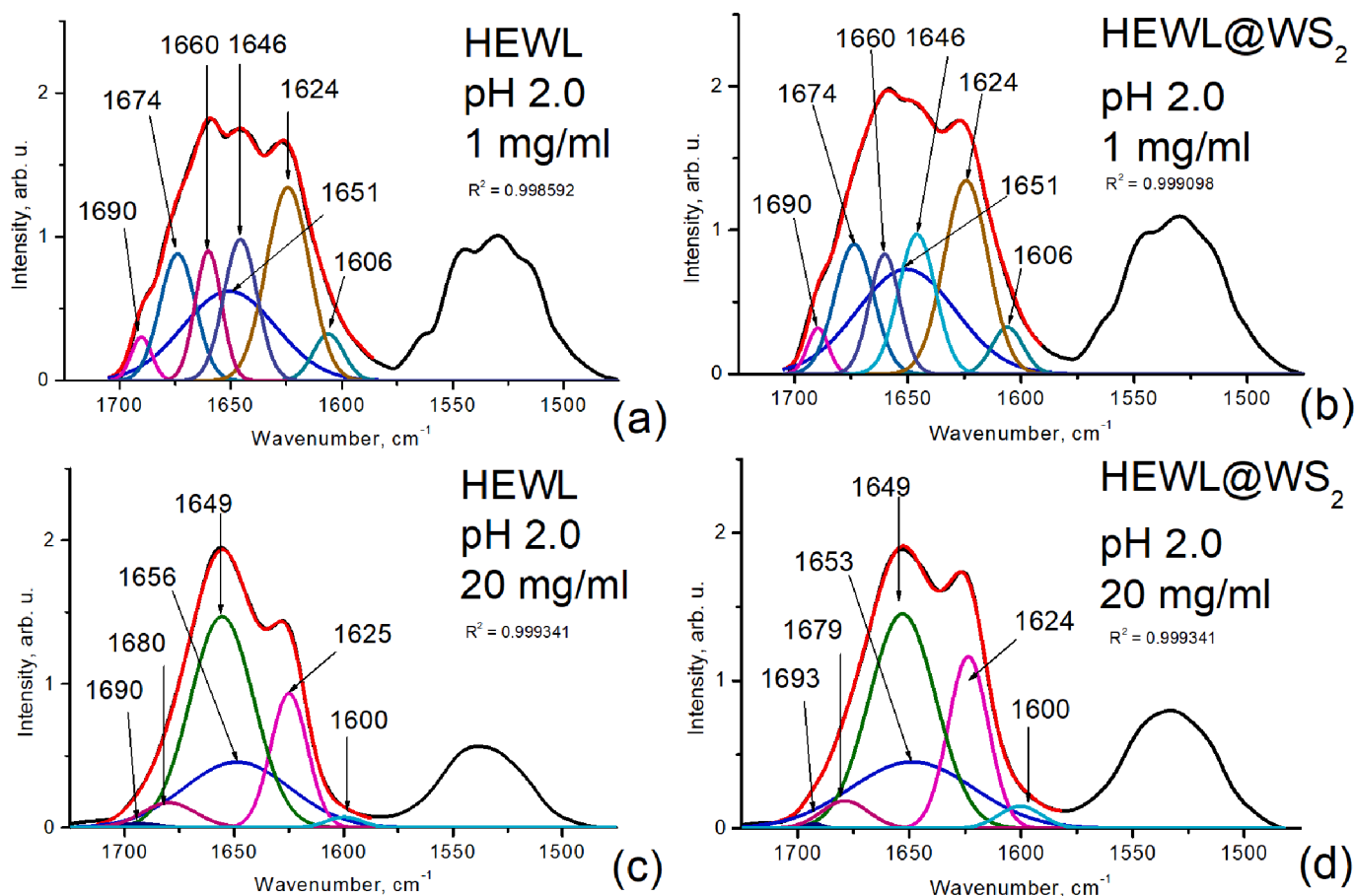


Fig. 4. Decomposition of Amide I band of FTIR spectra of HEWL and HEWL@2D WS₂ samples at pH 2.0.

sample with 3.5 pH and WS₂ present while incubation. We suppose that this effect was induced by surface of 2D nanoparticles similar to discussed in [45] and such behavior of proteins is connected with its ordering on the WS₂ support. The surface strain of WS₂ nanoparticles in acidic medium can modify the surface dipole resulting in a polarization, so protein molecules are oriented on the WS₂ surface. Different pH or higher temperature disturb the orientation of the molecules or even cause the protein denaturation.

3.4. Fluorescent analysis

Application of Thioflavin T (ThT) is considered as the classic approach for amyloid fibrils investigation [46]. Since ThT is fluorescent dye, we used respective fluorescence analysis to determine the presence of amyloid structures (Fig. 8).

Indeed, the increase of ThT concentration results in increase of its fluorescent signal, while the 2D WS₂ nanoparticles decrease the emission of ThT in concentration-dependent manner (Fig. 9). This effect is based on WS₂ ability to promote both static and dynamic quenching [47] and in this way influence the signal of fluorescent probes.

Thus, even if 2D WS₂ nanoparticles influence amyloid formation from HEWL decreasing the fluorescence intensity of ThT, the quenching does not allow to monitor this effect in correct manner. Therefore, the implementation of this technique might cause false positive results. The similar effect was observed in [41] with MoS₂, another 2D nanomaterial similar to WS₂. So, only the fluorescent probe-independent approaches may be used for analysis of the influence of 2D WS₂ on β -amyloid structures.

3.5. Confocal microscopy

The use of confocal microscopy allows obtaining more contrast image compared to conventional optical microscopy. According to Rayleigh's criterion [48], the resolution limit (20% intensity decrease of its maximum value) in the case of a conventional optical microscope is:

$$r_{convent} = 0.61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin\theta} = 1.22 \frac{\lambda'}{D} F \quad (1)$$

At the same time, the resolution limit of the confocal microscope is 26% [25]:

$$r_{confocal} = 0.44 \frac{\lambda}{n \cdot \sin\theta} = 0.88 \frac{\lambda'}{D} F, \text{ where } \lambda' = \frac{\lambda}{n}.$$

On the other hand, according to Nyquist criteria [49] for digital resolution, the smallest resolved objects should have approximately 2.3 pixels. The confocal images of HEWL samples are presented in Fig. 10. In the 2D WS₂ nanoparticles-free sample characteristic elongated structures at high (11.5) pH were present. We suppose that these structures correspond to amyloid aggregates. According to confocal microscopy resolution (Eq. 1), for wavelength of 405 nm, optical resolution of obtained images is

$$r_{confocal} = 0.44 \frac{\lambda}{NA} = 237.6 \text{ nm, for } 40 \times / 0.6$$

$$r_{confocal} = 0.44 \frac{\lambda}{NA} = 190.8 \text{ nm, for } 63 \times / 0.75$$

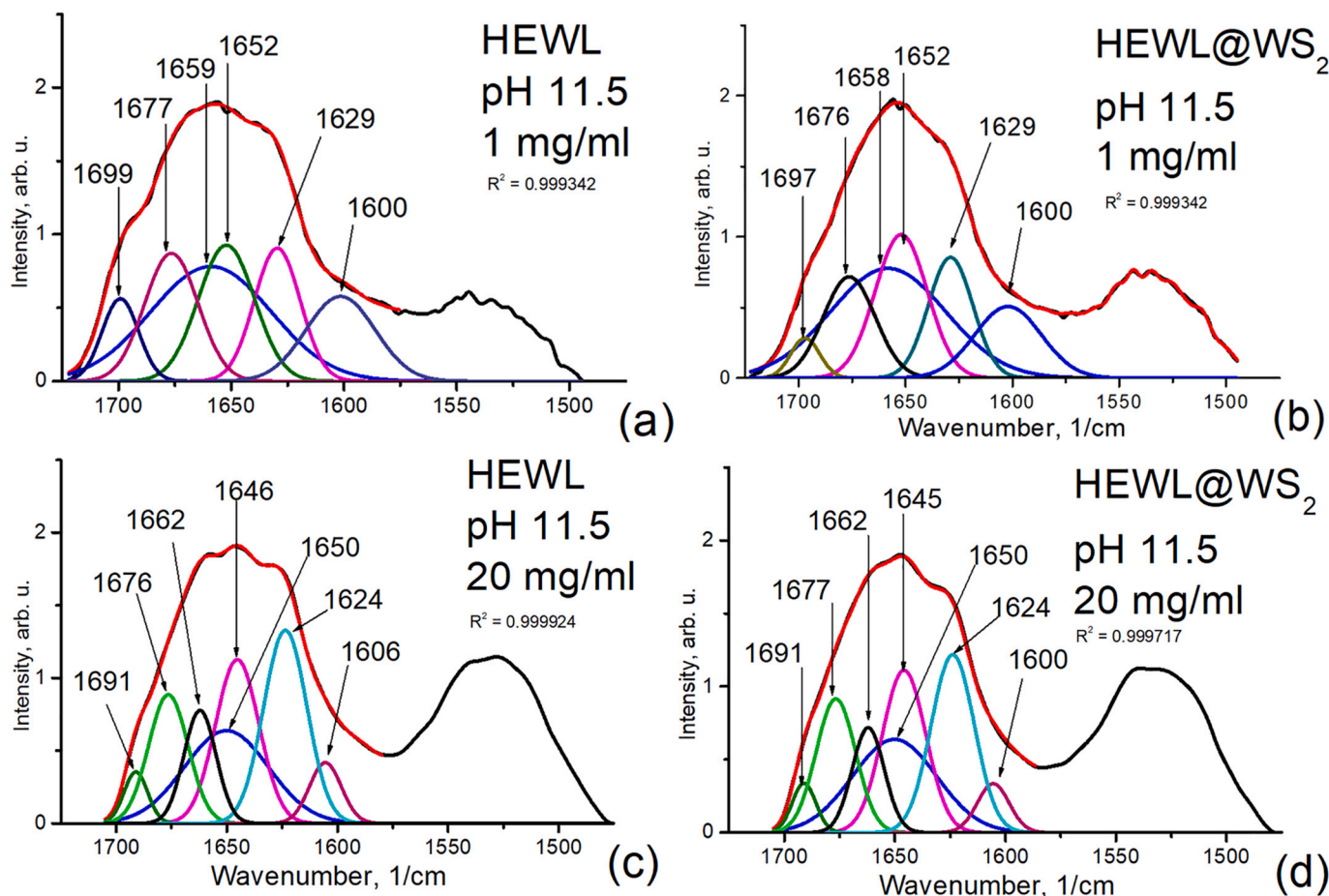


Fig. 5. Decomposition of Amide I band of FTIR spectra of HEWL and HEWL@2D WS₂ samples at pH 11.5.

Table 2b

Secondary structure contribution of HEWL and HEWL@WS₂ at pH 2.0 (concentration 20 mg/mL).

Structure	HEWL	HEWL@WS ₂	Difference
α-Helix	48.82%	45.30%	-3.52%
Antiparallel β-sheet	18.64%	21.49%	2.85%
Parallel β-sheet	5.40%	3.89%	-1.51%
Unordered	25.84%	26.32%	0.48%
Side groups	1.30%	3.00%	1.70%

Bolded values indicates Antiparallel β-sheet

Table 3a

Secondary structure contribution difference between HEWL and HEWL@WS₂ at pH 11.5 (concentration 1 mg/mL).

Structure	HEWL	HEWL@WS ₂	Difference
α-Helix	17.68%	20.41%	2.73%
Antiparallel β-sheet	21.07%	17.77%	-3.30%
Parallel β-sheet	15.82%	14.33%	-1.49%
Unordered	31.88%	34.49%	2.61%
Side groups	13.55%	13.00%	-0.55%

Bolded values indicates Antiparallel β-sheet

where NA is numerical aperture of the objective, λ is wavelength. Image of the object can be used to estimate its location in nanometers, although the actual size of the object might be far beyond the resolution limit [50]. The smallest visible aggregates on Fig. 10 are approximately 0.58 μ m in diameter. The aggregates visible on images seem to be composed of small,

Table 3b

Secondary structure contribution difference between HEWL and HEWL@WS₂ at pH 11.5 (concentration 20 mg/mL).

Structure	HEWL	HEWL@WS ₂	Difference
α-Helix	15.03%	14.71%	-0.32%
Antiparallel β-sheet	29.22%	27.04%	-2.18%
Parallel β-sheet	25.05%	24.75%	-0.30%
Unordered	26.20%	29.35%	3.15%
Side groups	4.50%	4.15%	-0.36%

Bolded values indicates Antiparallel β-sheet

Table 4

Generalization of Tables 2a, 2b, 3a and 3b. Change of antiparallel β-structure contribution according to FTIR spectroscopy.

	Low pH (2.0)	High pH (11.5)
Low protein concentration (1 mg/mL)	Inhibited (-0.98%)	Inhibited (-3.30%)
High protein concentration (20 mg/mL)	Promoted (+2.85%)	Inhibited (-2.18%)

Bolded values indicates Antiparallel β-sheet

Confocal microscopy, although does not possess resolution necessary to distinguish individual fibrils, allows to assess aggregated amyloid structures (Fig. 10). In all samples at pH 11.5 we see characteristic elongated structures regardless of 2D WS₂ nanoparticles in the sample. At low pH, however, different type of aggregations was registered (Fig. S4).

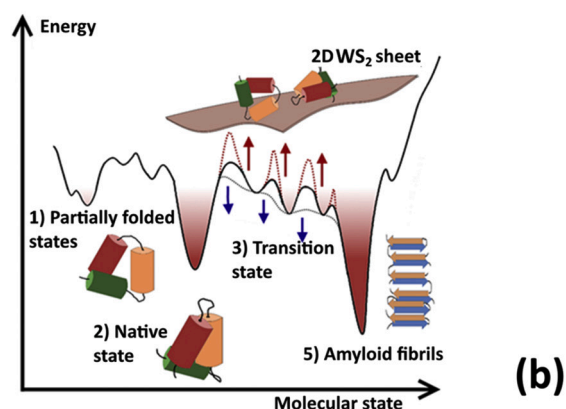
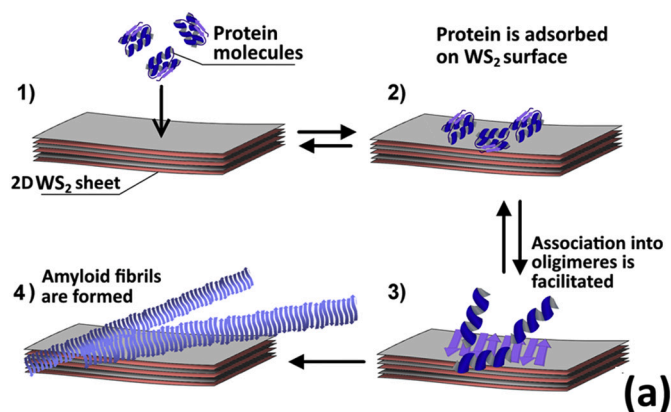


Fig. 6. Protein molecules adsorbed on the surface of WS₂ nanosheets may form protein corona, thus bringing sufficient amount of monomers for amyloid fibril formation initialization (a); protein energetic states and its conformations. WS₂ can either keep the protein in transition state, or facilitate its transition by changing activation barrier (b).

4. Conclusion

In this work, the 2D WS₂ nanoparticles interaction with HEWL and their effect on amyloid fibril formation was studied. Nanoparticles were shown to have double effect on amyloid fibril formation. According to FTIR data and spectra decomposition, at pH = 2.0 and protein concentration 20 mg/ml, the amount of antiparallel β -sheet was increased when WS₂ nanoparticles were present while incubation. We suggest that when protein molecules are adsorbed 2D material with high surface area, the formation of amyloid oligomers are more favorable. At pH = 11.5, however, antiparallel β -sheet contribution was decreased both at high and low concentration of protein. In this case, the proximity of HEWL isoelectric point (pH = 11.3) seems to have the most significant impact on the phenomenon. The mechanism of the effect, however, have not been studied yet. It is also worth noting that we obtained amyloid fibrils at high (pH = 11.5) at extremely low concentration of protein 1 mg/ml, whereas usually 20 mg/ml concentration is used for incubation. In addition, with confocal microscopy we obtained images of elongated structures which supposedly are of amyloid nature. Overall results indicate that the effect of 2D WS₂ nanoparticles depends on pH and protein concentration, and might be used further on for modulation of amyloid fibril formation.

Credit author statement

I.P, T.H. and O.G. performed sample preparation and FTIR experiments. Infrared spectra were analyzed by G.D., I.P, T.H. and O.G. G.D. designed and performed the main experiments. K.P. and I.P. performed experiments, processed and interpreted data of Fluorescent Analysis. S.

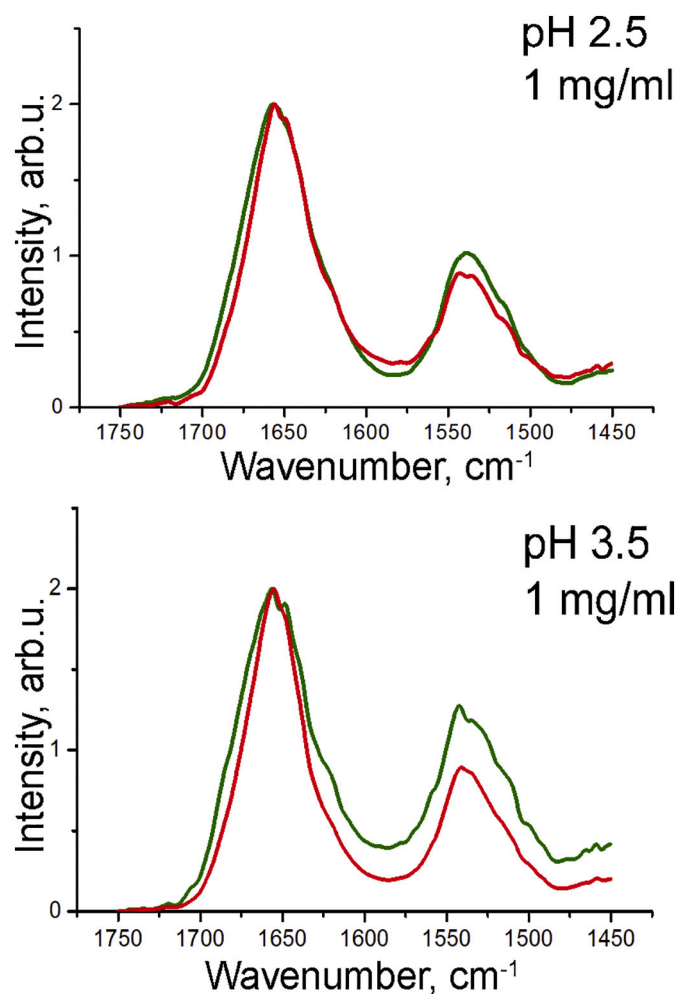


Fig. 7. FTIR spectra of HEWL and HEWL@2D WS₂ samples at pH = 2.5 and = 3.5 (protein concentration 1 mg/mL).

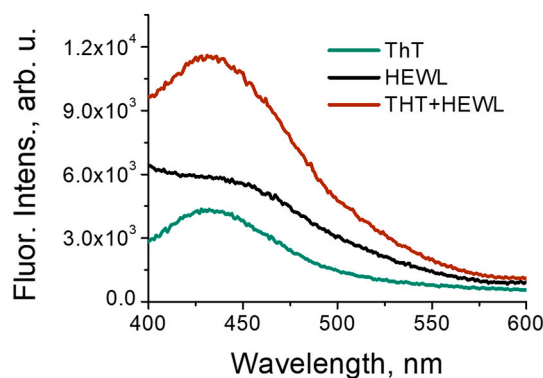


Fig. 8. Fluorescence analysis of 4 μ M ThT signal in presence and absence of 7.5 mg/mL HEWL. Excitation wavelength was 340 nm.

K., T.D. and T.H. obtained and interpreted confocal microscopy data. T. D. Produced substrate for confocal microscopy. O.P., A.K. and V.K. produced and characterized 2D WS₂ nanoparticles. G.D. supervised and wrote the manuscript with contributions from O.G., K.P., and I.P. All authors contributed to data analysis and interpretation of results. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

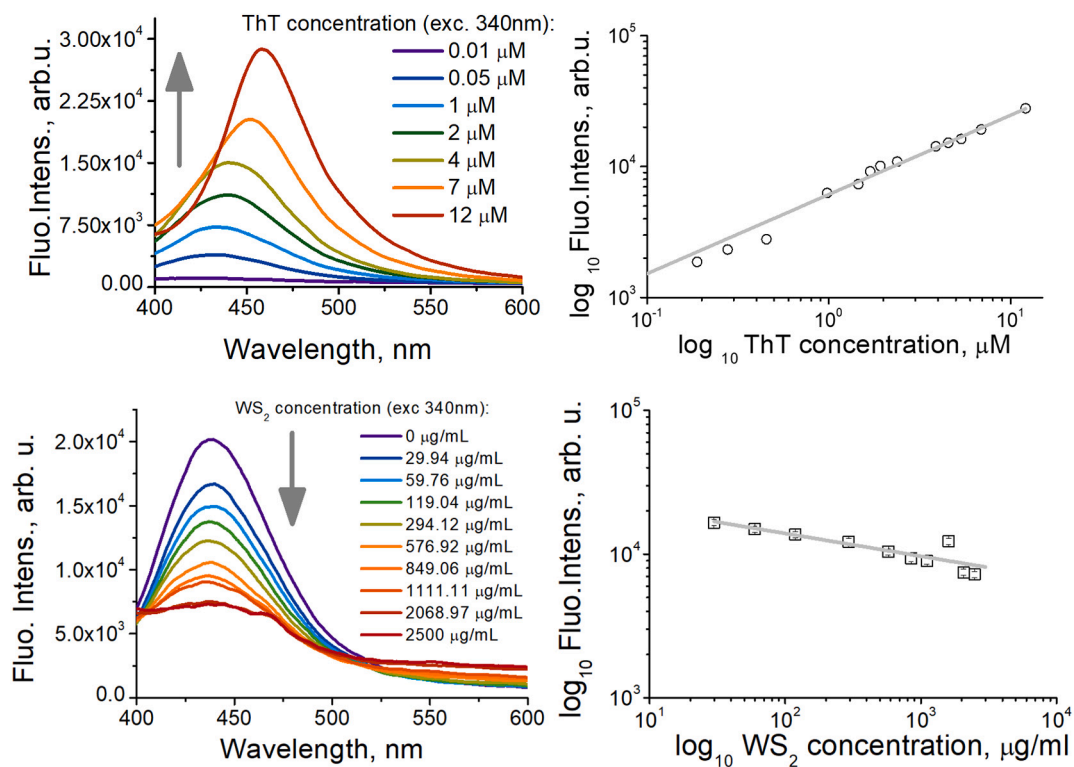


Fig. 9. Fluorescence spectra of pure ThT and ThT with 2D WS2. (a) Influence of ThT concentration on its fluorescence intensity and (b) its quantitative analysis. (c) Influence of 2D WS2 concentration on the fluorescence intensity of ThT and (d) its quantitative analysis. Excitation wavelength was 340 nm.

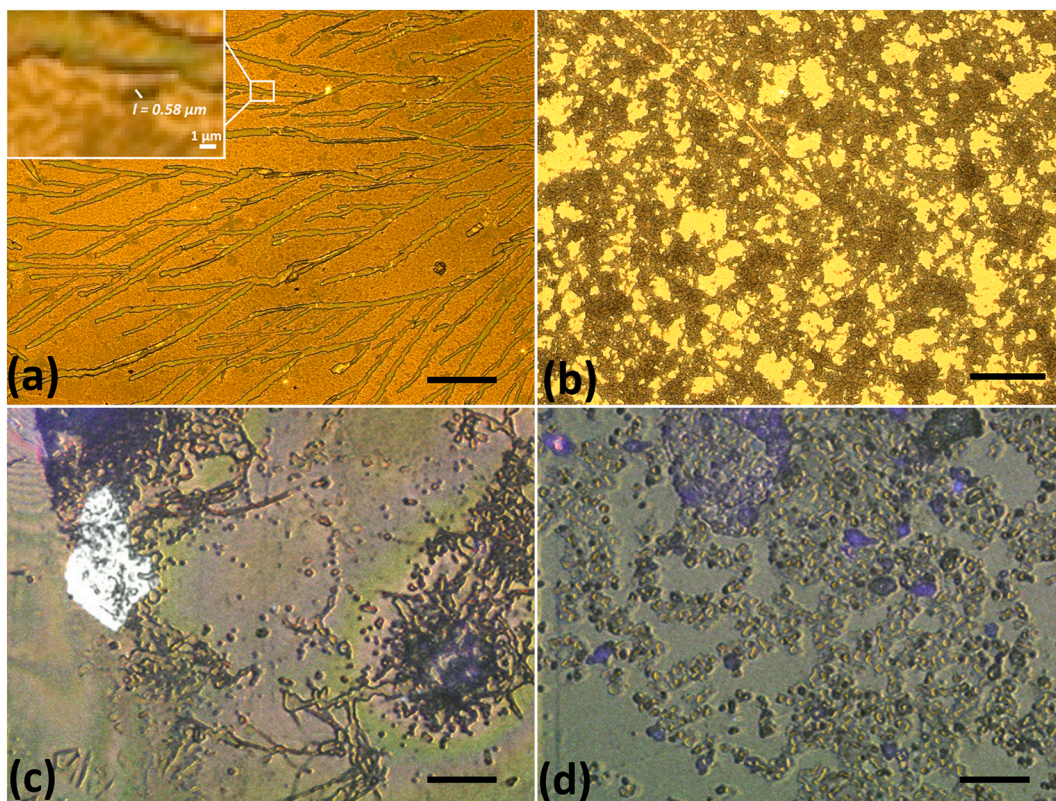


Fig. 10. Confocal image of HEWL (a) and HEWL@2D WS2 (b) obtained at pH = 11.5, initial protein concentration 1 mg/ml, and room temperature during incubation. Confocal image of HEWL (c) and HEWL@2D WS2 (d) obtained at pH = 2, initial protein concentration 1 mg/ml, and room temperature during incubation. Scale bar 50 μm.

Funding

The work was supported by the project "Development of 2D materials and "smart" sensors for medical and biological purposes based thereon" of the Targeted Program of scientific research of the National Academy of Sciences of Ukraine "Smart" sensory devices of a new generation based on modern materials and technologies" No.11/1-2020. Also this work was supported by NATO Science for Peace and Security Programme-SPS No. 985291, the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreements No. 690853.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are grateful Dr. M. Kanyuk (Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine) for assistance in fluorescence data acquisition and processing. Dr. A. S. Nikolenko (Institute of Semiconductor Physics of the NAS of Ukraine) is acknowledged for assistance in acquisition and processing Raman spectra.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140556>.

References

- [1] A.R. Lam, J. Jiang, S. Mukamel, Distinguishing amyloid fibril structures in Alzheimer's disease (AD) by two-dimensional ultraviolet (2DUV) spectroscopy, *Biochemistry* 50 (45) (2011) 9809–9816, <https://doi.org/10.1021/bj201317c>.
- [2] C.Y. Lin, T. Gurlo, R. Kaye, A.E. Butler, L. Haataja, C.G. Glabe, P.C. Butler, Toxic human islet amyloid polypeptide (h-IAPP) oligomers are intracellular, and vaccination to induce anti-toxic oligomer antibodies does not prevent h-IAPP-induced β -cell apoptosis in h-IAPP transgenic mice, *Diabetes* 56 (5) (2007) 1324–1332, <https://doi.org/10.2337/db06-1579>.
- [3] R.N. Rambaran, L.C. Serpell, Amyloid fibrils: abnormal protein assembly, *Prion* 2 (3) (2008) 112–117, <https://doi.org/10.4161/pri.2.3.7488>.
- [4] Y. Zou, W. Hao, H. Li, Y. Gao, Y. Sun, G. Ma, New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 9834–9843, <https://doi.org/10.1021/jp504201k>.
- [5] G. Zandomeni, M.R.H. Krebs, M.G. McCammon, M. Fändrich, FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils, *Protein Sci.* 13 (12) (2009) 3314–3321, <https://doi.org/10.1110/ps.041024904>.
- [6] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 333–366, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.
- [7] O.S. Makin, L.C. Serpell, Structures for amyloid fibrils, *FEBS J.* 272 (23) (2005) 5950–5961, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x>.
- [8] R. Riek, D.S. Eisenberg, The activities of amyloids from a structural perspective, *Nature* 539 (7628) (2016) 227–235, <https://doi.org/10.1038/nature20416>.
- [9] B. Morel, L. Varela, A.I. Azuaga, F. Conejero-Lara, Environmental conditions affect the kinetics of nucleation of amyloid fibrils and determine their morphology, *Biophys. J.* 99 (11) (2010) 3801–3810, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.039>.
- [10] M. Holley, C. Eginton, D. Schaefer, L.R. Brown, Characterization of amyloidogenesis of hen egg lysozyme in concentrated ethanol solution, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (1) (2008) 164–168, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.018>.
- [11] G. Gorbenko, V. Trusova, R. Sood, J. Molotkovsky, P. Kinnunen, The effect of lysozyme amyloid fibrils on cytochrome c-lipid interactions, *Chem. Phys. Lipids* 165 (7) (2012) 769–776, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.10.001>.
- [12] G.I. Dovbeshko, O.M. Fesenko, E.D. Obratsova, K.R. Allakhverdiev, A.E. Kaja, Conformation analysis of nucleic acids and proteins adsorbed on single-shell carbon nanotubes, *J. Struct. Chem.* 50 (5) (2009) 954–961, <https://doi.org/10.1007/s10947-009-0142-8>.
- [13] G.I. Dovbeshko, O.P. Repnytska, E.D. Obratsova, Y.V. Shtogun, DNA interaction with single-walled carbon nanotubes: a SEIRA study, *Chem. Phys. Lett.* 372 (3–4) (2003) 432–437, [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(03\)00429-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(03)00429-9).
- [14] G.I. Dovbeshko, O.P. Repnytska, E.D. Obratsova, Y.V. Shtogun, E.O. Andreev, Study of DNA interaction with carbon nanotubes, *Semiconductor Physics Quantum Electronics & Optoelectronics* 6 (1) (2003) 105–108.
- [15] G.I. Dovbeshko, O.P. Gnatyuk, V.I. Chegel, Y.M. Shirshov, D.V. Kosenkov, E.A. Andreev, H.A. Tajmir-Riahi, P.M. Lytvyn, Gold and Colloidal Gold Surface Influence on DNA Conformational Change, *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics* 7 (3) (2004) 318–325.
- [16] O.P. Gnatyuk, G.I. Dovbeshko, A. Yershov, S.O. Karakhim, O. Ilchenko, O. Y. Posudievsky, 2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker and drug delivery system with protection properties, *RSC Adv.* 8 (53) (2018) 30404–30411, <https://doi.org/10.1039/c8ra05085f>.
- [17] J. Guo, J. Li, Y. Zhang, X. Jin, H. Liu, X. Yao, Exploring the influence of carbon nanoparticles on the formation of β -sheet-rich oligomers of IAPP22-28 peptide by molecular dynamics simulation, *PLoS One* 8 (6) (2013) e65579, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065579>.
- [18] H. Li, Y. Luo, P. Derreumaux, G. Wei, Carbon nanotube inhibits the formation of β -sheet-rich oligomers of the Alzheimer's amyloid- β (16–22) peptide, *Biophys. J.* 101 (9) (2011) 2267–2276, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.046>.
- [19] L. Xie, D. Lin, Y. Luo, H. Li, X. Yang, G. Wei, Effects of hydroxylated carbon nanotubes on the aggregation of A β 16–22 peptides: a combined simulation and experimental study, *Biophys. J.* 107 (8) (2014) 1930–1938, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.034>.
- [20] M. Olenchuk, O. Gnatyuk, G. Dovbeshko, I. Polovyi, S. Karakhim, Do carbon nanotubes inhibit or promote amyloid fibrils formation? *Biophys. Bull.* (42) (2019) 113–126, <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-04>.
- [21] S. Du, Q. Wang, X. Yang, K. Wang, L. Liu, Q. Li, Z. Li, Acceleration of hen egg white lysozyme amyloid fibrillation by single- or few-layer molybdenum disulfide nanosheets, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 17 (5) (2017) 2892–2898, <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13072>.
- [22] A.K. Buell, C.M. Dobson, T.P.J. Knowles, The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation, *Essays Biochem.* 56 (2014) 11–39, <https://doi.org/10.1042/bse0560011>.
- [23] Y. Wakuda, S. Nishimoto, S.I. Suye, S. Fujita, Native collagen hydrogel nanofibers with anisotropic structure using core-shell electrospinning, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24700-9>.
- [24] M. Li, A. Zhao, K. Dong, W. Li, J. Ren, X. Qu, Chemically exfoliated WS2 nanosheets efficiently inhibit amyloid β -peptide aggregation and can be used for photothermal treatment of Alzheimer's disease, *Nano Res.* 8 (10) (2015) 3216–3227, <https://doi.org/10.1007/s12274-015-0821-z>.
- [25] R.H. Webb, Confocal optical microscopy, *Rep. Prog. Phys.* 59 (3) (1996) 427–471, <https://doi.org/10.1088/0034-4885/59/3/003>.
- [26] L.L. Del Mercato, P.P. Pompa, G. Maruccio, A. Della Torre, S. Sabella, A.M. Tamburro, R. Cingolani, R. Rinaldi, Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (46) (2007) 18019–18024, <https://doi.org/10.1073/pnas.0702843104>.
- [27] O.Y. Posudievsky, O.A. Khazieva, A.S. Kondratyuk, V.V. Cherepanov, G. I. Dovbeshko, V.G. Koshechko, V.D. Pokhodenko, Liquid exfoliation of mechanochemically nanostructured tungsten disulfide to a graphene-like state, *Nanotechnology* 29 (8) (2018) 085704, <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaa381>.
- [28] V.V. Cherepanov, A.G. Naumovets, O.Y. Posudievsky, V.G. Koshechko, V. D. Pokhodenko, Self-assembly of the deposited graphene-like nanoparticles and possible nanotrack artefacts in AFM studies, *Nano Express.* 1 (1) (2020) 010004, <https://doi.org/10.1088/2632-959X/AB763A>.
- [29] P. Sharma, N. Verma, P.K. Singh, S. Korpole, Ashish, Characterization of heat induced spherulites of lysozyme reveals new insight on amyloid initiation, *Sci. Rep.* 6 (2016), 22475, <https://doi.org/10.1038/srep22475>.
- [30] M. Charnley, J. Gilbert, O. Jones, N. Reynolds, Preparation of amyloid fibril networks, *Bio-Protocol* 8 (4) (2018), <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2733>.
- [31] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.-M. Ruyschaert, Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Springer, Boston, 1994, pp. 405–450.
- [32] C. Pérez, K. Griebenow, Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the thermal denaturation of hen egg-white lysozyme dissolved in aqueous buffer and glycerol, *Biotechnol. Lett.* 22 (23) (2000) 1899–1905, <https://doi.org/10.1023/A:1005645810247>.
- [33] E.V. Kudriashova, Structure and Functional Properties of Biomolecules on the Interfaces of Phases. New Research Methods. A Manual for Students and Graduate Students Specializing in Biochemistry and Biophysics, 2012.
- [34] G.I. Dovbeshko, Molecular Mechanism of Interaction of Biological Molecule with Nanostructures, Ligands and Low Doses of Ionizing and Microwave Irradiation, V. N. Karazin Kharkiv National University, 2009.
- [35] X. Dai, F. Zhou, N. Khan, W.T.S. Huck, C.F. Kaminski, Direct visualization of reversible switching of micropatterned polyelectrolyte brushes on gold surfaces using laser scanning confocal microscopy, *Langmuir* 24 (22) (2008) 13182–13185, <https://doi.org/10.1021/la802066a>.
- [36] M.T. Elghetany, A. Saleem, Methods for staining amyloid in tissues: a review, *Stain. Technol.* 63 (4) (1988) 201–212, <https://doi.org/10.3109/10520298809107185>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464206> (accessed August 7, 2019).
- [37] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Anal. Biochem.* 177 (2) (1989) 244–249, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90046-8).
- [38] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (7) (2010) 1405–1412, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.

- [39] R. Swaminathan, V.K. Ravi, S. Kumar, M.V.S. Kumar, N. Chandra, Lysozyme: a model protein for amyloid research, in: *Adv. Protein Chem. Struct. Biol* 84, Academic Press Inc., 2011, pp. 63–111.
- [40] M.A. Williams, J.M. Thornton, J.M. Goodfellow, Modelling protein unfolding: hen egg-white lysozyme, *Protein Eng. Des. Sel.* 10 (8) (1997) 895–903, <https://doi.org/10.1093/protein/10.8.895>.
- [41] X. Wang, Q. Han, X. Liu, C. Wang, R. Yang, Multifunctional inhibitors of β -amyloid aggregation based on MoS₂/AuNR nanocomposites with high near-infrared absorption, *Nanoscale* 11 (18) (2019) 9185–9193, <https://doi.org/10.1039/c9nr01845j>.
- [42] R.D. Hills, C.L. Brooks, Hydrophobic cooperativity as a mechanism for amyloid nucleation, *J. Mol. Biol.* 368 (3) (2007) 894–901, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.043>.
- [43] S.K. Maji, L. Wang, J. Greenwald, R. Riek, Structure-activity relationship of amyloid fibrils, *FEBS Lett.* 583 (16) (2009) 2610–2617, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.003>.
- [44] G. Duan, S.G. Kang, X. Tian, J.A. Garate, L. Zhao, C. Ge, R. Zhou, Protein corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane, *Nanoscale* 7 (37) (2015) 15214–15224, <https://doi.org/10.1039/c5nr01839k>.
- [45] N. AnnaMorozovska, A. EugeneEliseev, I. GalinaDovbeshko, D. MayaGlinchuk, Yunseok Kim, Flexo-induced Ferroelectricity in Low Dimensional Transition Metal Dichalcogenides, *Phys. Rev. B* 102 (2020), <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.102.075417>.
- [46] H.A. Shaban, C.A. Valades-Cruz, J. Savatier, S. Brasselet, Polarized super-resolution structural imaging inside amyloid fibrils using Thioflavine T, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12864-9>.
- [47] X. Zuo, H. Zhang, Q. Zhu, W. Wang, J. Feng, X. Chen, A dual-color fluorescent biosensing platform based on WS₂ nanosheet for detection of Hg²⁺ and Ag⁺, *Biosens. Bioelectron.* 85 (2016) 464–470, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.044>.
- [48] K.D. Hauch, B.D. Ratner, Microscopy for biomaterials science, in: *Biomater. Sci. An Introd. to Mater*, Third ed., Elsevier Inc., 2013, pp. 677–692, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00058-9>.
- [49] J.B. Pawley, Points, pixels, and gray levels: digitizing image data, in: *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer, Boston, MA, 2006, pp. 59–79.
- [50] J.C. Waters, Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy, *J. Cell Biol.* 185 (7) (2009) 1135–1148, <https://doi.org/10.1083/jcb.200903097>.

WS₂ Nanoparticles Inhibit the Formation of β-Sheet Amyloid Fibrils

G.I. Dovbeshko, O.P. Gnatyuk, I.O. Polovyi
Department of Physics of Biological Systems
Institute of Physics NAS of Ukraine
Prospect Nauki, 46, Kiev, 03028, Ukraine
gd@iop.kiev.ua

M.V. Bogdanov
³Department of Biochemistry and Molecular Biology
University of Texas McGovern Medical School
Houston, TX 77030, USA

P.A. Ivanchenko
²Department of Chemistry and Interdepartmental Centre
"Nanostructured Interfaces and Surfaces-NIS"
University of Torino, Via P. Giuria 7, 10125 Torino, Italy.

O. Yu. Posudievsky
Department of Free Radicals
L.V. Piszarshevsky Institute of Physical Chemistry of the
NAS of Ukraine
ProspektNauki 31, Kyiv 03028, Ukraine.

Abstract— Amyloid fibrils are highly ordered protein aggregates that are associated with several pathological processes, including Alzheimer and Parkinson diseases, prion propagation, cancer metastasis, etc. The most important problem of amyloid fundamental studies is to understand a mechanism of amyloid fibril formation and to prevent this process.

Here we study confocal optical images and FTIR spectra of lysozyme deposited on a solid substrate from aqueous solution under different pH before and after incubation with WS₂ nanoparticles. Confocal images were obtained with LCM 510 (CarlZeiss, Germany) and vibrational spectra with instrument Bruker IFS 66.

As a result, it is shown that at pH=11.6 the lysozyme can form the amyloid structure under 24° C. In the case of adding the WS₂ nanoparticles, the fibrils are not formed.

This experiment could be as model for further study of protein interaction with nanoparticles and estimation of their influences upon biological objects, as well as for the development of new drugs against different diseases associated with fibril formation.

Keywords— Amyloid fibril; lysozyme; 2D-WS₂ nanoparticles; β-sheet

I. INTRODUCTION

Amyloid fibrils are highly ordered noncovalent protein aggregates which are formed in the tissues of patients with different pathologies- e.g. cancer, Alzheimer and Parkinson disease etc. These aggregates have similar structure with predominant amount of β-forms are recognized in extra cell space of organs and tissues. More than 20 types of proteins form amyloids *in vivo*. Clinic symptoms of these diseases are not appeared up to the late stages and usually it happens in old age. That is why it is very important to study a mechanism of fibrils formation and to find correlation between recognition of

fibril and arising of disease as well to develop the ways for their prevention. According to literature, the 2D WS₂ nanoparticles have a prevention property against the fibril formation [1]. That is why we decided to study the influence of WS₂ nanoparticles on the fibril formation experimentally *in vitro* and *in vivo*. Here we present a part of our study connected with *in vitro* experiment with lysozyme protein which can form fibrils.

For characterization of the fibril formation, FTIR spectroscopy, optical and electron microscopy are usually used. Additional methods are X-ray analysis and CD spectroscopy. The characteristic feature of amyloid fibrils is an increased fraction of antiparallel β-sheets protein and a decreased amount of disordered structures and α-conformations [2-3]. In our study we use FTIR spectroscopy with Amid I absorption band shape fitting as well confocal microscopy data [4].

II. METHODS AND MATERIALS

The 2D-WS₂ nanoparticles were synthesized according to [5] with the size of the particles ranging from tens to hundred nm.

Hen egg white lysozyme (HEWL) was obtained from Fluka and used without further purification. We used colloidal solution of 2D-WS₂ nanoparticles in water.

After HEWL was dissolved in water (1mg/ml), HCl or KOH were added to change the solution pH value to 2.5 and 11.5, respectively. Next, the suspensions of 2D-WS₂ nanoparticles was added to HEWL solution and incubated for 14 days and for 4 days at room temperature at the first and the second experiments, respectively and then kept for 1 day at 50°C for the second experiment only. The samples were dropped onto a rough gold surface (for confocal microscopy and FTIR spectroscopy) or CaF₂ substrate (FTIR spectroscopy) and dried.

In FTIR experiments, the absorption spectra of the samples deposited on the rough nanostructured Au surface, and were registered just after lyophilical drying. The spectra were collected in the 400–7000 cm^{-1} region with an IFS-66 Bruker instrument with resolution of 0.5 cm^{-1} and wavenumber definition accuracy of not less than 0.01 cm^{-1} . Repeatability of the frequency in our IR spectra was 0.5 cm^{-1} and that for the absorbance – about 0.0005. Deconvolution and decomposition of the spectral bands were performed with Opus-5.5 software program. The peak positions of the absorption bands were estimated by using the second derivative method and/or the standard method. All spectra were baseline-corrected and normalised by the peak intensity of C=O stretching vibrations band centred near 1649 cm^{-1} .

HEWL was obtained from Fluka and used without further purification. 1 mg of HEWL was dissolved in 1 ml of aqueous solutions (pH 5.5). This solution was acidified to pH 2 and pH 4 by HCl and alkalified to pH 7 and pH 13 by KOH.

Confocal microscopy increases contrast of images by focusing radiated photons by the objective lens on a small ($\sim 50 \mu\text{m}$) detector pinhole which strongly limits a depth of focus.

Carl Zeiss LSM-510 META confocal laser scanning microscope with 4D Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr oil immersion objective was used to obtain confocal images. An ultraviolet mercury lamp HBO-100 or diode laser ($\lambda=405 \text{ nm}$, 25 mW), Ar or ArKr laser ($\lambda=488 \text{ nm}$, 30 mW) and HeNe laser ($\lambda=633 \text{ nm}$, 5 mW) were used to obtain fluorescent images. Transmissive images were obtained in visible light with a halogen incandescent lamp. Magnification of x40 was used while experiment.

III. RESULTS AND DISCUSSION

For determination of the fibril formation we used FTIR spectroscopy and conformational analysis of Amid I absorption band. Additionally, we used confocal microscopy analysis that give more contrast images than conventional optical microscopy.

According to the Rayleigh criterion, the resolution limit (an intensity reduction by 20% from its maximum value) in the case of a conventional optical microscope:

$$r_{convent} = 0.61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin\theta} = 1.22 \frac{\lambda'}{D} F,$$

At the same time, the resolution limit of confocal microscope is 26% [6]:

$$r_{confocal} = 0.44 \frac{\lambda}{n \cdot \sin\theta} = 0.88 \frac{\lambda'}{D} F, \quad \omega \eta \epsilon \rho \epsilon \lambda' = \frac{\lambda}{n}$$

For example, the confocal microscopy resolution for laser with wavelength 405 nm is 213.84 nm; whereas the resolution conventional microscopy for the same wavelength is 296.46 nm. Hence, the resolution of a confocal microscope is only 1.4 times better than that of an optical one. Therefore, the main advantage of a confocal microscope is not an increase of the resolution, but a substantial increase of the contrast when the

image is formed. According to our and literature data [4], we suppose that confocal image could be a marker of fibril formation along with AFM and STM microscopy as well together with FTIR spectroscopy. The last is due to the fact that authors of [4] have got a good correlation between the fibril formation and AFM and STM microscopy imaging even in the absence of fluorescing aminoacids (Trp, Phe, Tyr) in the protein sequence. The authors used poly (ValGlyGlyLeuGly) peptide and observed the fibril-like formation proven by AFM, STM and confocal microscopy. Similar to our case (see Fig.1) the fibrils prepared for STM study (on a gold support) were emitting light and the authors of [4] recorded them as bright patterns on the gold support. The diameter the fibrils changed from 20 to 250 nm and for the larger HEWL concentration up to 1-2 μm in [4] and they could distinguish them even for the thinnest fibrils of tens of nm in diameter. The reason of this is the possibility to register bright spots or fibrils even the smallest size (nm, essentially less than resolution limit-0.1-0.2 μm) due to the confocal microscope properties, namely, a better contrast, however with loss of sharpness due to diffraction spreading.

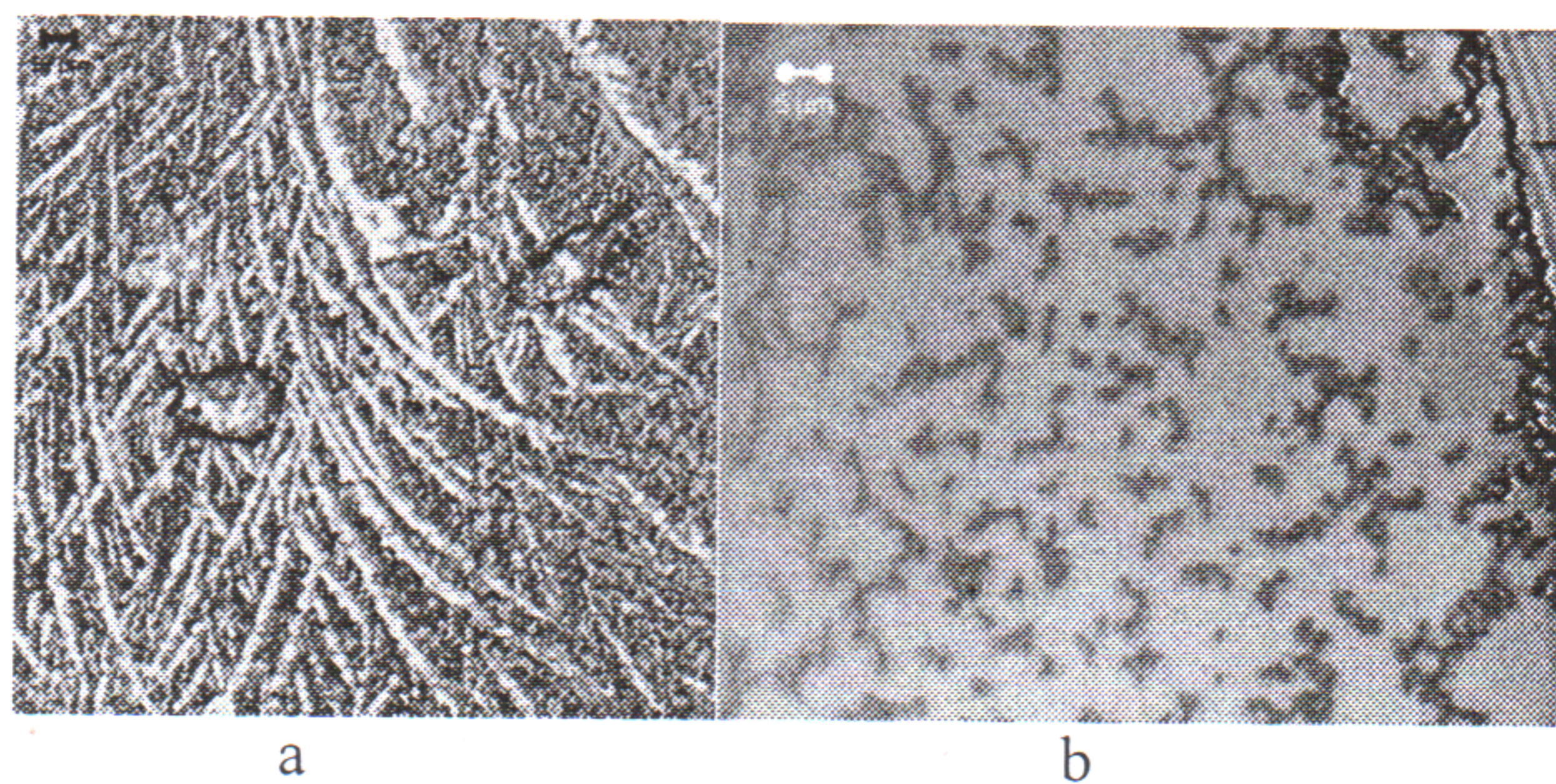


Fig. 1. Confocal images of HEWL under pH = 2.5 a) pure HEWL, b) HEWL+WS₂ taken from the second experiment

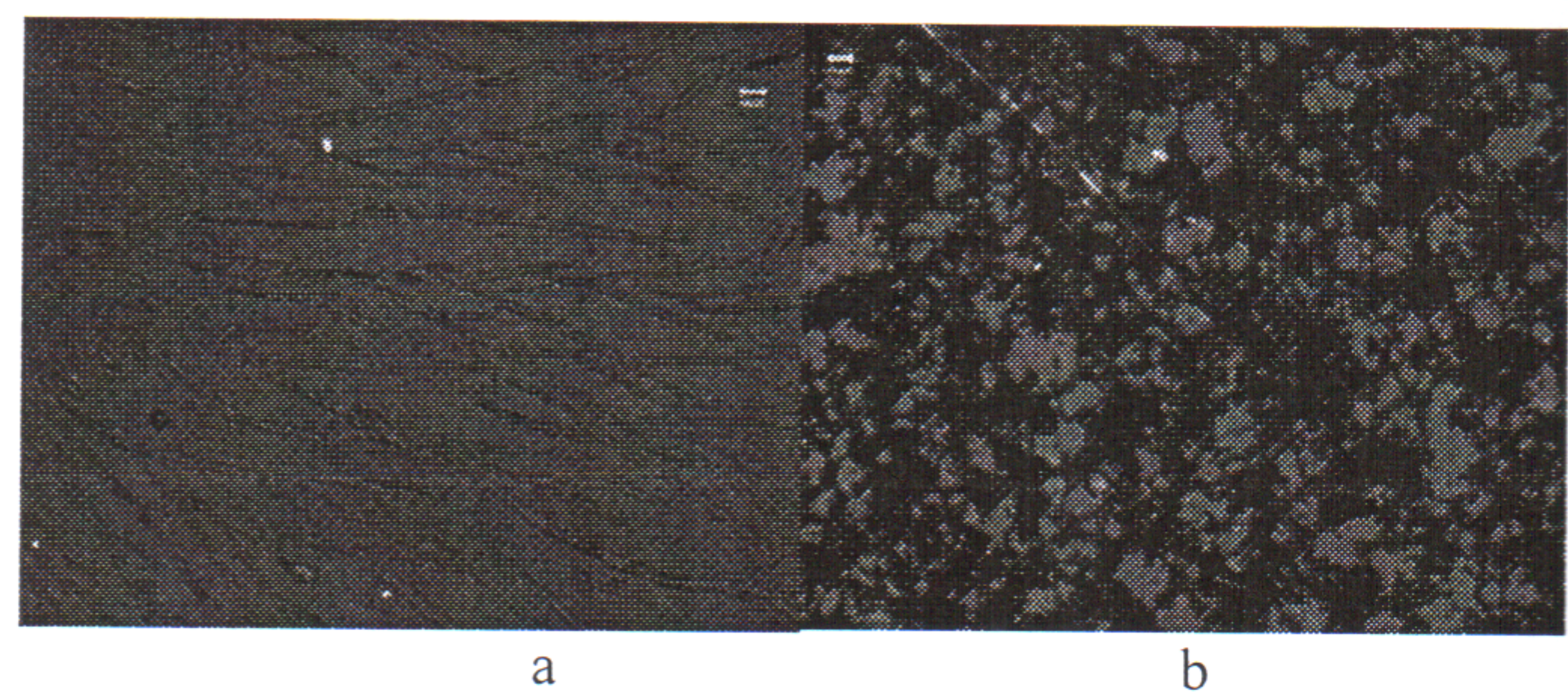


Fig. 2. Confocal images of Lysozyme under pH=11.6 (a), and Lysozyme/WS₂ complex under pH=11.4 (b) taken from the first experiment

Thus, in Fig 1 -2 we have registered the fibrils formation in both experiments with longer and shorter periods of incubations and have got the similar results. In the case of 2D-WS₂ nanoparticle presence we did not registered as much fibrils as in the case without the nanoparticles. The microscopic data are in the accordance with FTIR spectroscopy data and the Amid I absorption band fitting results. According to FTIR data (Fig.3-4) lysozyme with pH= 5.5 (similar to lysozyme of pH = 11.4 loaded with WS₂ nanoparticles) has no property of fibril formation in contrast to lysozyme of pH = 11.6. In the last sample the appearance of features for fibril formations

represented by a shoulder at 1693 cm^{-1} (antiparallel β -form) and shift of the maximum of the Amid I band from 1649 cm^{-1} in lysozyme of $\text{pH} = 5.5$ to 1649 cm^{-1} indicate a significant change in the protein conformations.

The analysis of the spectral fitting results for lysozyme at a highly alkaline $\text{pH} = 11.7$ shows the growth (Fig. 3) of the contribution of the shoulder of 1693 cm^{-1} , which can be assign to the formation of antiparallel β -sheets. When HEWL was loaded with WS_2 nanoparticles, the contribution of this shoulder is significantly lower. Decomposition of the Amid I band by components allows to perform a conformational analysis and calculate the contributions of each conformation (Fig. 4). We proceeded from the following assignment of the Amid I band components: 1649 cm^{-1} - α -helix, 1660 cm^{-1} - unordered form, 1632 - β -sheet, 1695 - antiparallel β - sheet, and 1615 cm^{-1} - side groups. Decomposition of spectra was performed according to [7-10]

With lysozyme at $\text{pH} = 5.5$, the contribution of α -structures is 28.2% and β -sheet 18.2%. At a highly alkaline condition ($\text{pH} = 11.6$), the contribution of antiparallel β -sheets is 19.6%, the contribution of α - structures is 19.4% and the contribution of β -layers 17.6%.

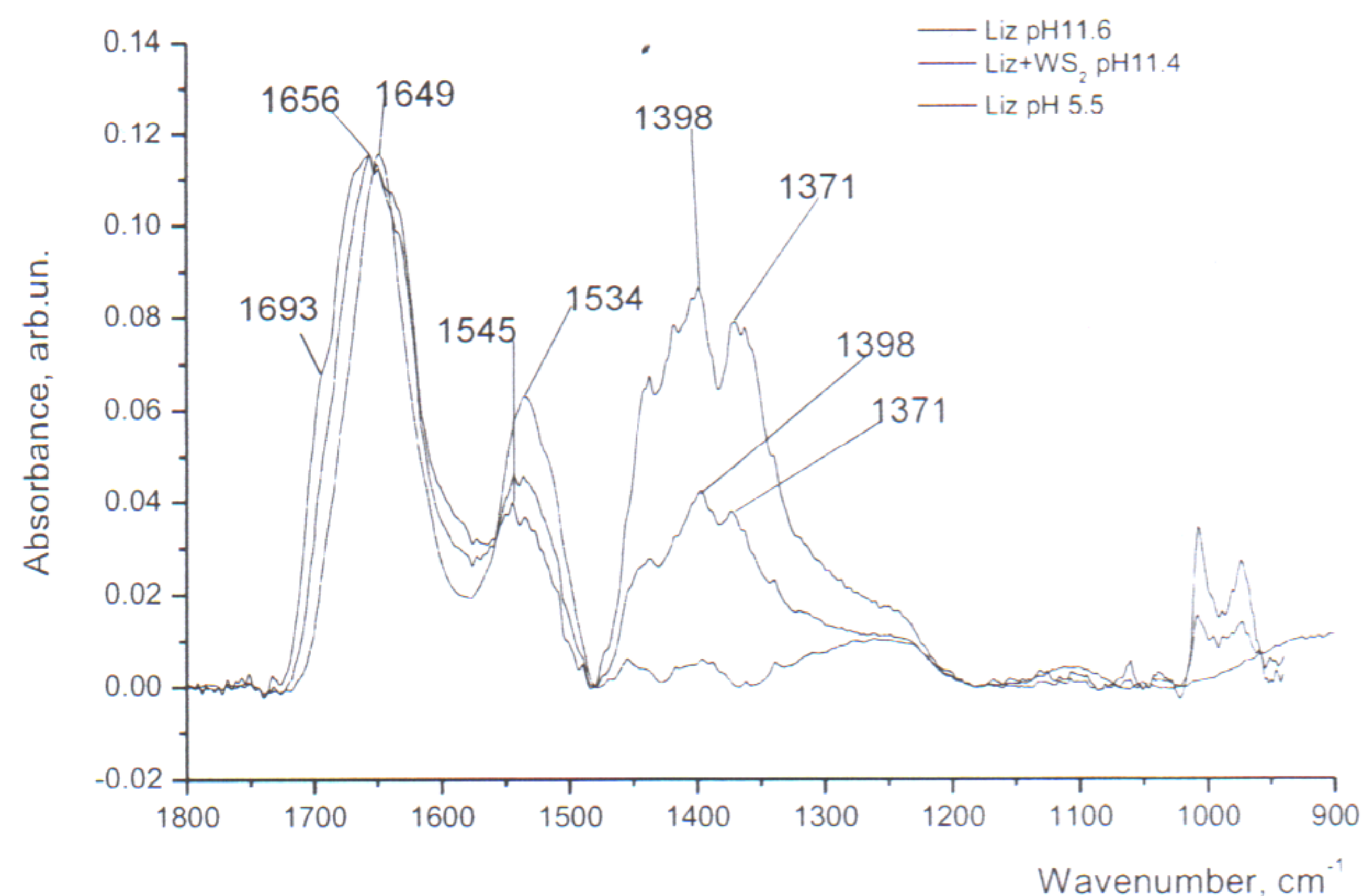


Fig. 3. **Figure 3.** FTIR spectra of Lysozyme $\text{pH}=11.6$, and Lysozyme/ WS_2 complex $\text{pH}=11.4$ taken from the first experiment

When the complex with WS_2 is present, the contribution of antiparallel β -sheets is 8.2%, the contribution of α -structures 22.5% and the contribution of β -sheets of 19.2%.

The reason for easy fibril formation under $\text{pH} = 11.6$ seems to be connected with the vicinity to an isoelectric point of lysozyme ($\text{pH} 11.3$) [11] and adding of WS_2 could further decrease it by 0.2-0.4 pH . So, changing in the charge state of the protein could be a moving force for initiating the fibril formation. Therefore, both experiments with lysozyme have shown that fibrils were formed both under low and high pH (being better and faster for high pH) and the process was partially broken by WS_2 particles.

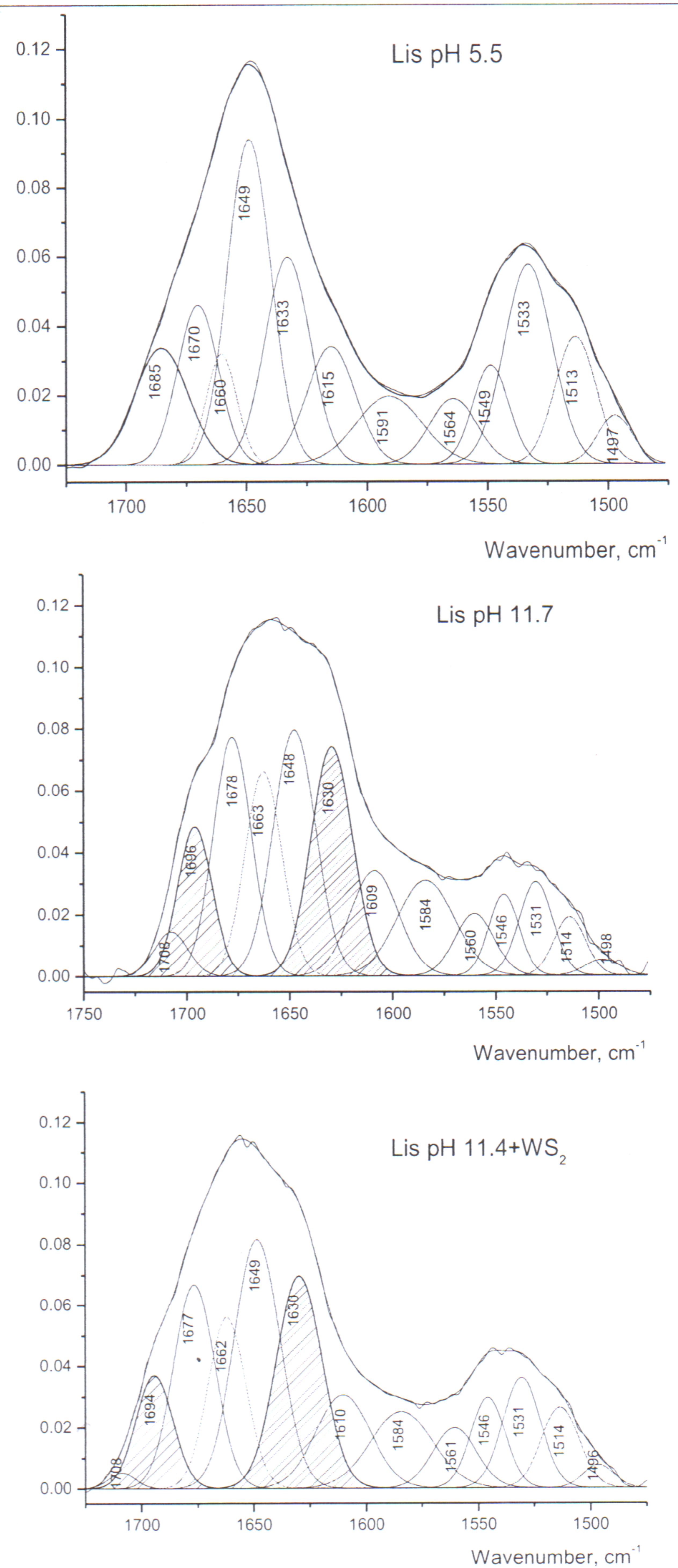


Fig. 4. Deconvolution of Amid I band of Lysozyme at $\text{pH}=5.5$, 11.6, and Lysozyme/ WS_2 complex at $\text{pH}=11.4$ taken from the second experiment.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by the HORIZON 2020 project "Asymmetry of biological membrane: theoretical, experimental and applied aspects" (690853-assymcurv-H2020-MSCA-xRISE-2015/H2020-MSCA-RISE-2015), NATO 98 5291, STCU 6175, Development of 2D materials and "smart"

sensors for medical and biological purposes 11/1 2018. We are grateful to Dr. S.O. Karachimfor registration of confocal images.

REFERENCES

- [1] Meng Li, Andong Zhao, Kai Dong, Wen Li, Jinsong Ren and Xiaogang Qu, "Chemically Exfoliated WS₂ nanosheets Can Efficiently Inhibit Amyloid β -Peptide Aggregation and Use for Photothermal Treatment of Alzheimer's Disease," *Nano Research* 2015, vol. 8, no.10, pp. 3216–3227, August 2015.
- [2] Hao, H. Li, Y. Gao, Y. Sun, and G. Ma, "New Insight in to Amyloid Fibril Formation of Hen Egg White Lysozyme Using a Two-Step Temperature-Dependent FTIR Approach", *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, pp. 9834-9843, July 2014.
- [3] G. Zandomenighi, M.R. Krebs, M.G. McCammon, M. Fandrich, "FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils," *Protein Sci.*, vol. 13, pp.3314-3321, Desember 2004.
- [4] L.L. del Mercato, P. P. Pompa, G. Maruccio, A.D. Torre, S. Sabella, A.M. Tamburro, R. Cingolani, and R. Rinaldi, "Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils," *PNAS*, vol. 104, pp. 18019-18024, November 2007.
- [5] O. Yu. Posudievsky et al., "Liquid exfoliation of mechanochemically nanostructured tungsten disulfide to a graphene-like state," *Nanotechnology*, vol. 29, no. 8, p. 085704, January 2018.
- [6] R. H. Webb, "Confocal optical microscopy," *Reports on Progress in Physics*, vol. 59, no. 3, pp. 427-471, October 1996.
- [7] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux and J. Ruyschaert "Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy," *M. Subcell. Biochem.*, vol. 23, pp. 405–450, January 1994.
- [8] C. P'erez and K. Griebenow, "Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the thermal denaturation of hen egg-white lysozyme dissolved in aqueous buffer and glycerol," *Biotechnology Letters*, vol. 22, pp. 1899–1905, December 2000.
- [9] E.V. Kudriashova, *Structure and functional properties of biomolecules on the interfaces of phases. New research methods, A manual for students and graduate students specializing in biochemistry and biophysics* Department of chemistry MSU, Moscow, 2013.
- [10] G.I. Dovbeshko, *Molecular mechanism of interaction of biological molecule with nanostructures, ligands and low doses of ionizing and microwave irradiation. - Manuscript. The thesis applied for scientific degree of doctor of sciences in physics and mathematics on speciality 03.00.02 – Biophysics. – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv 2009.*
- [11] R1. Swaminathan, VK. Ravi, S. Kumar, MV. Kumar, "Chandra N Lysozyme: a model protein for amyloid research," *Adv Protein Chem. Struct. Biol.*, vol. 84, pp. 63-111, 2011.

Висновки до розділу 1

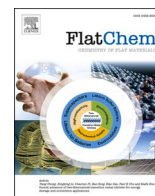
1. Визначено ІЧ, Раман та CARS спектроскопічні маркери 2D наночастинок нітриду бору, отриманих вдосконаленим механохімічним методом з масивного BN та показано стабільність водної суспензії таких наночастинок впродовж тривалого часу до пів року. Показано, що 2D-BN наночастинок мають інтенсивний CARS резонансний сигнал на частоті 1364 см^{-1} , що узгоджується з даними ІЧ та Раман спектроскопії.
2. Визначено спектроскопічні маркери нековалентних комплексів доксорубіцину з 2D-BN наночастинок по зміщенню 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} , смуги валентних коливань C=O з 1709 см^{-1} до 1726 см^{-1} у комплексі доксорубіцину з нітридом бору, порівняно з доксорубіцином. При цьому згідно з розрахунками енергія зв'язування 2D-BN наночастинок з доксорубіцином становить $-1,8\text{ eV}$, що свідчить про стійкість таких комплексів і причиною зміщень в спектрах є перебудова водневих зв'язків C=O...N-H при утворенні комплексу.
3. 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. 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.
4. Вперше показано що місця локалізації наночастинок в клітині можуть слугувати підсилюючими поверхнями для незначного (3-5 разів) підсилення сигналів в Раман спектрах та дозволяють зареєструвати Раман спектри різних компонент клітин (мембрани, цитоплазми, ядра). Керуючим параметром знаходження частинок нітриду бору в клітині є час інкубації. 2D-BN наночастинок можуть проникати в цитоплазму та в область ядра пухлинно\ клітини шляхом ендцитозу та/або локалізуватись

в області мембрани під час інкубації *in vitro*. Показано, що через 1 годину інкубації 2D-BN наночастинки локалізуються на мембрані та визначено спектроскопічні маркери проходження наночастинок через мембрану, а саме перерозподіл вкладів СН валентних коливань в сторону зростання СН₃, поява плеча Р-О-С на 1122 см⁻¹. Ці дані в подальшому можуть бути використані для цитологічного аналізу клітини.

5. 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 E¹_{2g} 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 наночастинками у синій спектральній області, що дозволяє використовувати 2D-WS₂ як маркери для візуалізації клітин та клітинних органел.
6. Виявлені під дією наночастинок 2D-WS₂ незворотні конформаційні переходи білка лізоциму в залежності від концентрації вихідного розчину білка та від рН середовища свідчать про утворення амілоїдних фібрил. Так, при концентрації білка 20 мг/мл і при рН = 2,0 та при концентрації білка 1 мг/мл і рН = 11,5 за даними розкладу на компоненти смуги поглинання Амід I, зростає вклад антипаралельних β-шарів з маркерами на 1624 см⁻¹ та 1680 см⁻¹, що свідчить про утворення амілоїдних фібрилярних структур. Дані корелюють з результатами, отриманими за допомогою конфокальної мікроскопії. Наночастинки 2D-WS₂ можуть бути використані для отримання гібридних структур з заданими властивостями в матеріалознавстві, а спектроскопічні наробики – для діагностики хвороб, що корелюють з утворенням амілоїдних фібрил.

РОЗДІЛ 2.

Вуглецеві наноструктури як платформа для дослідження біомолекул та культур клітин



Coherent anti-stokes Raman scattering spectroscopy (CARS) and imaging of DNA on graphene layers and glass covers

Galyna Dovbeshko^{a,*}, Olena Gnatyuk^a, Andrej Dementjev^b, Danielis Rutkauskas^b, Evgeniya Kovalska^{c,d}, Anna Baldycheva^d, Oleksii Ilchenko^e, Dmytro Krasnenkov^f, Tommi Kaplas^g

^a Institute of Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Nauki Prospekt, Kyiv 03028, Ukraine

^b Institute of Physics, Center for Physical Sciences and Technology, A. Goštauto 11, Vilnius LT-01108, Lithuania

^c Department of Inorganic Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic

^d College of Engineering, Mathematics and Physical Sciences, University of Exeter, North Park Road, Exeter EX4 4QF, UK

^e Department of Health Technology, Technical University of Denmark, Ørsteds Plads Building 345C, Kgs. Lyngby 2800, Denmark

^f D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology, NAMS of Ukraine, 67 Vyshhorodska St., Kyiv, Ukraine

^g Institute of Photonics, University of Eastern Finland, Yliopistokatu 7, P.O. Box 111, Joensuu FI-80101, Finland

ARTICLE INFO

Keywords:

Raman scattering
CARS imaging and spectroscopy
DNA molecules
Graphene layer

ABSTRACT

We report a comparative study of the Raman and Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) patterns of DNA molecules deposited on graphene or glass substrates. In the DNA CARS spectra, the positions of vibrational resonances are red-shifted by 10–20 cm⁻¹ and have new features in high-frequency region in comparison with spontaneous Raman data. We demonstrate that CARS imaging can be employed for the visualization and characterization of DNA molecules deposited on graphene.

Introduction

Vibrational spectroscopy of DNA molecules is of great interest for biochemical and medical applications [1,2]. Both, infrared (IR) and Raman spectroscopy [3] are widely used for a detection of DNA molecular conformation and their interaction with ligands and nanoparticles as well as for DNA sequencing [2]. Recent advances in the laser technology have made it possible to employ nonlinear spectroscopy techniques including Sum Frequency Generation (SFG) [4] and CARS [5] for characterization of biological molecules at interfaces [4]. However, a complexity of the CARS spectra of DNA and other macromolecules often makes difficult their interpretation and bands assignment. As a result, so far the usage of CARS spectroscopy on macromolecules is rather scarce. The reason of it is connected with a nature of physical effects of CARS and Raman processes.

It is known [6,7] that the intensity of the Raman process can be expressed as:

$$I_{RS}(\omega) (\chi^{(1)}(\omega)E)^2 P^2(\omega) \quad (1)$$

Here

$$P(\omega) = \chi^{(1)}(\omega)E + \chi^{(2)}(\omega)E + \chi^{(3)}(\omega)E + \dots + P_1 + P_2 + P_3$$

The intensity of CARS process is presented as:

$$I_{CARS}(\omega) (\chi^{(3)}(\omega))^2 E^6 \quad (2)$$

$$\text{if } E_{Stokes} \approx E_{pump} = E_{probe} = E$$

$$\chi^{(3)}(\omega) = \chi_{nr} + \chi_p(\omega),$$

$$(\chi^{(3)})^2 = \chi_{nr}^2 + 2\chi_{nr}\chi_p + \chi_p^2(\omega) \quad (3)$$

The Raman and CARS spectra do not coincide because $(\chi^{(3)})^2$ depends on resonant and non-resonant contributions [6,7]. In general, the χ_{nr} is not constant either. However the knowledge of the CARS spectra is important for image interpretation.

In this paper we employ the CARS technique for visualization of DNA molecules. We demonstrate in particular that the CARS sensitivity and image contrast can be considerably improved by placing the DNA molecules on a substrate with predeposited graphene layer.

Methods of non-linear spectroscopy such as Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and Sum Frequency Generation (SFG)

* Corresponding author.

E-mail address: matinelli@gmail.com (G. Dovbeshko).

<https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100243>

Received 23 January 2021; Received in revised form 27 February 2021; Accepted 13 March 2021

Available online 19 March 2021

2452-2627/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

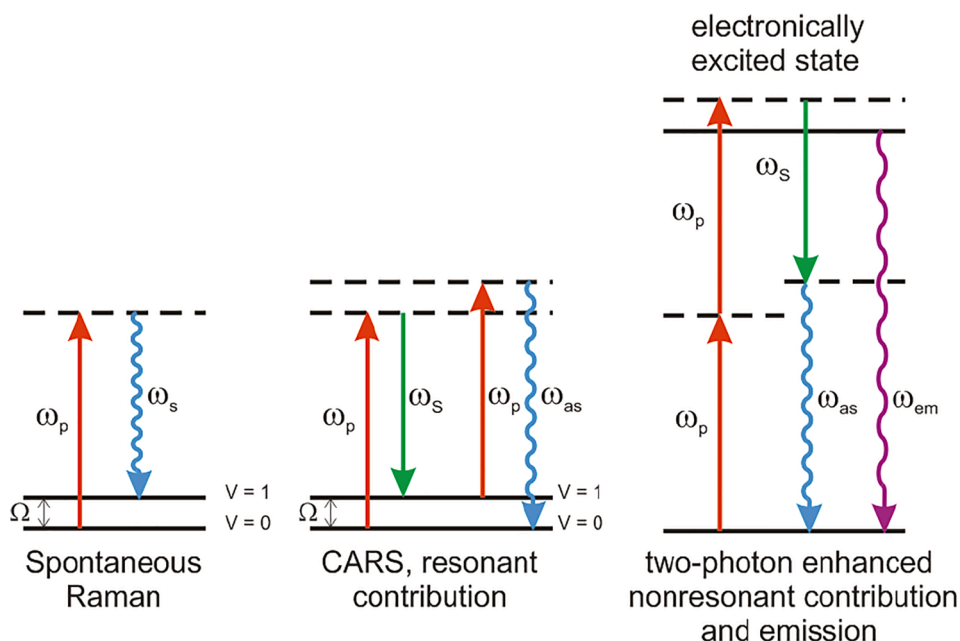


Fig. 1. Schematic energy diagram showing transitions in spontaneous Raman scattering and CARS processes. Right diagram demonstrates undesirable non-resonant CARS contribution and emission processes occurring simultaneously and concomitantly with resonance CARS.

spectroscopy have emerged in recent years for characterization of biological molecules at interfaces [4,5,8,9]. The advantages of these methods for imaging of biological molecules and cells are well known [5,8–14]. Here we apply CARS for imaging the DNA molecules. In this work we wished to enhance the CARS imaging contrast and sensitivity using graphene layers as a substrate. However, registration of CARS spectra of biological molecules is quite sophisticated and was not accomplished for the DNA until now. CARS spectroscopy, in contrast to CARS microscopy, has several disadvantages: complex band shapes in the CARS spectra and difficulties with their assignment, large number of available substrates. That is why CARS spectroscopy is rarely used as a conventional spectroscopic method and CARS spectra of DNA molecules should be registered before their imaging.

Materials and methods

Materials

DNA

The aqueous solution of DNA was prepared by dissolving chicken DNA fibers (Sigma) in MilliQ water. The stock concentration was 42 mg/ml (1,3 mM/l). DNA purity was evaluated by UV absorption in quartz cuvette with optical path length of 10 mm using Varioskan Flash multimode reader (Thermo corp.). In order to measure Raman, CARS and UV transmission spectra we used the DNA solutions with concentrations of 2.1 mg/ml (0.16 mM/l), 1 mg/ml (0.07 mM/l) and 42 mg/ml, respectively. It is worth noting that since the CARS signal is proportional to the square of the concentration, CARS spectroscopy requires more substance in the probe than Raman spectroscopy. To prepare samples for CARS and Raman measurements, the DNA solution was dropped on a bare glass slice or on a glass surface covered with pre-deposited graphene layer. The DNA molecules formed a thin solid film on the substrate upon drying.

Graphene

We synthesized a monolayer graphene by chemical vapor deposition (CVD) using as a catalyst 25 μm thick copper foil (Alfa Aesar item #13382) [15]. The copper pieces were loaded into a quartz chamber with a diameter of 8 cm. The growth temperature was in the range of

1000–1035 $^{\circ}\text{C}$ and the run duration was 30 min. The samples were heated under H_2 flow to reduce the oxidation of the copper foil. During the growth process, a partial pressure of CH_4 and H_2 gases was 1.5 and 3 Torr, and corresponding flow rates were 40 and 80 sccm, respectively. Subsequently, a 30 min graphene growth was completed by cooling down the chamber with H_2 flow until achieving the temperature below 100 $^{\circ}\text{C}$. The copper foil with deposited graphene layer was removed from the CVD-reactor when the temperature reached 50–60 $^{\circ}\text{C}$.

Transfer of the CVD-grown monolayer graphene onto the substrates was performed by a photoresist S1813 (Shipley Company) or AR P 661–3.5%. The photoresist was used as a support to transfer the graphene (with the area of about 1–2 cm^2) onto the polished quartz wafers for a super-capacitor fabrication. The etching of Cu-foil was performed with FeCl_3 , and the photoresist was removed with acetone.

Experimental methods

Raman measurements

The Raman spectra of DNA were obtained using a home-made Raman instrument with verification of its ability at the excitation wavelength of 785 nm and laser power of 1.5 mW. The Raman line of Si at 520 cm^{-1} was used as the reference for the wavenumber calibration. We have carried out the Raman measurement with DNA deposited on the graphene/quartz wafers or the glass slice substrates. For the data analysis we used the WiRE 3.4 software. The DNA conformation on different substrates has been determined using the positions of the characteristic Raman bands and was found to be in satisfactory agreement with literature data [3].

CARS measurements

The CARS process involves two incoming light waves with ω_p (pump) and ω_s (Stokes) frequencies, that produce a signal anti-Stokes wave with frequency of $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$.

In CARS spectroscopy, the molecular vibration with frequency $\Omega = \omega_p - \omega_s$ is detected by measuring the intensity and/or polarization of the anti-Stokes wave as a function of Ω .

Therefore, this technique allows one to visualize, e.g., the spatial distribution of molecules with the vibrational mode Ω by mapping the CARS signal at $\omega_{AS} = \omega_p + \Omega$ (Fig. 1).

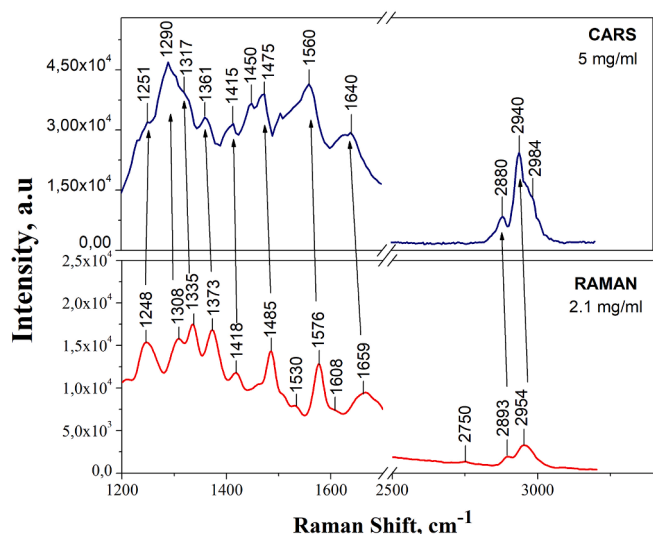


Fig. 2. The comparison of CARS and Raman spectra of the DNA. In the 1200–1700 cm^{-1} range, the characteristic bands of the CARS spectrum are red-shifted by 3–20 cm^{-1} against the Raman one due to different physical nature of the effects. At 5 mg/ml DNA concentration, the CARS spectrum involves the multi-phonon resonances being partially changed in comparison Raman experiment. In the high-frequency region of 2500–3500 cm^{-1} the CARS and Raman spectrum of the DNA looks very similar. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

This yields the imaging of a spatial distribution of molecules deposited on the substrate surface with high spatial resolution.

The experimental setup was described elsewhere [5,7,16]. Briefly, it is based on a home-built CARS microscope with a compact laser source (EKSPLA Ltd.). The pump and Stokes pulses of 6 ps at 1 MHz repetition frequency were provided by 1064 nm Nd:YVO₄ laser and a travelling wave optical parametric oscillator (OPO) operating in the wavelength range from 690 to 2300 nm, respectively. The energies of the pump and Stokes pulses varied in the range from 1 to 10 nJ. The OPO was pumped by the second harmonic of the Nd:YVO₄ laser. Tuning the OPO wavelength allowed us to probe the vibrational modes in the 700–4500 cm^{-1} range. After passing the spatial filter, collinear Stokes and pump beams were directed to an inverted microscope (Olympus IX71) and focused onto the sample by an oil-immersion objective (Olympus, Plan Aporchrom., 60X, NA 1.42). The co-propagating CARS beam was spectrally separated from the pump and Stokes beams by long- and short-pass filters and collected by objective with NA 0.4 to the avalanche photodiode (SPCM-AQRH-14, Perkin Elmer), which was connected to a multifunctional board PCI 7833R (National Instruments Ltd). The avalanche photodiode was operated in the photon counting mode. In the paper all images are presented with colored scale. Numbers near scale means an amplitude of signal measured in counts per second.

Measurements of the CARS spectra were performed by tuning the OPO wavelength. In order to account for the spectral dependence of the OPO efficiency, the CARS signal intensity was normalized to the square of the OPO pulse intensity. The spectral resolution of the CARS setup was $\sim 8 \text{ cm}^{-1}$. The spectra were recorded with the detection rate of 5 cm^{-1}/s .

CARS images of 250×250 pixel with 2 ms pixel dwell time were acquired by scanning the substrate with the piezo-scanning system (Physic Instrument GmbH & Co). The sample scanning, data processing and the laser wavelength tuning were controlled from a computer.

Table 1

The DNA characteristic frequencies and their assignment. *data in the brackets are taken from [3].

Raman*	Assignment	CARS
1248 (1243)	Thy	1251
1308 (1304)	Ade	1290
1335 (1336)	Ade, Gua	1317
1373 (1373)	Thy, Ade, Gua	1361
1418 (1418)	Thy; $\delta(\text{CH}_2)$	1415
1485 (1483)	Gua, Ade	1475
1530 (1537)	Cyt	–
1576 (1574)	Gua, Ade	1560
1608 (1603)	Cyt	–
1659 (1651)	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{NH}_2)$ of Thy, Gua, Cyt	1640
2750 (2753)	Thy (overtone 2×1373)	–
2893 (2894)	$\nu(\text{CH}_2)$	2880
2954 (2950)	$\nu(\text{CH}_2)$	2940
	$\nu(\text{CH}_2)$	2984

Results and discussion

Features of CARS and Raman spectra

Fig. 2 shows that CARS spectra of DNA aqueous solution at a concentration of 42 mg/ml and Raman spectra at the DNA concentration of 2.1 mg/ml have the same spectral features either on metal, graphene/metal or glass substrates.

The DNA characteristic frequencies and their assignment are compiled in Table 1. In the CARS spectra of the DNA molecules registered in 1200–1700 cm^{-1} and 2800–3000 cm^{-1} spectral range, we observed a number of strong bands of complicated structure which we compared with the DNA Raman bands assigned to specific molecular groups according to [16–24].

In the wavenumber range of 2400–3400 cm^{-1} , the CARS spectrum of the DNA is similar to the that of its components Thy12, Ade and/or poly A, which are dominated by CH, NH and OH stretching vibrations [13].

In the 1200–1700 cm^{-1} range, the characteristic feature of CARS spectra is a 3–20 cm^{-1} red-shift of the resonances against the corresponding Raman data [16–20]. The low-frequency shift could be explained by a difference in the nature of Raman and CARS effects, and corresponding discussion is presented in this paper above. Also, CARS spectroscopy requires more amount of substance in the probe compared to Raman, and therefore the overtones and composition tones could be registered and disturb the spectra. In the high-frequency region of 2500–3500 cm^{-1} , Raman spectrum of the DNA consists of non-resolved peaks located at 2954, 2893 and 2750 cm^{-1} , which are assigned to CH and NH stretching vibrations. One can observe, however that the CARS spectrum of the DNA in this range looks very similar but with a better resolved component at 2984 cm^{-1} .

Imaging of DNA molecules on graphene layer

Imaging of graphene

By performing CARS measurements of the graphene layer we have discovered that at relatively low excitation power (up to 150 μW) the signal from graphene at 2900 cm^{-1} exceeds the signal from the glass substrate. That is, mapping of the CARS signal allows us to visualize the graphene sheet deposited on the substrate (see Fig. 3). It is worth noting, that the detected signal at frequency $\omega_{\text{AS}} = 2\omega_{\text{p}} - \omega_{\text{S}}$ is composed of the non-resonance CARS and luminescence signals.

At the pump pulse power of 370 μW and more we observed CARS signal from the glass substrates with or without predeposited graphene. Bright spots evenly distributed through the image belongs to the

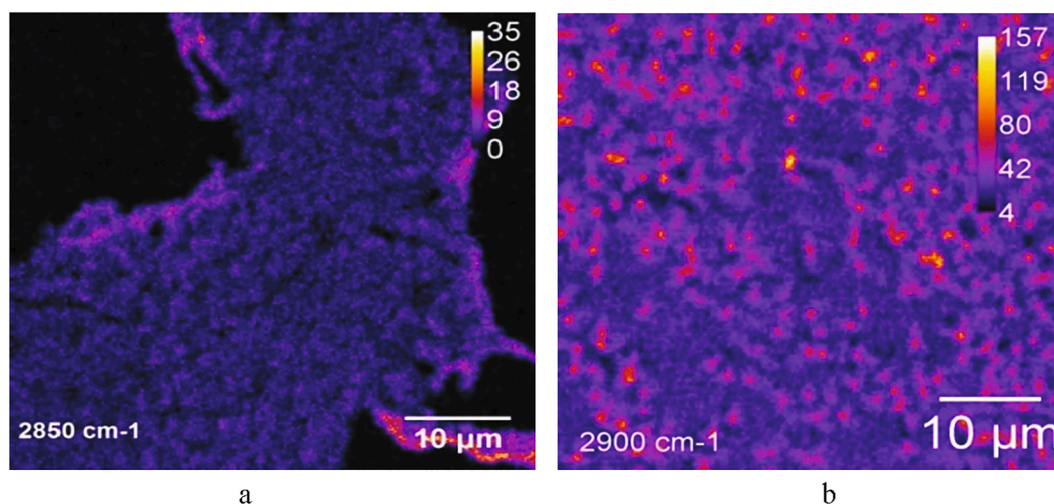


Fig. 3. a) left: CARS image of the graphene monolayer on the glass substrate at 2850 cm^{-1} , $50\text{ }\mu\text{W}$ -Stokes (probe) and $100\text{ }\mu\text{W}$ - pump, the edges of the graphene layer glow brighter; b) right: CARS image of the two-layer graphene on the glass substrate at 2900 cm^{-1} , $70\text{ }\mu\text{W}$ – Stokes (probe) and $370\text{ }\mu\text{W}$ – pump. Brighter shade of pixel corresponds to a larger amplitude of measured signal. The numbers next to the coloured bar indicate the counts per second (CPS) corresponding to a particular colour. In the following figures the same colour-amplitude bars are used.

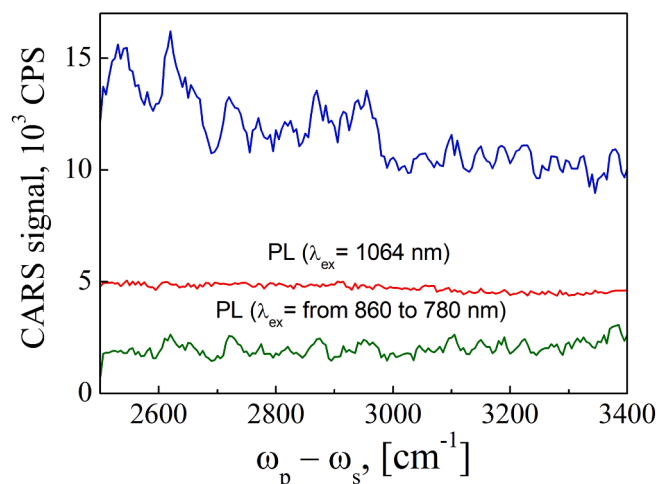


Fig. 4. CARS signal from the two-layer graphene (image Fig. 3b) on the glass substrate (blue), the response (photo-luminescence) after excitation of Stokes (red line) and the response after excitation by pump (green line). CARS signal from bilayer graphene layer is similar intensity to luminescent signal. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

graphene (Fig. 3) similar to [25].

To clarify the obtained results at the frequency ω_{AS} , we compared the graphene spectra obtained at the single beam (either Pump or Stokes) and the double beam (Pump and Stokes) excitations. The spectra in Fig. 4 show that irradiation with the Stokes beam (Pump beam blocked) produces the luminescence signal of about 5000 counts per second, while irradiation with the Pump beam (Stokes beam blocked) yields luminescence signal of about 2000 counts per second. Irradiation with both Pump and Stokes beams produces CARS signal at about 15,000 counts per second. Thus, one can conclude that luminescence signal produced by Pump and Stokes beams alone is of similar intensity as the CARS signal.

DNA of low concentration

Earlier we studied the thymine molecules, one of the bases of DNA, in microcrystalline sample by Second harmonic (SHG) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) technique [26]. In this article we visualized the DNA on the graphene surfaces with and without measuring the CARS spectra. In the latter case we used the CARS bands for the DNA molecules deposited from the aqueous solution of high concentration.

At low DNA concentration, CARS mapping at 2760 cm^{-1} (Thy overtone in DNA) and at 2900 cm^{-1} (C–H vibration band) produced the same results (Fig. 5), indicating no imaging contrast. The CARS response both from the graphene layer and the DNA molecules overlaps with the luminescence and non-resonant CARS signals. However, the bright filaments in the image can be attributed to the DNA molecules because one can observe from Fig. 3 that non-resonant CARS signal from the underlying graphene has no bright features providing suitable background for the DNA response.

The identity of the spectral imaging acquired at different frequencies certifies that the luminescence emission from the DNA gives essential contribution to the CARS imaging. The dark region on the bottom of Fig. 5 originates from the glass support.

DNA deposited from aqueous solution with higher concentration

Fig. 6 shows the CARS image acquired at 1625 cm^{-1} for $\lambda_{\text{pump}} = 910\text{ nm}$ and the emission map at $\lambda_{\text{exc}} = 910\text{ nm}$ of DNA deposited from aqueous with high concentration (42 mg/ml) on the glass substrate. The comparison of the two images shows that the graphene emission constitutes a significant part of the total signal, while the CARS signal predominantly originates from the non-resonant susceptibility. The CARS spectrum shown in Fig. 6 confirms that any resonant band is absent in this spectral region.

The CARS spectrum was acquired in bright spots shown in the respective images. The graphene emission constitutes $1/8$ of the CARS signal. In contrast to the graphene images, that appears to be homogeneous over $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$ regions (Fig. 3) beside the edges of the layer, the images of the DNA molecules on graphene have a feature of irregular bright spots of high intensity up to $10\text{ }\mu\text{m}$ in size (Fig. 6). In Figs. 5 and 6 the graphene substrate appears as black spots.

The CARS spectrum acquired in a bright spot in the image shown in

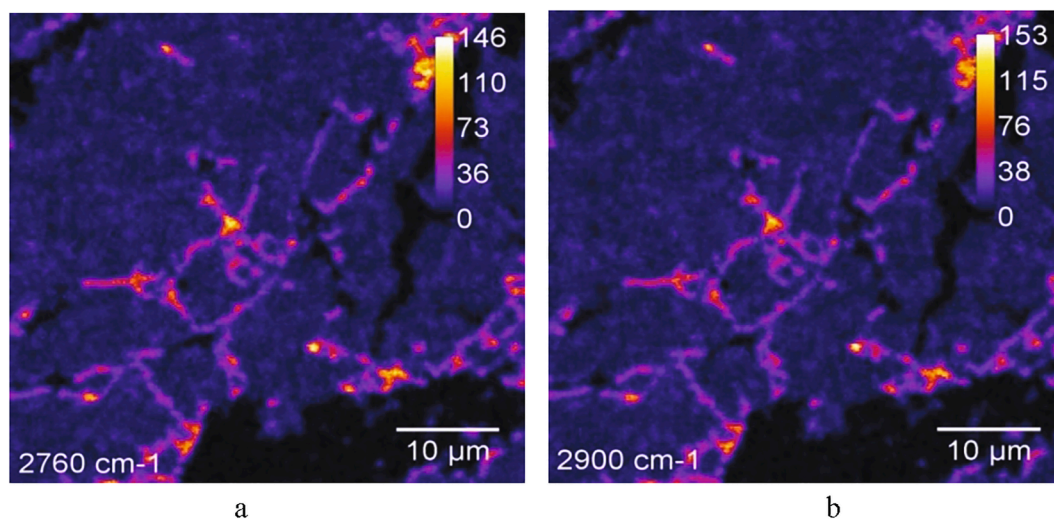


Fig. 5. CARS images of DNA deposited on the monolayer graphene-covered glass substrate from the aqueous solution with low concentration (1 mg/ml) acquired at 2760 (a) and 2900 cm^{-1} (b). Stokes power was 300 μW and Pump power was 170 μW . DNA looks as bright strips on the dark background of graphene support.

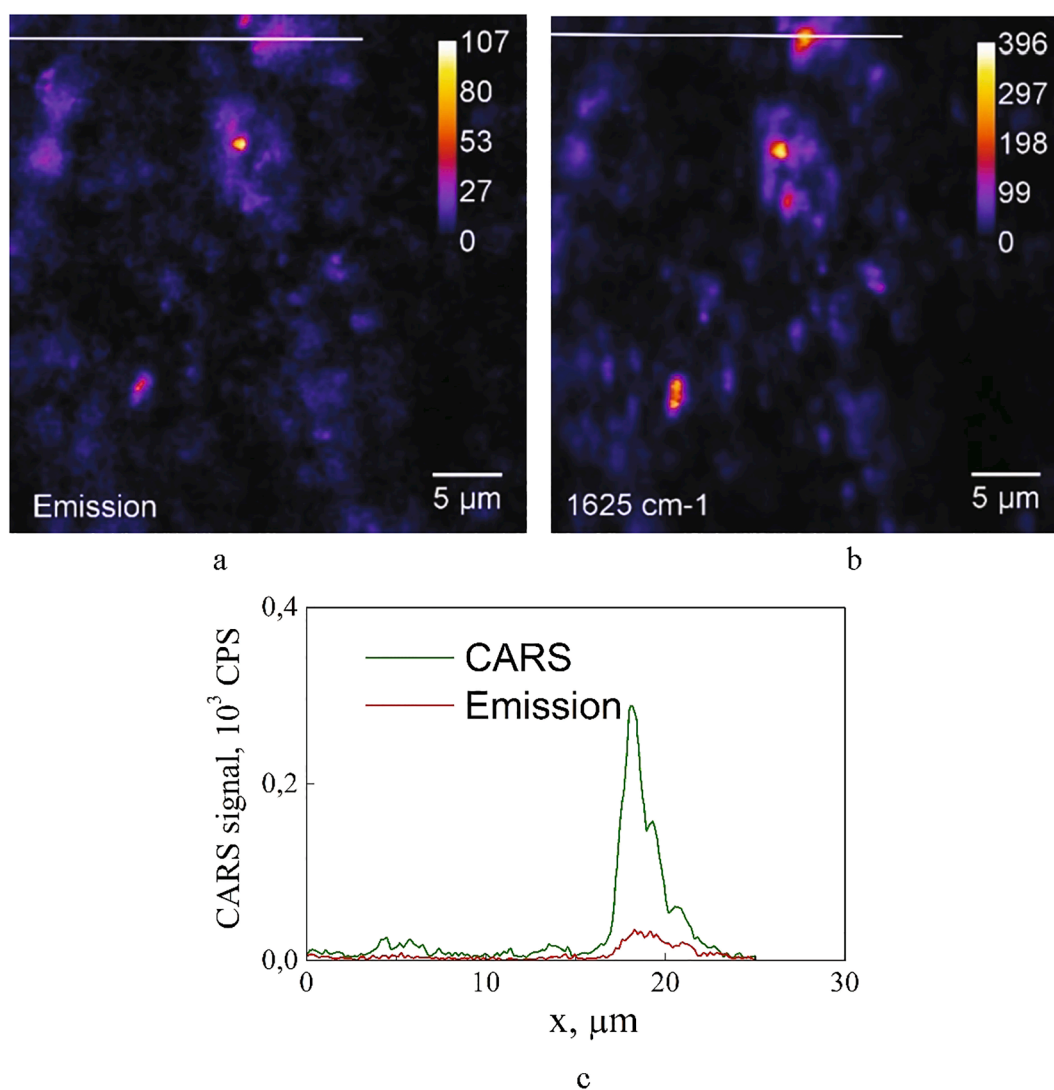


Fig. 6. (a) Emission map and (b) CARS image of the DNA deposited from the aqueous solution with high (42 mg/ml) concentration and registered at 1625 cm^{-1} , close to Ade, Cyt, Thy vibration modes (Table 1), Stokes power was 500 μW and Pump power was 3200 μW , CARS and emission signals (c) are presented along the white line in the upper part of both images (a and b).

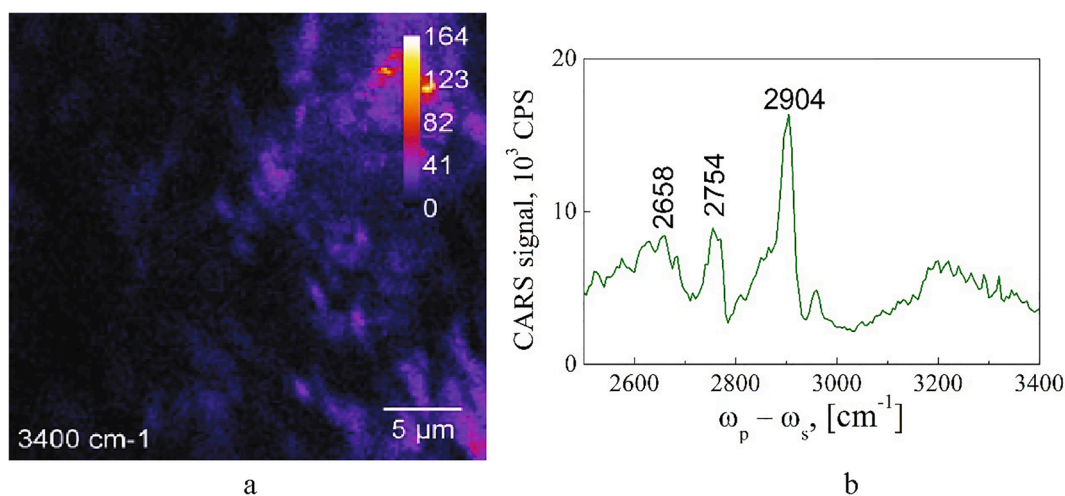


Fig. 7. CARS image (a) and CARS spectrum (b) of the DNA on the glass substrate deposited from the aqueous solution with high (42 mg/ml) concentration. Here we demonstrate a drastic difference with the CARS spectrum of DNA deposited from the aqueous solution with low concentration of 5 mg/ml (Fig. 2). At higher DNA concentration, the CARS spectrum involves also the multi-phonon resonances, as 2754 cm⁻¹ line. Acquisition frequency 3400 cm⁻¹, Stokes power was 500 μW and Pump power was 3200 μW.

Fig. 7 reveals distinct C–H stretching bands and a broad band in the 3340–3400 cm⁻¹ region, most probably associated with vibrations of residual water molecules on the substrate. The band near 3340–3400 cm⁻¹ could be attributed to H bonded OH groups of DNA vibration or overtones as well. The higher number of spectral lines in the CARS spectrum compared to that of the Raman one, more likely originating from a multi-phonon excitation and Fano-type resonances, provides us with richer information on the molecular structure. The overtone near 2754 cm⁻¹ is one of examples (Table 1, Fig. 7).

In contrast to bare graphene layer, deposition of low concentration DNA on the graphene layer results in an irregular pattern of bright spots (Fig. 8). The dark strips in Fig. 8 appear to be associated with weaker CARS signal from DNA against the graphene emission. In this experiment we excited the graphene with more probe and pump power (400 and 400 μW) than in the previous experiment (probe and power were 300 and 170 μW) (Fig. 6).

The comparison of CARS and Raman spectra showed their similarity and recognition. The shift of the CARS spectra compared to those of Raman ones towards the lower frequencies is associated with the difference in processes contributing to the Raman and CARS intensity (see the Introduction). Naturally, a specific form of DNA, namely condensed DNA in the cell nuclei or untwisted one, its conformation and interaction with other molecules will affect both the CARS and the Raman spectra of the DNA under study. [20,21,27].

We demonstrated, that DNA yields high contrast images on graphene layers both at low and high deposition concentrations. We detected the bright spots of DNA deposited at low concentration and the dark filaments of DNA at higher concentration. The DNA molecules could be detected because they generate a stronger CARS signal than the emission from graphene. If the CARS signal from DNA is weaker than the graphene emission induced by probe and pump radiation, the DNA can be identified as dark bands. The DNA simply covers the substrate, and by the absence of a signal from these dark places, one can speak of the presence of the DNA strands. And there is no CARS spectrum features since there is small DNA amount. This allows us to conclude that graphene is a suitable contrast enhancer for the CARS imaging of DNA.

The contrast of DNA can be defined as [6]:

$$C = \frac{I_{\text{DNA}} - I_G}{I_G} \quad (4)$$

here I_{DNA} and I_G represents the signal from DNA and graphene, respectively. The calculated contrast enhancement of DNA on the graphene substrate ranged from a few times (Fig. 5) up to ten times (Fig. 8).

Conclusions

We obtained the CARS spectra of DNA molecules and compared them with corresponding Raman spectra. It was shown that the CARS spectrum of DNA molecules shows a red shift against the Raman one. At high DNA concentration in the deposition solution (42 mg/ml), new bands appear in the high frequency region (2400–3400 cm⁻¹) of the CARS spectrum compared to the Raman one, which are thought to be overtones. In both spectral regions (1200–1700 cm⁻¹ and 2400–3400 cm⁻¹) we obtained the DNA images on the graphene surfaces with and without acquiring their CARS spectra. Unlike the other types of metal nanostructured substrates, we did not acquire any enhancement of the CARS signal from the DNA molecules deposited on the graphene substrate. However, the DNA imaging contrast was enhanced by up to 10 times due to strong third-order non-linearity of monolayer graphene.

CRedit authorship contribution statement

Galya Dovbeshko: Conceptualization, Supervision, Writing - original draft, Validation. **Olena Gnatyuk:** Data curation, Writing - original draft. **Andrej Dementjev:** Methodology, Software, Visualization, Investigation. **Danielis Rutkauskas:** Methodology, Software. **Evgeniya Kovalska:** Data curation, Writing - review & editing. **Anna Baldycheva:** Data curation, Writing - review & editing. **Oleksii Ilchenko:** Investigation, Methodology. **Dmytro Krasnenkov:** Investigation, Methodology. **Tommi Kaplas:** Investigation, Methodology, Writing - original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

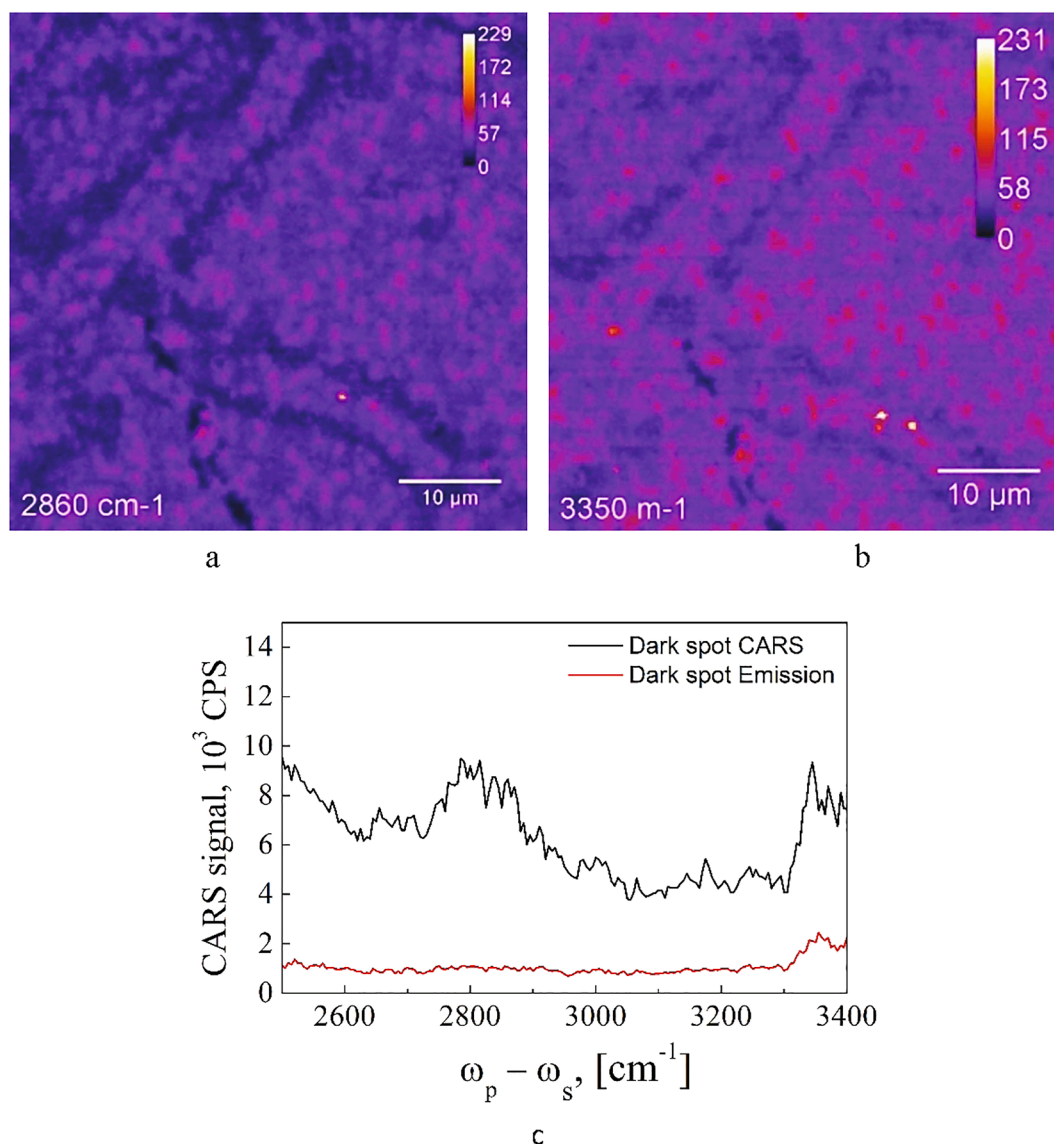


Fig. 8. CARS images (a,b) and CARS spectrum (c) of DNA deposited from the aqueous solution of low concentration (2.1 mg/ml) acquired at different frequencies). The dark strips (a,b) are associated with weaker CARS signal from DNA on the background of the bright graphene emission (c). The acquisition frequencies were 2860 cm^{-1} and 3350 cm^{-1} , Stokes power was $400\text{ }\mu\text{W}$ and Pump power was $400\text{ }\mu\text{W}$.

Acknowledgements

This work has been supported by the HORIZON 2020 project “Asymmetry of biological membrane: theoretical, experimental and applied aspects” (690853-assymcurv-H2020-MSCA-RISE-2015/H2020-MSCA-RISE-2015), NATO SPS 985291, EPSRC First Grant No. 35569/1, Development of 2D materials and “smart” sensors for medical and biological purposes 2018-2022, Ukrainian - Lithuanian projects M/19-2019, joint Ukrainian-Czech R&D projects for the period of 2021–2022, Project NFDU 2020.02/0027 (Dovbeshko Galyna), Project NFDU 2020.01/0043 (Gnatyuk Olena) and we are thankful to Denis Pidhirnyi for DNA sample preparation.

References

- [1] A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, N.J. Halas, Surface-enhanced raman spectroscopy of DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (16) (2008) 5523–5529, <https://doi.org/10.1021/ja800023j>.
- [2] M.L. Metzker, Emerging technologies in DNA sequencing, *Genome Res.* 15 (12) (2005) 1767–1776, <https://doi.org/10.1101/gr.3770505>.
- [3] B. Prescott, W. Steinmetz, G.J. Thomas, Characterization of DNA structures by laser Raman spectroscopy, *Biopolymers* 23 (2) (1984) 235–256, <https://doi.org/10.1002/bip.360230206>.
- [4] X. Chen, M.L. Clarke, J. Wang, Z. Chen, Sum frequency generation vibrational spectroscopy studies on molecular conformation and orientation of biological molecules at interfaces, *Int. J. Mod. Phys. B* 19 (2005) 691. <https://doi.org/10.1142/S0217979205029341>.
- [5] A. Dementjev, J. Kiskis, E. Žurauskas, Imaging of histological sections of the human intestine by multimodal CARS microscope, *Lith. J. Phys.* 52 (3) (2012) 269–275, <https://doi.org/10.3952/lithjphys.52304>.
- [6] E. Hendry, P.J. Hale, J. Moger, A.K. Savchenko, S.A. Mikhailov, Coherent Nonlinear Optical Response of Graphene, *Phys. Rev. Lett.* 102 (9) (2010) 097401, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.097401>.
- [7] A. Dementjev, V. Gulbinas, A. Serbenta, M. Kaucikas, G. Niaura, Coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy/microscope based on a widely tunable laser source, *J. Modern Opt.* 57 (6) (2010) 503–509, <https://doi.org/10.1080/09500341003728932>.
- [8] D.V. Voronine, Z. Zhang, A.V. Sokolov, M.O. Scully, Surface-enhanced FAST CARS: en route to quantum nano-biophotonics, *Nanophotonics* 7 (3) (2018) 523–548, <https://doi.org/10.1515/nanoph-2017-0066>.
- [9] T. Ichimura, N. Hayazawa, M. Hashimoto, Y. Inouye, S. Kawata, Tip-enhanced coherent anti-stokes raman scattering for vibrational nanoimaging, *Phys. Rev. Lett.* 92 (2004) 220801–220804, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.92.220801>.
- [10] A. Pliss, A.N. Kuzmin, A.V. Kachynski, P.N. Prasad, Nonlinear optical imaging and raman microspectrometry of the cell nucleus throughout the cell cycle, *Biophys. J.* 99 (10) (2010) 3483–3491, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.069>.

- [11] A. Karuna, F. Masia, M. Wiltshire, R. Errington, P. Borri, W. Langbein, Label-free volumetric quantitative imaging of the human somatic cell division by hyperspectral coherent anti-stokes raman scattering, *Anal. Chem.* 91 (4) (2019) 2813–2821, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04706.s001>.
- [12] T. Guerenne-Del Ben, Z. Rajaofara, V. Couderc, V. Sol, H. Kano, P. Leproux, J.-M. Petit, Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50453-0>.
- [13] X. Zhang, M.B.J. Roeffaers, S. Basu, J.R. Daniele, D. Fu, C.W. Freudiger, G. R. Holtom, X.S. Xie, Label-free live cell imaging of nucleic acids using stimulated raman scattering (SRS) Microscopy, *Chem. Phys. Chem.* 13 (4) (2012) 1054–1059, <https://doi.org/10.1002/cphc.201100890>.
- [14] S.H. Parekh, Y.J. Lee, K.A. Aamer, M.T. Cicerone, Label-free cellular imaging by broadband coherent anti-stokes raman scattering microscopy, *Biophys. J.* 99 (8) (2010) 2695–2704, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.009>.
- [15] O. Balci, E.O. Polat, N. Kakenov, C. Kocabas, Graphene-enabled electrically switchable radar-absorbing surfaces, *Nat. Commun.* 6 (1) (2015), <https://doi.org/10.1038/ncomms7628>.
- [16] G. Dovbeshko, O. Fesenko, A. Dementjev, R. Karpicz, V. Fedorov, O. Y. Posudievsky, Coherent anti-Stokes Raman scattering enhancement of thymine adsorbed on graphene oxide, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 263, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-26>.
- [17] T. Meyer, N. Bergner, A. Medyukhina, B. Dietzek, C. Krafft, B.F.M. Romeike, R. Reichart, R. Kalff, J. Popp, Interpreting CARS images of tissue within the C-H-stretching region, *J. Biophoton.* 5 (10) (2012) 729–733, <https://doi.org/10.1002/jbio.201200104>.
- [18] A. Volkmer, Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38 (5) (2005) R59–R81, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/5/R01>.
- [19] C.H. Camp Jr., Y.J. Lee, M.T. Cicerone, Quantitative, comparable coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) spectroscopy: Correcting errors in phase retrieval: Quantitative, comparable CARS spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 47 (4) (2016) 408–415, <https://doi.org/10.1002/jrs.4824>.
- [20] V.V. Boiko, V.R. Romanyuk, O.P. Gnatyuk, O.O. Ilchenko, S.O. Karakhim, A. V. Korovin, G.I. Dovbeshko, Vibrational spectra of DNA in the confined interglobular volume of photonic crystal, *J. Biol. Phys.* 44 (1) (2018) 101–116, <https://doi.org/10.1007/s10867-018-9480-0>.
- [21] O.P. Gnatyuk, G.I. Dovbeshko, A. Yershov, S.O. Karakhim, O. Ilchenko, O. Y. Posudievsky, 2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker and drug delivery system with protection properties, *RSC Adv.* 8 (53) (2018) 30404–30411, <https://doi.org/10.1039/C8RA05085F>.
- [22] N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan, E. Volokhina, G. Vrensen, J. Greve, C. Otto, Nonresonant confocal raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells, *Biophys. J.* 84 (6) (2003) 3968–3981, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75124-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75124-8).
- [23] K. Klein, A. Gigler, T. Aschenbrenner, R. Monetti, W. Bunk, F. Jamitzky, G. Morfill, R. Stark, J. Schlegel, Label-free live-cell imaging with confocal raman microscopy, *Biophys. J.* 102 (2) (2012) 360–368, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.027>.
- [24] Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman, Raman spectroscopy of biological tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.* 42 (5) (2007) 493–541, <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>.
- [25] A. Paddubskaya, D. Rutkauskas, R. Karpicz, G. Dovbeshko, N. Nebogatikova, I. Antonova, A. Dementjev, Recognition of spatial distribution of CNT and graphene in hybrid structure by mapping with coherent anti-stokes raman microscopy, *Nanoscale Res. Lett.* 15 (1) (2020), <https://doi.org/10.1186/s11671-020-3264-8>.
- [26] A. Dementjev, D. Rutkauskas, I. Polovy, M. Macernis, D. Abramavicius, L. Valkunas, G. Dovbeshko, Characterization of thymine microcrystals by CARS and SHG microscopy, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020), <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74305-4>.
- [27] T.J. Thomas, H.A. Tajmir-Riahi, C.K.S. Pillai, Biodegradable polymers for gene delivery, *Molecules.* 24 (20) (2019) 3744, <https://doi.org/10.3390/molecules24203744>.

Journal of Nanophotonics

SPIEDigitalLibrary.org/jnp

Enhancement of infrared absorption of biomolecules absorbed on single-wall carbon nanotubes and graphene nanosheets

Galyna Dovbeshko
Olena Gnatyuk
Olena Fesenko
Anna Rynder
Oleg Posudievsky



Enhancement of infrared absorption of biomolecules absorbed on single-wall carbon nanotubes and graphene nanosheets

Galyna Dovbeshko,^a Olena Gnatyuk,^a Olena Fesenko,^a Anna Rynder,^{a,b} and Oleg Posudievsky^c

^aInstitute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Nauki Avenue, 03028, Kyiv, Ukraine

gd@iop.kiev.ua

^bNational University of Kyiv-Mohyla Academy, 2 Skovorody Street, 04070, Kyiv, Ukraine

^cL.V. Pisarzhevsky Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, 31 Nauki Avenue, 03028, Kyiv, Ukraine

Abstract. Surface-enhanced infrared absorption effect was shown for graphene for the first time. Comparative analysis of the effect was carried out for thymine (Thy), one of the bases of DNA, absorbed on single-wall carbon nanotubes (SWCNT) and graphene sheets. The enhancement factor in the case of SWCNT was generally greater in comparison with that obtained for graphene sheets. Its value for SWCNT was up to six and the largest enhancement factors were found for vibrations of CH, C–OH, and C–N bonds. The maximum enhancement factor in the case of graphene sheets equal to 3.7 was found for ring and deformational vibrations of N–H bonds. The obtained experimental data allowed us to suppose that H-bonds influence the interaction between SWCNT and Thy in Thy-SWCNT/Au, while the chemically induced charge transfer is probably dominant in the case of Thy-graphene/Au. © 2012 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). [DOI: [10.1117/1.JNP.6.061711](https://doi.org/10.1117/1.JNP.6.061711)]

Keywords: single-wall carbon nanotubes; graphene; thymine; plasmons; surface enhanced infrared absorption.

Paper 12092SS received Jul. 9, 2012; revised manuscript received Sep. 21, 2012; accepted for publication Sep. 25, 2012; published online Oct. 22, 2012.

1 Introduction

An effect of surface enhanced infrared absorption (SEIRA) of molecules near rough metal surface by a factor of 10 to 200 is well-known.¹ Here we study a possibility to obtain enhancement of optical signals for biomolecules absorbed on nonmetallic surface, namely, carbon nanostructures, such as single-walled carbon nanotubes (SWCNT) and graphene nanosheets, which was not studied before. Carbon nanotubes and graphene are widely used in nanotechnology due to their unique electronic, thermal, optical, mechanical, and transport properties. For example, carbon nanotubes are used as sensors, biocompatible agents, functionalized elements and more.^{2–4} Also, it is supposed that graphene will have many technical applications in photovoltaic, lithium batteries, optoelectronic and electronic devices and so on.^{5–7} It was found earlier that SWCNTs could be used as substrates for surface-enhanced Raman scattering (SERS) effect with an enhancement factor of up to 17.⁸ A question arises: could carbon nanotubes and graphene be used as enhancing supports for SEIRA? If yes, which support, SWCNT or graphene, is more efficient?

The SEIRA effect has been known for the last 40 years. The explanation of the effect, which is similar to SERS, is not simple and includes several mechanisms, including electromagnetic (the increase of the electromagnetic field near rough metal surface or island metal film) and chemical (the increase of the dipole transition moment of the absorbed molecules).¹ The energy of incident photons excites optical transitions in adsorbed molecules and local plasmon oscillations in the metal islands. Plasmon oscillations transfer their energy to adsorbed molecules on the

metal surface, leading to additional molecule absorption. The frequency of plasmon oscillations is determined by the concentration of electrons in the metal, dielectric constants and curvature of the metal surface. Practically, plasmon frequencies of most metals are located in ultraviolet and visible regions with decreased density of states in near infrared (NIR) and mid infrared (MIR) regions. That is why the enhancement factor due to the local electrical field effect drastically decreases in the mid-region. In the case of carbon nanotubes plasmon frequency is located in the far infrared (IR) region.^{5,9} Changing the length of nanotubes could influence the position of plasmon resonance.¹⁰ The presence of plasmon peak at the terahertz region was also reported in Refs. 4, 9, and 11. Analogous data were also published for plasmons in graphenes.^{9,12} So, it was important to perform a comparative study of the SEIRA effect for the stated carbon nanomaterials. This study was carried out using thymine (Thy), one of the bases of DNA, as a molecular agent of the SEIRA effect useful for further sensor application of the nanocarbons.

2 Materials and Methods

Thy was purchased from Sigma-Aldrich. The SWCNTs (A.M. Prokhorov General Physics Institute of Russian Academy of Sciences) have been synthesized by arc discharge between two graphite electrodes in a He atmosphere and purified in accord with Ref. 13. The material has been certified by high resolution transmission electron microscopy and Raman scattering.¹³ The length of SWCNTs was in the range from 1 to 2 μm , and the diameter from 0.9 to 1.6 nm with preferential fraction of 1.4 to 1.5 nm.

The graphene nanosheets were synthesized using a mechanochemical approach to exfoliate graphite microflakes.¹⁴ Briefly, a dry mixture of the graphite microflakes and potassium chloride was mechanochemically treated in an agate grinding bowl using planetary ball mill. The product, the mixture of the nanostructured graphite and crystals of NaCl, was thoroughly washed with water and dried in a vacuum at room temperature. To prepare graphene dispersion, a definite amount of the prepared nanostructured graphite was ultrasonically disintegrated in dimethyl formamide. Dispersion was purified by centrifugation, and the upper half of its volume was selected for further studies. The resulted dispersion was characterized by Raman spectroscopy (Fig. 1) and an amount of graphene in the probe was about 0.13 mg/mL. The typical lateral dimension of the graphene sheets mostly was in the range of 20 to 50 nm.

We first prepared the stock solution of Thy (1 mg/mL) and divided it onto three aliquots. The probe with one weight part of the stock solution was mixed with SWCNTs (0.1 to 1 weight part of nanotubes) by ultrasonic disintegrator (UZDN-A, Sumy, Ukraine) and subsequent centrifugation (9000 rpm) for 40 min. A probe of graphene (0.03 to 0.1 weight part) was also ultrasonically mixed with one weight part of the stock solution for 15 min. Then the samples for further studies

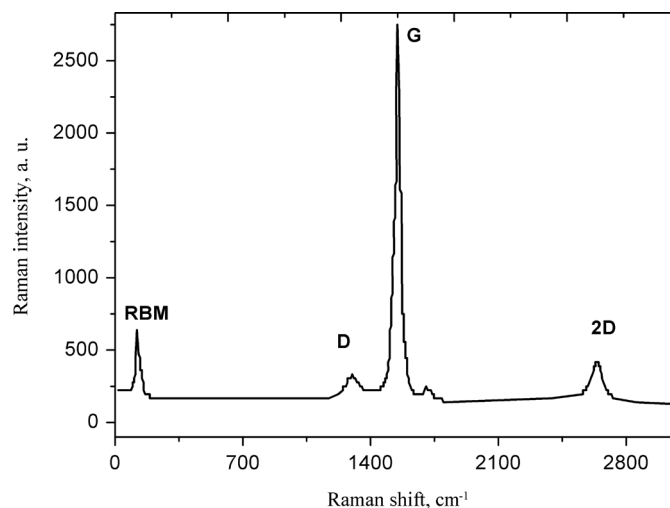


Fig. 1 Raman spectrum of single-wall carbon nanotubes ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$).

were prepared by depositing a drop of the Thy solution and a Thy solution with carbon nanotubes (graphene) on gold film. The procedure used for preparation of the samples ensured the same Thy/SWCNT and Thy/graphene weight ratios.

A Bruker IFS-66 instrument with a reflection attachment (the incidence angle of 16.5 deg) was used for to register Fourier transform infra-red (FTIR) spectra of Thy and their complexes with SWCNT or graphene sheets in the reflectance mode in the 400 to 4000 cm^{-1} range. Evaluation of the spectra was done with Opus 5.5 software. The position of the bands has been estimated with the use of the method of second derivative and/or standard method. Reproducibility of the frequency in the IR spectra was equaled to $\pm 0.5 \text{ cm}^{-1}$ and for absorption ± 0.0005 a.u. The experimental enhancement factor was determined as the ratio of the intensity of the absorbance bands of Thy registered for Thy-SWCNT/gold and Thy-graphene/gold systems to that for Thy/gold. We used gold as IR substrate¹⁵ for Thy due to the fact that CaF_2 or any other IR substrate will restrict the region (900 to 400 cm^{-1}) of registration of IR spectra, especially the region of the most enhanced bands of Thy on carbon nanotubes or graphene sheets.

3 Characterization of SWCNT and Graphene Nanosheets

Carbon nanotube is a graphite sheet that is rolled up to form a cylinder. Carbon materials can be effectively characterized by Raman spectroscopy. Moreover, Raman spectra are like fingerprints of any carbon material, including carbon nanotubes and graphene. The main feature of the Raman spectra of graphite structure is a so-called G-mode (1600 cm^{-1}) with lines of E_{2g} , E_{1g} , A_{1g} symmetry in the Γ point of Brillouin zone that correlates with the ordering of crystal lattice of graphite structure. The second characteristic mode of graphite-like materials is a so-called D-mode, with A_{1g} symmetry that characterizes the disorder of graphene layer lattice.³ It refers to breathing vibrations of rings of graphene layer in the K point of Brillouin zone.¹⁶ The second order mode of this vibration [so called two-dimensional (2D)] is registered at 2600 to 2700 cm^{-1} in SWCNT, and they have the intensity which usually exceeds the intensity of second-order vibrations.¹⁷

The last fact could be the evidence that nanotubes consist of similar structures that manifest a strong electron-phonon interaction and strong dispersion dependence of D-mode.¹⁷ Other carbon-like materials do not have such peculiarity.¹⁸ SWCNT has a low frequency mode of significant intensity that is assigned to the breathing vibration of a whole tube.¹⁶ The characteristic feature of SWCNT Raman spectra is half the width of the bands equal to 10 to 30 cm^{-1} for G-mode, and 30 to 50 cm^{-1} for D-mode, as well as 0.1 or less for D/G intensity ratio. The position of G and D bands, appearance of breathing mode and its position, half-width and relative intensity of all the bands could be used for characterization of a type of allotropic forms of carbon, the nanotubes and their diameters. Raman spectrum of the carbon nanotubes used in this work is presented in Fig. 1.

Graphene is a monolayer of carbon atoms packed into a 2-D honeycomb crystal structure. Graphene is a semimetal. Graphene layers are held together by van der Waals forces. By analogy with SWCNT, Raman spectrum of graphene contains G, D and 2-D bands also. Position of the maximum of 2-D band could be used as a characteristic to determine the number of layers in the graphene sheets.¹⁹ Raman spectrum of a thin film of graphene sheets used in the present work is presented in Fig. 2.

4 Results and Discussion

It is well known from calculation data²⁰⁻²² that adsorption of nucleo-bases on carbon nanotubes proceeds by π - π stacking interaction resulting in a flat laying of the base ring. Earlier we studied mechanism of interaction of DNA with SWCNT, using Thymine, adenine, poly-A as model systems and stated their spectroscopic features.^{21,23} In our previous study of the Thy-SWCNT system²³ we have concluded the adsorption of the separated molecules of Thy on the surface of the carbon nanotubes results in the island film formation due to π - π stacking interaction. The interaction of DNA bases with SWCNT and their different aspects, such as structure and mechanism under interaction, were studied in other papers,²³⁻²⁵ including our paper;²³ however, the

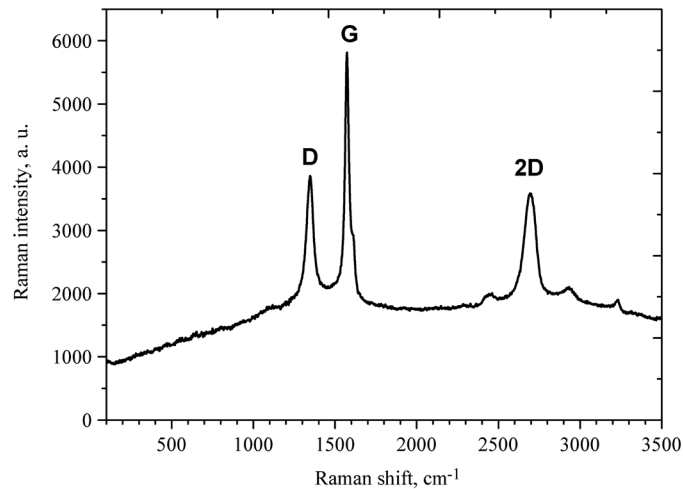


Fig. 2 Raman spectra of the graphene film ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$).

aspect of enhancement of IR signals of biological molecules (namely DNA) on SWCNT was discussed earlier only in our paper.²⁶

For the Thy-SWCNT system (Fig. 3) we found a number of enhanced vibrations in comparison with individual Thy. Thus, the $\text{C}_2=\text{O}$ vibration is characterized by the enhancement of the intensity and the low-frequency shift from 1775 to 1755 cm^{-1} in comparison with Thy/Au system that indicates formation of new intermolecular H-bonds with participation of $\text{C}_2=\text{O}$. The highest enhancement factor (up to 5.3) was observed for bands 1481 , 1440 , 1427 , 1364 cm^{-1} assigned to N–H and C–H vibrations.

The bands at 1024 , 933 , 831 , 557 , 475 , 428 cm^{-1} assigned to CH_3 and N_1C_2 , $\text{C}_2=\text{O}$, $\text{C}_4=\text{O}$, N_3H , N_3C_4 , $\text{N}_3\text{C}_2=\text{O}$ of Thy in Thy-SWCNT/Au showed considerable enhancement of their intensity three to five times (Table 1). It could be connected with increase of the local electrical fields in the system SWCNT/Au system. The crystalline packing of the absorbed Thy molecules is one more reason of the observed enhancement in the low frequency region.

Adsorption of Thy on graphene sheets led to widening (up to two times) of the band at 1669 cm^{-1} , decreasing its intensity (0.9) and high-frequency shift to 1678 cm^{-1} (Fig. 4). This indicated the formation of new bonds in Thy-graphene/Au system in comparison with Thy/Au and the appearance of more strong interaction in Thy-graphene system. We calculated the enhancement factor for Thy absorbed on graphene and found it equal to 3.7 with the maximum value for ring vibration at 979 cm^{-1} . Ring vibrations are the most enhanced in Thy-graphene in comparison with other types of vibrations, which indicates parallel or a slightly tilted location of the Thy ring relative to the graphene plane.

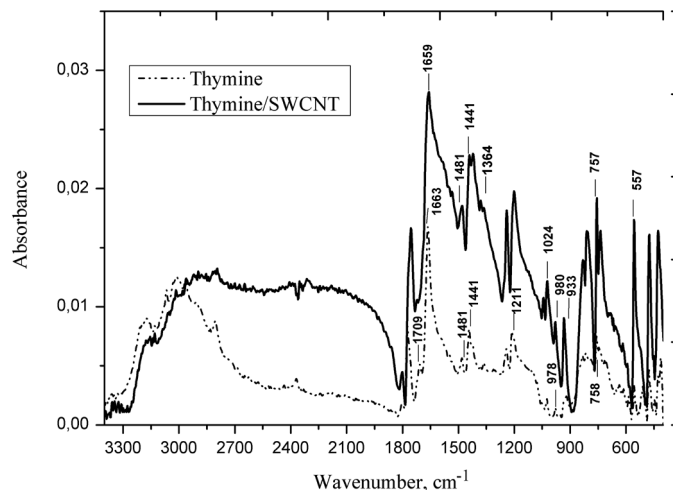


Fig. 3 SEIRA spectra of Thy-SWCNT/Au in comparison with Thy/Au.

Table 1 Enhancement factors and assignments of IR bands of Thy in Thy-graphene/Au and Thy-SWCNT/Au systems.

Thy (on the Au)	Thy + Graphene			Thy + SWCNT		
	Wavenumber, cm ⁻¹	<i>g</i> ^{2a}	Assignment	Wavenumber, cm ⁻¹	<i>g</i> ^{2a}	Assignment
1709	1706	1.9	C ₂ =O	1709	1.8	C ₂ =O
1663	1678	0.9	C ₄ =O	1659	1.4	C ₄ =O
1550	1550	1.4	C=C	1550	2.3	C=C
1481	1482	1.3	N ₁ -H def	1481	2.7	C-H ₃ def
1440	1443	1.2	N ₁ -H def, C ₃ -H def	1441	4.0	N ₁ -H def
1427	1420	1.4	C ₃ -H def	1421	5.3	N ₁ -H def, C ₃ -H
1364	1366	3.0	N ₃ -H def	1364	4.0	N ₃ -H def.
1241	1241	1.7	C-C	1241	1.7	C-C
1212	1202	1.3	C ₆ -H def, C ₂ -N ₃ str.	1201	2.3	C ₆ -H def, C ₂ -N ₃ str.
1025	1022	1.5	CH, C-OH	1024	4.2	C-H, C-OH
978	979	3.7	N-C ₂ ring-bending	980	4.1	N-C ₂ ring-bending
920	934	2.6	Γ-CH	933	5.0	γ-CH
842	829	2.0	N ₃ -H, γ-C ₂ =O	831	2.6	N ₃ -H, γ-C ₂ =O
812	811	2.2	N ₁ -H, γ-C ₂ =O, C ₄ =O	810	2.7	N ₁ -H, γ-C ₂ =O, C ₄ =O
758	757	1.7	Skeletal ring mode	757	2.5	Skeletal ring mode
743	741	1.7	C ₄ =O			
				617	2.3	γ-C ₄ =O
554	556	2.0	N-H	557	4.2	β-C ₄ =O
474	476	1.9	N-H	475	2.8	α-ring-bending

^a*g*²-Enhancement factor.

5 Probable Mechanism of SEIRA Effect

Basing on the obtained data, we could assume that there are several mechanisms of SEIRA effect in the studied systems. One of the probable mechanisms is local field enhancement in the near-field zone of the finite-length metallic SWCNTs, which is considered in detail in Refs. 2 to 4. Due to edge effects, a large surface density of electric charge concentrates near the edges of SWCNT. This charge induces a large electric field, resulting in strong field intensity enhancement outside the SWCNT.^{2,24} Our data shows that the enhancement factor for Thy-SWCNT has a similar behavior as for Thy-graphene in the region of 400 to 1600 cm⁻¹ (Fig. 5). So, we suppose that plasmons of graphene and SWCNT located in the far-infrared region^{4,12,13} participate in the process of IR enhancement for Thy molecules absorbed on SWCNT and graphene sheets. In the region of 2000 to 4000 cm⁻¹ (Figs. 3 and 4), the spectra of Thy-SWCNT and Thy-graphene show different behavior for interaction of Thy molecules with the studied carbon nanostructures. That fact allowed us to suppose that H-bonds influence the interaction between SWCNT and Thy in Thy-SWCNT/Au, while the chemically induced charge transfer is probably dominant in the case of Thy-graphene/Au. We registered a shift for a majority of the bands in IR spectra, the shift in the Thy/graphene system being greater in comparison with SWCNT/Thy, e.g., in the Thy/graphene system the shift was about 15 cm⁻¹—from 1663 to 1678 cm⁻¹, for SWCNT/Thy it was about 4 cm⁻¹—from 1663 to 1659. Other reasons come from the literature about a possibility of charge transfer.²⁷⁻²⁹

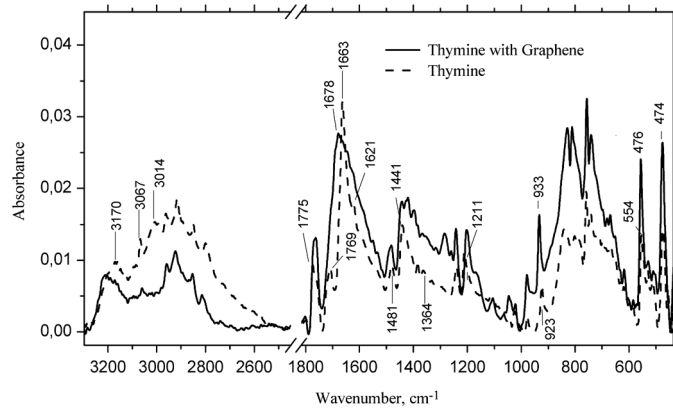


Fig. 4 SEIRA spectra of Thy-graphene/Au in comparison with Thy/Au.

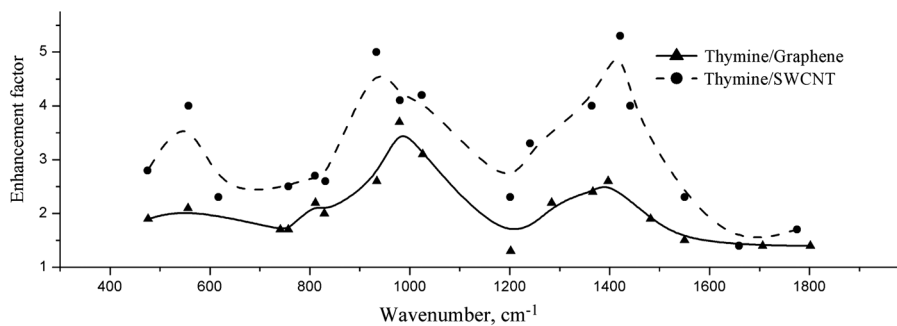


Fig. 5 Dependence of the enhancement factor on wavenumbers in Thy-SWCNT/Au and Thy-graphene/Au systems.

6 Conclusions

It was first shown that graphene can be used as a substrate for surface-enhanced infrared spectroscopy. The enhancement factor for Thymine molecules absorbed on SWCNT is greater than that on graphene nanosheets. The obtained experimental data allowed us to suppose that H-bonds influence the interaction between SWCNT and Thy in Thy-SWCNT/Au, while the chemically induced charge transfer is probably dominant in the case of Thy-graphene/Au.

Acknowledgments

We thank the STCU Project No. 5525, Ukrainian-German project No. M366, Nanotwinning project No. 294952 of the FP7, the Program of Joint Russian-Ukrainian Projects, and the Targeted Complex Program of the National Academy of Sciences of Ukraine "Fundamental problems of nanostructured systems, nanomaterials and nanotechnologies" for their financial support. This paper is a result of the efforts of many people. Professor Galyna Dovbeshko is responsible for spectral analyses. Dr. Olena Gnatyuk is responsible for the measurement of FTIR of spectra Thy/Graphene. Dr. Olena Fesenko is responsible for measurement Thy/SWCNT and calculation enhancement factor of SEIRA effect. Anna Rynder is responsible for the sample preparation, and Dr. Oleg Posudievsky is responsible for the synthesis of graphene nanosheets.

References

1. V. A. Kosobukin, "The effect of enhancement the external field near the surface of metal and its manifestation in spectroscopy," *Surface Phys. Chem. Mech.* **12**, 5–20 (1983).
2. M. Dresselhaus, G. Dresselhaus, and P. Avouris, *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*, Springer, Berlin (2001).

3. K. Williams et al., "Nanotechnology—carbon nanotubes with DNA recognition," *Nature* **420**(6917), 761 (2002), <http://dx.doi.org/10.1038/420761a>.
4. M. Dresselhaus, G. Dresselhaus, and P. Eklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press, New-York (1996).
5. G. Xu et al., "Plasmonic graphene transparent conductors," *Adv. Mater.* **24**(10), OP71–OP76 (2012), <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201104846>.
6. Y. Sun, Q. Wu, and G. Shi, "Graphene based new energy materials," *Energy Environ. Sci.* **4**(4), 1113–1132 (2011), <http://dx.doi.org/10.1039/c0ee00683a>.
7. F. Bonaccorso et al., "Graphene photonics and optoelectronics," *Nat. Photon.* **4**(9), 611–622 (2010), <http://dx.doi.org/10.1038/nphoton.2010.186>.
8. X. Ling et al., "Can graphene be used as substrate for Raman Enhancement?," *Nano Lett.* **10**(2), 553–561 (2010), <http://dx.doi.org/10.1021/nl903414x>.
9. I. Crassee et al., "Intrinsic terahertz plasmons and magnetoplasmons in large scale monolayer graphene," *Nano Lett.* **12**(5), 2470–2474 (2012), <http://dx.doi.org/10.1021/nl300572y>.
10. G. Y. Slepyan et al., "Experimental evidence of localized plasmon resonance in composite materials containing single-wall carbon nanotubes," *Phys. Rev. B* **85**(24), 165435 (2012), <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevB.85.245134>.
11. G. Y. Slepyan et al., "Terahertz conductivity peak in composite materials containing carbon nanotubes: theory and interpretation of experiment," *Phys. Rev. B* **81**(20), 205423 (2010), <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevB.81.205423>.
12. H. Yan et al., "Tunable infrared plasmonic devices using graphene/insulator stacks," *Nat. Nanotechnol.* **7**(5), 330–334 (2012), <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2012.59>.
13. E. Obraztsova et al., "Structural measurements for single-wall carbon nanotubes by Raman scattering technique," *Nanostruct. Mater.* **12**(1–4), 567–572 (1999), [http://dx.doi.org/10.1016/S0965-9773\(99\)00185-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0965-9773(99)00185-3).
14. O. Y. Posudievsky et al., "Preparation of graphene oxide by solvent-free mechanochemical oxidation of graphite," *J. Mater. Chem.* **22**(25), 12465–12467 (2012), <http://dx.doi.org/10.1039/c2jm16073k>.
15. J. J. Panek et al., "p-Nitrobenzoic acid adsorption on nanostructured Au surface investigated by combined experimental and computational approaches," *Chem. Phys. Chem.* **12**(13), 1–12 (2011), <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.v12.13>.
16. R. Saito et al., "Raman spectroscopy of graphene and carbon nanotubes," *Adv. Phys.* **60**(3), 413–550 (2011), <http://dx.doi.org/10.1080/00018732.2011.582251>.
17. C. Thomsen and S. Reich, "Double resonant Raman scattering in graphite," *Phys. Rev. Lett.* **85**(24), 5214–5217 (2000), <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.85.5214>.
18. G. Dovbeshko et al., "Vibrational spectra of carbonaceous materials: a SEIRA spectroscopy versus FTIR and Raman," *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* **13**(Suppl. 1), 393–400 (2005), <http://dx.doi.org/10.1081/FST-200039387>.
19. L. M. Malard et al., "Raman spectroscopy in graphene," *Phys. Rep.* **473**(5–6), 51–87 (2009), <http://dx.doi.org/10.1016/j.physrep.2009.02.003>.
20. Y. V. Shtogun, L. M. Woods, and G. I. Dovbeshko, "Adsorption of adenine and thymine and their radicals on single-wall carbon nanotubes," *J. Phys. Chem. C* **111**(49), 18174–18181 (2007), <http://dx.doi.org/10.1021/jp074270g>.
21. G. Dovbeshko et al., "Modeling of DNA base interactions with carbon nanotubes: ab initio calculations and SEIRA data," *AIP Conf. Proc.* **1148**, 416–420 (2009), <http://dx.doi.org/10.1063/1.3225333>.
22. S. Meng et al., "DNA nucleosides interaction and identification with carbon nanotubes," *Nano Lett.* **7**(1), 45–50 (2007), <http://dx.doi.org/10.1021/nl0619103>.
23. G. Dovbeshko et al., "Nucleic acid interaction and interfaces with single-walled carbon nanotubes," *Carbon Nanotubes 2010*, J. M. Marulanda, Ed., pp. 697–719, In-Tech, Vukovar, Croatia (2010).
24. N. Varghese et al., "Binding of DNA nucleobases and nucleosides with graphene," *Chem. Phys. Chem.* **10**(1), 206–210 (2009), <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.v10:1>.
25. F. Albertorio et al., "Base dependent DNA-carbon nanotube interactions: activation enthalpies and assembly-disassembly control," *Nanotechnology* **20**(39), 395101 (2009), <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/20/39/395101>.

Olena Fesenko · Leonid Yatsenko
Mikhaylo Brodin
Editors

Nanomaterials Imaging Techniques, Surface Studies, and Applications

Selected Proceedings of the FP7 International
Summer School Nanotechnology: From
Fundamental Research to Innovations,
August 26–September 2, 2012,
Bukovel, Ukraine

 Springer

Chapter 2

Comparative Analysis of the IR Signal Enhancement of Biomolecules Adsorbed on Graphene and Graphene Oxide Nanosheets

Galyna Dovbeshko, Olena Fesenko, Olena Gnatyuk, Anna Rynder and Oleg Posudievsky

2.1 Introduction

Carbon nanostructures, namely, single-wall carbon nanotubes (SWCNT) and graphenes, are of great interest due to their unique electronic, thermal, optical, mechanical, and transport properties. Here we study a possibility of using these materials as enhancers of optical signals of adsorbed biomolecules similar to the effect earlier known for metallic and semiconducting surfaces in surface enhanced spectroscopy [1, 2]. Surface enhanced infrared absorption (SEIRA) and surface enhanced Raman scattering (SERS) effects have been known for the past 40 years. They consist in enhancement of optical process cross section for molecules located near curved metal surface. The enhancement for IR signal could be up to $(2-5) \times 10^2$ and up to 10^6 for RS. The explanation of the effect is complex and usually includes electromagnetic (the increase of the electromagnetic field near rough metal surface or island metal film) and chemical (the increase of the dipole transition moment of the adsorbed molecules) mechanisms. Earlier, we studied the SEIRA effect for DNA molecules absorbed on carbon nanotubes [3] and graphene [4] and found it to be up to 10 and 4, correspondingly. We also considered the

G. Dovbeshko (✉) · O. Fesenko · O. Gnatyuk · A. Rynder
Institute of Physics of the National Academy of Sciences, 46 Nauki Ave,
Kyiv 03028, Ukraine
e-mail: gd@iop.kiev.ua

A. Rynder
National University of Kyiv-Mohyla Academy, 2 Skovorody St, Kyiv 04070, Ukraine
e-mail: rynder@ukr.net

O. Posudievsky
L.V. Pisarzhevsky Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences,
31 Nauki Ave, Kyiv 03028, Ukraine
e-mail: posol@inphyschem-nas.kiev.ua

O. Fesenko et al. (eds.), *Nanomaterials Imaging Techniques, Surface Studies, and Applications*, Springer Proceedings in Physics 146.
DOI: 10.1007/978-1-4614-7675-7_2, © Springer Science+Business Media New York 2013

25

SERS effect for poly(A) molecules adsorbed on carbon nanotubes, the enhancement factor of which reached 10^5 [5]. In this work we compare different graphene-based nanostructured supports and reply to the question of what type of support, graphene or its oxide form, is more efficient. This study was done using thymine (Thy) molecule, one of the bases of DNA that could be useful for further sensor application of the nanocarbons.

2.2 Materials and Methods

Preparation of graphene and graphene oxide was based on primary mechanochemical delamination of graphite microflakes (Alfa Aesar) [6]. Briefly, a dry mixture of the graphite microflakes and sodium chloride was mechanochemically treated in an agate grinding bowl using planetary ball mill. The product, a mixture of the nanostructured graphite and crystals of NaCl, was thoroughly washed with water to remove the salt and dried in vacuum at room temperature. To prepare a graphene dispersion, a definite amount of the prepared nanostructured graphite was ultrasonically disintegrated in dimethylformamide. The dispersion was purified by centrifugation, and the upper half of its volume was selected for further studies. The concentration of the graphene dispersion was about 0.13 mg/mL. The typical longitudinal size of the graphene sheets was in the range of 20–50 nm.

To prepare the graphene oxide, sodium chloride was replaced by potassium permanganate and a definite quantity of sulfuric acid. The mechanochemical treatment of the reaction mixture was carried out in the same conditions. A definite amount of the prepared nanostructured graphite oxide was dispersed in water. Dispersion was purified by centrifugation, and the upper half of its volume was selected for further studies. The concentration of the aqueous graphene oxide dispersion was about 1.0 mg/mL. The typical longitudinal size of the graphene sheets was in the range of 30–50 nm [6].

SWCNTs (A.M. Prokhorov General Physics Institute of Russian Academy of Sciences) were synthesized in arc discharge in the atmosphere of He, and then purified and characterized by high resolution transmission electron microscopy and Raman scattering [7]. The length of SWCNTs was from 1 to 2 μ , and the diameter from 0.9 to 1.6 nm with preferential fraction of 1.4–1.5 nm. The concentration of the stock aqueous dispersion of SWCNT prepared according to [5] was 0.1 mg/ml.

Thy was used as received from Sigma-Aldrich. We first prepared the stock solution of Thy (1 mg/mL) and divided it onto 4 aliquots. The probe with 1 weight part of the stock solution was mixed with SWCNTs (0.1–1 weight part of nanotubes) by ultrasonic disintegrator UZDN-A (Sumy-Pribor) and subsequent centrifugation (9,000 rpm) during 40 min. A probe of graphene and graphene oxide (0.03–0.1 weight part) was also ultrasonically mixed with 1 weight part of the stock solution of Thy for 15 min. Then, the samples for further studies were prepared by depositing a drop of the solution of Thy and that of Thy with graphene, graphene oxide, or carbon nanotubes on the gold support. The procedure

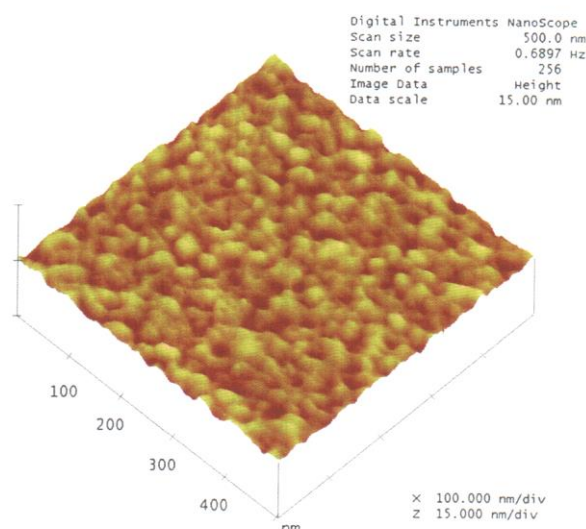
used for preparation of the samples ensured the same Thy/SWCNT, Thy/graphene, and Thy/graphene oxide weight ratios.

Home-made gold support for IR spectroscopy (Fig. 2.1) was produced in the Institute of Physics of NASU (Kiev, Ukraine) [8]. A thin layer of gold was prepared by vacuum deposition of the metal (99.999 pure) on the glass supports (TF-1 glass, 20×20 mm) via an intermediate adhesive Cr layer. Before the deposition, glass surface was cleaned by $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ and $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ solution subsequently, both 1:2:2 by volume concentration for 5 min at boiling temperature. Then it was rinsed in distilled water and dried in a flow of pure nitrogen. The gold was evaporated from molybdenum heater and deposited at a rate of $1.0\text{--}1.5 \text{ nm s}^{-1}$ on room temperature substrate. The thickness of gold surface was within $300\text{--}350 \text{ \AA}$ in the different experiments, the Cr interlayer being not thicker than 20 \AA . The gold surface just after deposition looks like hydrophobic surface with wetting angle close to 80° and random roughness about $10\text{--}20 \text{ \AA}$.

Confocal microscope LCM-510 (Germany) with laser excitation of 405, 543, and 488 nm was used to characterize the samples prepared for IR spectroscopy studies. The images were registered by a digital camera AxioCam [9].

Bruker IFS-66 instrument with a reflection attachment (the incidence angle of $16^\circ 30'$) was used to register Fourier transform infrared (FTIR) spectra of Thy and its complexes with graphene, graphene oxide, and SWCNT in the reflectance mode (Fig. 2.2) in the $400\text{--}4,000 \text{ cm}^{-1}$ range. Evaluation of the spectra was done with Opus 5.5 software. The position of the bands was estimated using the method of second derivative and/or standard method. Reproducibility of the frequency in the IR spectra was equaled to $\pm 0.5 \text{ cm}^{-1}$ and for absorption $\pm 0.0005 \text{ a.u.}$ The experimental enhancement factor was determined as the ratio of the integral intensity of the absorbance bands of Thy registered for Thy-graphene oxide/Au, Thy-graphene/Au, and Thy-SWCNT/Au systems to that for Thy/Au for the same

Fig. 2.1 AFM image of the gold support used in SEIRA studies



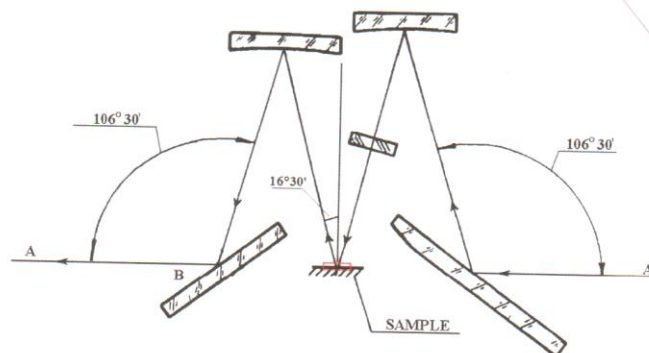


Fig. 2.2 Transmittance geometry of IR studies

amount of Thy. We used gold as IR substrate [9] for Thy due to the fact that CaF_2 or any other IR substrate will restrict the registration region ($900\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) of IR spectra, especially the region of the most enhanced bands of Thy on graphene or SWCNT.

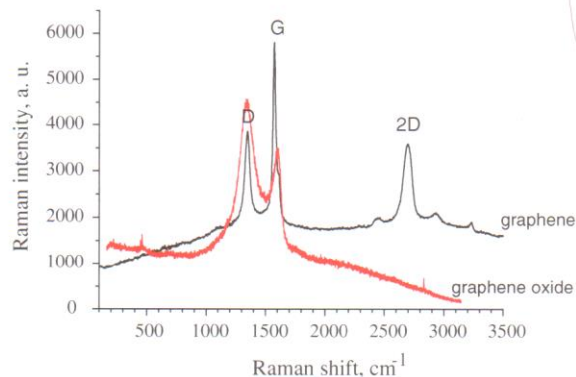
The total enhancement factor in the $500\text{--}1,800\text{ cm}^{-1}$ range for Thy adsorbed on graphene-based substrates was calculated as the ratio of the integral intensity of all bands of Thy adsorbed on graphene, graphene oxide, or nanotubes to that of Thy adsorbed on the gold support.

2.3 Results and Discussion

It is well known that all carbon materials can be effectively characterized by Raman spectroscopy. The main feature of the Raman spectra of graphite structure is the so called G-mode ($\sim 1,600\text{ cm}^{-1}$) with lines of E_{2g} , E_{1g} , and A_{1g} symmetry in the Γ point of Brillouin zone that correlates with the ordering of crystal lattice of graphite structure. The second characteristic mode of the graphite-like materials is the so called D-mode ($\sim 1,300\text{ cm}^{-1}$), with A_{1g} symmetry that characterizes the disorder of graphene layer lattice [10]. It refers to breathing vibrations of rings in graphene layer in the K point of Brillouin zone [10]. The second order mode of this vibration (so-called 2D or G' band) is registered at $2,600\text{--}2,700\text{ cm}^{-1}$, and has the intensity that usually exceeds the intensity of second-order vibrations and even first order tones [11].

By analogy with SWCNT, Raman spectrum of graphene also contains G, D, and 2D bands. Position, line shape, and intensity of 2D (or G') band could be used as a characteristic of the number of layers in the graphene sheets [11, 12]. The Raman spectra of the graphene and graphene oxide films are shown in Fig. 2.3. From the analysis of the graphene spectrum we could suppose that the sample has

Fig. 2.3 Raman spectra of graphene ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$) and graphene oxide films ($\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$)



more than three layers. In the spectrum of graphene oxide we do not obtain the 2D mode.

Confocal microscopy data showed that graphene and graphene oxide films on the gold support have flake-like forms of different size: large fragments (more than 1μ) and small ones (less than 1μ) which consist of subclusters; graphene oxide has round-like homogeneous fragments, and their size is usually more than 2μ (Fig. 2.4). The images in Fig. 2.4 were received by superimposition of three images obtained using lasers with the wavelengths of 405, 543, and 488 nm.

It is well known from the data of the numerical calculations [13] that adsorption of nucleobases on carbon nanotubes occurs by π - π stacking resulting in nearly flat geometry of Thy (or adenine). Here, we compare the experimental data obtained with vibration spectroscopy for Thy adsorbed on SWCNT, graphene and graphene oxide. The obtained Thy-graphene and Thy-graphene oxide complexes were characterized by IR spectroscopy (Fig. 2.5) and compared with Thy-SWCNT system. The enhancement factor in the case of SWCNT was generally greater in comparison with that obtained for graphene sheets. Its value for SWCNT was up to 5.3 and the largest enhancement factors were found for vibrations of C-H, C-OH, and C-N bonds. The maximum enhancement factor in the case of graphene equal to 3.7 was found for ring and deformational vibrations of N-H bonds. In our previous work [5] the obtained experimental data allowed us to suppose that H-bonds influence the interaction between SWCNT and Thy in Thy-SWCNT system, while the chemically induced charge transfer is likely dominant in the case of Thy-graphene/Au.

Complexes of Thy with graphene, graphene oxide, and SWCNT are assigned according to [14–17] and characterized by the following spectroscopic features:

1. In all complexes of Thy-graphene (Fig. 2.5), Thy-graphene oxide (Fig. 2.5) and Thy-SWCNT (Table 2.1), the $\text{C}_2=\text{O}$ vibration shows the enhancement of the intensity and a shift in the low-frequency region from $1,774$ to $1,761 \text{ cm}^{-1}$ (both for Thy-graphene and for Thy-SWCNT) and to $1,759 \text{ cm}^{-1}$ (for Thy-graphene oxide) that indicates the formation of new intermolecular H-bonds with $\text{C}_2=\text{O}$ participation for these complexes.

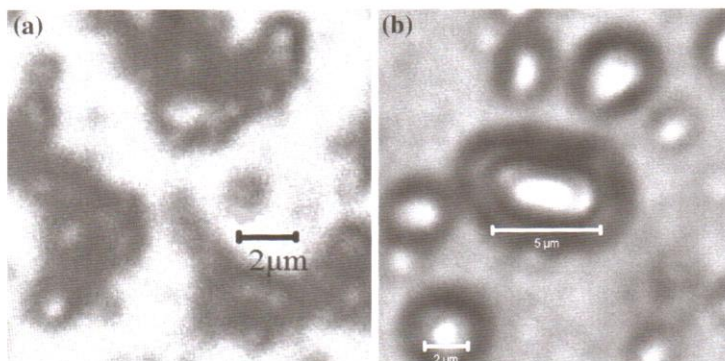


Fig. 2.4 Confocal images of graphene (a) and graphene oxide (b) (excitation wavelength: 405 nm—39 %, 543 nm—71 %, 488 nm—31 %; Filters: Ch2: LP 420, Ch3: LP 560, Ch2: LP 505; Pinhole Ch2: 150 μm , Ch3: 200 μm , Ch2: 180 μm)

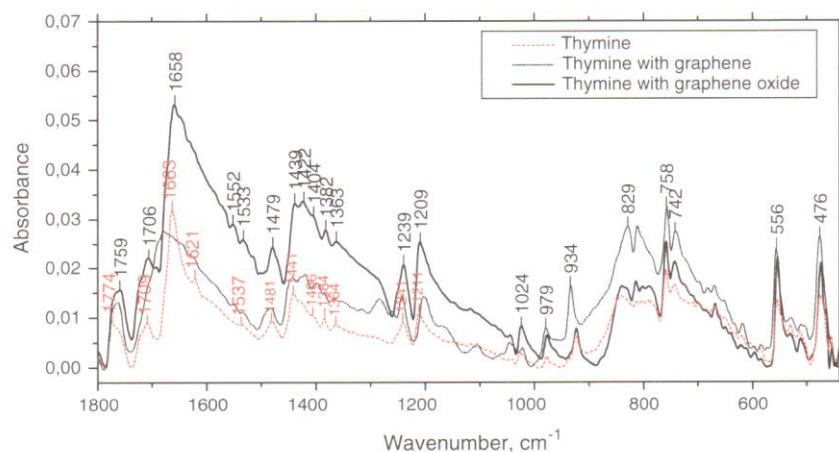


Fig. 2.5 SEIRA spectra of Thy and Thy adsorbed on graphene and graphene oxide

2. Thy-graphene (Fig. 2.5) and Thy-SWCNT (Table 2.1) shows decrease in the intensity of $\text{C}_4=\text{O}$ vibration and a shift from $1,663$ to $1,678$ cm^{-1} in the case of graphene and to $1,679$ cm^{-1} in the case of SWCNT [14], indicating the breaking of some of the inter- or intramolecular H-bonds with participation of $\text{C}_4=\text{O}$. In the case of graphene oxide, we observe an increase in the intensity of $\text{C}_4=\text{O}$ vibration and a shift from $1,663$ to $1,658$ cm^{-1} .
3. The spectral range from 978 to 474 cm^{-1} assigned to deformation $\text{N}-\text{C}_2$, ring-bending, γ -CH, CO, N-H, and ring-bending vibrations for both Thy-graphene and Thy-SWCNT complexes show 4–5-fold increase in intensity of the major bands (Fig. 2.5). It should be noted that we observed 3–4 enhancement factor

Table 2.1 Enhancement factors and assignments of IR bands of Thy/Au; Thy-graphene/Au; Thy-graphene oxide/Au and Thy-SWCNT/Au systems [14–17]

Thy	Thy-Graphene		Thy-Graphene oxide		Thy + SWCNT		Assignment
	Wavenumber, cm^{-1}	g^{2*}	Wavenumber, cm^{-1}	g^{2*}	Wavenumber, cm^{-1}	g^{2*}	
1,774	1,761	1.5	1,759	1.8	1,761	2.1	C2=O
1,709	1,706	1.9	1,706	2.5	1,709	1.8	C2=O
1,663	1,678	0.9	1,658	3.3	1,679	1.4	C4=O
1,550	1,550	1.4	1,552	3.2	1,550	2.3	C=C
1,481	1,482	1.3	1,479	2.6	1,481	2.7	C-H ₃ def
1,440	1,443	1.2	1,439	2.8	1,441	4.0	N ₁ -H def
1,427	1,420	1.4	1,422	2.9	1,421	5.3	N ₁ -H def, C ₃ -H
1,364	1,366	3.0	1,363	3.9	1,364	4.0	N ₃ -H def.
1,241	1,241	1.7	1,239	2.7	1,241	1.7	C-C
1,211	1,202	1.3	1,209	2.3	1,201	2.3	C ₆ -H def, C ₂ -N ₃ str.
1,025	1,022	1.5	1,024	3.0	1,024	4.2	C-H, C-OH
978	979	3.7	977	3.0	980	4.1	N-C ₂ , ring-bending
920	934	2.6	923	1.2	933	5.0	γ -CH
842	829	2.0	832	1.2	831	2.6	N ₃ -H, γ -C ₂ =O
812	811	2.2	812	1.3	810	2.7	N ₁ -H, γ -C ₂ =O, γ -C ₄ =O
758	757	1.7	758	1.2	757	2.5	Skeletal ring mode
743	741	1.7	742	1.3			C ₄ =O
619	617	2.2	621	1.2	617	2.3	γ -C ₄ =O
554	556	2.0	554	1.2	557	4.2	β -C ₄ =O
474	476	1.9	474	1.3	475	2.8	α -ring-bending

* g^2 —enhancement factor

for N_3-H deformation vibrations ($1,364\text{ cm}^{-1}$ for Thy on gold), $N-C_2$ ring-bending vibrations (978 cm^{-1} for Thy on gold) for all studied complexes of Thy-graphene, Thy-graphene oxide (Fig. 2.5) and Thy-SWCNT (Table 2.1). However, the enhancement factor of the band of about 923 cm^{-1} for Thy-graphene oxide system is rather low as it is equal to 1.2 (Fig. 2.5). For Thy-graphene system, similar to that of Thy-SWCNT, we observed the increase in the intensity of γ -CH vibration and a shift from 920 to 934 cm^{-1} (933 cm^{-1} in the case of SWCNT).

Also, we have calculated the total enhancement factors for Thy-graphene and Thy-graphene oxide and found that they are equal to 1.6 and 2.0, correspondingly (Fig. 2.5). The dependence of the enhancement factor on the wavenumber for Thy-graphene (2), Thy-SWCNT (2), and Thy-graphene oxide is presented in Fig. 2.6.

As one can see from Fig. 2.6, the frequency dependence of the enhancement factor in the region of $1,800-400\text{ cm}^{-1}$ for Thy-SWCNT is similar to that for Thy-graphene. Such dependence for Thy-graphene oxide system has another tendency. Namely, in the case of Thy-graphene oxide we observed the enhancement in the region of $1,600-1,800\text{ cm}^{-1}$ in contrast to Thy-graphene and Thy/SWCNT, but did not observe it in the region of $400-900\text{ cm}^{-1}$. However, both Thy-graphene and Thy-SWCNT show large enhancement in the region of $600-400\text{ cm}^{-1}$ for the majority of the bands. It could be assumed that in the case of Thy-graphene oxide the chemical mechanism is more preferential than in the case of Thy-graphene or Thy-SWCNT. The oxidation of graphene influences the enhancement factor of the infrared absorption.

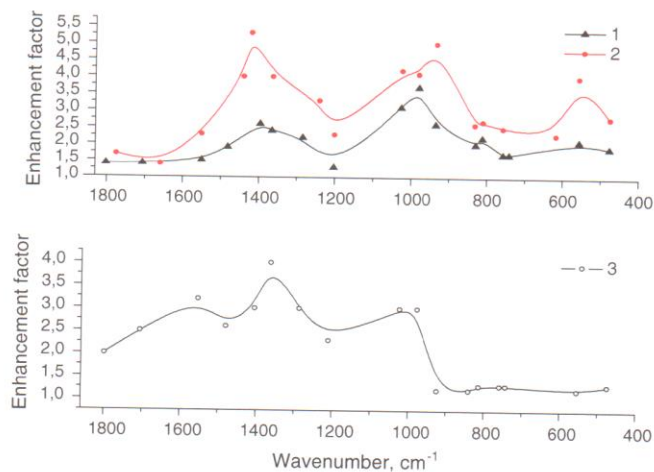


Fig. 2.6 The dependence of enhancement factor on the wavenumber for Thy-graphene (1), Thy-SWCNT (2), and Thy-graphene oxide (3)

We suppose that the local field enhancement mechanism weakly influences the enhancement of the vibrations of Thy adsorbed on graphene and does not influence the vibrations of Thy adsorbed on graphene oxide in contrast to those on SWCNT. In case of Thy adsorbed on SWCNT we registered an enhancement factor of up to 4.2 for all vibrations in the 400–900 cm^{-1} region. Local field enhancement on the edges of the carbon nanotubes is reported in [18]. They calculated and measured the peak in terahertz region which was connected with plasmon oscillations.

According to earlier publications, the plasmon frequency of carbon nanotubes is located in the far IR region [19, 20]. Plasmons in graphene seem to be located in the same region as well [20, 21]. Changing the length of nanotubes could influence the position of plasmon resonance [19] and shift it to far IR (FIR). Therefore, the presence of carbon nanotubes of different lengths in the Thy-SWCNT system could be a reason for the large enhancement factor for the bands in the spectrum region close to FIR. In general, one more reason for the SEIRA effect for Thy adsorbed on graphene and SWCNT in low frequency region is connected with crystalline packing of Thy molecules. We believe that in contrast to Thy-SWCNT with the total enhancement factor of 2.8, the lower total enhancement factor for Thy-graphene system (1.6) is due to decreased number of contact sites owing to the flake-type structure of graphene. For Thy-graphene oxide system the total enhancement factor is equal to 2.0 and the effect is characterized by selectively enhanced bands connected with C–O sites in graphene oxide.

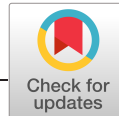
2.4 Conclusion

It was first shown that graphene and graphene oxide can be used as a substrate for surface enhanced infrared spectroscopy. The enhancement factor for Thy molecules adsorbed on SWCNT is greater than that on graphene or graphene oxide nanosheets. The obtained experimental data allowed us to suppose that H-bonds influence the interaction between SWCNT and Thy in Thy-SWCNT, while the chemically induced charge transfer is likely dominant in the case of Thy-graphene and Thy-graphene oxide complexes. It was shown that the type of the frequency dependence of the enhancement factor in the region of 1,800–400 cm^{-1} is the same for Thy-SWCNT/Au and Thy-graphene/Au systems, but is different for Thy-graphene oxide/Au. That fact indicates that the oxidation degree of graphene has influence on the enhancement factor of the infrared absorption.

Acknowledgments We thank for financial support the STCU Project No. 5525, Nanotwinning project (No 294952) of the FP7, PIRSES-2012-318617 FAEMCAR, Ukrainian-Russian project N60-02-12 and the Targeted Complex Program of the National Academy of Sciences of Ukraine “Fundamental problems of nanostructured systems, nanomaterials and nanotechnologies”.

References

1. Domingo C (2004) Infrared spectroscopy on nanosurfaces. *Opt Pur Apl* 16:567–571
2. Kosobukin V (1983) The effect of enhancement the external field near the surface of metal and its manifestation in spectroscopy. *Surface: Phys Chem Mech* 12:5–20
3. Dovbeshko G, Gnatyuk O, Yakovkin K, Shuba MV, Maksimenko SA (2011) Chap. 2 in *Physics, chemistry and application of nanostructure*, Borisenko VE et al World Scientific London, Singapore, 291–294
4. Dovbeshko G, Fesenko O, Rynder A, Posudievsky O et al (2012) Enhancement of infrared absorption of biomolecules absorbed on single-wall carbon nanotubes and graphene nanosheets. *J Nanophoton* 6:061711
5. Dovbeshko G, Woods L, Damin A et al. (2010) Carbon nanotubes. In: Marulanda JM, In-Tech, pp 697–719
6. Posudievsky O, Khazieieva O, Koshechko V et al (2012) Preparation of graphene oxide by solvent-free mechanochemical oxidation of graphite. *J Mater Chem* 22:12465–12467
7. Obratsova E, Bonard JM, Kuznetsov V et al (1999) Structural measurements for single-wall carbon nanotubes by Raman scattering technique. *Nanostruct Mater* 12:567–572
8. Panek J, Jezierska A, Dovbeshko G et al (2011) p-Nitrobenzoic acid adsorption on nanostructured Au surface investigated by combined experimental and computational approaches. *Chem Phys Chem* 12:1–12
9. Paddock S (ed) (1998) *Confocal microscopy methods and protocols*. Humana Press, Newcastle
10. Malard L, Pimenta M, Dresselhaus G et al (2009) Raman spectroscopy in graphene. *Phys Reports* 473:51–87
11. Saito R, Hofmann M, Dresselhaus G et al (2011) Raman spectroscopy in graphene and carbon nanotubes. *Adv Phys* 60:413–550
12. Thomsen C, Reich S et al (2000) Double resonant Raman scattering in graphite. *Phys Rev Lett* 85:5214–5217
13. Meng S, Maragakis P, Papaloukas C, Kaxiras E (2007) DNA nucleosides interaction and identification with carbon nanotubes. *Nano Lett* 7:45–50
14. Dovbeshko G, Woods L, Shtogun YA, Fesenko O (2009) Modeling of DNA base interactions with carbon nanotubes: ab initio calculations and SEIRA data. *AIP C* 1148:416–420
15. Colarusso P et al (1997) The infrared spectra of uracil, thymine, and adenine in the gas phase. *Chem Phys Lett* 269:39–48
16. Haiss W, Roelfs B, Port SN et al (1998) In-situ infrared spectroscopic studies of thymine adsorption on a Au(111) electrode. *J Electroanal Chem* 454:107–113
17. Nowak M, Lapinski L, Kwiatkowski J et al (1995) Molecular Structure and Infrared Spectra of Adenine. *Experimental Matrix Isolation and Density Functional Theory Study of Adenine ¹⁵N Isotopomers*. *J Phys Chem* 100:3527–3534
18. Slepian GY, Shuba MV, Maksimenko SA, Thomsen C, Lakhtakia A et al (2012) Experimental evidence of localized plasmon resonance in composite materials containing single-wall carbon nanotubes. *Phys Rev B* 85:165435
19. Slepian GY, Shuba MV, Maksimenko SA, Thomsen C, Lakhtakia A (2010) Terahertz conductivity peak in composite materials containing carbon nanotubes: Theory and interpretation of experiment. *Phys Rev B* 81:205423
20. Crassee I, Orlita M, Potemski M, Walter A, Ostler M, Seylller Th, Gaponenko I et al (2012) Intrinsic terahertz plasmons and magnetoplasmons in large scale monolayer graphene. *Nano Lett* 12:2470–2474
21. Yan H, Li X, Chandra B, Tulevski G et al (2012) Tunable infrared plasmonic devices using graphene/insulator stacks. *Nat Nanotechnol* 7:330–334



RESEARCH ARTICLE

In situ Raman study of laser-induced stabilization of reduced nanoceria (CeO_{2-x}) supported on graphene

Andrii Nikolenko¹ | Viktor Strelchuk¹ | Olena Gnatyuk² | Piotr Kraszkiewicz³ | Vitaliy Boiko² | Evgeniya Kovalska⁴ | Wlodzimierz Mista³ | Roman Klimkiewicz³ | Volodymyr Karbivskii⁵ | Galina Dovbeshko²

¹Optical Submicron Spectroscopy Laboratory, Institute of Semiconductor Physics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Department of Physics of Biological Systems, Institute of Physics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Division of Nanomaterials Chemistry and Catalysis, Institute of Low Temperature and Structure Research, Wroclaw, Poland

⁴College of Engineering, Mathematics and Physical Sciences, University of Exeter, Exeter, UK

⁵Department of Nanostructures Physics, Institute for Metal Physics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Correspondence

Andrii Nikolenko, Optical Submicron Spectroscopy Laboratory, Institute of Semiconductor Physics of NAS of Ukraine, 41 Nauky pr., Kyiv 03028, Ukraine.
Email: nikolenko.andrii@gmail.com

Funding information

Joint Polish-Ukrainian Projects

Abstract

This work demonstrates a novel approach to application of in situ Raman spectroscopy to study laser-induced stabilization of reduced nanoceria (CeO_{2-x}) supported on graphene—a promising nanocomposite for future development of nanomaterial-enabled gas sensors or vital catalysts for hydrogenation of alcohols under anaerobic conditions. Structural stabilization of CeO_{2-x} nanoparticles (NPs) on a graphene surface is evidenced by significant modification of Raman spectra—the appearance, increase in relative intensity, and low-wavenumber shift of CeO_2 F_{2g} band at excitation laser powers higher than ~ 5 mW. The effect is related to the reduction in a number of oxygen vacancies in CeO_{2-x} NPs. Analysis of the graphene 2D and G band wavenumbers through $\omega_{2D}(\omega_G)$ correlation indicated a decrease in p-type graphene doping attributed to the charge transfer between the stabilizing CeO_{2-x} NPs and the graphene that occurs due to trapping of graphene mobile holes by oxygen vacancies in CeO_{2-x} . High-resolution transmission electron microscopy analysis supported this idea by showing the increased lattice constant of fluorite-type hexagonal-shaped CeO_{2-x} NPs as compared with bulk CeO_2 and which could be related to partial reduction of CeO_{2-x} NPs as a result of the Ce^{4+} transformation to Ce^{3+} with formation of corresponding oxygen vacancies. X-ray photoelectron spectroscopy data confirmed the mixed $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ valence state of the CeO_{2-x} NPs. Thus, by combining the structure conversion of nanoceria induced by electromagnetic radiation and its stabilization by the graphene support, this work provides a foundation for advanced concepts in the development of the next-generation catalysts and sensors.

KEYWORDS

catalyst, charge transfer, graphene, in situ Raman spectroscopy, nanocerium

1 | INTRODUCTION

Cerium oxide due to its strong catalytic activity is considered as a highly effective alternative to noble metal

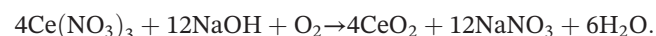
catalysts for the transformation of oxygenates.^[1] The catalytic activity of ceria oxide can be further enhanced in nanostructures or nanocomposites due to the nanoscale effects.^[2] In general, strong coupling of inorganic

nanocrystals with two-dimensional (2D) nanosheets to produce function-enhanced nanomaterials with uniform size, dispersion, and high coverage density has long been of interest to scientists from various research fields. Graphene is considered as a promising support for ceria because of its 2D structure, chemical stability, good electrical conductivity, and well-developed technology. Owing to defects, such as oxygen vacancies, CeO₂ can attach to graphene sheets, which promotes the formation of stable CeO_{2-x}/graphene nanostructure.^[3] Bonding of CeO_{2-x} nanoparticles (NPs) to graphene is realized due to dispersion interactions (van der Waals forces) between the adsorbent (graphene) and the adsorbate (CeO_{2-x} particles).^[4] Recently, outstanding catalytic and photocatalytic performances of CeO₂ supported on graphene and graphene oxide have been demonstrated.^[1,2,5]

We report on in situ laser-induced formation of CeO_{2-x} NPs/graphene nanostructure studied by Raman spectroscopy. The process is demonstrated to be accompanied with charge transfer between CeO_{2-x} NPs and the graphene, which is confirmed by modification of the graphene Raman spectrum in the CeO_{2-x}/graphene system.

2 | EXPERIMENTAL DETAILS

The graphene NPs were synthesized by the electrochemical exfoliation method of the thermally exfoliated graphite foil.^[6] The thermally exfoliated graphite foil, obtained by anodic oxidation of natural graphite, was applied as a carbon-based precursor. Afterwards, a foil was oxidized by a low concentrated aqueous KOH solution in the presence of a surfactant^[7] and then rinsed with deionized (DI) water until pH = 7 was achieved. As a result, homogeneous colloids consisting of graphene NPs in alkali solution were obtained. Loading of cerium dioxide with 5.2 wt.% was carried out in the water dispersion of the graphene material at ambient conditions. In order to achieve a homogeneous mixture, the graphene material of 5 g was placed in the water (100 ml) and dispersed under ultrasonication for 5 min. Then, 0.1-M Ce(NO₃)₃ (16 ml) was added to the graphene-based dispersion at permanent stirring that was followed by introducing the 0.1-M NaOH (48 ml), at first, and then DI water until pH = 7–7.5 was reached. The possible reaction occurs as follows:



Afterwards, the obtained solution was centrifuged (5 min, 5,000 rpm), washed in DI water, and filtered. The precipitated CeO_x/graphene composites were dried at 110°C for 2 hr and then homogenized in an agate mortar.

Micro-Raman measurements were performed at room temperature in backscattering configuration using a triple Raman spectrometer T-64000 Horiba Jobin-Yvon, equipped with electrically cooled charge-coupled device detector and Olympus BX41 microscope. The Ar-Kr ion laser line with wavelength of 488 nm was used for excitation. The excitation radiation was focused on the sample surface with ×50/NA 0.75 optical objective, giving a laser spot diameter of about 1 μm. The laser power on the sample surface was varied in the range of 0.1–12.5 mW. Simultaneous registration of Stokes and anti-Stokes Raman spectra was performed using triple subtractive mode of the spectrometer.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | High-resolution transmission electron microscopy analysis

High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) analysis (Figure 1a–c) showed the resulted material to have a sufficiently non-uniform distribution of CeO_{2-x} NPs over the graphene surface. The NPs are mostly hexagonal-shaped with clear edges and have close to normal size distribution with an average size of 12.5 nm and standard deviation of 3.9 nm. Some of the NPs, which demonstrate a well-resolved picture of atomic planes, are bonded by (111) planes with interplanar distance of 0.327 nm. Selected-area electron diffraction pattern (Figure 1d) demonstrates a contrast ring structure testifying polycrystalline nature of the sample, which is due to different orientation of the NPs.

The selected-area electron diffraction pattern is consistent with that of fluorite structure of CeO₂, with the most intense (111) line corresponding to 0.327-nm lattice spacing. It should be noted that the most intensive line for the C-type Ce₂O₃ is expected to be (511) corresponding to 0.2184-nm lattice spacing.^[8] The lattice constant *a* for fluorite-type CeO₂ calculated from *d*₁₁₁ spacing was found to be 0.567 nm. This value is somewhat higher than 0.541 nm expected for bulk CeO₂. This could be due to the lattice expansion upon CeO₂ reduction on graphene with transition of Ce⁴⁺ to Ce³⁺ and formation of corresponding oxygen vacancies within the fluorite lattice structure of CeO_{2-y} because of higher ionic radius of Ce³⁺ (1.01 Å) as compared with Ce⁴⁺ (0.87 Å). It should be noted that similar lattice expansion was observed earlier for small-size NPs,^[8,9] and the stability of the fluorite CeO_{2-y} is expected for *y* values up to 0.15 (i.e., oxygen vacancy concentration exceeds 7.5%) after which the phase transformation to the C-type Ce₂O₃ occurs.^[10]

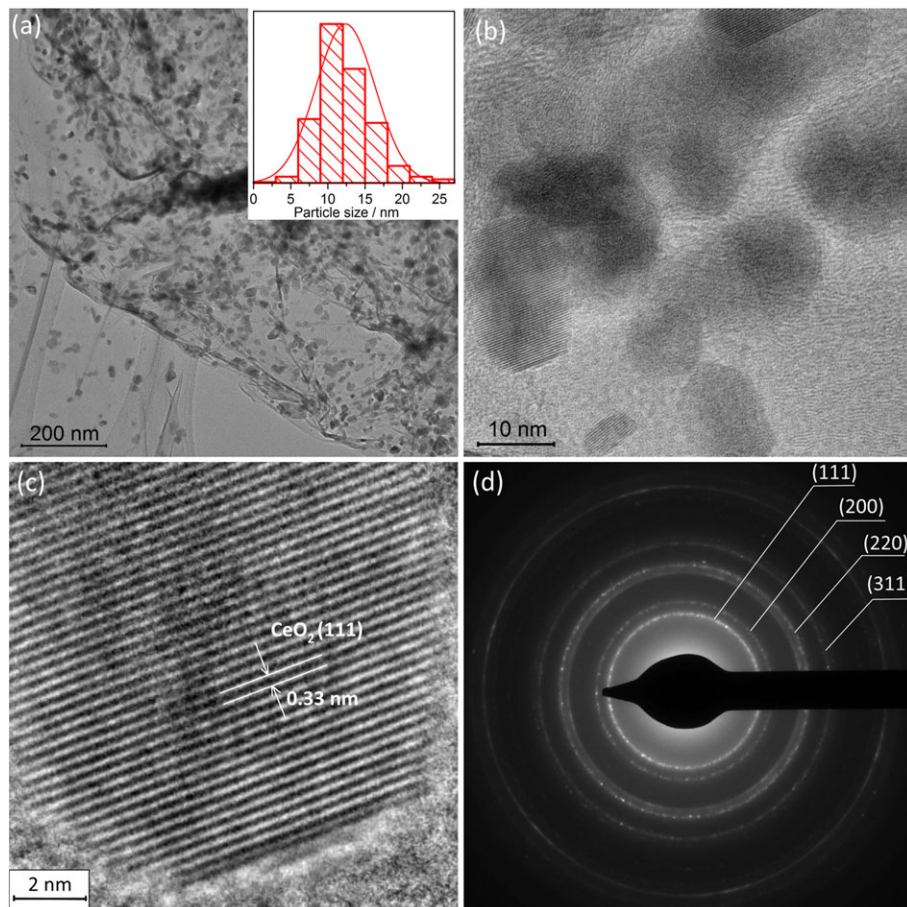


FIGURE 1 (a–c) High-resolution transmission electron microscopy images of the CeO_{2-x}/graphene; (d) selected-area electron diffraction pattern. Size distribution of the CeO_{2-x} nanoparticles is shown on the inset [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.2 | X-ray photoelectron spectroscopy

Figure 2a shows wide scan X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectra in the binding energy range of 0–1000 eV, which were obtained to identify the chemical elements present on the surface of the graphene and CeO_{2-x}/graphene samples. The XPS spectra show distinct carbon and oxygen peaks, C1s and O1s, representing the major constituents of the sample surface. The Ce3d peaks are also registered for the CeO_{2-x}/graphene sample. The high-resolution XPS C1s spectra of graphene and CeO_{2-x}/graphene are shown in Figure 2b. The main peak at 284.6 eV deduced from C1s peak is assigned to the sp² carbon hybridization (C=C) for graphene, which is characteristic of graphite carbon, whereas a shoulder at 285.2 eV is assigned to sp³ defective carbon. The different oxygen functional groups were also identified by XPS. The shoulder of the main C1s peak consists of three peaks, which could be attributed to carbons involved in a single bond with one oxygen atom (phenols, ethers at 285.6 eV), carbons having a double bond with one oxygen atom (ketones,

aldehydes, and quinones at 287.5 eV), and carboxylic groups (carboxylic acids and esters at 289.5 eV).^[11]

The quantitative analysis of high-resolution C1s XPS spectra (Figure 2b) through curve fitting was carried out to determine the relative percentage of surface functionalized moieties (Table 1). As follows from the evaluation of the ratio of corresponding peak areas, about 35% of the surface carbon atoms are bound to oxygen atoms in graphene. The similarity of the XPS spectra in C1s-electron position for graphene and CeO₂/graphene samples is due to similar distribution of surface functional groups.

The high-resolution XPS O1s spectra of graphene and CeO_{2-x}/graphene are shown in Figure 1c. The broad peak in the O1s region of the pristine graphene was deconvoluted into three main peaks: a peak at 531.2 eV, attributed to oxygen double bonded to carbon (O=C) in quinone, ketone, and aldehyde moieties, a peak at 532.4 eV related to carboxylic groups O=C–O, and a third peak at 533.3 eV due to oxygen single bonded to carbon (C–O) in ether and phenol groups. Because oxygen atoms in carboxylic acids and esters have both

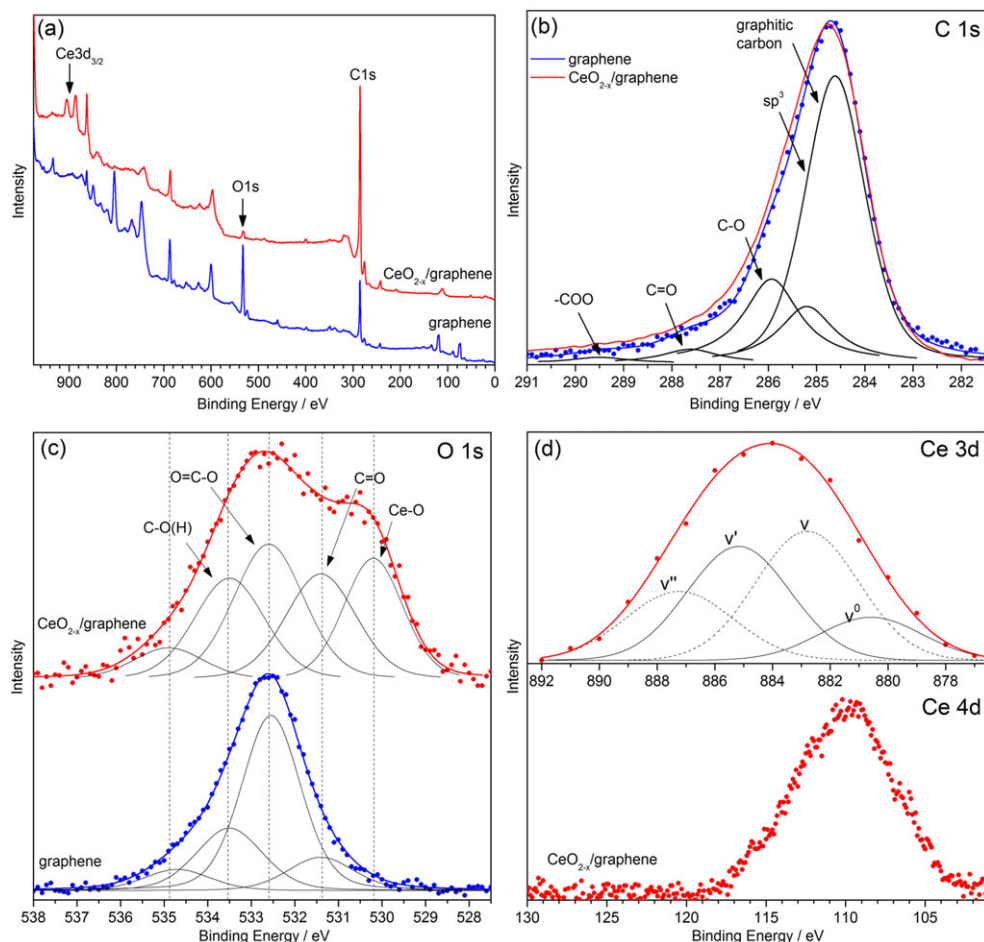


FIGURE 2 X-ray photoelectron spectroscopy spectra of graphene, CeO_{2-x} , and $\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$: (a) wide scan; (b) normalized C1s core level spectra of graphene and $\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$; (c) normalized O1s core level spectra of graphene, CeO_{2-x} and $\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$; and (d) Ce3d and Ce4d core spectrum of $\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 1 Chemical composition of functional groups on the surface of graphene and $\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$

Sample	O/C	C=C, % (284.6 eV)	sp ³ , % (285.2 eV)	C—O, % (285.6 eV)	C=O, % (287.5 eV)	O=C—O, % (289.5 eV)
Graphene	0.35	60	14	21	3	1
$\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$	0.37	52	21	19	5	3

single and double bonds, they contribute to both the aforementioned component peaks. For $\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$ sample, the additional peak attributed to Ce—O is also identified at 529.8 eV.

The Ce3d peaks of the $\text{CeO}_{2-x}/\text{graphene}$ sample (Figure 2d) were resolved into v'' and v satellite peaks located at about 888.5 and 882.5 eV, which are characteristic of tetravalent Ce^{4+} ions.^[12] Registration of intensive components v' and v^0 , respectively, at about 885.2 and 880.9 eV corresponds to the presence of considerable amount of Ce^{3+} ions in the sample. It should be noted that registration of broadened Ce3d peak and the absence of the fine structure typical for Ce (IV) or Ce (III)

oxides^[12] could be caused by a mixed valence state of Ce in the studied samples. This is also confirmed by the presence of broadened Ce4d line in the range of 120–105 eV, as well as the absence of pronounced signal in the range of 130–120 eV inherent to Ce (IV) oxide.^[13]

3.3 | Raman spectroscopy

Raman spectra of pure constituents (Figures 3 and S1) at the lowest laser powers were found to be typical for ceria with F_{2g} vibrational mode at 465 cm^{-1} and for few-layer graphene with structural defects with prominent D, G,

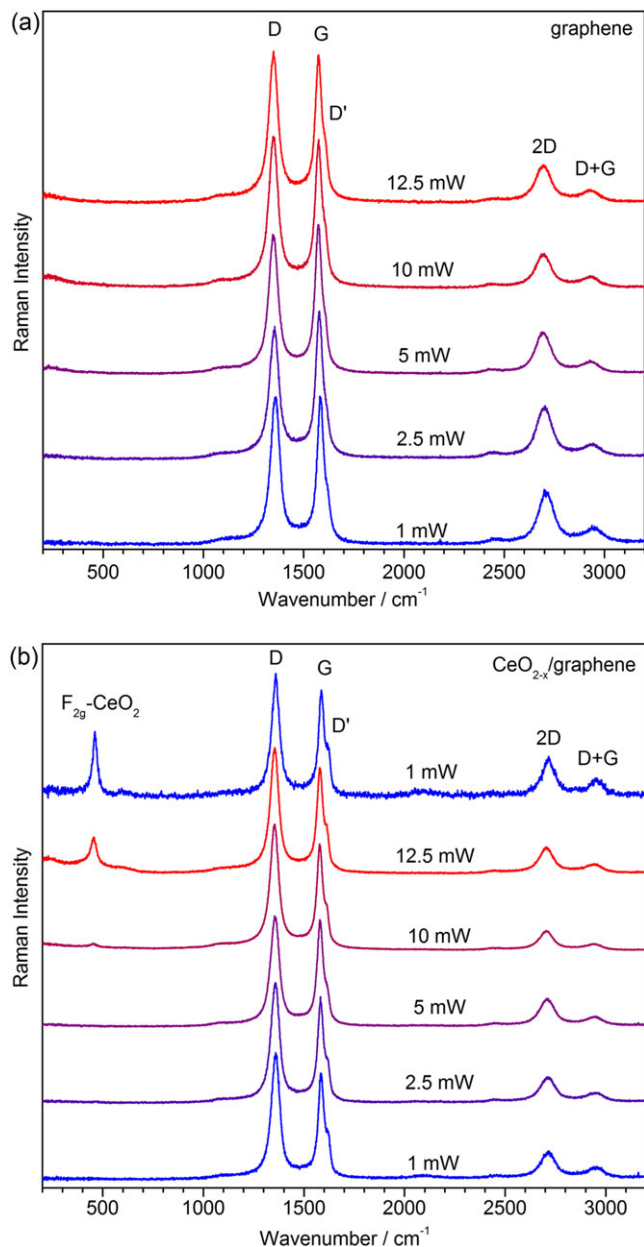


FIGURE 3 Typical Raman spectra of (a) graphene and (b) CeO_{2-x} /graphene measured at varied excitation power [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

and 2D bands at 1,359, 1,586, and 2,714 cm^{-1} ,^[14] whereas the Raman spectrum of CeO_{2-x} /graphene revealed only graphene modes. It should be noted that Raman spectra of graphene and CeO_{2-x} /graphene samples are characterized by quite large width of the G band of about 46 and 40 cm^{-1} , high I_D/I_G intensity ratio of about 0.7 and 1.4, and low I_{2D}/I_G intensity ratio of about 0.6 and 0.7, correspondingly. As a rule, I_{2D}/I_G ratio or shape of 2D band is used to determine the number of graphene layers. However, investigated graphene contains rather high concentration of structural defects as evidenced by registration of intensive defective D, D', and D + G bands and large

full width of first-order G and D bands. As the processes responsible for D and 2D bands according to double electron–phonon resonance mechanism are competitive (increase in intensity of D band leads to decrease in intensity of 2D band), attribution of certain number of layers is difficult. Also, high full width of Raman lines (registered full width of G band of 40–46 cm^{-1} as compared with about 15 cm^{-1} expected for single-layer graphene) do not allow to resolve the structure of 2D band. However, correlating registered relative intensity and full width of D, G, and 2D bands with the results of paper,^[14] which studies evolution of Raman spectrum from single-, few-, and many-layer graphene with increasing disorder, it can be concluded that investigated Raman spectra are close to that of 2–3 layer graphene subjected to bombardment dose of 10^{12} – 10^{13} Ar^+/cm^2 , which results in typical distance between defects of 3–10 nm or defect density of $(35 \pm 3) \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-2}$.

The appearance and relative intensity enhancement of the CeO_2 F_{2g} band in the spectra of CeO_{2-x} /graphene composite was registered at laser powers higher than 5 mW, whereas its wavenumber position was found to be shifted down to 450 cm^{-1} , as compared with 463 cm^{-1} for pure CeO_{2-x} powder at the same laser power. The effect was found to be irreversible, that is, the signal from CeO_{2-x} remained in the spectrum at 461.3 cm^{-1} after following decrease of laser power down to 1 mW (Figure 3b).

Raman spectra of pure CeO_{2-x} registered at laser powers up to 7.5 mW demonstrated the expected gradual low-wavenumber shift and broadening of the first-order CeO_2 F_{2g} band due to laser heating effect (Figure S1a). In the high-wavenumber range, besides the second-order cerium phonon peak at 1,170 cm^{-1} , there are also less intensive features registered at 595 and 825 cm^{-1} , which are related to oxygen vacancies and to peroxo-like species adsorbed on reduced CeO_2 surface, respectively.^[15–17] Relative intensity of the mentioned features slightly increases with laser power. It should be noted that oxygen vacancies in CeO_2 NPs lead to transformation of Ce^{4+} to Ce^{3+} and CeO_{2-x} as the structure for ceria NP. The effect is stronger for small-sized NPs with higher fraction of surface atoms.^[18] At laser power of 10 mW, Raman signal disappeared, whereas broad photoluminescence background was registered instead (Figure S1b). It should be noted that the spectral range of maximum photoluminescence intensity of 1.8–2.0 eV is close to the bandgap energies found for purple CeO_2 nanorods and yellow CeO_2 nanoislands.^[19]

In contrast, Raman spectra of CeO_{2-x} /graphene demonstrated an increase in relative intensity, gradual high-wavenumber shift, and narrowing of ceria F_{2g} band with increasing laser power, whereas its peak position is shifted to lower wavenumbers and broadened in pure

CeO_{2-x} (Figure 4). The particle size^[20,21] and structure disorder (defects, doping, and nonstoichiometry effect)^[3,22] are potential factors that can contribute to the changes in the Raman peak position and full width of the nanoceria F_{2g} mode. In addition, a significant redshift of the F_{2g} band from ~474 to ~460 cm⁻¹ in the composite spectra was proposed to be related to the charge transfer between the CeO₂ and graphene.^[23]

Possible mechanism of the absence of Raman F_{2g} ceria peak in as-prepared CeO_{2-x}/graphene composite, its appearance and increase in intensity under laser radiation could be based on the Ce³⁺ → Ce⁴⁺ transformation as well as a change in a number of oxygen vacancies. This might be described as electron transitions between fully occupied O2p and valance 4f and 5d bands of cerium under redox conditions,^[24,25] which occurred due to a laser irradiation.

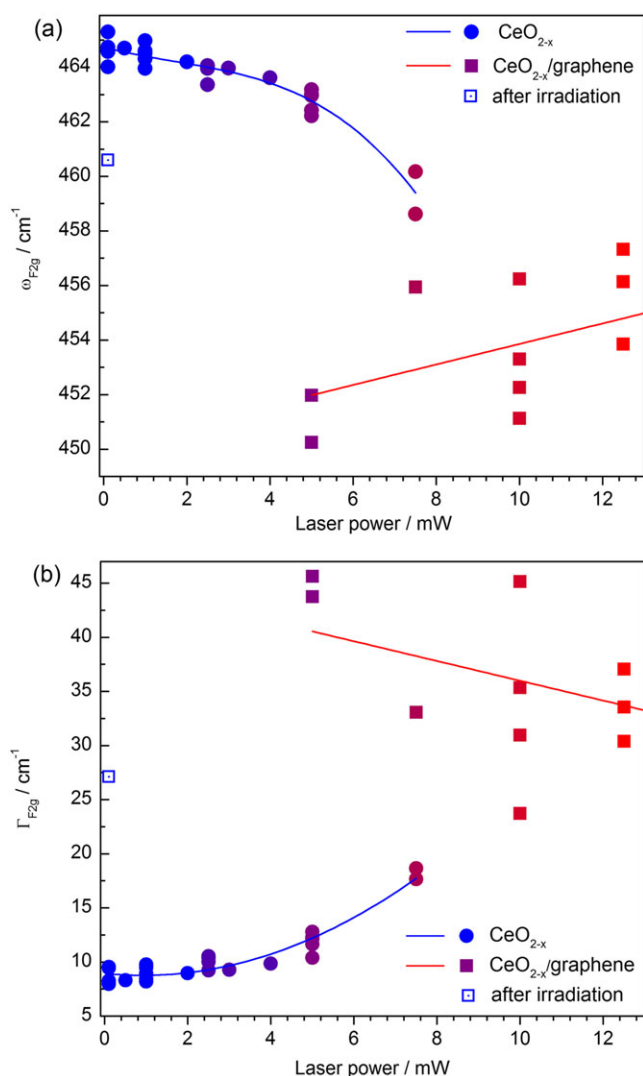


FIGURE 4 (a) Frequency position and (b) full width of CeO₂ F_{2g} Raman band in pure CeO_{2-x} and CeO_{2-x}/graphene as a function of excitation laser power [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

This is consistent with the HRTEM observations of crystalline fluorite-type CeO_{2-x} NPs with increased lattice constant, as compared to CeO₂, due to the presence of Ce³⁺ and oxygen vacancies in as-prepared composite. In this model, Ce³⁺ oxidation accompanied by the releasing of the electron, which easily can be accepted by graphene sheet, is supposed.^[26] By applying laser irradiation, oxygen migrates into the cerium lattice, and Ce³⁺ cations oxidize. Moreover, the presence of Ce³⁺ cations causes an ionic conductivity increase as oxygen ions move toward oxygen vacancies that has happened due to electron movement by a polaron hopping mechanism.^[27]

A larger full-width, asymmetric low-wavenumber broadening and significant low-wavenumber shift of CeO_{2-x} F_{2g} band in the Raman spectra of CeO_{2-x}/graphene as compared with those of pure CeO_{2-x} can be related to phonon confinement effect in CeO_{2-x} NPs.^[25-27] It should be noted that information on CeO_{2-x} particles (grain size and concentration of oxygen vacancies) can be obtained from the shape analysis of the CeO₂ F_{2g} Raman band using spatial correlation length model, where correlation length (L) is limited by the distance between the defects in the oxygen sublattice.^[28-30] Because of size-dependent nonstoichiometry, L is strongly dependent on grain size (d_g), and for small-sized ($d_g < 100$ nm) grains, $L \ll d_g$ due to high concentration of oxygen vacancies, whose formation energy reduced from 4.8 to 1.7 eV when the grain size decreased from 100 to 5 nm.^[29] Thus, in our case, the full width of F_{2g} band is mainly driven by the concentration of oxygen vacancies in NPs. Using reported by Kosacki et al.^[29] empirical relation Γ (cm⁻¹) = 10 + 124.7/ d_g (nm) and obtained full width of F_{2g} band at the lowest laser power for the CeO_{2-x}/graphene after irradiation ($\Gamma = 27$ cm⁻¹), grain size can be estimated as $d_g = 7.4$ nm. We calculated the correlation length as $L = 1.9$ nm, and on the basis of data presented in Kosacki et al.,^[29] the corresponding oxygen vacancy concentration was estimated as $8 \cdot 10^{19}$ cm⁻³. Estimated grain size is somewhat lower than the average particles size $d = 12.5$ nm obtained from HRTEM measurements. The reason of such underestimate could be inhomogeneous strains or size distribution of NPs, which were demonstrated to significantly influence full width of F_{2g} mode.^[31] It should be noted that similar rough estimate of the correlation length for the spectrum measured at 5 mW, that is, when ceria signal appears, gives correlation length less than 0.5 nm, that is close to the radius of CeO₂ molecule of 0.34 nm, and corresponds to oxygen vacancy concentration higher than 10^{21} cm⁻³.^[29] Namely, high concentration of oxygen vacancies seems to be a reason for the absence of ceria Raman signal in as-prepared composite at low excitation power. Thus, the observed gradual decrease in the F_{2g} band full width together with its high-wavenumber shift with increasing laser power

can be related to gradual laser-assisted reduction in number of oxygen vacancies, oxidation of CeO_{2-x} NPs, and their interaction with the graphene layer.^[3,22,32] Similar behavior with less intense and broadened F_{2g} Raman peak was observed earlier for CeO_2 nanosheets containing high concentration of oxygen vacancies, which also was accompanied by the appearance of two peaks in XPS spectra related to Ce^{3+} and Ce^{4+} , correspondingly, whereas thermal annealing in air lead to an enhancement and narrowing of the F_{2g} CeO_2 Raman peak because of the reduction in the number of oxygen vacancies.^[33]

Laser-induced interaction between CeO_{2-x} and graphene is confirmed by drastic modification of the graphene spectrum in the CeO_{2-x} /graphene system as compared with pure graphene (Figures S2 and 5). First, the position of the Raman G band was found at $1,585 \text{ cm}^{-1}$ at the lowest laser power both for the pure graphene and CeO_{2-x} /graphene. Contrary to almost linear dependence of the G band position reported earlier for graphene on laser power with the gradient of $-1.226 \text{ cm}^{-1}/\text{mW}$,^[34] in our case, it demonstrated a non-linear low-wavenumber shift with laser power, which was found to be less pronounced for the CeO_{2-x} /graphene composite (Figure S2a). Second, the full width of the G band is found to be less for the composite and demonstrates an unexpected narrowing with the laser power (Figure S2b). Third, the intensity ratio of the D and G Raman bands of graphene, I_D/I_G , was found to be higher for the CeO_{2-x} /graphene composite and demonstrated a different behavior with the laser power (Figure S2c). The observed transformations of the graphene Raman bands could be attributed to the

combined impact of temperature, elastic strains, doping, and defects, which in the case of CeO_{2-x} /graphene composite could increase in the site of CeO_{2-x} interaction due to oxygen functionalities and decreased integrity of sp^2 domains.

The analysis based on the graphene 2D and G band wavenumbers through $\omega_{2D}/(\omega_G)$ correlation makes it possible to resolve between the above mentioned effects of temperature, elastic strains, and doping.^[35–38] Relative variations of the 2D and G band positions as a function of the laser power, P_{laser} , are given in Figure 5. As can be seen, both the G- and 2D-mode wavenumbers decrease with laser power with a gradient $\Delta\omega_{2D}/\Delta\omega_G$ of approximately 1.44 and 0.98 for graphene and for the CeO_{2-x} /graphene, respectively, and the wavenumber shift being almost two times larger for the graphene sample.

The effect of elastic strains can be neglected as we deal with unsupported few-layer graphene sheets. To estimate the temperature of the composite at high power laser irradiation, Stokes and anti-Stokes Raman spectra were measured. The temperature (T) of the sample was estimated from the relative intensities of the Stokes and anti-Stokes Raman components $I_S/I_{AS} = ((\omega_l + \omega_v)/(\omega_l - \omega_v))^4 \exp(\hbar\omega_v(T)/kT)$, where ω_l and ω_v are the wavenumber of the excitation laser radiation and of the vibrational mode, respectively. The estimated temperature of the sample at the highest laser powers was found to be $\sim 200^\circ\text{C}$. Temperature coefficients of the G and 2D bands were reported to be $\chi_G = -0.016 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ and $\chi_{2D} = -0.034 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ ^[39] for supported single-layer graphene and $\chi_G = -0.015 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ and $\chi_{2D} = -0.066 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ ^[39] for supported bilayer graphene, or $\chi_G = -0.01517 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ and $\chi_{2D} = -0.03915 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ for suspended single-layer graphene.^[40] Significantly higher coefficients of $\chi_G = -0.0468 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ and $\chi_{2D} = -0.0946 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$ for single-layer graphene were explained by oxygen-induced hole doping taking place after temperature-dependent Raman measurements.^[41] Taking into account the estimated above temperature, the estimated temperature shifts of the G and 2D bands for the CeO_{2-x} /graphene composite is more closer to the oxygen-induced hole-doped graphene, and in any case, pure temperature effect would lead to a slope of $\Delta\omega_{2D}/\Delta\omega_G > 2$.

Thus, the observed downshift of G and 2D bands with the excitation laser power suggests an interplay between the temperature effect and the decrease in p-type doping. Optical doping of graphene under laser irradiation was reported earlier.^[33,36] It should be noted that the obtained value of $\Delta\omega_{2D}/\Delta\omega_G = 0.98$ for the CeO_{2-x} /graphene is more close to the corresponding value found for the hole-doped graphene of $(\Delta\omega_{2D}/\Delta\omega_G)_{\text{hole}} = 0.70$,^[34] where the $\Delta\omega_{2D}/\Delta\omega_G = 1.44$ for the graphene is closer to pure

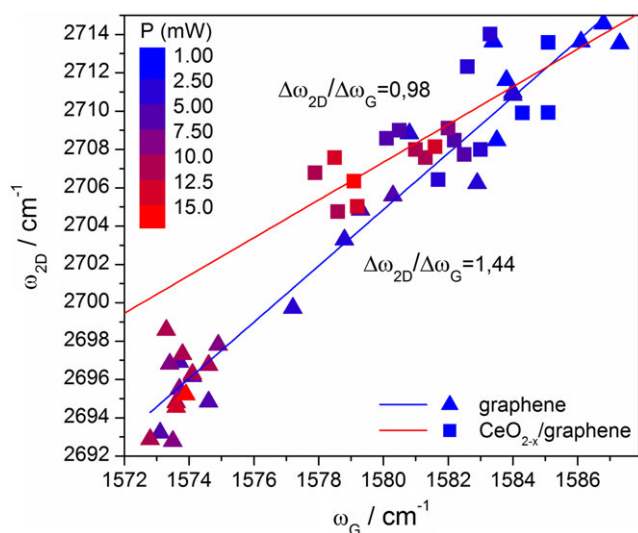


FIGURE 5 Dependence of ω_{2D}/ω_G on excitation laser power for graphene and CeO_{2-x} /graphene [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

temperature effect. The observed decrease in the p-type doping of graphene in the CeO_{2-x}/graphene composite could be a result of charge transfer taking place between forming CeO_{2-x} NPs and the graphene due to oxygen vacancies in CeO_{2-x}. The mobile holes in graphene could be trapped with oxygen vacancies in CeO_{2-x} NPs.^[4] Increasing of the density of the oxygen vacancies on CeO_{2-x} leads to the interaction of the mobile holes in graphene and localized electrons in the CeO_{2-x} NPs, resulting in an n-type CeO_{2-x}/graphene. Specifically, ultra-small ceria NPs (<5 nm) contain higher density of surface oxygen vacancies, which is a function of the population of mixed Ce⁴⁺/Ce³⁺ valence state.^[9] Thus, there is strong electrostatic interaction between the ceria NPs and the graphene support. Slight increase in I_D/I_G ratio with the laser power could be related both to an increased number of defects at the site of CeO_{2-x} interaction with graphene and a decreased graphene doping rate due to the charge transfer mechanism.^[42] Non-adiabatic processes in the CeO_{2-x}/graphene system under the laser and X-ray electromagnetic radiation seem to be responsible for the observed effects, and it requires a theoretical description.^[43]

4 | CONCLUSIONS








The initial composite of CeO_{2-x} NPs supported on graphene was shown to contain hexagonal-shaped CeO_{2-x} NPs with average size of 12.5 nm and crystalline structure of fluorite-type CeO₂ with a lattice constant higher than that of bulk CeO₂. The lattice expansion is related to partial reduction of CeO₂ as a result of Ce⁴⁺ transformation to Ce³⁺ with formation of corresponding oxygen vacancy. The XPS data showed considerable amount of oxygen-containing functional groups bonded to the graphene and indicated a mixed valence state of Ce in the CeO_{2-x}/graphene. Ceria Raman band in the range of 447–451 cm⁻¹ of CeO_{2-x}/graphene was found to be shifted in comparison with that of CeO_{2-x} on carbon nanotubes support (456 cm⁻¹). The changes of the CeO_{2-x} Raman band registered under laser radiation power tuning from 1 to 10 mW suggested stabilization of CeO_{2-x} NPs on the graphene surface under laser radiation and the reduction in oxygen vacancies. This process is accompanied with laser-induced charge transfer between CeO_{2-x} and graphene, which is confirmed by drastic modification of the graphene Raman bands in the spectrum of the CeO_{2-x}/graphene composite. The observed downshift of G and 2D bands with increasing laser power indicates the decrease in p-type doping, which is confirmed by the analysis of ω_{2D}(ω_G) correlation. The observed decrease in p-type doping of graphene

in the CeO_{2-x}/graphene composite is explained as a result of charge transfer effect taking place between CeO_{2-x} NPs and graphene due to trapping of graphene mobile holes by the oxygen vacancies in CeO_{2-x}.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. Yuriy Sementsov for the graphene particles preparation and to the Joint Polish-Ukrainian Projects (2012–2014, 2015–2017, and 2018–2020) for the financial support.

ORCID

Andrii Nikolenko  <https://orcid.org/0000-0001-6775-3451>
 Olena Gnatyuk  <https://orcid.org/0000-0003-4406-5503>
 Vitaliy Boiko  <https://orcid.org/0000-0001-6652-7890>
 Evgeniya Kovalska  <https://orcid.org/0000-0002-8996-0790>
 Włodzimierz Miśta  <https://orcid.org/0000-0003-1298-2198>
 Roman Klimkiewicz  <https://orcid.org/0000-0003-3326-6537>
 Galina Dovbeshko  <https://orcid.org/0000-0002-7701-0106>

REFERENCES

- [1] Z. Ji, X. Shen, M. Li, H. Zhou, G. Zhu, K. Chen, *Nanotechnology* **2013**, *24*, 115603.
- [2] J. Kaur, K. Anand, G. Singh, A. Hastir Virpal, R. Chand Singh, *AIP Conf. Proc.* **2015**, *1661*, 080009.
- [3] L. Jiang, M. Yao, B. Liu, Q. Li, R. Liu, H. Lv, S. Lu, C. Gong, B. Zou, T. Cui, B. Liu, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 11741.
- [4] D. Joung, V. Singh, S. Park, A. Schulte, S. Seal, S. I. Khondaker, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 24494.
- [5] J. Yang, J. Ofner, B. Lendl, U. Schubert, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2016**, *7*, 1815.
- [6] Y. Sementsov, S. Makhno, M. Kartel, W. Bo, G. Dovbeshko, V. Styopkin, S. Nedilko, *IJISSET* **2017**, *4*, 71.
- [7] S. G. Nedilko, S. Revo, V. Chornii, V. Scherbatskyi, K. Ivanenko, M. Nediuko, Y. Sementsov, M. Skoryk, A. Nikolenko, V. Strelchuk, *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, *12*, 28.
- [8] R. K. Hailstone, A. G. DiFrancesco, J. G. Leong, T. D. Allston, K. J. Reed, *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 15155.
- [9] S. Deshpande, S. Patil, S. Kuchibhatla, S. Seal, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*, 133113.
- [10] R. Wang, P. A. Crozier, R. Sharma, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 5700.
- [11] G. Dovbeshko, E. Kovalska, W. Miśta, R. Klimkiewicz, *Reac. Kinet. Mech. Cat.* **2017**, *122*, 1063.
- [12] J. Myslivecek, V. Matolin, I. Matolinova, *Materials* **2015**, *8*, 6346.
- [13] D. R. Mullins, S. H. Overbury, D. R. Huntley, *Surf. Sci.* **1998**, *409*, 307.

- [14] E. H. Martins Ferreira, M. V. O. Moutinho, F. Stavale, M. M. Lucchese, R. B. Capaz, C. A. Achete, A. Jorio, *Phys. Rev. B* **2010**, *82*, 125429.
- [15] Y. M. Choi, H. Abernathy, H. T. Chen, M. C. Lin, M. Liu, *Chem. Phys. Chem* **2006**, *7*, 1957.
- [16] Z. Wu, M. Li, J. Howe, H. M. Meyer III, S. H. Overbury, *Langmuir* **2010**, *26*(21), 16595.
- [17] A. Filtschew, K. Hofmann, C. Hess, *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*(12), 6694.
- [18] P. Dutta, S. Pal, M. S. Seehra, Y. Shi, E. M. Eyring, R. D. Ernst, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5144.
- [19] G. Zhou, Y. Yao, X. Zhao, X. Liu, B. Sunc, A. Zhou, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 59370.
- [20] M. Grujic-Brojcin, M. J. Scepanovic, Z. D. Dohcevic-Mitrovic, Z. V. Popovic, *Acta Phys. Pol. A* **2009**, *116*, 51.
- [21] J. E. Spanier, R. D. Robinson, F. Zhang, S. W. Chan, I. P. Herman, *Phys. Rev. B* **2001**, *64*, 245407.
- [22] Y. Lee, G. He, A. J. Akey, R. Si, M. Flytzani-Stephanopoulos, I. P. Herman, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12952.
- [23] M. Srivastava, A. K. Das, P. Khanra, E. Uddin, N. H. Kima, J. H. Lee, *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 9792.
- [24] F. Marabelli, P. Wachter, *Phys. Rev. B* **1987**, *36*, 1238.
- [25] E. Wuilloud, B. Delley, W. D. Schneider, Y. Baer, *Phys. Rev. Lett.* **1984**, *53*, 202.
- [26] M. E. Khan, M. M. Khan, M. H. Cho, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 20824.
- [27] J. J. Plata, A. M. Marquez, J. F. Sanz, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 14502.
- [28] I. Kosacki, T. Suzuki, V. Petrovsky, H. U. Anderson, P. Colomban, *Radiat. Eff. Defects Solids* **2001**, *156*, 109.
- [29] I. Kosacki, T. Suzuki, H. U. Anderson, P. Colomban, *Solid State Ionics* **2002**, *149*, 99.
- [30] G. Gouadec, P. Colomban, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2007**, *53*, 1.
- [31] Z. D. Dohcevic-Mitrovic, M. J. Scepanovic, M. U. Grujic-Brojcin, Z. V. Popovic, S. B. Boskovic, B. M. Matovic, M. V. Zinkevich, F. Aldinger, *Solid State Commun.* **2006**, *137*, 387.
- [32] D. W. Wheeler, I. Khan, *Vib. Spectrosc.* **2014**, *70*, 200.
- [33] L. Lei, Z. Wu, H. Liu, Z. Qin, C. Chen, L. Luo, G. Wang, W. Fan, J. Wang, *J. Mater. Chem. A* **2018**, *6*, 9948.
- [34] I. Calizo, S. Ghosh, W. Baob, F. Miao, C. N. Lau, A. A. Balandin, *Solid State Commun.* **2009**, *149*, 1132.
- [35] A. Tiberj, M. Rubio-Roy, M. Paillet, J. -R. Huntzinger, P. Landois, M. Mikolasek, S. Contreras, J.-L. Sauvajol, E. Dujardin, A. -A. Zahab, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2355.
- [36] J. E. Lee, G. Ahn, J. Shim, Y. S. Lee, S. Ryu, *Nature Commun.* **2012**, *3*, 1024.
- [37] F. Fromm, P. Wehrfritz, M. Hundhausen, T. Seyller, *New J. Phys.* **2013**, *15*, 113006.
- [38] Y. Yaakob, Y. Kuwataka, M. Zamri, M. Yusop, S. Tanaka, M. Saufi, R. G. Kalita, M. Tanemura, *Phys. Status Solidi B* **2015**, *252*(6), 1345.
- [39] I. Calizo, F. Miao, W. Bao, C. N. Lau, A. A. Balandin, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 071913.
- [40] S. Tian, Y. Yang, Z. Liu, C. Wang, R. Pan, C. Gu, J. Li, *Carbon* **2016**, *104*, 27.
- [41] H. Zhou, C. Qiu, F. Yu, H. Yang, M. Chen, L. Hu, Y. Guo, L. Sun, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2011**, *44*, 185404.
- [42] M. Bruna, A. K. Ott, M. Ijäs, D. Yoon, U. Sassi, A. C. Ferrari, *ACS Nano* **2014**, *8*, 7432.
- [43] L. D. Landau, E. M. Lifshitz, *Quantum Mechanics: Non-Relativistic Theory*, Pergamon Press, Oxford **1977**.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Nikolenko A, Strelchuk V, Gnatyuk O, et al. In situ Raman study of laser-induced stabilization of reduced nanoceria (CeO_{2-x}) supported on graphene. *J Raman Spectrosc.* 2018;1–9. <https://doi.org/10.1002/jrs.5542>

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Chemical Physics Letters 372 (2003) 432–437

**CHEMICAL
PHYSICS
LETTERS**
www.elsevier.com/locate/cplett

DNA interaction with single-walled carbon nanotubes: a SEIRA study

G.I. Dovbeshko ^a, O.P. Repnytska ^{a,*}, E.D. Obraztsova ^b, Y.V. Shtogun ^c

^a *Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Physics of Biological Systems,
Prospect Nauki 46, Kyiv 03028, Ukraine*

^b *P.N. Lebedev Physics Institute, Russian Academy of Sciences, 53 Leninsky Prospect, Moscow 117924, Russia*

^c *Department of Radiophysics, National Taras Shevchenko University of Kiev, 64 Volodymyrska str., Kyiv 01033, Ukraine*

Received 17 January 2003; in final form 6 March 2003

Abstract

Interaction of nucleic acids with graphite powder and SWCNT was studied by surface enhanced infrared absorption spectroscopy. The analysis of DNA-SWCNT complex vibrational modes shows that the numerous structural changes in DNA are connected to appearance of new sugar and bases conformations, changes in phosphate vibrations, which may be interpreted as A–B conformation transition and stabilisation of structure in some DNA fragments. A slight graphite influence on the DNA structure has been registered. The spectroscopic data could be explained by the model of DNA interaction with SWCNT based on wrapping of nucleic acid molecules around carbon nanotubes proposed by R. Smalley. A similar situation seems to occur in chromosome during DNA assembling by histones.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays a study of carbon nanotubes is of great scientific and applied interest due to their mechanical and electrical properties [1]. However, due to their not good solubility in any solvents, it is very difficult to isolate one carbon nanotube from the other. It is known that some polymers and nucleic acids could be applied for it [2,3]. The mechanism of the interaction of DNA with carbon

nanotubes is important for applications and fundamental science, however until now it is not clear. That is why we decided to perform our experiment.

2. Method and materials

FTIR spectroscopy, namely, one of its new super-sensitive method – surface enhanced infrared absorption (SEIRA) has been used for study of the interaction of DNA with SWCNT.

The SWCNT have been synthesized by arc discharge between two graphite electrodes in He atmosphere in Moscow Institute of Physics [4].

* Corresponding author. Fax: +38-44-265-15-89.

E-mail addresses: galyna@ukma.kiev.ua (G.I. Dovbeshko), olena@iop.kiev.ua (O.P. Repnytska).

The anode has been drilled and filled with catalytic powder (Ni:Y₂O₃:C—weight ratio 1:1:2). The nanotube-containing soot has been collected from the walls of protecting cylinder (diameter of 10 cm). The nanotube content in the raw material was about 20 wt.%. The contaminants are the amorphous carbon and metallic catalyst particles. The material has been certified by high resolution transmission electron microscopy and Raman scattering [4]. Their length was 1–2 μm, and diameter 1.2–1.6 nm. Aqueous solution of DNA (Na-salt of calf thymus DNA, Servo) (0.25 mg DNA/0.5 ml H₂O) was heated up to 100 °C, then 0.5 mg SWCNT was added. Compounds of the solution were mixed, stirred and then precipitated onto quartz substrate covered with gold layer (thickness of the gold was 200 Å, roughness 50 Å). Spectra were collected in reflectance mode with the reflectance attachment (a light incidence angle was close to 16.5°) on Bruker IFS-48 instrument in the 380–5300 cm⁻¹ region. Due to using of rough gold substrate we observed the effect of SEIRA for nucleic acids [5–7]. The estimation shows that the enhancement of the effect is increased in the case when the characteristic size of roughness of the surface is close to 50–100 Å. In our experiment, we used gold substrate with similar size of roughness and obtained enhancement of SEIRA by factor 3–7 for different vibrations. The carbon samples in KBr pellets were prepared for FTIR transmittance spectroscopy. Raman spectra have been registered by Bruker RFS 100/S instrument with NIR excitation (laser: Neodym-YAG, λ = 1064 nm).

3. Results and discussion

Raman spectra (Fig. 1a) showed that graphite have two wide weak peaks at 1329 and 1591 cm⁻¹. The SWCNT (Fig. 1b) has very strong peak positions at 1593 cm⁻¹ with a shoulder at 1571 cm⁻¹ and low frequency mode at 162 cm⁻¹ with shoulder at 148 and 177 cm⁻¹. The band at 162 cm⁻¹ was identified as the A_{1g} symmetry radial breathing mode, and the band at 1593 cm⁻¹ was assigned to an unresolved Raman triplet identified (in armchair symmetry tubes) as tangential carbon

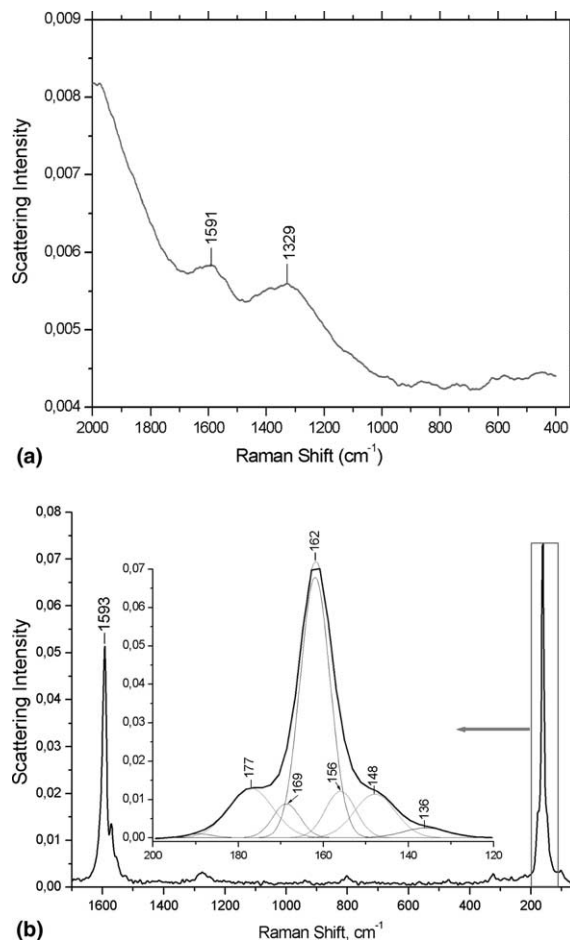


Fig. 1. Raman spectra of ultradispersed graphite (a) and SWCNT (b) obtained with NIR excitation (spectra were registered by Dr. Manfred Westermayer, Friburg, Germany).

displacement modes, A_{1g}, E_{1g}, and E_{2g} [8]. These three nearly degenerate high frequency modes are related to the graphite E_{2g} symmetry interlayer mode at 1593 cm⁻¹. These main SWCNT Raman bands are homogeneously broadened due to the tube diameter distribution. According to [9] the diameter of SWCNT could be determined from the formula d (nm) = 223.75 (cm⁻¹ nm)/ w (cm⁻¹), where w —is the position of low frequency mode in Raman spectrum. In our experiment we decomposed the low-frequency mode into a number of peaks at 136, 148, 156, 162, 169, 177 cm⁻¹ (Fig. 1b insert). So, in the experiment we used the SWCNT with diameters of 1.26–1.65 nm.

In our experimental conditions (60% humidity) we registered the DNA in A conformational state as it was found earlier [6].

The SWCNT influences the DNA structure more strongly than graphite. In the case of DNA-SWCNT, we obtained the changes of the vibrational modes of DNA that are the marker bands of the conformational state of DNA [10,11]. The changes in the DNA marker bands indicate strong DNA interaction with SWCNT. It is known [10,11], that marker bands of DNA in B-helix conformation are the following: 1715–1710 cm^{-1} (base pairing), 1220–1228 cm^{-1} (phosphate asymmetric band), 1085–1088 cm^{-1} (phosphate symmetric band), 890 and 835 cm^{-1} (C_2' -endo/anti conformation). A-helix of DNA has characteristic features at 1705–1700 cm^{-1} (base pairing), 1230–1240 cm^{-1} (phosphate asymmetric band), 1090–1092 cm^{-1} (phosphate symmetric band), 890, 878, 860 and 805 cm^{-1} (C_3' -endo/anti conformation). So, the increase of absorption at 1712 and 1700 cm^{-1} (Figs. 2 and 3b) could be interpreted as increase of base pairing and appearance both A and B DNA helices. However, under our experimental condition (60% humidity) we usually register only A-helix of DNA. In our spectra SWCNT-DNA main marker bands correspond to B-form of DNA. As usually it is impossible to obtain B-form of DNA under 60% humidity without additional strong influence.

As it could be seen from Fig. 2, the spectra of different DNA-SWCNT parts of the same sample changed drastically in comparison with the reference denaturated DNA (bottom spectra). The phosphate I band shifts in high frequency region from 1090 cm^{-1} (A-form) in reference DNA to 1100, 1095, 1095, 1096 (not-A- or B-form), 1091, 1092 cm^{-1} (A-form) in the DNA-SWCNT, the phosphate II band has low-frequency shift from 1234 cm^{-1} (A-form) in reference DNA to 1226, 1227, 1229, 1228, 1229 cm^{-1} (B-form) in the DNA-SWCNT. The most contribution in phosphate asymmetric band in DNA (1220–1240 cm^{-1}) is assigned to PO_2^- vibration. The phosphate symmetric band (1085–1092 cm^{-1}) is more complex and deoxyribose (C–O, C–C) gives a great contribution and influences the shape of this band. So, the changes in phosphate backbone along with

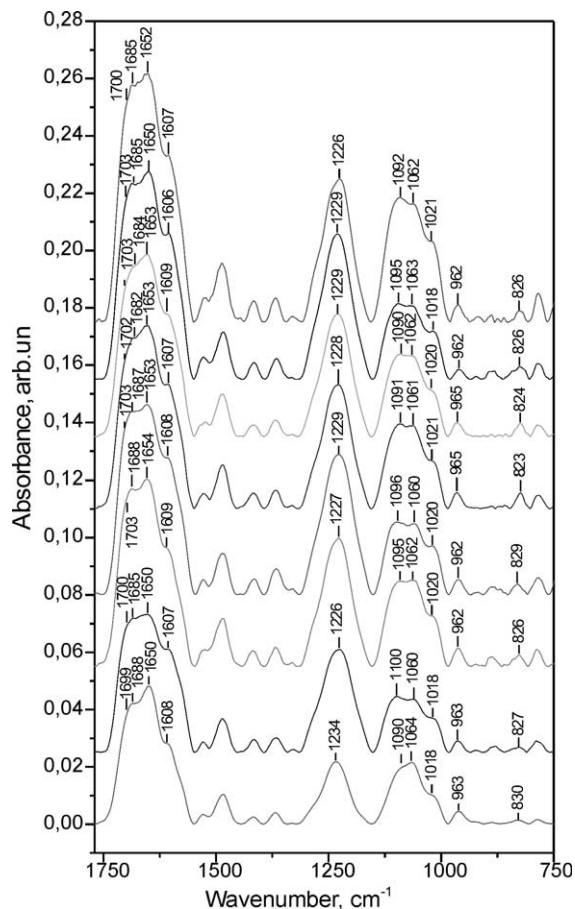


Fig. 2. SEIRA spectra of different parts of the DNA-SWCNT sample in comparison with the reference denaturated DNA (bottom spectra).

sugar moieties could be induced by SWCNT and explain the position of phosphate symmetrical band that is not A- or B-form in the case of DNA-SWCNT. The base band shows the presence of a high-frequency shoulder at 1700 cm^{-1} (A-form)–1712 cm^{-1} (B-form) (in comparison with 1699 cm^{-1} in reference DNA), which indicates the strengthening of interaction between the DNA helix with SWCNT. The increase of the bands in the sugar region (900–750 cm^{-1}) and shift of sugar vibration at 830 cm^{-1} (reference DNA) to 829, 827, 826, 824, 823 cm^{-1} in DNA-SWCNT is an evidence of some changes in conformations of sugar and bases in DNA under SWCNT interaction (Fig. 2).

In Fig. 3 we present, in zoomed scale, the second (from the bottom) DNA-SWCNT spectrum of Fig. 2. Some transformation of H-bonds in the region of OH-, NH- and CH-vibrations was observed (Fig. 3a). The increase (about 50 cm^{-1}) of the halfwidth of H-bonded O–H and N–H stretching vibration has been registered for DNA-SWCNT complex. Thus, for reference denaturated DNA and DNA-graphite complex, the halfwidth of the OH–NH–CH band is equal to 478 cm^{-1} , for DNA-nanotubes complex this parameter is equal

to 527 cm^{-1} . This halfwidth increase in DNA-SWCNT is due to increase of shoulder in the $2950\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ region. This indicates the formation of strongly H-bonded NH and OH molecular groups [12] in DNA with SWCNT and could be seen from the difference spectra in Fig. 3a.

In the region of the bases (Fig. 3b), the spectra of DNA-graphite complex and reference denaturated DNA practically have no difference. For DNA-graphite complex, some decrease of integral intensity (5.27) of the base band was observed in

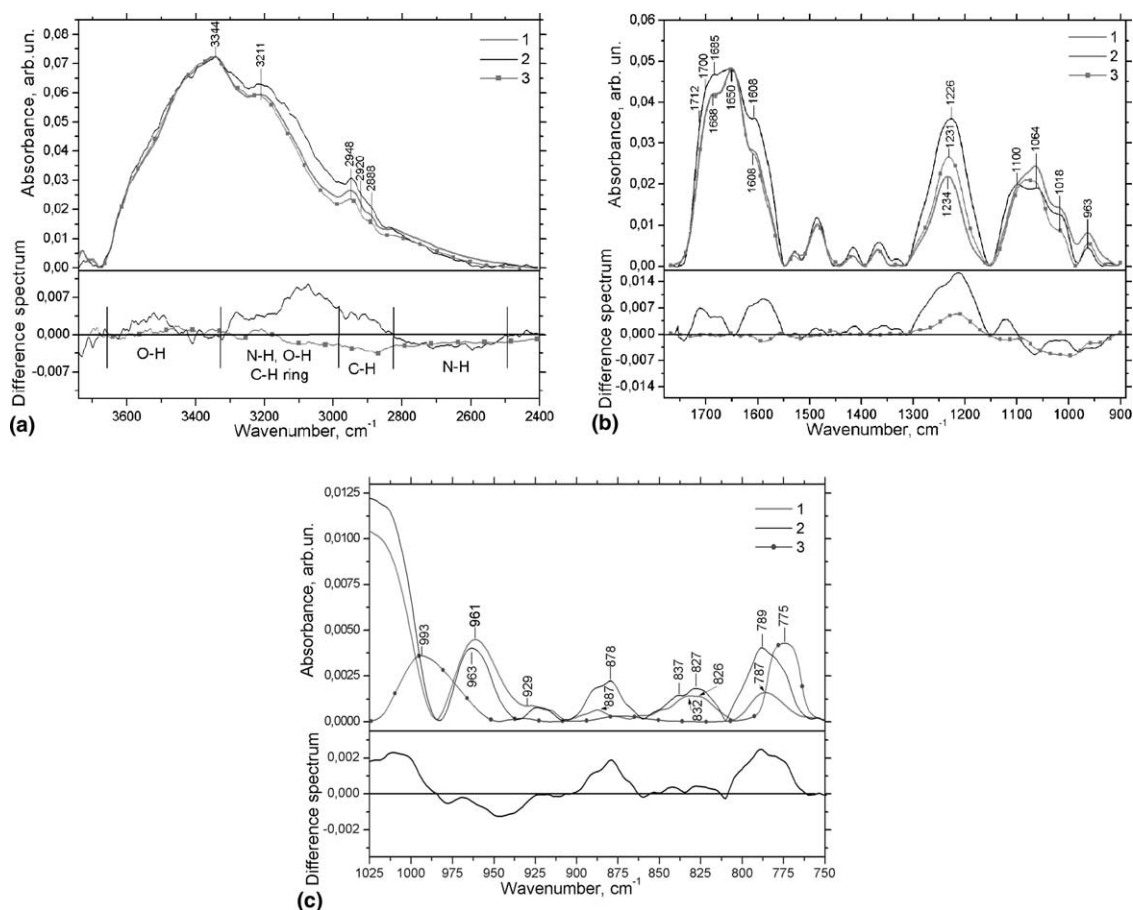


Fig. 3. (a) SEIRA spectra of denaturated DNA (curve 1), DNA with carbon nanotubes (curve 2), and DNA with ultradispersed graphite (curve 3) on the gold substrate in the region $2400\text{--}3800\text{ cm}^{-1}$. Difference spectrum = DNA with carbon nanotubes or with graphite – denaturated DNA. (b) SEIRA spectra of denaturated DNA (curve 1), DNA with carbon nanotubes (curve 2) and DNA with ultradispersed graphite (curve 3) on the gold substrate in the region $890\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$. Difference spectrum = DNA with carbon nanotubes or with graphite – denaturated DNA. (c) SEIRA spectra of denaturated DNA (curve 1), DNA with carbon nanotubes (curve 2) and SWCNT (curve 3) on the gold substrate in the region $750\text{--}1025\text{ cm}^{-1}$. Difference spectrum = DNA with carbon nanotubes – denaturated DNA.

comparison with the reference denaturated DNA (5.37). In the case of DNA-SWCNT complex, the essential increase of the absorption of C=O molecular groups at 1712, 1700, 1685 cm^{-1} and C=N at 1608 cm^{-1} was registered. The integral intensity of the base band has been increased to 6.24 for the DNA-SWCNT complex. The relative intensity of the base vibrations was increased in the spectrum of DNA-SWCNT in comparison with those for reference DNA. All these features show that in the case of DNA-SWCNT complex the B-helical structures DNA are restored.

We have registered the low-frequency shift of asymmetrical PO_2^- vibration both for DNA-SWCNT and DNA-graphite complexes (Fig. 3b). For reference DNA, the frequency position of asymmetric PO_2^- vibration is equal to 1234 cm^{-1} (A-form), in DNA-graphite – 1231 cm^{-1} (A-form), in DNA-SWCNT – 1226 cm^{-1} (B-form) [10,11]. Integral intensity was 1.59 for DNA, 2.00 for DNA-graphite and 3.05 for DNA-SWCNT. The shoulder of phosphate symmetric band at 1100 cm^{-1} was found in DNA-SWCNT. This shoulder was absent for denaturated DNA and only a small shoulder was registered in DNA-graphite complex.

The DNA interaction with SWCNT leads to integral intensity increase of the vibrations in the 600–900 cm^{-1} region (Fig. 3c). Namely, the band intensity at 789 cm^{-1} (787 cm^{-1} in DNA) increases by factor 3.2; the band at 827 cm^{-1} (832 cm^{-1} in DNA – assigned to sugar C_2' -endo) by 1.4; the band at 878 cm^{-1} (887 cm^{-1} in DNA assigned to deoxyribose vibration) by 5.5. The increase of the band at 827 cm^{-1} indicates that we have the greatest contribution from the B-form of DNA in DNA-SWCNT complex. These spectral changes in the 600–900 cm^{-1} region could be assigned to the SWCNT absorption at 789, 933, 993 cm^{-1} , too. However, this contribution has non-additive features as we could see from the difference spectra [(DNA-SWCNT complex—DNA)], Fig. 3c. So, the changes in DNA-SWCNT at 827, 878 and 929 cm^{-1} could not be explained by additive contribution of the SWCNT.

That is why we could suppose that SWCNT causes A–B transition in some fragments of DNA sugar-phosphate backbone. This could be in agreement with the model of DNA interaction

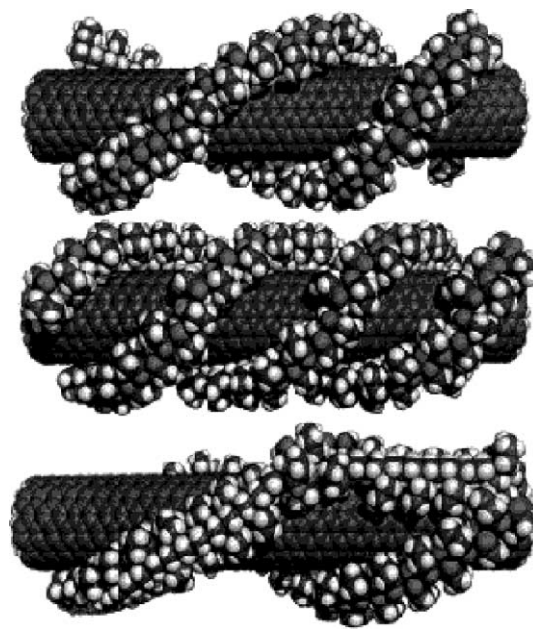


Fig. 4. The model of DNA interaction with SWCNT [2]. (This picture presentation was kindly permitted by Prof. R.E. Smalley.)

with SWCNT based on wrapping of nucleic acid molecule around nanotube (Fig. 4), proposed by Smalley and co-workers [2]. The similar type of DNA behaviour occurs in cell, namely, in the process of DNA assembling by histones in chromosome [13]. Naturally, this supposition should be proved by other experimental methods, such as TEM, that we are going to do.

4. Conclusions

The analysis of vibrational modes of DNA with SWCNT has shown that the structural changes in DNA occur. They can be interpreted as A–B transition and stabilisation of DNA structure in some DNA fragments. Other conformation forms of DNA induced by SWCNT could be supposed also. We registered very slight graphite influence on the DNA structure. The model of DNA wrapping around SWCNT could be proposed for the process of carbon nanotube interaction with DNA. The similar situation seems to occur in chromosomes during DNA assembling by histones.

Acknowledgements

This work was supported by grant of National Foundation of Fundamental Research of Ukraine no. 020710004 and Project SCOPES 7SUPJ062400. We are greatly indebted to Prof. Yu.M. Shirshov from Institute of Physics of Semiconductors of NASU for assistance in experiment and Dr. Manfred Westermayer (Freiburg, Germany) for Raman spectra of carbon samples.

References

- [1] Z. Guo, P.J. Sadler, S.C. Tsang, *Adv. Mater.* 10 (1998) 701.
- [2] M.J. O'Connell, P. Boul, L.M. Ericson, C. Huffman, Y. Wang, E. Haroz, C. Kuper, J. Tour, K.D. Ausman, R.E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 265.
- [3] M. Panhuis, A. Maiti, I.N. Coleman, A.B. Dalton, B. McCarthy, W.I. Blau, in: H. Kuzmany (Ed.), *Electronic Properties of Molecular Nanostructures*, 591, American Institute of Physics, Woodbury–Melville–New York, 2001, p. 497.
- [4] E.D. Obratsova, J.-M. Bonard, V.L. Kuznetsov, *Nanostruct. Mater.* 12 (1999) 567.
- [5] G.V. Andrievsky, V.K. Klochkov, A.B. Bordyuh, G.I. Dovbeshko, *Chem. Phys. Lett.* 364 (1–2) (2002) 8.
- [6] G.I. Dovbeshko, V.I. Chegel, N.Y. Gridina, O.P. Repnytska, Y.M. Shirshov, V.P. Tryndiak, I.M. Todor, G.I. Solyanik, *Biospectroscopy* 67 (6) (2002) 470.
- [7] G.I. Dovbeshko, V.I. Chegel, N.Y. Gridina, O.P. Repnytska, Y.M. Shirshov, V.P. Tryndiak, I.M. Todor, *Semicond. Phys. Quant. Electron. Optoelectron.* 4 (3) (2001) 202.
- [8] Y. Chen, R.C. Haddon, S. Fang, A.M. Rao, P.C. Eklund, W.H. Lee, E.C. Dickey, E.A. Grulke, J.C. Pendergrass, A. Chavan, B.E. Haley, R.E. Smalley, *J. Mater. Res.* 13 (9) (1998) 2423.
- [9] J. Chen, M.A. Hamon, H. Hu, Y. Chen, A.M. Rao, P.C. Eklund, R.C. Haddon, *Science* 282 (1998) 95.
- [10] B. Schrader, in: *Infrared and Raman Spectroscopy*, Weinheim, New York–Basel–Cambridge–Tokyo, 1995, p. 765.
- [11] J. Liquier, A. Akhebat, E. Taillandier, F. Ceolin, T. Huynh Dinh, J. Igolen, *Spectrochim. Acta A* 47 (1991) 177.
- [12] R.M. Badger, S.H. Bauer, *J. Chem. Phys.* 5 (1937) 839.
- [13] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, vol. 2, Mir, 1986.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-04>

УДК 577.359

DO CARBON NANOTUBES INHIBIT OR PROMOTE AMYLOID FIBRILS FORMATION?

M.V. Olenchuk¹, O.P. Gnatyuk¹, G.I. Dovbeshko¹, I.O. Polovyi¹, S.O. Karakhim²

¹Institute of Physics of NASU, Nauky Avenue, 46, Kyiv, 03028, Ukraine

²Palladin Institute of Biochemistry of NASU, Leontovycha St. 9, Kyiv, 01601, Ukraine

e-mail: ipoliovyy@gmail.com

Submitted October 5, 2018

Accepted February 5, 2019

Background: Carbon nanotubes, due to their unique physical properties, have been widely used in materials science and electronics; however, numerous attempts to create systems for delivering drugs or complexes of therapeutic drugs with nanotubes for improving their effectiveness and specificity have not succeeded. It is primarily due to the high cytotoxicity of nanotubes for living cells as well as the lack of mechanisms for their biodegradation. On the other hand, carbon nanotubes can form stable compounds with such biologically important molecules as DNA, phospholipids, proteins. In this paper, the possibility of the formation of amyloid fibril structures in lysozyme due to the interaction with carbon nanotubes is shown. The obtained results have both a fundamental and an applied value, since this may be a method for obtaining model amyloid fibrils for further study.

Objectives: The purpose of the work was to study the effect of carbon nanotubes on the formation of fibril structures in lysozyme at room temperature under different pH values.

Materials and methods: For the preparation of the samples, hen egg-white lysozyme protein (HEWL, Fluka), as well as single-walled (SWCNT, Sigma-Aldrich) and multi-walled (MWCNT, ООО ТМ "Spetsmash", Kyiv, Ukraine) carbon nanotubes were used. Used techniques: IR-Fourier Absorption Spectroscopy; confocal microscopy.

Results: In this paper, the study of molecular mechanisms of interaction of lysozyme with carbon nanotubes by vibrational spectroscopy was carried out and a conformational analysis of the formed complexes was performed. It is shown that carbon nanotubes can affect the structure of lysozyme even at room temperature and normal pH values, as evidenced by conformational changes in lysozyme due to interaction with carbon nanotubes. Complexes which are formed as a result of such interaction, have characteristic features of amyloid fibrillar structures. It reveals one of possible mechanisms of carbon nanotubes cytotoxicity. On the other hand, such a technique can be introduced to obtain model amyloid fibrils for further study.

Conclusion: The method of vibrational spectroscopy has shown that carbon nanotubes can influence the structure of lysozyme, as it is shown by the conformational analysis of the absorption band Amide I. After the interaction of lysozyme with CNT, an increase in the contribution of antiparallel β -conformation in the structure of lysozyme is observed, and the contribution of the α -helix conformation is reduced, which are characteristic features in the formation of fibrillar structures. The possibility of amyloid fibril formation without the use of high temperatures at different pH values with the interaction of lysozyme and carbon nanotubes, which can be applied as a method for obtaining the model amyloid fibrils, is shown.

KEY WORDS: amyloid fibril; lysozyme; carbon nanotubes; β -sheet.

ВУГЛЕЦЕВІ НАНОТРУБКИ ПЕРЕШКОДЖАЮТЬ ЧИ СПРИЯЮТЬ ФОРМУВАННЮ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ?

М.В. Оленчук¹, О.П. Гнатюк¹, Г.І. Довбешко¹, І.О. Польовий¹, С.О. Карахим²

¹Інститут фізики НАН України, проспект Науки 46, Київ, 03028, Україна

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна, вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна

Актуальність. Вуглецеві нанотрубки, завдяки своїм унікальним фізичним властивостям, знайшли широке застосування в матеріалознавстві та електроніці, однак численні спроби створення систем доставки ліків чи комплексів терапевтичних препаратів з нанотрубками з метою покращення ефективності та специфічності їх дії не призвела до успіху. В першу чергу це пов'язано з високою цитотоксичністю нанотрубок для живих клітин та відсутністю механізмів їх біодеградації. З

іншого боку, вуглецеві нанотрубки можуть утворювати стійкі комплексами з такими біологічно важливими молекулами як ДНК, фосфоліпіди, білки. В даній роботі показана можливість формування амілоїдних фібрилярних структур в лізоцимі при взаємодії з вуглецевими нанотрубками. Отримані результати мають як фундаментальне, так і прикладне значення, оскільки це може бути методом отримання модельних амілоїдних фібрил для подальшого вивчення.

Мета роботи. Метою роботи було дослідити вплив вуглецевих нанотрубок на процес утворення фібрилярних структур в лізоцимі при кімнатній температурі при різних значеннях рН.

Матеріали і методи. Для приготування експериментальних зразків був використаний лізоцим, виділений з білка курячих яєць (HEWL – Hen Egg-White Lysozyme, Fluka), а також одностінні (SWCNT, Sigma-Aldrich) та багатостінні (MWCNT, ООО ТМ «Спецмаш», Київ, Україна) вуглецеві нанотрубки. Використані методики: ІЧ-Фур'є-спектроскопія поглинання; конфокальна мікроскопія.

Результати. В даній роботі проведено дослідження молекулярних механізмів взаємодії лізоциму з вуглецевими нанотрубками методом коливальної спектроскопії та проведено конформаційний аналіз утворених комплексів. Показано, що вуглецеві нанотрубки можуть впливати на просторову структуру лізоциму навіть при кімнатній температурі та нормальних значеннях рН, про що свідчать конформаційні зміни в лізоцимі внаслідок взаємодії з вуглецевими нанотрубками. Комплекси, утворені внаслідок такої взаємодії, мають характерні риси амілоїдних фібрилярних структур, що розкриває один з механізмів цитотоксичності вуглецевих нанотрубок. З іншого боку, така методика може бути впроваджена для отримання модельних амілоїдних фібрил з метою їх подальшого вивчення.

Висновки. Методом коливальної спектроскопії показано, що вуглецеві нанотрубки можуть впливати на просторову структуру лізоциму, про що свідчить конформаційний аналіз смуги поглинання Амід I. Після взаємодії лізоциму з ВНТ, відбувається збільшення вкладу антипаралельної β -конформації в структурі лізоциму, та зменшення вкладу α -спіральної конформації, що є характерними рисами при формуванні фібрилярних структур. Показана можливість утворення амілоїдних фібрилярних структур без застосування високих температур при різних значеннях рН при взаємодії лізоциму з вуглецевими нанотрубками, що може мати прикладне застосування в якості методу отримання модельних амілоїдних фібрил.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амілоїдні фібрили; лізоцим; вуглецеві нанотрубки; β -шари.

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ ПРЕПЯТСТВУЮТ ИЛИ ВЫЗЫВАЮТ ФОРМИРОВАНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ?

М.В. Оленчук¹, Е.П. Гнатюк¹, Г.И. Довбешко¹, И.А. Полевой¹, С.А. Карахим²

¹Институт физики НАН Украины, проспект Науки 46, Киев, 03028, Украина

²Институт биохимии им. О.В. Палладина, ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

Актуальность. Углеродные нанотрубки, благодаря своим уникальным физическим свойствам, нашли широкое применение в материаловедении и электронике, однако многочисленные попытки создания систем доставки лекарств или комплексов терапевтических препаратов с нанотрубками с целью повышения эффективности и специфичности их действия не привела к успеху. В первую очередь это связано с высокой цитотоксичностью нанотрубок для живых клеток и отсутствием механизмов их биодеградации. С другой стороны, углеродные нанотрубки могут образовывать устойчивые комплексы с такими биологически важными молекулами как ДНК, фосфолипиды, белки. В данной работе показана возможность формирования амилоидных фибриллярных структур из лизоцима при взаимодействии с углеродными нанотрубками. Полученные результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение, поскольку это может быть способом получения модельных амилоидных фибрилл для дальнейшего изучения.

Цель работы. Целью работы было исследовать влияние углеродных нанотрубок на процесс образования фибриллярных структур в лизоциме при комнатной температуре при различных значениях рН.

Материалы и методы. Для приготовления экспериментальных образцов был использован лизоцим, выделенный из белка куриных яиц (HEWL – Hen Egg-White Lysozyme, Fluka), а также одностенные (SWCNT, Sigma-Aldrich) и многостенные (MWCNT, ООО ТМ «Спецмаш», Киев, Украина) углеродные нанотрубки. Используются методики: ИК-Фурье-спектроскопия поглощения; конфокальная микроскопия.

Результаты. В данной работе проведено исследование молекулярных механизмов взаимодействия лизоцима с углеродными нанотрубками методом колебательной спектроскопии и проведен конформационный анализ образованных комплексов. Показано, что углеродные нанотрубки могут

влиять на пространственную структуру лизоцима даже в условиях комнатной температуры и нормальных значений pH, о чем свидетельствуют конформационные изменения в лизоциме в результате взаимодействия с углеродными нанотрубками. Комплексы, образованные в результате такого взаимодействия, имеют характерные черты амилоидных фибриллярных структур, раскрывают один из механизмов цитотоксичности углеродных нанотрубок. С другой стороны, такая методика может быть введена для получения модельных амилоидных фибрилл с целью их дальнейшего изучения.

Выводы. Методом колебательной спектроскопии показано, что углеродные нанотрубки могут влиять на пространственную структуру лизоцима, о чем свидетельствует конформационный анализ полосы поглощения Амид I. После взаимодействия лизоцима с УНТ, происходит увеличение вклада антипараллельной β -конформации в структуре лизоцима, и уменьшение вклада α -спиральной конформации, которые являются характерными чертами при формировании фибриллярных структур. Показана возможность образования амилоидных фибриллярных структур без применения высоких температур при различных значениях pH при взаимодействии лизоцима с углеродными нанотрубками, что может иметь прикладное применение в качестве метода получения модельных амилоидных фибрилл.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоидные фибриллы; лизоцим; углеродные нанотрубки; β -слои.

A key issue in the amyloid science is to understand a mechanism of the amyloid fibril formation and its connection with pathological state of a living body [1] It is known that amyloid fibril arising is correlate with a number of diseases such as Alzheimer and Parkinson diseases, prion propagation, cancer geneses and metastases progress etc [2]; moreover, amyloid fibrils can appear in a variety of different morphological shapes [3-5].

Lysozyme (Lys), a small protein with four disulfide bonds, stems a property of bactericidal enzyme. It was found in a salivary fluid, in human tears, in the protein of hen egg. It is able to destroy the cell wall of gram-negative bacteria and some types of fungi. It contains 129 amino acid residues. Lysozyme is one of the most intensively studied proteins, especially, it is often used as a model system for amyloid fibril formation study [6, 7]. The amyloid fibril is a type of insoluble protein that aggregate with a specific secondary structure. [3-5, 8-10]. Lysozyme is not associated with any known amyloid diseases; however, it shares similar morphological features with amyloids from disease associated proteins. Study of mechanism of amyloid formation extends our knowledge about fibril formation and assists to clear up a possible disadvantage of interaction between nanoparticles and amyloids.

Carbon nanotubes (CNTs) are the most investigated carbon nanomaterials due to their unique physical and chemical characteristics, cheap and easy production, stability and indispensability for improving of electrical and mechanical properties of materials. Last years the carbon nanotubes are used as supporting matrix for protein adsorption and isolation [11]. Thus, Yuan et al. used Multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) as a carrier to prepare lysozyme imprinted polymers or even separation of lysozyme from egg white. However, the question arises: how do CNTs influence the amyloid fibrils formation. A fact about solubility of carbon nanotubes in the presence of fibril-forming protein lysozyme is an additional argument indicating easy possibility for fibril appearing [12-14]. However, a computer simulation of a CNT interaction with lysozyme done in [2] showed another possibility, namely, breaking of fibrils in the presence of CNT. So, the question about the CNT role in the fibrils breaking and formation is important. That is why the subject of our research was to study an influence of carbon nanotubes on fibril formation *in vitro* model experiment.

MATERIALS AND METHODS

Hen egg white lysozyme (HEWL) was purchased from Fluka and used without further purification. MWCNT were provided by OOO TM "Spetsmash", Kiev, Ukraine. They were obtained by catalytic pyrolysis of acetylene with the outer diameter 2-40 nm, the number of walls from 2 to 15 and the length up to 50 μm , and treated from catalyst residues by

hydrofluoric acid. Single walled carbon nanotubes (SWCNT) were bought from Sigma-Aldrich, with the diameter of 1.4-1.5 nm and the length about 1-2 μm .

The process of preparation of amyloid fibrils included ultrasonic treatment of aqueous solution of nanotubes (three times), followed by the selection of the central transparent part of the solution. Thereafter, an aqueous suspension of nanotubes was added to the aqueous solution of lysozyme (concentration 1 mg/ml).

In this study we did not use surface-active substances intentionally because they could affect the formation of amyloid fibrils and could also provide additional absorption bands in vibrational spectra, which significantly distort the analysis of results.

An aqueous suspension of SWCNT was prepared by ultrasonication at 60 W and 22 kHz for 3 hours. 1 mg of HEWL was dissolved in 1 ml of distilled water (pH = 5.5). This solution was acidified to pH = 2.5 with HCl addition or alkalinized to pH = 11.5 with KOH. An aqueous suspension of MWCNT was added to the prepared lysozyme solution and incubated for 14 days at room temperature. An aqueous suspension of SWCNT was added to the prepared lysozyme solutions and incubated for 2 days at 50 °C. For the IR absorption spectra registration and confocal imaging, the samples were dropped onto a rough gold surface and dried.

The IR spectra were collected in the 400-7000 cm^{-1} region with an IFS-66 Bruker instrument with resolution of 0.5 cm^{-1} and wavenumber definition accuracy of not less than 0.01 cm^{-1} . Repeatability of frequency in our IR spectra measurements was 0.5 cm^{-1} and that of absorbance – about 0.0005. The IR spectra of proteins were measured in the external reflection configuration at the light incidence angle 16.5°, as described in [15,16]. Deconvolution and decomposition of the spectral bands were performed with Opus-5.5 software program. The peak positions of the absorption bands were estimated by using the second derivative method and/or the standard Opus-5.5 peak finding method. All spectra were baseline-corrected and normalized by the peak intensity of O-H stretching vibrations band centered near 3300 cm^{-1} [16, 17].

Confocal imaging was carried out with a Carl Zeiss LSM-510 META confocal laser scanning microscope with the 4D Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr oil immersion objective in Multi Track mode. For observing objects in a transmittance mode in visible light a halogen incandescent lamp was used. A fluorescence images of the objects were obtained by excitation with ultraviolet mercury lamp HBO-100 or with diode laser ($\lambda=405$ nm, 25 mW), Ar or ArKr laser ($\lambda=488$ nm, 30 mW) and HeNe laser ($\lambda=633$ nm, 5 mW) in backscattering geometry. Magnification in the experiments was x40 and x10. The most important optical advantage of confocal microscopy is that the radiated photons are focused by the objective lens on a small (~ 50 μm) detector pinhole which limits a depth of focus and cut other photons by pinhole causing better contrast in comparison with other types of optical microscopes.

RESULTS AND DISCUSSION

To analyze the contribution of antiparallel β -layers in the spatial structure of HEWL, conformational analysis of the IR absorption bands of the lysozyme Amide I (1700–1600 cm^{-1}) was done (Fig. 1).

This part of the IR absorption spectrum gives a lot of information about the protein secondary structure and conformational changes. The Amide I band is mainly due to C=O stretching vibration (approximately 80%) of the amide groups coupled with in-plane NH bending (<20%).

The set and position of the bands for a fitting were selected according to the literature data [18-20] of conformational states of lysozyme to certain positions of the bands of Amide I. The conformational state of the protein in amyloid fibrils differs from that in initial protein

and results in the appearance of the new conformation, namely, antiparallel β -layers, which were not found in reference sample.

In order to mark the antiparallel β -sheet, we performed a model experiment for the amyloid fibril formation under standard conditions (2 days at 50°C) and at different pH.

With the vibrational spectra analysis we found that markers of antiparallel β -layers conformation are in the region of 1687-1695 cm^{-1} and 1615-1625 cm^{-1} . Thus, in the fitting processes we must consider the appearance of this new conformation, so the number of components in the reference sample and in the amyloid will be different. In the case of incubation with MWCNT, the total contribution of β -sheet increases by about 10% compared to that for SWCNT.

Quantitative analysis of the protein secondary structure is based on the assumption that secondary structure can be presented as a contributions of all conformations. The components of the Amide I band can be determined by considering their frequency and intensity behavior.

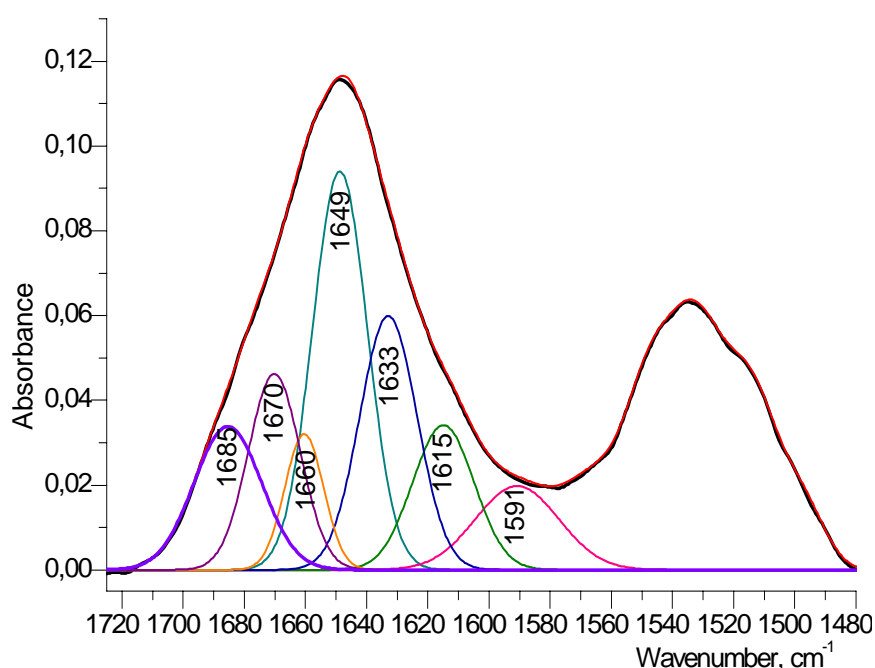


Fig. 1. Component analysis of Amide I IR absorption bands of HEWL, pH 5.3.

The biological activity of CNTs relative to proteins was checked with FTIR spectroscopy. It was shown that after the interaction of the proteins with MWCNT, the relative percentage content of β -conformation in the structure of the proteins increases, and an unordered state of the protein decreases. Thus, our experimental studies confirm the possibility of forming the structures harmful to human body upon interaction of HEWL with CNTs.

Our results show that the protein structural composition is the following: α -helix – 28.17%, β -turn – 13.07%, β -sheet – 31.38%, disordered structure – 27.38%. The similar secondary structure of lysozyme dissolved in water was determined from the far-UV CD spectra [6]. We suppose that peaks at 1615 cm^{-1} and 1685 cm^{-1} are formed by the contribution of β -sheet and side groups in the reference [21]. After interaction with SWCNT structural composition is similar to reference HELW, but we see a small part antiparallel form (6.59%) in the β -sheet (Fig. 2 b). After interaction with MWCNT, the protein undergoes structural changes (Fig. 2 a): the contribution from β -sheet, namely, antiparallel conformation increases (16.24%) along with a decrease in the contribution from the disordered structure

(15.35 %). Similar strong changes in the protein conformation indicate the formation of the amyloid fibril structures [18-20].

A new absorption peak at 1620 cm^{-1} (Fig. 2 a) and 1616 cm^{-1} (Fig. 2 b) corresponds to the appearance of a new conformation, likely HEWL amyloid fibril [6]. Peaks at $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ and at $\sim 1685\text{ cm}^{-1}$ are characteristic of β -sheet structure [21]. A peak about 1694 cm^{-1} is characteristics of antiparallel form in the β -sheet (Fig. 2 b) [16]. In the case of MWCNT, the fitting of the system gives 1699 cm^{-1} peak. The shift of the peak in high frequency region could be explained by additional interaction in the system MWCNT-protein. The results of spectra fitting show an interaction of MWCNT and SWCNT with lysozyme for both cases (Fig. 2). Thus, in the Fig. 2, we see a larger (about 10%) contribution of antiparallel β -sheet conformation in the case of HEWL+MWCNT in comparison with the same for HEWL+SWCNT. This conclusion is in accordance with the data from [13] where lysozyme has stronger interaction with larger diameter of nanotubes that could assist better fibril formation.

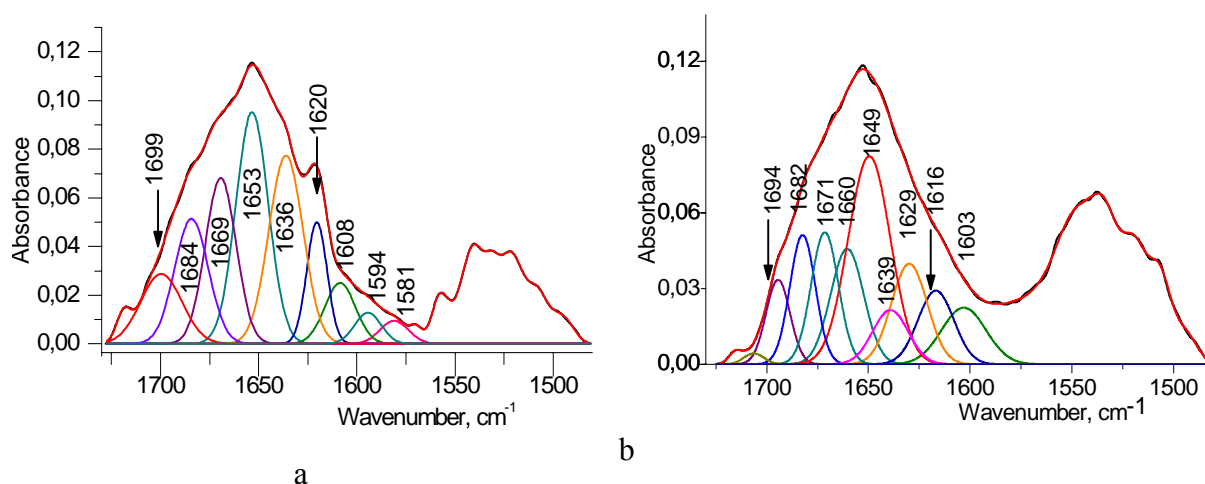


Fig. 2. Component analysis of Amid I and Amid II IR bands of HEWL+MWCNT at pH 5.5 (a) and 1580 HEWL+SWCNT at pH 6.0 (b).

For comparison we added also all spectra for all the samples under neutral pH (5.5-6) on one figure, from which we can clearly see appearance of the antiparallel beta-sheet conformation (1621 cm^{-1} and 1696 cm^{-1} in Lys+MWCNT and 1614 cm^{-1} in Lys+SWCNT) (Fig. 3). These peaks are clearly distinguished on the shoulders of wider Amid I bands of the sample with carbon nanotubes in comparison to reference sample.

In confocal microscopy image at pH = 5.5 (Fig. 4 a) the lysozyme does not show fibril structure; similarly, we have not observed the formation of fibrils for lysozyme+SWCNT complex (Fig. 4 b, c), too. At normal pH for SWCNT and MWCNT, we observed the formation of a continuous thin film of protein, a thickness of about 0.5 microns, in which we do not observe fibrillar structures. We see aggregation of CNTs presented by black points inside of the film of lysozyme (Fig. 4).

The colorful bands we see in the images are of an interference nature and indicate that the film is heterogeneous and has a different thickness. Black strips are cracks of the crystal film of lysozyme. Multiple black dots in Fig. 4 b and c we assign to carbon nanotubes.

In the case of lysozyme+SWCNT complex dense nuclei from lysozyme are formed (Fig. 4 b and Fig. 5 b, respectively). We can suggest that this is a state of the fibril film formation with participation of SWCNT and/or MWCNT, supported by FTIR spectroscopy.

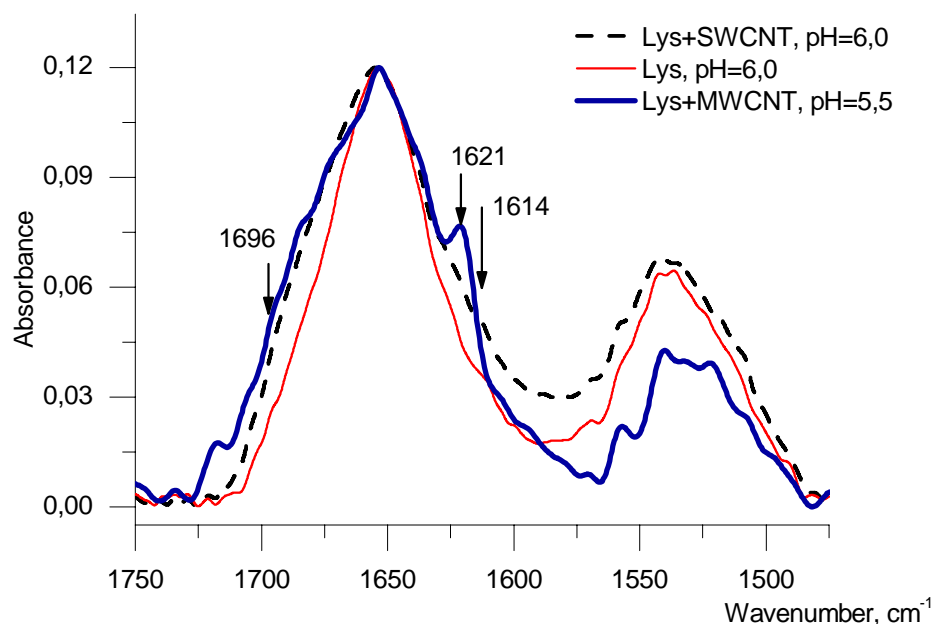


Fig. 3. IR spectra of lysozyme Amid I and Amid II regions: HEWL+SWCNT (dot line), HEWL (thin line), HEWL+MWCNT (thick line).

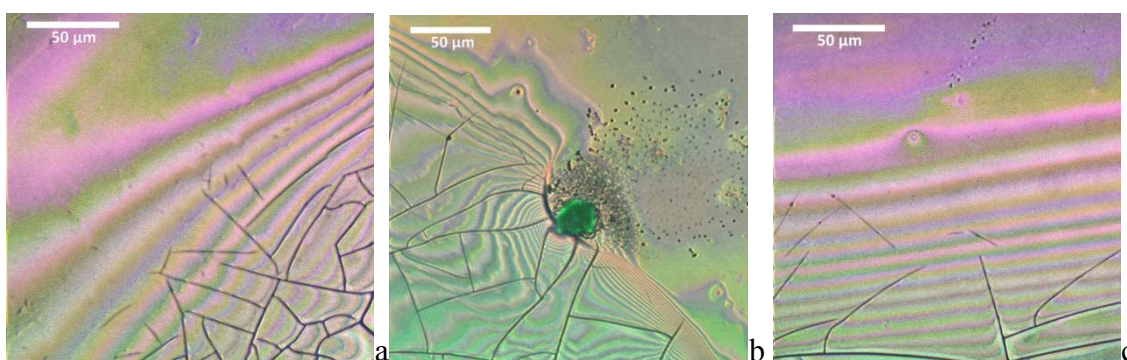


Fig. 4. Confocal images of pure HEWL (a), HEWL+SWCNT (b), HEWL+MWCNT (c) under pH=5.5.

We suppose that the fibrils come close one to another and form solid-like film [22] as in the case of the local larger protein concentration being a result of film thickness variation. The confocal microscopy data are not in accordance with FTIR fitting data and the conclusion about fibril features appearance in the Amid I spectral region.

IR spectra in the region of Amid I for all the samples of Lys obtained under 11.7 are similar. (Fig. 5) In the case of alkaline pH, the shape of Amid I band is mostly determined by pH of the sample, and the spectra have negligible differences. Due to the dominant contribution of beta conformation in protein structure, which has maximum at 1628 cm^{-1} , we could not registered low frequency shoulder located near 1614 cm^{-1} assigned to antiparallel beta conformation. Meanwhile high frequency of antiparallel beta conformation near 1693 cm^{-1} we can find at 1693 cm^{-1} for both samples (Fig. 5).

For a sample of lysozyme without nanotubes at an alkaline value of the pH (Fig. 6 a, pH 11.5), the size of the observed fibrillar aggregates is smaller than with the nanotubes (Fig. 6 b, c, pH 11.5). Here we registered clear, elongated structures with a diameter up to several microns and a length of tens of microns or more.

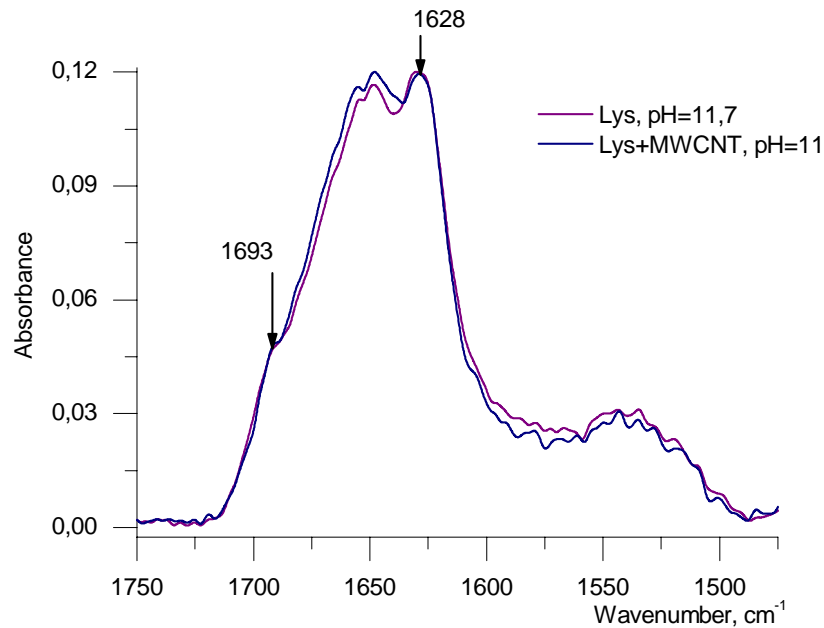


Fig. 5. IR spectra of lysozyme Amid I and Amid II regions: HEWL (thin line), HEWL+MWCNT (thick line).

Confocal microscopy cannot record structures with thin diameter (from units totens of nanometer), which is characteristic for fibril at initial stage of its formation. However, earlier [23–27] it was shown that the centroid of an image of the spot can be used to locate the object far beyond the resolution limit, despite the fact that the actual object size in the image can significantly differ from microscopy data.

We suggested that the size of actual fibrillar aggregates varies up to the size of a pixel. According to Nyquist criteria for digital resolution, the smallest resolved objects should have ~ 2.3 pixels [23].

According to the confocal microscopy resolution, for wavelength of 405 nm, optical resolution of obtained images is

$$d = 0.4 \frac{\lambda}{NA} = 216 \text{ nm},$$

where NA is numerical aperture of the objective, λ is wavelength. Next, the size of a pixel is calculated being equal 94 nm in our case. However, the location of the luminescent object can be estimated with nanometer precision for the images with a high signal-noise ratio. [24–27]

In case of SWCNT, we observed ramified net of fibrillar aggregates (Fig. 6 b, pH 11.5). In case of MWCNT on the background of small size structures (micron and less) we observed distinct elongated structures of 50 μm , which are corresponding to the size of carbon nanotubes used in our experiment. (Fig. 6 c, pH 11.5)

In contrast to high pH = 11.7 (Fig. 5) in the case of low pH = 2.5 (Fig. 7) fibrils seems to form more easily. Thus, in the sample of Lys+MWCNT at pH 2.5 we registered beta conformation at 1626 cm^{-1} , but in this sample (Lys+MWCNT) we could not distinguish low frequency shoulder at 1615 cm^{-1} , at the same time high frequency shoulder at 1962 cm^{-1} appears. However, for the samples Lys and Lys+SWCNT we registered low frequency shoulder at 1613 cm^{-1} assign to beta conformation.

Therefore, MWCNT possesses more significant effect than SWCNT. We suppose that influence from both pH and MWCNT are being added. (Fig. 7)

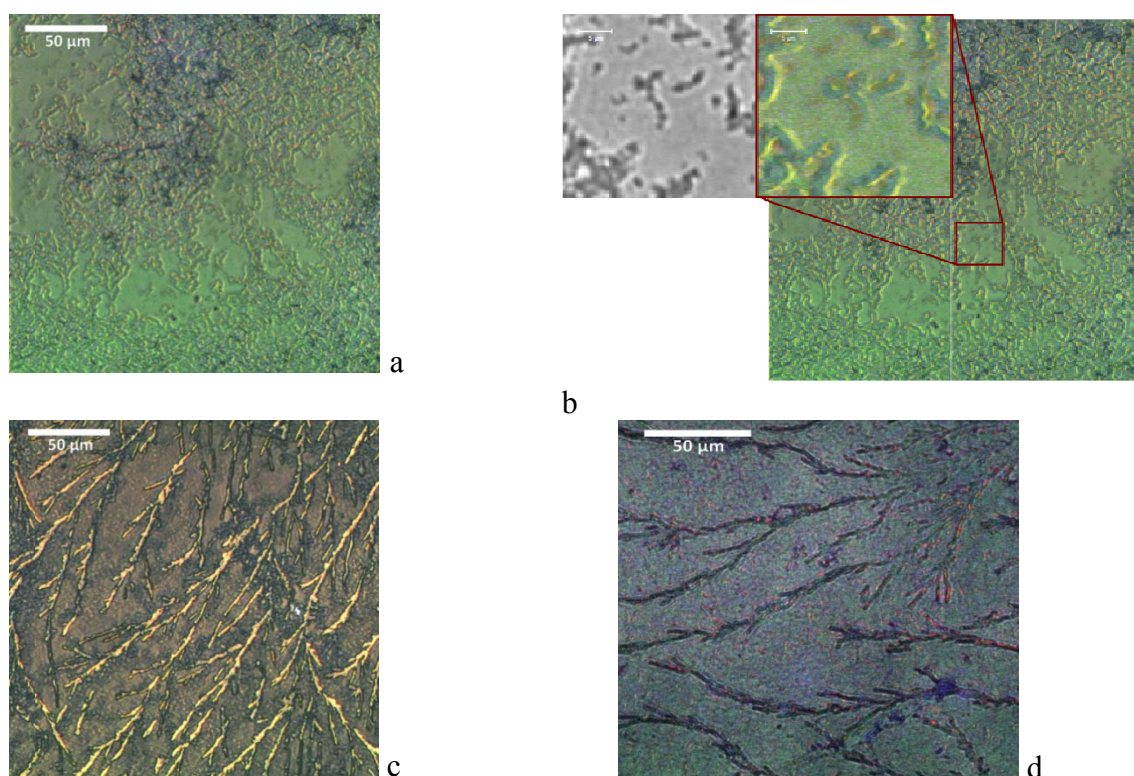


Fig. 6. Confocal images of pure HEWL (a,b), HEWL+SWCNT (c), HEWL+MWCNT (d) under pH=11.5.

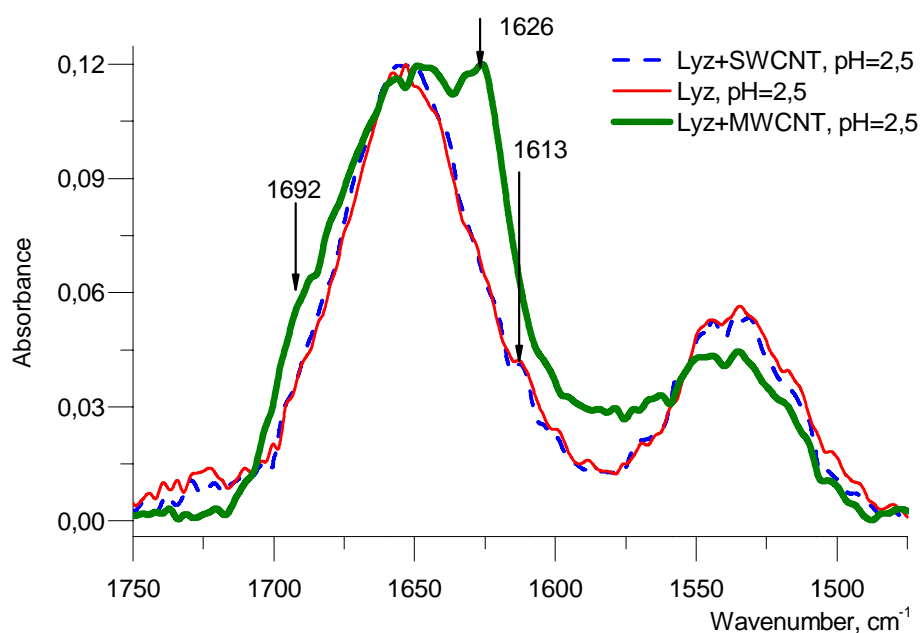


Fig. 7. IR spectra of lysozyme Amid I and Amid II regions: HEWL+SWCNT (dot line), HEWL (thin line), HEWL+MWCNT (thick line).

In case of acidic pH of the sample, we observe separated, seldom located fibrillar aggregates in confocal images. These aggregates were located more tightly in case of MWCNT (Fig. 8, c, pH 2.5), in comparison to those with SWCNT (Fig. 8, b, pH 2.5), and the sample without nanotubes (Fig. 8, a, pH 2.5).

Nanotubes serve as a surface, on which the formation of amyloid fibrils occurs more effectively. Surface of SWCNT and MWCNT have similar properties. Therefore, SWCNT and MWCNT influence the amyloid fibril formation similarly.

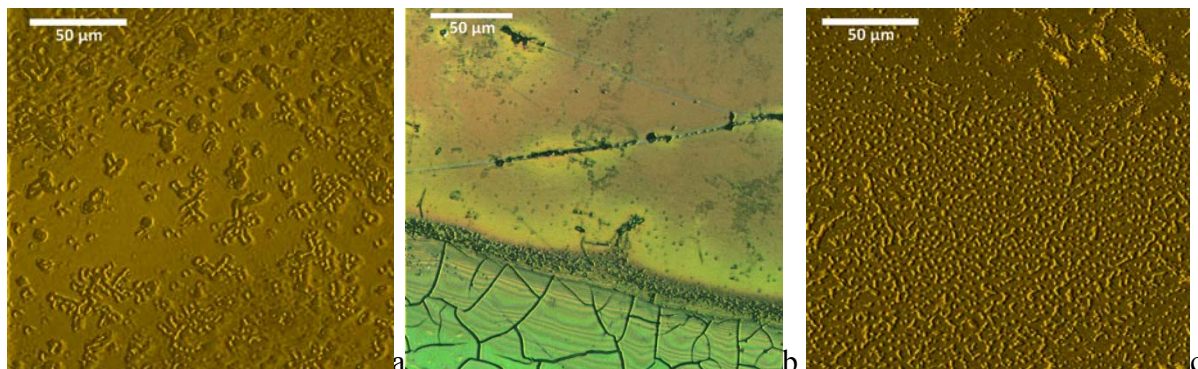


Fig. 8. Confocal images of pure HEWL (a), HEWL+SWCNT (b), HEWL+MWCNT (c) under pH=2.5.

Since the concentration of nanotubes was significantly (several orders of magnitude) lower than the concentration of lysozyme, the size of amyloid aggregates ranged up to several microns in diameter and 10 µm in length, which agrees with [23].

CONCLUSION

Summarizing, using FTIR spectroscopy and confocal microscopy, we have found out that CNTs could be a good promoter to initiate the process of fibril formation even under the room temperature and pH range of 5.5-6. The effect of amyloid fibril formation under different physiological conditions could be modeled by presence of CNT in lysozyme solution. The mechanism of this effect seems to be connected with good absorbance of lysozyme on the CNT and matches their surfaces. The relationship of the revealed effect with the diseases should be studied *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by the HORIZON 2020 project “Asymmetry of biological membrane: theoretical, experimental and applied aspects” (690853-assymcurv-H2020-MSCA-RISE-2015/ H2020-MSCA-RISE-2015), NATO 98 5291, STCU 6175, “Development of 2D materials and “smart” sensors for medical and biological purposes” 11/1 2018.

This paper is dedicated by the authors to the memory of a prominent Ukrainian physicist and biophysicist Professor Blagoi Yuri Pavlovych. We are grateful to Yuri Pavlovych for the sharing of invaluable scientific experience in the field of interaction between DNA and other biological molecules with metal ions, mutual creative work. The authors of the paper thank to all the co-authors of the cited papers for their cooperation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

M.V. Olenchuk <https://orcid.org/0000-0002-3710-6349>
 G.I. Dovbeshko <https://orcid.org/0000-0002-7701-0106>
 O.P. Gnatyuk <https://orcid.org/0000-0003-4406-5503>
 I.O. Polovyi <https://orcid.org/0000-0003-0149-7314>
 S.O. Karakhim <https://orcid.org/0000-0002-8389-0584>

REFERENCES

1. Annamalai, K., Gührs, K.-H., Koehler, R., Schmidt, M., Michel, H., Loos, C., Fändrich, M. (2016). Polymorphism of Amyloid Fibrils In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(15), 4822–4825.
2. Li, H., Luo, Y., Derreumaux, P., & Wei, G. (2011). Carbon Nanotube Inhibits the Formation of β -Sheet-Rich Oligomers of the Alzheimer's Amyloid- β (16-22) Peptide. *Biophysical Journal*, 101(9), 2267–2276. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.046>
3. Close, W., Neumann, M., Schmidt, A., Hora, M., Annamalai, K., Schmidt, M., ...Fändrich, M. (2018). Physical basis of amyloid fibril polymorphism. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03164-5>
4. Schmidt, A., Annamalai, K., Schmidt, M., Grigorieff, N., &Fändrich, M. (2016). Cryo-EM reveals the steric zipper structure of a light chain-derived amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22), 6200–6205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522282113>
5. Liberta, F., Loerch, S., Rennegarbe, M., Schierhorn, A., Westermark, P., Westermark, G. T., ...Schmidt, M. (2018). Cryo-EM structure of an amyloid fibril from systemic amyloidosis. *Cold Spring Harbor Laboratory*. <https://doi.org/10.1101/357129>
6. Knubovets, T., Osterhout, J. J., Connolly, P. J., &Klibanov, A. M. (1999). Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1262–1267. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1262>
7. Zou, Y., Hao, W., Li, H., Gao, Y., Sun, Y., & Ma, G. (2014). New Insight into Amyloid Fibril Formation of Hen Egg White Lysozyme Using a Two-Step Temperature-Dependent FTIR Approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(33), 9834–9843. <https://doi.org/10.1021/jp504201k>
8. Riek, R., & Eisenberg, D. S. (2016). The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature*, 539(7628), 227–235. <https://doi.org/10.1038/nature20416>
9. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., &Westermark, P. (2016). Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*, 23(4), 209–213. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1257986>
10. Annamalai, K., Liberta, F., Vielberg, M.-T., Close, W., Lilie, H., Gührs, K.-H., ...Fändrich, M. (2017). Common Fibril Structures Imply Systemically Conserved Protein Misfolding Pathways In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(26), 7510–7514. <https://doi.org/10.1002/anie.201701761>
11. Yuan, S., Deng, Q., Fang, G., Wu, J., Li, W., & Wang, S. (2014). Protein imprinted ionic liquid polymer on the surface of multiwall carbon nanotubes with high binding capacity for lysozyme. *Journal of Chromatography B*, 960, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.021>
12. Gao, R., Zhang, L., Hao, Y., Cui, X., Liu, D., Zhang, M., & Tang, Y. (2015). Novel polydopamine imprinting layers coated magnetic carbon nanotubes for specific separation of lysozyme from egg white. *Talanta*, 144, 1125–1132. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.090>
13. Horn, D. W., Tracy, K., Easley, C. J., & Davis, V. A. (2012). Lysozyme Dispersed Single-Walled Carbon Nanotubes: Interaction and Activity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(18), 10341–10348. <https://doi.org/10.1021/jp300242a>
14. Vaitheeswaran, S., & Garcia, A. E. (2011). Protein stability at a carbon nanotube interface. *The Journal of Chemical Physics*, 134(12), 125101. <https://doi.org/10.1063/1.3558776>
15. Dovbeshko, G. I., Chegel, V. I., Gridina, N. Y., Repnytska, O. P., Shirshov, Y. M., Tryndiak, V. P., ... Solyanik, G. I. (2002). Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study. *Biopolymers*, 67(6), 470–486. <https://doi.org/10.1002/bip.10165>
16. Dovbeshko, G.I. (2009). *Molecular mechanisms of interaction of biological molecules with nanostructures, ligands and low doses of ionizing and microwave irradiation*. (Doctor of sciences dissertation, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv). (in Ukrainian). Available from Vernadsky National Library of Ukraine (DS117134)
17. Dovbeshko, G.I., Chegel, V.I., Gridina, N.Ya., Gnatyuk, O.P., Shirshov, Y.M., Tryndiak, V.P., and Todor, I.M. (2001). Surface enhanced infrared absorption of nucleic acids on gold substrate. *Semiconductor Physics Quantum Electronics and Optoelectronics*, 4(3), 202–206. <https://doi.org/10.1117/12.429717>
18. Dong A., Meyer J.D., Brown J.L., Manning M.C., Carpenter J. F. (2000) Comparative Fourier Transform Infrared and Circular Dichroism spectroscopic analysis of all-proteinase inhibitor and ovalbumin in aqueous solution. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 148-155. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2054>
19. Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., &Raussens, V. (2006). Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. *Biophysical Journal*, 90(8), 2946–2957. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072017>

20. Pérez, C., & Griebenow, K. (2000). Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the thermal denaturation of hen egg-white lysozyme dissolved in aqueous buffer and glycerol. *Biotechnology Letters*, 22(23), 1899–1905. <https://doi.org/10.1023/a:1005645810247>
21. Zandomenighi, G., Krebs, M. R. H., McCammon, M. G., & Fändrich, M. (2009). FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science*, 13(12), 3314–3321. <https://doi.org/10.1110/ps.041024904>
22. del Mercato, L. L., Pompa, P. P., Maruccio, G., Torre, A. D., Sabella, S., Tamburro, A. M., ... Rinaldi, R. (2007). Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 18019–18024. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702843104>
23. Waters, J. C. (2009). Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 185(7), 1135–1148. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903097>
24. Churchman, L. S., Okten, Z., Rock, R. S., Dawson, J. F., & Spudich, J. A. (2005). Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(5), 1419–1423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409487102>
25. Yildiz, A., & Selvin, P. R. (2005). Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy: Application to Molecular Motors. *Accounts of Chemical Research*, 38(7), 574–582. <https://doi.org/10.1021/ar040136s>
26. Huang, B., W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. (2008). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319, 810–813.
27. Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E., & Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods*, 5(2), 155–157. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1176>
28. Pawley J. B. (2006) Handbook of Biological Confocal Microscopy (3^d ed.). Springer, New York: Science+Business Media, LLC.
29. Kovalska, V., Chernii, S., Cherepanov, V., Losytskyy, M., Chernii, V., Varzatskii, O., ... Yarmoluk, S. (2017). The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme. *Journal of Molecular Recognition*, 30(8), e2622. <https://doi.org/10.1002/jmr.2622>

MODIFICATION OF ALKALOID STRUCTURE IN THE CONIUM DRUG WITH FULLERENES C₆₀

M.A. ZABOLOTNYI,¹ A.I. MOMOT,¹ G.I. DOVBESHKO,² E.P. GNATYUK,²
G.I. SOLYANYK,³ O.P. DMYTRENKO,¹ N.P. KULISH,¹ K.V. FEDINA⁴

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv

(64, Volodymyrs'ka Str., Kyiv 01033, Ukraine; e-mail: Zabolotny@univ.kiev.ua)

²Institute of Physics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine

(46, Nauka Ave., Kyiv 03680, Ukraine)

³R.E. Kavetskyi Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology

(45, Vasylkivska Str., Kyiv 03022, Ukraine)

⁴A.A. Bogomolets National Medical University

(13, Taras Shevchenko Blvd., Kyiv 01033, Ukraine)

PACS 33.15.Bh
©2012

The antineoplastic drug Conium, whose active components are piperidine alkaloids, and the possibility of a modification of its properties by fullerenes C₆₀ are studied. The IR spectra of the mixture of the drug Conium and a fullerene water solution are obtained. The spectral manifestation of the formation of a complex of fullerene with one of the alkaloids, namely γ -coniceine, is detected. The existence of the complex and its spectral characteristics are confirmed by quantum-chemical computations with a Gaussian program. Moreover, the IR spectra are calculated, and the conformations of γ -coniceine are studied.

1. Introduction

Despite a rapid development of molecular biology and chemistry, which ensure a quick implementation of *de novo* synthesized drugs, plants remain to be a traditional rich source of pharmacologically active substances. In particular, almost a half of modern pharmaceuticals used in medicine were obtained from plant extracts. The same is absolutely true for antitumoral drugs as well. The list of effective antitumoral phytochemical drugs includes vincristine, vinblastine, etoposide, teniposide, taxol, taxotere, topotecan, irinotecan, and others. The main biologically active agents of plants used in medicine for treating the malignant neoplasms are alkaloids, which manifest a pronounced cytostatic action upon tumor cells. Recently, large interest was attracted to groups of alkaloids known as neurotoxins such as, e.g., terpenoids and piperidines. Some of their representatives (aconitine alkaloids of *Aconitium napellus* and poison hemlock (*Conium maculatum*) alkaloids) demonstrate a high antitumoral activity [1–4].

The experience in the application of antitumoral chemotherapy demonstrated that its capabilities are restricted, and the efficiency is low, if it is used for the treatment of locally invasive and disseminated forms of malignant neoplasms. In this case, a reduced efficiency of cytostatic therapy is associated with a low selectivity of the antitumoral action and a high toxicity with respect to the normal and, as a rule, vital organs and tissues. In this connection, the creation of effective and low-toxicity antitumoral drugs is one of the most actual challenging problems in modern oncology. It should be emphasized that the modification of pharmacological properties of the already known antitumoral agents aimed at enhancing their efficiency and/or reducing their toxicity is considered as a promising direction in the development of effective antitumoral drugs. The corresponding modification of antitumoral drugs can be based on changes of the structure and the properties of active ingredient molecules owing to the formation of complexes with fullerenes [5]. It is known that fullerene C₆₀ molecules, due to their ability of inducing the charge transfer, are effective electron acceptors and are capable to essentially modify the structure of other molecules and form complexes with them. Therefore, this work is aimed at studying a possibility for Conium alkaloids to form a complex with fullerene C₆₀ and at determining the energy and conformational parameters of the adducts of Conium alkaloids.

2. Materials and Methods

The analysis of a capability for alkaloid molecules to form adducts with fullerenes C₆₀ was carried out, by

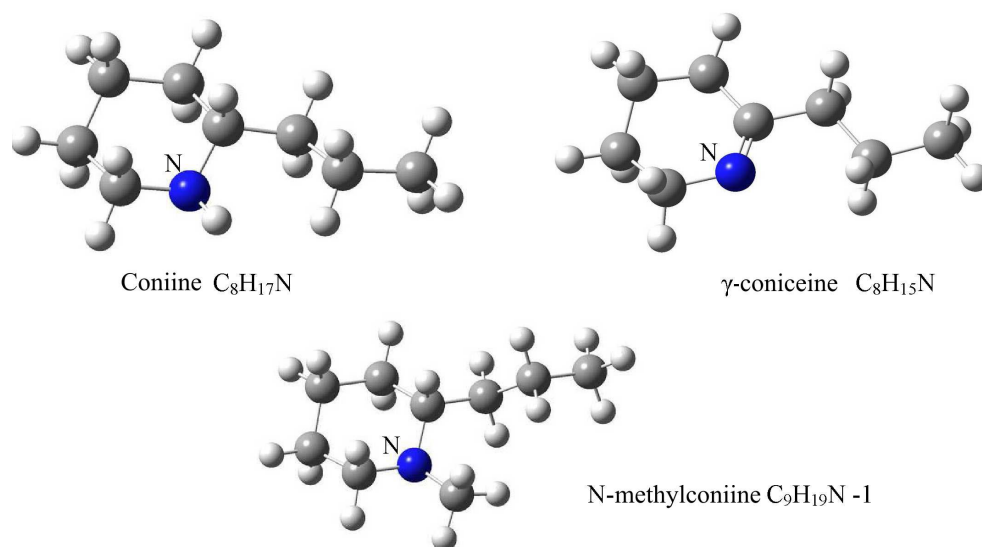


Fig. 1. Structural formulas of poison hemlock alkaloids

taking advantage of a numerical simulation and by analyzing the absorption spectra in the infra-red (IR) range. In the experimental researches, we used the Conium preparation (Conium maculatum D3, Weleda, Germany) and a 2% aqueous solution of fullerene C_{60} prepared at the Technical University (Ilmenau, Germany) [6]. The choice of Weleda's preparations was stimulated by the stability of their properties.

The mixtures of fullerene with Conium were prepared by mixing the initial substances in the following C_{60} -to-Conium ratios: 0.2 ml:0.05 ml, 0.2 ml:0.1 ml, and 0.2 ml:0.2 ml. Then the mixtures were stirred in an ultrasonic mixer for 30 min.

All the specimens for recording the IR spectra were fabricated in the form of KBr pellets. The IR spectra were registered on an IR Fourier spectrometer Bruker IFS 66 (Germany) in the transmission geometry. The determination error for the wavenumber was 0.2 cm^{-1} , the transmittance error was 0.1%. The registration and the processing of spectra were carried out with the use of the software program OPUS 5.5.

Raman spectra for C_{60} were registered on a spectrometer Horiba Jobin-Yvon T64000 (France), by using the excitation emission of an Ar-Kr laser Stabilite 2018-RM Spectra Physics 2.5W (USA) at a wavelength of 0.4888 \AA .

The numerical analysis was carried out with the help of the software programs Gaussian 03, in the framework of the density functional method, and using the Becke 3-parameter-Lee-Yang-Parr (B3LYP) hybrid functional with the basis set 6-31G(d).

3. Research Results and Their Discussion

It is known that poison hemlock (*Conium maculatum*) used for fabricating the Conium drug contains a number of alkaloids in its composition. Among those, the main alkaloids are coniine ($C_8H_{17}N$), N-methylconiine ($C_9H_{19}N$), γ -coniceine ($C_8H_{15}N$), conhydrine ($C_8H_{17}NO$), and pseudoconhydrine ($C_8H_{17}NO$) [7–10]. From the literature data, we also know about two conformational states of N-methylconiine. The calculations carried out for the dipole moment and the energy of alkaloid molecules in the ground states (Table 1) showed that three of six alkaloids (γ -coniceine, conhydrine, and pseudoconhydrine) have molecules with higher dipole moments, which may result in the formation of adducts with the participation of just those molecules. The structural formulas of main alkaloids that are contained in poison hemlock are depicted in Fig. 1.

Table 1. Dipole moments and ground-state energies of Conium alkaloids

Alkaloid	Dipole moment, (Debye)	Ground state energy, (Hartree units)
Coniine	0.82	-369.8483
N-methylconiine 1	0.44	-409.1525
N-methylconiine 2	0.46	-409.1523
γ -coniceine	1.77	-368.6375
Conhydrine	1.28	-445.0555
Pseudoconhydrine	2.37	-445.0576

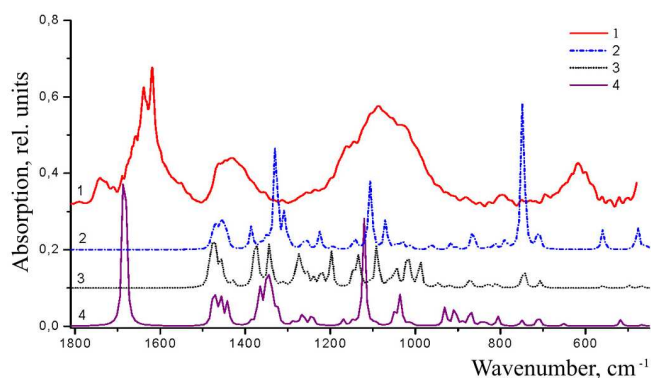


Fig. 2. Experimental IR spectrum for Conium drug (1) and calculated IR spectra for coniine (2), N-methylconiine (3), and γ -coniceine (4) molecules

The geometry of each alkaloid molecule was optimized, and the corresponding IR spectrum was calculated. A scaling factor of 0.9613 was used for the spectra.

In Fig. 2, the spectra of three alkaloids under consideration are exhibited. The bands in the high-frequency spectral range from 2800 to 3600 cm^{-1} are associated with stretching vibrations of N–H and C–H groups. In the range of 1800–400 cm^{-1} , one can observe deformation vibrations of C–N, C–H, and C–C bonds, stretching vibrations of double bonds C=C and C=N, and C–C–C skeletal vibrations. In the calculated spectrum of γ -coniceine, there is a band at 1684 cm^{-1} , which corresponds to ring vibrations in the corresponding molecule; the dominant contribution to those vibrations can be given by the C=N bond. In the spectra of other two alkaloids, no analogous band is observed.

The calculated alkaloid spectra qualitatively coincide with the experimental spectrum of IR absorption by Conium (curve 1 in Fig. 2). The presence of peaks in the experimental spectrum in the interval of about 1600–1800 cm^{-1} testifies to the presence of γ -coniceine in the Conium drug. The presence of coniceine can be determined from the Raman spectrum, since the calculations point to the presence of the 3369- cm^{-1} line associated with vibrations of the N–H bond.

Of particular interest is γ -coniceine. It is a unique alkaloid among those entering the Conium content, because it possesses a double bond connecting N and C atoms (Fig. 1). The presence of a double bond in γ -coniceine may testify that this alkaloid can form stable chemical complexes.

The numerical analysis executed with the help of the software program Gaussian showed that γ -coniceine has at least six stable conformations, the structural formulas of which are presented in Fig. 3. Conformations 1 to 4,

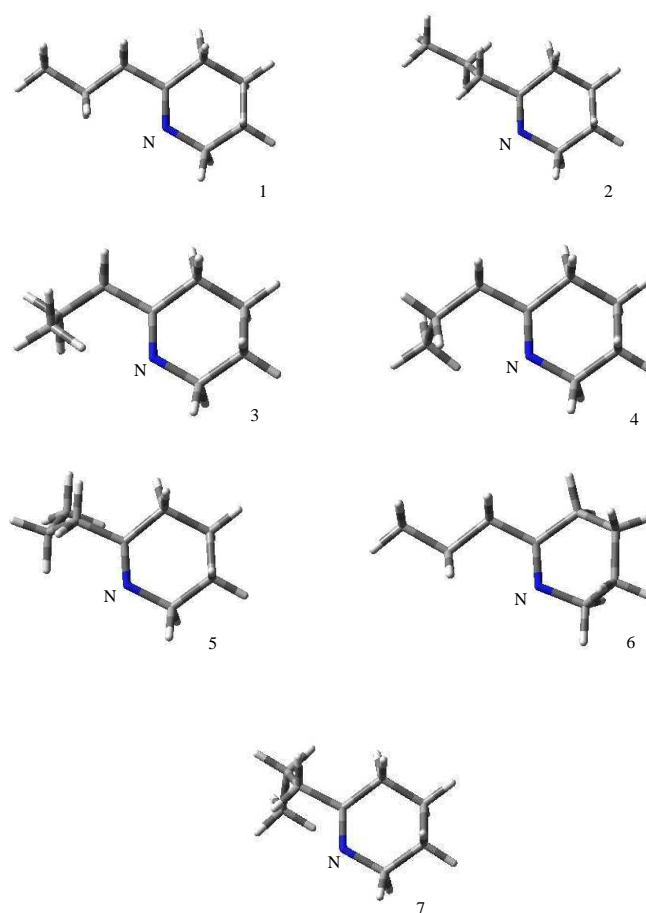


Fig. 3. Conformational forms of γ -coniceine molecule

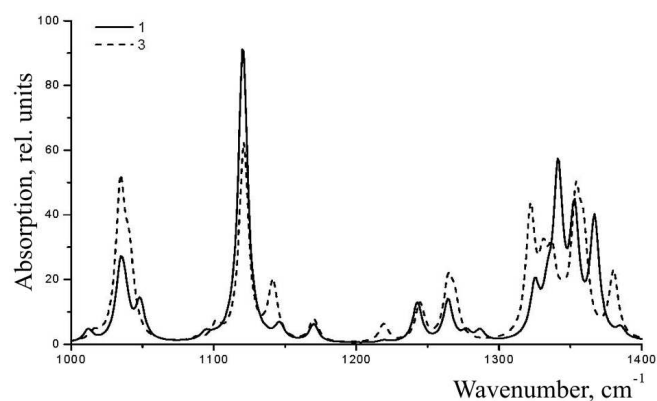
6, and 7 are stable (the frequencies of their vibrations are real-valued numbers), whereas conformation 5 is unstable (there is one imaginary vibration frequency) (see Table 2). The molecule in conformation 1 has the lowest energy in the ground state, $E_1 = -368.6375$ Hartree. Our calculations show that the structure with the lowest energy has the largest linear dimensions among all possible ones and the lowest dipole moment among stable states. Hence, γ -coniceine molecules in state 1 should dominate in the solution in the equilibrium case, which explains the particular interest in this alkaloid.

In Fig. 4, the infra-red spectra obtained for two conformers of γ -coniceine characterized by minimal energies are compared. One can see that the spectra are different in both the band positions and intensities.

In the experimental IR spectrum of fullerene solution, four narrow absorption bands are observed at 527, 576, 1182, and 1429 cm^{-1} , which confirms the nature of the initial specimen. In the IR spectrum, the bands stem from intramolecular vibrations of the four-fold degener-

Table 2. Parameters of a γ -coniceine molecule in various conformational states

State	$E - E_1$, eV	Number of imaginary frequencies	Dipole moment	Maximum linear size, Å	Position x_i of the peak corresponding to C=N vibrations in the IR spectrum, C=N, cm^{-1}	Peal position difference $x_i - x_1$, cm^{-1}
1	0	0	1.77	8.37	1684	0
2	0.034	0	1.78	8.30	1678	-5.28
3	0.022	0	1.84	7.55	1686	1.94
4	0.028	0	1.88	7.60	1685	1.16
5	0.134	1	1.92	8.25	1666	-18.01
6	0.053	0	1.79	7.25	1675	-8.37

Fig. 4. Comparison between IR spectra calculated for conformers 1 (solid curve) and 3 (dashed curve) of γ -coniceine. Conformer enumeration corresponds to that in Table 2

ate IR-active mode T_{1u} . The band at 576 cm^{-1} is less sensitive to the action of external factors. The mode at 1182 cm^{-1} characterizes the intermolecular distance, and a frequency of 1429 cm^{-1} is sensitive to the influence of a charge. The latter two modes belong to stretching vibrations, with the vibrations of single bond C-C being observed at about 1183 cm^{-1} , and those of the double bond C=C at about 1426 cm^{-1} . In addition, there are two bands of valence OH vibrations in the interval of $3500\text{--}3400 \text{ cm}^{-1}$, which correspond to stronger (at 3520 cm^{-1}) and weaker (at 3415 cm^{-1}) hydrogen bonds.

In the Raman spectra, vibrations typical of C_{60} are also observed (Fig. 5). In the Raman spectrum, the marker lines of fullerene at 1574 , 1466 , 1424 , 1250 , 1100 , 774 , 707 , 493 , and 270 cm^{-1} [11] are registered.

The experimental spectrum of Conium (Fig. 6) reveals three bands of stretching OH vibrations (at 3547 , 3469 , and 3417 cm^{-1}), a band in a vicinity of 3250 cm^{-1} related to NH vibrations, and two bands at 1639 and 1619 cm^{-1} corresponding to C=N valence vibrations. The experimental data agree with the results

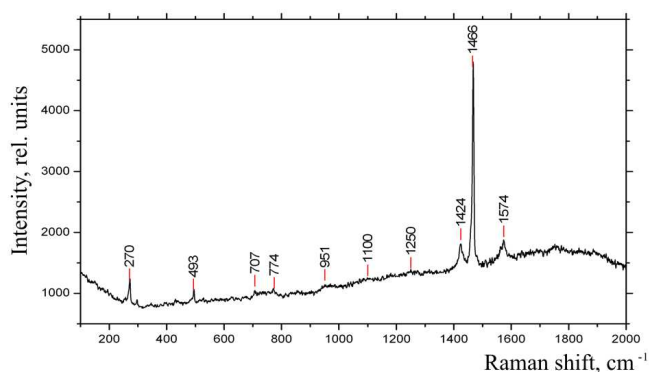


Fig. 5. Raman spectrum of fullerene deposited from an aqueous solution onto a gold substrate

of calculations obtained within quantum chemical methods.

After the complex of Conium with fullerene having been formed, a band at 1633 cm^{-1} appeared in the spectrum instead of two bands in the interval $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$. This fact may testify to the interaction between C_{60} and the drug and to the formation of a new bond, most likely in γ -coniceine. In the interval $3500\text{--}3400 \text{ cm}^{-1}$, only one maximum at 3435 cm^{-1} remains. In specimens with a smaller amount of fullerene, all those bands become somewhat weakened, but do exist. If the content of fullerene in the studied specimen increases – e.g., $0.05 \text{ ml Conium} + 0.2 \text{ ml C}_{60}$ – they disappear completely. The bands associated with fullerene do not almost change, although the complex demonstrates a certain shift of the fullerene bands toward high frequencies by about $0.5\text{--}1.2 \text{ cm}^{-1}$.

In Fig. 7, the concentration dependences of IR spectra for the complex Conium + fullerene C_{60} are depicted. The experimental data demonstrate that, if the Conium-to-fullerene content ratio is 1:1 (the lower curve), a spectrum typical of the pure Conium drug is observed, namely, a double band in the region of $1639\text{--}1619 \text{ cm}^{-1}$ and three vibrational states at 3549 , 3470 ,

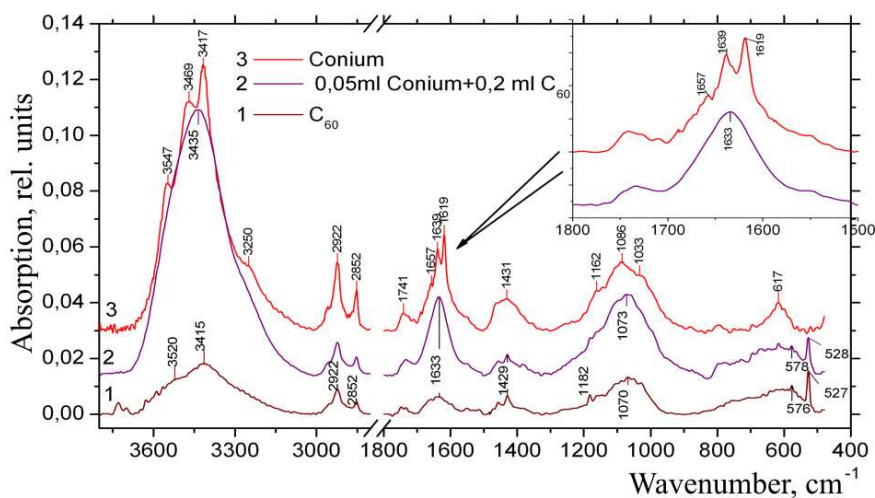


Fig. 6. IR Fourier spectra of Conium drug, fullerene, and a complex of Conium with fullerene

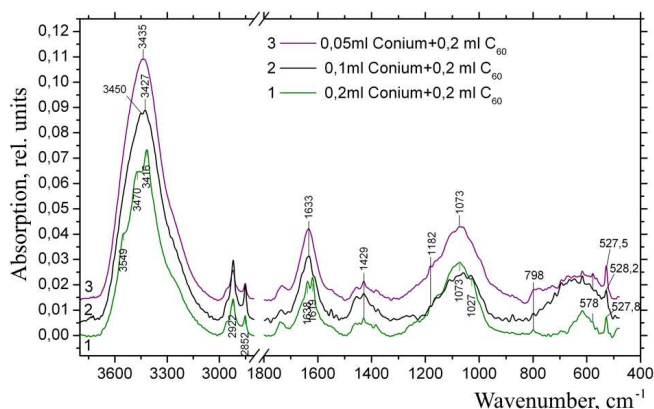


Fig. 7. IR spectra of the complex "fullerene + Conium drug" taken in various contents

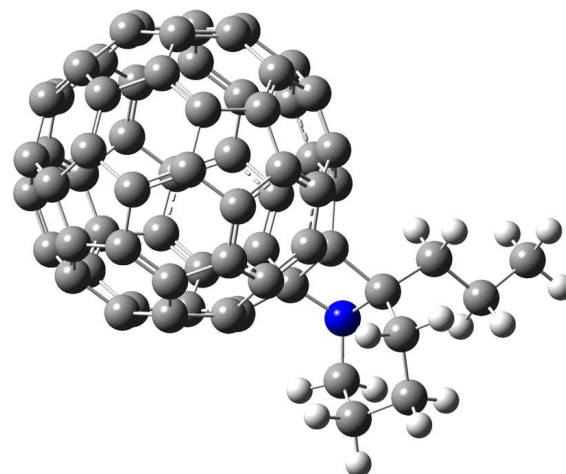


Fig. 8. Molecular complex "γ-coniceine + C₆₀"

and 3416 cm^{-1} in the region of hydrogen bonds. The fullerene marker bands at 1429, 1182, 578, and 528 cm^{-1} are also present. If the Conium content decreases and, respectively, the mass of fullerene grows (the middle and upper curves), the splitting disappears, and only one maximum remains in the interval around 3435 cm^{-1} and another one in the interval around 1633 cm^{-1} , with the fullerene bands becoming more intense and pronounced.

Our calculations showed that the formation of a stable complex consisting of one γ -coniceine and one fullerene C₆₀ molecules is possible, which is exhibited in Fig. 8. This figure illustrates a deformation-induced modification of γ -coniceine molecule with respect to conformation 1, which is the most favorable energetically (see Table 2), during the formation of the complex. The structure depicted in Fig. 8 was obtained by optimizing the

complex geometry in the framework of the Hartree–Fock method with the basis 3-21G. The stability of the determined structure is confirmed by the absence of the so-called imaginary frequencies in the calculated vibration spectrum. In Table 4, the data for the ground-state energy of the complex (taking the energy of zero-point oscillations into account) and the sum of the energies of a γ -coniceine molecule in conformational state 1 and a fullerene molecule are presented. These data allowed the binding energy of the complex to be determined.

It is known that the Hartree–Fock method does not take the energy of electron correlation into account. Therefore, the energy was calculated using the same density functional method (B3LYP) in the basis 6-31G(d). As is seen from Table 4, the binding energy calculated

Table 3. Frequencies in the IR spectrum and vibration relationships for C₆₀, Conium, and complex “C₆₀ + Conium”

Conium	C ₆₉	0.2Conium +0.2C ₆₀	0.1Conium +0.2C ₆₀	0.05Conium +0.2C ₆₀	Vibration relationship
3547	3520	3549	3450		OH stretching hydrogen-bonded
3469		3470	3427	3435	OH stretching hydrogen-bonded
3417	3415	3416			OH stretching hydrogen-bonded
3250					OH stretching hydrogen-bonded
2922	2922	2922	2922	2922	CH asymmetric stretching
2852	2852	2852	2852	2852	CH symmetric stretching
1741	1748				C=O
	1733	1738	1735	1733	C=O
1639	1633	1638	1633	1633	C=N, C=C, N-H
1619		1619			C=N, C=C, N-H
1431	1429	1429	1429	1429	C ₆₀ marker band
1162	1182	1181	1182	1181	C ₆₀ marker band
1086		1073	1060	1073	C-C, C-O
1033		1027	1032		C-C, C-O
	798	798	798	798	C-C-C
617					
	576	578	578	578	C ₆₀ marker band
	527	527.8	528.2	527.8	C ₆₀ marker band

Table 4. Parameters of complex “ γ -coniceine + C₆₀”

Optimization and vibration calculation method	Ground state energy calculation method	Ground state energy, Hartree				Binding energy	
		Fullerene C ₆₀	γ -coniceine	Total C ₆₀ + γ -con.	Complex C ₆₀ + γ -con.	Hartree	eV
Hartree-Fock 3-1G	Hartree-Fock 3-21G	-2258.6720	-363.8687	-2622.5407	-2622.5412	0.00059	0.0160682
Hartree-Fock 3-21G	Density functional 6-31G(d)	-2285.7585	-368.4131	-2654.1716	-2654.1711	-0.00046	-0.012614
Density functional 6-31G(d)	Density functional 6-31 G(d)	-2285.7990	-368.4172	-2654.2162	-2654.1954	-0.02083	-0.566923

by different techniques has different signs. Therefore, in order to specify data, the optimization of a complex geometry and the calculation of the corresponding frequencies were carried out in the framework of the density functional method (B3LYP) in the basis 6-31G(d). This more exact calculation confirmed the stability of the complex. At the same time, it was found that, for the complex to be formed, an energy barrier has to be overcome.

One can see from Fig. 9 that the calculated spectrum of the complex γ -coniceine + fullerene C₆₀ contains marker bands of fullerene subjected to a definite low-frequency shift in comparison with the experimental fullerene spectrum (Fig. 6, curve 1). In the calculated infra-red spectrum of the complex, there is no band at 1684 cm⁻¹, which is characteristic of γ -coniceine and produced by vibrations of the C=N double bond. This circumstance is evidently associated with the hybridiza-

tion of the state connected with ring vibrations in C₆₀ of coniceine, when the complex is formed.

Hence, we demonstrated a capability of modifying the conformational parameters of Conium alkaloids with the use of fullerene C₆₀. Such a modification of the conformational characteristics of Conium alkaloids can substantially affect the pharmacological properties of the drug, so that additional researches in this direction are needed.

4. Conclusions

1. The structural forms of alkaloids entering the Conium content-coniine, N-methylconiine, γ -coniceine, conhydrine, and pseudoconhydrine have been determined, and the dipole moments and ground-state energies of corresponding molecules have been calculated. The conformations of alkaloid molecules with minimum energy

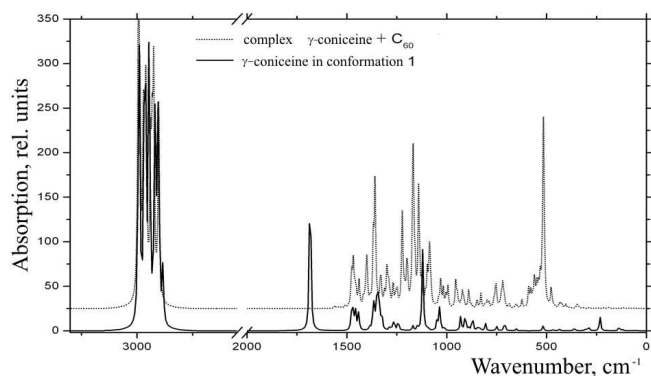


Fig. 9. Calculated IR spectra for γ -coniceine in conformation 1 (solid curve) and the complex " γ -coniceine + C_{60} " (dotted curve)

were found to have the largest linear dimensions and the lowest (for stable states) dipole moments.

2. The spatial structure and the energy parameters of stable and unstable conformations of a γ -coniceine molecule have been determined. The IR absorption spectra for two molecular conformations of γ -coniceine with the lowest energies have been calculated. It is shown that the absorption in the interval around 1684 cm^{-1} , which is connected with vibrational modes of $C=N$ molecular groups is inherent to only one conformation.

3. Our experimental data confirm that the features in the vibrational modes of the Conium drug are also associated with the presence of $C=N$ groups and are located in the region of $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$.

4. A possibility for γ -coniceine and fullerene C_{60} to form a complex has been demonstrated.

1. M. Kondoh, I. Suzuki, F. Nagashima, S. Simizu, M. Harada, M. Fujii, H. Osada, Y. Asakawa, and Y. Watanabe, *J. Pharm. Exper. Therapy* **311**, 115 (2004).
2. G.I. Solyanyk, O.G. Fedorchuk, O.M. Pyaskovska, O.Y. Dasyukevych, G.V. Gorbyk, and D.L. Kolesnyk, Patent 48524 Ukraine, MPK A 61 K 35/76, A 61 P 35/04. No. 2009 08954; appl. 28.08.2009; publ. 25.03.2010, Bull. N 6.
3. O.N. Pyaskovskaya, Yu.V. Yanish, D.L. Kolesnik, O.I. Dasyukevich, V.A. Shlyakhovenko, and G.I. Solyanyk, *Biofiz. Visn.* **21**, No. 2, 35 (2008).

4. N.N. Aleutskii, N.A. Nazarenko, E.V. Rekhacheva, N.V. Solovyova, E.V. Karpova, Patent 4042544/14 Russia, publ. 20.09.1996.
5. M.A. Zabolotnyi, N.V. Bashmakova, Yu.M. Barabash, G.I. Dovbeshko, L.N. Kirkilevskaya, E.P. Gnatyuk, O.P. Dmitrenko, M.P. Kulish, and A.I. Momot, in *Abstracts of the 2nd International Scientific Conference "Nanostructure materials-2010: Belarus-Russia-Ukraine"* (Kyiv, 2010), p. 677 (in Russian).
6. S. Thakral and R.M. Mehta, *Indian J. Pharm. Sci.* **68**, 13 (2006).
7. A.K. Sirotkin, L.B. Piotrovskii, L.N. Poznyakova, and O.I. Kiselev, *Vopr. Biol. Med. Farmats. Khim.* No. 3, 21 (2005).
8. A.P. Orekhov, *Chemistry of Alkaloids* (Khimiya, Moscow, 1995) (in Russian).
9. F.D. Galey, D.M. Holstege, and E.G. Fisher, *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**, 60 (1992).
10. S.T. Lee, B.T. Green, K.D. Welch, J.A. Pfister, and K.E. Panter, *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 2061 (2008).
11. G.V. Andrievsky, V.K. Klochkov, A.B. Bordyuh, and G.I. Dovbeshko, *Chem. Phys. Lett.* **364**, 8 (2002).

Received 06.10.11.

Translated from Russian by O.I. Voitenko

МОДИФІКАЦІЯ СТРУКТУРИ АЛКАЛОЇДІВ ПРЕПАРАТУ CONIUM ФУЛЕРЕНАМИ C_{60}

М.А. Заболотний, А.І. Момот, Г.І. Довбешко, О.П. Гнатюк, Г.І. Соляник, О.П. Дмитренко, М.П. Куліш, К.В. Федіна

Резюме

Проведено дослідження протицуклинного препарату Conium, активними компонентами якого є алкалоїди пиперидинової групи, і можливості модифікації його властивостей за допомогою фулеренів C_{60} . Виконано вимірювання спектрів ІЧ поглинання суміші препарату Conium і водного розчину фулеренів. Виявлені спектральні особливості утворення комплексу фулерену з одним з алкалоїдів, а саме γ -коніціїном. Існування такого комплексу і його спектральні характеристики підтверджуються квантово-хімічними обчисленнями, виконаними за допомогою програми Gaussian. Крім того, обчислено ІЧ-спектри алкалоїдів і досліджено конформації γ -коніціїну.

PACS 87.45.M-, 87.64.kv, 87.64.M-

Surface enhanced imaging and IR spectroscopy of the biological cells on the nanostructured gold film

G.I. Dovbeshko¹, O.P. Gnatyuk¹, S.O. Karakhim², T.P. Doroshenko³, V.R. Romanyuk³

¹*Institute of Physics, NAS of Ukraine,
46, prospect Nauky, 03680 Kyiv, Ukraine,
Phone: +38 (044) 525-98-51, fax: +38 (044)525-15-89,
e-mail: gd@iop.kiev.ua*

²*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine,
9, Leontovycha str., 01601 Kyiv, Ukraine*

³*V. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics, NAS of Ukraine,
41, prospect Nauky, 03680 Kyiv, Ukraine*

Abstract. New approach for optical imaging, structural study and cell cultivation based on the effect of the enhancement of optical signals from biomolecules and biological cells near nanostructured rough gold surface is proposed. The surface enhanced IR absorption (SEIRA) spectroscopy and confocal microscopy experiments were made using the culture of SPEV (porcine embryonic kidney epithelium transplantable line) and fibroblast cells, cultivated and/or adsorbed on the gold substrate. The SEIRA spectra registered from monolayer of the SPEV cells cultivated on the rough gold showed a low frequency shift of about 2 to 7 cm^{-1} for the most characteristic IR vibrations, compared with those adsorbed from suspension on the same substrate. An enhancement factor of 15...30 was obtained for different molecular vibrations. The confocal microscopy contrast images of the SPEV cells on rough gold substrate were obtained in laser fluorescence mode. This approach opens new possibilities for visualization of the living cells *in vivo* without staining. The fluorescence of the rough gold surfaces and effects responsible for our findings have been discussed.

Keywords: SPEV cells, nanostructured rough gold substrate, SEIRA spectroscopy, laser scanning confocal microscopy, fluorescence imaging.

Manuscript received 16.11.16; revised version received 19.04.17; accepted for publication 14.06.17; published online 18.07.17.

1. Introduction

Contrast imaging of biological molecules and cells is of great importance for medical and biological analysis. However, optical transparency and weak fluorescence of biological objects restricts microscopic imaging. Therefore, various markers such as dyes, quantum dots, nanoparticles are used for improvement of cell visualization. For example, a dye molecules of green fluorescent protein (GNP) are used to mark a cytoskeleton, molecules of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – to stain a nuclei in the cell. At the same time, development of the free-label method is attractive for non-destructive cell analysis and has grown recently.

IR spectroscopy methods, with their increased sensitivity (*i.e.*, signal-to-noise ratio), are essential for

structural studies of biological objects. It is known that optical signals from the molecules adsorbed on the nanostructured metal substrate or colloidal metal nanoparticles can be enhanced by 10 to 10³ times for infra-red (IR) absorption [1, 2], by ~10³ for luminescence, and by ~10⁶ for Raman scattering (RS). Earlier, we have reported an enhancement of IR signals for Amid I band from albumin for a near monomolecular layer by more than 100 times [3] as well as essential enhancement in our SEIRA study of phospholipids [4]. These data are in accordance with other publications on SEIRA effect [5-8]. We have got an enhancement factor of about 10⁵ in SERS spectra of poly-A molecules adsorbed on carbon nanotubes and deposited on commercially available SERS substrate [9]. So, if it is possible to obtain the signal from different cellular

components enhanced by rough gold surface, we would expect to obtain an enhanced IR absorption signal, *i.e.* SEIRA spectra, from the whole cells deposited on the rough metal surface.

The second point is related with a new approach to optical microscopy visualization of the cells deposited on the same gold substrates, which was applied for SEIRA spectroscopy. Laser scanning confocal microscopy (LSCM) was chosen as one of the modern and widely-used instrument for imaging of biological structures and processes in different branches of medicine, biology and bionanotechnology. Confocal imaging is related to fluorescent methods. The objects under study should possess proper luminescence or should be stained with fluorescent probes and be transparent for light penetration to a certain depth. Fluorescent confocal microscopy was proved to be a powerful tool to study alive and fixed cells, thin cuts of plant and animal tissues and even small organisms. It is especially important for studying the alive cells to have a possibility to provide imaging with high spatial and time resolutions. It enables to clear up the most complicated organization of the whole organism at molecular, cellular and tissue levels.

However, an application of fluorescent probes for studying the cell structure has a number of disadvantages. First, this is cytotoxicity in the case of alive cells, non-selectivity of the probes to sub-cell components, as well as insufficient specificity and overlapping of fluorescence spectra from different probes. Therefore, an actual task is a search for imaging possibilities for cells with confocal microscopy methods without application of fluorescent probes.

Here, we discuss a strategy complying SEIRA spectroscopy together with confocal microscopy to study living cells and analyze monostructured gold film for visualization of free labeling cells. The proposed new approach for structural study and visualization of cells is based on the effect of the enhancement of optical signals from molecules and cells deposited on a nanostructured gold substrate.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparations

SPEV (porcine embryonic kidney epithelium transplantable line) cells for our experiments were cultured in plastic flasks in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Sigma) medium with 5% fetal calf serum FCS (v/v) (HyClone), kanamycin (100 µg/ml), amphotericin B (5 µg/ml) according to [10]. A total number of the grown cells was calculated using the conventional method in Goryaev chamber [11]. Sown concentration was equal to 5×10^4 cells/cm². The cells were grown in Sanyo incubator at the temperature +37 °C in humid atmosphere with 5% CO₂. Grown solution was replaced every 2 days. Cells were passaged

at ~80% confluence. The cultivated SPEV cells were transferred into suspension and placed on a cover glass or Au-precoated glass substrate. The samples were returned to the incubator for 24...48 h to ensure adequate adhesion. Prior to physical experiments, the culture medium was removed. For confocal microscopy and FTIR experiments, the SPEV cells were cultured on a gold substrate placed in sterile Petri dishes in incubator for 24...48 hours. All the cell samples were washed triple in Hanks solution placed in a waterproof glass camera and dried for 1 hour at 0.5 atm under evacuation by using the Millipore XF 5423050 vacuum pump.

As a substrate, we used a gold (Au) thin (20...35 nm) films fabricated by vacuum thermal deposition of pure (0.99999) Au onto glass substrates (TF-1 glass, 20×20 mm) preliminary covered with the intermediate 5 nm adhesive Cr layer [8]. Before Au deposition, glass surface was cleaned with NH₄OH:H₂O₂:H₂O and HCl:H₂O₂:H₂O (1:2:2 by v/v) solutions, subsequently, for 5 min at the boiling temperature. Then it was rinsed in bidistilled water and dried in a flow of pure nitrogen.

The morphology of the gold surface has been studied with a Nanoscope IIIa (Digital Instrument) atomic force microscope (AFM) in a tapping mode. Tapping force mode scans were performed using commercially available AFM silicon nitride tips. The scanning frequency was approximately 1 Hz in all experiments. Statistical analysis was made with conventional statistics program.

Reflectance and transmittance spectra of initial gold thin films were measured in the spectral range $\lambda = 380...1100$ nm with DMR-4 monochromator and variable-angle of incidence reflectance attachment in *p*-polarized light. Device is equipped with silicone photodiode photodetector and incandescent bulb lamp as wide-band continuous spectra light source.

Confocal imaging was carried out with a Carl Zeiss LSM-510 META confocal laser scanning microscope with the Plan-Achromat 63×/1.4 Oil DIC oil immersion objective in Multi Track mode. The confocal microscope optical scheme is presented in Fig.1. A halogen incandescent lamp was used for observing objects in the transmittance mode in visible light. A fluorescence images of the objects were obtained by excitation with ultraviolet mercury lamp HBO-100 or with diode laser ($\lambda = 405$ nm, 25 mW), Ar or ArKr laser ($\lambda = 488$ nm, 30 mW) and HeNe laser ($\lambda = 633$ nm, 5 mW) in backscattering geometry. The fluorescent light was filtered with a band pass BP 420-480 nm or long pass LP420 nm, BP 505-530 nm or LP 505 nm and LP 650 nm filters, respectively. LSM-510 META was equipped with a 32-channels Metadetector (polychromatic detector) and registration system AxioCam. The scanning speed depends on the resolution and for LCM 510 microscope at 512×512 resolution, it makes up about 1/5 seconds on a layer [12]. Magnification in the experiments was 63× and 10×. The most important

optical advantage of confocal microscopy is that the radiated photons are focused by the objective lens on a small (~50 μm) detector pinhole (2 in Fig. 1), which limits the depth of focus. Optical thickness d of slices depends on the wavelength (λ), objective lens numerical aperture (N.A.), refractive index (n), pinhole diameter (P) and roughly $d \sim P n \lambda / (\text{N.A.})^2$. In this work, the optical slice thickness was about 0.8 μm.

For SEIRA experiments, the samples with the cells deposited on the rough surface of Au were dried liophilically. All the samples were kept in closed tight boxes with P₂O₅ water adsorbent. The spectra were collected in the 400...7000 cm⁻¹ region with an IFS-66 Bruker instrument with resolution of 0.5 cm⁻¹ and wavenumber definition accuracy of not less than 0.01 cm⁻¹. Repeatability of the frequency in our SEIRA spectra was 0.5 cm⁻¹ and that for the absorbance – about 0.0005.

IR spectra from molecular vibrations of cell components (proteins, nucleic acids, lipids) deposited on gold rough surfaces were measured in external reflection configuration at light incidence angle 16.5°, as described in [1-3].

Deconvolution and decomposition of the spectral bands were performed with Opus-5.5 software program. The peak positions of the absorption bands were estimated by using the second derivative method and/or the standard method. All the spectra were baseline-corrected and normalized by the peak intensity of O–H stretching vibration band centred near 3300 cm⁻¹. Estimation of the SEIRA enhancement factor was carried out as in [2].

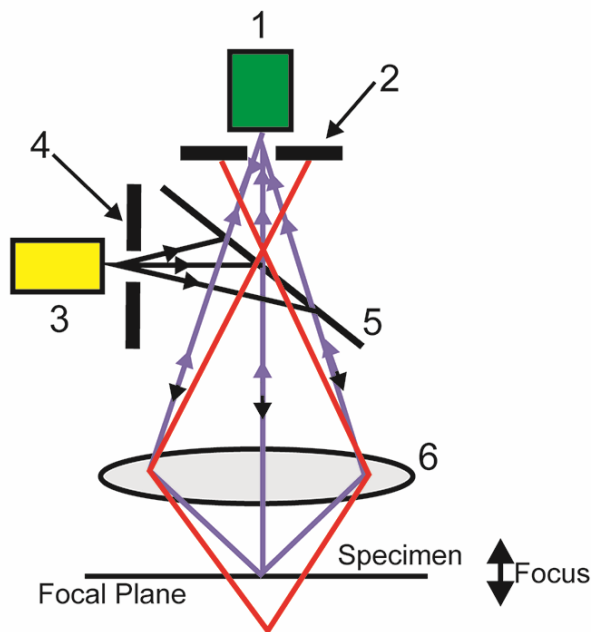


Fig. 1. Scheme of confocal microscopy: photodetector (1), detector pinhole (2), laser or light source (3), source pinhole (4), beamsplitter (5), objective lens (6).

3. Physical basis of the effect of enhancement of optical processes

3.1. SEIRA

For the first time, an enhancement of IR signal from molecules chemisorbed on Au and Ag surface by the factor up to 10³ has been registered by Harstein and colleagues in 1980 [13]. Only at the beginning of the 90-th years, scientists came back to study of the enhanced IR effects, mainly due to very low limit of the molecules that could be detected by IR spectroscopy and its some advantages (non-destructivity, higher signal-noise ratio, less distorted spectra) in comparison with SERS. In 1991, the effect was named as SEIRA by Osawa and Ikeda [14]. The effect cannot be explained in a simple way, it includes several mechanisms, namely: 1) local increase of electromagnetic field near the rough metal surface or metal film due to excitation of surface plasmons, 2) increase of dipole transition moment of adsorbed molecules [15, 16].

The conditions for surface plasmon excitation at the interface between two media (1 – environment, 2 – plasmon-carrying media) are as follows:

$$\begin{aligned} \varepsilon'_2(\lambda) < -\varepsilon'_1(\lambda), \\ |\varepsilon'_2(\lambda)/\varepsilon''_2(\lambda)|^2 \gg 1, \end{aligned} \quad (1)$$

where ε' and ε'' are real and imaginary parts of dielectric permittivity, λ is the wavelength.

When incident light promotes excitation of molecules or cells adsorbed on a gold substrate, the probability of optical process near metal surface is increased due to enhancement of local electric field and density of photon states. Naturally, this effect depends on morphology of gold surface, sizes of roughness and film thickness [17-20].

3.2. Metal-enhanced fluorescence

Earlier [21, 22], it was shown that the intrinsic emission from DNA can be enhanced manifold by silver island film substrate. The time-resolved measurements have shown a decreased lifetime for the intrinsic DNA emission near the silver islands. These results of increased intensity and decreased lifetime indicate a metal-induced increase in the radiative rate decay of the DNA. As in the case of SEIRA spectroscopy, the main mechanism driving the enhanced photoluminescence (PL) of the molecule near metal surface is related with the enhanced density of photon states near metal surface and changes in probability of PL process (Fig. 2). In this figure, E and E_m – electric fields for transition from the ground state to the excited one without metal and with metal, respectively, Γ – intrinsic radiative rate (without metal), Γ_m – radiative rate with metal, k_{nr} and k_m – rate of non-radiative process without metal and with metal, respectively.

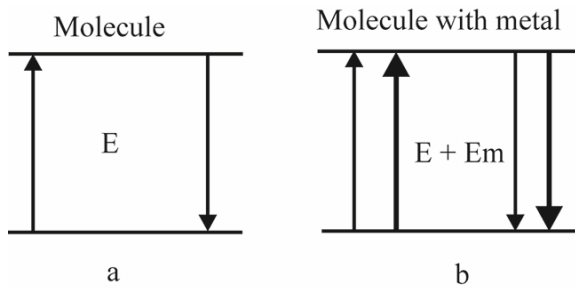


Fig. 2. Schematic energy diagram of fluorescence inherent to a free molecule (a) and the molecule on metal surface (b).

The situation with enhanced PL is more complicated in comparison with SEIRA spectroscopy due to competition between different radiative decay channels strongly influencing the PL intensity. So, in some cases for the molecules near metal surface the PL intensity would decrease [21-23]. Thus, the quantum yield, Q_0 , of a fluorophore shows a competition between radiative decay and nonradiative processes (k_q is the rate constant of quenching):

$$Q_0 = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr} + k_q}. \quad (2)$$

The fluorescence lifetime, or decay time, is the average time for an ensemble of fluorescent molecules to remain in the state:

$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma + k_{nr} + k_q}. \quad (3)$$

When fluorophores are placed at suitable distances from metallic surface, fluorophores could undergo modifications of their radiative decay rates, where an increase in Γ_m results in an increase in PL intensity, Q_m , and reduction in lifetime τ_m , which is converse to the free-space condition. If the fluorophore quantum yield and lifetime near metal surface are expressed by the following formula

$$Q_m = \frac{\Gamma_m}{\Gamma_m + k_{nr} + k_q}, \quad (4)$$

$$\tau_m = \frac{1}{\Gamma_m + k_{nr} + k_q}. \quad (5)$$

One can get an increase of quantum yield, when the lifetime decreases. It could be explained by strong coupling between electromagnetic field oscillation on metal surface and fluorophore dipole. In the case of metal, the increase of Q_m caused by decrease of the lifetime τ_m is different in comparison with that of conventional fluorescence without fluorophore. In the latter case, Q increase is due to non-radiative k_n decay rate decrease (Fig. 3).

Therefore, near the metal surface the conditions for redistribution of channels governing by fluorescence occur. The theoretical basis and experimental evidence for PL enhancement by metal surface do exist and can manifest themselves in a number of cases.

4. Results and discussion

4.1. Gold substrate for enhanced infrared spectra and luminescent imaging

Morphology of the semitransparent gold film surface is presented in Fig. 4a. The surface relief of the Au substrates was found with AFM to have a *rms* roughness of 2...5 nm. Transmittance (T), reflectance (R) and absorption (Abs = 1-R-T) spectra (Fig. 4b) of films used indicate that films are continuous, with optical parameters close to bulk gold. The increase of absorption at $\lambda < 500$ nm is caused by intraband absorption in the gold [24]. Absorption from local plasmons (radiative modes, typically observed in the Drude region $\lambda > 500$ nm) with isolated gold nanoparticles is not monitored. Thus, the enhancement of electromagnetic field near the metal surface can be invoked by surface roughness mainly [25].

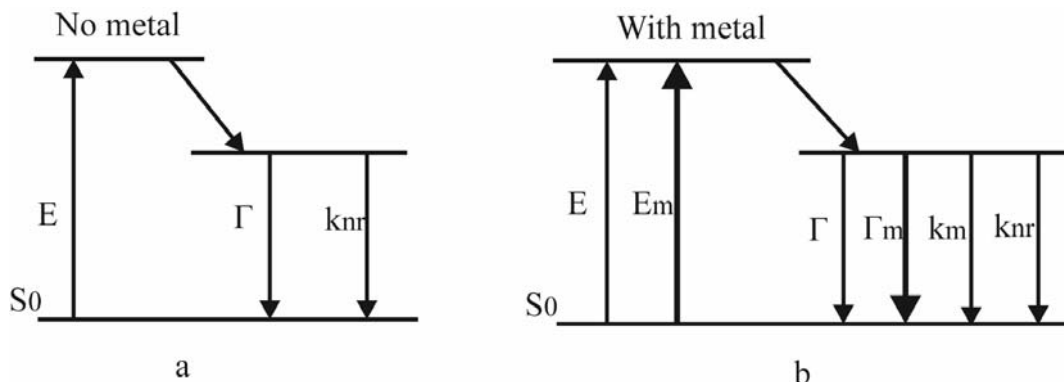


Fig. 3. Classical Jablonski diagram for PL of the molecule in free space (a) and its modified form in the presence of metallic surface (b): E – incident photon, E_m – concentrated by metal incident field, Γ – radiative or emission decay rate, Γ_m – radiative decay rate in the presence of metal, k_{nr} and k_m – nonradiative decay rate represents all the other rate processes returning the molecule to the ground state without emission, without and with metal, accordingly.

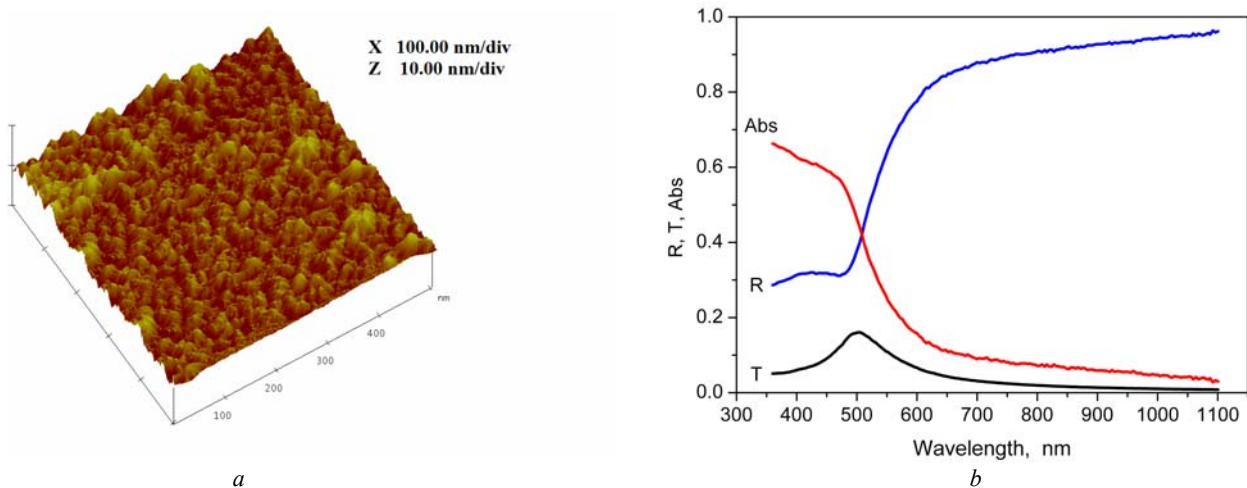


Fig. 4. AFM image of surface relief (a) and reflectance, transmittance and absorbance spectra for 43 nm gold film on the glass substrate (b).

4.2. SEIRA experiments on SPEV cells

SEIRA spectra of SPEV cells deposited on the gold substrate from suspension and after single or double washing with aqueous solution are presented in Fig. 5a. In the process of cells deposition from the suspension on the gold substrate, the cells did not cover the substrate as a monolayer, but usually they form a thick layer. The SEIRA spectrum from the thick layer (Fig. 5a, curve 1) indicates the low intensity and pure band resolution due to excessive IR absorption for separated bands. The higher quality spectra of the cells were registered after washing (Fig. 5a, curve 2). After washing, the cells are arranged separately in a monolayer manner, at some distance from each other, which was confirmed by confocal microscopy (see Figs. 6, 7 and 8). Note, that with SEIRA spectroscopy we have registered signal from about 100 cells.

From Fig. 5b one can see differences in the spectra of the cells cultivated directly on the gold surface and

transferred to the gold substrate from suspension. The main spectral changes in SEIRA spectra of these samples were observed in the regions of NH, OH, CH₂-CH₃ stretching vibration bands, Amid I and Amid II bands, as well as in the 900...1300 cm⁻¹ region. For the SPEV cells cultivated on the gold substrate, we have registered a shift of different bands by 4...7 cm⁻¹ to low frequencies, except for phosphate asymmetrical stretching band. Specifically, CH stretching vibration bands were shifted by 4 cm⁻¹, Amid I – by 6 cm⁻¹, Amid II – by 4 cm⁻¹. In addition, in the spectra of SPEV cells cultivated on the gold substrate the relative intensity of Amid I and Amid II bands increases comparing with those of SPEV cells deposited on gold substrate. However, no change in the intensity or frequency of Amid A band near 3292 cm⁻¹ was observed. The observed shifts of the bands position in the spectra of SPEV cultivated on the gold substrate in comparison with those of the cells grown on the glass substrate could be explained by more strong interaction

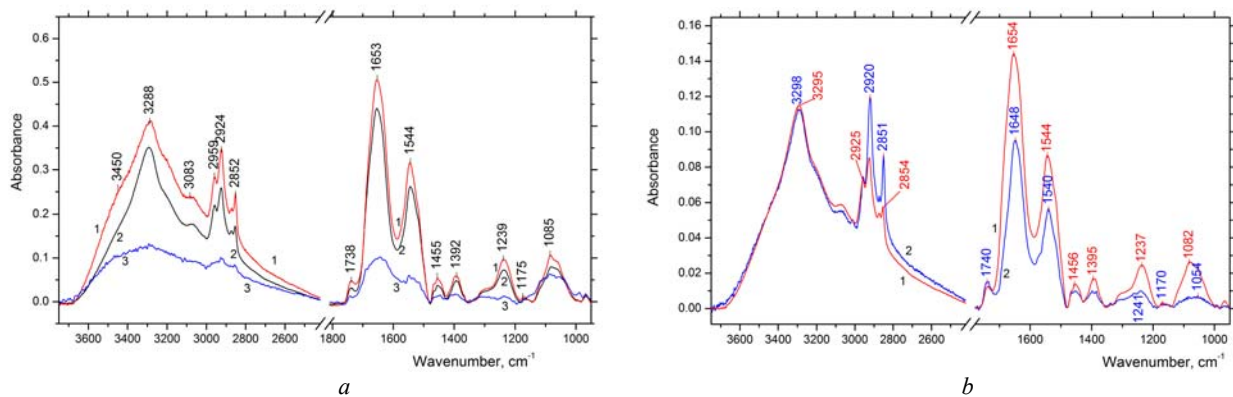


Fig. 5. a) SEIRA spectra of SPEV cells adsorbed from suspension on gold substrate just after deposition (3) and after single (2) or double (1) washing. b) SEIRA spectra of SPEV cells transferred to the gold substrate from suspension (1) and cultivated directly on the gold surface (2).

between the cells and the gold substrate. Note that in any case the shifts of the IR bands position of the cellular components, DNA and proteins deposited on the gold substrate in comparison with those on the neutral substrate as CaF₂ in our earlier papers [1-4, 8, 9] are in accordance with the present results.

For the SPEV cells deposited from suspension, the conformation analysis of protein bands showed the preferable presence of α -helix (1653...1654 cm⁻¹), and that for asymmetrical phosphates showed DNA presence in A-form (1237...1241 cm⁻¹). Thus, we have got an enhancement of IR absorption of SPEV cells deposited on the rough gold substrate (by about 15...30 times) for different vibrations and obtained high-quality spectra with good resolution.

4.3. Confocal microscopy

Fig. 6a demonstrates fluorescent images of the initial rough gold substrate at all excitation wavelengths used, namely, with the blue (405 nm), green (488 nm) and red (633 nm) laser lines. Observed fluorescence is in agreement with previous data of Boyd *et al.*[26], where the authors reported a fluorescence of a gold film with rough surface with characteristic peaks near 2.0 eV (0.62 μ m) and 2.8 eV (0.44 μ m) excited by light source with 3.50 eV (0.35 μ m) or 4.67 eV (0.27 μ m). They arise from intra- and inter-band transitions of gold as well connected with recombination of holes and electrons [26]. This fluorescence can be enhanced by local electromagnetic field of plasmons excited at the gold rough surface [27, 28]. Thus, gold substrate is a source of both proper fluorescence and enhanced local electromagnetic field that can effect on optical process near metal surface [19,20]. Fig. 6b demonstrates that a gold-free area of glass substrate (black area down) and scratches on the gold surface do not show any fluorescence at excitation conditions specified. Clear glass looks like black spot under laser excitation in the confocal microscope contrary to the gold substrate that looks like bright spot and gives pronounced fluorescence.

Fig. 7 shows a good-quality confocal microscopy luminescent image of the SPEV cells cultivated on gold substrate excited using UV lamp (365 nm) and registered via FSet 01 filter. Different sub-cellular structures are clearly seen.

The SPEV and fibroblast cells cultivated or deposited on the gold substrate have a weak proper fluorescence under UV-lamp excitation (Fig. 8), which is a traditional image for confocal microscopy. Nevertheless, under excitation with UV radiation, a membrane and intracellular structures visualization can be achieved, when gold-covered substrate is used. The fluorescence from membrane structures is shifted to the long-wave region in comparison with intracellular components, and it simplifies the procedure of visualization. So, if the

cells have no proper luminescence, one could register an image of the cells as a shadow from the cells due to fluorescence from the gold.

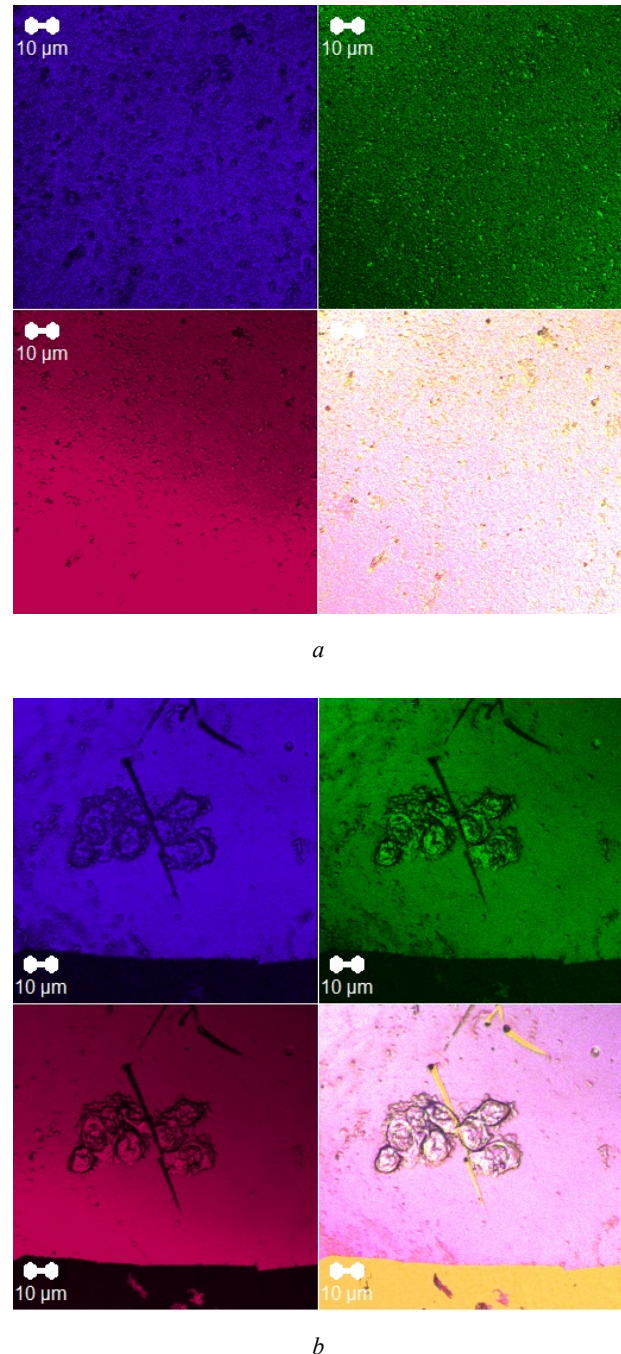


Fig. 6. Confocal microscopy fluorescent images of rough initial gold substrate excited with 405, 488 and 633 nm laser lines, registered with BP 420-480, BP 505-530 and LP 650 nm filters, respectively, presented by the dark blue, green and pink colors and their aggregated image marked with rose (a). Images of colony of the suspended cells on the gold rough substrate; the glass substrate and scratch on the gold look like black spots (b). Proper long pass filters were used for registration, magnification 63 \times .

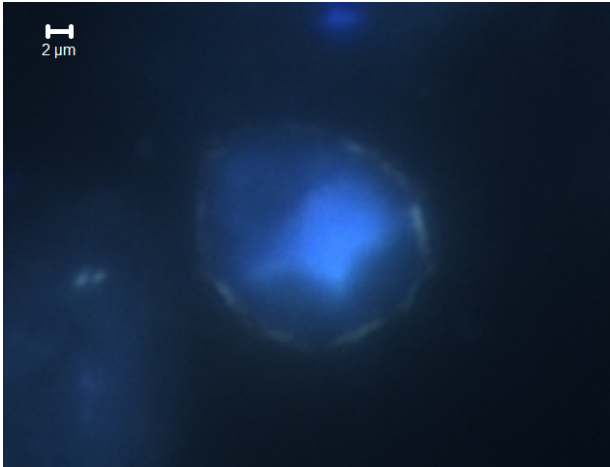


Fig. 7. Confocal microscopy luminescent image of the SPEV cells cultivated on gold substrate excited using UV lamp (365 nm) and registered via FSet 01 filter (Exc = BP 365/12, emiss = LP 397).

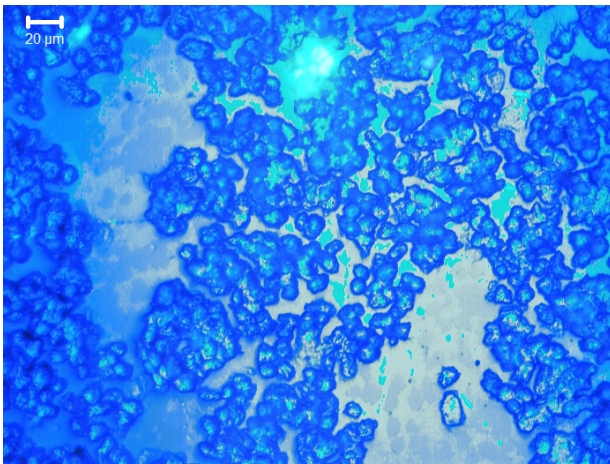


Fig. 8. Confocal microscopy fluorescent image of fibroblasts excited by UV lamp with FSet 01 filter (Exc = BP 365/12, beamspl = FT 395, emiss = LP 397).

However, the excitation with laser provides better images of the cells *in vivo* on the gold-covered substrate (Fig. 9), which is not possible to get in the luminescent mode on glass coverslip without staining the cells. Under excitation with green or blue laser, the cells on the gold reveal better emission, and the obtained images are of the best quality, while the red laser excitation gives a picture of cells as a shadow. In the latter case, sometimes we can see a fragment of the interior fluorescence from the cells. In the conventional mode, PL from the stained cells is registered via band pass filters of BP 420-480, BP 505-530 and LP 650, and in this case PL is weaker than that with application of long pass filters. Quality of our cell images depends on PL of the gold surface stronger than on the type of filters.

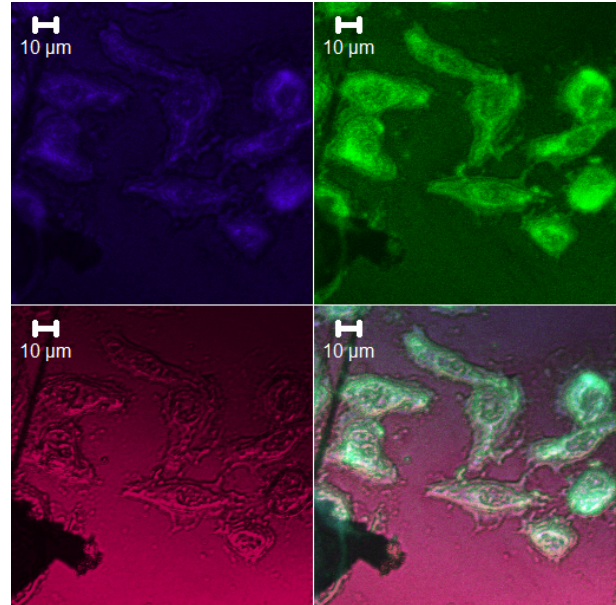


Fig. 9. Confocal luminescence images of SPEV cells on the gold substrate excited by 405, 488 and 633 nm laser lines and registered via long pass filters LP 420, LP 505, LP 650. Aggregated image is presented as well.

Time dependence of PL inherent to the SPEV cells at continuous excitation with UV lamp via the blue filter set FSet 01 in time series mode is presented in Fig. 10. The decrease in the intensity of PL by 2-3 times from cell for 60-70 s was observed. A gold substrate and a cell have different complex dependence of fluorescence kinetics. Kinetics of the PL decay requires a special study.

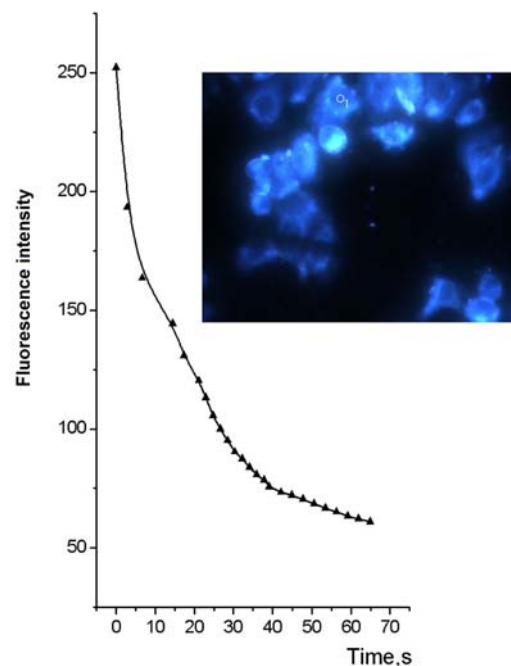


Fig. 10. Confocal microscopy image of the SPEV cells on the gold substrate and time dependence of fluorescence intensity from the cell (marked by circle 1).

The origin of the above mentioned effects should be studied in details. Particularly, we could not propose preferable mechanism responsible for the fluorescence of cells and energy transfers. However, we can conclude that: 1) the rough semitransparent gold film substrate can enhance the proper fluorescence of the cells; 2) a potential of the confocal microscopy gives an opportunity to register a fluorescence from the biological cells *in vivo* on the gold enhancing substrate that is difficult to reach without labelling; 3) SEIRA spectroscopy of a cells monolayer on the rough gold substrate gives a possibility to analyze structural components of the cells with better resolution than conventional FTIR spectroscopy.

5. Conclusions

In this paper, a new approach for optical imaging, structural study and cell cultivation is proposed. Rough thin gold film on the glass coverslip was used as a substrate for SPEV cells growth and optical investigations. Such substrate evokes the enhancement of optical signals from biomolecules and biological cells located near nanostructured surface.

The enhancement factor of 15...30 was obtained for different molecular vibrations in the SEIRA spectra from monolayer of the SPEV cells cultivated on the rough gold as well as a low-frequency shift of about 2...7 cm^{-1} for the majority of characteristic IR vibrations, as compared with that of cells adsorbed from suspension on the same substrate. For the first time, SEIRA spectra of monolayer of the SPEV cells deposited on the rough gold substrate were registered with better resolution than that obtained on monolayer of protein or other biopolymers.

The confocal microscopy contrast images of the SPEV cells on the rough gold substrate were obtained in laser fluorescence mode without cells labelling. The fluorescence of the rough gold surfaces and effects responsible for our findings have been discussed.

This approach opens new possibilities for visualization of the cells *in vivo* without staining.

Acknowledgements. The work was supported by Program of NAS of Ukraine No. VC 156 (2013-2016) and Institute for Problem of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU (Volkova N.A.).

References

1. Dovbeshko G.I., Chegel V.I., Gridina N.Ya., Gnatyuk O.P., Shirshov Y.M., Tryndiak V.P., Todor I.M. Surface enhanced infrared absorption of nucleic acids on gold substrate. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2001. **4**, No. 3. P. 202–206.
2. Dovbeshko G.I., Chegel V.I., Gridina N.Ya., Gnatyuk O.P., Shirshov Y.M., Tryndiak V.P., Todor I.M., Solyanik G.I. Surface enhanced infrared absorption of nucleic acids from tumour cells: an FTIR reflectance study. *Biospectroscopy, USA*. 2002. **67**. P. 470–486.
3. Dovbeshko G.I. Molecular mechanism of interaction of biological molecule with nanostructures, ligands and low doses of ionizing and microwave irradiation. – Manuscript. The thesis applied for scientific degree of doctor of sciences in physics and mathematics on speciality 03.00.02 – Biophysics. – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2009.
4. Dovbeshko G.I., Gnatyuk O.P., Tryndiak V.P., Todor I.M., Solyanik G.I. Chehun V.F. in: *Frontiers of Multifunctional Nanosystems*. Eds. E. Buzaneva, P. Scharff. Amsterdam: Kluwer Academic Publ., 2002. P. 265–280.
5. Kuhne Ch., Steiner G., Fischer W.B., Salzer R. Surface enhanced FTIR spectroscopy on membrane. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998. **360**. P. 750–754.
6. Ataka K. and Heberle J. Biochemical applications of surface enhanced infrared absorption spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. **388**. P. 47–54.
7. Ataka K., Heberle J. Use of surface enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRA) to probe the functionality of a protein monolayer. *Biopolymers*. 2006. **82**, No. 4. P. 415–419.
8. Dovbeshko G.I., Gnatyuk O.P., Chegel V.I., Shirshov Yu.M., Kosenkov D.V., Andreev E.A., Tajmir-Riahi H.A., Litvin P.M. Gold and colloidal gold surface influence on DNA conformational changes. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2004. **7**, No. 3. P. 318–325.
9. Dovbeshko G., Fesenko O., Gnatyuk O., Shtogun Ya., Woods L., Bertarione S., Damin A., Scarano D., Zecchina A. in: *Carbon Nanotubes*. Eds. J.M. Marulanda, In-Tech., 2010. P. 697–719.
10. Freshney R. Ian. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. John Wiley & Sons, 2015.
11. Birger M.O. (Ed.) *The Handbook on Microbiological and Virologic Methods of Research*. M.: Medicine, 1982.
12. Paddock S.W. (Ed.) *Confocal Microscopy Methods and Protocols*. Springer, 1999.
13. Hartstain A., Kirtley J.R., Tsang J.C. Enhancement of the infrared absorption of the molecular monolayers with thin metal overlayers. *Phys. Rev. Lett.* 1980. **45**. P. 201–209.
14. Osawa M., Ikeda M. Surface-enhanced infrared absorption of p-nitro benzoic acid deposited on silver island films: contributions of electromagnetic and chemical mechanisms. *J. Phys. Chem.* 1991. **95**. P. 9914–9919.
15. Kosobukin V.A. Collective modes in enhancement of external electric field on the surface of the metals. *Doklady Akademii Nauk SSSR, Ser. Fiz.* 1985. **49**, No. 6. P. 1111–1120 (in Russian).

16. Kosobukin V.A. Effect of enhancement of external electric field near metal surface and its manifestation in spectroscopy. *Poverkhnost'. Fizika, khimiya, mekhanika*. 1983. **12**. P. 5–20 (in Russian).
17. Osawa M. in: Vol. 1. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Eds. J.M. Chalmers, P.R. Griffiths. Chichester: Wiley, 2002. P. 785–800.
18. Suetaka W. *Surface Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*. New York: Plenum Press, 1995.
19. Nishikawa Y., Fujiwara K., Ataka K., Osawa M. Surface-enhanced infrared external reflection spectroscopy at low reflective surfaces and its application to surface analysis of semiconductors, glasses, and polymers. *Anal. Chem.* 1993. **65**. P. 556–562.
20. Aroca R.F., Ross D.J., Domingo C. Surface-enhanced infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2004. **58**. P. 324A–338A.
21. Lakowicz J.R., Shen B., Gryczynski Z., D'Auria I., Gryczynski S. Intrinsic fluorescence from DNA can be enhanced by metallic particles. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2001. **286**. P. 875–879.
22. Lakowicz J.R. Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications. *Anal. Biochem.* 2001. **298**. P. 1–24.
23. Bondar V.V., Kuryk M.V. Exciton luminescence on the interface antracene-gold. *J. Exp. Theor. Phys.* 1980. **78**, No. 1. P. 94–99.
24. Aspnes D.E., Kinsbron E., Bacon D.D. Optical properties of Au: Sample effects. *Phys. Rev. B.* 1980. **21**. P. 3290–3299.
25. Maier S.A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer Science and Business Media LLC, 2007.
26. Boyd G.T., Yu Z.H., Shen Y.R. Photoinduced luminescence from the noble metals and its enhancement on roughened surfaces. *Phys. Rev. B.* 1986. **33**, No. 6. P. 7923–7926.
27. Lumdee C., Yun B., Kik P.G. Effect of surface roughness on substrate-tuned gold nanoparticle plasmon resonances. *Nanoscale*. 2015. **7**, No. 9. P. 1–6.
28. Andersen S.K.H., Pors A., Bozhevolnyi S.I. Gold photoluminescence wavelength and polarization engineering. *ACS Photonics*. 2015. **2**, No. 3. P. 432–438.

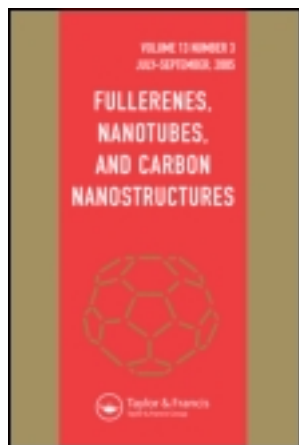
Висновки до розділу 2

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 $1625 - 1632\text{ см}^{-1}$.
2. 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 $C_2=O$ та $C_4=O$, 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 високочастотний зсув смуг, коефіцієнт підсилення для яких більше 1,7 рази, зокрема $C_2=O$, деформаційні коливання C-H та C-N. В інших випадках фіксуємо низькочастотні зсуви порядку $1-5\text{ см}^{-1}$. Максимальний коефіцієнт підсилення порядку 3,7 рази.
3. Показано, що в системі CeO_{2-x} /графен під дією лазерного випромінювання відбувається заповнення кисневих вакансій, утворених в оксиді церію при переході від масивного до наноструктурованого CeO_2 , та окислення Ce до Ce^{+4} . Система CeO_{2-x} /графен може бути використана для розробки газових датчиків.

4. Показано, що вуглецеві нанотрубки можуть спричиняти незворотні конформаційні переходи в лізоцимі за умови інкубації при кімнатній температурі при різних значеннях водневого показника. Про це свідчить зростання вкладу антипаралельної β -конформації в структурі лізоциму, і зменшення вкладу α -спіральної конформації, які є характерними рисами при формуванні фібрилярних структур.
5. Визначені спектроскопічні маркери утворення комплексу коніуму з фулеренами C_{60} , а саме відсутність розщеплення області $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ та в області $3500-3400\text{ cm}^{-1}$, яке фіксували в чистому препараті коніуму. Це може свідчити про взаємодію між C_{60} і коніумом з утворенням нового зв'язку найімовірніше в γ -коніцеїні.
6. Було показано, що наноструктурована підложка, виготовлена у вигляді напиленого шару золота на скляну основу є зручною платформою для дослідження біологічних молекул та клітин, в якій поєднується власна флуоресценція з підсиленням оптичних процесів за рахунок підсилення поля плазмонними коливаннями. При цьому слід враховувати можливі частотні зсуви основних смуг поглинання порівняно зі спектрами пропускання.

Розділ 3

Коливальні маркери вуглецевих наноструктур



Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/lfn20>

Vibrational Spectra of Carbonaceous Materials: A SEIRA Spectroscopy versus FTIR and Raman

G. I. Dovbeshko ^{a b}, O. P. Gnatyuk ^a, A. N. Nazarova ^c, Yu. I. Sementsov ^d & E. D. Obraztsova ^d

^a Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Prospect Nauki, 46, Kyiv, Ukraine

^b National Taras Shevchenko University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

^c Institute of Surface Chemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

^d Natural Science Center of A.M., Prokhorov General Physics Institute, RAS, Moscow, Russia

Published online: 06 Feb 2007.

To cite this article: G. I. Dovbeshko, O. P. Gnatyuk, A. N. Nazarova, Yu. I. Sementsov & E. D. Obraztsova (2005): Vibrational Spectra of Carbonaceous Materials: A SEIRA Spectroscopy versus FTIR and Raman, Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures, 13:51, 393-400

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1081/FST-200039387>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Vibrational Spectra of Carbonaceous Materials: A SEIRA Spectroscopy versus FTIR and Raman

G. I. Dovbeshko and O. P. Gnatyuk

Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine,
Prospect Nauki, 46Kyiv, Ukraine

G. I. Dovbeshko

National Taras Shevchenko University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

A. N. Nazarova

Institute of Surface Chemistry National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Yu. I. Sementsov and E. D. Obratsova

Natural Science Center of A.M., Prokhorov General Physics Institute,
RAS, Moscow, Russia

Abstract: Vibration spectra of different carbon-based materials—soot, natural flake graphite, exfoliated graphite and, single-walled nanotubes—have been studied by SEIRA (surface enhanced infrared absorption) spectroscopy and compared with FTIR and Raman spectroscopy. The SEIRA method is a more sensitive tool for characterisation of contamination structure and optical properties of carbon materials than conventional IR spectroscopy. Our study showed that second-order modes in Raman spectra could be used for characterisation of nanodimensional tube-like structure in carbon materials.

Keywords: Carbonaceous materials, SEIRA, FTIR, Raman spectroscopy

Address correspondence to G. I. Dovbeshko, Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Prospect Nauki, 46, Kyiv 03028, Ukraine. E-mail: gd@iop-kiev.ua

INTRODUCTION

Study of vibrational modes of carbon materials is of great importance for applied science technology. Raman spectroscopy, being a routine and nondestructive technique, is known as a powerful tool for identification of graphites, carbon nanotubes, fullerenes, diamond, etc. (1–4). However, it is difficult to use this method for detection of contamination. FTIR spectroscopy, namely its new sensitive modification—surface enhanced infrared absorption (SEIRA), is more sensitive for this purpose. SEIRA method has been recently used for registration of small amounts of substances absorbed on rough metal surface. The signal enhancement could reach 10–1000 times in comparison with conventional geometry. That is why we try to apply SEIRA for characterisation of carbon materials.

METHODS AND MATERIALS

The single-walled carbon nanotubes (SWCNT) were synthesised by arc discharge between two graphite electrodes in He atmosphere in the Natural Science Center of General Physics Institute (RAS, Moscow) (5). Their length was 1–2 μm and diameter 1.3–1.5 nm. The exfoliated graphite (EG) was synthesised by persulphate oxidation method in the Institute of Surface Chemistry (Fig. 1) (Kyiv, Ukraine) (6).

The contamination of carbon materials has been registered by SEIRA spectroscopy in RAS (reflection-absorption) mode with IFS-48 Bruker instrument. Spectra were evaluated with the Opus 2.2 program. The samples have been prepared as powder in KBr for conventional FTIR spectroscopy or as films precipitated on quartz substrate covered with a gold layer (thickness of the gold layer was 200 Å, roughness was 50 Å) for SEIRA spectroscopy. SWCNT were mixed in alcohol, treated with ultrasound irradiation for 20 min, and then precipitated on gold substrate. The samples of soot and graphite were mechanically milled, mixed with alcohol, and precipitated on gold substrate. EG was rolled on gold substrate.

The Raman spectra were registered with the Bruker RFS 100/s instrument; a Neodym-YAG laser with the wavelength $\lambda = 1064$ nm was used as an excitation source.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection Rules for Graphite

It is known that hexagonal graphite belongs to D_{6h}^4 ($P6_3/mnc$) symmetry group (7). The irreducible representation of the optical modes of the

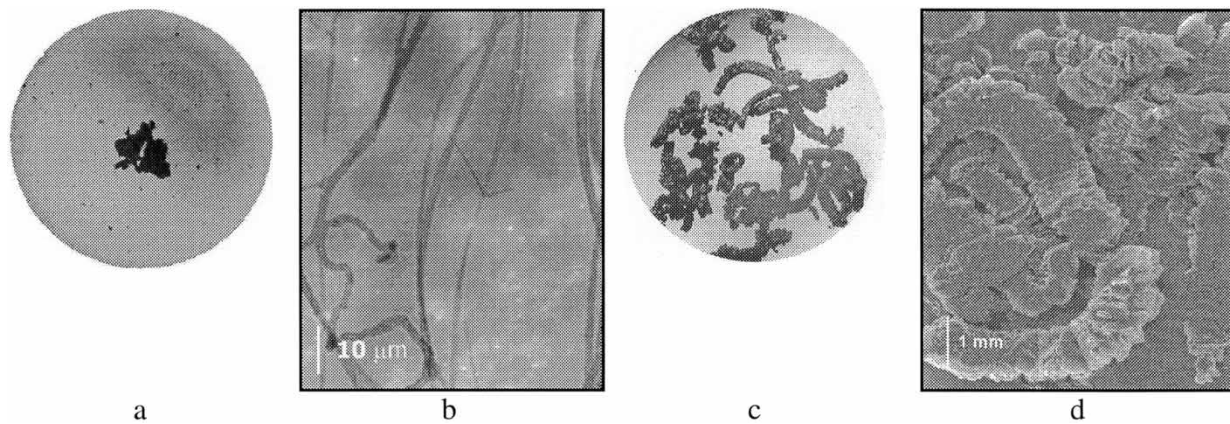


Figure 1. Microscopic images of single-walled carbon nanotubes (a, b) and exfoliated graphite (c, d); (a, c) optical microscopy images, $\times 16$; (b, d) TEM images.

Brillouin zone centre of graphite is the following (4):

$$\Gamma = 2E_{2g} + E_{1u} + 2B_{2g} + 2A_{2u} \quad (1)$$

According to selection rules, only ungerade (odd) symmetry vibrations (E_{1u} and A_{2u}) can be active in IR spectra. As usual, the E -modes determine the motions within the layer planes, the A and B modes are characterised by atomic displacement normal to the planes. The E_{1u} mode is IR-active polarised in the plane of graphite layer and located close to 1587 cm^{-1} . The A_{2u} mode polarised in perpendicular direction is located close to 868 cm^{-1} (7). Usually for graphite layer the u -modes are nonactive due to the equivalent position of carbon atoms in the layer; they become active in a 3-dimensional structure.

Selection Rules for Nanotubes

The irreducible representation of the optic modes for SWCNT can be presented as following: for armchair nanotubes (even $n = 2j$ with D_{nh} symmetry) (8)

$$\begin{aligned} \Gamma_{2j}^{vib} = & 4A_{1g} + 2A_{1u} + 4A_{2g} + 2A_{2u} + 2B_{1g} + 4B_{1u} + 2B_{2g} + 4B_{2u} \\ & + 4E_{1g} + 8E_{1u} + 8E_{2g} + 4E_{2u} + \dots + 4E_{(j-1)g} + 8E_{(j-1)u} \end{aligned} \quad (2)$$

for zigzag nanotubes ($n = 2j$ with D_{nh} symmetry):

$$\begin{aligned} \Gamma_{2j}^{vib} = & 3A_{1g} + 3A_{1u} + 3A_{2g} + 3A_{2u} + 3B_{1g} + 3B_{1u} + 3B_{2g} \\ & + 3B_{2u} + 6E_{1g} + 6E_{1u} + 6E_{2g} \\ & + 6E_{2u} + \dots + 6E_{(j-1)g} + 6E_{(j-1)u}, \end{aligned} \quad (3)$$

for armchair and zigzag nanotubes (odd $n = 2j + 1$ with D_{nh} symmetry):

$$\begin{aligned} \Gamma_{2j+1}^{vib} = & 3A_{1g} + 3A_{1u} + 3A_{2g} + 3A_{2u} + 6E_{1g} \\ & + 6E_{1u} + 6E_{2g} + 6E_{2u} + \dots + 6E_{jg} + 6E_{ju}, \end{aligned} \quad (4)$$

for chiral nanotubes:

$$\Gamma_N^{vib} = 6A + 6B + 6E_1 + 6E_2 + \dots + 6E_{N/2-1}. \quad (5)$$

The number of Raman and infrared-active modes for a carbon nanotube does not depend much on the nanotube diameter and chirality, though the total number of phonon modes $6N-4$ is very different for different chiralities (where N is the number of hexagones per unit cell). Group theory selection rules indicate that there are 15 or 16 Raman-active modes and 6–9 IR-active modes for a SWCNT. For chiral nanotubes modes with A and E_1

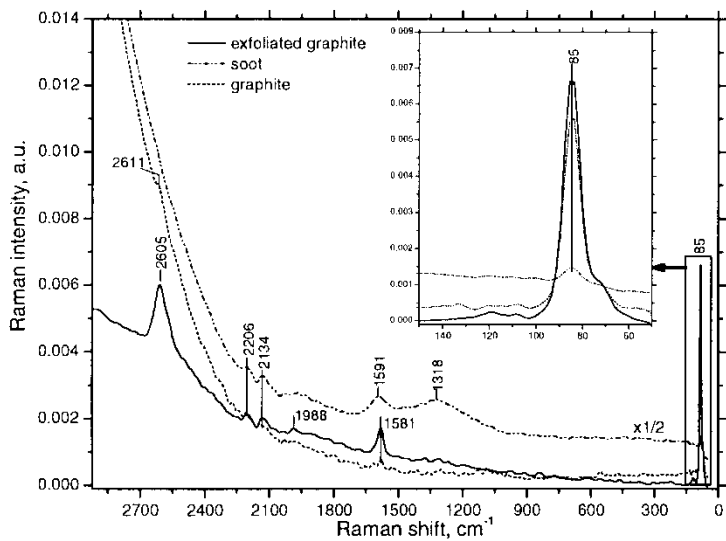
symmetry are both Raman- and IR-active, because of the lack of an inversion centre (4).

Raman Spectroscopy

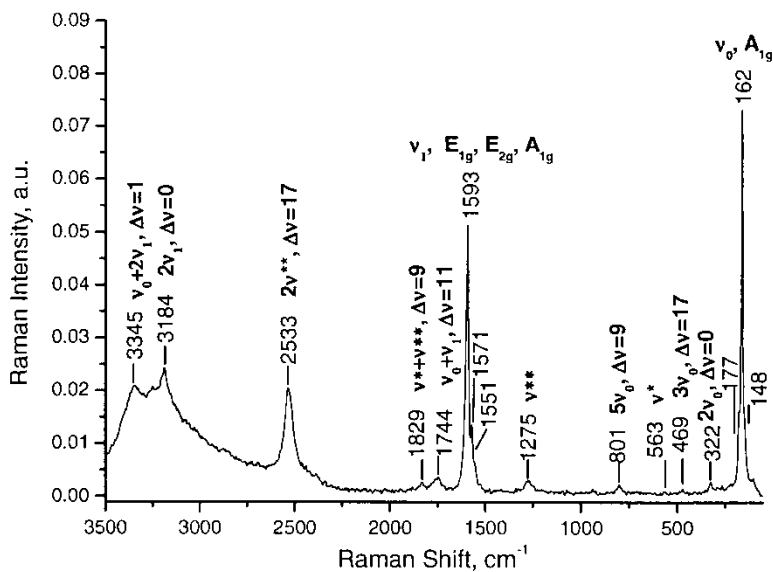
Raman spectra of EG, SWCNT, soot, and crystalline graphite are presented in Fig. 2. It should be mentioned that the main band of Raman scattering, so called G-mode, according to the theory characterises tangential vibrations of carbon atoms of graphene layer of E_{2g} symmetry and correlates with the ordering of crystal lattice of graphite structure. For EG this band is found near 1581 cm^{-1} for Γ point of Brillouin zone, i.e., it coincides with the experimental value for crystalline graphite and with theoretical computation for graphene layer (4). Frequency shift in high-frequency region means reduction of the areas of coherent scattering of the materials under study (4). Such effect could be noticed in the samples of soot and nanotubes— 1591 and 1593 cm^{-1} , respectively. It should be noted that the second of characteristic modes of graphite-like materials, so called D-mode, with A_{1g} symmetry that characterises the disorder of lattice of graphene layer could be hardly registered for EG and crystalline graphite. This mode is found near 1300 cm^{-1} and refers to breathing vibrations of rings of graphene layer in the K point of Brillouin zone (4). The wide maximum at 1318 cm^{-1} could be noticed for soot and the scattering at 1275 cm^{-1} —for nanotubes. The second-order modes of this vibration are well registered at 2605 cm^{-1} in EG and at 2.533 cm^{-1} in SWCNT and they have the intensity that usually exceeds the intensity of second-order vibrations. The last fact could be evidence that EG and nanotubes consist of similar structures that lead to the appearance of strong electron-phonon interaction. It is difficult to explain the great intensity of this band in an other way. Other carbon-like materials do not have such peculiarity. Single-walled carbon nanotubes have a low-frequency mode of significant intensity that is assigned to the vibrations of a whole tube (4). EG is also characterised with the most intensive low-frequency or lattice mode near 85 cm^{-1} . Being based on supposition of nanostructural similarity between SWCNT and EG and using the formula that comes from the dispersion dependence between frequency and propagation vector for nanotubes (4), it is possible to connect the vibrational frequency with the diameter of vibrating structure, it is possible to get the diameter of pores or cylindrical apertures of $\sim 2.6\text{ nm}$ for EG. The next formula was used:

$$D^{(\text{nm})} \approx 223,75/\omega(\text{cm}^{-1})$$

So, we suppose that nanotubes and EG consist of tube-like nanostructures of similar size.



a



b

Figure 2. Raman spectra of exfoliated graphite, soot, natural graphite (a) and SWCNT (b).

IR-RAS Spectroscopy

Because of great scattering it is very difficult to register the absorbance conditioned by the contaminations in the samples prepared by conventional method in KBr pellets. On account of the lack of information the spectra are not presented. That is why we used another technique, namely SEIRA, that allows us to register spectra of carbonaceous materials on gold substrate quite easily.

IR spectra of different carbon materials could include similar contaminations. In SEIRA spectra of soot and EG (Fig. 3) we observed the bands that could be assigned to absorption of molecular groups of C=O ($1750\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$) and C-H ($1490\text{--}1415\text{ cm}^{-1}$). In all materials under study the bands of C=N, C=C ($1650\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$) have been registered. The wide band in the region of $950\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ assigned to C-N, C-O, C-C is the characteristic feature of many carbon materials and of the materials of our interest. A number of weak bands in the region below 900 cm^{-1} could be assigned to absorption of collective modes with participation of C-C, C-O. We suppose that the bands in the $3500\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ are the characteristic of contamination and the region below 900 cm^{-1} is a characteristic of carbon "backbone." In the case of SEIRA spectra, the number of registered bands

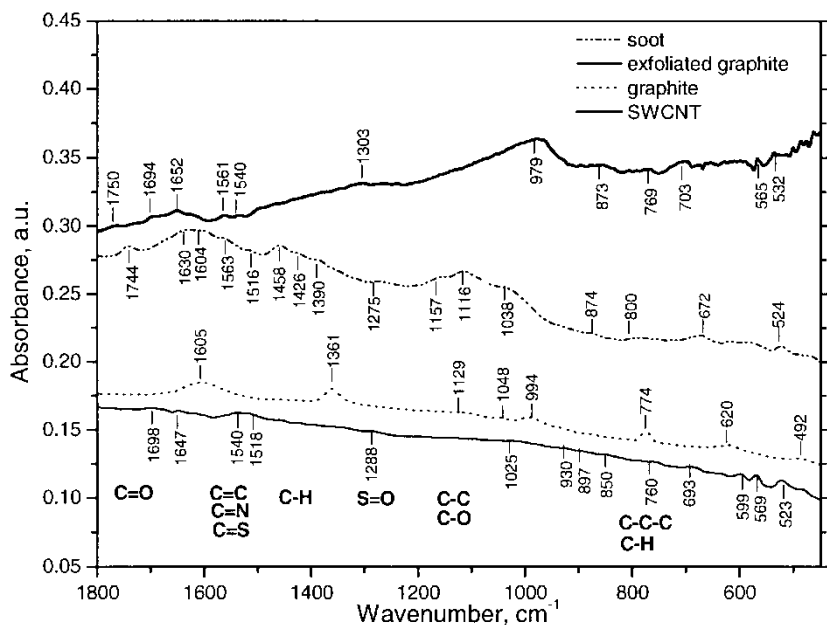


Figure 3. SEIRA spectra of soot, exfoliated graphite, natural graphite, and single-walled carbon nanotubes.

on the gold substrate is larger than for the samples in KBr in the FTIR spectra in conventional geometry. The band positions for both methods are the same; it could change negligibly, however, the intensity shows more changes.

CONCLUSIONS

Raman spectroscopy can be used for determination of a disorder degree of carbon materials as well as for identification of the diameter of porous nanostructures using low-frequency mode. SEIRA spectra can effectively demonstrate the presence of contaminations in carbon materials.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are greatly indebted to Dr. Vladimir Romanyuk from Institute of Physics of Semiconductors of NAS of Ukraine, Kyiv for TEM images.

REFERENCES

1. Dovbeshko, G.I., Repnytska, O.P., and Shtogun, Y.V. (2003) DNA interaction with single-walled carbon nanotubes: a SIERA study. *Chem. Phys. Lett.*, 372: 432–437.
2. Brichka, S.Ya., Prikhodko, G.P., Brichka, A.V., Teretz, M.I., Pokrovsky, V.A., Dovbeshko, G.I., and Repnitska, O.P. (2004) Physical-chemical properties of multi-walled N-containing carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. (Rus.)*, 78 (1): 157–162.
3. Robertson, J. (2002) Diamond-like amorphous carbon. *Mat. Sci. Eng. (R)*, 37: 129–281.
4. Saito, R., Dresselhaus, M.S., and Dresselhaus, G. (1998) *Physical Properties of Carbon Nanotubes*; Imperial College Press: Cambridge.
5. Obraztsova, E.D., Bonard, J.-M., and Kuznetsov, V.L. (1999) *Nanostruct. Mater.*, 12: 567.
6. Sementsov, Yu.I., Pyatkovsky, M.L., and Chernysh, I.G. (1998) Structural changes in the process of obtaining dispersed forms of exfoliated graphite. *Powd. Metal. (Rus.)*, 9/10: 98–106.
7. Nemanich, R.I. and Lucovsky, G. (1977) Infrared active optical vibrations of graphite. *Solid State Commun.*, 23: 1379–1389.
8. Aksenov, V.L., Ossipyan, Yu.A., and Shakhmatov, V.S. (2000) Symmetry groups of carbon nanotubes. *Part. Nuclei Lett. (Rus.)*, 4 (101): 5–9.

Synthesis of carbon nanotubes from a chlorine-containing precursor and their properties

S.Ya. Brichka^a, G.P. Prikhod'ko^a, Yu.I. Sementsov^a, A.V. Brichka^a,
G.I. Dovbeshko^{b,*}, O.P. Paschuk^b

^a *Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, General Naumov Street, 17, Kyiv 164, 03680, Ukraine*

^b *Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Prospect Nauki, 46, Kyiv 03028, Ukraine*

Received 2 July 2003; accepted 26 May 2004

Available online 15 July 2004

Abstract

A template method for the synthesis of multi-wall carbon nanotubes from dichloromethane was investigated. The use of a non-thermally stable precursor allows for a low synthesis temperature (250 °C) in comparison with acetylene synthesis. Carbon nanotubes of different structure could be synthesised using different matrix geometries. Electron spectroscopy used for chemical analysis shows that the carbon nanotubes consist of carbon, oxygen (14.3 at.%), chlorine (0.25 at.%). The material has been characterised by surface enhanced IR spectroscopy in the reflectance-absorbance mode, and temperature-programmed desorption with mass-spectrometry control. The vibrations of C–O, C–C, C=O, C=C molecular groups as well as the collective modes of large entities containing these groups have been recorded.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: A. Carbon nanotubes; B. Pyrolysis; C. Infrared spectroscopy, Mass spectroscopy

1. Introduction

Structures of nanotubular form are now being widely studied [1,2]. Carbon nanotubes (CNT) as an example of a new quasi one-dimensional allotropic form of carbon attract attention of researchers. The CNT's unique structure determines its mechanical and electronic properties. They are actively used for development of smart composite materials for chemical sources of charge, electronic devices as well as catalysts and adsorbents [3–5].

Modification of carbon nanotubes (CNTs) leads to the creation of new functional and construction materials. There are known different processes of synthesis of modified CNTs: filling of their inner cavities, chemical modification of CNT ends by functional groups, substitution of CNT carbon atoms by other elements, chemical modification of CNT lateral surfaces by double bonds, intercalation of atoms and molecules in the

intertubular space of a bunch of CNTs. Usually, for the synthesis of CNTs by the chemical vapor deposition method (CVD), unsaturated hydrocarbon compounds, such as acetylene, ethylene, propylene and benzol are used. Methane also can be used as initial hydrocarbon for CNTs obtaining [7,8]. Many publications emphasise the possibility of substitution of carbon by nitrogen or boron atoms in CNTs [9–12]. In the process of the catalytic pyrolysis of 2-amino-4, 6-dichloro-s-triazine [9], polypyrrol [10], nickel phthalocyanine complex [11], acetonitrile [12] the nitrogen-containing CNTs could be obtained. Content of nitrogen does not exceed 6 at.%. Boron-containing CNTs are mostly synthesised by means of solid-phase chemical reaction between CNTs and B₂O₃ [13]. The CH₃CN·BCl₃ [14] and (CH₃)₃N·BH₃ [15] pyrolysis with a Co-catalyst leads to multi-layer nitrogen-and boron-containing CNTs. In the process of the reaction between CNTs and B₂O₃ at 1500 °C in nitrogen a simultaneous substitution of carbon atoms by nitrogen and boron also takes place [16,17]. We consider that the use of a new class of carbon compounds as initial substances for CNT synthesis provides a possibility to extend the number of CNTs

* Corresponding author. Tel.: +380-44-265-73-64; fax: +380-44-265-15-89.

E-mail address: gd@iop.kiev.ua (G.I. Dovbeshko).

with different properties, as well as to enhance ideas about their formation mechanism.

The results of CNT synthesis from dichloromethane (CH_2Cl_2) with an Al_2O_3 membrane produced are presented in this work. The temperature regime of this process was also studied. The characteristics of the CNT surface were obtained using electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA), temperature-programmed desorption mass-spectrometry (TPD-MS) and infrared spectroscopy in the reflection-absorption mode (IR-RAS).

2. Experimental section

2.1. Carbon nanotube synthesis

Matrix synthesis of carbon nanotubes consists in the application of an inorganic body with nanotube-like pores. Under pyrolysis of hydrocarbons with Cl, carbon vapour that is formed deposits on the solid surface as carbon nanotubes. The last stage is the separation of the carbon nanotubes from the matrix.

Al_2O_3 membranes were synthesised by anode oxidation of electropolished aluminium plates in 0.4 M solution of oxalic acid under a voltage of 31 ± 1 V and at a temperature of 16–20 °C for 24 h. The membranes have been separated from aluminium by a change of polarity of the electrodes. The membranes obtained had a thickness of 60–80 μm . It should be mentioned that according to X-ray data the Al_2O_3 sample was amorphous.

The Al_2O_3 membranes were placed in a quartz reactor 18 mm in diameter in an inert atmosphere of argon, and the temperature in the reaction zone was increased to 300–700 °C. Then a gas mixture formed by passing argon (flow velocity of 0.015 l min^{-1}) through a vessel containing CH_2Cl_2 flowed into the reactor. The time of pyrolysis was equal to 20–80 min. The synthesised composite consisting of Al_2O_3 plates containing carbon was then dissolved in 44% HF at room temperature for removal of the oxide and the insoluble carbon fraction obtained.

2.2. Characterisation of carbon nanotubes

The samples were heated (mass loss was more than 60%) to purify CNTs from other forms of carbon. According to SEM and TEM data, the samples synthesised by the matrix method contain more than 70% of CNTs. After purification, the sample mostly consists of CNTs, and the quantity of amorphous particles does not exceed 10%. After washing the samples, the carbon fraction was identified by scanning electron microscopy (SEM) with X-ray micro analyser “Superprobe-733” (JEOL, Japan) and transmission electron microscopy.

Thermal analysis was performed at a heating rate of 10 °C min^{-1} (Q-1500 D). The CNTs were studied by X-ray photoelectron spectroscopy (ESCA, XPS SERIES-800 Kratos Analytical) using AlK_{α} -radiation with an energy of 1486.6 eV. TPD-MS experiments were performed as follows: a sample of up to 2 mg in weight was placed into quartz cell and then heated from room temperature to final temperature of 900 °C at a heating rate of 10 °C min^{-1} . At the same time, the products of the sample desorption were determined by mass-spectroscopy for $m/z = 2$ –100 amu. The contamination of carbon nanotubes was registered by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy with an IFS-48 Bruker instrument. Spectra were evaluated with the Opus 2.2 program. The samples for IR-RAS spectroscopy were prepared as KBr pellets or films precipitated on a gold/ SiO_2 substrate. The samples were prepared in the following way: the carbon nanotubes in alcohol or/and aqueous solution were treated with an ultrasonic vibrator for 20 min and then precipitated on a gold-precoated substrate.

3. Results and discussion

3.1. Formation of carbon nanotubes in templates of different geometry

The temperature of CH_2Cl_2 pyrolysis has a considerable effect on the process of CNT formation. In the process of CH_2Cl_2 decomposition at 300 °C, carbon deposition was not observed on Al_2O_3 membranes (the matrix did not change colour). At higher temperature a carbon fraction is deposited on the Al_2O_3 (the matrix became black). In accordance with the electron microscopy data, the CNTs have been observed in the carbon fraction synthesised in the 400–600 °C range. At temperatures higher than 650 °C no fiber-like structures were seen in the CH_2Cl_2 pyrolysis reaction products. The mechanism of carbon vapour formation and its condensation on the matrix surface at temperatures above 650 °C, obviously differs from those realised at 400–600 °C. As it is known, in the process of CNT arc-discharge synthesis, the temperature in the arc rises up to 4000 °C. In the process of laser synthesis, the graphite target is heated to 1200 °C and additionally irradiated by a laser beam [6]. The temperature of acetylene pyrolysis on the aluminium oxide membranes is equal to 700–1000 °C; the synthesis is done with Fe-, Co-, Ni-catalysts at the temperature 500–800 °C. In order to obtain a lower CNT synthesis temperature (about 400 °C), the authors [18] used a Ni/ SiO_2 catalyst under a pressure of 90 Torr. Therefore, the CNT pyrolytic synthesis at 400 °C on Al_2O_3 membranes could be considered as a relatively low-temperature synthesis compared to the temperature used by other methods. We explain

the low-temperature of CNT synthesis by the low thermal stability of the initial hydrocarbon (CH_2Cl_2). In acetylene, propylene, methane, etc. molecules frequently used as reagents for the CVD synthesis of CNTs, covalent carbon-carbon bonds (single, double and triple) as well as carbon-hydrogen bonds are strong. A high activation energy is required for their rupture as demonstrated by the hydrocarbon pyrolysis temperature. Thus, the thermal instability of some hydrocarbons could be used for elaboration of low-temperature CNT synthesis. It should be noted that the HCl, which is formed in the process of CH_2Cl_2 pyrolysis, has a negative effect on Co-, Ni-catalysts due to interaction of the acid with metals and creation of volatile chloride [14].

It is known [5,6] that CNTs obtained in the synthesis look like a textured material. In our case the produced material looks like close-packed CNTs, a rubbery-like material consisting of twisted CNTs and/or parallel CNTs having a form of spirals or some other shapes. Fig. 1 shows the CNTs synthesised at 500 °C for 60 min. The CNTs synthesised in the present work, consist of bunches in which the tubes are oriented in one direction. As reported in [12,19,20], application of Al_2O_3 membranes for nanotube synthesis could lead to the formation of some sprout-like defects. In our nanotubes we have found such CNT defects with TEM (Fig. 2). Their appearance is obviously determined by the geometry of the membrane pores in which they are formed. The outer diameter of the CNTs was equal to 50–62 nm. The thickness of the CNT wall was found to be 10–15 nm indicating a large number of graphene layers (35–40 layers) in the wall. For some practical applications it is necessary to have the ends of the CNTs open. In the most cases with arc and laser synthesis, the CNTs have closed ends whereas in the matrix synthesis, all the CNTs have open ends [12].

The temperature range of the CNT synthesis results in the possibility of using a hybrid matrix prepared as

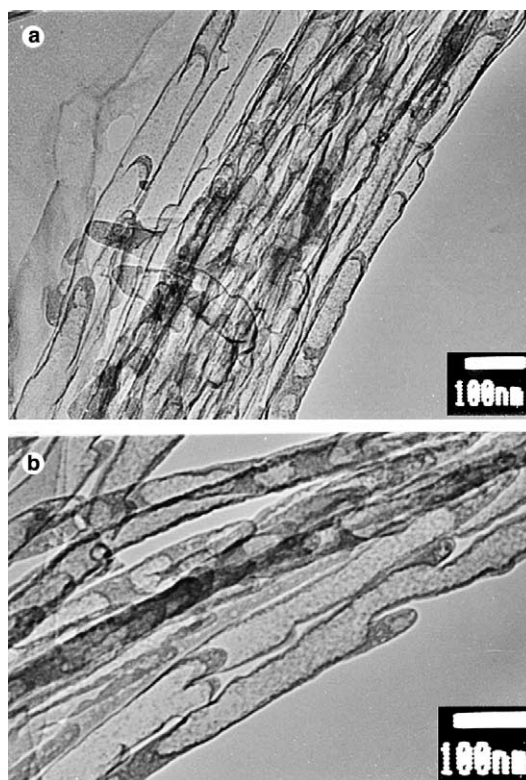


Fig. 2. TEM images of synthesised CNTs.

follows: a thin aluminium plate was subjected to anodic oxidation on both sides and used for further experiments without the oxide phase separation stage. In the result the membrane pores were closed by an aluminium layer from one side and looked like nanoreactor-cylinders with one closed end. The synthesis of nanotubes in the above mentioned conditions and at a temperature of 400 °C was performed to study the influence of matrix geometry on the CNT formation. The structure of the CNTs obtained (Fig. 3) differs from that shown in Fig.

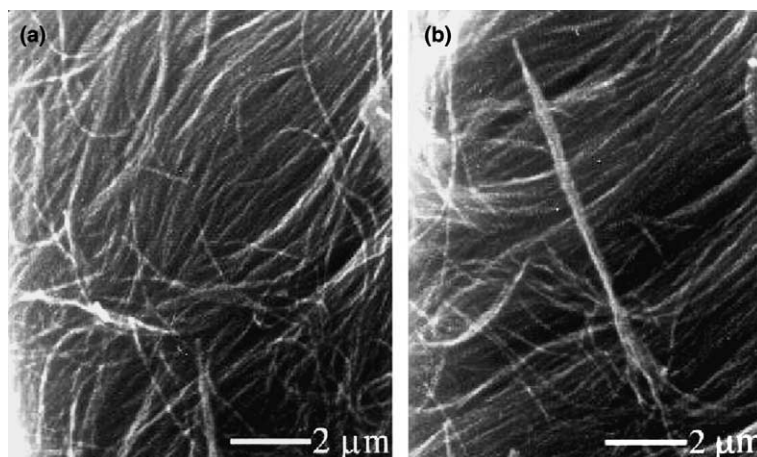


Fig. 1. SEM images of synthesised CNTs.

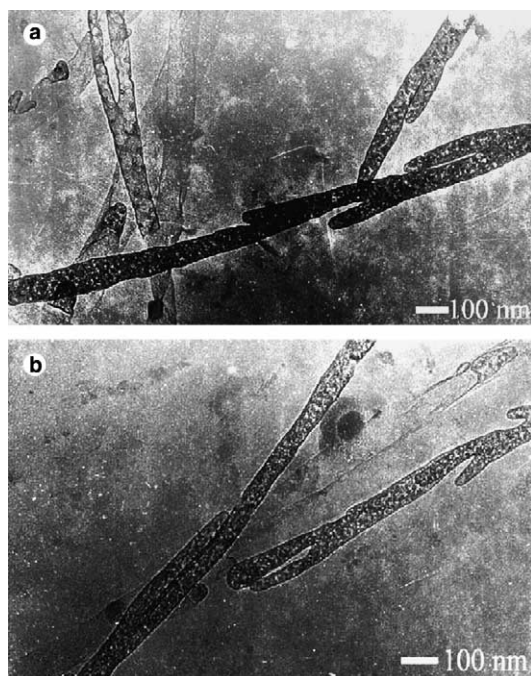


Fig. 3. TEM images of synthesised CNTs on hybrid matrix.

2. The comparison of respective TEM images shows that the CNTs formed in the pores of the hybrid matrix have different wall thickness, namely, there are multi-wall nanotubes, 8 nm thick, as well as thin nanotubes (Fig. 3). We suppose that the thin-walled nanotube seen in Fig. 3 could be a single-wall carbon nanotube. It should be mentioned that between the walls of multi-wall CNTs (Fig. 3) a combination of light and dark shades could be noticed. The TEM method is based on the assumption that a more dark region of the image indicates an object of greater thickness. That is why atypical images of CNTs (Fig. 3) could be explained by the formation of carbon nanoparticles in the holes of nanotubes during the pyrolysis, or by an irregular thickness of the walls. Thus, changes in the geometry of nanoreactors strongly affect the process of CNT formation.

3.2. Thermal stability of carbon nanotubes

The fact that the thermal stabilities of CNTs synthesised by arc-discharge, laser or CVD methods are quite different, could be explained by the difference in their structure ordering. The multi-wall CNTs synthesised by the arc discharge method are more resistant to oxidation under thermal treatment in air (the oxidation temperature on DTA curve is equal to 710 °C) compared to those obtained by catalytic pyrolysis (oxidation temperature is equal to 485 °C) [21]. We have studied two types of samples: as-produced CNTs (without purification) and purified ones. For the original samples one exothermal peak corresponding to the process of

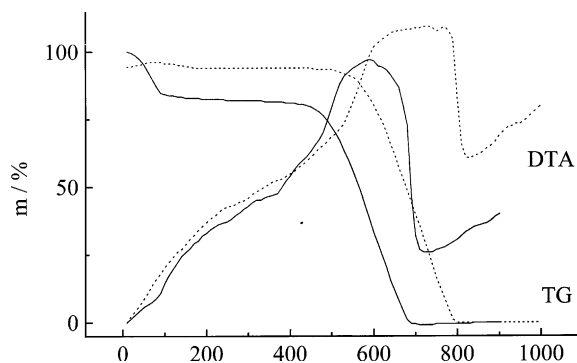


Fig. 4. TG and DTA curves of CNTs without purification (---) and purified CNTs (—).

carbon oxidation by atmospheric oxygen has been observed on the DTA curves (Fig. 4). The beginning of the exothermal effect is observed at 530 °C which coincides with the temperature of the mass loss onset. The thermal activity of the purified CNTs is more complicated. According to the thermal gravimetry (TG) curve, a distinctively defined gradual mass loss of the sample reaching less than 3%, takes place in the 150–370 °C range. At higher temperature a further mass loss is observed, this becomes more pronounced at temperatures higher than 475 °C till complete burnout of the CNTs. The exothermal effect of the CNT oxidation takes place at 475 °C which is comparable to the temperature stability of CNTs synthesised from acetylene at 485 °C with the same catalyst [21]. The beginning of the exothermal process for the purified CNTs has been moved towards lower temperature (475 °C) compared to the initial carbon sample (530 °C). The differences in the thermal stabilities of the samples could be explained by the fact that, in the process of CNT purification, active carbon oxidation is accompanied by a formation of oxygen-containing functional groups on the surface of the tubes. These functional groups are destroyed later at lower temperatures and this is accompanied by mass loss in the purified CNTs. It is obvious that in the process of CNT purification the thermal stability decreases.

3.3. Characterization of the carbon nanotube surface

3.3.1. ESCA analysis

According to the ESCA (XPS) data, the oxygen content in the surface layer of the CNTs is equal to 14.3% and carbon—85.45 at.%. Both non-modified multi-walled CNTs and graphite have a maximum at 284.6 eV which corresponds to the C 1s peak [22]. The signal shift from synthesised CNTs towards the region of high energies ($\Delta E = 0.4$ eV) could be explained by the influence of more electronegative chlorine, which forms a chemical bond with carbon atoms. In the photoelectron spectrum the 1s-electron peak of carbon (C 1s) equals to 285 eV. In our opinion, this signal belongs to

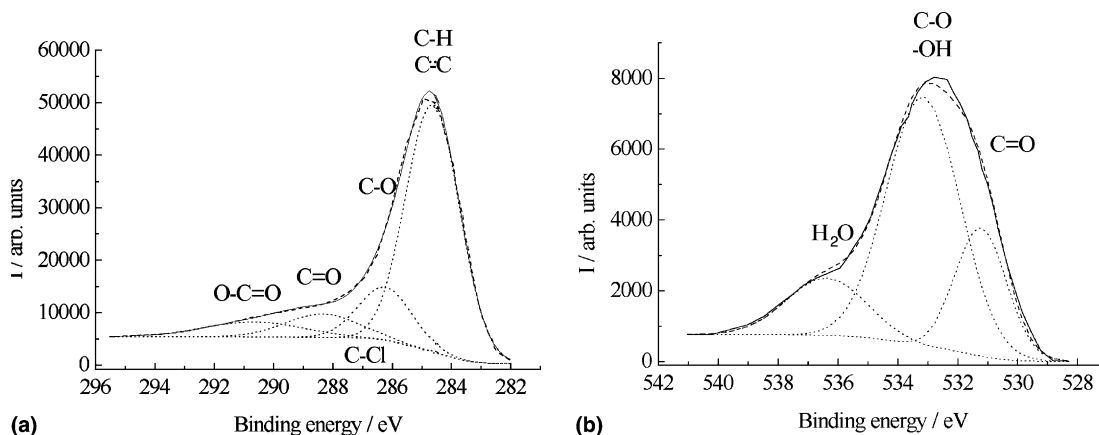


Fig. 5. X-ray photoelectron spectra of (a) C 1s and (b) O 1s of CNTs.

carbon atoms in sp^2 -hybridisation. The XPS analysis of C 1s and O 1s spectra (Fig. 5) has been carried out to study CNT functional groups in detail. According to evaluation of the C 1s spectrum, about 9% of carbon is bound with oxygen as C—O, 4% as C=O and 6% in O—C=O, and 0.18% in C—Cl. A considerable concentration of C=O groups on the surface is in accordance with XPS analysis of the O 1s peak, where the ratio C—O/C=O is equal to 2.8. In the process of CNT formation under CH_2Cl_2 pyrolysis, chlorine-containing compounds are formed. The interaction of Cl^- with CNTs is inevitable in such conditions. We observed chlorine (0.25 at.%) on the surface of the synthesised CNTs. A peak at 200 eV was registered in the spectrum of Cl 2p of chloride anions. In the process of CNT purification the Cl-containing molecules physically adsorbed on the surface are desorbed. Therefore, chlorine anions closely bound to CNTs could be a result of the chemisorption and introduction of HCl molecules into the defects of graphene layers. We suppose that CNTs modified by chlorine anions should have special physical–chemical properties that could be used, for example, in catalysis.

3.3.2. TPD-MS study

The thermal stability of the functional groups on the CNT surface was studied by TPD-MS [23]. The analysis of the desorption products in the gas phase indicates that H_2O , CO_2 and CO have been extracted from CNT samples (Fig. 6). In accordance with the ESCA data the chlorine atoms form part of the chemical composition of the synthesised CNTs, but no trace of HCl has been detected in the desorption products. The TPD profile of H_2O reveals two maxima: a low-temperature maximum at 90 °C that belongs to physically adsorbed H_2O on outer surface of CNTs and another at 260 °C assigned to H_2O desorption from nanotube cavities. In the TPD spectrum of CO_2 (Fig. 6), the two regions of its desorption have been observed that are connected with

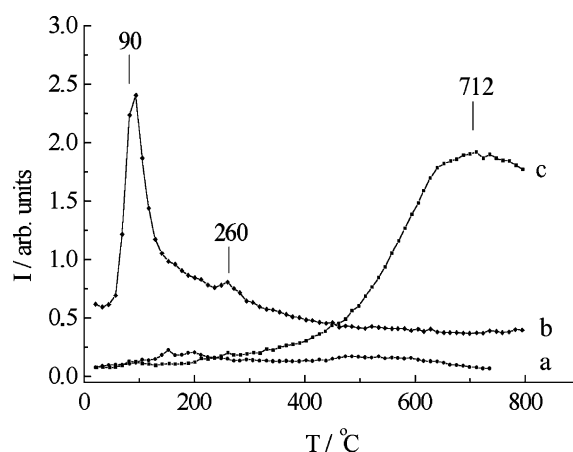


Fig. 6. TPD profiles of evolved (a) CO_2 ($m/z = 48$ amu), (b) H_2O ($m/z = 18$ amu) and (c) CO ($m/z = 28$ amu).

the destruction of oxygen-containing functional groups on the CNT surface. Two maxima at 260 and 617 °C could be referred to carboxylic and lactone functional groups, respectively [24]. The functional group of carboxylic acid anhydride dissociates to CO_2 and CO. In the TPD CO profiles the broad maximum at 712 °C could be assigned to phenol, carbonyl and ether functional groups [24].

3.3.3. IR-RAS spectroscopy

It is known that hexagonal graphite has D_{6h}^4 ($P6_3/mnc$) group symmetry [25]. The irreducible representation of the optical modes of the Brillouin zone centre of graphite are the follows:

$$\Gamma = 2E_{2g} + E_{1u} + 2B_{2g} + 2A_{2u}$$

According to selection rules, only antisymmetric vibrations (E_{1u} and A_{2u}) could be active in IR spectra. As usually, the E -modes determine the motions within the layer planes, the A and B modes are characterised by atomic displacements normal to the planes. The E_{1u} mode is IR-active polarised in the plane of the graphite

layer and located close to 1587 cm^{-1} . The A_{2u} mode is polarised in the perpendicular direction and located close to 868 cm^{-1} [25]. As usual, for graphite layer the u -modes are non-active due to the equivalent positions of carbon atoms in the layer, they become active in a 3-dimensional structure.

We suppose that the same types of vibrations could be manifested in spectra of multi-wall nanotubes. Due to the fact that according to [26], in the limit of large diameter, we can expect multi-wall carbon nanotubes to have the properties of graphite. FTIR spectra of initial and purified chlorine-containing carbon nanotubes are nearly the same. In both cases, we observed bands that could be assigned to the absorption of molecular groups of O–H (3460 cm^{-1}), C=O ($1740\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$); C=C ($1650\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$); C–H ($2900\text{--}3700, 1490\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$), as well as a broad band in the region of $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ assigned to C–O, C–C. The bands at 1741 cm^{-1} are characteristic of lactone (C–O–C=O)^{cycl.} and carboxylic (HO–C=O) groups. A number of weak bands in the region below 1000 cm^{-1} could be assigned to the absorption by collective modes of carbon nanotubes with participation of C–C, C–O bonds. Numerous vibrations of the chains of π -electrons of the tube probably take part in this process. As usual, we could observe bands near 1600 cm^{-1} that are connected with contamination and could not detect the bands that are assigned to graphite. So, all the bands that we register with IR-RAS belong to contamination of or defects in the nanotube structure.

The band positions for both measurement methods are negligibly different, but there are strong changes in intensity. Thus, in IR-RAS spectra of the chlorine-containing carbon nanotubes obtained from alcohol solution (Fig. 7, curve 2) and from aqueous solution

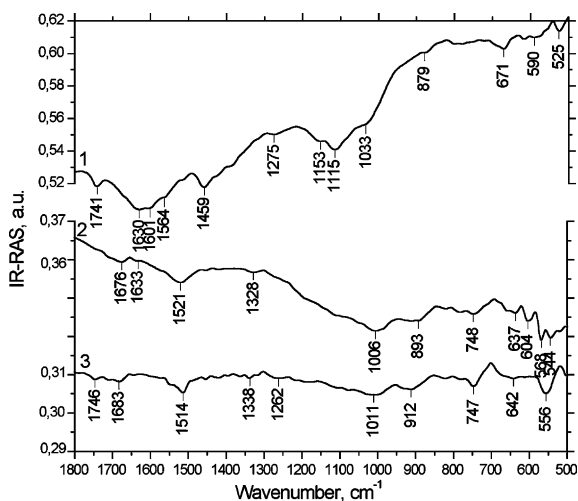


Fig. 7. IR-RAS spectra of soot (curve 1) and chlorine-containing carbon nanotubes from alcohol solution (2), from aqueous solution (3).

(Fig. 7, curve 3), have the following peak positions of the main bands on the gold surface: 893 (912), 748 (747), 637 (642), 568 (556), cm^{-1} (in parents, the bands of nanotubes obtained from aqueous solution are indicated). Such low frequency modes are characteristic of carbon polymers and are usually assigned to vibrations of large fragments of the molecule of a collective nature.

IR-RAS spectra show more bands due to the fact that the geometry in the reflectance mode or RAS spectroscopy detects preferentially polarised radiation [27]. The incident electric field interacts only with dipole moments which are parallel to electric field. Modes with dipole moments perpendicular to the direction of the incident electric field cannot not be excited and the corresponding vibrational modes became non-active in IR spectra. It should be noted that a different orientation of the nanotubes on the gold surface could lead to a change of position of the same mode for samples of different preparation conditions, or for a different orientation of the same sample. This could lead to a non-coincidence of IR-RAS data with conventional IR spectroscopy data for the samples in KBr pellets.

In Raman spectra of these multi-wall carbon nanotubes, only 2 wide bands at 1599 and 1300 cm^{-1} of the same intensity have been observed. This suggests the presence of different defects in the graphene layers in the nanotubes.

4. Conclusions

Synthesis of CNTs from CH_2Cl_2 has been performed by a template method that allows for the control of the length and diameter of the carbon tubes. The use of CH_2Cl_2 decreases the temperature of CNT pyrolytic synthesis in Al_2O_3 membranes to $400\text{ }^\circ\text{C}$. A small number of chlorine anions as well as oxygen-containing functional groups have been observed on the surface of the CNTs.

Acknowledgements

The authors are greatly indebted to Dr. Vladimir Romanyuk from Institute of Physics of Semiconductors of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev for the TEM pictures in Fig. 2.

References

- [1] Tenne R, Homyonfer M, Feldman Y. Nanoparticles of layered compounds with hollow cage structures (inorganic fullerene-like structures). *Chem Mater* 1998;10(11):3225–38.
- [2] Rao CNR, Seshadri R, Govindaraj A, Sen R. Fullerenes, nanotubes, onions and related carbon structures. *Mater Sci Eng Rep* 1995;15(6):209–62.

- [3] Terrones M, Hsu WK, Kroto HW, Walton DRM. Nanotubes—A revolution in materials science and electronics. *Fullerenes Relat Struct* 1999;199:189–234.
- [4] Hu JT, Odom TW, Lieber CM. Chemistry and Physics in one-dimension—synthesis and properties of nanowires and nanotubes. *Accounts Chem Res* 1999;32(5):435–45.
- [5] Ajayan PM. Nanotubes from carbon. *Chem Rev* 1999;99(7):1787–99.
- [6] Rakov EG. The methods of production of carbon nanotubes. *Successes Chem* 2000;69(1):41–59.
- [7] Laurent C, Peigney A, Rousset A. Synthesis of carbon nanotube Fe-Al₂O₃ nanocomposite powders by selective reduction of different Al₁₋₈Fe₀₋₂O₃ solid-solutions. *J Mater Chem* 1998;8(5):1263–72.
- [8] Kong J, Cassell AM, Dai HJ. Chemical-vapor-deposition of methane for single-walled carbon nanotubes. *Chem Phys Lett* 1998;292(4–6):567–74.
- [9] Terrones M, Grobert N, Zhang JP, Terrones H, Olivares J, Hsu WK, et al. Preparation of aligned carbon nanotubes catalyzed by laser-etched cobalt thin-films. *Chem Phys Lett* 1998;285(5–6):299–305.
- [10] Han CC, Lee JT, Yang RW, Chang H, Han CH. A new and easy method for making well-organized micrometer-sized carbon tubes and their regularly assembled structures. *Chem Mater* 1999;11(7):1806–13.
- [11] Yudasaka M, Kikuchi R, Ohki Y, Yoshimura S. Nitrogen-containing carbon nanotube growth from Ni phthalocyanine by chemical vapor deposition. *Carbon* 1997;35(2):195–201.
- [12] Brichka SYa, Prikhod'ko GP, Brichka AB, Ogenko VM, Chuiko AA. Matrix synthesis of N-containing carbon nanotubes. *Theor Exp Chem* 2002;38(2):107–9.
- [13] Han W, Bando Y, Kurashima K, Sato T. Fine-structure of boron-nitride nanotubes produced from carbon nanotubes by a substitution reaction. *Appl Phys Lett* 1998;73:3085–94.
- [14] Terrones M, Grobert N, Olivares J, Zhang JP, Terrones H, Kordatos K, et al. Controlled production of aligned-nanotube bundles. *Nature* 1997;388:52–5.
- [15] Sen R, Satishkumer BC, Govindaraj A, Harikumar KR, Raina G, Zhang J, et al. BsbondC—N, C—N and B—N nanotubes produced by the pyrolysis of precursor molecules over Co catalysts. *Chem Phys Lett* 1998;287(5–6):671–87.
- [16] Golberg D, Bando Y, Kurashima K, Sato T. MoO₃-promoted synthesis of multi-walled BN nanotubes from C-nanotube templates. *Chem Phys Lett* 2000;323(1–2):185–91.
- [17] Golberg D, Bando Y, Kurashima K. MoO₃ Large-scale synthesis and HRTEM analysis of single-walled B-doped and N-doped carbon nanotube bundles. *Carbon* 2000;38(14):2017–27.
- [18] Shyu YM, Hong FCN. Low-temperature growth and field emission of aligned carbon nanotubes by chemical vapor deposition. *Mater Chem Phys* 2001;72(2):223–7.
- [19] Kyotani T, Tsai LF, Tomita A. Preparation of ultrafine carbon tubes in nanochannels of an anodic aluminum-oxide film. *Chem Mater* 1996;8(8):2109–13.
- [20] Kyotani T, Pradhan BK, Tomita A. Synthesis of carbon nanotube composites in nanochannels of an anodic aluminum-oxide film. *Bull Chem Soc Jpn* 1999;72:1957–70.
- [21] Sui YC, Acosta DR, Gonzalez-Leon JA, Bermudez A, Feuchtwanger J, Cui BZ, et al. Structure, thermal stability, and deformation of multibranched carbon nanotubes synthesized by CVD in the AAO template. *J Phys Chem B* 2001;105:1523–7.
- [22] Frackowiak E, Gautier S, Gaucher H, Bonnamy S, Beguin F. Electrochemical storage of lithium multiwalled carbon nanotubes. *Carbon* 1999;37:61–9.
- [23] Boehm HP. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. *Carbon* 1994;32(5):759–69.
- [24] Figueiredo JL, Pereira MFR, Freitas MMA, Orfao JJM. Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* 1999;37:1379–89.
- [25] Nemanich RI, Lucovsky G. Infrared active optical vibrations of graphite. *Solid State Commun* 1977;23:117–20.
- [26] Saito R, Dresselhaus G, Dresselhaus MS. Physical properties of carbon nanotubes. Cambridge: Imperial College Press; 1998.
- [27] Ditchburn RW. *Light*. Moscow: Nauka; 1965.



Graphene Quantum Dots from Partially Unzipped Multi-Walled Carbon Nanotubes: Promising Materials for Oxygen Electrodes

M. O. Danilov,^{1,z} S. S. Fomanyuk,¹ G. I. Dovbeshko,² O. P. Gnatyuk,² I. A. Rusetskiy,¹ and G. Ya. Kolbasov¹

¹Institute of General and Inorganic Chemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv, 03142, Ukraine

²Institute of Physics of the NAS of Ukraine, Kyiv, 03028, Ukraine

Photoluminescent graphene quantum dots (GQDs) the one- or two-layer graphene nanoparticles 1.5–3 nm in size with a blue emission have been obtained from electrochemically synthesized partially unzipped multi-walled carbon nanotubes ultrasonically treated for one hour. Various physicochemical methods including photoluminescence spectroscopy, XRD, TEM, and Raman spectroscopy, have been used to characterize the electrochemically synthesized partially unzipped multi-walled carbon nanotubes and GQDs. Two-layer oxygen electrodes were fabricated, where GQDs served as an active layer. The investigations of electrocatalytic characteristics of the oxygen electrodes fabricated of the obtained materials were carried out in a fuel half-cell with an alkaline electrolyte. The fabricated oxygen electrodes were stable for six months at a discharge current density of 200 mA cm⁻². The obtained GQDs are promising materials as a new type of catalyst carriers for oxygen electrodes of fuel cells.
© 2021 The Electrochemical Society ("ECS"). Published on behalf of ECS by IOP Publishing Limited. [DOI: 10.1149/1945-7111/abf4b3]

Manuscript submitted December 10, 2020; revised manuscript received March 19, 2021. Published April 14, 2021.

A major problem in the construction of air/oxygen electrodes is the lack of efficient and stable catalytically active support. The most promising materials for the catalyst carrier are carbon materials.

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and graphene have similar physical, chemical and catalytic properties. For example, when a catalyst is applied onto these materials, its electrocatalytic properties increase dramatically.

By applying some oxidative treatment, it is possible to longitudinally unzip MWCNTs and to obtain graphene sheets with the appropriate number of layers.¹ By controlling the process of the MWCNTs unzipping, it is also possible to obtain the MWCNTs with a defective structure^{2,3} or so called disordered MWCNTs.⁴ The electronic properties of MWCNTs with an armchair structure were found to depend on the degree of unzipping.⁵ The literature describes various methods of MWCNTs unzipping, which differ only in the method of MWCNTs treatment leading either to nanotubes unzipping or creation of graphene quantum dots (GQDs). In,⁶ a method is reported for obtaining carbon nanocrystals emitting a strong blue luminescence after electrochemical treatment of MWCNTs. In our previous works, the possibility of controlled unzipping of MWCNTs was shown.^{7,8} The transformation of graphene sheets into graphene nanoribbons (1D), i.e. limiting them in one more dimension, leads not only to new effects, but also simplify their potential use in nanodevices, since usually graphene micron-sized (2D) sheets are too big. The attempts to solve these problems led to unexpected results: scientists suggested not to limit their interest in the graphene nanoribbons (1D), but to introduce a third "limitation" to obtain GQDs (0D) that is, nanometer pieces of graphene layers. But so far the existing methods for cutting graphene sheets are ineffective, and require to be replaced with more effective ones. Therefore, we investigated the most promising, in our opinion, method for the GQDs production by electrochemical synthesis of partially unzipped multi-walled carbon nanotubes (PUMWCNTs) with their subsequent ultrasonic disintegration.

Since GQDs are known for their strong luminescence, so we used photoluminescence spectroscopy to prove the proposed method results in the GQD.

Nowadays, light-emitting nanostructures are attracting a great attention of scientific community due to their wide application in optoelectronic devices,^{9,10} as biological markers¹¹ and in biomedicine.¹² Due to their compatibility with many living and nonliving forms, and their environmental friendliness, silicon and carbon nanostructures are preferred for many applications. The

nanostructured forms of carbon such as fullerenes, single and multi-walled carbon nanotubes have many properties that differ from those of bulk carbon analogs. However, these carbon nanostructures are not efficient light emitters, especially in the visible region. Some nanostructures have been reported to emit effectively in the visible range^{6,11,13} which shows the prospect in the development of effective carbon light emitters. Recently it has been reported that carbon nanotubes⁶ and graphene nanoparticles in special conditions¹³ do effectively emit light in the visible range. For example, quantum dots, i.e. nanoscale semiconductor particles, are able to emit photons with different wavelengths under the same excitation wavelength.¹⁴ This intriguing change of photoluminescent (PL) emission is called the small size effect. The development of GQD synthesis methods is a promising direction of research, since it allows one to obtain environmentally friendly photoluminescent materials for medical purposes.¹⁴ There are many methods for producing carbon nanoparticles by ultrasonic disintegration of nanographite and carbon black,¹⁵ electrochemical crushing of MWCNTs,⁶ graphene sheets crushing using a chemical reaction¹⁴ or microwave treatment in an acidic medium.¹⁶ Graphene nanoparticles and carbon nanotubes are of particular interest, since they have remarkable optical properties—the plasmon effect and blue photoluminescence (PL).^{17–19} Here we propose a new method for GQD fabrication by ultrasonic crushing of PUMWCNTs, in anticipation that the resulting GQDs will have different optical properties compared to those prepared by other methods. It is also of great interest to investigate the possibility of using the obtained GQDs as a catalyst carrier for oxygen electrodes of fuel cells a more promising material obtained from partially unzipped multi-walled carbon nanotubes, the so-called graphene quantum dots.

The aim of our work was to apply the electrochemical synthesis for preparation of PUMWCNTs with subsequent production of luminescent GQDs using ultrasonic disintegration technology, followed by their investigation as a potential electrode material for the construction of oxygen electrode of fuel cells.

Experimental

All chemical reagents were obtained from Aldrich (Gillingham, U.K.). MWCNTs for electrochemical anodic oxidation were provided by TMSpetsmash Ltd (Kyiv, Ukraine). The outer diameter of the MWCNTs was ~10–30 nm, and the specific surface area was 230 m² g⁻¹. The MWCNT bulk density was 25–30 g dm⁻³, the number of walls varied from 4 to 15. To remove the residues of a complex catalyst consisting of (SiO₂ + Al₂O₃ + Fe₂O₃ + MoO₃) from the nanotubes, they were pre-treated in heated hydrofluoric acid. For all chemical preparations bi-distilled water was used. As

^zE-mail: danilovmickle@rambler.ru

the hydrophobic layer, the conducting carbon black of P267E grade (Russia) was used.

The PUMWCNTs were prepared by anodic oxidation of the MWCNTs in a 150 ml glass flask in 80% sulphuric acid solution; while the mass fraction of MWCNTs was 1 g. As a reservoir for MWCNTs oxidation, an acid-proof bag was used. To press the MWCNTs to the anode the PTFE liners were used. As a cathode, a titanium electrode was used, while platinum plate served as an anode. Oxidation of the MWCNTs was performed in a galvanostatic mode.⁸ An Ag/AgCl electrode attached via a salt bridge was used as a reference electrode in these experiments. Oxidation of nanotubes was carried out at a potential of +3 V. The degree of unzipping of MWCNTs was controlled by the oxidation time. In our experiments, the oxidation time was 0, 0.5, 2.0 and 4.0 h.

To prepare the desired carbon nanomaterials, an ultrasonic probe device UZDN-1 (Russia) with a frequency of 22 kHz and a power of 340 W was used. To disintegrate the supplied powders, 0.1 g of carbon material and 50 ml of distilled water were used. As carbon nanomaterials, we used the MWCNTs with varying degree of unzipping achieved by electrochemical oxidation. The powders were ultrasonically treated for 1 hour at room temperature. Further, during 24 h, the sedimentation of large fractions of the carbon materials took place. Smaller fractions, consisting of smaller carbon nanoparticles, remained in the form of a yellowish colloidal aqueous solution. The obtained colloidal solutions and ground powders of carbon nanomaterials were used in optical and electrochemical experiments.

Two-layer oxygen electrodes were prepared by pressing hydrophobic layer and active layer on a nickel grid. The hydrophobic layer contained 0.07 g cm^{-2} of electrically conducting carbon black with 25% polytetrafluoroethylene addition, and the active layer contained 0.014 g cm^{-2} of the synthesized carbon materials with 5% polytetrafluoroethylene as a binder. During a pressing, a weighed portion of the active layer investigated material was pressed onto the surface of hydrophobic layer. A zinc anode was used in the fuel half-cell. The fuel half-cell for electrodes testing is described in.⁸ A 6 M KOH solution was used as an electrolyte. A silver chloride electrode connected through a salt bridge was used as a reference electrode. The electrochemical load characteristics were recorded in a galvanostatic mode. The study of the polarization curves has been carried

out using a standard three-electrode system with a IPS-Pro Volta (Russia) potentiostat. The electric current was set from zero to a testing value with 40 mA steps. At each current value, the corresponding potential was measured after 10 min. of holding the cell under the working current. Oxygen was synthesized in U-shaped electrolyser with the alkaline electrolyte. Oxygen was fed to the oxygen electrode at an overpressure of 0.01 MPa. Before measurements, an oxygen stream was passed for an hour through the open circuit of the fuel cell. We have compared the parameters of the oxygen electrodes made of the prepared CQDs with those of pristine MWCNTs containing deposited platinum black. The platinum was electrochemically deposited from aqueous solution consisting of 3% H_2PtCl_6 with 0.2% lead acetate (II) at the following conditions: voltage 1 V, duration 2.5 min. The current direction was changed every 30 s.

The morphology of the prepared carbon nanostructures has been studied using a JEM-100 CXII electron microscope. X-ray diffraction measurements have been carried out with a DRON-4 X-ray diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ radiation. Raman spectra were recorded using a T-64000 Horiba Jobin-Yvon triple grating spectrometer. Electronic absorption spectra were recorded with Perkin Elmer UV/VIS Lambda 35 spectrophotometer using $30 \mu\text{m}$ thick quartz slides. PL excitation and emission spectra were recorded in the region of 300–700 nm with Perkin Elmer LS 55 instrument, the light source was a xenon lamp (Xe).

Results and Discussion

Figure 1 shows the X-ray diffraction patterns of MWCNTs, PUMWCNTs after 4 h of oxidation, and GQDs obtained from PUMWCNTs after a 4-hour oxidation with subsequent ultrasonic disintegration. The XRD patterns of the prepared materials have shown that the diffraction peak near 10° , which is associated with graphene oxide, is absent in the observed X-ray diffraction patterns. The diffraction peak observed at 26° corresponds to the hexagonal plane of graphite (002) with an interlayer distance of 0.34 nm.²⁰ This peak confirms the long-range order and good crystallinity of MWCNTs and is due to the intact inner core of MWCNTs that did not delaminate during oxidation. The same position of the peaks 002, 004 of the basal planes and the two-dimensional (100) lattice

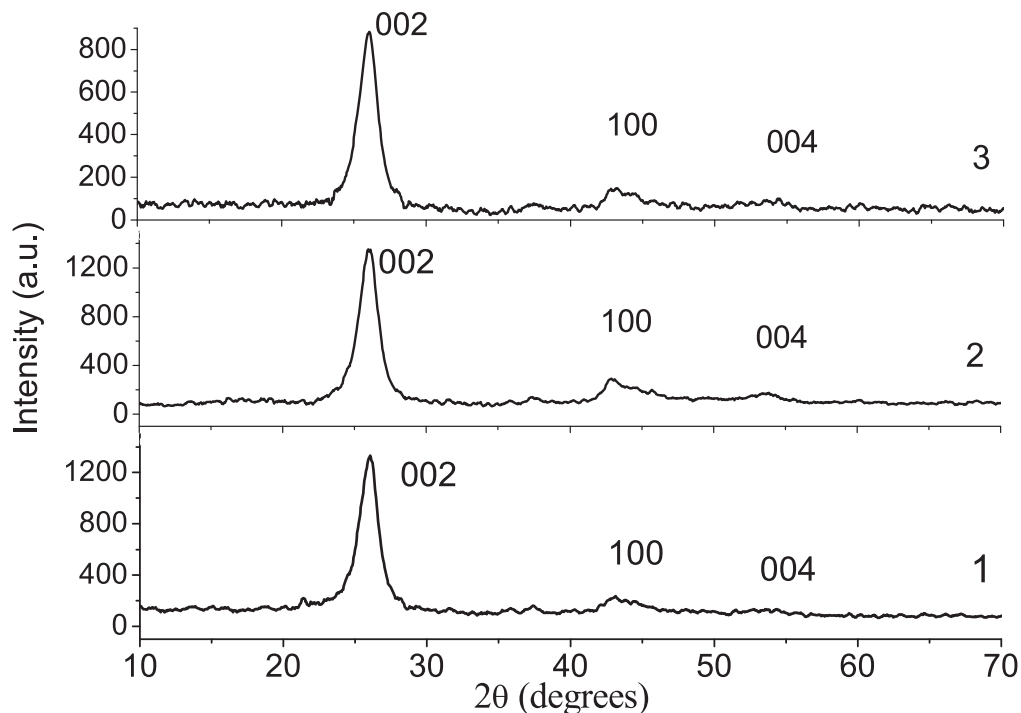


Figure 1. X-ray diffraction patterns of initial MWCNTs (1), PUMWCNTs after 4-hour oxidation (2) GQDs (3).

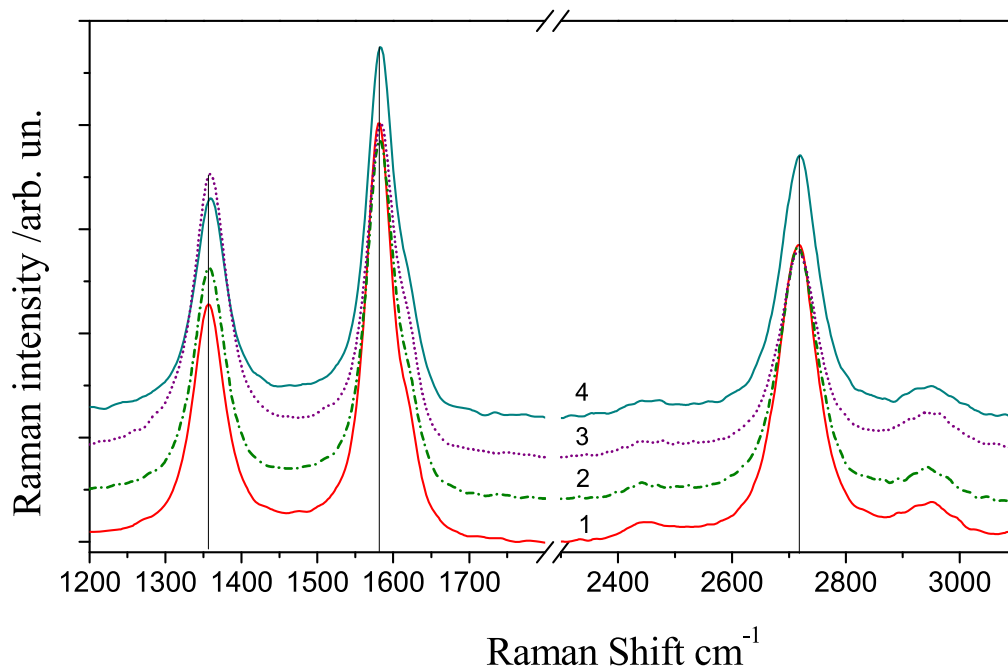


Figure 2. Raman spectra of oxidized MWCNTs after different time of electrochemical processing: 0, 0.5, 2.0 and 4.0 h ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, laser power 1 mW).

reflections observed for all three samples of carbon material in Fig. 1 indicates the invariability of the distance between carbon layers of graphite structures 3.44 \AA .²¹ According to the authors of,²¹ we identified peaks 002, 004 of the basal planes (basal planes (002), (004),) and the reflection from the two-dimensional plane (100) for the GQDs obtain from PUMWCNTs after 4 h of oxidation with subsequent ultrasonic disintegration (Fig. 1 pattern 3) which 3 indicates a decrease in the size of carbon domains and the number of their parallel layers. Initial MWCNTs (Fig. 1 XRD pattern 1) and PUMWCNTs after 4 h of oxidation (Fig. 1 XRD pattern 2) are practically identical in intensity. A slight increase in the width of the peaks for the PUMWCNTs after the 4-hour oxidation compared to initial MWCNTs may be the result of partial delamination of the edges of carbon nanotubes as a result of electrochemical treatment. Thus, based on the XRD results, it can be assumed that the use of electrochemical and ultrasonic treatment promotes a stratification of carbon nanotubes and a decrease in the size of carbon particles obtained using these synthesis methods.

To analyze the structure of the prepared carbon materials depending on MWCNT electrochemical treatment duration, the Raman spectroscopy has been used (Fig. 2).

In the Raman spectra we follow for marker bands of graphite-type materials, so called G mode, D-mode and 2D mode. The G-mode, so-called “graphite” mode of E_{1g} symmetry at the Γ point of the Brillouin zone was recorded near 1581 cm^{-1} for initial carbon nanotubes (Fig. 2). This mode corresponds to the tangential oscillation of the carbon atoms in π -conjugated rings of the graphene layer and the G-mode position in initial MWCNTs is close to that of a graphite structure at 1580 cm^{-1} indicates a perfect crystalline structure of the initial multiwalled nanotubes. A so-called D-mode is recorded for the original MWCNTs at 1358 cm^{-1} , and characterizes

a disordering in graphene multilayer structures. The D-mode registered in the Raman spectra of perfect hexagonal lattice graphite.^{22,23} This mode corresponds to the breathing of the π -conjugated rings of the graphene layer at the K point of the Brillouin zone. The relative intensity and the half-width (FWHM) of the D and the G band represent the degree of ordering of the graphite-like structure, the band broadening corresponds to a greater degree of disorder. Depending on the time of the MWCNTs processing, the I_G/I_D intensity ratio decreases in the order: original nanotubes, partially unzipped carbon nanotubes oxidized during 0.5, 2, and then 4 h (Table I). The character of a slight growth in the position of the G- from 1581 cm^{-1} for the original nanotubes to 1584 cm^{-1} for those after oxidation during 4 h, respectively, the half-width of the G-mode increases from 42.7 cm^{-1} to 45.6 cm^{-1} (while the D-mode halfwidth has no regular dependence), and a decrease of the I_G/I_D intensity ratio, demonstrate an increased disordering or stress strain of MWCNTs structure after processing. More detailed analysis of Raman spectra of PUMWCNTs was done on average spectra in our previous paper.²⁴

The TEM micrographs show the morphology of the initial MWCNTs and the prepared PUMWCNTs (Figs. 3a–3c). As follows from the analysis of the above micrographs, after 2-hour anodic oxidation of MWCNTs (Fig. 3b), the nanotubes are broken and unzipped producing nanoribbons of graphene-like material. On the photomicrograph (Fig. 3b), arrows indicate where particles of 0.4, 0.5, 1, 1.5, and 2 nm are located. With increasing anodic oxidation time up to 4 h, further unzipping and shredding of the graphene-like nanoribbons occurs with the formation of fragments of partially unzipped graphene nanoribbons (Fig. 3c). Thus, during the anodic oxidation of MWCNTs, their gradual unzipping proceeds occur, the unzipping degree being dependent on the time of anodic treatment.⁸

Table I. Raman parameters of D and G modes for MWCNTs before and after oxidation.

Samples	Frequency D, cm^{-1}	Halfwidth D, cm^{-1}	Frequency G, cm^{-1}	Halfwidth G, cm^{-1}	Ratio G/D
0	1357	48.1	1581	42.7	1.76
0.5	1358	47.9	1582	45.5	1.55
2	1359	49.9	1584	48.0	1.18
4	1360	48.1	1584	45.6	1.69

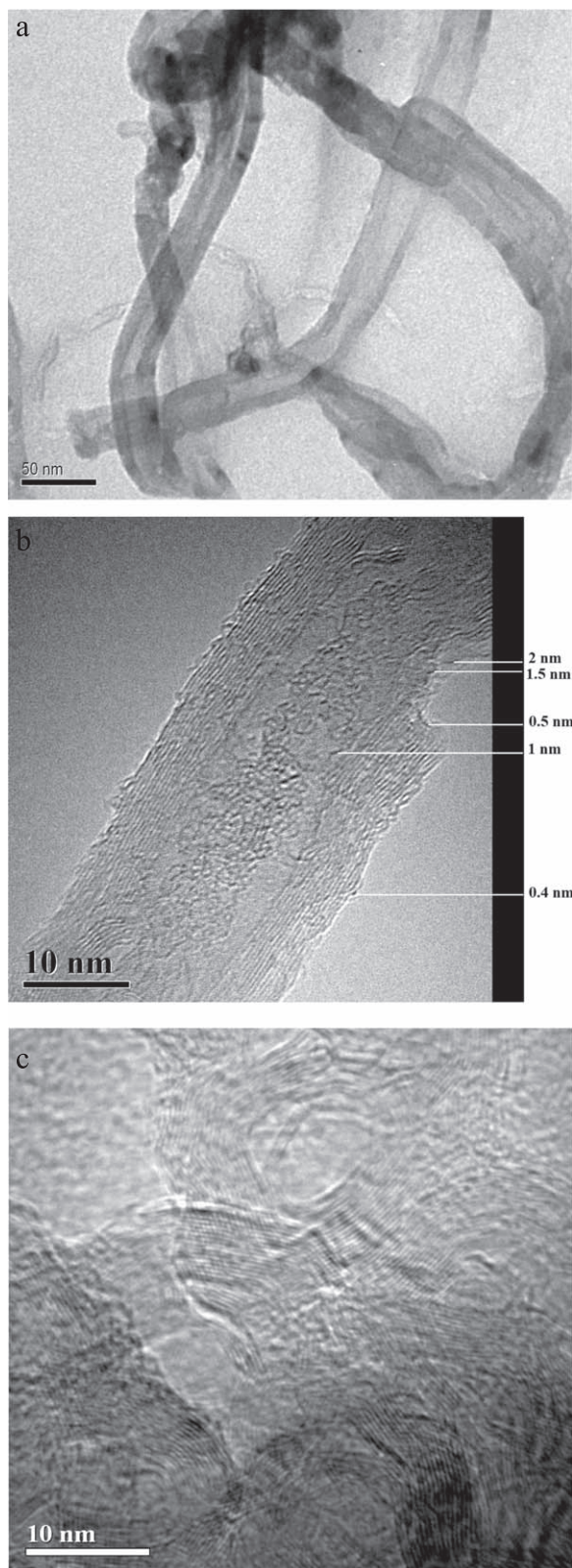


Figure 3. TEM micrographs of (a) initial MWCNTs, and PUMWCNTs after (b) two and (c) four h of anodic oxidation.

Figure 4 shows the results of PL studies of the PUMWCNTs and GQD samples after ultrasonic treatment. Namely, a blue PL emission from the colloidal carbon nanotube solution is observed in the 400–430 nm regions (Figs. 4a–4c) upon excitation with the wavelengths of 220, 255 and 320 nm. With the PL studies, it was

shown that the increase in the PUMWCNTs luminescence intensity depends on the degree of their unzipping which appeared to be more after 4-hour oxidation and ultrasonic treatments (Fig. 4b) while the shape and positions of the PL emission bands remain practically the same. The authors of¹⁵ suppose that the PL emission from carbon nanoparticles is due to the edge and internal structural defects in carbon nanoparticles. We observed the maximum of the PL emission band (Figs. 4a–4c) at 400 nm, and the PL excitation (PLE) spectrum shows the excitation band centered at 220–240 nm with a shoulder at 257 nm and the broad band at 320 nm. A wide excitation band at 220–240 nm with a shoulder of 257 is attributed to the interband π - π^* transition being a signature of sp^2 hybridized electronic orbitals.¹⁷ For bilayer graphene nanoparticles and single-walled carbon nanotubes with a decrease in diameter from 3 to 1 nm, the peak at 240 nm shifts to 206 nm.¹⁸

Based on these data, the size the carbon nanoparticles in our experiment could be estimated as equal to 1.5–3 nm. The PL excitation band centered at 320 nm is caused by the C=O/COOH, OH, and C–O–C terminal groups of carbon nanoparticles.¹⁹ Typically, for carbon nanoparticles this band is observed at 350–360 nm,²⁵ but in the case of one- or two-layer carbon nanoparticles with a lateral distance of 0.5–1.3 nm, it shifts to 320 nm.^{26–28} Accordingly, it can be concluded that during the ultrasonic treatment in colloidal aqueous solution, the one- or two-layer carbon nanoparticles of small size 1.5–3 nm are mainly produced (Fig. 3b). In the studied samples, after the MWCNTs unzipping, there are both small graphene particles of up to a dozen nm in size, the so-called nanodots, and large fragments—about μm and more, as well as oxidized forms of graphene particles—graphene oxide particles. It is known that CNTs display luminescent properties in the wavelength range of above 1 μm . Graphene does not luminescence under normal conditions, however, small graphene nanoparticles (about several or tens nanometers in size, usually no more than 20 nm) are characterized with blue PL, which spectral position, as a rule, does not depend on the excitation wavelength^{29,30} but its intensity decreases with increasing excitation wavelength.

Our PL experiments revealed similar features for all PUMWCNTs samples obtained after 2 and 4 h of anodic oxidation. Regardless of the excitation wavelength (220 nm and/or 320 nm), we observed the PL emission band near 400 nm with intensity falling when increasing excitation wavelength (or decreasing the exciting quantum energy). The position of the PL emission maximum is higher in energy than in the case of Ref. 29 but we believe that the latter is due to the fact that our graphene nanoparticles are curved and have curled edges, since they are the result of exfoliation from the walls of MWCNTs with a diameter of 2–40 nm and are possibly strained. At only one excitation wavelength (255 nm), the recorded PL spectrum had a flat region at its maximum (practically a plateau from 400 nm to 450 nm). We believe that this is due to the fact that, in addition to GQDs, all samples contained oxidized small particles of nanotubes or oxidized forms of graphene, and only with resonance π - π^* excitation (255 nm) they can make a dominant contribution to the PL emission at 450 nm. Namely, upon excitation with 220 and 320 nm, the blue photoluminescence (Fig. 5) was observed in the samples with a maximum near 400 nm (395–398 nm) and contributions at 449–455 nm, 488–494 nm, and 298–320 nm, respectively. Under excitation with a wavelength 255 nm, a broad maximum was observed in the region of 398–452 nm, 494 and 547. Almost all spectra showed the same component bands but with different contributions. That is why we present here only the data for one sample. The PL bands with maxima at 449–455 nm, 488–494 nm, and 524–547 nm can be attributed to different defects in oxidized forms of graphene. With a difference of 1–2 nm due to an error in determining the position of the wavelength maximum one could consider this as one state. With a difference of 10 nm, this is most likely different but close energy states, although inaccuracy in the deconvolution cannot be ruled out. We believe that deconvolution of the PL emission band of other samples will give similar results in relation to contribution from different carbon nanostructures.

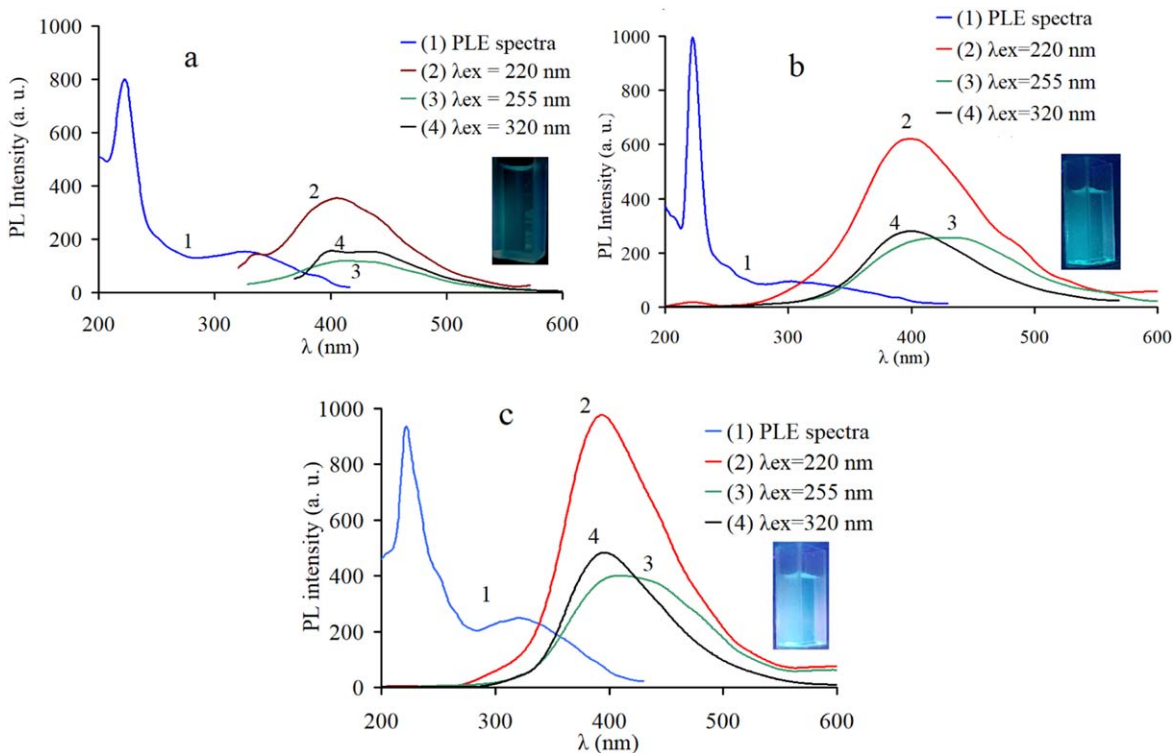


Figure 4. PL excitation and emission spectra of (a) initial MWCNTs; (b), (c) PUMWCNTs exposed to (b) two- and (c) four-hour oxidation after 1-hour ultrasonic treatment. The sample was prepared as 50 ml aqueous suspension of 0.1 g powder material. The excitation wavelength used are 220, 255, and 320 nm.

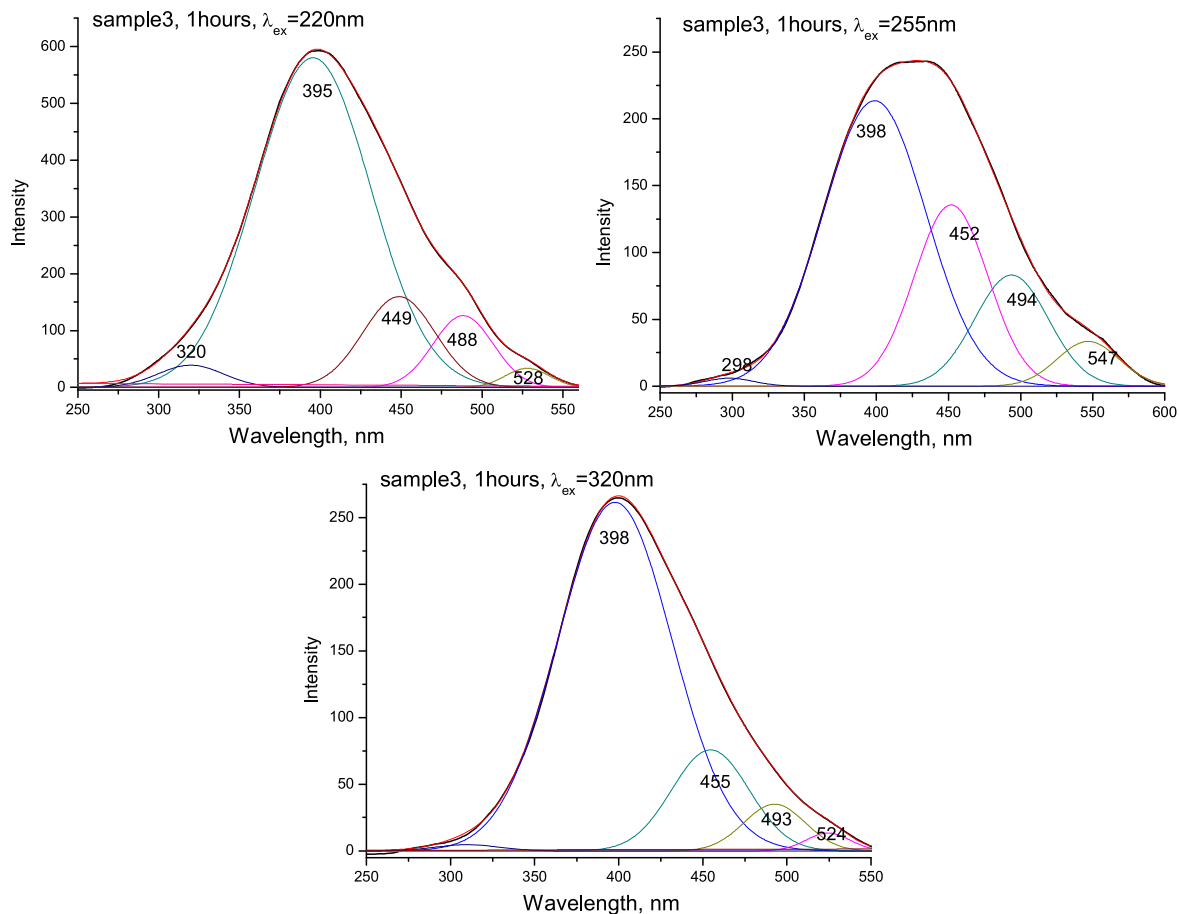


Figure 5. Deconvolution of the PL spectra of MWCNTs after anodic oxidation and ultrasonic treatment at 340 W during 1 hour. The sample was prepared as 50 ml aqueous suspension of 0.1 g powder material. The excitation wavelengths used are 220, 255, and 320 nm. PL spectra are the same as in Fig. 4b.

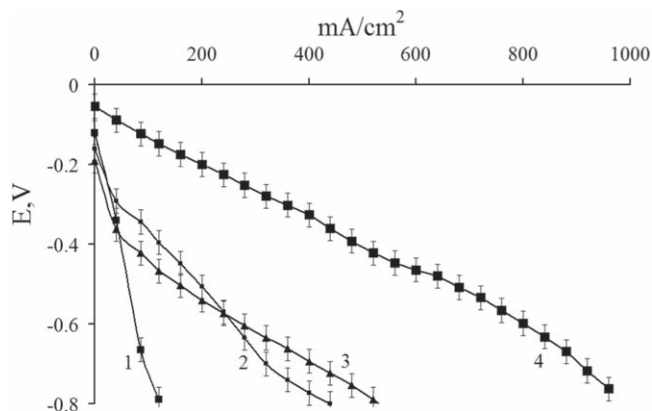


Figure 6. Polarization curves for oxygen electrodes with an active layer of different carbon nanotubes (1)—MWCNT; (2)—PUMWCNTs after 4-hour oxidation; (3)—GQDs; (4)—MWCNTs with deposited Pt in amount of 10 wt.%.

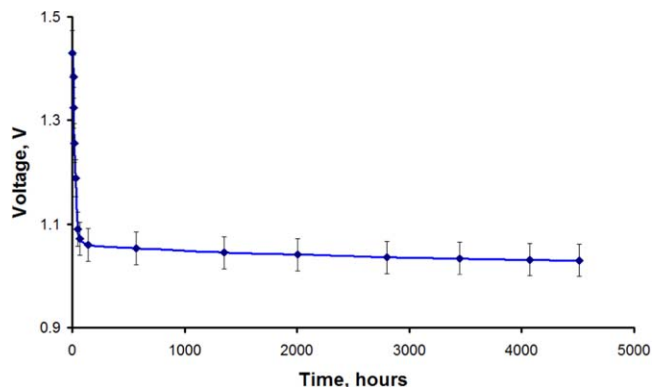


Figure 7. Long-term tests of a two-layer oxygen electrode with an active layer consisting of 0.02 g cm^{-2} GQDs produced from PUMWCNTs coupled with a zinc anode under constant operating current density at an oxygen electrode of 200 mA cm^{-2} .

Recently, zero-dimensional GQDs have received considerable attention as a new type of quantum dot because of their unique electronic and opto-electronic properties. Unlike two-dimensional graphene, GQDs have a band gap because of quantum confinement and exhibit strong photoluminescence.²⁹ Some studies have demonstrated the possibility of tailoring the band gap or PL emission of GQDs. In principle, the band gap of GQDs is highly influenced by their size due to the quantum confinement effect that highlights when their diameter is less than 10 nm. Ritter et al.³¹ and Lu et al.³² demonstrated the size dependence of the GQDs' band gap using scanning tunneling spectroscopy experiments. These authors clearly demonstrated that the band gap of the GQDs increases as the size of the GQDs decreases. Peng et al.³³ also reported that the PL emission of the GQDs is blue shifted when their size is decreased because of the increased band gap of the GQDs. Another route to tune the band gap of GQDs is through chemical functionalization. Gupta et al.³⁴ demonstrated that the PL emission from the GQDs was shifted by functionalizing the GQDs, but the underlying mechanism of the shift was unclear. Zhu et al.³⁵ also reported that the PL shift resulting from the chemical functionalization can be explained by suppression of the defect state emission, thereby allowing the intrinsic state emission from the band gap of the GQDs to play a leading role in the PL emission.

Figure 6 shows the dependence of the current density on the potential value for oxygen electrodes prepared of MWCNTs (Fig. 6 curve 1), PUMWCNTs after 4-hour oxidation (Fig. 6 curve 2), and GQDs produced from PUMWCNTs after 4-hour oxidation (Fig. 6

curve 3) compared to that of MWCNTs with deposited platinum (Fig. 6 curve 4). It was found that the GQDs formed by ultrasonic treatment from PUMWCNTs after 4-hour oxidation markedly improve the electrochemical characteristics of the oxygen electrodes (an increased current density at the same potential value) (Fig. 6 curve 3). This indicates a change in the structure and specific surface area of the studied materials. The obtained results show that the GQDs produced from PUMWCNTs without supported catalyst are catalytically active materials for the manufacture of oxygen electrodes, which follows from a comparison of their characteristics with the electrodes based on MWCNTs with deposited platinum (Fig. 6 curve 4). Therefore, when deposit a catalyst, such materials can be promising as a catalyst carrier for oxygen electrodes. This is proved by experiments on long-term operation of the fuel half-cell at a constant current density applied to the oxygen electrode for 6 months with a 10 h night rest period with an open circuit. Flat discharge curve in Fig. 7 shows that during the investigated operating time of the oxygen electrode, no destruction and aging of the electrode material from graphene quantum dots is observed. This discharge curve also shows that no aggregation or enlargement of graphene quantum dots occurs. It is worth to mention that the produced materials were stable over six months subject to testing in the fuel half-cell by galvanostatic mode at current density of 200 mA cm^{-2} on the oxygen electrodes.

Conclusions

We have proposed a simple method for producing GQDs by ultrasonic disintegration of PUMWCNTs. With XRD, TEM, Raman and PL spectroscopy methods it has been shown that during ultrasonic disintegration, the GQDs, presumably, the one or two-layer curved graphene nanoparticles with a size of 1.5–3 nm are obtained as a result of their exfoliation from the walls of the PUMWCNTs. The blue PL emission from the GQDs has been observed that confirms their formation under the applied synthesis route.

The oxygen electrodes prepared of the obtained GQDs were stable for six months at a discharge current density of 200 mA cm^{-2} . The obtained GQDs are promising materials as a new type of catalyst carriers for oxygen electrodes of fuel cells.

Acknowledgments

We are thankful to Dr. A. Nikolenko from V.E. Lashkaryev Institute of Semiconductor Physics of NAS of Ukraine for Raman measurements.

ORCID

M. O. Danilov <https://orcid.org/0000-0002-3765-9250>
 S. S. Fomanyuk <https://orcid.org/0000-0001-9844-8855>
 G. I. Dovbeshko <https://orcid.org/0000-0002-7701-0106>
 O. P. Gnatyuk <https://orcid.org/0000-0003-4406-5503>

References

- M. O. Danilov, I. A. Slobodyanyuk, I. A. Rusetskii, and G. Y. Kolbasov, *Graphene Science Handbook: Fabrication Methods*, ed. M. Aliofkhaizraei et al. (CRC Press/Taylor & Francis, London/New York) p. 205 (2016).
- R. J. Young, I. A. Kinloch, L. Gong, and K. S. Novoselov, *Compos. Sci. Technol.*, **72**, 1459 (2012).
- D. Torres, J. L. Pinilla, R. Moliner, and I. Suelves, *Carbon*, **8**, 405 (2015).
- C. Tang, W. Guo, and C. Chen, *Physical Review B*, **83**, 075410 (2011).
- B. Huang, Y.-W. Son, G. Kim, W. Duan, and J. Ihm, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17919 (2009).
- J. Zhou, C. Booker, R. Li, X. Zhou, T.-K. Sham, X. Sun, and Z. Ding, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 744 (2007).
- M. O. Danilov, I. A. Rusetskii, I. A. Slobodyanyuk, G. I. Dovbeshko, O. Y. Khyzhun, V. V. Strelchuk, and G. Y. Kolbasov, *Fuel cells*, **19**, 202 (2019).
- M. O. Danilov, I. A. Rusetskii, G. I. Dovbeshko, S. S. Fomanyuk, and G. Y. Kolbasov, *ECS Trans.*, **95**, 273 (2019).
- A. J. Bard, Z. Ding, and N. Myung, *Semiconductor Nanocrystals and Silicate Nanoparticles. Structure and Bonding*, ed. X. Peng and D. M. P. Mingos (Springer, Berlin, Heidelberg) vol. 118 (2005).

10. K. Hutchison, J. Gao, G. Schick, Y. Rubin, and F. Wudl, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5611 (1999).
11. Y. Lin, B. Zhou, R. B. Martin, K. B. Henbest, B. A. Harruff, J. E. Riggs, Z.-X. Guo, L. F. Allard, and Y.-P. Sun, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 14779 (2005).
12. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, *Science*, **307**, 538 (2005).
13. V. Boiko, R. Tomala, O. Posudievsky, V. Moiseienko, G. Dovbeshko, and W. Strek, *Opt. Mater.*, **101**, 109744 (2020).
14. G. Zhang and X. Sun, *Graphene Science Handbook: Size-Dependent Properties*, ed. M. Aliofkhazraei et al. (CRC Press/Taylor & Francis, London/New York) p. 27 (2016).
15. L. Lu, Y. Zhu, C. Shi, and Y. Pei, *Carbon*, **109**, 373 (2016).
16. L. L. Li, J. Ji, R. Fei, C. Z. Wang, Q. Lu, J. R. Zhang, L. P. Jiang, and J. J. Zhu, *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 2971 (2012).
17. A. N. Emam, A. L. Samah, A. M. Amany, H. Awad, and B. M. Mona, *RSC Adv.*, **7**, 23502 (2017).
18. G. A. Rance, D. H. Marsh, R. J. Nicholas, and A. N. Khlobystov, *Chem. Phys. Lett.*, **493**, 19 (2010).
19. D. Pan, Z. Li, and M. Wu, *Adv. Mater.*, **22**, 734 (2009).
20. R. C. Shende and S. Ramaprabhu, *Solar Energy Materials & Solar Cells*, **157**, 117 (2016).
21. K. Jurkiewicz, M. Pawlyta, and A. Burian, *Journal of Carbon Research C*, **4**, 68 (2018).
22. A. C. Ferrari and J. Robertson, *Physical Review B*, **61**, 14095 (2000).
23. G. I. Dovbeshko, O. P. Gnatyuk, A. N. Nazarova, Y. I. Sementsov, and E. D. Obratsova, *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures.*, **13**, 393 (2005).
24. M. O. Danilov, G. I. Dovbeshko, I. A. Rusetskiy, V. I. Pekhnyo, A. S. Nikolenko, and G. Y. Kolbasov, *Applied Physics A*, **126**, 764 (2020).
25. B. Wu, R. Zhu, M. Wang, P. Liang, Y. Cian, and S. Wang, *J. Mater. Chem. B.*, **5**, 7796 (2017).
26. Y. Dong, J. Shao, C. Chen, H. Li, R. Wang, Y. Chi, X. Lin, and G. Chen, *Carbon*, **50**, 4738 (2012).
27. G. L. Hong, H. L. Zhao, H. H. Deng, H. J. Yang, H. P. Peng, Y. H. Liu, and W. Chen, *Int. J. Nanomedicine*, **13**, 4807 (2018).
28. S. Wang, Z.-G. Chen, I. Cole, and Q. Li, *Carbon*, **82**, 304 (2015).
29. S. H. Jin, D. H. Kim, G. H. Jun, S. H. Hong, and S. Jeon, *ACS Nano*, **7**, 1239 (2013).
30. Y. Dong, J. Shao, C. Chen, H. Li, R. Wang, Y. Chi, X. Lin, and G. Chen, *Carbon*, **50**, 4738 (2012).
31. K. A. Ritter and J. W. Lyding, *Nat. Mater.*, **8**, 235 (2009).
32. J. Lu, P. S. E. Yeo, C. K. Gan, P. Wu, and K. P. Loh, *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 247 (2011).
33. J. Peng et al., *Nano Lett.*, **12**, 844 (2012).
34. V. Gupta, N. Chaudhary, R. Srivastava, G. D. Sharma, R. Bhardwaj, and S. Chand, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9960 (2011).
35. S. Zhu et al., *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 4732 (2012).

Висновки до розділу 3

1. Визначено спектральні маркери (ГЧ та Раман) різних типів вуглецевих структур з метою їх подальшого використання для аналітичних задач та для контролю технологічних процесів синтезу наноструктур. Раман спектроскопія може бути використана для визначення ступеня розупорядкування вуглецевих матеріалів, а також для визначення діаметра вуглецевих нанотрубок та для визначення кількості шарів у графенових наноструктурах. Спектри SEIRA можуть ефективно виявляти наявність забруднень у вуглецевих матеріалах чи залишки продуктів реакції при їх синтезі, а також ступінь окислення.
2. Показано можливість утворення графенових квантових точок розміром 1,5–3 нм шляхом їх відшарування зі стінок частково розкритих багатостінних вуглецевих нанотрубок в результаті тривалої ультразвукової обробки (впродовж 1 години). Отримані таким чином квантові точки мають люмінесцентні властивості, а також є перспективними матеріалами для кисневих електродів.

Розділ 4

Спектральні маркери ліпідів з пухлинних тканин та модельних ліпосом різного складу при взаємодії з протипухлинними препаратами

УДК 616-006.6:577.352.333:615.277.3

В. Ф. ЧЕХУН¹, В. П. ТРИНДЯК¹, І. М. ТОДОР¹, В. М. МИХАЙЛЕНКО¹,
І. Г. КОНДРИЧИН¹, Г. І. ДОВБЕШКО², О. П. РЕПНИЦЬКА², Г. І. КУЛИК¹

ВМІСТ ФОСФОЛІПІДІВ ТА ХОЛЕСТЕРОЛУ У ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАНАХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ІЗ РІЗНОЮ ЧУТЛИВІСТЮ ДО ДОКСОРУБІЦИНУ

Целью данной работы было изучение качественного и количественного состава фосфолипидов, содержания холестерина и индекса ненасыщенности липидов плазматических мембран в чувствительных и резистентных к действию доксорубицина клетках карциномы Герена. Установлено, что в резистентных клетках по сравнению с чувствительными наблюдается увеличение количества общего холестерина и уменьшение уровня ненасыщенности жирных кислот. При анализе ³¹P-ЯМР спектров индивидуальных фосфолипидов плазматической мембраны было показано, что в резистентном к доксорубицину штамме карциномы Герена уровень фосфатидилсерина и сфингомиелина выше, чем в чувствительном. Достоверные различия между плазматическими мембранами двух штаммов в количестве фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола не установлены. Обнаруженные нами изменения в составе липидов плазмалеммы резистентных клеток обуславливают увеличение их микровязкости, что, возможно, приводит к уменьшению проникновения доксорубицина в цитоплазму и накоплению его внутри клеток. Кроме того, повышение содержания фосфатидилсерина в мембранах резистентного штамма может быть предпосылкой активации выведения цитотоксичных веществ из клеток с участием Р-гликопротеина.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фосфолипиды, карцинома Герена, лекарственная устойчивость, плазматическая мембрана.

Резистентність пухлин до лікарських препаратів є однією з актуальних проблем сучасної онкології. Виявлення механізмів виникнення резистентності пухлинних клітин сприятиме ефективному пошуку шляхів її подолання. В попередніх дослідженнях [1] із використанням флуоресцентних зондів нами було встановлено структурно-функціональні відмінності між плазматичними мембранами чутливих та резистентних до доксорубіцину клітин карциноми Герена, а також показано, що плазматичні мембрани резистентного штаму характеризуються більшою мікров'язкістю порівняно з чутливим. Відомо, що мікров'язкість мембран залежить від якісного та кількісного складу ліпідів (зокрема фосфоліпідів), які їх формують, і кількості в них холестеролу [2, 3]. Крім того, з фосфоліпідами пов'язана активність Р-глікопротеїну, який бере безпосередню участь у виведенні токсичних агентів із клітин під час реалізації феномену множинної лікарської резистентності [4, 3]. Згідно з даними літератури, відомості щодо складу фосфоліпідів плазматичних мембран, виділених із резистентних та чутливих до протипухлинних препаратів злоякісних клітин, досить обмежені [5–7]. Крім того, ці дослідження здійснені лише на культурі клітин, а за таких умов не береться до уваги важливий зв'язок між пухлиною та організмом, що обмежує вивчення механізмів реалі-

зації природної та набутої резистентності. Тому в цій роботі ми вивчали вміст холестеролу, якісний та кількісний склад фосфоліпідів, а також індекс ненасиченості ліпідів плазматичних мембран клітин карциноми Герена, чутливих і резистентних до доксорубіцину.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на 75 щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 120–160 г розведення експериментальної бази Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, яким перещеплювали під шкіру ($2,5 \cdot 10^6$ клітин/тварину) чутливу або резистентну до доксорубіцину солідну карциному Герена. Набуття резистентності карциноми Герена до доксорубіцину відбувалося внаслідок послідовних перещеплень щурам клітин пухлини, яку одержували від тварин після проведення курсу терапії доксорубіцином (сумарна доза 7,5 мг/кг) [8].

Препарат вводили щурам внутрішньочеревинно 5 разів через добу. Сумарна доза його становила 9,5 мг/кг. Ін'єкції розпочинали на 9–11-й день після перещеплення пухлини.

Зразки пухлинної тканини брали у тварин, які перебували під легким ефірним наркозом. Плазматичні мембрани клітин пухлин виділяли методом диференційного ультрацентрифугуван-

ня у градієнті густини сахарози [9], після чого екстрагували з них фосфоліпиди методом двофазної екстракції як описано в роботі [10].

Якісний і кількісний склад фосфоліпідів визначали методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопії [10, 11]. ^{31}P -спектри записували на ЯМР-спектрометрі Mercury-300BB («Varian», США) на частоті хвилі 121,46 МГц. Для кожного спектра реєстрували 500–800 сканів із використанням 45° -го імпульсу та розв'язкою від протонів, час на релаксацію становив 2,4 с, а величина відношення сигнал/шум – понад 100. Екстракти аналізували при кімнатній температурі, сигнали ідентифікували за їхніми хімічними зміщеннями. Сигнал фосфатидилхоліну вважали за 0,00 мільйонних частин (м.ч.) і використовували як внутрішній стандарт для калібрування хімічних зміщень у ^{31}P -спектрах фосфоліпідів. На рис. 1 наведено типовий спектр фосфоліпідів плазматичних мембран клітин карциноми Герена. Основні резонансні лінії у спектрі належать мажорним фосфоліпідам (м.ч.): фосфатидилхоліну (0,00), фосфатидилсерину (0,74), фосфатидилетаноламіну (0,83) та плазمالогенам фосфатидилетаноламіну (0,87). У спектрі виявлено також резонансні лінії мінорних фракцій мембранных фосфоліпідів: фосфатидилінозитолу (0,54 м.ч.) та сфінгомієліну (0,65 м.ч.). Кількісне визначення фосфоліпідів здійснювали, обчислюючи інтегральні площини сигналів і використовуючи пакет прикладних комп'ютерних програм VNMR, («Varian», США).

Вміст загального холестеролу визначали методом газорідинної хроматографії (хроматограф «Carlo Erba», Італія) на 0,5-метрових скляних

колонках, наповнених 1,5%-м OV-1 на фазі Chimalite W (80-100 меш) фірми «Shimadzu seikashu» (Японія) при 250°C [12].

Дослідження інфрачервоних спектрів (ІЧ-спектрів) фосфоліпідів проводили на серійному спектрометрі IFS-48 («Bruker», Німеччина) з використанням приставки на відбивання. Як основу використовували скляні пластинки з напиленням шаром золота товщиною 20–50 нм [13].

Вміст подвійних зв'язків (індекс ненасиченості) визначали в екстракті мембранных ліпідів, приготовленому методом Фолча, на аналізаторі подвійних зв'язків (модель DBA, Росія). Визначення їх ґрунтується на обчисленні кількості озону, яка витрачається на окислення ненасичених ліпідів, передусім подвійних зв'язків поліненасичених жирних кислот. При цьому кількість озону визначається методом УФ-спектроскопії за довжини хвилі 250–310 нм [14].

Статистичне оброблення одержаних даних здійснювали з використанням *t*-критерію Стюдента.

Результати та обговорення

Дані проведених досліджень свідчать, що вміст холестеролу у плазматичних мембранах клітин резистентного штаму вірогідно вищий ($p < 0,05$) порівняно з клітинами чутливої пухлини (рис. 2). Таке підвищення рівня холестеролу може спричинювати збільшення мікрров'язкості плазматичних мембран клітин, резистентних до доксорубіцину, що узгоджується з попередніми нашими експериментами, в яких використовували флуоресцентні зонди [1], та даними літератури [2, 3]. Відомо, що мікрров'язкість мембран істотно зале-

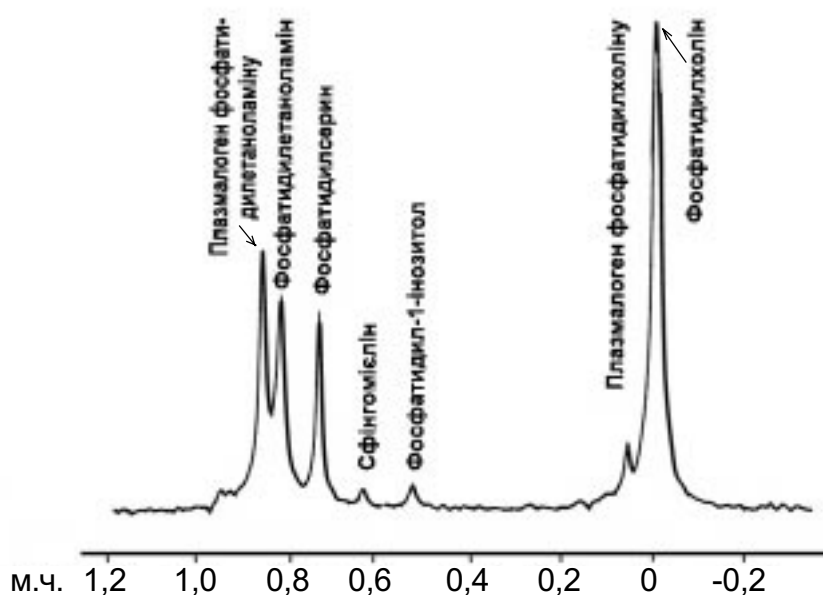


Рис. 1. ^{31}P -ЯМР-спектр фосфоліпідів плазматичної мембрани карциноми Герена.

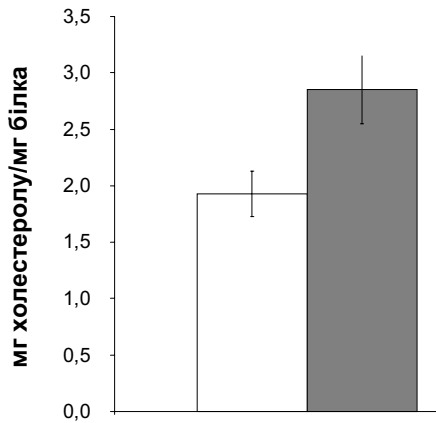


Рис. 2. Кількість холестеролу у плазматичній мембрані клітин чутливого та резистентного до доксорубіцину штамів карциноми Герена: □ – мембрана чутливих до препарату клітин; ■ – мембрана резистентних до препарату клітин.

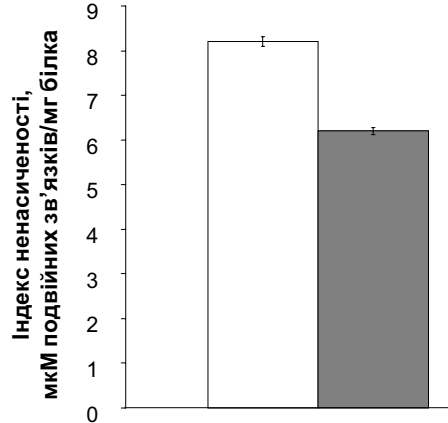


Рис. 3. Індекс ненасиченості ліпідів плазматичних мембран клітин чутливого та резистентного до доксорубіцину штамів карциноми Герена: □ – мембрана чутливих до препарату клітин; ■ – мембрана резистентних до препарату клітин.

жить від рівня ненасиченості їхніх жирних кислот. Тому ми досліджували рівень ненасиченості останніх, використовуючи два підходи.

За допомогою аналізатора подвійних зв'язків, нами також було встановлено (рис. 3), що індекс ненасиченості загальних ліпідів у плазмі резистентних клітин нижчий, ніж у чутливих. Отже, зменшення ненасиченості ліпідів сприятиме збільшенню мікров'язкості мембран.

Оскільки на цьому приладі визначають сумарну кількість подвійних зв'язків як у жирних кислотах фосфоліпідів, так і в холестеролі, для оцінки вмісту α - та β -ненасичених жирних кислот у фосфоліпідах нами додатково було застосовано модифікований високочутливий метод ІЧ-спектроскопії [12, 13].

ІЧ-спектри фосфоліпідів, екстрагованих із плазматичних мембран клітин чутливих і резис-

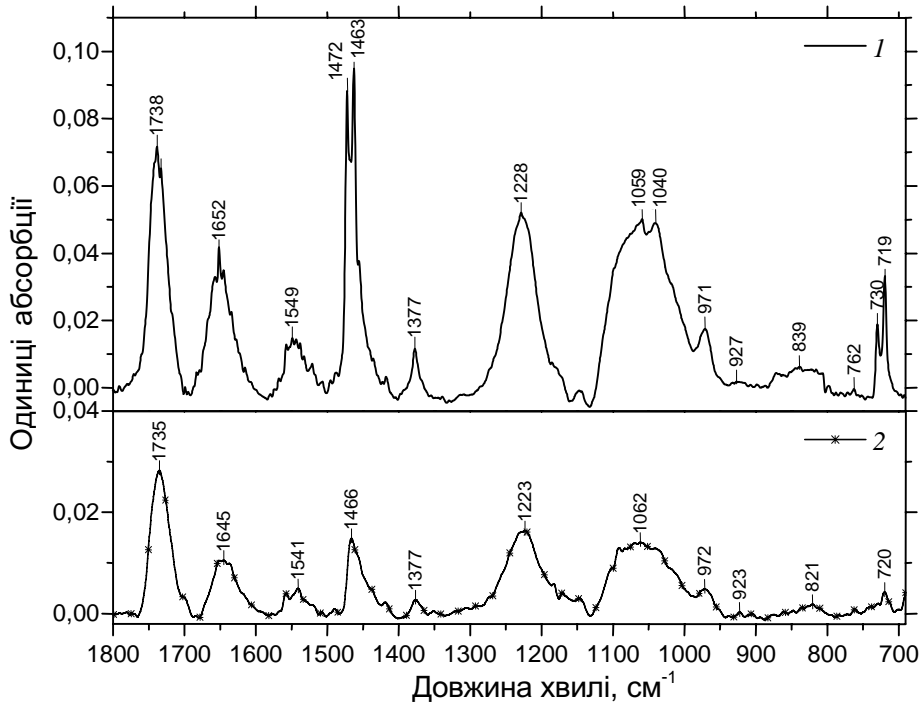


Рис. 4. ІЧ-спектри фосфоліпідів плазматичних мембран клітин резистентного до доксорубіцину (крива 1) та чутливого (крива 2) штамів карциноми Герена.

тентних до доксорубіцину штамів карциноми Герена, свідчать про їхню відмінність (рис. 4). Так, наприклад, у спектрі фосфоліпідів резистентних клітин спостерігається зміщення деяких піків у високочастотну область порівняно з таким у чутливих. При цьому слід звернути увагу на перший пік у спектрах, який відповідає карбоновим кислотам. У разі збільшення кількості α - і β -ненасичених жирних кислот відбувається його зміщення в низькочастотну область, що узгоджується з даними роботи [12]. Частота максимуму першого піка в ІЧ-спектрі, що характеризує резистентні пухлини, становить 1738 см^{-1} , а максимуму відповідного піка у спектрі фосфоліпідів плазматичної мембрани, чутливої до доксорубіцину пухлини, — 1735 см^{-1} . Це свідчить про те, що у плазматичних мембранах резистентних клітин рівень α - і β -ненасичених жирних кислот фос-

фоліпідів нижчий порівняно з таким у чутливих.

Методом ЯМР-спектроскопії проведено дослідження фракційного складу фосфоліпідів, виділених із плазматичних мембран клітин обох штамів. Виявилось, що рівень фосфатидилсерину і сфінгомієліну у плазмалемі резистентних клітин вищий (рис. 5, а). Однак за вмістом фосфатидилетаноламіну, плазмалогену фосфатидилетаноламіну та фосфатидилхоліну плазматичні мембрани клітин резистентного і чутливого штамів однакові (рис. 5, б). При цьому внаслідок збільшення вмісту сфінгомієліну в загальній фракції фосфоліпідів відбувається зменшення величини відношення фосфатидилхолін/сфінгомієлін (рис. 6), що може спричинити підвищення структуризації мембран резистентних клітин. Цей висновок узгоджується як з даними літератури [5], так і з вищенаведеними результатами наших досліджень

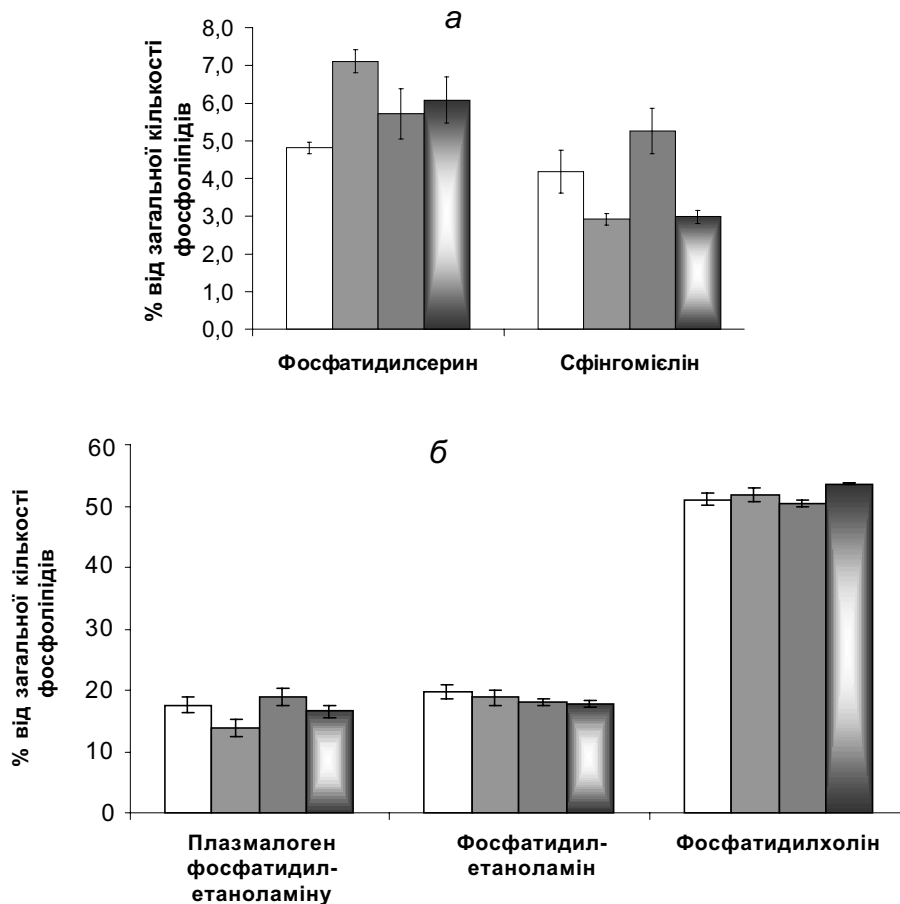


Рис. 5. Вміст фосфоліпідів у плазматичній мембрані клітин чутливого та резистентного до доксорубіцину штамів карциноми Герена: а) фосфатидилсерину та сфінгомієліну; б) плазмалогену фосфатидилетаноламіну, фосфатидилетаноламіну та фосфатидилхоліну. □ — мембрана чутливих до препарату клітин; ■ — мембрана чутливих до препарату клітин після лікування тварин доксорубіцином; ■ — мембрана резистентних до препарату клітин; ■ — мембрана резистентних до препарату клітин після лікування тварин доксорубіцином.

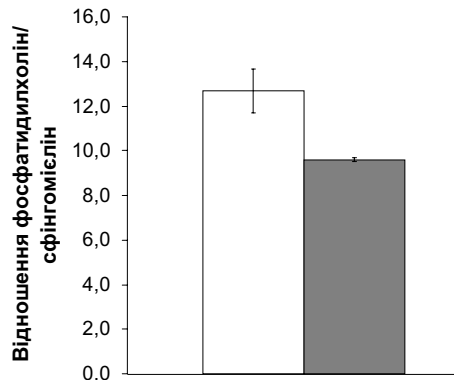


Рис. 6. Величина відношення фосфатидилхоліну/сфінгом'єлін у плазматичній мембрані клітин чутливого та резистентного до доксорубіцину штамів карциноми Герена: □ – мембрана чутливих до препарату клітин; ■ – мембрана резистентних до препарату клітин.

стосовно мікров'язкості плазматичних мембран [1].

Збільшення вмісту фосфатидилсерину в резистентних клітинах має важливе значення, оскільки він бере безпосередню участь в активації (фосфорилюванні) Р-глікопротеїну внаслідок стимуляції активності фосфатидилсеринзалежної протеїнкінази С [4]. Слід зазначити, що Р-глікопротеїн за присутності молекул АТФ сприяє транспортуванню цитотоксичних речовин із клітин [15].

Значний інтерес мають дослідження складу фосфоліпідів у клітинах резистентного та чутливого до доксорубіцину штамів карциноми Герена після проведення курсу лікування ним щурів. Одержані нами дані свідчать, що досліджуваний препарат практично не впливає на рівень фосфатидилетаноламіну, фосфатидилхоліну у плазматичних мембранах, виділених із резистентних або чутливих клітин (рис. 5, а). Але за цих умов накопичення в них фосфатидилсерину неоднакове (рис. 5, б). Якщо у плазмалемі резистентних клітин його рівень майже не змінюється, то у чутливих клітин – вірогідно підвищується. З літератури відомо, що зазначений фосфоліпід бере участь в апоптозі клітин і його наявність на зовнішній поверхні плазматичної мембрани свідчить про ініціацію цього процесу [16]. Крім того, відомо, що доксорубіцин здатен індукувати Fas-опосередкований апоптоз пухлинних клітин [17]. Тому можна припустити, що збільшення вмісту фосфатидилсерину у плазмалемі, ймовірно, свідчить про загибель чутливих до доксорубіцину пухлинних клітин у процесі апоптозу.

Таким чином, базуючись на результатах проведених досліджень, можна дійти висновку, що між плазматичними мембранами клітин чутливої

та резистентної до доксорубіцину карциноми Герена спостерігаються відмінності у рівні холестеролу та деяких фосфоліпідів. Збільшення вмісту холестеролу, зменшення величини відношення фосфатидилхоліну/сфінгом'єлін та ненасиченості ліпідів зумовлює збільшення мікров'язкості плазмалемі резистентних клітин, що може перешкоджати проникненню доксорубіцину в цитоплазму та накопиченню його всередині клітин. Крім того, підвищення рівня фосфатидилсерину у плазматичних мембранах клітин резистентного штаму карциноми Герена опосередковано свідчить про активацію процесу виведення цитотоксичних речовин із клітин за участі Р-глікопротеїну. Одержані нами дані дають підставу вважати, що в механізмі розвитку резистентності до доксорубіцину важливу роль відіграють зміни у фракційному складі ліпідів плазматичних мембран, які можуть сприяти зменшенню проникнення препарату всередину клітин.

V. F. Chekhun¹, V. P. Tryndiak¹,
I. M. Todor¹, V. M. Mikhailenko¹,
I. G. Kondrychyn¹, G. I. Dovbeshko²,
O. P. Repnytska², G. I. Kulik¹

PHOSPHOLIPIDS AND CHOLESTEROL CONTENT IN TUMOR CELL PLASMA MEMBRANES WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO DOXORUBICIN

S u m m a r y

The investigation is aimed to study qualitative and quantitative composition of phospholipids, cholesterol content and lipids unsaturation index in plasma membranes of Guerin's carcinoma cells sensitive or resistant to doxorubicin. The comparison of infrared spectra and phospholipids unsaturation index showed that the unsaturation level of fatty acids in plasma membrane from resistant cells was lower than that from sensitive carcinoma cells. ³¹P-NMR spectroscopy of plasma membranes phospholipids shows the increase of phosphatidylserine and sphingomyelin content in plasma membrane isolated from resistant tumor as compared with sensitive tumor. The levels of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were equal in drug-resistant and drug-sensitive carcinoma strains. Changes in plasma membrane from resistant cells result in elevation of plasma membrane microviscosity and phosphatidylserine level increase can suggest the activation of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin.

К е у w o r d s: phospholipids, Guerin's carcinoma, drug resistance, plasma membrane.

¹Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;

²Institute of Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: v_tryndiak@onconet.kiev.ua

1. Чехун В. Ф., Кулик Г. І., Триндяк В. П. та ін. // Доп. НАН України. 2002. № 10. С. 182–186.
2. Thompson T. E. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1993. 3, N 4. P. 473–493.
3. LuKer G. D., Nilsson K. R., Covey D. F., Piwnicka-Worms D. // J. Biol. Chem. 1999. 274, N 11. P. 6979–6991.
4. Pajeva I. K., Wiese M., Cordes H.-P., Seydel J. K. // J. Cancer. Res. Clin. Oncol. 1996. 122, N 1. P. 27–40.
5. Ramu A., Glaubiger D., Weintraub H. // Cancer. Treat. Rep. 1984. 68, N 4. P. 637–641.
6. Alon N., Busche R., Tiimmler B., Riordan J. K. Molecular and Cellular Biology of Multidrug resistance in tumor cells / Ed. I. B. Robinson. 1991. Plenum Press: NY. London. P. 263–276.
7. Mazzoni A., Trave F. // Oncol. Res. 1993. 5, N 2. P. 75–82.
8. Чехун В. Ф., Тодор І. Н., Соляник Г. І. и др. // Эксперим. онкология 2000. 22, № 4. P. 195–199.
9. Van Amelsvoort J. M. M., Sips H. J., Van Dam K. // Biochem. J. 1978. 174, N 3. P. 1083–1086.
10. Tyagi R. K., Azrad A., Degani H., Salomon Y. // Magn. Reson. Med. 1996. 35, N 2. 194–200.
11. Merchant T. E., de Graaf P. W., Minsky B. D. et al. // NMR Biomed. 1993. 6, N 3. 187–93.
12. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир. 1973. 323 с.
13. Chekhun V. F., Solyanik G. I., Kulik G. I. et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2002. 21, N 4. P. 599–607.
14. Тимов В. Н., Лисицын Д. М., Амелюшкина В. А. и др. // Клинич. лаб. диагностика. 2002. № 5. С. 3–8.
15. Ueda K., Yoshida A., Amachi T. // Anti-Cancer Drug Design. 1999. 14, N 2. P. 115–121.
16. Shiratsuchi A., Mori T., Nakanishi Y. // J. Biochem. (Tokyo). 2002. 132, N 3. P. 381–386.
17. Poulaki V., Mitsiades C. S., Mitsiades N. // Drug Resist. Update. 2001. 4, N 4. P. 233–242.

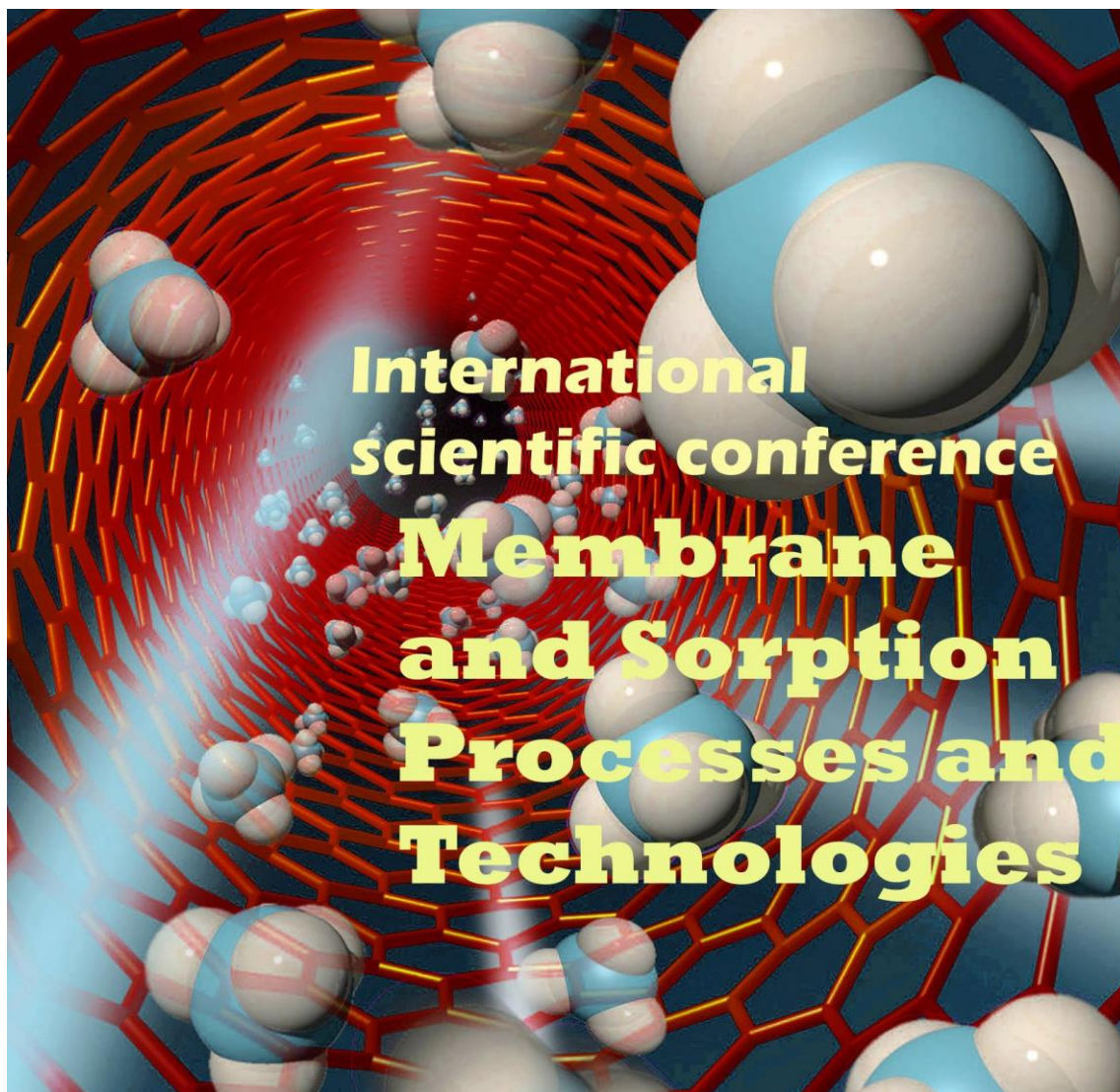
¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України, Київ;

²Інститут фізики НАН України, Київ;

e-mail: v_tryndiak@onconet.kiev.ua

Отримано 11.11.2002



12-14 грудня 2017

FTIR SPECTROSCOPY STUDY OF CLOSELY MODELED BACTERIAL CELL MEMBRANES WITH DIFFERENT PHOSPHOLIPID COMPOSITION

Dovbeshko G.I.^a, Gnatyuk O.P.^a, Nischuk A.^b, Bogdanov M.^c

^a *Institute of Physics of the NAS of Ukraine, Department of physics of biological systems
Nauki Ave. 46, 03028 Kyiv, Ukraine;*

E-mail: matinelli@gmail.com

^b *National University of Kyiv-Mohyla Academy, 2 Skovorody vul., Kyiv 04655, Ukraine*

^c *Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas McGovern
Medical School, Houston, TX 77030, USA*

Membrane mimetics allow the membrane environment to be probed at a tractable and defined level of molecular complexity. Membrane mimetics are invaluable tools enabling the study of the complex range of molecular events which occur at cell membranes (lipid polymorphism, wild number of structural transmembrane and lateral rearrangements to modulate the properties in response to changes in environment and different residing membrane protein needs: i.e. maintain the life of the cell). Therefore determination of unique spectroscopic markers of phospholipids is one of the important tasks in membrane biophysics and membrane science.

Here we present different protocols for model membrane formation and formulations and successfully characterise their spectroscopic parameters. We have used phospholipids extracted from native or genetically altered *Escherichia coli* or artificially designed and modeled lipid membranes from synthetic phospholipid counterparts: W3899, wild type (phosphatidylethanolamine, PE=75%, phosphatidylglycerol, PG=20%, cardiolipin, CL=5%), PE-deficient AL95 mutant (50%PG+50%CL) and AD93/pMprF (CL=57%, PG=12% and LysylPG=31%) i.e. mimicking phospholipid profile of Gram-positive human pathogen *Staphylococcus aureus*.

Membrane mimetics are invaluable tools enabling the study of the complex range of molecular events which occur at cell membranes. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra acquired enable the fundamental physical properties of the lipid bilayer to be determined in a single experiment: different surface charges, hydrophobic and hydrophilic areas, differences in adsorption and transmittance. Protocol of stable liposome (one of the biological membrane model) formation consists of ultrasound treatment and freezing in liquid nitrogen followed by thawing procedure. Different parameters of ultrasound treatment were analysed by vibrational spectroscopy and microscopy. It appears that extended ultrasound treatment under capacity more than 90 W prevents liposome formation.

Spectroscopic individual phospholipid and bilayer markers, structural property of artificial membranes and application of membrane lipid mimetics will be discussed.

Acknowledgement

This work has been supported by the HORIZON 2020 project “Asymmetry of biological membrane: theoretical, experimental and applied aspects” (690853-assymcurv-H2020-MSCA-RISE-2015/H2020-MSCA-RISE-2015) and NATO SPS 985291.

THE INTERACTION OF CELL MEMBRANE WITH OXALIPLATIN

Gnatyuk O.P.^a, Dovbeshko G.I.^a, Tymchyshyn O.^a, Nikolenko A.^b, Cherpak O.V.^c, Bogdanov M.^d

^a *Institute of Physics of the NAS of Ukraine, Department of physics of biological systems
Nauki Ave. 46, 03028 Kyiv, Ukraine;*

E-mail: matinelli@gmail.com

^b *V. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics, 41 pr. Nauki, 03028, Kyiv,
Ukraine;*

^c *Taras Shevchenko National University of Kyiv, Faculty of Physics, Department Physics
of Functional Materials, Glushkova Ave., 2., 02000 Kyiv, Ukraine;*

^d *Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas McGovern
Medical School, Houston, TX 77030, USA*

Creation of new biologically active materials, study of their physico-chemical and therapeutic properties, as well as the creation of effective and low-toxic anticancer drugs is one of the most important problems of modern pharmacology and oncology. Along with the development of new drugs, the possibilities of modifying already known drugs are being studied to increase their effectiveness and specificity. Oxaliplatin is modified an advanced version of well known anti-tumor drug cisplatin. Oxaliplatin is less toxic than cisplatin, and its mechanism of action is the formation of cross-links between the bases in the DNA.

In this project we studied the interaction phospholipid DOPG (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) with oxaliplatin study. DOPG is one of the main components of cell membrane. Liposomes were prepared according to a standardized procedure to simulate the cell membrane and the process of passing the drug through the membrane with DOPG. This procedure involves dissolving DOPG in chloroform, ultrasonic processing and cryoprocessing. For the preparation of complexes liposomes with oxaliplatin, the preparation was added before the formation of liposomes (one series of samples-before), and after the formation of liposomes (another series of samples - after). Then, the samples were then incubated for two hours.

It was shown that interaction DOPG with oxaliplatin lead to redistribution of intermolecular H-bonds, more dense lipid packing in membrane, lipid ordering resulting to phase transition of the lipids.

Acknowledgement

This work has been supported by the HORIZON 2020 project “Asymmetry of biological membrane: theoretical, experimental and applied aspects” (690853-assymcurv-H2020-MSCA-RISE-2015/H2020-MSCA-RISE-2015) and NATO 98 5291

**18th International Young Scientists Conference
Optics and High Technology Material Science
Devoted to 95th Anniversary of
Professor M. U. Bilyi**



SPO 2017

**Scientific Works
October 26-29, 2017**

Kyiv, UKRAINE

DP.15

The interaction of cell components with cisplatin derivatives

Cherpack O.¹, Gnatyuk O.², Dovbeshko G.², Foley S.³, Bogdanov M.⁴

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Faculty of Physics, Department Physics of Functional Materials, Glushkova Ave., 2, 02000 Kyiv, Ukraine; phone +38(093)077-93-79;

E-mail: oksana.cherpack@gmail.com

² Institute of Physics of the NAS of Ukraine, Department of physics of biological systems Nauki Ave. 46, 03028 Kyiv, Ukraine;

E-mail: hrysantemka@gmail.com; matinelli@gmail.com

³ Laboratoire Chrono Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Compte, 16 route de Gray, 25030, Besançon, France

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas McGovern Medical School, Houston, TX 77030, USA.

Nowadays the task of finding of efficient anti-cancer drugs and the mechanism of its action is important for applied and fundamental science. Carboplatin is known as an advanced version of the widely used anti-tumor drug cisplatin. Carboplatin is less toxic than cisplatin [1]. The mechanism of carboplatin action is a formation of cross-links between bases in DNA. However, the resistance of cancer cells is more connected with the interaction of cisplatin and its derivatives with the membrane. For this reason, we have started to study the interaction of carboplatin with a cell membrane. Does carboplatin pass into the cell without interaction with the membrane? What is the mechanism of carboplatin penetration into the cell?

In this work we present the results of interaction phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) with carboplatin study. DOPC is one of the main components of the cell membrane. Liposomes were prepared according to a standardized procedure to simulate the cell membrane and the process of passing the drug through the membrane with DOPC. This procedure involves dissolving DOPC in chloroform, ultrasonic processing and cryoprocessing. For the preparation of complexes with liposomes with carboplatin, the preparation was added before the formation of liposomes (one series of samples-before), and after the formation of liposomes (another series of samples - after). The, the samples were then incubated for two hours.

It was shown that stronger changes occurred in samples, where carboplatin was added after the formation of liposomes. In the region C=O stretching vibration there is a strong inhibition of the band at 1637 cm^{-1} and its low frequency shift to 1735 cm^{-1} . We registered increase intensity of the band at 1648 cm^{-1} . In the region of PO_2 molecules group absorption there is a shoulder at 1120 cm^{-1} , which

5-th International Conference

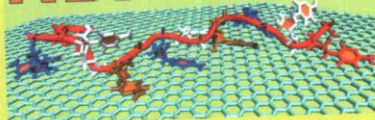


**B. Verkin Institute for Low Temperature
Physics and Engineering**
National Academy of Sciences of Ukraine

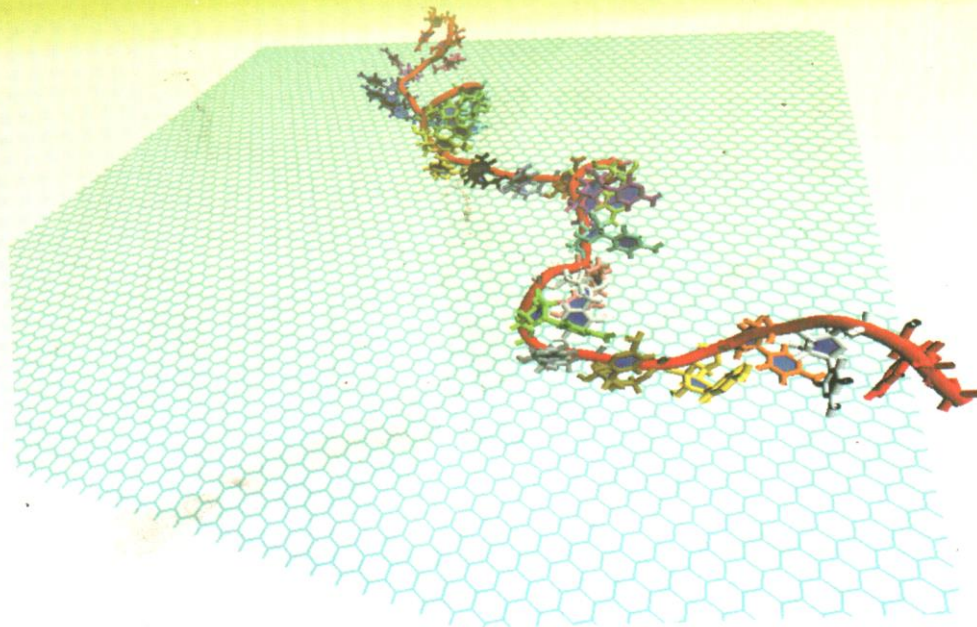


Institute of Physics
National Academy of Sciences of Ukraine

NBP-2017



NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects Book of Abstracts



October 2-5, 2017 Kharkiv, Ukraine

O-24

VIBRATIONAL “SIGNATURES” OF LIPID CELLULAR MEMBRANE MIMETICS

Dovbeshko G.^{1*}, Gnatyuk O.¹, Boiko V.V.^{1,2}, Ivanchenko P.A.^{1,3}, Martra G.³, Foley S.⁴
Bogdanov M.⁵

¹*Institute of Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Nauki Ave, Kyiv 03680, Ukraine*

²*Institute of Low Temperature and Structure Research Polish Academy of Sciences, ul. Okólna 2,
50-422 Wrocław*

³*Department of Chemistry, University of Torino, Via P. Giuria 7, 10125 Torino, Italy*

⁴*Laboratoire Chrono Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté,
16 route de Gray, 25030, Besançon, France*

⁵*Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas McGovern Medical
School, Houston, TX 77030, USA*

Lipids play a fundamental role in organization of cell membrane and a primary target of the environmental impact. Due to the variation in lipid hydrophobic acyl chains and hydrophilic polar headgroups, each of the different lipid types are made up of a wide spectrum of structural variants, which as a whole determine membrane fluidity, lateral pressure, permeability and symmetric or asymmetric surface charge. Although much is known about the physicochemical properties of individual lipid species much less is known about the behavior of even simple mixtures of lipids in the test tube environment. It has thus been difficult to extrapolate this information to biological membranes containing proteins and complex lipid mixtures. Moreover, how these diverse physical and chemical properties translate into biological function is also not clearly understood.

Questions remain, do heterogeneous phospholipid head groups and/or aliphatic acyl chain undergo a deformation and/or a change in conformation (orientational) under supramolecular assembly. Are the conformational order of lipid head groups or acyl chains and their orientational parameters interrelated and affected (e.g. conformationally restricted or not) by residing membrane proteins, pharmaceutical compounds or nanoparticles used in drug delivery. In order to answer these questions we have studied the vibrational signatures of heterogeneous lipid mixtures using both qualitative and quantitative vibrational spectroscopies (FTIR, Raman, SEIRA). Confocal microscopy was also used to determine indicative marker bands of either synthetic or natural phospholipid counterparts assembled into a supramolecular structure and thus mimic natural lipid compositions.

Here we present a study of the molecular structure of lipid compositions mimicking native cell membranes. We demonstrated the difference between their vibrational characteristics, especially within the range of different phospholipids. In order to test whether CH aliphatic acyl chains undergo strong deformation under the influence of different foreign compounds the effect of graphene nanoparticles on the structure of lipids was analyzed and compared with “lipid only” vibrational “signatures”.

Acknowledgements. This work was supported by project H2020-MSCA-RISE-2015 № 690853 assymcurv, FP7 IRSES program, project ILSES, GA 612620 and NATO project G5291.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

Г.И. ДОВБЕШКО,
Е.М. ФЕСЕНКО,
Е.П. ГНАТЮК

**УСИЛЕННАЯ
ПОВЕРХНОСТЬЮ
КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ
СПЕКТРОСКОПИЯ**

*ПРОЕКТ
«НАУКОВА КНИГА»*

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 2014

7.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ

Конформационный анализ ДНК из опухолей различного типа и различных штаммов: чувствительных и резистентных, а также после воздействия противоопухолевых препаратов, был проведен на основе метода главных компонент, который оказался достаточно информативным. Каждый спектр был конвертирован в одну точку. Главным для экспериментатора являлся выбор плоскости сечения многомерного пространства для наиболее удачного представления данных и их соответствия действительности. На плоскости точками *A* и *B* обозначены канонические формы А-ДНК и В-ДНК, точкой *AB* — форма ДНК, которой присущи свойства обеих форм, точками Au10, Au20, Au30 — формы ДНК, близкие к конденсированной ДНК (рис. 7.15), где конденсация вызвана частицами коллоидного золота (см. гл. 6).

Различные ДНК из опухолевых тканей находятся в различных частях плоскости главных компонент, но их положение не совпадает с ДНК канонической формы. Можно провести линию, которая

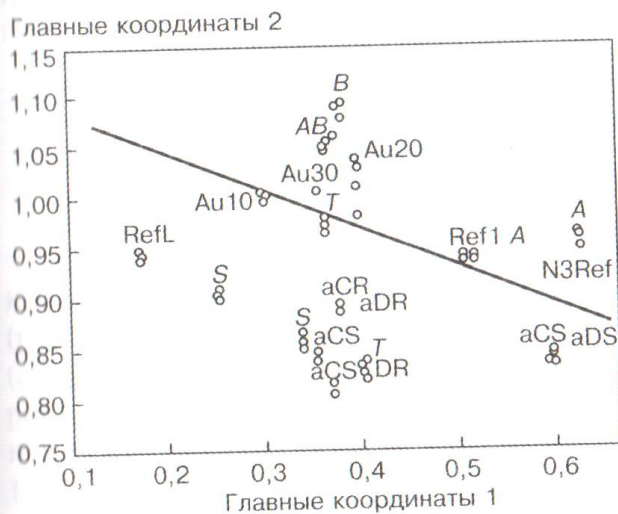


Рис. 7.15. Карта состояния конформационного анализа ДНК, полученная методом главных компонент:

T, S — ДНК чувствительного штамма; *CR* — *цис*-платин резистентный штамм; *DR* — доксорубин резистентный штамм. ДНК выделена после действия противоопухолевых препаратов: *aDS* — чувствительный штамм после доксорубина; *aCS* — чувствительный штамм после *цис*-платина; *aDR* — резистентный штамм после доксорубина; *aCR* — резистентный штамм после *цис*-платина. Контрольная ДНК (Serva) в А-форме (*A* и *Ref1*), в В-форме (*B*) и АВ-форме (*AB*); *Ref L, N3Ref* — ДНК выделена из тканей нормальных органов крысы карцинома Герена. ДНК (Serva) конденсированная (*Au10, Au20, Au30*) [200]

разделит плоскость на две части: в одной будет расположена ДНК из нормальных тканей, а в другой ДНК из опухолевых тканей. На основе обширного статистического анализа, было определено наличие малигнанных тканей различной локализации по ИК-спектрам ДНК [214, 215].

7.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПИДОВ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* И *IN VITRO*

7.3.1. Фосфолипиды из чувствительных и резистентных штаммов

Сравнение ИК-спектров фосфолипидов из резистентных и чувствительных к доксорубину штаммов показало наличие жидкокристаллической фазы (по нашему мнению, орторомбической) в резистентном штамме [259] (рис. 7.16).

Это предположение было сделано на основании спектральных особенностей в области деформационных и либрационных CH_2 -колебаний и их расщепления в области 1472 см^{-1} и 1463 см^{-1} , а также на 719 см^{-1} и 730 см^{-1} [260]. В области валентных CH -колебаний частоты фосфолипидов из резистентных штаммов смещены в высокочастотную область на $1-1,5 \text{ см}^{-1}$ по сравнению

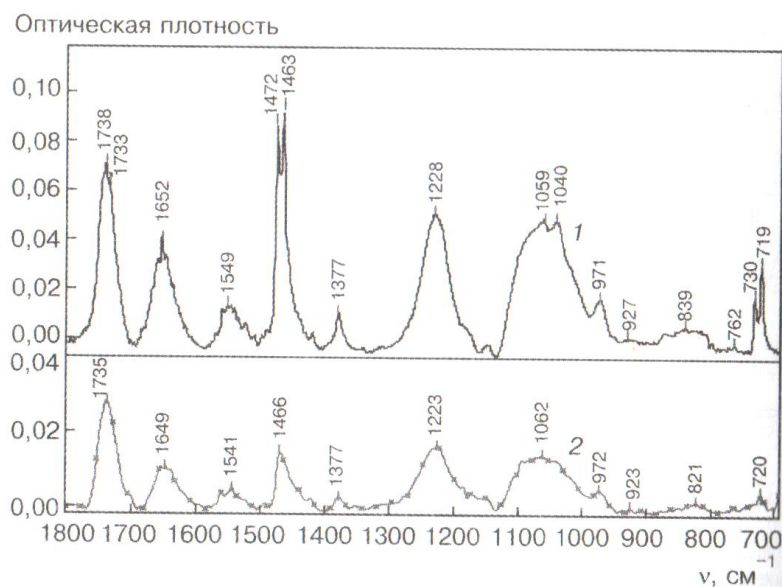


Рис. 7.16. SEIRA-спектр фосфолипидов из доксорубин-резистентного (1) и доксорубин-чувствительного штаммов (2) опухолевых клеток

со спектром чувствительного штамма, что свидетельствует о росте содержания *gош*-конформации липидов (менее стабильная форма по сравнению с *транс*-конформацией). В области C=O валентных колебаний в образцах фосфолипидов из резистентного штамма наблюдается две компоненты — 1738 см^{-1} (гелеобразная фаза) и 1733 см^{-1} (жидкокристаллическая фаза).

В образцах фосфолипидов из чувствительных штаммов присутствует C=O полоса на 1735 см^{-1} . На основе спектроскопических данных при наличии двух фаз после выделения (содержание воды тщательно контролировалось по ИК-спектрам) можно предположить, что фазовый переход для фосфолипидов из резистентных штаммов происходит при более низкой температуре, чем у чувствительных штаммов [261, 262]. Авторы работы [263] наблюдали высокую степень структурного упорядочения в плазматических мембранах липидов из доксорубицин-резистентного штамма P388 лейкозных клеток крыс по сравнению с чувствительным штаммом. Известно, что фосфолипиды из резистентного штамма более гетерогенны по структуре по сравнению с чувствительным штаммом. Таким образом, приходим к выводу, что наблюдаемые различия связаны со структурными изменениями фосфолипидов плазматических мембран опухолевых тканей.

7.3.2. Индуцированная *цис*-платином и доксорубицином структура фосфолипидов (эксперимент *in vivo*)

В ИК-спектрах фосфолипидов из *цис*-платин резистентных клеток [264] не наблюдается расщепления CH_2 компонент (рис. 7.17) как в липидах из доксорубицин-резистентных штаммов (см. рис. 7.16, кривая *Л*). Действие *цис*-платина приводит к формированию комплекса липид—*цис*-платин. Это подтверждает появление новых полос в области фосфатов, а именно: 1260, 1220, 1156, 1175, 1096, 1027, 984, не относящихся к поглощению фосфолипидов (см. рис. 7.17, б). Некоторые из колебаний в этой области сужаются, смещаются, расщепляются и изменяются по интенсивности [265]. Структура фосфолипидов, индуцированная доксорубицином, подобна структуре фосфолипидов, которые выделены из чувствительных штаммов (рис. 7.18, а). А именно, область фосфат-

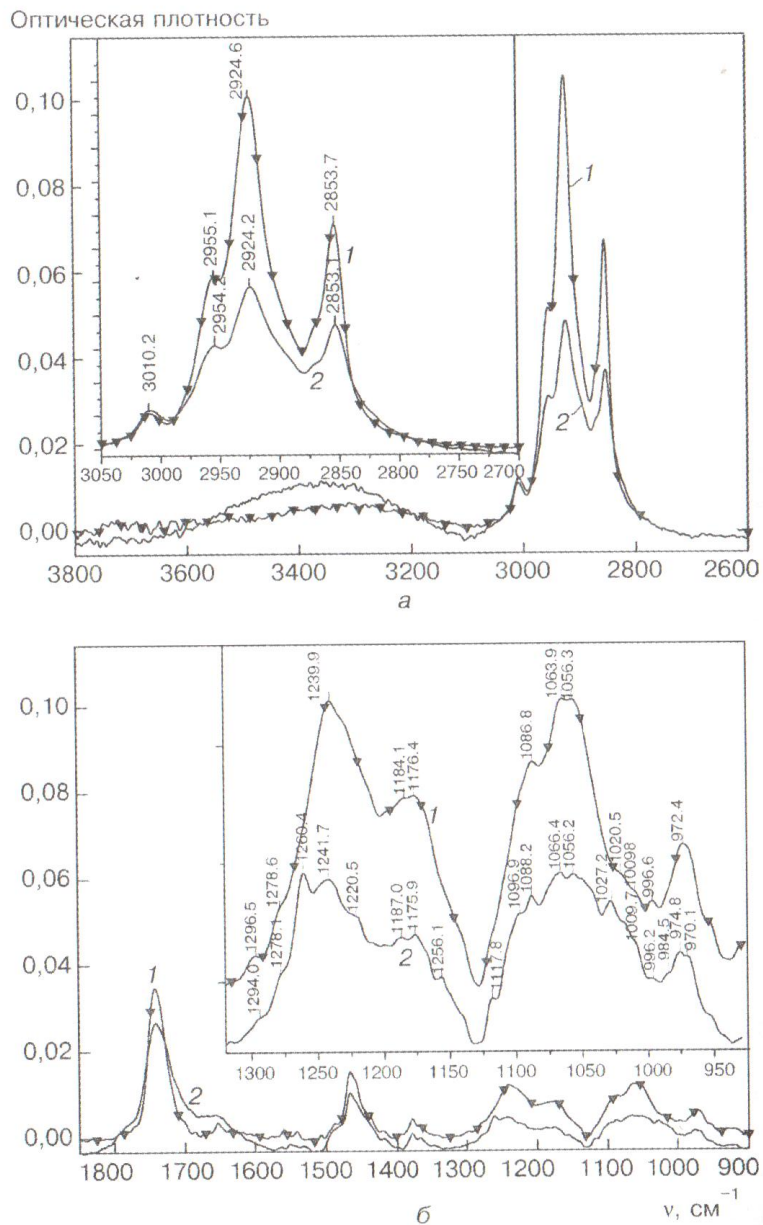


Рис. 7.17. SEIRA-спектры фосфолипидов из резистентного штамма опухолевых штаммов до (1) и после (2) воздействия *цис*-платина

ных полос имеет те же компоненты и их положения, что и для фосфолипидов до и после лечения доксорубицином: 1065 (1066), 1181 (1182), 1237 (1236), 1294 (1294).

7.3. Взаимодействие липидов с противоопухолевыми препаратами...

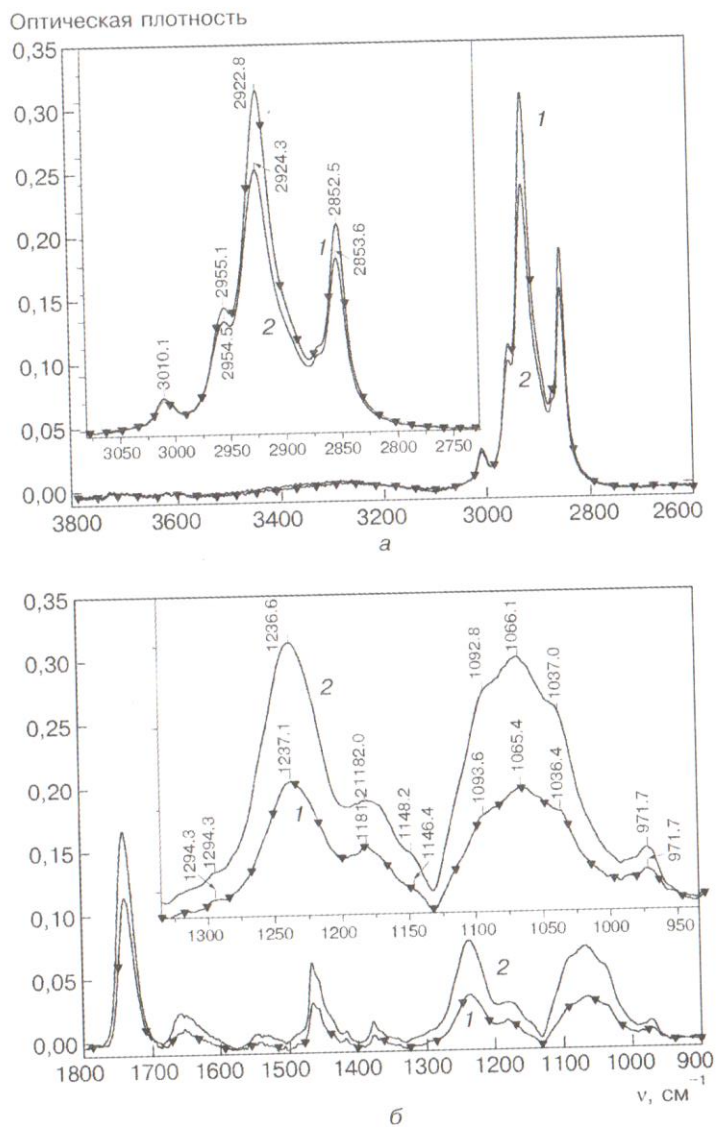


Рис. 7.18. SEIRA-спектры фосфолипидов из чувствительного штамма опухоли до (1) и после (2) воздействия доксорубина

Смещение этих полос обусловлено водородными связями после воздействия доксорубина. В области валентных колебаний их положение характеризуется высокочастотным сдвигом (на 0,6—

1,5 см⁻¹) и уменьшением интенсивности. Это указывает на увеличение разупорядочения углеводородных цепей. Индуцированные доксорубицином изменения в структуре фосфолипидов, вероятно, имеют не ковалентную природу и могут быть восстановлены репаративными механизмами клетки.

7.3.3. Индуцированные *цис*-диаминодихлорплатином изменения в фосфолипидах из чувствительных клеток (эксперимент *in vitro*)

SEIRA-спектры общей фракции фосфолипидов были изолированы из плазматических мембран чувствительных клеток и инкубированы с 50 мкМ *цис*-платина на протяжении получаса при температуре 37 °С (рис. 7.19). Наиболее яркая картина наблюдалась в области фосфатов: рост интенсивности и сдвиг на 5 см⁻¹ в низкочастотную область. Низкочастотный сдвиг, индуцированный *цис*-платином в СН валентных колебаниях (около 1 см⁻¹), был обусловлен некоторым упорядочением фосфолипидной структуры. Результаты эксперимента *in vivo* показали более существенные изменения в структуре фосфолипидов, индуцированных *цис*-платином, чем результаты эксперимента *in vitro*. Причиной является то, что невозможно учесть все особенности составляющих окружения в мембране, локального рН и температурных

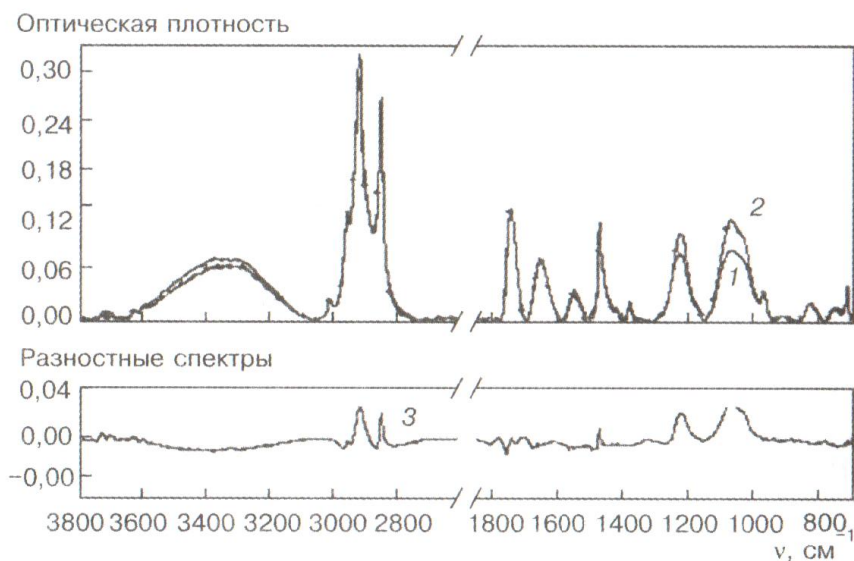


Рис. 7.19. SEIRA-спектры фосфолипидов из плазматических мембран: 1 — до инкубации с *цис*-платином; 2 — после инкубации с *цис*-платином *in vitro*; 3 — разностный спектр

7.3. Взаимодействие липидов с противоопухолевыми препаратами...

режимов. В клетке процессы происходят в неравновесных условиях в отличие от эксперимента в пробирке [259, 264, 266].

Таким образом, мы наблюдали существенные различия в спектрах фосфолипидов из чувствительных и резистентных штаммов клеток. Это указывает на то, что основная мишень противоопухолевого действия лекарств — мембрана — в резистентных клетках уже имеет модифицированную структуру и отличается от мембраны чувствительных штаммов. Важно то, что действие противоопухолевых препаратов *in vivo* и *in vitro* тоже существенно различается, поэтому необходимы эксперименты *in vivo* при онкологических исследованиях. Действие доксорубицина и *цис*-платина на мембрану имеет различный характер: доксорубицин приводит к фазовым превращениям в мембране, а *цис*-платин образует комплекс с фосфолипидами, хотя в обоих случаях речь идет об изменении структуры мембраны. Образование резистентных штаммов означает «запоминание» клеткой этих новых структур. На базе исследования SEIRA-спектров фосфолипидов можно построить методику оценки индивидуальной чувствительности к действию противоопухолевых препаратов, но это требует накопления большого статистического материала.

Висновки до розділу 4

1. 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 cm^{-1} , та розщепленням смуги С=О на 1738 та 1733 cm^{-1} , а також більш високочастотним положенням смуги PO_2^- на 1228 cm^{-1} . Фосфоліпіди з чутливого штаму пухлинних клітин утворюють невпорядковану рідкокристалічну фазу та характеризуються більш низькочастотним положенням смуги PO_2^- на 1223 cm^{-1} , положенням С=О на 1735 cm^{-1} та відсутністю розщеплення деформаційних коливань СН.
2. Розроблено та опробовано два протоколи для отримання модельних везикул (ліпосом) різного фосфоліпідного складу, що основою для дослідження взаємодії мембрани з протипухлинними препаратами оксаліплатин та карбоплатин. Перший протокол - із вбудованим у мембрану лікарським засобом (препарат був доданий у процесі приготування ліпосом) та другий протокол - із адсорбованим на мембрані лікарським засобом (препарат додавали після утворення ліпосом). Визначено набір інфрачервоних спектральних маркерів модельних ліпосом, що включають наступні смуги: валентні коливання молекулярних груп CH_2^- в області 2925 cm^{-1} , валентні коливання молекулярних груп С=О в області 1735 cm^{-1} , а також смугу валентних асиметричних коливань PO_2^- . Взаємодія протипухлинних препаратів з фосфоліпідною мембраною відбувається шляхом утворення водневих зв'язків між С=О та N-H групами фосфоліпідів та лікарських засобів, що створює більшу упорядкованість в ліпідній системі.

Розділ 5

Спектральні маркери вторинної структури колагену регенерованих тканин

Composite chitosan/polyethylene oxide film for duraplasty in traumatic brain injury model in rats



Panteleichuk A.¹, Kadzhaya M.¹, Biloschytsky V.², Shmeleva A.³, Petriv T.⁴, Gnatyuk O.⁵, Dovbeshko G.⁵, Kozakevych R.⁶, Tyortyh V.⁶

¹Department of neurotrauma, Romodanov State Institute of Neurosurgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Chronic pain treatment group, Romodanov State Institute of Neurosurgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Department of Neuropathomorphology, Romodanov State Institute of Neurosurgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁴Department of Reconstructive Neurosurgery with X-ray surgery, Romodanov State Institute of Neurosurgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁵Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁶Chuiiko Institute of Surface Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: basirovich@ukr.net

ABSTRACT

The duraplasty is a standard procedure during neurosurgery for injuries and diseases of the brain. The hermetic closure of the dura mater is not always possible with the application of autologous tissues. Synthetic, allogeneic and xenogeneic implants, which are currently used, have disadvantages, so the search for the material that would best meet the requirements for a dura mater scaffold continues.

THE PURPOSE is to study the physical and chemical properties of the composite chitosan/polyethylene oxide (PEO) film and determine the effectiveness of its application for duraplasty in the experiment *in vivo*; to analyze its ability to biodegradation; to evaluate the effect of chitosan/PEO scaffold on the regeneration of dura matter.

MATERIALS AND METHODS. The experiment used 10 white rats aged 12 months with a penetrating traumatic brain injury model. Postoperative material was examined by macroscopy, optical microscopy and infrared spectroscopy.

RESULTS. According to the analysis of infrared absorption, spectral markers of scar tissue, regenerating and intact dura mater were determined. Oscillation spectroscopy data indicate degradation of the chitosan film and repair of normal dura mater. Histology data also indicate biological degradation of the chitosan film and its replacement by newly formed normal connective tissue.

CONCLUSION. The data of morphological and spectroscopic studies show the ability of chitosan/PEO film to biodegradation *in vivo* with followed replacement not by scar but by normal connective tissue.

KEY WORDS: chitosan; polyethylene oxide; penetrating traumatic brain injury; infrared spectroscopy; morphological studies

In neurosurgery, the problem of the duraplasty is extremely urgent, because one of the conditions for success in neurosurgical intervention is to restore integrity of dura mater (DM) and the subdural space to prevent damage to cerebral cortex and the leakage of cerebrospinal fluid [1]. Hermetic closure of the dura mater correlates with a decrease in the intensity of liquorrhea and a decrease in the rate of infectious complications [2, 3]. This issue is especially urgent after the decompression trepanation due to severe traumatic brain injury or acute cerebrovascular accident [4, 5]; surgery on the skull and posterior fossa, when DM defect is created

as a result of bipolar coagulation; the dural resection following meningioma surgery [6], as well as spinal neurosurgery [7]. In this case, there is a need to application a dura mater scaffold.

The study of DM substitutes has been continuing for over a century. In 1924, W. Penfield proposes the concept of «ideal dura mater substitute» [8, 9] which was further developed, for example in the work of O. Arutyunov, N. Meskhia [10]. The substitute must be non-toxic, biodegradable, and suitable for suturing; not lead to commissure or infection; create a waterproof barrier; to have antibacterial properties at penetrating trauma;



Fig. 1. Scanning electron microscopy of chitosan films (A, scale – 20 μm), chitosan/PEO 1/1 wt% (B, scale – 1 μm) and chitosan/PEO 7/3 wt% (C, scale – 3 μm).

and should be at a reasonable price [11, 12]. The development of modern new polymeric materials stimulates the search for new opportunities in creating an effective substitute for DM [11].

To improve the dural closure, various materials of autologous, allogeneic, xenogeneic and synthetic origin were tested [12-14]. Autologous grafts are non-toxic, quickly integrated in host tissues, flexible, durable and easily sutured [15-17]. However, the lack of the available autografts and needs to additional incisions to obtain it limit their application [14]. The feasibility of using allograft tissue was reviewed following the publication of reports linking dura mater transplantation to Creutzfeldt-Jakob disease (transmissible spongiform encephalopathy) [10]. Thus, xenogeneic and synthetic materials become an alternative to neurosurgery.

One of the promising materials for the development of a xenogeneic substitute for DM may be chitosan. It is biodegradable, non-toxic, has antibacterial and antifungal properties [18] and is, therefore, considered promising to create an effective scaffold for DM [13].

Several techniques have been proposed for the design of DM substitute based on chitosan. Chitosan as a biopolymer allows to create two-layer membranes with porous and non-porous parts. This model of chitosan is similar in thickness, structural and functional characteristics to DM and has greater tensile strength than the collagen matrix. The feasibility of creating a two-layer chitosan matrix is as follows: (a) in the porous part, growth factors can penetrate through the pore network, cell migration and neovascularization occur, but this layer is unstable to mechanical loads; (b) the non-porous part provides greater resistance to loads, it can be sutured [13].

To improve the structural and mechanical properties of chitosan materials, researches aimed at developing various composite systems based on chitosan and other polymers are promising [19]. A substitute for DM in the form of a grid of polylactic acid and chitosan was developed [20]. Wider and more efficient use of chitosan can be expected with the introduction of electrospinning to obtain nanofiber materials. Thin nanofibers can be obtained in the mixtures of chitosan with polyvinyl alcohol, gelatin or collagen, silk fibroin, polycaprolactone, polyethylene oxide (PEO) [21]. PEO has good spinnability, low toxicity and its interaction with chitosan improves the technical processing of the latter in the production of polymer films [21]. It is a biodegradable polymer [22]. PEO is approved for the use in drug delivery systems by the US Food and Drug Administration (FDA) [23]. Given the viability of the composite material of chitosan with PEO [24] with the possibility of adjusting a wide range of hydrophilic properties, physical and mechanical characteristics [21], we selected a model of dura mater substitute of xenogeneic (chitosan) and synthetic (polyethylene oxide) origin for our study.

PURPOSE – to investigate the physical and chemical properties of the composite chitosan/polyethylene oxide film and to determine the effectiveness of its application for duraplasty in animals; to analyze its ability to biodegradation; to evaluate the effect of this biopolymer film on the regeneration of dura mater.

MATERIALS AND METHODS

White rats were used in the study. The animals were kept in standard vivarium conditions under natural light-dark cycle and fed a balanced

compound feed *ad libitum*. The surgery and the euthanasia of animals were performed according to the rules of bioethics regulated by Directive 2010/63/EU «On the protection of animals used for scientific purposes» (2010) and the Law of Ukraine #3447-IV «On protection of animals from cruelty» (2006). The study was approved by the Committee on Bioethics of the Romodanov State Institute of Neurosurgery of the NAMS of Ukraine (Protocol #18 of June 10, 2016).

Methods of surgery. Fifteen male rats aged 12 months and weighing 250-300 g were selected for surgery. After craniotomy and penetrating brain injury [25], duraplasty was performed with composite film based on chitosan/PEO. Experimental animals were divided into 3 groups (n = 5 animals per group): (1) for histological examination; (2) for macroscopic and infrared (IR) spectroscopic examination; (3) a group of intact animals (the samples of native DM for IR spectroscopy). The surgery was performed under general anesthesia by xylazine (Sedazin, *Biowet*, Poland) 15 mg/kg and ketamine (Calipsol, *Gedeon Richter*, Hungary) 70 mg/kg body weight that was administered intramuscularly. After head shearing and disinfection with a Betadine 10 % solution (*Aegis*, Hungary), a mid-line skin incision was performed and the bones of the skull were exposed. A 4x7 mm trepanation hole was formed in the right parietal area using a high-speed drill. The bone flap was isolated from the underlying dura mater and removed. DM was carefully dissected crosswise from the middle of the hole to its corners. The surface of the brain was exposed and the cerebral cortex was penetrated with a G18 needle to a depth of 2 mm.

Dural flaps were placed back without suturing with diastasis, covered with chitosan/polyethylene oxide film without bone flap. Thus, decompressive craniectomy was modeled. After hemostasis, the wound was sutured using Vicryl 5/0 and treated with a Betadine solution. Postoperative antimicrobial prophylaxis using intramuscularly injection of Ceftriaxone 20 mg/kg was performed. Animals were euthanized on the 21st day by decapitation under ketamine anesthesia (0.1 % 2 mL).

Synthesis and selection of polymer composite films. Several variants of chitosan-based biopolymer films have been proposed for duraplasty: native film consists of 100 % chitosan; composite chitosan/polyethylene oxide film with equal mass fractions of components chitosan/PEO 1/1 wt%, and composite chitosan/polyethylene oxide film with mass fraction of chitosan 70 % (chitosan/PEO 7/3 wt%). Synthesis and the following laboratory studies were performed at Chuiko Institute of Surface Chemistry.

Native and composite films were prepared by evaporation of the solvent after the coating the glass with a primary polymer solution. Primary solutions were prepared by dissolving chitosan, PEO in 2 wt% Acetic acid solutions using magnetic stirrer for 12 hours. After forming, the films were dried at room temperature for 12 hours. When the drying was completed, the film was placed in 1.0 M sodium hydroxide solution for several hours to neutralize excess acetic acid, followed by intensive washing with distilled water. Thereafter the films were dried at room temperature for 24 hours. Subsequently, a thorough study of the structure of the obtained films, their water absorption capacity and spectral analysis were performed. The surface structure of the polymer composite films was examined using a Quantax™ 3D FEG scanning electron microscope (FEI, USA) (Fig. 1).

Also, a laboratory study of the water absorption capacity of the dural substitutes was performed (Table 1). This is a very important parameter, because with a high degree of hydrophilicity of the DM scaffold, there may be a risk of brain compression [13].

SAMPLE	DEGREE OF SWELLING, % OF WEIGHT
Chitosan	230.34
Chitosan/PEO 1/1 wt%	140.3*
Chitosan/PEO 7/3 wt%	150.92

Table 1. The water absorption capacity of polymer composites.
 Note: * – $p < 0.05$ compared to chitosan.

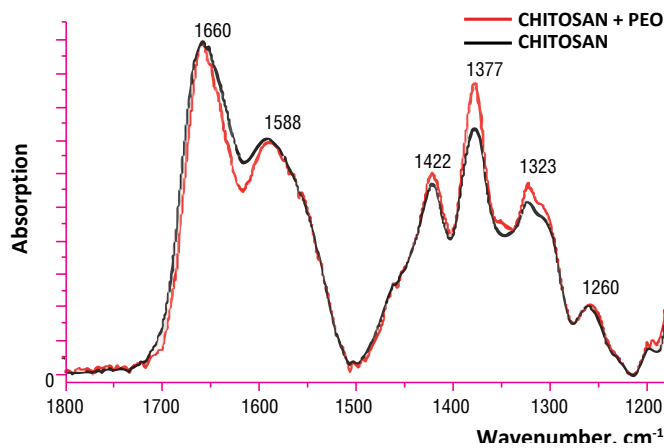


Fig. 2. FTIR spectra of films based on chitosan (black curve) and chitosan/PEO 7/3 wt% (red curve).

POINTS	DESCRIPTION
0	There is no adhesion of scaffold to the cerebral cortex
1	Scaffold is fused with the cerebral cortex, but isolated without macroscopic damage
2	Scaffold ingrow to the cortex, causing the rupture of cortical vessels during isolation
3	Cerebral cortex is injured when the bone flap removed

Table 2. The evaluation of material adhesion.

The IR spectra of the studied samples from chitosan, chitosan/PEO 1/1 wt%, chitosan/PEO 7/3 wt% were analyzed (Fig. 2). Data were obtained using a Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrometer Nicolet Nexus 450 (Thermo Scientific, USA) in the middle infrared range of 400–4,000 cm^{-1} .

Chitosan is a linear polysaccharide composed of a monomer N-acetyl-1,4-b-D-glucopyranosamine. The IR spectra of native chitosan has specific absorption bands in the region of 3400 cm^{-1} , belonging to OH hydrogen-bound molecular groups, as well as valent oscillations of CH in the region of 2900–2800 cm^{-1} . The absorption in the region 1660 refers to C=O valent vibrations together with a small contribution of the deformation oscillations of NH_2 . The band in the region 1588 is actually referred to as NH_2 deformation oscillations. The region of 1400–1300 is specific of the deformation oscillations of CH molecular groups of [27–29]. In the PEO film we observe an increase in the contribution of valence CH oscillations in the region of 2800–2900 cm^{-1} and deformation CH in the region of 1400–1300 cm^{-1} . However, no frequency shifts in the formation of the chitosan-PEO complex are observed, indicating no intermolecular interactions between components of the polymer film [29–31].

Thus, from the proposed samples of composite biopolymer films based on chitosan, chitosan/PEO 7/3 wt% film was selected, because

the surface roughness of this sample was maximum compared to others (according to electron microscopy). This film had less degree of swelling compared to native chitosan and almost did not differ from the swelling degree of chitosan/PEO 1/1 wt%. The surface roughness of the scaffolds is critical for the selection of material, because in this case the colonization and proliferation of cells in the biopolymer material is more effective [33, 34].

Postoperative material of animals of the study group and samples of native DM of the control group were analyzed by IR spectroscopy. To analyze the IR absorption spectra, tissue samples up to 0.5 mm^3 were excised from 5 sites of dural substitute implants from each animal. For control of experimental samples, similar tissue samples were excised from the intact dura mater over the opposite hemisphere in the same animals, where the injury was not modelled. Thin sections of postoperative tissue were prepared, which were dried at room temperature between two plates of fluoride glass (CaF_2) transparent in the IR region. Next, the obtained films on CaF_2 base were placed in the cuvette chamber of the IFS 66 spectrometer (Bruker, USA) to analyze the absorption spectra.

The absorption spectra of native DM, scar tissue, and the substitutes from regenerating dura mater in a wide spectral range (3400–800 cm^{-1}) were analyzed by infrared spectroscopy and a number of spectroscopic markers for analysis were determined. The most informative for the analysis is the region of absorption of amide bonds Amide I and Amide II in the range 1750–1480 cm^{-1} . The formation of adhesion was macroscopically evaluated according to the Stryker system, table 2 [35].

After euthanasia of animals, tissues and implants were excised for histological examination. Tissue was fixed in serial 5–7–10 % solution of neutral formalin up to 24 hours and performed paraffin-embedded blocks in according standard technique. Serial 5–7 μm thick sections were prepared using a microtome HM430 (Microm, Germany) and stained hematoxylin and eosin. Histological sections were examined on a binocular microscope followed by photo documentation on a light optical photomicroscope Axiophot (Carl Zeiss, Germany) at magnifications objective x100 and x200, ocular x10, and adapter x2. Tissue sections were evaluated for local tissue changes, hemorrhage, cellular alteration in the cortex, the presence of an implant, newly formed dura mater or scar tissue.

Statistical data analysis was performed using the STATISTICA 10.0 software (StatSoft Inc., USA). Statistical significance of differences between groups was determined using the Mann-Whitney U-test. In all cases, the assumptions for the statistical significance of the obtained result were considered correct if the probability of the zero hypothesis was less than 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

In animals of the chitosan/PEO group, the remains of the film were not visualized. The surface of dura mater in the trepanation hole and outside did not differ. The fusion was detected on the periphery of the bone hole, but adhesions in the trepanation area were not detected (Fig. 3). The formation of adhesions between the defect of DM and the remains of the biopolymer film to assess the severity of adhesion was 0–1 points.

Three weeks after the surgery, when using chitosan-based film, the spectral characteristics show the presence of remains of this film in samples of DM from the corners and center of the trepanation window. In the sample of regenerating DM (green curve) the deviation is clearly visible in the area of 1587 cm^{-1} , which definitely belongs to the film (Fig. 4). However, in this sample Amide II band is strongly pronounced at 1550 cm^{-1} , as an indicator of protein tissue. This may indicate the degradation of the chitosan-based film and the repair of normal dural tissue.

It is shown that the IR spectroscopy allows to control the dynamics of dura mater regeneration. According to the analysis of IR absorption spectra, spectral markers of scar tissue, regenerating and intact DM were determined. Scar tissue differs significantly from the tissues of regenerating DM, in particular, the presence of a band in the region 1739 cm^{-1} (C=O),

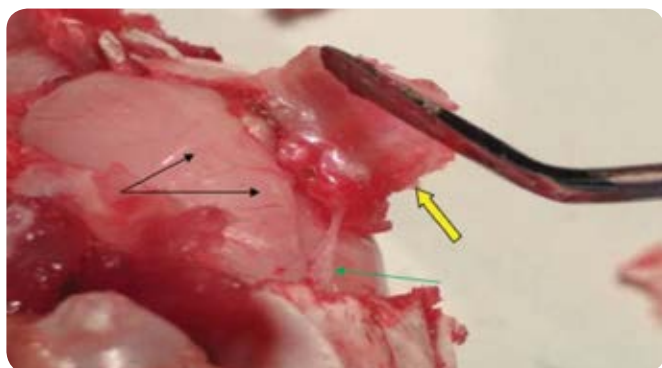


Fig. 3. Macroscopic picture of rats' skull in 3 weeks after duraplasty using biopolymer chitosan-based film. There are ill-defined fibrous adhesions on the periphery of the bone hole (green arrow); there are no adhesions in the area of the film implantation. Black arrows – the surface of dura mater in the surgery area. A yellow arrow – a bone fragment of the cranial vault with the trepanation hole (inner surface), the remaining bones of the cranial vault are removed.

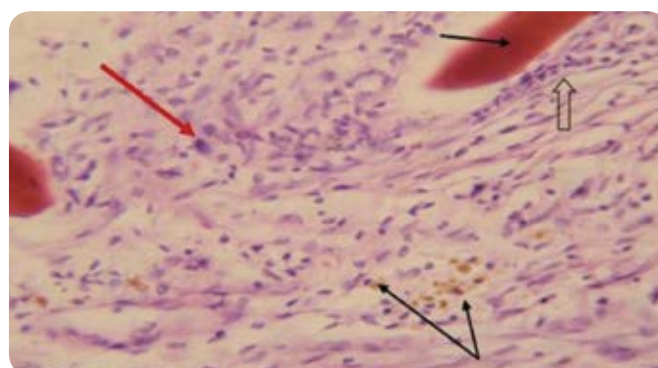


Fig. 5. Photomicrograph of tissue specimen after duraplasty using biopolymer chitosan/PEO 7/3 wt% film. Remains of chitosan (thin black arrows) among the colony of fibroblasts. Round cells – young fibroblasts (red arrow), elongated cells – mature fibroblasts (transparent arrow). Hematoxylin-eosin staining; ob. x200, oc. x10, adapter x2.

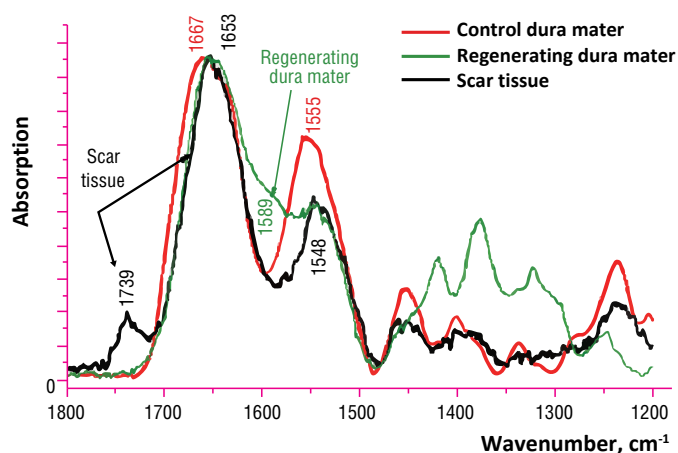


Fig. 4. Absorption spectra of dural tissue samples after implantation of chitosan-based film.

which is completely absent in the spectra of intact and regenerating DM. In addition, the ratio between the Amide I and Amide II bands differs by decreasing the intensity of Amide II and restriction the Amide I band compared to the sample of intact DM. In the sample of regenerating DM the presence of a band of oscillations of NH_2 at 1589 cm^{-1} was identified, which refers to the absorption of the chitosan-based film, which is absent in the samples of intact DM and scar tissue. However, the presence of a band in the region of 1548 cm^{-1} (Amide II) indicates that there are cells on the film and suggests that regeneration processes occur.

The obtained data are confirmed by histological study. Replacement of the implant on the 21st day after surgery with a biopolymer chitosan-based film occurred by forming a new fibrous connective tissue with a large number of hyperchromic fibroblasts and collagen fibers. Fibroblasts had both elongated and oval shape. In some cells (young forms of fibroblasts), rod-like pale-colored nuclei were observed (Fig. 5). The

expression of the bundles of collagen fibers and layers of the surrounding newly formed connective tissue was different. The bundles of fibers facing the cerebral surface from below were thinner than the bundles of fibers localized on the outer surface. The edges of the defect of the dura mater and the newly formed fibrous tissue had no clear boundary. In addition, no inflammatory reactions were observed. The formation of weak adhesions between dura mater and brain is detected. The borderline brain tissue was normal.

The results of the study allow to positively evaluate the effectiveness of the application of the dura mater substitute based on chitosan/PEO 7/3 wt% in rats. It can be assumed that the composite chitosan/PEO dural substitute first performs the function of a solid scaffold, and then PEO degrades or is washed out of the pores of chitosan, where further cells penetrate and the porous material is used to regenerate dura mater. The addition of PEO in the polymer composition led to a decrease in water absorption. The increase of PEO content did not significantly reduce the swelling of the materials.

The surface structure of the chitosan/PEO films depends on the content of polyethylene oxide. Thus, when the content of PEO is 30 wt%, a rougher surface of the film is formed. When the content of PEO in the composite is 50 wt%, there is a decrease in the roughness of the sample, the surface is more homogeneous. This is due to the penetration of PEO macromolecules into the supramolecular structure of chitosan with the simultaneous filling of cavities. The surface roughness of the implant may be important for improved adhesion to the native DM to seal the subdural space. In addition, when PEO is 30 wt%, more pores remain for further penetration of cells.

The analysis of the IR spectrum of the chitosan/PEO 1/1 wt% and chitosan/PEO 7/3 wt% films showed that with the increase of PEO concentration in the mixture the oscillations of amide groups of chitosan in the region of 1530 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} gradually shifts to the region of higher waves. It can be assumed that the strong interactions of amide groups between chitosan molecules change to less strong interactions of the N-H group of chitosan with unpaired electrons of oxygen atoms from polyethylene oxide macromolecules.

CONCLUSION

1. **Chitosan/polyethylene oxide biopolymer film (chitosan/PEO 7/3 wt%) is suitable for duraplasty under experimental conditions.**
2. **Morphological (macroscopic and histological) and spectroscopic (IR absorption) methods show the ability of chitosan/polyethylene oxide film to biodegradation.**
3. **The results of IR spectroscopy and histological data indicate that in the area of the biopolymer film implantation there are processes of normal regeneration of dural tissues, but scar tissue is not formed.**
4. **These studies allow us to conclude about the effectiveness of the chitosan/polyethylene oxide and its positive effect on the regeneration of dura mater in animals.**

REFERENCES

1. MacEwan MR, Kovacs T, Osburn J, Ray Wilson Z. Comparative analysis of a fully-synthetic nanofabricated dura substitute and bovine collagen dura substitute in a large animal model of dural repair. *Interdisciplinary Neurosurg*. 2018; **13**:145-150. DOI:10.1016/j.inat.2018.05.001.4.
2. Matula C, Kjaersgaard L, Di Ieva A. Watertight dural closure in brain surgery: a simple model for training. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*. 2014; **75**(3):241-5. DOI:10.1055/s-0033-1342928.
3. Abuzayed B, Kafadar AM, Oguzoglu SA, Canbaz B, Kaynar MY. Duraplasty using autologous fascia lata reinforced by on-site pedicled muscle flap: technical note. *J Craniofac Surg*. 2009; **20**(2): 435-8. DOI:10.1097/scs.0b013e31819b968f.
4. Hongtao Sun, Hongda Wang, Yunfeng Diao, Yue Tu, Xiaohong Li, Wanyong Zhao, et al. Large retrospective study of artificial dura substitute in patients with traumatic brain injury undergo decompressive craniectomy *Brain Behav*. 2018; **8**(5):e00907. DOI: 10.1002/brb3.907.
5. Miyake S, Fujita A, Aihara H, Kohmura E. New technique for decompressive duraplasty using expanded polytetrafluoroethylene dura substitute--technical note. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2006; **46**(2):104-6. DOI: 10.2176/nmc.46.104.
6. Schmalz P, Griessenauer C, Ogilvy CS, Thomas AJ. Use of an absorbable synthetic polymer dural substitute for repair of dural defects: a technical note. *Cureus*. 2018; **10**(1):e2127. DOI:10.7759/cureus.2127.
7. Hoell T, Hohaus C, Huschak G, Beier A, Meisel HJ. Total dura substitute in the spine: double layer dural substitute made from polylactide layer and bovine pericardium. *Acta Neurochir (Wien)*. 2007; **149**(12):1259-62. DOI:10.1007/s00701-007-1414-8.
8. Narotam PK, Van Dellen JR, Bhoola K, Raidoo D. Experimental evaluation of collagen sponge as a dural graft. *Br J Neurosurg*. 1993; **7**(6):635-41. DOI:10.3109/02688699308995092.
9. Pettorini BL, Tamburrini G, Massimi L, Paternoster G, Caldarelli M, Di Rocco C. The use of a reconstituted collagen foil dura mater substitute in paediatric neurosurgical procedures – Experience in 47 patients *Br J Neurosurg*. 2010; **24**(1):51-4. DOI: 10.3109/02688690903386991.
10. Azzam D, Romiyo P, Nguyen T, Sheppard JP, Alkhalid Y, Lagman C, et al. Dural Repair in Cranial Surgery Is Associated with Moderate Rates of Complications with Both Autologous and Nonautologous Dural Substitutes. *World Neurosurg*. 2018; **113**:244-248. DOI:10.1016/j.wneu.2018.01.115.
11. Arutyunov AI, Meskhia NSh. Nekotorye aktual'nye voprosy plastiki defektov tverdogo mozgovogo obolochki [Some topical issues of the plasty of the defects of the dura mater]. *Voprosy neyrokhirurgii – Neurosurgery Issues*. 1972; **3**: 3-9. [In Russian]
12. Kizmazoglu C, Aydin HE, Kaya I, Atar M, Husemoglu B, Kalemci O, et al. Comparison of Biomechanical Properties of Dura Mater Substitutes and Cranial Human Dura Mater : An *In Vitro* Study *J Korean Neurosurg Soc*. 2019; **62**(6):635-642. DOI:10.3340/jkns.2019.0122.
13. Rosen CL, Steinberg GK, DeMonte F, Delashaw JB Jr, Lewis SB, Shaffrey ME, et al. Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. *Neurosurgery*. 2011; **69**(5):1093-103. DOI: 10.1227/NEU.0b013e3182284aca.
14. Sandoval-Sanchez JH, Ramos-Zuniga R, de Anda SL, et al. A new bilayer chitosan scaffolding as a dural substitute: experimental evaluation. *World neurosurgery*. 2012; **77**(3-4):577-582. DOI:10.1016/j.wneu.2011.07.007.
15. Lam FC, Kasper E. Augmented autologous pericranium duraplasty in 100 posterior fossa surgeries a retrospective case series. *Neurosurg*. 2012; **71**. DOI:10.1227/NEU.0b013e31826a8ab0.
16. Hoover DA, Mahmood A. Ossification of autologous pericranium used in duraplasty. Case report. *J Neurosurg*. 2001; **95**(2):350-352. DOI:10.3171/jns.2001.95.2.0350.
17. Stevens EA, Powers AK, Sweasey TA, Tatter SB, Ojemann RG. Simplified harvest of autologous pericranium for duraplasty in Chiari malformation Type I. Technical note. *J Neurosurg Spine*. 2009; **11**(1):80-83. DOI:10.3171/2009.3.SPINE08196.
18. Warren WL, Medary MB, Dureza CD, et al. Dural repair using acellular human dermis: experience with 200 cases: technique assessment. *Neurosurg*. 2000; **46**(6):1391-1396. DOI:10.1097/00006123-200006000-00020.
19. Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym*. 2017; **164**:268-283. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.02.001.
20. Maslennikova LD. *Polymer Composites [Polimerni kompoziti]*. Kyiv, 2011. 300 p. [in Ukrainian]
21. Guo W, Guo Q, Zhang S, Li J. Manufacturing of artificial dura mater with chitosan polylactic acid. *Chin J Clin Rehabil*. 2005; **9**:24-25.
22. Mengistu Lemma, Bossard SF, Rinaudo M. Preparation of Pure and Stable Chitosan Nanofibers by Electrospinning in the Presence of Poly (ethylene oxide). *IJMS*. 2016; **17**(11):E1790.
23. Reed AM, Gilding DK. Biodegradable polymers for use in surgery—Poly(ethylene oxide)/poly(ethylene terephthalate) (PEO/PET) copolymers: 2. *In vitro* degradation. *Polymer*. 1981; **22**:499-504.
24. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; **75**(1):1-18. DOI:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
25. Zivanovic S, Li J, Davidson PM, Kit K. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomacromolecules*. 2007; **8**(5):1505-1510. DOI:10.1021/bm061140p.
26. Basu A, Krady JK, O'Malley M, Styren SD, DeKosky ST, Levison SW. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the

- induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci*. 2002; **22**(14):6071-6082. DOI:10.1523/JNEUROSCI.22-14-06071.2002.
27. *Dimzon IK, Knepper TP*. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *Int J Biol Macromol*. 2015; **72**:939-945. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.050.
 28. *Kumirska J, Czerwicka M, Kaczyński Z, et al*. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar Drugs*. 2010; **8**(5):1567-1636. DOI:10.3390/md8051567.
 29. *Paluszkiewicz C, Stodolak E, Hasik M, Blazewicz M*. FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2011; **79**(4):784-788. DOI: 10.1016/j.saa.2010.08.053.
 30. *Park HJ, Lee JS, Lee OJ, et al*. Fabrication of microporous three-dimensional scaffolds from silk fibroin for tissue engineering. *Macromol Res*. 2014; **22**:592-599. doi.org/10.1007/s13233-014-2083-0.
 31. *Yiin-Kuen Fuh, Shengzhan Chen, Jason S. C. Jang*. Direct-write, Well-aligned Chitosan-Poly (ethylene oxide) Nanofibers Deposited via Near-field Electrospinning, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. 2012; **49**(10):845-850. DOI:10.1080/10601325.2012.714676.
 32. *Zivanovic S, Li JP, Davidson M, Kit K*. Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films. *Biomacromolecules*. 2007; **8**:1505-1510. DOI:10.1021/bm061140p.
 33. *Katalinich M*. Characterization of Chitosan Films for Cell Culture Applications. The University of Maine, 2001.
 34. *Foster LJ, Ho S, Hook J, Basuki M, Marçal H*. Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physicochemical, Material and Biological Properties. *PLoS One*. 2015; **10**(8):e0135153. DOI:10.1371/journal.pone.0135153.
 35. Pre-Clinical Evaluation of Collagen Dura Substitutes in a Rabbit Duraplasty Model: DuraMatrix Suturable. 2015. <https://cmf.stryker.com/assets/files/3i/duramatrix-suturable---white-paper.pdf>



ARTICLE ON THE SITE
TRANSPLANTOLOGY.ORG

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Оригінальна стаття = Original article = Оригинальная статья

Ukr Neurosurg J. 2019;25(4):64-71
doi: 10.25305/unj.184031

Теоретичне обґрунтування ефективності застосування біополімерів при експериментальній черепно-мозковій травмі (огляд літератури та власні результати)

Пантелейчук А.Б.¹, Каджая М.В.¹, Шмельова А.А.², Малишева Т.А.², Гнатюк О.П.³, Довбешко Г.І.³

¹ Відділ нейроtraumi, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

² Відділ нейропатоморфології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

³ Відділ фізики біологічних систем, Інститут фізики НАН України, Київ, Україна

Надійшла до редакції 18.10.2019

Прийнята до публікації 18.11.2019

Адреса для листування:

Пантелейчук Андрій Борисович,
відділення нейроtraumi,
Інститут нейрохірургії ім. акад.
А.П. Ромоданова, вул. Платона
Майбороди, 32, Київ, 04050,
Україна, basirovich@ukr.net

Мета: на основі аналізу літературних джерел обґрунтувати доцільність застосування біополімерних плівок на основі колагену для пластики твердої мозкової оболонки (ТМО), виявити і проаналізувати в експерименті здатність зазначеного матеріалу до біодеградації за допомогою методів світлооптичної мікроскопії та інфрачервоної спектроскопії, вивчити можливість застосування біополімерних плівок на основі колагену для пластики ТМО в умовах експерименту.

Матеріали і методи. Прооперовано під загальним наркозом 13 щурів з масою тіла 200–250 г. Проведено краніотомію. Розсікали хрестоподібно ТМО від середини отвору до його кутів. Оголювали поверхню кори мозку і проводили penetрацію кори голкою розміром G 18 на глибину 2 мм. Клапті ТМО не ушивали, вони залишалися із діапазом між краями. Зверху вкладали шматочок колагенової плівки. Кістковий клапоть видаляли. Основну групу утворили 10 тварин, контрольну (без застосування колагенової плівки) – 3. Через 3 тиж після операції всіх тварин вивели з експерименту. Місце операції, зокрема череп та кіркову тканину, вилучили для макроскопічного і гістологічного дослідження та молекулярного аналізу за допомогою інфрачервоної спектроскопії.

Результати. За результатами макроскопічного і гістологічного дослідження виявлено, що колагеновий замітник ТМО не призводить до виражених запальних ускладнень і надмірного рубцево-спайкового процесу, запобігає ліквореї, здатний до біодеградації із заміщенням плівки власною сполучною тканиною.

Висновки. Підтверджено здатність колагенових плівок до біодеградації через 3 тиж після penetраційної травми у щурів в експерименті. Дані інфрачервоної спектроскопії і морфологічні дані свідчать про те, що на межі між колагеновим імплантатом і нативною ТМО відбуваються процеси регенерації ТМО, а не формування рубцевої тканини. Отримані дані теоретично обґрунтовують можливість застосування колагенових заміників для пластики дефектів ТМО.

Ключові слова: експериментальна черепно-мозкова травма; пластика твердої мозкової оболонки; колагенова плівка; біодеградація; морфологічне дослідження, інфрачервона спектроскопія

Theoretical substantiation of the efficiency of biopolymers application in experimental TBI (literature review and own results)

Andriy B. Panteleychuk¹, Nikolay V. Kadzhaya¹, Anna A. Shmeleva², Tatyana A. Malysheva², Olena P. Hnatyuk³, Galina I. Dovbeshko³

¹ Department of Neurotrauma, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine

² Department of Neuropathomorphology, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine

³ Department of Physics of Biological Systems, Institute of Physics of NASU, Kyiv, Ukraine

Received, 18 October 2019

Accepted, 18 November 2019

Objective: based on the analysis of literary sources, to justify the feasibility of using collagen-based biopolymer films for dura mater, to analyze experimentally the ability of this material to biodegrade and form a new dura mater using light optical microscopy and IR spectroscopy, and to investigate the possibility of application of biopolymer collagen-based films as a substitute for the dura mater.

Materials and methods. Thirteen rats weighing 200–250 g under general anesthesia were operated. Craniotomies were performed. The dura mater was incised crosswise from the middle to its corners. The surface of the cerebral cortex was exposed and was penetrated with a G18 needle to a depth of 2 mm. Dura mater flaps were not sutured with diastasis between the edges. A small piece of collagen film was placed over dissected dura and the bone flap was removed. The basic group consisted of 10 animals and the control group without collagen film included 3 animals. Three weeks after the

Copyright © 2019 Andriy B. Panteleychuk, Nikolay V. Kadzhaya, Anna A. Shmeleva, Tatyana A. Malysheva, Olena P. Hnatyuk, Galina I. Dovbeshko



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Address for correspondence:

Andriy B. Panteleychuk, Department of Neurotrauma, Romodanov Neurosurgery Institute, 32, Platona Mayborody str., Kyiv, 04050, Ukraine, basirovich@ukr.net

intervention, all animals were euthanized and operating sites, including skull and cortical tissue, were explanted for histological, macroscopic examination and molecular analysis by infrared spectroscopy.

Results. According to the results of macroscopic and histological examination, collagen substitute for the dura mater does not lead to severe inflammatory complications and excessive scar adhesions, prevents cerebrospinal fluid outflow, is capable of biodegradation with the replacement of connective tissue resembling a newly formed dura mater.

Conclusions. 1. The experiment confirmed the ability of collagen-based films to biodegrade in 3 weeks after penetration trauma in rats. 2. The data of both infrared spectroscopy and morphological study indicate that at the border of the collagen implant and the native dura mater the regeneration processes prevail over the formation of scar tissue. 3. The data obtained confirm the collagen-based substitute to be used for dura mater plastics.

Keywords: *dura mater plastics; collagen-based film; biodegradation; morphological study; IR spectroscopy*

Теоретическое обоснование эффективности применения биополимеров при экспериментальной черепно-мозговой травме (обзор литературы и собственные результаты)

Пантелейчук А.Б.¹, Каджая Н.В.¹, Шмелева А.А.², Малышева Т.А.², Гнатюк Е.П.³, Довбешко Г.И.³

¹ Отделение нейротравмы, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

² Отдел нейроморфологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

³ Отдел физики биологических систем, Институт физики НАН Украины, Киев, Украина

Поступила в редакцию 18.10.2019

Принята к публикации 18.11.2019

Адрес для переписки:

Пантелейчук Андрей Борисович, отделение нейротравмы, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, 04050, Украина, basirovich@ukr.net

Цель: на основе анализа литературных источников обосновать целесообразность применения биополимерных пленок на основе коллагена для пластики твердой мозговой оболочки (ТМО), выявить и проанализировать в эксперименте способность указанного материала к биодegradации с помощью методов светооптической микроскопии и инфракрасной спектроскопии, изучить возможность применения биополимерных пленок на основе коллагена для пластики ТМО в условиях эксперимента.

Материалы и методы. Прооперированы под общим наркозом 13 крыс с массой тела 200–250 г. Проведена краниотомия. Рассекали крестообразно ТМО от середины отверстия к его углам. Обнажали поверхность коры мозга и проводили пенетрацию коры иглой размером G 18 на глубину 2 мм. Лоскуты ТМО не ушивали, они оставались с диастазом между краями. Сверху укладывали кусочек коллагеновой пленки. Костный лоскут удаляли. Основную группу составили 10 животных, контрольную (без применения коллагеновой пленки) – 3. Через 3 нед после операции все животные были выведены из эксперимента. Место операции, включая череп и корковую ткань, извлекали для макроскопического и гистологического исследования и молекулярного анализа с помощью инфракрасной спектроскопии.

Результаты. По результатам макроскопического и гистологического исследования выявлено, что коллагеновый заменитель ТМО не приводит к выраженным воспалительным осложнениям и чрезмерному рубцово-спаечному процессу, предупреждает истечение ликвора, способен к биодegradации с замещением пленки собственной соединительной тканью.

Выводы. Подтверждена способность коллагеновых пленок к биодegradации через 3 нед после пенетрационной травмы у крыс в эксперименте. Данные инфракрасной спектроскопии и морфологические данные свидетельствуют о том, что на границе между коллагеновым имплантатом и нативной ТМО происходят процессы регенерации ТМО, а не формирование рубцовой ткани. Полученные данные теоретически обосновывают возможность применения коллагеновых заменителей для пластики дефектов ТМО.

Ключевые слова: *экспериментальная черепно-мозговая травма; пластика твердой мозговой оболочки; коллагеновая пленка; биодegradация; морфологическое исследование, инфракрасная спектроскопия*

Тверда мозкова оболочка (ТМО) – герметизувальна мембрана із сполучної тканини, яка складається переважно з колагенових волокон різного діаметра, має впорядковану багаторівневу/багатшарову структуру і різний напрямок волокон та судин у певних анатомічних ділянках [1]. Порушення

цілісності ТМО після черепно-мозкової травми (ЧМТ) і/або нейрохірургічних втручань є причиною різних ускладнень з боку ЦНС. Найпоширенішою практичною на завершальному етапі нейрохірургічної операції вважають відновлення герметичності та водонепроникності ТМО, щоб запобігти пошкодженню тканин

Стаття містить рисунки, які відображаються в друкованій версії у відтинках сірого, в електронній — у кольорі.

кори мозку і витіканню ліквору [2]. Частота виникнення ліквореї після краніотомії становить 7–10% [3–5]. Вважають, що герметичне закриття ТМО асоціюється зі зниженням частоти ліквореї і меншою кількістю локальних інфекційних ускладнень [6,7]. У зв'язку з цим застосування біодеградувальних матеріалів, які сприяють репарації дефектів ТМО, є актуальним і має не лише медичне, а і соціальне значення.

Замінники ТМО класифікують за походженням і способом отримання, хімічними та біомеханічними характеристикам: автотрансплантати, алотрансплантати, ксенотрансплантати і синтетичні трансплантати [8–11]. Ми досліджували переважно матеріал, в якому колагенова основа є матрицею для відновлення цілісності ТМО.

У 1924 р. W G Penfield запропонував концепцію ідеального замінника ТМО, наголосивши на необхідності пошуку матеріалів, які б розсмоктувалися після запобігання адгезії. Було встановлено, що ушкодження м'якої та арахноїдальної оболонок забезпечує адгезію незалежно від типу замінника ТМО, що в подальшому підтвердилося [12,13]. Отже, «ідеальний замінник» ТМО має забезпечувати непроникність для рідин, відповідати фізичним властивостям ТМО людини, щоб забезпечити захист тканин мозку, бути легким і зручним для маніпуляцій під час операції при намочуванні у фізіологічному розчині; механічні властивості матеріалу мають полегшувати накладання швів і/або склеювання; мінімізувати місцеве запалення тканин для запобігання утворенню небажаного рубцювання і фіброзу або спайок; стимулювати на різних етапах наближену до фізіологічної фільтрацію клітинами (макрофагами, фібробластами) і бути матрицею для прискорення відновлення цілісності шляхом формування модифікованої ТМО; сприяти ремодельованню судинної сітки; бути ергономічно та економічно виправданим [14,8,15–19]. Обґрунтовано п'ять основних вимог до імплантату, які дають змогу наблизитися до «ідеального замінника» ТМО: по-перше, імплантат має тимчасово або постійно виконувати захисну функцію, відокремлюючи і герметизуючи субдуральний простір від епідурального; по-друге, імплантат має індукувати власні клітини до диференціювання і усунути дефіцит тканини ТМО (менінготеліальна індукція); по-третє, імплантат має сприяти інфільтрації та імплантації фібробластів (менінготеліальна провідність), що є функціональним показником тривимірної структури трансплантата; по-четверте, бажано щоб імплантат містив клітинні компоненти, здатні регенерувати нативну тканину (фібро- і менінготеліогенез); по-п'яте, імплантат має бути пластичним, тобто мати здатність легко набувати потрібної форми і відповідати хірургічному дефекту без деформації оточуючих тканин, а також відповідну еластичність (міцність до розтягнення) – здатність утримувати хірургічний шов під напруженням [20]. Важливе значення має дотримання двох умов: відновлення герметичності ТМО для запобігання ліквореї і потенційна здатність імплантату до біодеградації з рівномірним відновленням цілісності нативної ТМО.

Найкращим матеріалом для створення імплантатів ТМО, який найбільшою мірою відповідає ззначеним критеріям, визнано колаген, який міститься в усіх

сполучних тканинах. Це одна з найбільш вивчених біомолекул позаклітинного матриксу [21].

З огляду на наведені дані для дослідження було обрано біоплівку на основі колагену, яка є матрицею відновлення цілісності ТМО.

Колагенова матриця є найпоширенішим ксеногенним замінником ТМО, отриманим з перикарда, сухожилків великої рогатої худоби, бичачої або свинячої підслизової оболонки тонкої кишки. Ці біоматеріали обробляють для видалення клітинних та інших імуногенних компонентів [22,23]. Структура, функція і синтез колагену I типу добре вивчено [24,25]. Молекули колагену мають здатність до самостійної полімеризації з утворенням міцних волокон, які формують тривимірні впорядковані структури. Колаген в тканинах існує у вигляді волокон, фібрил і макроскопічних пучків [26,27]. Він є інертним, еластичним, адгезивним матеріалом, який легко обробляти. Завдяки здатності до відновлення первинної і вторинної структури колаген має слабку імунореактивність і спричиняє незначну запальну реакцію та реакцію відторгнення стороннього тіла [28], хоча виявлено антитіла до бичачого колагену [29]. Колаген є хемоатрактантом для фібробластів [30]. Ця особливість у поєднанні з пористою структурою колагенового матриксу сприяє адгезії та проліферації фібробластів і неоваскуляризації [31]. Колагеновий матрикс гідрофільний, з гарною білково-клітинною взаємодією, але його недоліками крихкість, швидка біодеградація, що створює труднощі з підтримкою бажаної форми при повільній репарації [23,32–33]. Негативним чинником є також ризик передачі вірусів та їх складових від донора [34].

Методологія оцінки замінника ТМО передбачає: характеристику фізичних властивостей (міцність на розтягнення, спроможність швів, кут змочування (контактний кут), ζ -потенціал), цитологічних (клітинна культура, тест на цитотоксичність (МТТ-тест), конфокальна лазерна сканувальна мікроскопія, сканувальна електронна мікроскопія) і вивчення біосумісності (проведення експерименту з макро- та мікроскопічною (гістологічною) оцінкою за спеціальними методиками (забарвлення трихромом за Массоном) [35]. Характеристику репаративних процесів визначають гістологічними та мікроскопічними методами. Однак у доступній літературі ми не виявили фізичних методів дослідження, які дають змогу підтвердити формування нової тканини ТМО. Одним з таких методів можна вважати інфрачервону спектроскопію (ІЧ-спектроскопія). Інфрачервона спектроскопія виявилася важливим інструментом для вивчення біологічних молекул (білків, ліпідів, вуглеводів і нуклеїнових кислот). Цей метод дає змогу ідентифікувати окремі молекули та характеризувати зміни їх хімічної структури. Розширюються можливості застосування ІЧ-спектроскопії для вивчення біологічних об'єктів [36].

Мета: на основі аналізу літературних джерел обґрунтувати доцільність застосування біополімерних плівок на основі колагену для пластики твердої мозкової оболонки, виявити і проаналізувати в експерименті здатність зазначеного матеріалу до біодеградації за допомогою методів світлооптичної мікроскопії та інфрачервоної спектроскопії, вивчити можливість

застосування біополімерних плівок на основі колагену для пластики твердої мозкової оболонки в умовах експерименту.

Матеріали і методи

Дослідження проведене на щурах. Тварин утримували за природної змінності циркадного світлового циклу. Годували збалансованим комбінованим кормом ad libitum. Хірургічна частина експерименту і виведення тварин з експерименту проведені з дотриманням принципів біоетики, регламентованих Директивою 2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» (2010) та Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006). Проведення дослідження схвалене Комітетом з біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України» (протокол №18 від 10.06.2016 р.).

Для проведення хірургічної процедури відібрано 13 тварин віком 12 міс з масою тіла 200–250 г, яким після краніотомії та нанесення пенетраційної травми мозку проведено пластику ТМО колагеновою плівкою. Тварин розподілили на три групи: першу (n=5) – для

гістологічного дослідження, другу (n=5) – для молекулярного дослідження, контрольну (без застосування колагенової плівки) (n=3).

Операцію проводили під загальним знеболюванням: внутрішньом'язово вводили розчин ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща, 15 мг/кг маси тіла) та кетаміну (Calipsol, Gedeon Richter, Угорщина, 70 мг/кг маси тіла). Всі хірургічні маніпуляції проводили у стерильних умовах з використанням стерильних матеріалів. Після ретельного видалення шерстистого покриву голови і дезінфекції 10% розчином бетадіну (Betadine, Egis, Угорщина) виконували розріз по середній лінії та оголювали кістки склепіння черепа. Формували трепанаційний отвір (вікно) розміром 4 × 7 мм у правій тім'яній ділянці за допомогою високооборотного дреля. Розмір трепанаційного вікна ретельно контролювали. Кістковий клапоть обережно відсепарували від підлеглої ТМО і видаляли. Під ТМО обережно, щоб не пошкодити мозок, заводили голку від інсулінового шприца, трохи підіймали ТМО і розсікали хрестоподібно від середини отвору до його кутів. Оголювали поверхню мозку, вкритують її мозковою оболонкою (ММО), і проводили пенетрацію кори головного мозку голкою розміром G 18 на глибину 2 мм. Таким чином моделювали тяжку ЧМТ з вогнищем геморагії [37].

Клапоть ТМО укладали на місце без ушивання, з діастазом між краями. Поверх них розташовували колагенову плівку. Кістковий клапоть на місце не укладали. Таким чином було змодельовано декомпресивну трепанацію черепа (**Рис. 1-3**). Після забезпечення гемостазу рану ретельно ушивали, при цьому кістковий клапоть на місце не укладали. Рана повторно обробляли розчином бетадіну. Проводили антибіотикопрофілактику (цефтріаксон внутрішньом'язово в дозі 20 мг/кг маси тіла) [38].

Тварини виводили з експерименту на 21-шу добу під наркозом 0,1% кетаміну (2 мл).

Після виведення тварини з експерименту тканини із зони операції вилучали для гістологічного дослідження (єдиним блоком). Проводили забарвлення гематоксиліном та еозином за стандартними методиками.

Методом ІЧ-спектроскопії (спектрометр Bruker IFS 66) проаналізовано спектри поглинання ТМО, рубцевої тканини та полімерної колагенової плівки у



Рис. 1. Сформоване трепанаційне вікно (1-й етап). Стрілкою вказана поверхня твердої мозкової оболонки. Макропрепарат



Рис. 2. Нанесення травми (2-й етап). Пенетрація мозку. Макропрепарат



Рис. 3. Плівку укладено поверх клаптів твердої мозкової оболонки (3-й етап). Макропрепарат

широкому спектральному діапазоні (3400–800 cm^{-1}) і визначено набір спектроскопічних маркерів для аналізу. Найінформативнішою для аналізу є область поглинання амідних зв'язків Амід I та Амід II у діапазоні 1750–1480 cm^{-1} .

Результати та обговорення

Після виведення тварини з експерименту розсікали шкіру на голові по середній лінії. Зону операції в ділянці трепанаційного вікна оцінювали на наявність зрощень між шкірою, поверхнею ТМО і корою мозку. Візуально залишки плівки не виявляли, поверхня ТМО в зоні та поза зоною трепанації візуально не відрізнялися, спостерігали зрощення по периферії кісткового вікна. Зрощень у просвіті трепанаційного вікна не виявлено. Потім кістки склепіння черепа відділяли від його основи (Рис. 4) і забирали матеріал для молекулярного дослідження (ІЧ-спектроскопії): клаптики ТМО по периферії кісткового вікна, на межі між

залишками полімерної плівки та неушкодженій «материнській» оболонки. Для гістологічного дослідження вилучали блок тканин із зони операції (ділянку мозку, кістки черепа та його оболонки).

При гістологічному дослідженні виявлено характерні структурні зміни будови в місці експериментального застосування біоматеріалу: колагеновий імплантат через 3 тиж мав ознаки розшарування (біодеградації) на волокна і заміщення сполучною тонковолокнистою фіброзною тканиною (Рис. 5), краї імплантату щільно зростаються з ТМО і внутрішніми шарами кісток черепа внаслідок активації клітин окістя. Наслідком операційної травми (термічної дії високооборотного дреля при трепанації черепа на тонку кісткову тканину) можна пояснити явища резорбції кістки по периметру кісткового дефекту (Рис. 6), а в прилеглий мозковій тканині – явища перичелюлярного набряку як безпосередньо в ділянці penetрації мозку, так і на відстані від неї, а також скупчення гіперпластично активованих астроцитів довкола зони травми. Крім того, відзначено наявність локальних підгострих запальних інфільтратів (лімфоцити, моноцити, макрофаги) і зони крововиливів (Рис. 7).

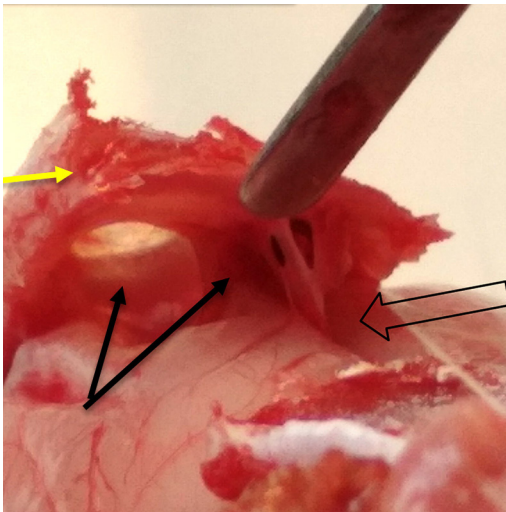


Рис. 4. Друга група після пластики колагеном, 21-ша доба експерименту. Жовта стрілка – кістки склепіння черепа, прозора стрілка – серповидний відросток, чорні стрілки – рубцево-спайкова тканина по периферії трепанаційного вікна. Макропрепарат

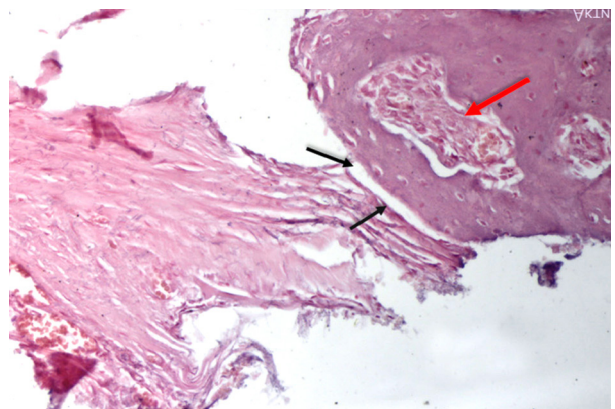


Рис. 6. Перша група, 21-ша доба. Ділянки деградації волокон колагену і заміщення тонкою фіброзною тканиною (стрілки). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$

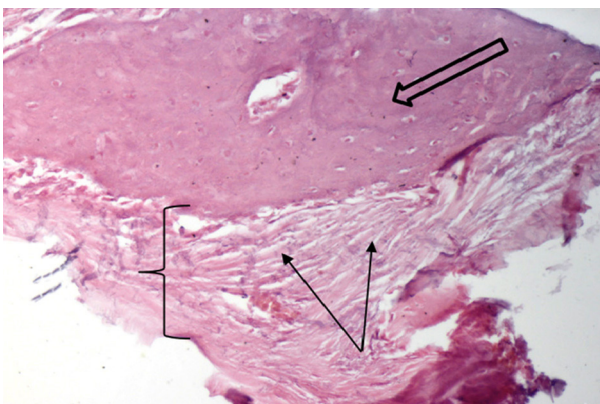


Рис. 5. Перша група, 21-ша доба. Ділянки розм'яктування колагену (дужка) і заміщення сполучною тонковолокнистою фіброзною тканиною (стрілки). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$

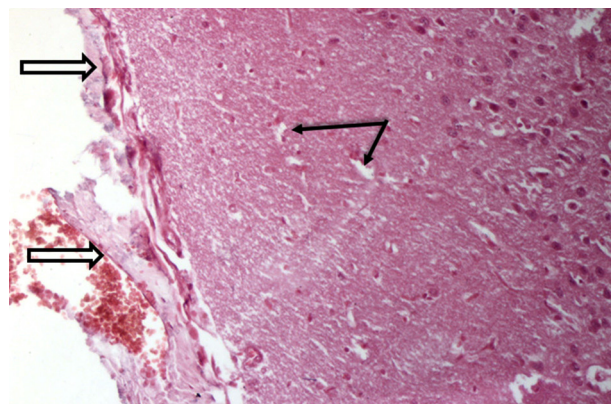


Рис. 7. Перша група, 21-ша доба. Ділянки пластики твердої мозкової оболонки (біла стрілка – колагеновий імплант), м'якої мозкової оболонки (чорна стрілка) і прилеглих шарів кори мозку (набряк). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$

Дослідження за допомогою ІФ-спектроскопії. Коливальна спектроскопія є ефективним і високо-точним інструментом для аналізу біологічних молекул і тканин та ефективно використовується зокрема для вирішення багатьох прикладних завдань медицини. У нас є позитивний досвід використання коливальної спектроскопії для дослідження ефективності клітинної терапії при хронічному запаленні ахілового сухожилля [39]. Основною перевагою цього методу є специфічність молекулярних спектрів та їх конформаційна чутливість. Існує чітка залежність характеристик ІЧ-спектрів від будови молекул, що ґрунтується на характеристичності нормальних коливань для певних хімічних зв'язків та їх комбінацій, молекулярних груп у молекулі та різних просторових структур.

Молекулярні коливання будь-якої білкової молекули можуть бути описані у термінах коливань молекулярних груп, які входять до складу пептидного зв'язку, а саме валентне С=О, валентне С - N, валентне N - H, деформаційне ОСN, деформаційне

CNH, крутильне С-N, деформаційні коливання С=О і N-H. Усі ці коливання сильно змішані та перекриваються, утворюючи декілька характеристичних для білкової молекули смуг - амід А (3300 cm^{-1}), амід В (3080 cm^{-1}), амід І (1650 cm^{-1}), Амід ІІ (1545 cm^{-1}), Амід ІІІ- ІV [40,41] (Рис. 8).

Для рубцевої тканини є характерною наявність смуги С=О коливань в області 1739 cm^{-1} , відсутність плеча в області 1667 cm^{-1} (1667 cm^{-1} та 1653 cm^{-1} у контролі, лише 1653 cm^{-1} у рубці), за рахунок цього смуга Амід І у рубці значно звужується та спостерігається низькочастотний зсув смуги Амід ІІ (із 1555 cm^{-1} у контролі до 1548 cm^{-1} у рубці). Ці особливості дають змогу відрізнити рубцеву тканину від інтактної ТМО.

За результатами аналізу коливальних спектрів показано, що зразки тканини з місця травми за спектральними характеристиками близькі до контрольної ТМО протилежної півкулі тварини і статистично значуще відрізняються від рубцевої тканини тварини контрольної групи (Рис. 9), тому

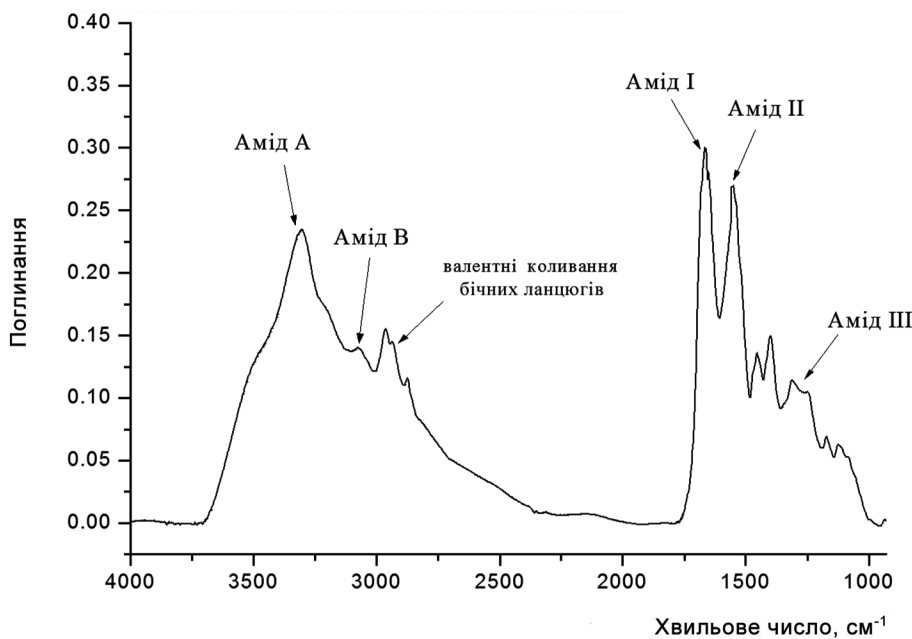


Рис. 8. Характеристичні смуги поглинання білка в інфрачервоному діапазоні

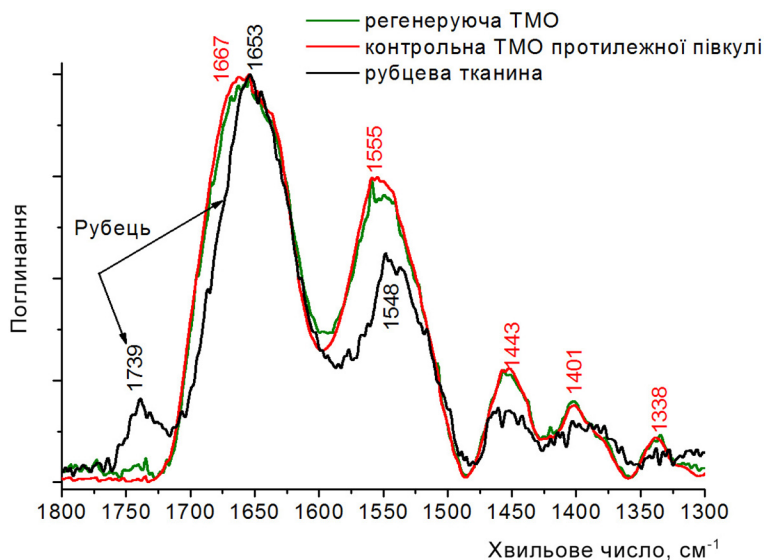


Рис. 9. Спектри поглинання зразків тканин твердої мозкової оболонки в інфрачервоному діапазоні

можна стверджувати, що використання колагенових плівок сприяє регенерації ТМО і запобігає утворенню рубця [42,43].

Отримані нами дані довели, що біополімерні імплантати є ефективними для відновлення цілісності ТМО і продемонстрували здатність до біодеградації із заміщенням власною сполучною тканиною.

Висновки

Підтверджено здатність колагенових плівок до біодеградації через 3 тиж після пенетраційної черепно-мозкової травми у щурів в експерименті.

Дані інфрачервоної спектроскопії і морфологічні дані свідчать про те, що на межі між колагеновим імплантатом і нативною твердою мозковою оболонкою відбуваються процеси регенерації твердої мозкової оболонки, а не формування рубцевої тканини.

Отримані дані теоретично обґрунтовують можливість застосування колагенових замінників для пластики дефектів твердої мозкової оболонки.

Розкриття інформації

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Етичні норми

Всі процедури, виконані підослідним тваринам, відповідають підзаконним й етичним нормам та схвалені комітетом з питань етики наукової установи, на базі якої проведено дослідження.

Фінансування

Дослідження не мало спонсорської підтримки.

References

- Protasoni M, Sangiorgi S, Cividini A, Culivaris GT, Tomei G, Dell'Orbo C, Raspanti M, Balbi S, Reguzzoni M. The collagenic architecture of human dura mater. *J Neurosurg.* 2011 Jun;114(6):1723-30. doi: 10.3171/2010.12.JNS101732. PMID: 21294622.
- MacEwan MR, Kovacs T, Osburn J, Ray WZ. Comparative analysis of a fully-synthetic nanofabricated dura substitute and bovine collagen dura substitute in a large animal model of dural repair. *Interdisciplinary Neurosurgery.* 2018 Sep 1;13:145-50. doi: 10.1016/j.inat.2018.05.001.
- Grotenhuis JA. Costs of postoperative cerebrospinal fluid leakage: 1-year, retrospective analysis of 412 consecutive nontrauma cases. *Surg Neurol.* 2005 Dec;64(6):490-3, discussion 493-4. doi: 10.1016/j.surneu.2005.03.041. PMID: 16293457.
- Kumar A, Maartens NF, Kaye AH. Evaluation of the use of BioGlue in neurosurgical procedures. *J Clin Neurosci.* 2003 Nov;10(6):661-4. doi: 10.1016/s0967-5868(03)00163-2. PMID: 14592612.
- Kehler U, Hirdes C, Weber C, Spuck S, Tronnier V, Kundt G, Piek J. CSF leaks after cranial surgery—a prospective multicenter analysis. *Innovative Neurosurgery.* 2013 Feb 1;1(1):49-53. doi: 10.1515/ins-2012-0002.
- Matula C, Kjærsgaard L, Di Ieva A. Watertight dural closure in brain surgery: a simple model for training. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg.* 2014 May;75(3):241-5. doi: 10.1055/s-0033-1342928. PMID: 23681920.
- Abuzayed B, Kafadar AM, Oguzoglu SA, Canbaz B, Kaynar MY. Duraplasty using autologous fascia lata reinforced by on-site pedicled muscle flap: technical note. *J Craniofac Surg.* 2009 Mar;20(2):435-8. doi: 10.1097/scs.0b013e31819b968f. PMID: 19326487.
- Rosen CL, Steinberg GK, DeMonte F, Delashaw JB Jr, Lewis SB, Shaffrey ME, Aziz K, Hantel J, Marciano FF. Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. *Neurosurgery.* 2011 Nov; 69 (5):1093-103; discussion 1103-4. doi: 10.1227/NEU.0b013e3182284aca. PMID: 21670715.
- Sabatino G, Della Pepa GM, Bianchi F, Capone G, Rigante L Albanese A, Maira G, Marchese E Autologous dural substitutes: a prospective study. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014 Jan;116:20-3. doi: 10.1016/j.clineuro.2013.11.010. PMID: 24300745.
- Berjano R, Vinas FC, Dujovny M. A review of dural substitutes used in neurosurgery. *Crit Rev Neurosurg.* 1999 Jul 28;9(4):217-222. doi: 10.1007/s003290050136. PMID: 10436210.
- Schmalz P, Griessenauer C, Ogilvy CS, Thomas AJ. Use of an absorbable synthetic polymer dural substitute for repair of dural defects: a technical note. *Cureus.* 2018 Jan;10(1):e2127 doi: 10.7759/cureus.2127. PMID: 29607275; PMCID: PMC5875978.
- Narotam PK, Van Dellen JR, Bhoola K, Raidoo D. Experimental evaluation of collagen sponge as a dural graft. *Br J Neurosurg.* 1993;7(6):635-41; doi: 10.3109/02688699308995092. PMID: 8161425.
- Pettorini BL, Tamburrini G, Massimi L, Paternoster G, Caldarelli M, Di Rocco C. The use of a reconstituted collagen foil dura mater substitute in paediatric neurosurgical procedures – Experience in 47 patients *Br J Neurosurg.* 2010 Feb;24(1):51-4. doi: 10.3109/02688690903386991. PMID: 20158353.
- Esposito F, Cappabianca P, Fusco M, Cavallo LM, Bani GG, Birolì F, Sparano A, de Divitiis O, Signorelli A. Collagen-only biomatrix as a novel dural substitute. Examination of the efficacy, safety and outcome: clinical experience on a series of 208 patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2008 Apr;110(4):343-51. doi: 10.1016/j.clineuro.2007.12.016. PMID: 18242823.
- Birolì F, Esposito F, Fusco M, Bani GG, Signorelli A, de Divitiis O, Cappabianca P, Cavallo LM. Novel equine collagen-only dural substitute. *Neurosurgery.* 2008 Mar;62(3 Suppl 1):273-4; discussion 274. doi: 10.1227/01.neu.0000317404.31336.69. PMID: 18424997.
- Caroli E, Rocchi G, Salvati M, Delfini R. Duraplasty: our current experience. *Surg Neurol.* 2004 Jan; 61(1):55-9. doi: 10.1016/s0090-3019(03)00524-x. PMID: 14706380.
- Danish SF, Samdani A, Hanna A, Storm P, Sutton L. Experience with acellular human dura and bovine collagen matrix for duraplasty after posterior fossa decompression for Chiari malformations. *J Neurosurg.* 2006 Jan;104(1 Suppl):16-20. doi: 10.3171/ped.2006.104.1.16. PMID: 16509475.
- Horaczek JA, Zierski J, Graewe A. Collagen matrix in decompressive hemicraniectomy. *Neurosurgery.* 2008 Jul;63(1 Suppl 1):ONS176-81; discussion ONS181. doi: 10.1227/01.neu.0000335033.08274.1c. PMID: 18728597.
- Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y, Iwata H, Yamamoto K. Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. *J Neurosurg.* 1997 Jun;86(6):1012-7. doi: 10.3171/jns.1997.86.6.1012. PMID: 9171181.
- Litvack ZN, West GA, Delashaw JB, Burchiel KJ, Anderson VC. Dural augmentation: part I-evaluation of collagen matrix allografts for dural defect after craniotomy *Neurosurgery.* 2009 Nov;65(5):890-7; discussion 897. doi: 10.1227/01.NEU.0000356970.22315.BC. PMID: 19834401.
- Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials.* 2010 Mar;3(3):1863-87. doi: 10.3390/ma3031863
- McCall TD, Fults DW, Schmidt RH. Use of resorbable collagen dural substitutes in the presence of cranial and spinal infections-report of 3 cases. *Surg Neurol.* 2008 Jul;70(1):92-6; discussion 96-7. doi: 10.1016/j.surneu.2007.04.007. PMID: 18262619.
- Sekhar LN, Mai JC. Dural repair after craniotomy and the use of dural substitutes and dural sealants. *World Neurosurg.* 2013 Mar-Apr;79(3-4):440-2. doi: 10.1016/j.wneu.2011.12.062. PMID: 22381295.
- Tanzer ML, Kimura S. Phylogenetic aspects of collagen structure and function. In: Nimni ME, editor. *Collagen.* Boca Raton: CRC Press; 2018. P. 25-40.
- Pachence JM. Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res.* 1996 Spring;33(1):35-40. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199621)33:1<35::AID-JBMB>3.0.CO;2-N. PMID: 8734072.

26. Nimni ME, Harkness RD. Molecular structures and functions of collagen. In: Nimni ME, editor. Collagen. Boca Raton: CRC Press; 1988. P. 10-48.
27. Zerris VA, James KS, Roberts JB, Bell E, Heilman CB. Repair of the dura mater with processed collagen devices. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007 Nov;83(2):580-8. doi: 10.1002/jbm.b.30831. PMID: 17465025.
28. Ramshaw JA, Vaughan PR, Werkmeister JA. Applications of collagen in medical devices. Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications. 2001 Feb 25;13(01):14-26. doi: 10.4015/S1016237201000042.
29. Medina MA. Capsule Granulation Tissue Harvested From Abdominal Region Used as Dural Autologous Graft. Insights in Neurosurgery. 2017;1(3):21. <https://www.researchgate.net/publication/320433891>
30. Schick B, Wolf G, Romeike BF, Mestres P, Praetorius M, Plinkert PK. Dural cell culture. A new approach to study duraplasty. Cells Tissues Organs. 2003;173(3):129-37. doi: 10.1159/000069469. PMID: 12673095
31. Narotam PK, van Dellen JR, Bhoola KD. A clinicopathological study of collagen sponge as a dural graft in neurosurgery. J Neurosurg. 1995 Mar;82(3):406-12. doi: 10.3171/jns.1995.82.3.0406. PMID: 7861218.
32. Narotam PK, Qiao F, Nathoo N. Collagen matrix duraplasty for posterior fossa surgery: evaluation of surgical technique in 52 adult patients. Clinical article. J Neurosurg. 2009 Aug;111(2):380-6. doi: 10.3171/2008.10.JNS08993. PMID: 19199453.
33. Stendel R, Danne M, Fiss I, Klein I, Schilling A, Hammersen S, Pietilae T, Jänisch W, Hopfenmüller W. Efficacy and safety of a collagen matrix for cranial and spinal dural reconstruction using different fixation techniques. J Neurosurg. 2008 Aug;109(2):215-21. doi: 10.3171/JNS/2008/109/8/0215. PMID: 18671632.
34. Haywood AM. Transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med. 1997 Dec 18;337(25):1821-8. doi: 10.1056/NEJM199712183372508. PMID: 9400041.
35. Deng K, Yang Y, Ke Y, Luo C, Liu M, Deng Y, Tian Q, Yuan Y, Yuan T, Xu T A novel biomimetic composite substitute of PLLA/gelatin nanofiber membrane for dura repairing. Neurol Res. 2017 Sep;39(9):819-829. doi: 10.1080/01616412.2017.1348680. PMID: 28701072.
36. Stuart BH. Infrared Spectroscopy of Biological Applications: An Overview. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 Jun 15; doi: 10.1002/9780470027318.a0208.pub2.
37. Purushothuman S, Marotte L, Stowe S, Johnstone DM, Stone J. The Response of Cerebral Cortex to Haemorrhagic Damage: Experimental Evidence from a Penetrating Injury Model PLoS One. 2013;8(3):e59740. doi: 10.1371/journal.pone.0059740. PMID: 23555765; PMCID:PMC3605910/
38. Tsybaliuk V, Tretyak I, Gatskiy A. [The research of sciatic nerve combined plastics efficiency at it's large defect by it's functional recovery quantification in rats in experiment]. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2012;(3):48-51. Ukrainian. doi: 10.25305/unj.60846.
39. Kostrub OO, Blonskyy RI. [Cell therapy for degenerative tendon damage]. Kyiv: Zdorovya. 2011. Ukrainian.
40. Susie G. [IR spectra of biological macromolecules and model compounds]. In: Volkenstein MV, editor. [The structure and stability of biological macromolecules]. Moscow: Mir; 1973. p. 487-537. Russian.
41. Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. Subcell Biochem. 1994;23:329-62. doi: 10.1007/978-1-4615-1863-1_8. PMID: 7855877.
42. Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Raussens V. Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. Biophys J. 2006 Apr 15;90(8):2946-57. doi: 10.1529/biophysj.105.072017. PMID: 16428280; PMCID: PMC1414549.
43. Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman DI. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. Applied Spectroscopy Reviews. 2008 Feb 1;43(2):134-79. doi: 10.1080/05704920701829043.



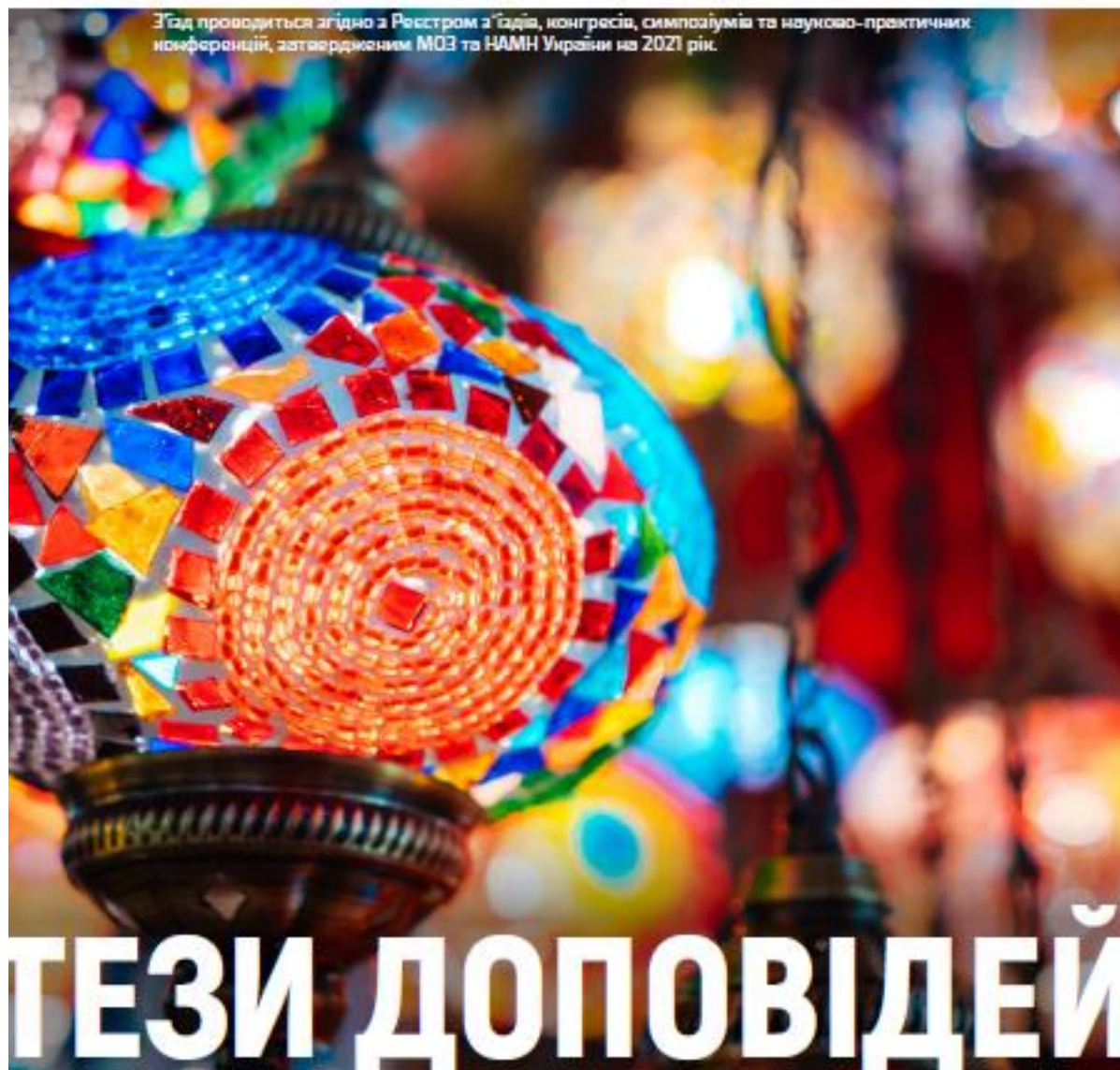
11-18
травня
2021



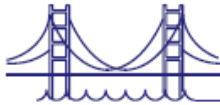
VII З'їзд
НЕЙРОХІРУРГІВ
УКРАЇНИ з міжнародною
участю



З'їзд проводиться згідно з Регстром з'їздів, конгресів, симпозиумів та науково-практичних конференцій, затвердженим МОЗ та НАМН України на 2021 рік.



ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ



Можливості конфокальної мікроскопії для оцінки ефективності пластики твердої мозкової оболонки біополімерами в експерименті

Пантелейчук Андрій Борисович *¹, Каджая Микола Володимирович ¹, Шмельова Анна Анатоліївна ²,
Васлович Вікторія Вікторівна ², Гнатюк Олена Петрівна³, Карахім Сергій Олександрович ⁴,
Довбешко Галина Іванівна ³

1. Відділ нейротравми, Державна установа Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна
2. Відділ нейропатоморфології, Державна установа Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна
3. Відділ фізики біологічних систем, Інститут фізики НАН України, Київ, Україна
4. Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ.

Possibility of confocal microscopy in evaluating the efficiency of biopolymeric dura mater plastics in experimental study

Andrii B. Panteleichuk *¹, Mykola V. Kadzhaya ¹, Anna A. Shmeleva ², Viktoria V. Vaslovich², Olena P. Hnatiuk ³, Sergiy O. Karakhim⁴, Galina I. Dovbeshko ³

Вступ. Біополімерні матеріали становлять інтерес для реконструктивної хірургії ТОГМ, як альтернатива аутопластики. Досліджується можливість використання біополімерних плівок на основі хітозану і колагену.

Мета дослідження : за допомогою світлооптичної і конфокальної мікроскопії дослідити можливість і ефективність застосування біополімерних плівок на основі хітозану і колагену для пластики ТОГМ в умовах експериментальної ЧМТ.

Матеріали та методи дослідження : досліджено 10 тварин (щурів) віком 12 міс. вагою 250-300 г , яким була проведена пластика ТОГМ хітозановою і колагеновою плівками.

Хірургічна частина експерименту : проводився наркоз, розріз по середній лінії голови і оголювалося склепіння черепа . Формувався трепанаційний отвір розміром 4*7 мм в правій тім'яній ділянці . Розмір вікна ретельно контролювався . Кістковий клапоть видалявся . Після цього під ТОГМ розсікалася хрестоподібно від середини отвору до його кутів . Оголювалася поверхня кори мозку і проводилася penetрація кори голкою для люмбальної пункції (розміром G 18) на глибину 2 мм – таким чином моделювалася тяжка черепно-мозкова травма з вогнищем геморагії .

Потім клапті ТОГМ укладалися на місце, поверх них укладалася хітозанова плівка , кістковий клапоть на місце не укладався . Таким чином було змодельовано декомпресивну трепанацію черепа . Тварини виводилися з експерименту на 42 день . Відібрано матеріал для гістологічного дослідження за стандартними методиками, забарвлення гематоксилін-еозин.

Результати . Конфокальна мікроскопія дала можливість оцінити заміщення полімерних плівок новоутвореною сполучною тканиною, яка за своєю структурою подібна до материнської ТОГМ.

Висновки: - через 6 тижнів після операції виявлено, що біополімерні плівки є біодеградуєчими ; їх вплив сприяє герметизації субдурального простору внаслідок активної регенерації сполучної тканини.

Ключові слова: конфокальна мікроскопія, біополімери, пластика ТОГМ.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE

PHYSICAL
RESEARCH
METHODS
IN MEDICINE



PROCEEDINGS

I

27-29 October
2011
Tbilisi

Besides that, the personnel serving this equipment should provide the radiation safety of patients in order to get rid of the possible reversible effects of treatment and harm of patients

The specialists in radiation safety will be charged to monitor the existing radiation background and, in exceptional circumstances, to provide timely the adequate activities for overcoming the arising problems.

Georgia experiences the lack of qualified specialists in these branches of science and technology. Thus, it is clearly revealed the necessity of signed specialties and, consequently, the perspectives of their further permanent and steady development.

Key words: diagnostics, radiation safety, medicine, physics.

FTIR spectroscopy study of Achilles tendon damage.

Fourier transform infrared spectroscopy as an analytical tool for research efficiency of cell therapy

O.P. Gnatyuk¹, G.I. Dovbeshko¹, O.M. Fesenko¹, A.A. Kosrtrub², R.I. Blonskyi², O.I. Goncharuk³.

¹ – Department of Physics of Biological Systems, Institute of Physics of the National Academy of Science of Ukraine.

² – GD “Institute of traumatology and orthopedy AMS of Ukraine”, Kyiv, Ukraine.

³ – Department for Cryobiology of Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine.

Keywords: FTIR spectroscopy, conformational analysis, achilles tendon, damages, syndrome of chronic overload, cells therapy.

Introduction

It is known that a chronic overload syndrome of tendons (COST) – degenerate-dystrophy's reorganisation of a tissue tendons under the influence of chronic overload and microtraumas occur. It is characterised by initial swelling with the further destruction of specialised cells, disorganisation of fibrous structures with the subsequent replacement of defect by a coarse-fibered tissue and occurrence of nekros in the tendons and in places of its fastening to a bone (entesopatia), that leads to occurrence of a painful syndrome, reduction of durability with the subsequent pathological rupture of a tendons [3]. Today, there is no clear pathogenic well-founded procedure for the treatment of patients with degenerative injuries of tendons, which is characterized by unconformity of applied methods and their low efficiency as they fail to restore metabolic and reparative processes in the tissue of tendon affected by degenerative changes to a sufficient degree. Here we present the application of cells-based therapy in treatment of degenerative injuries of tendons and method of vibrational spectroscopy for testing of its efficiency. That is why the goal of our study was to determine the effect of autologous platelet-rich plasma (PLP), autologous fibroblasts (F), and autologous mesenchymal stem cells (MSC) on reparation of tendons affected by degenerative process [4, 5].

The three types of cells has been used for cell therapy.

Autologous Fibroblasts are the main cells of a connective tissue derived from mesenchyme and morphologically represent spindle-shaped cells with a flat oval nuclei. Fibroblasts produce tropocollagen (precursor of collagen), extracellular matrix (an amorphous substance that fills space between cells and fibers of connective tissue), and growth factors, due to which fibroblasts play a critical role in wound healing. As a result of differentiation process, they transform into less active mature cells – fibrocytes (tenocytes).

Autologous Mesenchymal stem cells (MSC) are the precursors of all cells of the connective tissue. They are able to differentiate into the cells of the connective tissue including bone, cartilage and tendon. They are also able to produce various cytokines, growth factors and molecules of extracellular matrix

Plazma rich in growth factors (PRGF) – are the regulatory peptides (tissue hormones) produced by different types of the cells, that can stimulate growth, proliferation and/or differentiation of living cells. Growth factors function as signaling molecules for communication between cells.

Materials and methods

The experimental study was performed during September-November 2009 on 301 sexually mature male rats, weighed 250±12 grams and divided into four series depending on the type of the experimental study the test animals underwent after their withdrawal from the experiment. In line with the methods developed by our team, the dystrophic degenerative injury of the Achilles tendon was simulated in all animals by triple intratendinous administration of Diprosan solution.

The animals received a single dose of the following infusions 0.25 cm more proximally of a calcaneal tuberosity seven days after the simulation of dystrophic degenerative injury of their Achilles tendons:

- **I group** received 0.025 ml of normal saline solution;
- **II group** received 0.025 ml of autologous platelet-rich plasma (APRP);
- **III group** received 0.025 ml of autologous mesenchymal stem cells (AMSC) in 2.5x10⁵ cells dose;
- **IV group** received 0.025 ml of autologous fibroblasts (AF) taken from autologous derma (in 2.5x10⁵ cells dose).
- **V group** included 7 animals with intact Achilles tendon.

Here we used - histomorphologic method, biomechanical method, infrared spectroscopy, optical microscopy, statistics.

All manipulations with animals were done according to European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasburg . – 1986. – 52.

By means of infrared spectroscopy we conducted molecular evaluation of condition of extracellular matrix, as well as condition of collagen, in particular its ordered and unordered forms. We also evaluated strength properties of tendon's tissue by defining and comparing the indicators of ultimate loads at tension of a tendon before and after the therapy. The outcomes were evaluated at the 7th, 21st and 45th days of observation. According to this scale the quality of reparative processes were considered very bad if the total score was 0, and optimal if the total score was 33.

FTIR-spectroscopy studies.

Achilles tendons tissue was cut out the tissue, refrigerated and then cut into fine slides. The thickness of the samples was about 30-50 mkm. Spectra were collected in transmittance mode with Bruker 66 instrument (Germany).

Analysis of secondary structure of collagen was done for the tissue in process of its regeneration. We developed a model for fitting of AMID1 band on the basis of our experiment and literature data. According to this model we assigned:

- 1695 cm⁻¹ to anti-parallel β -sheet,
- 1680 cm⁻¹ to β -turn, disordering form,
- 1660 cm⁻¹ to triple collagen helix,
- 1649 cm⁻¹ to β -turn, disordering form,
- 1630 to β -sheet).

Assignment of the conformation states of collagen was done according [6-18].

Therefore, the outcomes of the conducted research proved that the infrared spectroscopy is a highly informative method for the analysis of the specifics of molecular structure of a tendon tissue, especially for conformational analysis of collagen and intercellular matrix. According to the infrared spectroscopy, the application of autologous platelet-rich-plasma gives comparatively good results only at the early observation terms (7th and 21st days) (Fig.1, 2); application of the culture of mesenchymal stem cells and autologous fibroblasts considerably improves reparative processes in tendon's tissue during all terms of observation (Fig. 3, 4). However, practically complete restoration of the secondary structure of collagen and intercellular substance at the 45th day takes place only after application of autologous mesenchymal st the 7th day after the application of cell-based therapy for the treatment of a degenerative injury of tendons, a positive development of molecular changes has been established, which was observed in the animals of the 2nd, 3rd, and 4th test groups; though the best result was noted in the animals of the 2nd test group (after administration of APRP). Positive development noted during the first monitoring stage has been maintained at the 21st day, rehabilitation processes of the secondary structure of collagen continued, and the best therapeutic effect according to all the spectroscopic indicators was observed in the animals of the 3rd and 4th test groups (after administration of AMSC and AF).

The analysis of all the obtained spectroscopic data proves that the application of AMSC and AF cultures considerably improves rehabilitation processes in the tissue of a tendon affected by a degenerative injury. Practically complete restoration of the secondary structure of collagen, reduction of contribution of lipid fractions and an increase of water in the intercellular matrix take place at the 45th day after its administration. The administration of APRP gives a comparatively good result at the 7th day of observation, but due to the limited time of activity it turns out to be insufficient for a complete restoration of tendon's tissue affected by degenerative changes. Therefore, the outcomes of the conducted research proved that the infrared spectroscopy is a highly informative method for the analysis of the specifics of molecular structure of the tissue of Achilles tendon and intercellular matrix, as well as conformational analysis of collagen. Thus, at the 7th day after the application of cell-based therapy for the treatment of a degenerative injury of tendons,

a positive development of molecular changes has been established, which was observed in the animals of the 2nd, 3rd, and 4th test groups; though the best result was noted in the animals of the 2nd test group (after administration of APRP). Positive development noted during the first monitoring stage has been maintained at the 21st day, rehabilitation processes of the secondary structure of collagen continued, and the best therapeutic effect according to all the spectroscopic indicators was observed in the animals of the 3rd and 4th test groups (after administration of AMSC and AF).

Conclusion.

Intratendinous administration of the culture of autologous mesenchymal stem cells and autologous fibroblasts for degenerative injury of tendons most effectively contributes to a reparative regeneration of the structural organization of tendon's tissue, which is characterized by a pronounced regeneration process of tendon's tissue as early as 7th and 21st days with a practically complete regeneration of the structure of tendon's tissue on the 45th day of observation. Application of autologous platelet-rich plasma is characterized by a less expressed regenerative effect. In the control group of animals, pathological process tended to progress.

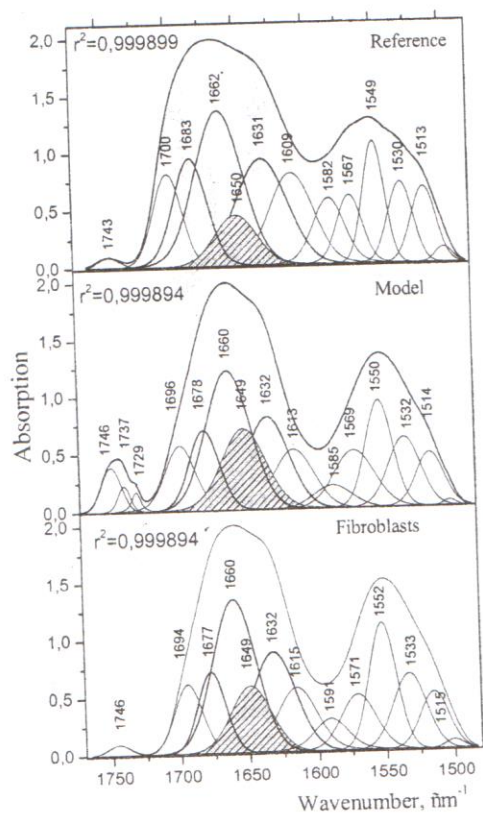


Fig1. Fitting of Amid I and Amid II for the samples after 7 days of treatment.

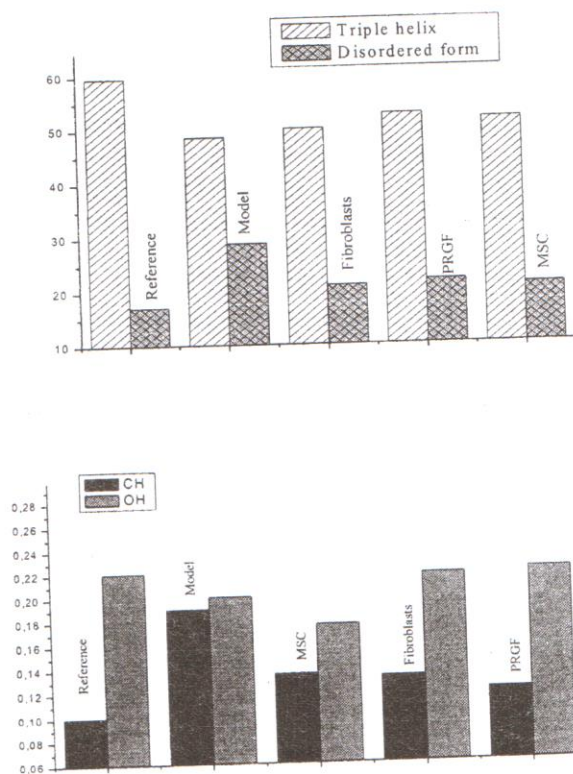


Fig. 2. Relative integral intensity of triple (1660 cm⁻¹) and disordering form (1649 cm⁻¹), as well as contribution of CH and OH stretching. 7 days after treatment

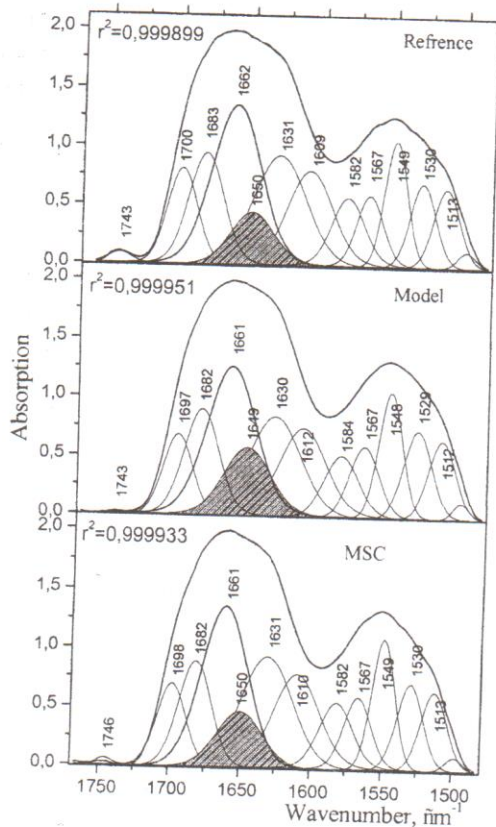


Fig. 3. Fitting of Amide I and Amide II for the samples after 45 days of treatment.

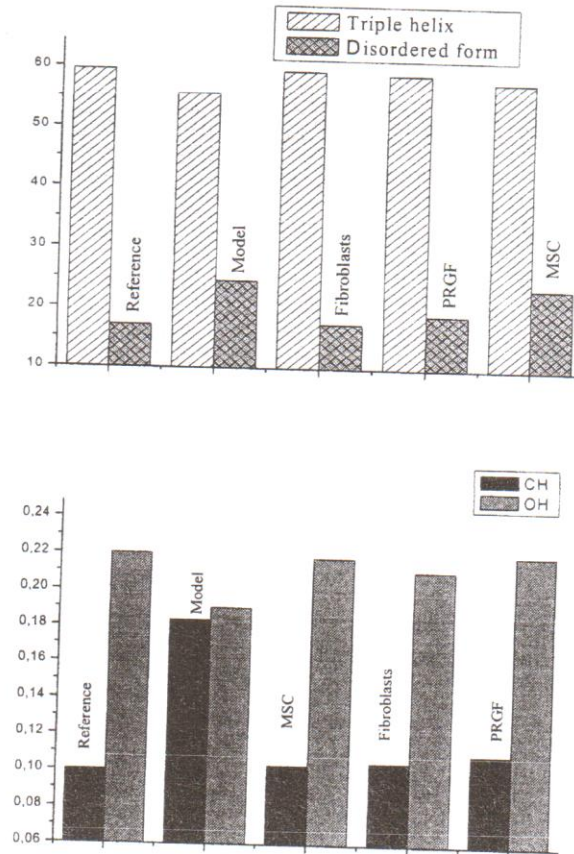


Fig. 4. Relative integral intensity of triple (1660 cm⁻¹) and disordering form (1649 cm⁻¹), as well as contribution of CH and OH stretching. 45 days after treatment

References

- O.P. Gnatiuk, G.I. Dovbeshko, O.M. Fesenko, A.A. Kostrub, R.I. Blonskyi, E.I. Goncharuk. FTIR Spectroscopy Study of Achilles Tendon Damage / Fourth Russian-Ukrainian-Polish Conference on Molecular Interactions. Book of Abstracts. Justarnia, October 4-9, 2009. P.93
- O.P. Gnatiuk, G.I. Dovbeshko, O.M. Fesenko, A.A. Kostrub, R.I. Blonskyi. FTIR Spectroscopy Study collagen I, II and III types. Conformation analysis / Central European school on physical organic chemistry. Intermolecular interactions and molecular recognition. Przesieka. 8-12 June, 2010. P. 69
- Спортивные травмы. Основные принципы профилактики и лечения // Под общей ред. П.А.Ф.Х. Ренстрема. – К.: Олимпийская лит-ра, 2002. – 378 с.
- Maffulli N. Tendon injuries Maffulli N., Renstrom P. – London: Springer, 2005. – P. 211–279.
- Maffulli N., Renström P., Leadbetter W.B. Tendon injuries. Basic science and clinical medicine. – Springer-Verlag: London Limited, 2005. – 332 p
- Goormaghtigh E. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy / Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.-M. // Subcell. Biochem. 1994. Vol. 23. – P. 405–450.
- J. H. Muyonga, C. G. B. Cole, K. G. Duodu. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chemistry*, Volume 86, Issue 3, July 2004, Pages 325-332.
- Doyle, B.B., Bendit, E.G. and Blout, E.R., 1975. *Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides*. Biopolymers 14, pp. 937–957.
- Anne George, Arthur Veis, FTIRS in water demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. *Biochemistry*, 1991, 30 (9), pp 2372–2377
- E. P. Paschalis, K. Verdellis, S. B. Doty, A. L. Boskey, R. Mendelsohn, M. Yamauchi. Spectroscopic Characterization of Collagen Cross-Links in Bone. 2001. *Journal of Bone and Mineral Research*. Volume 16 Issue 10, Pages 1821 – 1828.
- Payne, K.J. and Veis, A., 1988. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the Amide I band for conformational study. Biopolymers, 27, 1749-1760.

12. D. Gopinath, M. Rafiuddin Ahmed, K. Gomathi, K. Chitra, P. K. Sehgal and R. Jayakumar. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*. Volume 25, Issue 10, May 2004, Pages 1911-1917.
13. Frank S. Parker. Applications of *Infrared Spectroscopy* in Biochemistry. Plenum Press, New York, 1983. 528 p.
14. David Grant, William F. Long, Colin F. Moffat and Frank B. Williamson. Infrared spectroscopy of heparins suggests that the region 750-950 cm^{-1} is sensitive to changes in iduronate residue ring conformation. *Biochem. J.* (1991) 275, 193-197.
15. Maria O. Longas and Karl O. Breitweiser. Sulfate composition of glycosaminoglycans determined by infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry*. Volume 192, Issue 1, January 1991, Pages 193-196.
16. Sylvester MF, Yannas IV, Salzman EW, Forbes MJ. Collagen banded fibril structure and the collagen-platelet reaction. *Thromb Res.* 1989 Jul 1;55(1):135-48.
17. Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman, and Ihtesham ur Rehman. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43, 134-179, 2008.
18. Cyril Petibois, Gilles Gousspillou, Katia Wehbe, Jean-Paul Delage, Gérard Délérís. Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Anal Bioanal Chem* (2006) 386:1961–1966.

Summary

It is known that FTIR spectroscopy is a powerful and rapid technique for analysis of tissues, cell and their components, which is able to non-destructively recognize biopolymers and functional groups and provide abundant information about their organization [1, 2]. FTIR spectroscopy is a useful tool for monitoring changes in achilles tendon tissue occurring as a result of chronic overload syndrome of tendons (COST).

At present day one of perspective ways of introduction of achievements of molecular and cellular biology is application of cell therapy in treatment of COST at late stages of disease for the purpose of replacement in an organism of the damaged and worn out cells and tissue.

In this paper we proposed to use the new promising method of cell therapy for chronic overload syndrome of tendons (COST) therapy. We show that FTIR spectroscopy could be applied as an analytical tool for study of therapy efficiency. Achilles tendon damage of Wistar line rat was modelled by diprosan. According to FTIR spectroscopy data and luminescence microscopy study we have registered the short-cut fragments of protein molecules in model sample. FTIR spectra of the tissue before and after treatment on 7, 21 and 45 days were registered. Methods of treatment under study were chosen as mesenchymal stem cells, autological fibroblast and growth factors. As references we used a achilles tendon taken from health animals. According to analysis, the samples after treatment with mesenchymal stem cells and autological fibroblast for 45 days after application are close similar to the reference sample. We registered the recovery of collagen triple helix, increasing of lipid fractions quantity and increase of water in the intercellular matrix. Growth factors give a good result once in the early stages after treatment, but due to limited time of their life that is not enough for full functional recovery of damaged tissue. It is shown that for effective therapy of COST a more cheap method with autological fibroblast could be applied.

თავისუფალი რადიკალები ბიოლოგიასა და მედიცინაში

(გამოკვლევები ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის მეთოდის გამოყენებით)

ელუარდ ჩიკვაძე, თეიმურაზ გოგოლაძე

ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი

შესავალი.

თავისუფალი რადიკალები, ეს უაღრესად აქტიური ნაწილაკები, განუწყვეტლივ წარმოიქმნებიან როგორც ცოცხალ ორგანიზმში მეტაბოლური პროცესების შედეგად, აგრეთვე გარეგანი ფაქტორების – ულტრა იისფერი სხივები, X და γ გამოსხივება და, ზოგიერთ შემთხვევაში, დღის სინათლის (ფოტოსენსიბილიზაცია) მოქმედებითაც. [1-5].

ცოცხალ ორგანიზმებს გააჩნიათ როგორც ენდოგენური აგრეთვე ეგზოგენური თავისუფალ რადიკალებთან ბრძოლის მრავალი საშუალება – ფერმენტული სისტემები: სუპეროქსიდდისმუტაზა (სოდ-ი), კატალაზა, გლუტატიონპეროქსიდაზა, ასევე ბუნებრივი ანტი-

Висновки до розділу 5

1. 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.

ВИСНОВКИ

Досліджено спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами та визначено взаємозв'язки між спектральними 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 вдосконаленим 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...H-O 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 наночастинками 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 cm^{-1} . Місця локалізації наночастинок в клітині можуть слугувати підсилюючими поверхнями для незначного (3-5 разів) підсилення сигналів в Раман спектрах 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 наночастинками 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 рН середовища. При концентрації білка 20 мг/мл і при рН = 2,0 та при концентрації білка 1 мг/мл і рН = 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 високочастотний 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 фосфоліпід з резистентного штаму при кімнатній температурі утворюють впорядковану гель фазу, що характеризується розщепленням смуг деформаційних коливань

СН на 1475, 1465 cm^{-1} , та розщепленням смуги С=О на 1738 та 1733 cm^{-1} , а також більш високочастотним положенням смуги PO_2^- на 1228 cm^{-1} . Фосфоліпіди з чутливого штаму пухлинних клітин утворюють неупорядковану рідкокристалічну фазу та характеризуються більш низькочастотним положенням смуги PO_2^- на 1223 cm^{-1} , положенням С=О на 1735 cm^{-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 CH_2 -молекулярних груп в області 2925 cm^{-1} , валентні коливання С=О молекулярних груп в області 1735 cm^{-1} , а також смугу валентних асиметричних коливань PO_2^- молекулярні групи. Було показано, що протипухлинні препарати взаємодіють з фосфоліпідною мембраною шляхом утворення водневих зв'язків між С=О та N-H групами фосфоліпідів та лікарських засобів, про що свідчать зміни в поглинанні молекулярних груп С=О 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 використаних джерел

- S1. V.V Cherepanov, A.G. Naumovets, O.Y. Posudievsky, V.G. Koshechko and V.D. Pokhodenko, *Nano Express*, 2020, **1**, 010004. <https://doi.org/10.1088/2632-959X/AB763A>
- S2. O.Yu. Posudievsky, O.A. Khazieieva, A.S. Kondratyuk, V.V. Cherepanov, G.I. Dovbeshko, V.G. Koshechko and V.D. Pokhodenko, *Nanotechnology*, 2018, **29**, 085704. doi:10.1088/1361-6528/aaa381
- S3. Z. Movasaghi, S. Rehman and Dr. Ihtesham U. Rehman. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, **42**(5), 493.
- S4. J.H. Appel, D.O. Li, J.D. Podlevsky, A. Debnath, A.A. Green, Q.H. Wang and J. Chae. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2016, **2**(3), 361–367. doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00467
- S5. X.H. Wang, J.Q. Ning, C.C. Zheng, B.R. Zhu, L. Xie, H.S. Wu, S.J. Xu, *J. Mater. Chem. C*, 2015, **3**, 2589. doi:10.1039/C5TC00016E
- S6. X. Bai, J. Wang, X. Mu, J. Yang, H. Liu, F. Xu, Y. Jing, L. Liu, X. Xue, H. Dai, Q. Liu, Y.-M. Sun, C. Liu and X.-D. Zhang, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, **3**(3), 460. doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00714
- S7. Rambaran RN, Serpell LC. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. *Prion*. 2008;2(3):112-117.
- S8. Mechanisms of amyloid fibril formation. N. V. Dovidchenko, E. I. Leonova, O. V. Galzitskaya, *Biochemistry (Mosc)* 2014 Dec; 79(13): 1515–1527. doi: 10.1134/S0006297914130057
- S9. F. Chiti, C.M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem* 75 (2006) 333-366
- S10. E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.-M. Ruyschaert, Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, in: 1994: pp. 405–450. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1863-1_10.
- S11. C. Pérez, K. Griebenow, Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the thermal denaturation of hen egg-white lysozyme dissolved in aqueous buffer and glycerol, *Biotechnol. Lett.* (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1005645810247>.
- S12. E. V. Kudriashova, Structure and functional properties of biomolecules on the interfaces of phases. New research methods. A manual for students and graduate

- students specializing in biochemistry and biophysics, (2012).
- S13. X. Wang, Q. Han, X. Liu, C. Wang, R. Yang, Multifunctional inhibitors of β -amyloid aggregation based on MoS₂/AuNR nanocomposites with high near-infrared absorption, *Nanoscale*. 11 (2019) 9185–9193.
<https://doi.org/10.1039/c9nr01845j>.
- S14. Kosobukin V: The effect of enhancement the external field near the surface of metal and its manifestation in spectroscopy. *Surface: Phys Chem Mech* 1983, 12:5–20.
- S15. Osawa M: Surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 1st edition. Edited by Chalmers JM, Griffiths PR. Chichester: Wiley; 2002:85–799.
- S16. Rana F: Graphene terahertz plasmon oscillators. *IEEE Trans Nanotechnol* 2008, 7:91–99.
- S17. Lopes M, Candini A, Urdampilleta M, Reserbat-Plantey A, Bellini V, Klyatskaya S, Marty L, Ruben M, Affronte M, Wernsdorfer W, Bendiab N: Surface-enhanced Raman signal for terbium single-molecule magnets grafted on graphene. *ACS Nano* 2010, 4(12):127531–127537.
- S18. *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes* (Eds. Cataldo F., da Ros T.), (Philadelphia: Springer, 2011), 408 p.
- S19. G.V. Andrievsky, V.K. Klochkov, A.B. Bordyuh, G.I. Dovbeshko. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C₆₀ fullerene with help of FTIR reflectance and UV–Vis spectroscopy. *Chemical Physics Letters*. Volume 364, Issues 1–2. 2002. Pages 8-17. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(02\)01305-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(02)01305-2).
- S20. Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman & Dr. Ihtesham U. Rehman (2007): Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42:5, 493-541. <http://dx.doi.org/10.1080/05704920701551530>
- S21. Karima Belbachir & Razia Noreen & Gilles Gousspillou & Cyril Petibois. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* (2009) 395:829–837 DOI 10.1007/s00216-009-3019-y
- S22. Goormaghtigh E. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy / Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.-M. // *Subcell. Biochem.* – 1994. – Vol. 23. – P. 405–450.

- S23. H. Muyonga, C. G. B. Cole, K. G. Duodu. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), [Food Chemistry](#), [Volume 86, Issue 3](#), July 2004, Pages 325-332.
- S24. De Campos Vidal, B., & Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42(3), 283–289. doi:10.1016/j.micron.2010.09.010
- S25. Sanden, KW, Kohler, A, Afseth, NK, et al. The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to characterize connective tissue components in skeletal muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *J. Biophotonics*. 2019; 12: e201800436. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800436>
- S26. Sanden, K.W.; Böcker, U.; Ofstad, R.; Pedersen, M.E.; Høst, V.; Afseth, N.K.; Rønning, S.B.; Pleshko, N. Characterization of Collagen Structure in Normal, Wooden Breast and Spaghetti Meat Chicken Fillets by FTIR Microspectroscopy and Histology. *Foods* 2021, 10, 548. <https://doi.org/10.3390/foods10030548>

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

1. Dovbeshko G., **Repnytska 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.**, Kraszkievicz 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. V. 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.**, Pyshev 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.**, Kraszkievicz 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., Pyshev 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.