

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Лаптинский Кирилл Андреевич**

**ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ  
ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МАРКЕРОВ  
НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

01.04.21 – лазерная физика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук,  
Доленко Татьяна Альдефонсовна

Москва – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИХ СУСПЕНЗИЙ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ....	13
§1.1. Углеродные наноматериалы, их синтез. ....	13
1.1.1. Наноалмазы: методы синтеза. ....	13
1.1.2. Оксиды графена. ....	16
§1.2. Лазерная спектроскопия углеродных наночастиц. ....	17
1.2.1. Лазерная спектроскопия КР наноалмазов и оксидов графена. ....	17
1.2.2. Лазерная фотолюминесцентная спектроскопия наноалмазов и оксидов графена. ....	20
1.2.3. Механизмы фотолюминесценции наноалмаза и оксида графена. ....	22
§1.3. Молекулярные взаимодействия в суспензиях углеродных наночастиц. ....	26
§1.4. Фотолюминесцентные свойства НА и ОГ в суспензиях. ....	32
§1.5. Адсорбционные свойства углеродных наночастиц в суспензиях. ....	34
§1.6. Визуализация углеродных наночастиц в биологической среде. ....	37
§1.7. Адаптивные методы анализа данных в решении обратных задач лазерной спектроскопии. ....	41
1.7.1. Генетические алгоритмы. ....	41
1.7.2. Искусственные нейронные сети. ....	42
1.7.3. Понижение размерности пространства входных данных. ....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. ....	48
§2.1. Материалы. ....	48
2.1.1. Детонационные наноалмазы. ....	48
2.1.2. Оксид графена. ....	50
2.1.3. Прочие материалы. ....	50
§2.2. Методы исследования. ....	50
2.2.1. Лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния света. ....	50
2.2.2. Лазерная фотолюминесцентная спектроскопия. ....	52
2.2.3. Спектроскопия ИК поглощения. ....	53
2.2.4. Лазерная корреляционная спектроскопия. ....	54
2.2.5. Пикосекундная фотолюминесцентная спектроскопия с временным разрешением. ....	56
2.2.6. Микроскопия на основе подавления спонтанного испускания. ....	56
2.2.7. Методы характеристики суспензий углеродных наночастиц. ....	60
ГЛАВА 3. ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ С МОЛЕКУЛАМИ ОКРУЖЕНИЯ. ....	63
§3.1. Взаимодействие детонационных наноалмазов с различной функционализацией поверхности с молекулами воды. ....	63
3.1.1. Лазерная спектроскопия КР водных суспензий ДНА. ....	63
3.1.2. Рентгеновское поглощение водных суспензий ДНА. ....	67

3.1.3. Экспериментальное определение энергии водородных связей в водных суспензиях детонационных наноалмазов с различной функционализацией поверхности. . . . .	70
3.1.4. Теоретические расчеты энергии водородных связей в водных суспензиях ДНА. . . . .	76
3.1.5. Влияние ДНА с различной поверхностной функционализацией на водородные связи в воде. . . . .	81
§3.2. Лазерная спектроскопия взаимодействий углеродных наночастиц с молекулами окружения в протонных растворителях. . . . .	82
3.2.1. Влияние карбоксилированных ДНА на водородные связи в протонных растворителях. . . . .	83
3.2.2. Влияние ОГ на водородные связи в протонных растворителях. . . . .	86
Заключение к Главе 3. . . . .	88
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ С МОЛЕКУЛАМИ ОКРУЖЕНИЯ НА ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ . . . . .	89
§4.1. Фотолюминесцентные свойства детонационных наноалмазов в водных суспензиях. . . . .	89
4.1.1. Влияние функционализации поверхности детонационных наноалмазов на интенсивность их фотолюминесценции в водных суспензиях. . . . .	89
4.1.2. Кинетика затухания фотолюминесценции ДНА с различной функционализацией поверхности в водных суспензиях. . . . .	92
§4.2. Фотолюминесцентные свойства углеродных наночастиц в протонных растворителях. . . . .	94
4.2.1. Влияние водородных связей в протонных растворителях на фотолюминесцентные свойства ДНА. . . . .	94
4.2.2. Влияние водородных связей в протонных растворителях на фотолюминесцентные свойства оксида графена. . . . .	96
§4.3. Фотолюминесцентные свойства ДНА в окружении биомакромолекул . . . . .	96
§4.4. Механизмы фотолюминесценции УНЧ. . . . .	99
Заключение к Главе 4. . . . .	101
ГЛАВА 5. НАНОАЛМАЗЫ КАК АДСОРБЕНТЫ В БИОМЕДИЦИНЕ. . . . .	102
§5.1. Адсорбционные свойства детонационных НА по отношению к ионам неорганических солей. . . . .	102
5.1.1. Общие подходы в изучении адсорбционных свойств наночастиц. . . . .	102
5.1.2. Влияние функционализации поверхности ДНА на его адсорбционные свойства по отношению к ионам неорганических солей. . . . .	106
5.1.3. Исследование механизмов адсорбции ионов неорганических солей на поверхность наноалмазов. . . . .	108
§5.2. Адсорбционные свойства ДНА по отношению к молекулам ДНК. . . . .	110
5.2.1. Адсорбционные свойства ДНА по отношению к азотистым основаниям ДНК. . . . .	110
5.2.2. Адсорбция комплементарных пар азотистых оснований ДНК на поверхность детонационных наноалмазов. . . . .	114
5.2.3. Изучение механизмов адсорбции АО ДНК и их комплементарных пар на поверхность ДНА. . . . .	116
5.2.4. Взаимодействие ДНА с цепочками ДНК. . . . .	120
§5.3. Взаимосвязь между фотолюминесцентными свойствами ДНА и адсорбцией/взаимодействием с молекулами окружения. . . . .	122

Заключение к Главе 5. ....	123
ГЛАВА 6. ОПТИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ СРЕДЕ. ....	124
§6.1. Визуализация углеродных наночастиц в биоткани с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей. ....	124
6.1.1. Определение концентрации УНЧ в яичном белке по спектрам фотолюминесценции на фоне аутофлуоресценции белка. ....	124
6.1.2. Контроль выведения УНЧ из организма с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей. ....	130
§6.2. Мониторинг выведения из организма нанокompозитов на основе углеродных наночастиц с помощью лазерной спектроскопии. ....	133
6.2.1. Характеризация и свойства нанокompозитов оксид графена+сополимер+фолиевая кислота. ....	134
6.2.2. Решение обратной задачи лазерной фотолюминесцентной спектроскопии по контролю выведения нанокompозитов и их компонентов из организма. ....	136
6.2.3. Общие методологические принципы применения ИНС для контроля выведения наночастиц с уриной. ....	139
§6.3. Микроскопия УНЧ в клетках на основе подавления спонтанного испускания (STED- микроскопия). ....	141
Заключение к Главе 6. ....	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ....	144
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ. ....	147
БЛАГОДАРНОСТИ. ....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. ....	149
ПРИЛОЖЕНИЯ. ....	161

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы и степень ее разработанности**

Углерод наномасштабного размера, благодаря своим новым уникальным свойствам, имеет широкие перспективы применения в различных областях науки, техники, в технологических процессах [1]. Интерес к таким углеродным наночастицам, как наноалмазы (НА) и оксиды графена (ОГ), обусловлен сочетанием их свойств, которое позволяет использовать эти УНЧ в качестве наноагентов в биомедицине. Способность к стабильной фотолюминесценции НА и ОГ, возможность целенаправленной функционализации их поверхности различными группами или создания нанокомпозитов (НК) на их основе, селективные сорбционные свойства и биосовместимость этих УНЧ обеспечивают основу для разработки многофункциональных углеродных фотолюминесцентных биомаркеров для медицины. Под многофункциональными биомаркерами мы понимаем наночастицы, способные одновременно выполнять функции: 1) обнаружения и диагностики различных заболеваний по изменению фотолюминесцентных свойств УНЧ и нанокомплексов на их основе, 2) адресной доставки лекарства и/или адсорбции вредных веществ для их последующего выведения из организма.

Свойства УНЧ в порошкообразном состоянии хорошо изучены [2]. В литературе продемонстрированы стабильность их фотолюминесцентных свойств в биологической среде, возможность визуализации УНЧ с помощью методов лазерной спектроскопии [3]. Известны работы [4,5], в которых показана способность этих наночастиц надежно удерживать лекарственные препараты на поверхности и осуществлять их адресную доставку. Таким образом, УНЧ и НК на их основе хорошо зарекомендовали себя в качестве агентов для наномедицины. Однако для создания многофункционального фотолюминесцентного маркера на основе УНЧ и его безопасного использования необходимо всестороннее исследование молекулярных взаимодействий наночастиц и окружения, а также влияния этих взаимодействий на свойства УНЧ и окружающей среды. К сожалению, известны лишь единичные работы, посвященные изучению того, какие факторы биологического окружения и каким образом влияют на свойства УНЧ, в том числе, коллоидные, фотолюминесцентные и сорбционные.

Очевидно, что применение УНЧ в медицине подразумевает использование, в первую очередь, водных суспензий наночастиц. Патент на создание стабильной водной суспензии НА был получен относительно недавно - лишь в 2009 году [6]. Поэтому в последние годы активно ведутся работы по исследованию взаимодействий УНЧ с молекулами окружения для создания стабильных

коллоидных суспензий наночастиц с малыми размерами [7]. Установлено, что функционализация поверхности УНЧ играет важнейшую роль в этих взаимодействиях [7-9]. В частности, наибольший интерес вызывают карбоксилированные НА ввиду их нетоксичности [10] и хорошей способности удерживать лекарства. Несмотря на активное развитие тематики, все еще нет единого мнения о том, как поверхностные группы УНЧ взаимодействуют даже с молекулами воды. Поэтому исследование механизмов взаимодействия УНЧ с молекулами окружения в суспензиях и в биологической среде, а также влияния этих взаимодействий на свойства УНЧ является крайне актуальной задачей. Именно эта информация критически важна для разработки способов управления коллоидными и фотолюминесцентными свойствами УНЧ. Как известно, лазерная спектроскопия является мощным инструментом изучения межмолекулярных взаимодействий в веществах, поэтому в процессе выполнения настоящей работы использовались различные виды лазерной спектроскопии: спектроскопия комбинационного рассеяния света, фотолюминесцентная спектроскопия, лазерная корреляционная спектроскопия, пикосекундная фотолюминесцентная спектроскопия с временным разрешением, лазерная микроскопия на основе подавления спонтанного испускания.

Одной из важнейших задач применения УНЧ в биомедицине является визуализация наночастиц в биологической ткани. При решении этой задачи возникает проблема определения принадлежности регистрируемого сигнала к фотолюминесценции УНЧ или к аутофлуоресценции ткани. Имеется несколько подходов к решению этой проблемы: 1) синтез наночастиц с фотолюминесцентными свойствами, существенно отличными от аутофлуоресценции, 2) использование новых экспериментальных лазерных методов (например, микроскопии на основе подавления спонтанного испускания (STED-микроскопия), времяразрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM-микроскопия) и т.д.), 3) разработка и применение новых методов обработки и анализа сигналов. На сегодняшний день работы ведутся по каждому из указанных направлений. Известны реализации второго подхода с помощью STED-микроскопии [11] и FLIM-микроскопии [12] для НА с азот-вакантными центрами. Однако эти методы требуют дорогостоящего оборудования и позволяют определить лишь наличие/отсутствие НА в малом объеме биосреды. В рамках третьего подхода, например, для обработки данных томографии, изображений биотканей в микроскопе, данных рентгеновской диагностики [13-15], применяются адаптивные методы анализа данных. Для решения обратных задач лазерной спектроскопии – получения информации об объектах исследования по их спектрам – в нашей лаборатории впервые были успешно применены искусственные нейронные сети (ИНС) [16]. Была показана принципиальная возможность

выделения флуоресцентного сигнала нефтяных загрязнений на фоне флуоресценции растворенной органики в природных водах с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии с использованием ИНС. Несмотря на достигнутые успехи в этом направлении, решение таких задач требует развития как спектроскопических методов, так и методов анализа данных.

Таким образом, создание и эффективность использования УНЧ в качестве многофункциональных фотолюминесцентных маркеров в медицине существенно зависит от результатов исследования взаимодействий поверхностных групп УНЧ с молекулами окружения и разработки метода визуализации УНЧ в биологической среде.

### **Цели и задачи диссертационной работы**

Целью диссертационной работы является изучение фотолюминесцентных и сорбционных свойств углеродных наночастиц в суспензиях и биологической среде с помощью методов лазерной спектроскопии, а также поиск подходов к управлению этими свойствами для создания многофункциональных фотолюминесцентных маркеров на их основе.

В диссертационной работе были поставлены следующие задачи:

1. Изучение взаимодействий УНЧ с молекулами окружения в суспензиях и биологической среде методами лазерной спектроскопии.
2. Изучение влияния взаимодействий УНЧ с окружающими молекулами в суспензиях и биологической среде на фотолюминесцентные свойства УНЧ.
3. Исследование адсорбционных свойств НА по отношению к ионам и биомакромолекулам и определение механизмов их адсорбции на поверхность НА.
4. Разработка методов оптической визуализации углеродных наночастиц в биологической среде.

### **Научная новизна**

- С помощью лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света исследованы молекулярные взаимодействия поверхностных функциональных групп детонационных наноалмазов (ДНА) - COOH, OH, H - с молекулами воды и протонных растворителей. Обнаружена зависимость силы водородных связей в суспензиях от типа функциональных поверхностных групп ДНА. Впервые получены численные оценки энергии водородных связей в водных суспензиях ДНА с различной функционализацией поверхности.

- На основании результатов лазерной спектроскопии КР водных суспензий ДНА выдвинута и проверена гипотеза о проявлении электронных эффектов при взаимодействии ДНА с различной функционализацией поверхности с молекулами воды.
- Впервые исследовано взаимодействие НА с молекулами азотистых оснований (АО) ДНК. Определены значения адсорбционной активности карбоксилированных ДНА по отношению к АО ДНК, комплементарным парам АО ДНК и ионам тяжелых металлов.
- Впервые с помощью STED-микроскопии реализована визуализация НА детонационного метода синтеза в клетках *HeLa*.
- Создан новый способ оптической визуализации УНЧ в биологической среде. Впервые разработан метод одновременного определения концентрации нанокompозита на основе УНЧ и его компонентов в биологической ткани с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей.

### **Практическая значимость работы**

Полученные в настоящей диссертационной работе результаты обеспечивают хорошие перспективы использования в медицине наноалмазов и оксидов графена в качестве многофункциональных фотолюминесцентных маркеров. Установленные зависимости влияния взаимодействий поверхностных групп УНЧ с молекулами среды на фотолюминесцентные и сорбционные свойства наночастиц от типа функционализации поверхности позволяют эффективно использовать функционализацию поверхности УНЧ для управления свойствами наночастиц и их оптимизации. Разработанные методики визуализации и одновременного определения концентрации УНЧ, углеродных НК и их компонентов могут быть использованы для контроля движения биомаркеров, мониторинга выведения УНЧ из организма и их визуализации в организме. Применение ИНС обеспечивает распознавание и количественную оценку содержания сразу нескольких различных типов люминесцирующих наночастиц в крови, в различных органах, в клетках.

### **Апробация результатов работы**

Результаты, описанные в диссертационной работе, были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях:

International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies 2012, International Conference Advanced Carbon Nano Structures 2013, International Conference on Lasers, Applications and

Technologies 2013, International Conference “Physics and technology of nanomaterials and structures” 2013, International Conference on Neural Networks 2014, XII International Conference on Nanostructured Materials 2014, Symposium Optics and Biophotonics 2014, Symposium Optics and Biophotonics 2015, International Conference Advanced Carbon Nano Structures 2015, Hasselt Diamond Workshop 2016, 10th International Conference on New Diamond and Nano Carbons 2016, Symposium Optics and Biophotonics 2016, Hasselt Diamond Workshop 2017, XXIV Международная научная конференция "Ломоносов – 2017", 3-я Международная конференция «Физика и технология наноматериалов и структур» 2017, 13th International Conference Advanced Carbon NanoStructures 2017, First International Early Research Career Enhancement School on Biologically Inspired Cognitive Architectures 2017, Математические методы распознавания образов 2018, SPIE Photonics Europe 2018, IV Международная конференция и молодёжная школа «Информационные технологии и нанотехнологии» 2018, International Conference on Biologically Inspired Cognitive Architectures 2018.

Результаты работы являются оригинальными и опубликованы в 14 печатных работах [А-О] в рецензируемых научных журналах.

### **Личный вклад автора**

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены либо автором лично, либо при его определяющем участии. Личный вклад автора состоит в разработке методик приготовления и характеристики образцов, в проведении всего объема экспериментальных исследований, обработке и анализе полученных данных, в представлении результатов в виде научных докладов. Большая часть экспериментальных результатов была получена в Лаборатории лазерной спектроскопии растворов супрамолекулярных соединений и наноструктур кафедры квантовой электроники Физического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова. Изображения STED-микроскопии были получены в Лаборатории фармакологических наук Университета Або (Турку, Финляндия). Измерение кинетики тушения фотолюминесценции УНЧ в суспензиях были проведены в Физическом институте имени П.Н. Лебедева РАН. Публикации по теме диссертации были написаны при определяющем участии автора.

### **Защищаемые положения**

1. Впервые реализована STED-микроскопия наноалмазов детонационного метода синтеза в клетках *HeLa*.

2. Изменение энергии водородных связей в водных суспензиях детонационных наноалмазов в результате взаимодействия наночастиц с молекулами воды, полученное экспериментально методом лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния света и подтвержденное теоретически квантово-химическими расчетами, зависит от типа функциональных поверхностных групп детонационных наноалмазов. Степень влияния детонационных наноалмазов с различной поверхностной функционализацией на водородные связи воды определяется соотношением вкладов индуктивного и мезомерного электронных эффектов.

3. Согласно результатам лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния света суспензий углеродных наночастиц в протонных растворителях, ослабление водородных связей в суспензиях в результате взаимодействий наночастиц с молекулами растворителей тем больше, чем меньше полярность растворителя.

4. Фотолюминесцентные свойства углеродных наночастиц зависят от взаимодействий поверхностных групп наночастиц с молекулами окружения, в первую очередь, от силы водородных связей в суспензиях. Увеличение интенсивности фотолюминесценции в зависимости от функционализации поверхности коррелирует с рядом по степени влияния детонационных наноалмазов с различной поверхностной функционализацией поверхности на водородные связи воды. Посредством изменения функционализации поверхности детонационных наноалмазов возможно управление их фотолюминесцентными свойствами.

5. Значения адсорбционной активности детонационных наноалмазов по отношению к ионам тяжелых металлов, нитрат-ионам, цепочкам ДНК зависят от типа функциональных поверхностных групп наночастиц. Посредством целенаправленного изменения функционализации их поверхности возможно управление сорбционными свойствами углеродных наночастиц.

### **Обоснованность и достоверность результатов**

Результаты, представленные в настоящей диссертационной работе, были получены на современном лабораторном оборудовании. Обоснованность и достоверность представленных результатов обусловлена повторяемостью и хорошей воспроизводимостью измеряемых величин. Результаты, изложенные в диссертационной работе, многократно докладывались на специализированных всероссийских и международных конференциях, кафедральных и лабораторных семинарах.

## Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения и списка цитируемых литературных источников. Работа изложена на 162 страницах, иллюстрирована 84 рисунками, 15 таблицами и содержит одно Приложение с двумя таблицами. Список цитируемых литературных источников содержит 203 ссылки.

## Публикации по теме диссертации в рецензируемых журналах:

- А. **K. Laptinskiy**, E. Vervald, A. Bokarev, S. Burikov, M. Torelli, O. Shenderova, I. Plastun, T. Dolenko. Adsorption of DNA nitrogenous bases on nanodiamond particles: Theory and experiment. *J. of Phys. Chem. C*, 122:11066–11075, 2018.
- Б. O. Sarmanova, S. Burikov, S. Dolenko, I. Isaev, **K. Laptinskiy**, P. Neeraj, Ş. Didem, J. Rosenholm, O. Shenderova, T. Dolenko. A method for optical imaging and monitoring of the excretion of fluorescent nanocomposites from the body using artificial neural networks. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(4):1371–1380, 2018.
- В. E. Vervald, **K. Laptinskiy**, I. Vlasov, O. Shenderova, T. Dolenko. DNA-nanodiamond interactions influence on fluorescence of nanodiamonds. *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*, 9(1):64–66, 2018.
- Г. O. Sarmanova, S. Burikov, S. Dolenko, E. v. Haartman, S. Didem, I. Isaev, **K. Laptinskiy**, J. Rosenholm, T. Dolenko. Neural network classification method for solution of the problem of monitoring the removal of the theranostics nanocomposites from an organism. *Advances in Intelligent Systems and Computing*, 636:173–179, 2018.
- Д. S. Burikov, A. Vervald, **K. Laptinskiy**, T. Laptinskaya, O. Shenderova, I. Vlasov, T. Dolenko. Influence of hydrogen bonds on the colloidal and fluorescent properties of detonation nanodiamonds in water, methanol and ethanol. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 25(10):602–606, 2017.
- Е. T. Dolenko, S. Burikov, E. Vervald, A. Efitov, **K. Laptinskiy**, O. Sarmanova, S. Dolenko. Improvement of reliability of molecular DNA: solution of inverse problem of Raman spectroscopy using artificial neural networks. *Laser Physics*, 27:025203(8 pp), 2017.
- Ж. T. Petit, L. Puskar, T. Dolenko, S. Choudhury, E. Ritter, S. Burikov, **K. Laptinskiy**, Q. Brzustowski, U. Schade, H. Yuzawa, M. Nagasaka, N. Kosugi, M. Kurzyk, A. Venerosy, H. Girard, J.-C. Arnault, E. Osawa, N. Nunn, O. Shenderova, E. F. Aziz. Unusual water hydrogen bond network around hydrogenated nanodiamonds. *J. of Phys. Chem. C*, 121:5185–5194, 2017.

3. **K. Laptinskiy**, S. Burikov, S. Dolenko, A. Efitorov, O. Sarmanova, O. Shenderova, I. Vlasov, T. Dolenko. Monitoring of nanodiamonds in human urine using artificial neural networks. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials*, 213(10):2614–2622, 2016.
- И. T. Dolenko, S. Burikov, **K. Laptinskiy**, J. M. Rosenholm, O. Shenderova, I. Vlasov. Evidence of carbon nanoparticle–solvent molecule interactions in Raman and fluorescence spectra. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials*, 212(11):2512–2518, 2015.
- K. T. Dolenko, S. Burikov, A. Vervald, I. Vlasov, S. Dolenko, **K. Laptinskiy**, J. Rosenholm, O. Shenderova. Optical imaging of fluorescent carbon biomarkers using artificial neural networks. *J. of Biomedical Optics*, 19(11):117007, 2014.
- Л. T. Dolenko, S. Burikov, **K. Laptinskiy**, T. Laptinskaya, J. Rosenholm, A. Shiryayev, A. Sabirov, I. Vlasov. Study of adsorption properties of functionalized nanodiamonds in aqueous solutions of metal salts using optical spectroscopy. *J. of Alloys and Compounds*, 586:436–439, 2014.
- M. S. Burikov, S. Dolenko, **K. Laptinskiy**, I. Plastinin, A. Vervald, I. Vlasov, T. Dolenko. Using artificial neural networks for elaboration of fluorescence biosensors on the basis of nanoparticles. *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*, 5(1):195–202, 2014.
- H. **K. Laptinskiy**, S. Burikov, T. Laptinskaya, J. Rosenholm, O. Shenderova, I. Vlasov, T. Dolenko. Mechanisms of ions adsorption by nanodiamonds in aqueous suspensions. *J. of Nano- and Electronic Physics*, 5(4):04031, 2013.
- O. S. Burikov, A. Vervald, I. Vlasov, S. Dolenko, **K. Laptinskiy**, T. Dolenko. Use of neural network algorithms for elaboration of fluorescent biosensors on the base of nanoparticles. *Optical Memory and Neural Networks (Information Optics)*, 22(3):156–165, 2013.

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИХ СУСПЕНЗИЙ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

## §1.1. Углеродные наноматериалы, их синтез

Углерод – вещество, имеющее наибольшее количество известных аллотропных форм [17], среди которых присутствуют одномерные структуры (например, углеродные нанотрубки, наноконусы), двухмерные структуры (например, графен, графит), трехмерные (например, алмазы) и даже нульмерные объекты (например, фуллерены, углеродные луковицы). Несмотря на то, что все аллотропы, по сути своей, состоят из атомов углерода, различия в структурах получаемых материалов очень сильно влияет на свойства этих материалов. Так, например, удельная электропроводность графена составляет 2000 См/см, в то время как эта же величина для фуллерена равна  $10^{-10}$  См/см [18]; твердость алмаза – 10 по шкале Мооса, графита – лишь 1 [19]. Современное развитие науки и техники нуждается в создании новых материалов, которые можно было бы использовать для различных конкретных задач, однако, для их более эффективного использования требуется всестороннее изучение свойств этих материалов. В диссертационной работе рассматриваются наноалмазы детонационного метода синтеза частицы оксида графена. Выбор именно этих аллотропных форм углерода будет объяснен в дальнейших разделах.

### 1.1.1. Наноалмазы: методы синтеза

#### *Детонационный метод синтеза*

Впервые НА детонационного метода синтеза были получены в 1963 году советскими учеными при взрывном разложении взрывчатых веществ [20] (наиболее распространено использование смеси тринитротолуола и гексогена). При детонации значения давления и температуры на фронте ударной волны достигают области термодинамической стабильности алмаза, что, в свою очередь, приводит к образованию кристаллов алмаза. Согласно оценкам авторов [21], время образования НА не превышает 200-500 нс. Далее получаемые кристаллы наноалмазов испытывают многократное воздействие отраженных ударных волн, вследствие чего температура НА увеличивается и термодинамическое состояние продуктов реакции оказывается в области устойчивости графита, то есть происходит графитизация поверхности синтезированного НА. Несмотря на то, что сам метод синтеза был открыт 55 лет назад, до сих пор ведутся дискуссии по поводу механизмов формирования кристаллов НА. Так, например, в [22] в качестве «базиса» формирования НА рассматривается молекула циклогексана, а в работе [23] рассматривается

превращение углерода, входящего в состав взрывчатого вещества, в углерод алмазной фазы после выделения водорода в составе метана из взрывчатого вещества. Авторы работы [24] исследовали кинетику формирования ДНА с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния света и обнаружили преобразование адамантан-алмаз при воздействии взрывной волны за счет разрыва связей С-Н в структуре адамантана. Такой метод синтеза обладает рядом преимуществ: 1) ввиду отсутствия принципиальных ограничений на размеры взрывной камеры и массу взрывчатых веществ возможно крупномасштабное производство требуемого продукта, 2) ввиду того, что алмазная фаза углерода образуется из углерода, входящего в состав взрывчатого вещества, для синтеза не требуется редких и дорогих реактивов, 3) высокий процент выхода продуктов реакции (известна работа [25], в которой выход НА составил 60-70 мас. % при детонации октогена или гексогена с тринитротолуолом). Основным же недостатком такого метода синтеза является необходимость последующей процедуры выделения алмазной фазы углерода из продуктов взрывной реакции, сопряженная со сложными процедурами химической очистки (Рис. 1) [26].

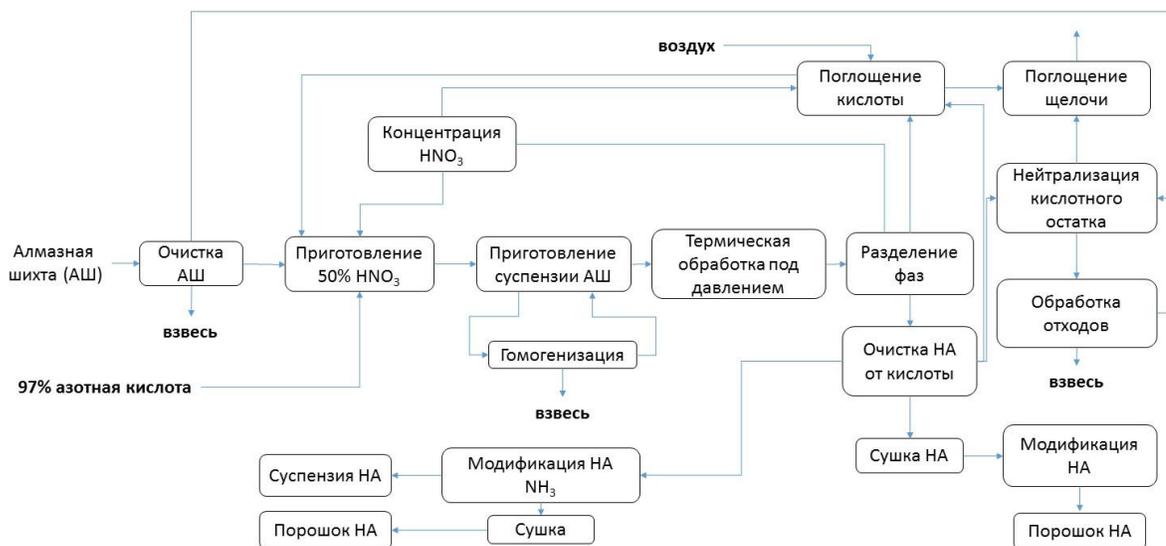


Рис. 1. Блок-диаграмма технологического процесса очистки ДНА [26].

Однако, даже несмотря на сложный процесс химической очистки, в результате остаются примеси, которые могут сильно влиять на свойства ДНА. Так, например, в работе [27] с помощью полевой индуктивно-связанной плазменной масс-спектрометрии изучался элементный состав 15 коммерчески доступных образцов ДНА. Авторами работы была проведена характеристика каждого из исследуемых образцов и составлена диаграмма (Рис. 2), на которой отложены

максимальные и минимальные значения концентрации примесей (мкг/г), имеющих в коммерчески доступных ДНА.

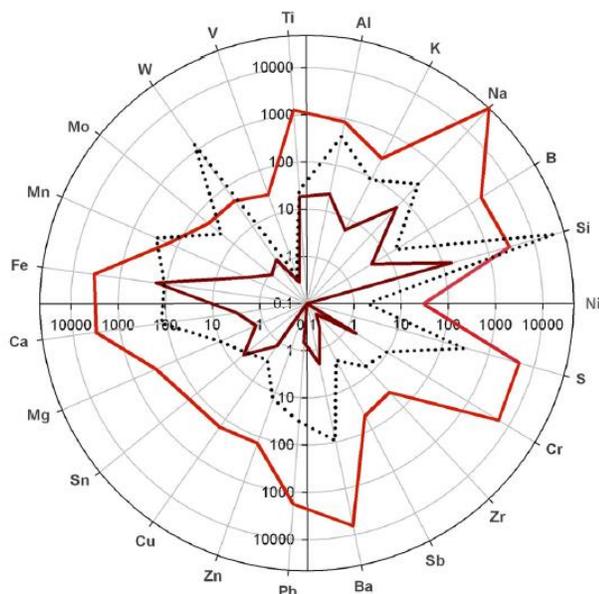


Рис. 2. Количество различных примесей, присутствующих в коммерчески доступных НА [27].

Одним из важнейших и уникальных свойств ДНА является полифункциональность поверхности частиц. В работе [28] с помощью термогравиметрии было установлено наличие на поверхности ДНА таких функциональных групп, как гидридные, карбоксильные, гидросильные, лактонные, группы ангидрида кислоты, эфирные и карбонильные. Помимо этого, известны работы, в которых на поверхности ДНА были обнаружены азотсодержащие группы [29]. С помощью комплекса химических процедур возможна функционализация - покрытие поверхности ДНА заранее заданными функциональными группами для последующего использования ДНА в конкретных задачах. В задачах биомедицины наиболее часто используется функционализация ДНА карбоксильными группами, так как эти группы обладают низкой токсичностью [30]. Процедура функционализации поверхности ДНА карбоксильными группами заключается в окислении поверхности НА в результате обработки или в смесях кислот, или, например, в растворе «Пиранья» - смеси  $H_2SO_4$  и  $H_2O_2$  [31].

Вследствие полифункциональной поверхности нанодiamondов имеются чрезвычайно большие проблемы в приготовлении стабильных суспензий ДНА: частицы легко агрегируют в жидкостях и выпадают в осадок. Патент на способ приготовления стабильной водной суспензии наночастиц с

размерами 20-30 нм был получен лишь в 2009 году [6], поэтому свойства ДНА в суспензиях только начинают исследоваться в литературе.

### *Лазерная абляция*

Метод импульсной лазерной абляции для синтеза НА впервые был осуществлен в 1992 году [32]. В общем случае процесс лазерной абляции заключается в удалении вещества с поверхности с помощью лазерного импульса. В эксперименте [32] в качестве мишени использовалась графитовая пленка, помещенная в бензол. Дальнейшее развитие технологии позволило реализовать синтез в отсутствие жидкости [33]. Такой метод синтеза позволяет получить наноалмазы малых размеров (~5 нм [34]) с монофункциональной поверхностью (в зависимости от окружения мишени) без дополнительных процедур очистки и функционализации. Однако этот метод синтеза сложно масштабировать, поэтому его стоимость несравнимо велика по сравнению с детонационным методом синтеза.

### *Синтез наноалмазов при высоком давлении и температуре*

Наноалмазы могут быть получены путем дробления микрокристаллов алмаза, синтезированных при высоком давлении (7-8 ГПа) и высокой температуре (1400-1600°C) [35] (НРНТ - high pressure, high temperature). Получение наноалмазов таким способом дорогостояще и сложно, поэтому их использование как в исследовательских, так и в прикладных задачах, существенно ограничено. Преимущество этого метода синтеза можно заключать в том, что получаемые НА (средний размер 18 нм) содержат минимальное количество дефектов кристаллической решетки [36].

#### **1.1.2. Оксиды графена**

Оксиды графена (ОГ) являются двумерными структурами и представляют собой соединение углерода, кислорода и водорода в различных соотношениях. Свойства ОГ существенно зависят от степени окисления и от метода синтеза частиц. На сегодняшний день известно несколько способов окисления поверхности графита, среди которых наиболее часто используемый – модифицированный метод Хаммерса [37]. Метод Хаммерса заключается в добавлении к смеси графита и нитрата натрия серной кислоты при температуре 66°C. Далее полученная смесь охлаждается до 0°C и к ней добавляется перманганат калия и вода. Продукт реакции очищается и обезвоживается. В результате пятидневной реакции образуются частицы ОГ с соотношением С:О 1.8, расстояние между слоями листов ОГ – 8.3 Å [38]. Полученные листы обрабатывают в ультразвуковой бане и после этого выделяют различные размерные фракции. Частицы ОГ имеют

характерные размеры 10-60 нм [39] (Рис. 3). Частицы, исследованные в настоящей работе, были синтезированы именно этим способом.

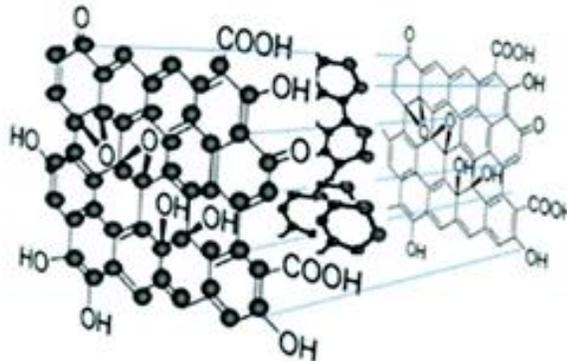


Рис. 3. Структура частицы ОГ [39].

## §1.2. Лазерная спектроскопия углеродных наночастиц.

Здесь и далее в работе при употреблении словосочетания «углеродные наночастицы» и аббревиатуры УНЧ будут пониматься углеродные наночастицы, исследуемые в настоящей работе, а именно, нанодиамазы и оксиды графена.

### 1.2.1. Лазерная спектроскопия КР нанодиамазов и оксидов графена

Как было указано выше, даже при проведении очистки алмазной шихты после детонационного взрыва конечный продукт (нанодиамазы) может иметь примеси. Известна работа [40], в которой показано, что при окислении поверхности ДНА в процессе их очистки и функционализации поверхности возможно уменьшение размера алмазного ядра и потеря некоторого количества углерода с  $sp^2$  гибридизацией. Для контроля состава и качества нанодиамазных частиц используется лазерная конфокальная спектроскопия КР света. На Рис. 4 представлен спектр КР порошка ДНА [41] и отмечены характеристические области спектра.

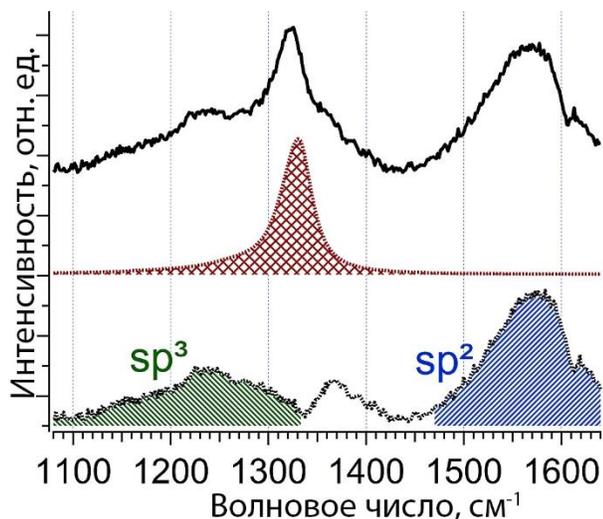


Рис. 4. Спектр КР ДНА [41] – черная линия, выделенные области спектра, используемые для анализа НА - ниже.

Типичный спектр КР порошка ДНА при возбуждении в видимой области спектра состоит из ряда характеристических линий, а именно: широкой полосы в области  $1100\text{-}1350\text{ см}^{-1}$ , соответствующей колебаниям аморфного углерода с  $sp^3$  гибридизацией [41], узкой линии алмаза в районе  $1332\text{ см}^{-1}$  с полушириной  $5\text{-}10\text{ см}^{-1}$ , широкой полосы в области  $1345\text{ см}^{-1}$  с полушириной  $250\text{ см}^{-1}$ , которая соответствует колебаниям аморфного углерода с  $sp^2$  гибридизацией, - так называемая D-линия, широкой полосы в области  $1520\text{-}1600\text{ см}^{-1}$  с полушириной  $100\text{ см}^{-1}$ , обусловленная колебаниями аморфного углерода с  $sp^2$  гибридизацией, - так называемая G-линия [42]. G-линия обусловлена валентными колебаниями пар атомов углерода в  $sp^2$  гибридизации, находящихся и в циклических кольцах, и в цепочках. D-линия, напротив, обусловлена только «дыханием» циклического кольца и, как было показано в [43], в отсутствии циклических колец, D-линии не наблюдается.

Выбор длины волны возбуждения сигнала КР имеет существенное значение при анализе углеродсодержащих объектов. Известно, что при использовании источника возбуждения, длина волны которого находится в видимом диапазоне, сечение КР от углерода, находящегося в  $sp^2$  гибридизации гораздо больше, чем значение сечения КР от углерода, находящегося в  $sp^3$  гибридизации (например, при  $\lambda_{\text{возб}}=514.4\text{ нм}$ , разница составляет  $50\text{-}250$  раз) [44]. Впервые в 1997 году [45] была обнаружена T-линия в области  $1060\text{ см}^{-1}$  при возбуждении сигнала КР в ультрафиолетовой области ( $244\text{ нм}$ ). Эта линия соответствует колебаниям C-C атомов углерода, находящихся в  $sp^3$  гибридизации. Эту линию редко используют для характеристики образцов (нахождения соотношения  $sp^3/sp^2$ ) ввиду того, что D-линия дает свой вклад в спектр КР при

возбуждении в УФ области только если в атомы углерода с  $sp^2$  гибридизацией находятся в разупорядоченных циклических соединениях [46].

При спектроскопии НА различных размеров было обнаружено, что интенсивность, положение и форма линии алмаза меняется при изменении размера наночастиц (Рис. 5). В работе [47] было показано, что этот эффект (асимметричное уширение линии КР алмаза и ее сдвиг в область малых значений волновых чисел) объясняется эффектом локализации оптических фононов в нанокристаллах.

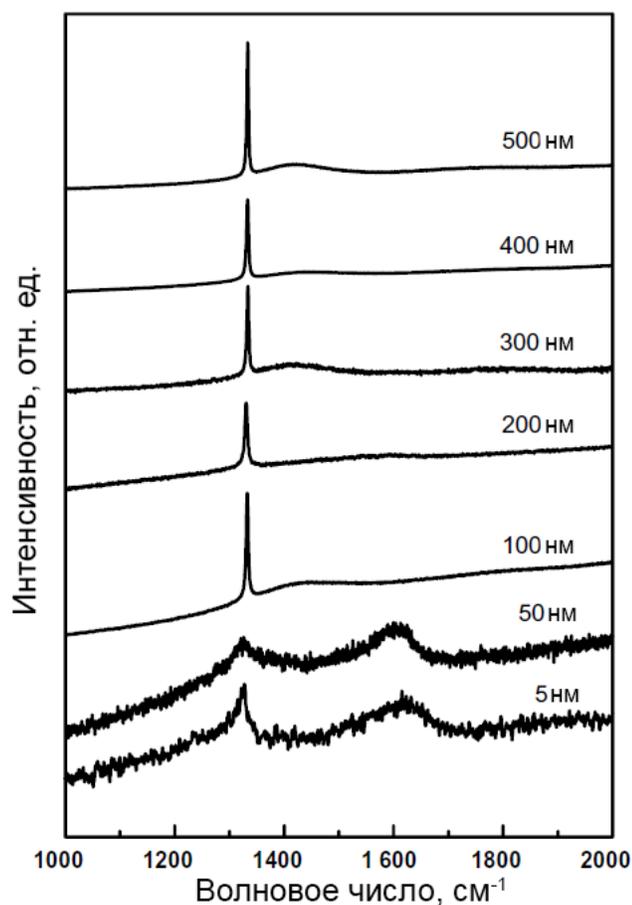


Рис. 5. Спектры КР НА различных размеров [48].

Типичный спектр КР порошка ОГ представлен на Рис. 6 и представляет собой ярко выраженные D- и G-линии, находящиеся в районе  $1345\text{ см}^{-1}$  и  $1595\text{ см}^{-1}$  соответственно. Ввиду того, что частицы ОГ получают из графита, спектроскопию КР удобно использовать в качестве инструмента для контроля окисления графита по изменению соотношения интенсивности D-линии к G-линии [49].

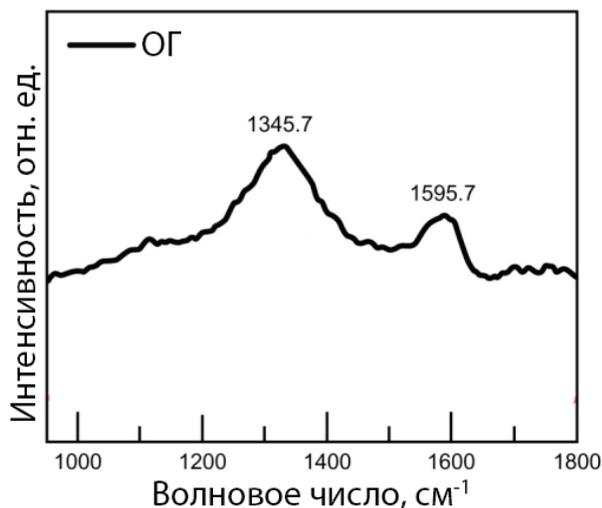


Рис. 6. Спектр КР наночастиц ОГ [49].

### 1.2.2. Лазерная фотолюминесцентная спектроскопия наноалмазов и оксидов графена

Фотолюминесцентные свойства НА в порошкообразном состоянии исследовались в работах [42,50-54], но до сих пор неясен механизм фотолюминесценции НА в даже в порошкообразном состоянии. Спектр фотолюминесценции ДНА представляет собой широкую бесструктурную полосу от 400 нм до 800 нм с максимумом в районе 450 нм (Рис. 7) [52]. В работе [53] фотолюминесценцию ДНА объясняли процессом излучательной рекомбинации, проходящим через систему непрерывно распределенных энергетических уровней в запрещенной зоне кластеров наноалмаза, однако известны работы и другие работы, в которых регистрируемые спектры фотолюминесценции порошков ДНА объясняют наличием различных структурных дефектов НА [53]. Подробно о механизмах фотолюминесценции будет сказано в п. 1.2.3.

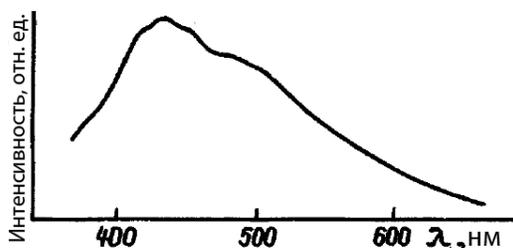


Рис. 7. Спектр фотолюминесценции ДНА при  $\lambda_{\text{возб}} = 337$  нм [52].

В работе [48] было показано, что фотолюминесценция наноалмазов с азот-вакантными центрами существенным образом зависит от их размера (Рис. 8). Авторы пришли к выводу, что полученные спектры фотолюминесценции нельзя объяснить лишь одним механизмом фотолюминесценции - за

счет дефектов кристаллической решетки, то есть азот-вакантных центров, а следует рассматривать дополнительные механизмы, чей вклад увеличивается с уменьшением размера наночастицы.

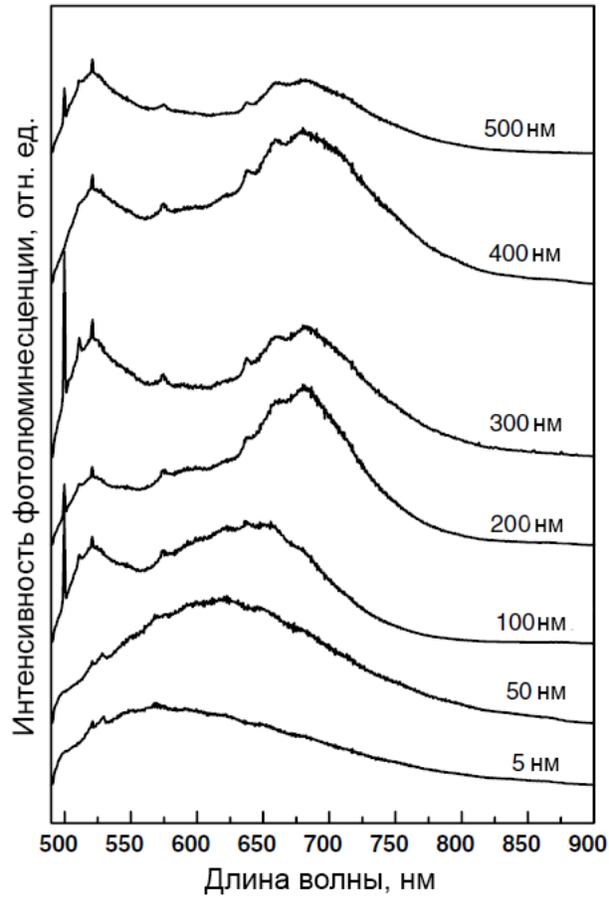


Рис. 8. Спектры фотолюминесценции порошков НА с азот-вакантными центрами разных размеров [48].

В работе [51] показано, что фотолюминесценция порошков ДНА стабильна в диапазоне изменения температуры от 20 до 80°C. Увеличение интенсивности фотолюминесценции ДНА при последующем нагреве до 200°C (Рис. 9) авторы связывают с десорбцией молекул воды с поверхности НА.

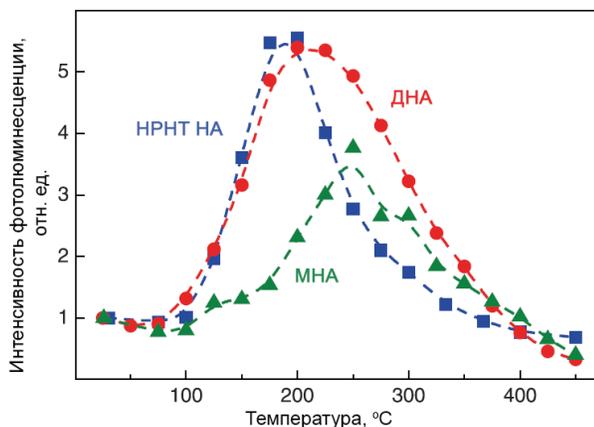


Рис. 9. Зависимость интенсивности фотолюминесценции от температуры ДНА, НА, полученного НРНТ синтезом и НА метеорического происхождения (МНА) [51].

Эти результаты подчеркивают важность исследования механизмов взаимодействия УНЧ с молекулами окружения, в общем, и влияния этих взаимодействий на фотолюминесцентные свойства ДНА, в частности.

Получение спектров фотолюминесценции ОГ в порошкообразном состоянии сталкивается с технической сложностью — при возбуждении фотолюминесценции лазерным излучением происходит сгорание образца. По этой причине фотолюминесценцию ОГ и ее свойства исследуют в различных растворителях (см. далее).

### 1.2.3. Механизмы фотолюминесценции наноалмаза и оксида графена

На сегодняшний день большинство исследователей рассматривают следующие механизмы фотолюминесценции наноалмазов и наночастиц оксида графена:

- 1) За счет дефектов в углероде  $sp^2$  гибридизации.
- 2) За счет оптически активных дефектов в наноалмазе.

#### *Фотолюминесценция УНЧ, обусловленная дефектами в углероде $sp^2$ гибридизации*

Под дефектами в данном случае понимается любое нарушение в структуре углерода с  $sp^2$  гибридизацией, обуславливающее образование дополнительных поверхностных электронных уровней/ловушек. Еще в 1987 году авторами [55] было выдвинуто предположение, согласно которому оптические свойства углеродных наноматериалов (в том числе и фотолюминесцентные [56]), имеющих в своей структуре углерод и в  $sp^2$ , и в  $sp^3$  гибридизациях, определяются состояниями атомов углерода с  $sp^2$  гибридизацией. Фотолюминесценция в такой системе

обуславливается электронно-дырочной рекомбинацией в локализованных  $\pi$  состояниях внутри запрещенной зоны. Величина запрещенной зоны варьируется от 0.5 до 4 эВ и зависит от размера кластера и содержания водорода в кластере [57,58]. Ввиду широкого распределения по размерам таких  $sp^2$  кластеров (обусловленного малым значением энергии формирования связи), наблюдается широкий спектр фотолюминесценции от видимого диапазона до ближнего ИК [57] (Рис. 10).

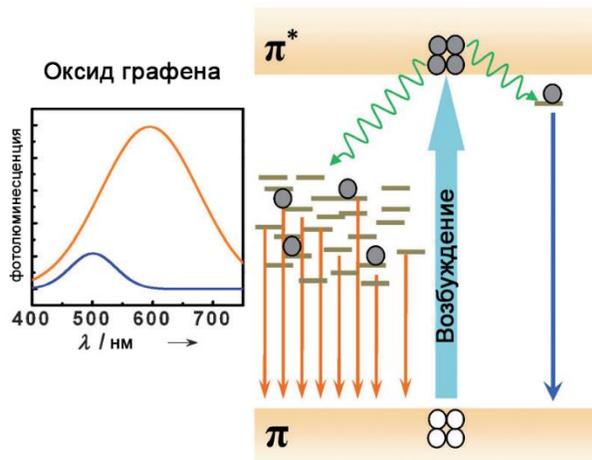


Рис. 10. Механизм фотолюминесценции оксида графена за счет делокализации  $\pi$  электронов, предложенный в работе [57].

Учитывая то, что фотолюминесценция определяется углеродом с  $sp^2$  гибридизацией, который, в свою очередь, находится на поверхности ДНА после очистки и процедуры функционализации поверхности, можно сделать вывод о том, что фотолюминесценция ДНА может иметь воздействие со стороны молекул окружения, поэтому критически важно исследовать степень влияния и механизмы этих воздействий.

#### *Фотолюминесценция НА, обусловленная оптически активными дефектами в объеме алмаза*

Наиболее изученным механизмом фотолюминесценции наноалмаза является фотолюминесценция за счет оптически активных дефектов в нем. При исследовании оптических свойств алмазов было обнаружено более 500 электронных оптических центров, среди которых половина связана с примесями [58,59]. Для создания оптических центров в качестве примесей используется большое количество различных атомов: **H, He, Li, Be, C, B, N, O, F, Ne, Na, Al, S, Si, P, Ar, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Y, Zr, Nb, Mo, Pd, Ag, Cd, Sb, Xe, Ta, W, Pt, Au, Tl, Er** [60] (жирным выделены те примеси, добавление которых приводило к созданию оптических центров). На сегодняшний день большое внимание привлекают НА с азот-вакантными оптическими центрами

(Рис. 11). Существует два принципиально разных подхода к формированию азот-вакантных центров в НА:

- 1) создание NV центров в объеме НА путем имплантации атомов азота в решетку алмаза, например, с использованием сфокусированного пучка ионов азота. Ионы азота выбивают атомы углерода из узлов решетки алмаза, образуя тем самым вакансии. Дальнейший отжиг образца приводит к объединению атома азота и вакансии, то есть, к формированию NV центра.
- 2) создание NV центров в НА на стадии синтеза наночастиц.

Азот-вакантный центр состоит из замещающего атом углерода атома азота, связанного с вакансией. Как только замещающий атом азота связывается с вакансией, три электрона атома азота связываются с тремя соседними атомами углерода, формируя при этом ковалентную связь, а оставшиеся два электрона образуют неподеленную пару. Азот-вакантный центр, в общем случае, имеет тенденцию захватывать дополнительный электрон от отрицательно заряженного центра (от  $NV^-$ ). На Рис 1.8. показано строение  $NV^0$  центра (а) и его переход в  $NV^-$  центр (б). Схема уровней этих двух центров отличается (Рис. 11 (в)).

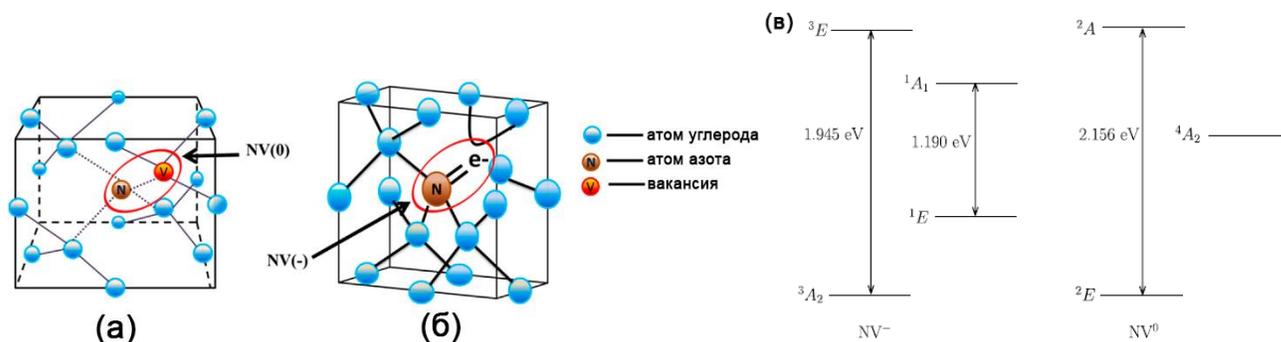


Рис. 11. Строение и схема уровней NV центров алмаза [61,62].

Спектры фотолюминесценции NV-центров при комнатной температуре представляют собой широкие полосы от 550 до 850 нм (Рис. 12).

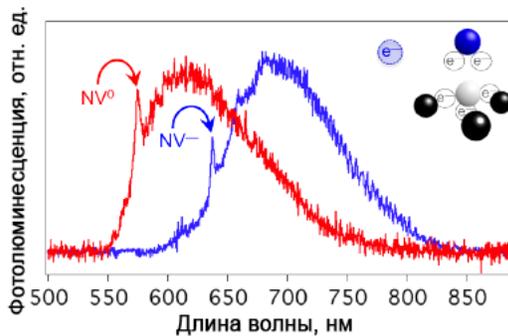


Рис. 12. Спектры фотолюминесценции  $NV^-$  и  $NV^0$  при комнатной температуре [59].

Существенным преимуществом НА с NV центрами является хорошая стабильность фотолюминесценции [63] – отсутствие мерцания и фотообесцвечивания, которые наблюдаются в красителях [64] и квантовых точках [65]. По сравнению с НА детонационного метода синтеза, фотолюминесценция НА с NV центрами гораздо более интенсивнее (квантовый выход центра  $NV^-$  составляет 99%, а при нахождении в составе НА – 70-80%) [66,67], против квантового выхода ДНА 0.22% [68]).

Несмотря на вышеописанные преимущества, НА с азот-вакантными центрами обладают существенными недостатками. Во-первых, синтез таких частиц до сих пор является сложным технологическим процессом, в результате чего объем производимой продукции в значительной степени уступает объемам производства ДНА, что, в свою очередь, сказывается на стоимости. Во-вторых, существуют определенные ограничения на размеры таких наночастиц. В работе [69] с помощью расчетов методом теории функционала плотности показано, что атомам азота энергетически более выгодно нахождение на поверхности НА или же сразу «под» поверхностью с  $sp^2$  гибридизацией. Поэтому атомы азота не могут считаться стабильными примесями в объеме наноалмаза, они могут быть таковыми только при больших размерах кристалла. На основании теоретических расчетов было показано, что локальная структура поверхности нанокристалла влияет на поверхностные энергетические уровни. Аналогичные выводы были сделаны и авторами работы [48], которые экспериментально исследовали фотолюминесценцию НА различных размеров: при размерах частиц 5-50 нм фотолюминесценция возникает за счет дефектов поверхности, а при размерах больше 100 нм может проявляться сигнал фотолюминесценции NV центра. В работе [70] было обнаружено мерцание фотолюминесценции НА-NV при нахождении NV-центра на глубине 8 нм от поверхности, что накладывает дополнительное ограничение на минимальный размер НА.

Известны работы [71,72], в которых показано, что даже в НА детонационного метода синтеза существует малое количество азот-вакантных центров. Источником атомов азота в этом случае является взрывчатое вещество, используемое при синтезе ДНА.

Важно отметить, что описанные механизмы фотолюминесценции УНЧ до сих пор требуют экспериментальных подтверждений. Несмотря на существенно более интенсивную фотолюминесценцию НА с азот-вакантными центрами, невозможность обеспечения стабильность фотолюминесценции частиц с размерами, меньшими 100 нм, не позволяет использовать их в качестве основы для создания нанокомпозитов.

Подводя итог §§1.1, 1.2, можно сделать вывод о том, что стабильные фотолюминесцентные свойства, присущие рассматриваемым УНЧ, открывает перспективы их использования в качестве фотолюминесцентного биомаркера.

### **§1.3. Молекулярные взаимодействия в суспензиях углеродных наночастиц**

Использование УНЧ в биомедицине подразумевает применение их в виде суспензий. Поэтому критически важно знать и понимать природу и механизмы этих взаимодействий, во-первых, для их эффективного использования и, во-вторых, для поиска подходов к управлению этими взаимодействиями. Как уже было указано выше, стабильные водные суспензии ДНА были получены относительно недавно [6]. Основная проблема, возникающая при работе с водными суспензиями, заключается в агрегации наночастиц, что является обычной трудностью при создании коллоидных систем [73]. На сегодняшний день до сих пор нет единого мнения о том, за счет чего возникает в воде агрегация УНЧ с прочными связями [74-76]. В работах [74,76] была предложена модель, согласно которой агрегаты возникают за счет электростатического взаимодействия разноименно заряженных поверхностей. Согласно результатам [76], чем больше по модулю значение дзета-потенциала наночастиц, тем более стабильной является суспензия. Авторы [75] предполагают образование ковалентных связей С-С между поверхностными атомами углерода наночастиц. Стоит отметить, что анализ и систематизация литературы, посвященной этой проблеме, крайне затруднительны: во-первых, из-за разнообразия методов, используемых для исследования взаимодействия УНЧ с молекулами окружения, во-вторых, из-за отсутствия единой «паспортизации» УНЧ, используемых в работах.

Вода является самым распространенным на Земле растворителем и в значительной степени присутствует в организме человека (головной мозг состоит на 73% из воды, легкие – почти на 83%, кожа - 64%, мышечная ткань и почки - 79%, и даже кости - 31% [77]). Поэтому особенно важно, в

первую очередь, исследовать природу и механизмы взаимодействия УНЧ с молекулами воды. Так как суспензии ДНА и ОГ удалось получить относительно недавно, направление, связанное с исследованием свойств суспензий УНЧ, только начало развиваться, причем, очень активно. Известны работы, в которых изучались процессы на границе НА-вода. Так, авторами [78] методом спектроскопии ИК поглощения был изучен процесс адсорбции воды на поверхность НА. Ими предложена гипотеза о существовании трех форм молекул воды на поверхности НА: монослой, состоящий из молекул воды, адсорбированных посредством водородной связи на кислоты Льюиса (то есть на поверхностные группы-акцепторы электронной пары), находящиеся на поверхности НА; монослой молекул воды, адсорбированных на основания Льюиса (то есть на поверхностные группы-доноры электронной пары), находящиеся на поверхности НА; и смежные адсорбированные молекулы воды, образующие межмолекулярные водородные связи (Рис. 13).

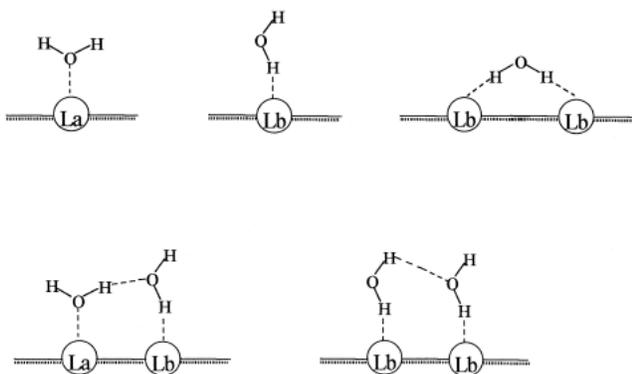


Рис. 13. Модель адсорбции молекул воды на поверхность НА [78]. Обозначения, введенные на рисунке: La – кислота Льюиса, Lb – основание Льюиса.

В работе [79] в результате анализа изотермы адсорбции воды на поверхность НА была отмечена слабая гидрофобность НА и наличие нескольких гидрофильных групп, находящихся на поверхности НА. На основании экспериментально полученных данных и расчетов авторами сделан вывод о том, что молекулы воды адсорбируются только на гидрофильные поверхности, присутствующие на поверхности НА за счет наличия на его поверхности  $sp^2$  гибридного углерода. При увеличении количества молекул воды образуются водные кластеры, формируя при этом непрерывный слой воды, который впоследствии проникает и в мезопоры (Рис. 14). Авторы не уточняют механизм адсорбции молекул воды на поверхность НА, однако он не противоречит модели, предложенной в [78].

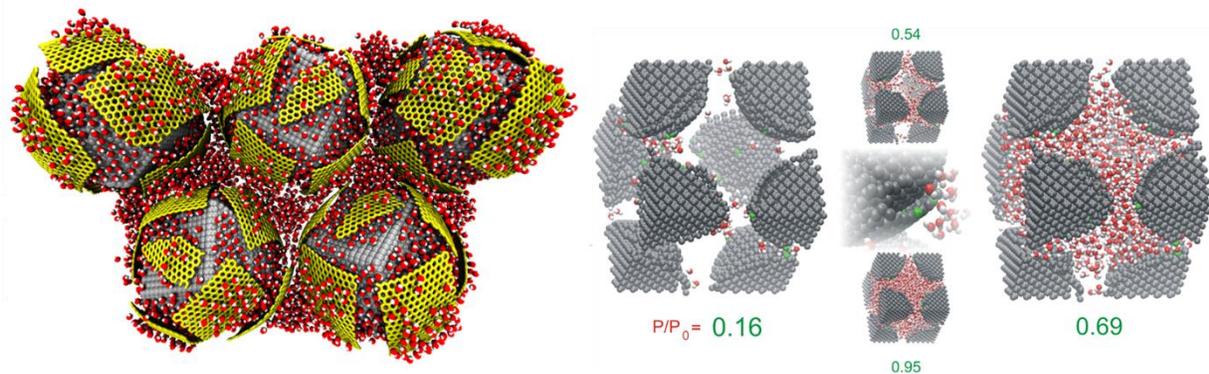


Рис. 14. Предложенная авторами [79] модель адсорбции молекул воды на поверхность НА.

В работе [80] методами дифференциальной сканирующей колориметрии обнаружено, что наличие так называемой нано-фазы воды на поверхности НА существенно зависит от размера наночастицы: при размере НА большем, чем 200 нм, нано-фазы воды не наблюдается. На основании экспериментальных данных авторами предложена модель частицы НА в суспензии, согласно которой непористое ядро НА покрывает сферическая оболочка, состоящая из молекул воды, толщина которой составляет 1 нм. Авторами было отмечено существенное уменьшение значения энтальпии плавления по сравнению с обычной водой, из чего авторы сделали вывод о высокой упорядоченности структуры воды, находящейся на поверхности НА.

Известны работы, в которых изучалось, как взаимодействия НА с водой зависят от функционализации поверхности наночастицы [81-90]. В работе [81] методами спектроскопии потерь энергии электронов высокого разрешения и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии показано, что адсорбция молекул воды на поверхность алмаза вызывает их активную диссоциацию и образование связей C=O, C-O-H на поверхности алмаза. Позже авторы [82], используя теоретические вычисления методом теории функционала плотности, показали, что и на кислородсодержащей поверхности алмаза, и на гидрогенизированной поверхности алмаза происходит молекулярная адсорбция молекул воды, при этом менее предпочтительной является гидрогенизированная поверхность.

В ряде работ [83-86] обнаружено, что в присутствии наночастиц, в том числе, и НА, физико-химические свойства растворителя, такие, как диэлектрическая проницаемость, могут сильно изменяться. Авторы указанных работ экспериментально продемонстрировали существенное увеличение значения диэлектрической проницаемости воды в присутствии даже малых концентраций НА (0.0085% по массе): 80 для обычной воды и  $1.6 \cdot 10^6$  для воды с НА. Было выдвинуто предположение, что молекулы воды, образуя слой на поверхности НА, связывают частицы в агрегаты посредством водородных связей. В работе [86] при исследовании показателя

преломления водных суспензий НА определено, что эффективная толщина внешнего слоя воды на поверхности НА, имеющего размер 5 нм равна приблизительно 0.5 нм (то есть, фактически, дальность влияния поверхности НА на окружающие молекулы). В свою очередь, НА являются причиной структурной перестройки молекул воды на больших расстояниях, скорее всего, посредством ориентационного механизма поляризации. Авторами [83-86] было выдвинуто предположение, что ДНА, находясь в водной суспензии, могут вызывать структурные изменения воды на очень большие расстояния, вызывая при этом структурную перегруппировку молекул воды.

Известны работы, в которых использовалась спектроскопия рентгеновского поглощения для изучения влияния как воды на НА [87], так и НА на молекулы воды [90]. В работе [87] методом спектроскопии рентгеновского поглощения К-границы углерода показано, что электронная структура ядра НА не изменяется при добавлении воды. Однако при этом на поверхности НА были обнаружены фуллереноподобные фрагменты, определяющие взаимодействия на границе раздела НА-вода. Адсорбция молекулярного кислорода, являющегося акцептором электрона, на фуллереноподобные фрагменты поверхности стабилизируется за счет молекул воды. В работе делается предположение о наличии переноса заряда от НА к окружающим молекулам. В работе [90] методом спектроскопии рентгеновского поглощения К-границы кислорода было изучено влияние НА на структуру воды в суспензии. Было обнаружено, что возмущение сетки водородных связей, вызванное малыми НА (3-5 нм), гораздо сильнее, чем возмущение, вызванное растворенными ионами солей, и распространяется это возмущение, по меньшей мере, на четыре гидратных слоя вокруг наночастицы. НА (~5 нм) гораздо больше ионов солей (0.2 нм для К), поэтому в первом гидратном слое одной наночастицы НА находится большее количество молекул воды. Авторы обнаружили, что электронная структура воды у поверхности НА сравнима со структурой аморфного льда высокой плотности.

Работа [88] посвящена изучению структурных характеристик водных суспензий НА и их агрегатов методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Было обнаружено образование стабильных кластеров НА, остающихся даже при высушивании суспензии и ее ресуспензировании. Такое поведение обнаружено для НА разных размеров (20 и 40 нм), для которых отличались лишь размеры агрегатов. Авторы установили, что механизм формирования кластеров НА может быть связан с диффузионно-ограниченной агрегацией (то есть, фактически, определяется броуновским движением в среде). Было отмечено, что такой механизм является уникальным, выделяющим суспензии НА как отдельный класс среди других коллоидных систем.

Другого мнения придерживаются авторы работы [89], в которой методами спектроскопии ИК поглощения, Кельвин-зондовой силовой микроскопии, термического анализа было изучено взаимодействие молекул воды с гидрогенизированными НА (ДНА-Н) и НА, имеющими на своей поверхности кислород (ДНА-О). Результаты термического анализа показали, что на поверхности ДНА-Н содержится 4.4% воды, в то время как на поверхности ДНА-О содержится 3.1% воды. Большое содержание воды на поверхности ДНА-Н авторы объясняют образованием тонкого слоя молекул воды на поверхности ДНА-Н и возможным формированием пористых агрегатов (Рис. 15). Такое поведение описывается так называемой моделью мостового кластера (*cluster bridging model*), согласно которой существует взаимодействие между близкими гидрофобными поверхностями (ДНА-Н) посредством организованных удлиненных кластеров воды.

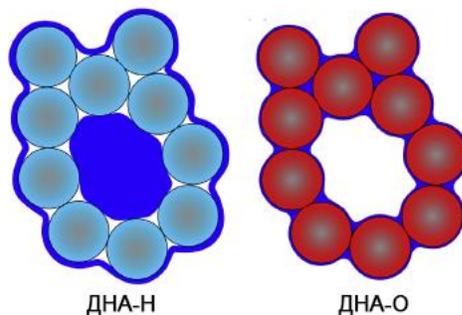


Рис. 15. Упрощенная модель-схема взаимодействия НА с различными поверхностными функционализациями с молекулами воды, предложенная авторами [89].

Как было показано выше, значительный вклад во взаимодействия НА с водой вносят фрагменты углерода с  $sp^2$  гибридизацией, находящиеся на поверхности НА. Эти фрагменты углерода наиболее близки по своей структуре к оксидам графена (ОГ). Известны работы, посвященные изучению взаимодействий ОГ с молекулами воды [90-95]. Так, например, в работе [91] методами молекулярной динамики изучались процессы, происходящие при взаимодействии ОГ с молекулами воды (Рис. 16).

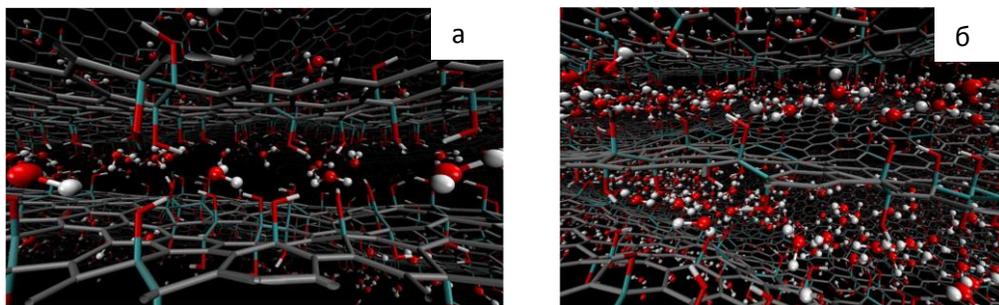


Рис. 16. Симуляция взаимодействия ОГ с молекулами воды при содержании воды между слоями ОГ в количестве а) 8.3%, б) 23.3% (% по массе) [91].

Авторами сделана оценка количества связанных и несвязанных молекул воды при различной степени гидратации частиц ОГ (взаимодействие ОГ с молекулами воды происходит посредством гидроксильной группы ОГ). При добавлении малого количества воды, почти все молекулы воды связаны с OH-группами ОГ (1% воды по весу). При увеличении общего числа молекул воды, количество несвязанных молекул воды увеличивается и достигает 21% при общем объеме воды 23.3% по массе. В результате вычислений было показано сильное взаимодействие между молекулами воды и OH-группами ОГ посредством образования водородных связей. Образующие связи являются причиной медленной диффузии воды в ОГ. Похожие результаты были получены экспериментально и авторами [92] с использованием нейтронного рассеяния.

В работе [93] методом молекулярной динамики определялась скорость испарения воды с поверхности ОГ и был обнаружен так называемый эффект Лейденфроста [94] – отделения целых водных кластеров от поверхности ОГ. Следует отметить, что этот эффект не наблюдается для поверхности графена.

Подводя итог настоящего раздела, можно сделать вывод о том, что различными методами было обнаружено существенное влияние УНЧ на молекулы воды и предложено несколько моделей взаимодействий на поверхности НА-вода. Следует отметить, что для ОГ известны, в основном, теоретические работы, нуждающиеся в экспериментальном подтверждении. Однако на сегодняшний день нет ясного понимания механизмов взаимодействий углеродных наночастиц в суспензиях с молекулами окружения, что делает чрезвычайно актуальным исследования в этом направлении. В настоящей диссертационной работе представлены результаты изучения механизмов взаимодействий УНЧ с молекулами воды, протонных растворителей и биомакромолекул с помощью лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния света.

#### §1.4. Фотолюминесцентные свойства НА и ОГ в суспензиях

Несмотря на чрезвычайную важность изучения влияния молекул окружения на фотолюминесцентные свойства НА для их использования в биомедицине, в научной литературе имеются только единичные публикации, посвященные этой проблеме.

В работе [96] при исследовании фотолюминесценции ОГ в различных растворителях (использовались водно-этанольные растворы и диметилсульфоксид) было показано, что при увеличении содержания спирта в водно-этанольном буфере увеличивается интенсивность фотолюминесценции ОГ (Рис. 17). Авторы выдвинули гипотезу, согласно которой изменение содержания спирта влияет на изменение фотолюминесценции за счет воздействия на способ релаксации возбужденного состояния.

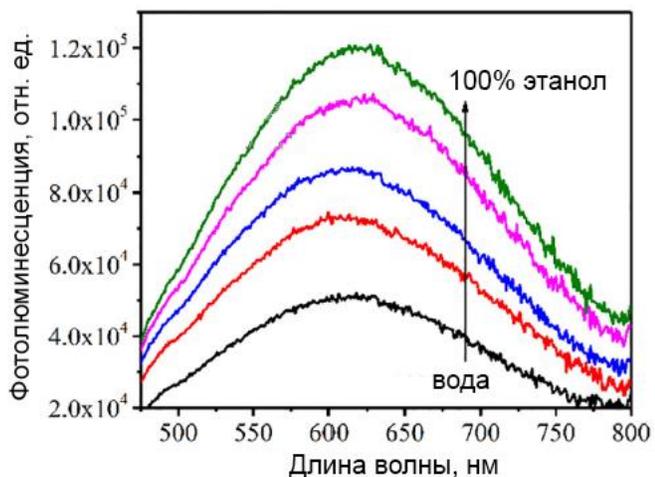


Рис. 17. Изменение интенсивности фотолюминесценции при изменении концентрации этанола в суспензии [96].

Известны работы за 2016-2018 гг., в которых исследовалось влияние растворителей с различной полярностью на фотолюминесцентные свойства углеродных наноточек [97-99]. Авторами обнаружен эффект, аналогичный сольватохромизму – зависимости цвета фотолюминесценции от полярности растворителя (Рис. 18). Одновременно с изменением интенсивности фотолюминесценции углеродных точек в разных растворителях, наблюдался и сдвиг максимума полосы фотолюминесценции.

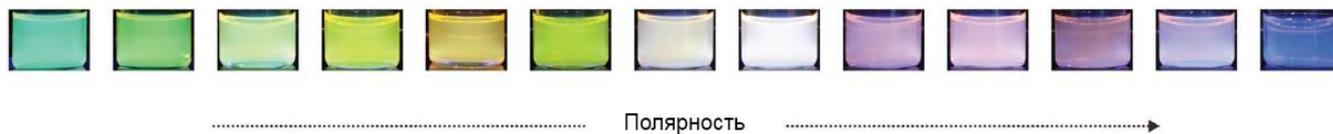


Рис. 18. Фотографии суспензий углеродных наноточек в различных растворителях при возбуждении на 365 нм. Последовательность растворителей от наименее полярного (слева) до наиболее полярного (справа) [97].

Авторы [99] выдвинули гипотезу, согласно которой, в присутствии растворителей во время сольватации происходит замедленная безизлучательная релаксация электронов с возбужденного уровня, которая вызывает красный сдвиг в спектрах испускания фотолуминесценции. Флуорофор в возбужденном состоянии и молекулы растворителя выходят из состояния равновесия и меняют ориентацию молекулы растворителя, что, в свою очередь, вызывает уменьшение энергии флуорофора (Рис. 19).

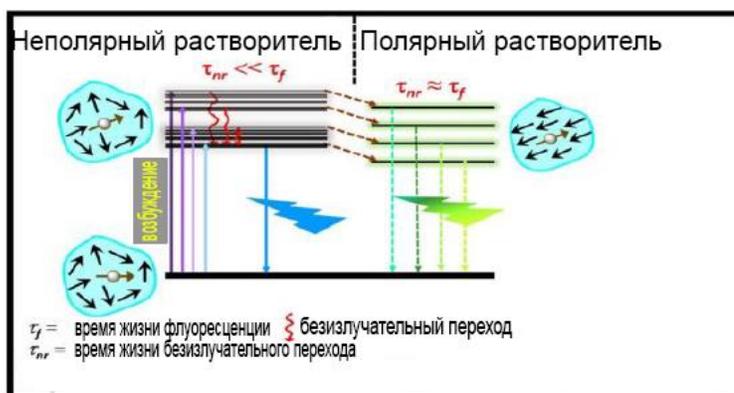


Рис. 19. Схема электронных уровней и предложенный механизм переориентации молекул растворителя, вызывающий сдвиг электронных уровней [99].

Авторами [100] было отмечено влияние растворителя на фотолуминесцентные свойства углеродных наноточек, в частности, на квантовый выход фотолуминесценции (Таблица 1). Было обнаружено, что в более полярных растворителях квантовый выход фотолуминесценции меньше, чем в менее полярных растворителях. Вместе с этим было отмечено увеличение времени жизни фотолуминесценции при уменьшении полярности растворителя. Сравнивая фотолуминесценцию углеродных наноточек в обычной и в тяжелой воде, был сделан вывод о том, что ввиду того, что водородные связи по своей природе локальны, изменение фотолуминесценции углеродных наноточек при изменении растворителя является прямым доказательством участия поверхности углеродных наночастиц в фотолуминесценции. Была выдвинута гипотеза, согласно которой

безизлучательный переход затрудняется при уменьшении частоты колебательных мод, участвующих в диссипации энергии (при замене N-H на N-D и O-H на O-D амидных и карбоксильных групп соответственно).

Таблица 1. Результаты исследования фотолюминесцентных свойств углеродных наноточек в различных растворителях [100].

Растворитель	Диэлектрическая проницаемость	Квантовый выход	Время жизни флуоресценции, нс
H <sub>2</sub> O	80	0.09	4.8
D <sub>2</sub> O	79	0.18	10.7
Глицерол	43	0.25	8.0
Метанол	33	0.22	9.7
Этанол	24	0.28	10.5
Изопропанол	18	0.33	11.5

Следует отметить, что результаты этих исследований позволяют говорить о возможности управления фотолюминесцентными свойствами углеродных точек и, возможно, использования этих наночастиц в качестве сенсора для определения полярности растворителя. Нам неизвестны работы, в которых было бы продемонстрировано влияние взаимодействий частица-молекула окружения растворителя на фотолюминесцентные свойства ДНА. Это очень важный вопрос не только для их последующего применения в качестве многофункционального биомаркера, но и для исследования механизмов фотолюминесценции ДНА.

### §1.5. Адсорбционные свойства углеродных наночастиц в суспензиях

В настоящее время для сорбции различных веществ в медицине активно используются такие адсорбенты, как активированный уголь, полимерные сорбенты, силикагель и др. Эти сорбенты различаются по величине удельной плотности поверхности (наибольшая – 800 м<sup>2</sup>/г у активированного угля марки БАУ-II), структуре, селективности и многим другим параметрам, позволяющим оптимальным образом их использовать в конкретных задачах [101].

В настоящее время известно большое количество работ, посвященных изучению адсорбционных свойств ДНА в суспензиях по отношению к различным ионам, превышение концентрации которых в организме может иметь необратимые последствия, и биомакромолекулам (Таблица 2). Приведенные в таблице адсорбтивы в большей или меньшей степени адсорбируются на поверхность НА. Сравнение и анализ данных литературных источников затруднителен ввиду того,

что, во-первых, в различных работах использовались различные образцы НА (то есть с разными размерами, методом очистки и т.д.), и, во-вторых, использовались различные показатели адсорбционных свойств наночастиц, что не позволяет провести корректный сравнительный анализ.

Таблица 2. Сводная таблица исследуемых адсорбтивов и функционализаций адсорбента (ДНА) с указанием предполагаемых механизмов адсорбции.

Ион/ механизма адсорбции	Объяснение	Функционализация поверхности НА	Ион/ механизма адсорбции	Объяснение	Функционализация поверхности НА
Медь (II)/ † [102-105], R [106,107]		-COOH, поли, -NH <sub>2</sub>	Кальций/ † [109]		-COOH
Цезий/ R [108]		поли	Рубидий/ † [109]		-COOH
Никель/ † [108], R [104]		-COOH	Литий/ † [109]		-COOH
Кадмий/ † [106]		-COOH	Оксалаты/ † [104]		-COOH
Хром/ † [106]		-COOH	Тетрабораты/ † [104]		-COOH
Магний/ † [104,109]		-COOH	Сульфаты/ † [104]		-COOH
Железо/ † [104]		-COOH	Хлориды/ † [104]		-COOH
Алюминий/ † [104]		-COOH	Цитохром с/ R [110]		-NH <sub>2</sub>
Цинк/ † [104]		-COOH	Бычий сывороточный альбумин/ R [111,112]		-O, -H, -COOH
Кобальт/ † [104]		-COOH	Лизоцим/ R[111]		-O, -H
Калий/ † [109]		-COOH	Мирамистин/ Г [105]		поли
Натрий/ † [109]		-COOH	Цепочки ДНК/ R [113,114]		-COOH, поли

† - Ион-обменный механизм, R - Электростатическое взаимодействие, Г - Гидрофобное взаимодействие

Несмотря на большое количество исследовательских работ, посвященных изучению адсорбционных свойств НА по отношению к различным ионам и молекулам, механизмы адсорбции молекул на поверхность НА все еще не выяснены. Среди вышеперечисленных следует отметить работы [103, 105], в которых исследовалась адсорбция ионов меди на поверхность карбоксилированных НА. На основании результатов спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и спектроскопии ядерного магнитного резонанса была изучена структура ДНА-Cu<sup>2+</sup> и сделан вывод о том, что наиболее вероятное расстояние от поверхности НА до иона меди – 0.2-0.3 нм (Рис. 20). Дальнейшее развитие работы позволило сделать оценку сверху количества ионов двухвалентной меди, которая может адсорбироваться на поверхность НА. Было получено, что на поверхность карбоксилированного НА может поместиться до 34% по массе ионов меди. На

основании полученных результатов авторы предположили, что механизмом адсорбции ионов меди на карбоксилированные НА является ион-обменный механизм, то есть присоединение иона с образованием ковалентной связи. В работе [104] была обнаружена одновременная адсорбция и катионов металлов, и анионов. При этом показано, что активность адсорбции выше в отношении к анионам, чем к катионам. Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что помимо адсорбции за счет электростатических взаимодействий, есть и другие механизмы. Другого мнения придерживаются авторы работы [115], в которой на примере адсорбции положительно заряженной молекулы иодида пропидия на НА была показана физическая природа адсорбции.

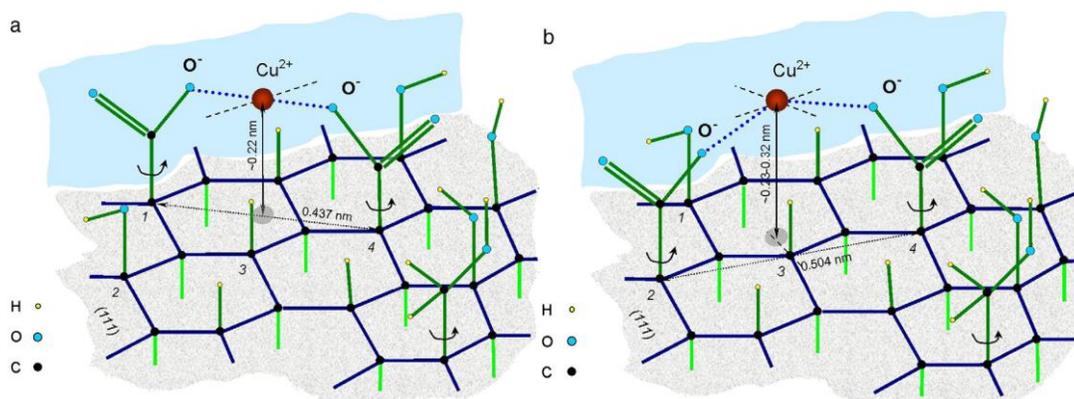


Рис. 20. Предложенные авторами [105] возможные схемы присоединения ионов двухвалентной меди к поверхности НА с карбоксильными группами.

Из анализа литературных данных следует, что на сегодняшний день не существует единого объяснения механизмов взаимодействия (адсорбции) ионов и молекул с поверхностью НА. Как видно из таблицы, противоречивы результаты и при исследовании адсорбции одних и тех же ионов на поверхности НА с одинаковой функционализацией (например, при адсорбции никеля).

Известны работы [111,112], в которых исследовалась адсорбция биомолекул на поверхность НА. Авторы едины во мнении, что взаимодействие НА с белками происходит посредством электростатического взаимодействия. Однако, имеются противоречивые данные по адсорбции цепочек ДНК. Так, например, в работе [114] показано, что на поверхность НА могут адсорбироваться линейные цепочки ДНК и не могут адсорбироваться кольцевые, однако, в работе [116] была продемонстрирована адсорбция кольцевой плазмиды pUC18.

Таким образом, в литературе отмечены высокие адсорбционные свойства наноалмазов по отношению к определенным ионам, белкам и красителям. Однако нет единой модели, объясняющей все наблюдаемые эффекты адсорбции веществ на поверхность ДНА. Вместе с тем,

понимание процессов взаимодействия НА с молекулами окружения посредством адсорбции необходимо для использования ДНА в качестве адсорбентов или для адресной доставки лекарственных веществ.

### §1.6. Визуализация углеродных наночастиц в биологической среде

Как указывалось ранее, благодаря уникальному сочетанию таких свойств УНЧ, как низкая токсичность, биосовместимость, возможность целенаправленной функционализации/модификации поверхности, способности к стабильной фотолюминесценции, для УНЧ открываются перспективы использования в качестве многофункционального фотолюминесцентного биомаркера. Само понятие фотолюминесцентного биологического маркера подразумевает его визуализацию в биологической ткани по спектрам фотолюминесценции наночастиц. Одной из проблем, возникающей при визуализации маркеров, является существенное перекрывание спектров фотолюминесценции УНЧ и аутофлуоресценция биологической ткани. Как видно из спектров флуоресценции биологической ткани, представленных на Рис. 21, аутофлуоресценция перекрывает весь видимый диапазон.

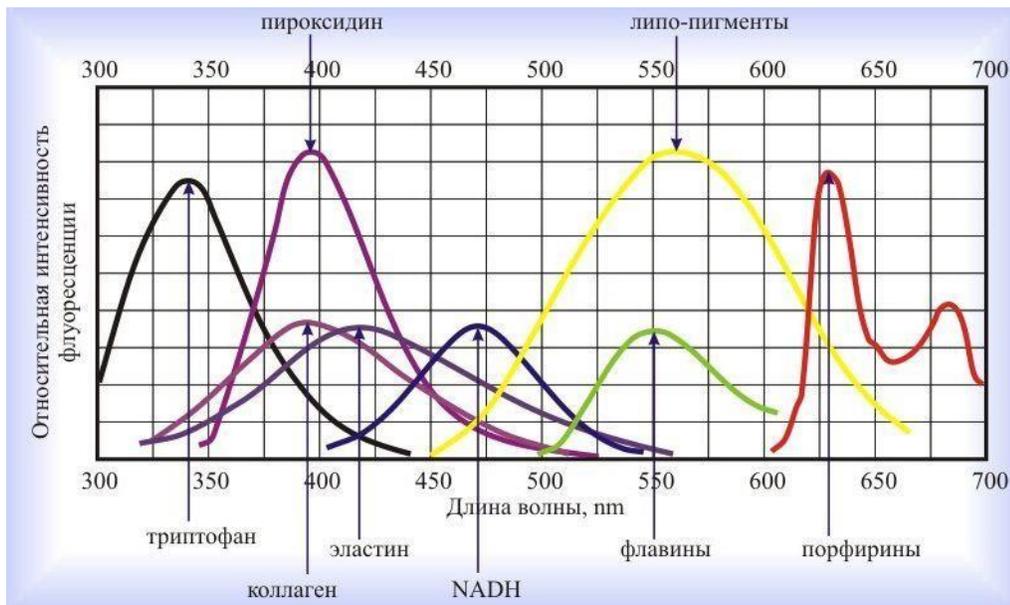


Рис. 21. Спектры флуоресценции собственных флуорофоров биологических тканей [117].

На сегодняшний день можно выделить три основных подхода к визуализации частиц в биологической среде:

1) Создание новых материалов для визуализации. В настоящее время активно разрабатываются органические красители [118], золотые нанокластеры [119], излучающие в ближнем ИК диапазоне.

Некоторые из красителей одобрены для проведения клинических исследований [120]. Однако новые красители и по-прежнему нерастворимы в воде, имеют тенденцию к агрегации, низкий квантовый выход, низкую фотостабильность. Благодаря квантово-размерному эффекту удалось получить полупроводниковые квантовые точки, излучающие в диапазоне от УФ до ИК областей спектра (400 - 4000 нм) [121]. Тем не менее, проблема токсичности полупроводниковых квантовых точек остается [122]. Активно идут работы по синтезу НА, легированных кремнием: они имеют узкую полосу флуоресценции с максимумом в районе 738 нм [123]. Таким образом, несмотря на значительный прогресс в области синтеза новых наночастиц для биологических применений, проблема оптимизации свойств наночастиц для их уверенной визуализации, для получения максимального терапевтического эффекта и безопасности далеко не решена на сегодняшний день.

2) Визуализация с применением уже имеющейся аппаратуры, например, микроскопии на основе подавления спонтанного испускания флуоресценции (STED-микроскопия), времяразрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM-микроскопия) и т.д.

Известны работы, в которых для визуализации частиц использовались методы лазерной конфокальной фотолюминесцентной микроскопии [124-126], микроскопии, основанной на подавлении спонтанного испускания (STED микроскопия) [11], микроскопии исследования времени жизни флуоресценции (FLIM-микроскопия) [12,127], сканирующей электронной микроскопии [128], просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения [21].

Метод STED-микроскопии был предложен в 1994 году Штефаном Хеллем и Яном Вихманном [129] (за что в 2014 Штефан Хелл получил Нобелевскую премию по химии). Суть метода заключается в подавлении спонтанного испускания, для чего используется второй лазерный источник для стимулирования излучательных переходов по краям фокусного пятна. Стоит отметить, что на сегодняшний день рекордное разрешение, полученное этим методом, составляет  $2.4 \pm 0.3$  нм и было получено при исследовании азот-вакантных центров в алмазе [130]. В работе [11] было показано, что с помощью STED-микроскопии возможно исследование распределения НА с NV центрами в объеме опухолевой клетки *HeLa* с разрешением 70 нм (Рис. 22).

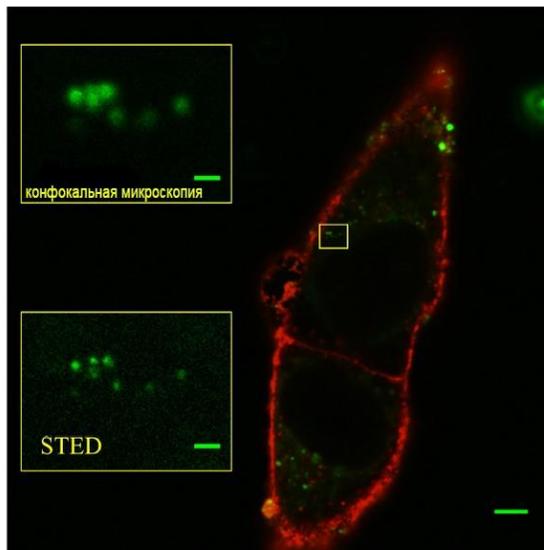


Рис. 22. Сравнение двух методик визуализации НА с NV центрами в объеме клетки. Клеточная мембрана обработана органическим красителем (Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 680 Conjugate) и отображена красным [11].

Другой метод, используемый для визуализации наночастиц в клетке - FLIM микроскопия. Суть метода заключается в измерении времени жизни фотолюминесценции. Ввиду того, что различные флуорофоры (например, компонентны биологической среды и наночастицы) имеют различные времена жизни фотолюминесценции, возможно проведение картирования для визуализации наночастиц в объеме среды.

В работе [12] была показана возможность использования НА с азот-вакантными центрами для их визуализации в живой ткани – в черве *Bristol N2* (Рис. 23) методом FLIM микроскопии.

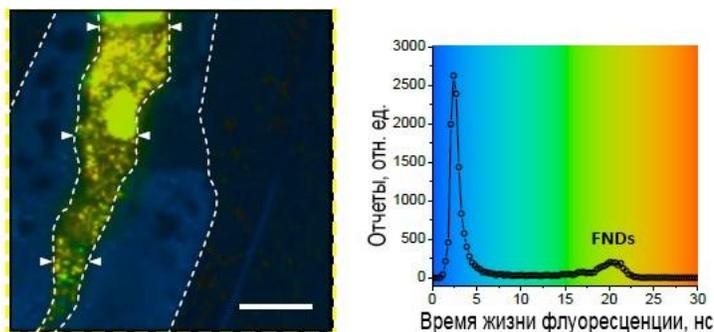


Рис. 23. Визуализация НА с NV центрами методом FLIM-микроскопии.

Важно отметить, что большие успехи, достигнутые в процессе визуализации в ткани связаны с НА с азот-вакантными центрами. Гораздо сложнее ситуация наблюдается при попытке решения

проблемы визуализации НА детонационного метода синтеза. Сложности, в первую очередь, связаны с тем, что интенсивность фотолюминесценции ДНА меньше, чем у НА с NV центрами, и сигнал фотолюминесценции ДНА в широком спектральном диапазоне перекрывается с фотолюминесценцией клеточного материала (Рис. 21). Сигнал фотолюминесценции НА-NV тоже перекрывается с аутофлуоресценцией. Известна лишь одна работа [127], посвященная визуализации НА, синтезированных методом лазерной абляции (без азот-вакантных центров) методом FLIM микроскопии и вышедшая в сентябре 2018 года (Рис. 24).

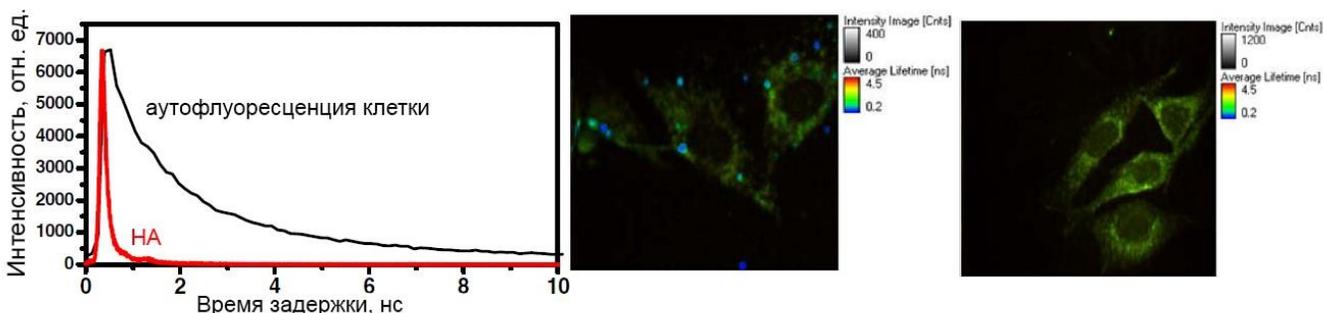


Рис.24. Слева направо: Кинетика тушения фотолюминесценции НА и аутофлуоресценции клеток, FLIM изображение в присутствии НА, FLIM изображение в отсутствии НА [127].

Реализация вышеописанных методов требует дорогого оборудования и не может применяться для визуализации УНЧ в биологической ткани при условии большого объема пробы. То есть, эти методы применимы для визуализации УНЧ в объеме клетки и, в общем случае, не позволяют ответить на вопрос о количестве УНЧ в объеме исследуемой биологической ткани.

3) Создание новых методов обработки сигналов. Другой способ преодоления сложности выделения сигнала фотолюминесценции – развитие новых методов и методик обработки сигнала фотолюминесценции НА на фоне аутофлуоресценции. Именно в этом направлении велись работы, описанные в оригинальной части настоящей работы. Для решения обратных задач лазерной спектроскопии – получения информации об объектах исследования по их спектрам – в нашей лаборатории впервые были успешно применены ИНС [16]. Была показана принципиальная возможность выделения флуоресцентного сигнала нефтяных загрязнений на фоне флуоресценции растворенной органики в природных водах с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии с использованием ИНС. На сегодняшний день известно использование ИНС в медицине для решения большого спектра различных задач – диагностики меланомы по спектрам

флуоресценции кожи [131], обработке изображений клетки, полученных с помощью конфокальной микроскопии [132], не инвазивной диагностики диабета по спектрам ИК [133], предупреждение припадков у больных эпилепсией по электрокардиограммам [134] и др. [135]. Большой трудностью при решении обратных задач фотолюминесцентной спектроскопии является то, что зачастую крайне сложно выявить все возможные виды взаимодействия наночастиц с окружением и даже оценить влияние такого взаимодействия на регистрируемый спектр. Ввиду того, что обучение ИНС происходит на экспериментальных данных, все возможные взаимодействия наночастица-окружения учитываются уже на стадии тренировки сети (см. 1.7.).

### **§1.7. Адаптивные методы анализа данных в решении обратных задач лазерной спектроскопии**

Для решения обратных задач лазерной спектроскопии суспензий УНЧ в диссертационной работе применялись адаптивные методы анализа данных - генетические алгоритмы (ГА) и искусственные нейронные сети (ИНС).

#### **1.7.1. Генетические алгоритмы**

Генетические алгоритмы предложены Дж. Холландом в 1975 году и применяются для решения задач оптимизации и моделирования [136-138]. Алгоритм базируется на принципах отбора и наследования, используемых живой природой в процессе эволюции. Ввиду схожести принципов обработки информации, в рамках применения этого алгоритма используются следующие понятия, аналогичные по своему смыслу используемым в биологии:

*Хромосома* – число, кодирующее подбираемый параметр, т.е. содержащее часть информации об одном из решений задачи.

*Индивидуум* – частное решение, состоящее из совокупности хромосом.

*Популяция* – набор индивидуумов.

*Скращивание* - обмен частью генетической информации двух индивидуумов (родителей), в результате которого возникает новый индивидуум (потомок), несущий в себе информацию, унаследованную от своих родителей.

*Мутация* – случайное изменение значений некоторого числа хромосом индивидуума на другие значения.

Конечной целью оптимизации является достижение оптимального значения целевой функции (функции оценки). Чем лучше значение целевой функции для конкретного индивидуума (частного

решения), тем выше вероятность его выживания и передачи генетической информации потомкам в процессе участия в размножении (скрещивания).

Алгоритм ГА выглядит следующим образом:

1. Создание начальной популяции. На данном этапе случайным образом создается заданное количество частных решений (индивидуумов).
2. Скрещивание индивидуумов – для каждого частного решения вероятность участия в скрещивании пропорциональна его качеству, определяемому значением целевой функции.
3. Добавление с небольшой вероятностью случайной мутации к индивидууму-потомку после скрещивания. Это необходимо для того, чтобы вносить возмущения в полученные решения, что увеличивает для алгоритма вероятность избежать «застывания» в локальных экстремумах и попасть в глобальный.
4. Помещение полученного индивидуума-потомка в популяцию нового поколения. Если популяция ещё не заполнена, то переход к п.2, иначе к п.5.
5. Уничтожение популяции предыдущего поколения полностью и переход к генерации нового поколения посредством отбора, скрещивания и мутаций (п.2).

К преимуществам этого метода можно отнести то, что ГА достаточно просты в реализации, относительно устойчивы к попаданию в локальный оптимум (за счет мутации и скрещивания) и не требуют ни какой априорной информации о поведении функции, ни её дифференцируемости. К недостаткам можно отнести то, что поиск глобального оптимума производится существенно медленнее по сравнению, например, с локально-градиентными методами, т.к. требует во много раз большего числа вычисления значения целевой функции (что в большинстве случаев является самой медленной частью алгоритма). Поэтому часто ГА используют в сочетании с локально-градиентными методами: обнаружение области глобального оптимума осуществляется ГА, а непосредственно поиск глобального оптимума – локально-градиентными методами.

### **1.7.2. Искусственные нейронные сети**

Искусственная нейронная сеть (ИНС) по своему построению аналогична сети биологических нейронов. Базовым элементом ИНС является формальный нейрон, представляющий собой с математической точки зрения взвешенный сумматор (Рис. 25(а)). На вход нейрона подается информация (входные признаки), которая после нелинейного преобразования поступает на

единственный выход нейрона. Создавая различные соединения нейронов (то есть определяя топологию соединения), можно получить нейронную сеть различных архитектур. Наиболее часто используется так называемый многослойный персептрон (МСП) (Рис 1.22(б)).

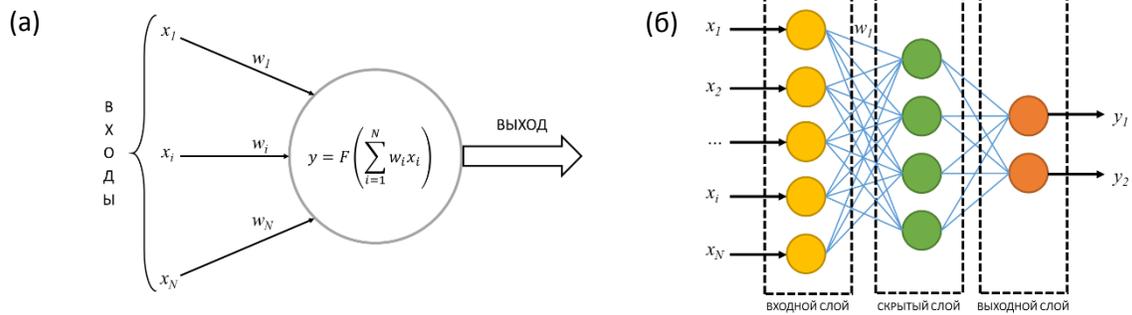


Рис. 25. Схематические изображения искусственного нейрона (а) и персептрона с одним скрытым слоем (б).

Входной слой персептрона используется для ввода информации, обрабатываемой впоследствии следующими слоями. При использовании ИНС для решения спектроскопических задач на входной слой подается спектр, при этом каждому каналу спектра соответствует один нейрон во входном слое. Последний слой МСП называется выходным и служит для вывода результата работы всей ИНС. Количество нейронов в выходном слое равно количеству параметров, определяемых нейронной сетью. Между входным и выходным слоями находятся один или несколько скрытых слоев, количество нейронов в каждом из них определяется сложностью решаемой задачи и подбирается индивидуально для каждой задачи (Рис. 25). Персептрон относится к числу архитектур, обучаемых с учителем, то есть необходимым условием корректной работы сети является наличие массива данных, для которых известны правильные ответы. Весь массив данных разбивается на три набора данных: тренировочный, валидационный и экзаменационный. Тренировочный набор служит для тренировки нейронной сети. Валидационный – набор для оценки степени натренированности сети. Валидационный набор не должен иметь общих примеров с тренировочным набором. Обучение сети прекращают, когда в течение заданного количества эпох средняя ошибка сети на валидационном наборе не убывает. Это необходимо для того, чтобы предотвратить запоминание сетью шумов, содержащихся в тренировочном наборе данных, - так называемое “переучивание” сети. Для оценки точности результата при различном уровне шума во входных данных используются экзаменационные наборы данных с добавлением шума соответствующего уровня, предъявляемые натренированной сети.

При работе с ИНС можно выделить несколько этапов:

- 1) Обучение нейронной сети. Для этого этапа используются известные примеры, при предъявлении которых происходит подстройка весовых коэффициентов  $w_i$  ИНС таким образом, чтобы ошибка на выходе сети была наименьшей.
- 2) Оценка натренированности сети проводится на валидационном наборе известных примеров. Этот этап необходим для того, чтобы избежать возможного переучивания сети.
- 3) Предъявление ИНС известных примеров (экзаменационный набор) для определения ошибки ответа – погрешности определения искомой величины.
- 4) Использование ИНС на новых данных с неизвестными ответами для определения значений искомых параметров.

После обучения сети требуется понять, насколько качественно она обучилась. Применяя сеть или к различным наборам, или ко всем примерам сразу, определяют разницу между рассчитанными значениями на выходных нейронах и ожидаемыми. Для такой оценки обычно используются такие показатели, как

$$\text{- средняя абсолютная ошибка } \overline{|\Delta y|} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |d_n - y_n|$$

$$\text{- коэффициент множественной детерминации } R^2 = 1 - \frac{\sum_{n=1}^N (d_n - y_n)^2}{\sum_{n=1}^N (\bar{y} - y_n)^2},$$

где  $y_n$  – полученное значение,  $d_n$  – ожидаемое значение,  $\bar{y}$  – среднее значение полученных ответов,  $N$  – количество примеров.

Коэффициент множественной детерминации является долей дисперсии зависимой переменной, объясняемой рассматриваемой моделью зависимости, то есть объясняющими переменными. Таким образом, сеть обучилась тем лучше, чем меньше средняя абсолютная ошибка и чем коэффициент детерминации ближе к 1.

При работе с ИНС можно выделить три основных подхода [139]:

- «От модели»
- Квазимодельный
- «От эксперимента»

В подходе "от модели" для получения данных, на которых обучается ИНС, применяется имеющаяся аналитическая или вычислительная модель решения прямой задачи. При наличии такой модели появляется возможность обеспечить требуемую представительность всех необходимых для обучения ИНС наборов данных. Однако качество решения при этом напрямую

зависит от адекватности используемой модели. В ситуациях, когда построение адекватной модели невозможно из-за сложности описания объекта, данный подход неприменим.

В *"квазимодельном"* подходе для получения представительных наборов данных используются смоделированные спектры. В отличие от подхода *"от модели"*, в котором данные рассчитываются в соответствии с известным аналитическим выражением для описания спектров, в *"квазимодельном"* подходе сначала строится параметрическая *"квазимодель"* для описания спектров на базе небольшого набора экспериментальных данных, а затем с ее помощью проводится расчет массива данных. Очевидно, что таким образом можно получить достаточное количество примеров и обеспечить хорошую представительность наборов для обучения ИНС в отличие от подхода *"от эксперимента"*. Однако точность решения обратной задачи в *"квазимодельном"* подходе в большой степени зависит от двух факторов: 1) от ошибки квазимодели, используемой для расчета (т.е. от соответствия выбранной или построенной расчетной квазимодели реальности); 2) от различия шумов в расчетных примерах и реальных шумов в экспериментально полученных данных.

В подходе *"от эксперимента"* для обучения нейронной сети используются только экспериментальные данные. Недостатком этого подхода является невысокая представительность наборов, так как получение очень большого объема экспериментального материала – это достаточно трудоемкая работа. Основные преимущества подхода: при обучении нейронной сети непосредственно на экспериментальных данных учитываются все молекулярные взаимодействия; сеть тренируется на реальных аппаратурных шумах, что повышает точность решения обратных задач.

Дополнительная трудность в работе со спектроскопическими данными возникает за счет неблагоприятного соотношения размерности пространства входных признаков и количества примеров в тренировочном наборе. Число входных признаков в спектроскопических задачах составляет сотни, а иногда и тысячи значений, а количество примеров соответствует количеству зарегистрированных спектров, число которых в случае применения подхода «от эксперимента» ограничено. Для решения этой проблемы в рамках настоящей работы были предприняты методы уменьшения размерности пространства входных признаков: агрегация каналов и выделение наиболее существенных признаков.

### 1.7.3. Понижение размерности пространства входных данных

Как было сказано выше, существует ряд методов понижения размерности пространства входных данных. В диссертационной работе для отбора существенных входных признаков использовались следующие критерии:

- 1). Кросс-корреляция (КК). Для выявления существенных признаков этой процедурой отбора вычислялись величины кросс-корреляции значений для каждого спектрального канала со значениями каждого выхода. Входные признаки, считающиеся важными для каждого выхода, определялись отдельно, а затем все признаки, значимые хотя бы для одного выхода, использовались для последующей тренировки персептрона.
- 2). Кросс-энтропия (КЭ). Для выявления существенных признаков этой процедурой отбора вычислялись величины кросс-энтропии значений для каждого спектрального канала со значениями каждого выхода. Входные признаки, считающиеся важными для каждого выхода, определялись отдельно, а затем все признаки, значимые хотя бы для одного выхода, использовались для последующей тренировки персептрона.
- 3). Стандартное отклонение (СТО). Для выявления существенных признаков этой процедурой отбора вычислялась величина стандартного отклонения значений для каждого спектрального канала по всем примерам, пропорциональное количеству информации в данном канале. Входные признаки, считающиеся важными для каждого выхода, определялись отдельно, а затем все признаки, значимые хотя бы для одного выхода, использовались для последующей тренировки персептрона.
- 4). Анализ весов нейронной сети (АВНС). Этот метод отбора существенных признаков основан на значениях весов нейронных сетей, натренированных на полном наборе данных. В основе метода лежит тот факт, что существенный входной признак обычно имеет большие величины весовых коэффициентов хотя бы для некоторых из связей, соединяющих его с выходным слоем. Для каждого вещества определение важных каналов производилось отдельно следующим образом: на полном наборе данных тренировались несколько идентичных нейронных сетей, различающихся начальными значениями весов. Далее производился анализ весов каждой из полученных нейронных сетей, и для каждой из них вычислялось средняя по всем каналам величина показателя существенности, а также его стандартное отклонение. Если величина показателя существенности в данном канале превышала значение «среднее + k стандартных отклонений», то канал признавался

важным. Далее, если канал был значимым хотя бы для трех сетей из пяти, то канал полагался важным. В зависимости от параметра  $k$  можно было варьировать количество значимых каналов.

5). Агрегации по спектральным каналам. Агрегация проводилась путем замены значений интенсивности  $n$  спектральных каналов на среднее арифметическое значение интенсивности в этих каналах (Рис. 26).

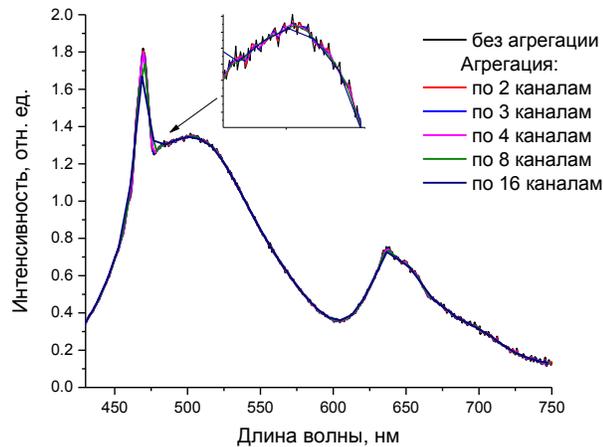


Рис. 26. Спектр флуоресценции яичного белка и спектры, полученные при агрегации каналов исходного спектра. На врезке показан увеличенный фрагмент спектра.

В работе [140] было проведено сравнение некоторых подходов, а именно отбора существенных входных признаков на основе кросс-корреляции, кросс-энтропии, а также выделения существенных признаков путём агрегации каналов, и было показано, что наибольшая точность решения обратной задачи получается при использовании агрегации спектральных каналов, что эквивалентно «загрублению» спектральной чувствительности прибора.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей главе описываются материалы, аппаратура и методы, используемые в ходе выполнения диссертационной работы.

### §2.1. Материалы

#### 2.1.1. Детонационные наноалмазы

##### *1). Детонационные наноалмазы с полифункциональной поверхностью (ДНА-поли, 10 нм)*

ДНА были синтезированы путем взрыва тринитротолуола и циклотриметилентринитрамина в газовой охлаждающей среде. Наноалмазы были отделены от неалмазной фазы углерода при помощи смеси серной и азотной кислот с добавлением олеата натрия (работа выполнялась на НПО Алтай, Россия). Поверхность полученного таким образом образца полифункциональна – присутствуют карбонильные группы, эфиры, гидроксиды и тд. Полученный материал измельчался и фракционировался по размерам [141].

Образцы 2) – 4) были получены в результате определенной обработки и функционализации поверхности ДНА-поли различными группами. Функционализирование поверхностей наночастиц проводилось в Международном Технологическом Центре (Ролли, Северная Каролина, США).

##### *2). Детонационные наноалмазы с карбоксилированной поверхностью (ДНА-СООН, 10 нм)*

Поверхность выделенных частиц ДНА-поли с размером 10 нм функционализировалась карбоксильными группами посредством обработки ДНА на воздухе при 420°C в течение 1 часа. Работа выполнялась на НПО Алтай (Россия) [142].

##### *3). Детонационные наноалмазы с гидроксидированной поверхностью (ДНА-ОН, 10 нм)*

ДНА-ОН получались из ДНА-СООН 10 нм путем обработки аланатом лития при повышенной температуре с использованием обратного холодильника. Затем реакционную смесь гасили 6 М HCl до прекращения выделения газообразного водорода. В дальнейшем ДНА многократно промывали деионизированной водой до тех пор, пока не было получено значение pH в диапазоне 5-6 [142].

##### *4). Детонационные наноалмазы с гидрогенизированной поверхностью (ДНА-Н, 10-11 нм)*

Гидрогенизированные НА получались из карбоксилированных ДНА, осажденных в кварцевой трубке и вставленных в плазменный источник нисходящего потока. Поток высокочистого водорода (10 см<sup>3</sup>/мин) при постоянном давлении в 12.5 мбар использовался для обработки

поверхности ДНА. Плазма генерировалась в кварцевой трубке, температура НА во время обработки оценивалась в 800-850 °С. ДНА подвергались воздействию водородной плазмы в течение 10 минут, что приводило к гидрогенезации поверхности. Полученные ДНА диспергировали в воде и обрабатывали в ультразвуковой бане в течение 1 часа. Фракционирование осуществлялось путем центрифугирования полученного материала. В результате была получена водная суспензия ДНА-Н с концентрацией 5.3 г/л [141].

*5). Детонационные наноалмазы с карбоксилированной поверхностью и размером 5 нм (ДНА-СООН 5 нм)*

Очистка этих образцов от неалмазной фазы углерода проводилась с использованием раствора хромового ангидрида в серной кислоте, смеси перекиси водорода и гидроксида натрия. Дальнейшая обработка полученного материала заключалась в очистке с использованием ион-обменных смол и фракционировании. Протокол функционализации полученных наночастиц карбоксильными группами аналогичен протоколу для ДНА-СООН 10 нм [143].

*6). Детонационные наноалмазы с полифункциональной поверхностью I6 (25 нм)*

Образцы ДНА I6 получались путем детонации смеси тринитротолуола с 1,3,5-тринитро-1,3,5-с-триазином в водной среде ("Новые технологии", Челябинск, Россия). ДНА очищались от неалмазного углерода в саже с использованием жидких или газофазных окислителей: посредством обработки раствором хромового ангидрида в серной кислоте с последующей обработкой в  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$  и ионообменных смолах и фракционированием (Международный Технологический Центр, Ролли, Северная Каролина, США). У обработанного таким способом НА I6 разнообразный набор поверхностных групп: карбонильные  $\text{C}=\text{O}$ , эфиры (метилловый  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_3$ , диметилловый  $\text{CH}_3\text{OCH}_3$ ), гидроксиды  $\text{M}(\text{OH})_n$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ . [144].

*7). Детонационные наноалмазы с карбоксилированной поверхностью I6-СООН (25 нм)*

Образцы были получены из ДНА I6 путем карбоксилизации поверхности. ДНА обжигались на воздухе при 420°C в течение 1 часа. [144].

*8). Детонационные наноалмазы G01*

Наноалмазы G01 (производитель PlasmaChem) были получены в результате контролируемого сухого детонационного синтеза с последующим очищением. Объемная плотность образца составляла 0.69 г/см<sup>3</sup>, средний размер кластера около 4 нм. [145].

### 2.1.2. Оксид графена

Оксид графена является продуктом химических реакций интеркаляции, расслоения и окисления нанографитовых пластин размером 400 нм (Nanostructured & Amorphous Materials Inc., Houston, TX) в смеси серной и азотной кислот в соотношении 3:1. После выпаривания кислот из супернатанта (при 350°C) осадок ОГ промывался и диспергировался в деионизованной воде для получения водной суспензии ОГ с определенной концентрацией [145].

### 2.1.3. Прочие материалы

Для проведения экспериментов и приготовления растворов и суспензий использовалась бидистиллированная деионизованная вода (система очистки воды Millipore Milli-Q, проводимость 0.6 мкСм/м). Растворители (этанол, метанол, изопропанол – производитель Merck) и азотистые основания (производитель SERVA), используемые в экспериментах, имели классификацию reagent (препарат реактивной частоты). Соли неорганических солей – не хуже, чем ЧДА (производитель БаумЛюкс).

## §2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния света

Исследования по спектроскопии КР света в жидких средах проводились на лазерном КР спектрометре, принципиальная схема которого показана на Рис. 27. В качестве источника возбуждения использовался аргоновый лазер ЛГ-106-М4 ( $\lambda_{\text{возб}}=488$  нм, выходная мощность 450 мВт), часть излучения которого (5%), выделенная при помощи отводной пластинки, использовалась для контроля мощности лазера. Контроль мощности осуществлялся измерителем мощности Ophir 3-AP. Была собрана 90° схема, в которой зондирование образца в кювете проводилось через дно кюветы, а рассеянное под углом 90° излучение с помощью системы линз собиралось на входной щели монохроматора.

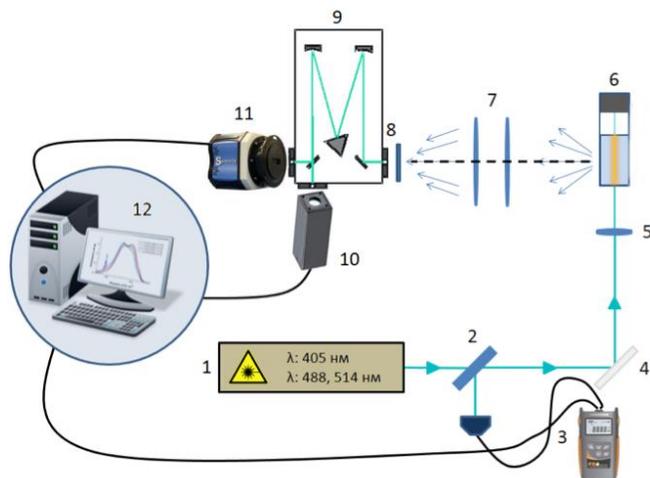


Рис. 27. Принципиальная схема экспериментальной установки для получения спектров КР и флуоресценции. 1) источник излучения, 2) светоотражающая пластинка, 3) измеритель мощности, 4) поворотное зеркало, 5) фокусирующая линза, 6) кварцевая кювета с образцом, 7) система светосбора, 8) входная щель монохроматора, 9) монохроматор, 10) ФЭУ, 11) CCD камера, 12) персональный компьютер.

Для регистрации спектров использовался монохроматор Acton 2500i (фокусное расстояние 500 мм), собранный по схеме Черни-Тернера и оснащенный двумя голографическими решетками, имеющими 900 и 1800 штр/мм на своей поверхности. Возможно использование монохроматора в двух режимах регистрации – параллельной (регистрация с помощью CCD камеры) и последовательной (с помощью ФЭУ).

В режиме параллельной регистрации в качестве детектора излучения использовалась CCD камера Syncerity 1024\*128 VIUV фирмы Jobin Yvon. Ширина входной щели монохроматора составляла 25 мкм, что обеспечивало практическое разрешение  $2 \text{ см}^{-1}$  и  $4 \text{ см}^{-1}$  при использовании решеток с 1800 штр/мм и 900 штр/мм, соответственно. Квантовая эффективность камеры в видимом диапазоне составляет приблизительно 75%. Время накопления спектров изменялось в зависимости от поставленной задачи: например, спектры КР валентных колебаний ОН групп снимались в режиме 10 накоплений по 5 секунд с последующим усреднением, а область низкочастотных колебаний для азотистых оснований и цепочек ДНК снималась в режиме 15 накоплений по 40 секунд. Выбор различных времен накопления обуславливается различной интенсивностью сигнала КР от различных образцов.

Исследования по конфокальной спектроскопии комбинационного рассеяния образцов проводились с использованием лазерного конфокального спектрометра LabRam HR-800 (Рис. 28). В качестве источника возбуждения сигнала КР использовался твердотельный лазер с диодной накачкой (длина волны 473 нм, диапазон регулировки мощности 50-500 мВт). Использование конфокального объектива позволяло фокусировать излучение лазера в область с характерным размером порядка 1-2 микрометра. Система регистрации спектров состояла из монохроматора (решетки 600 и 1800 штр/мм) и CCD камеры. Режим регистрации спектров – усреднение по 3 спектрам по 30 секунд. Автор работы выражает глубокую признательность заведующему лаборатории Углеродной нанофотоники ИОФ РАН И.И. Власову за предоставленную возможность использования оборудования.

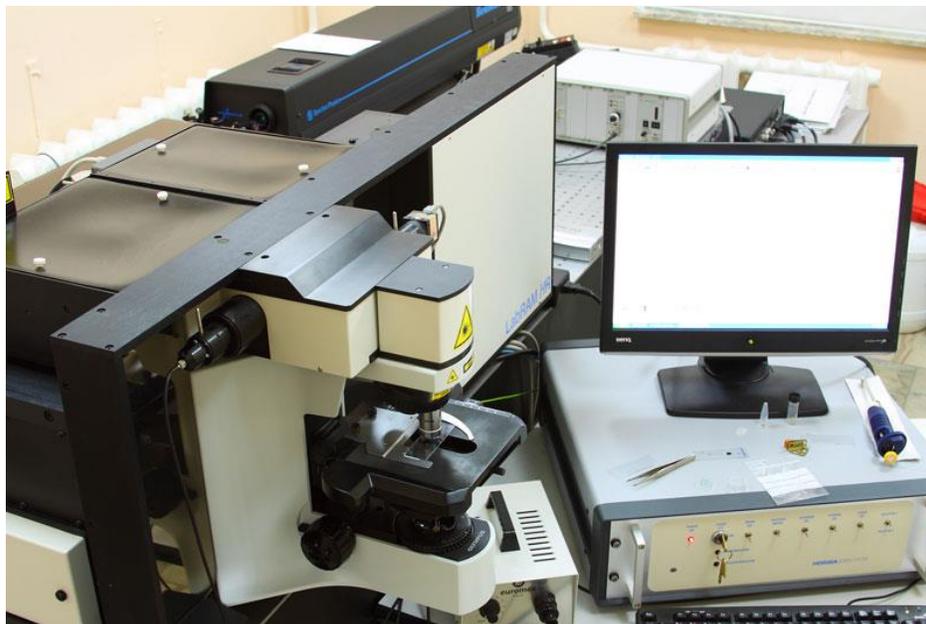


Рис. 28. Фотография лазерного конфокального КР спектрометра Horiba Jobin Yvon LabRAM HR800.

Все полученные спектры КР образцов корректировались на чувствительность детектора. Предобработка спектров КР суспензий наночастиц заключалась в выделении сигнала КР растворителя и нормировке спектра на интегральную интенсивность реперного сигнала КР растворителя.

### **2.2.2. Лазерная фотолуминесцентная спектроскопия**

Исследования по лазерной флуориметрии образцов проводились на лазерных спектрометрах, описанных в разделе 2.2.1. (Рис. 27).

Для возбуждения фотолюминесценции ДНА и ОГ в качестве источника излучения использовался диодный лазер ( $\lambda_{\text{возб}}=405$  нм, выходная мощность – до 200 мВт). В режиме последовательной регистрации в качестве детектора излучения использовался ФЭУ Hamamatsu H-8259-01, работающий в режиме счета фотонов. Чувствительность ФЭУ в видимом диапазоне составляет приблизительно 10 фотонов/отсчет. Ширина входной щели монохроматора составляла 250 мкм, что позволило получить практическое разрешение 0.5 нм при регистрации спектров флуоресценции (при использовании решетки 1800 штр/мм). Управление режимом работы ФЭУ и поворот решетки осуществлялись с помощью управляющего модуля Spectra-Hub и компьютера.

Помимо вышеописанной экспериментальной установки, для регистрации спектров фотолюминесценции использовалась система регистрации Thorlabs CSS200, позволяющая производить регистрацию спектров в диапазоне 200-1000 нм с разрешением 2 нм. Для подавления упругого рассеяния использовались узкополосный блокирующий фильтр Edmund Optics.

Все полученные спектры фотолюминесценции образцов корректировались на чувствительность детектора. Предобработка спектров фотолюминесценции заключалась в вычитании фонового сигнала, выделении сигнала КР растворителя и нормировке спектра на интегральную интенсивность реперного сигнала КР растворителя.

### **2.2.3. Спектроскопия ИК поглощения**

Для характеристики и исследования поверхности углеродных наночастиц использовалась спектроскопия ИК поглощения. Работы проводились на двух ИК-спектрометрах.

- ИК спектрометр Perkin Elmer Spectrum One, сопряженный с микроскопом Olympus AutoImage. Спектры ИК поглощения суспензий УНЧ регистрировались в схеме «на отражение» в области  $600\text{-}6000\text{ см}^{-1}$ . Образец представлял собой каплю осадка суспензий УНЧ, которая наносилась на подложку из алюминиевой фольги и высушивалась.

- Для регистрации спектров ИК поглощения суспензий УНЧ использовался ИК спектрометр Varian 640-IR FT-IR, оборудованный специальной приставкой, работающей по принципу нарушения полного внутреннего отражения. Спектры ИК поглощения суспензий УНЧ регистрировались в области  $600\text{-}6000\text{ см}^{-1}$ , спектральное разрешение составляло  $4\text{ см}^{-1}$ . При использовании этого прибора образец представлял собой каплю суспензии, помещаемую на поверхность кристалла ZnSe.

Как видно из вышенаписанного описания экспериментальных установок для ИК спектроскопии, прибор Perkin Elmer Spectrum One позволяет получить пространственное разрешение в 100

микрометров, в то время как регистрация спектров ИК на приборе Varian 640-IR FT-IR происходит со всего объема образца одновременно – то есть с поверхности порядка 13 мм<sup>2</sup>. Таким образом, в отсутствие потенциальной неоднородности образца (например, для характеристики суспензий и порошков УНЧ) лучше использовать прибор Varian 640-IR FT-IR ввиду отсутствия дополнительного этапа пробоподготовки.

### **Спектрофотометрия**

Для корректировки спектров КР и флуоресценции образцов, а также для определения концентраций различных веществ в растворах и суспензиях использовалась спектрофотометрия.

Для получения спектров оптического поглощения суспензий УНЧ использовались следующие приборы: двухлучевые спектрофотометры Lambda 25 фирмы Perkin Elmer, UV-1800 фирмы Shimadzu и однолучевой спектрофотометр Unico 2803, позволяющие регистрировать спектры оптического поглощения в диапазоне 190-1100 нм со спектральным разрешением 1 нм.

#### **2.2.4. Лазерная корреляционная спектроскопия**

Для определения размеров агрегатов наночастиц в жидких средах использовался метод динамического светорассеяния (ДСР), реализованный на приборе Correlator Goniometer System ALV-CGS-5000/6010 (Германия). Система оснащена He-Ne-лазером (длина волны 632.8 нм; мощность 20 мВт). Стеклокювета с образцом помещалась в ванночку с толуолом для избегания отражений от стенок кюветы.

Суть метода лазерной корреляционной спектроскопии заключается в исследовании квазиупругого рассеяния света на флуктуациях локального изменения показателя преломления среды. Временная автокорреляционная функция интенсивности рассеянного света  $G^{(2)}(t)$  определяет характерные временные масштабы, при которых положение рассеивающих центров зависит от их предыдущего положения, то есть на которых движение этих центров коррелировано.

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t - \tau) dt$$

где  $I$  – интенсивность падающего излучения в момент времени  $t$ ,  $\tau$  – время задержки,  $T$  – время накопления корреляционной функции.

Из корреляционной функции можно получить информацию о коэффициенте взаимной трансляционной диффузии  $D$ , который можно использовать для определения гидродинамического радиуса частиц  $R_h$ .

Для системы монодисперсных частиц, размер которых меньше длины волны света справедливы соотношения:

$$|g_1(t)| = e^{-t/\tau} = e^{-\Gamma t} = e^{-Dq^2 t}$$

$$|g^{(2)}(t)| = e^{-2t/\tau} = e^{-2\Gamma t},$$

где  $g^{(2)}(t)$  - нормированная временная автокорреляционная функция интенсивностей рассеянного света,  $\tau$  – время релаксации.

Трансляционный коэффициент диффузии вычисляется при помощи следующего соотношения:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma} = \frac{1}{Dq^2},$$

где  $q$  – волновой вектор рассеяния:  $q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$ ,  $\tau$  – время релаксации,  $D$  – коэффициент диффузии.

Гидродинамический радиус ( $R_h$ ) частицы вычисляется из диффузионного коэффициента при помощи соотношения Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_h}$$

где  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – температура,  $\eta_0$  – вязкость растворителя.

Гидродинамический радиус частицы  $R_h$  – это радиус непроницаемой сферы, невзаимодействующей с другими сферами и движущейся с тем же коэффициентом диффузии, что и исследуемая частица. Гидродинамический радиус отличается от радиуса инерции из-за гидродинамических взаимодействий между сегментами в макромолекуле и межмолекулярных взаимодействий, и в общем случае больше, чем действительный размер измеряемой частицы.

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D} = \frac{4kT\pi n_0(1 - \cos(\theta))\tau}{3\lambda_0^2 \eta_0}$$

Для численной обработки полученных корреляционных функций был использован программный пакет CONTIN.

### 2.2.5. Пикосекундная фотолюминесцентная спектроскопия с временным разрешением

Для исследования кинетики фотолюминесценции УНЧ использовался прибор Picoquant Microtime 200, представляющий собой конфокальный флуоресцентный микроскоп, оснащенный приставкой для временного разрешения сигнала. Для возбуждения фотолюминесценции УНЧ использовался импульсный лазер ( $\lambda_{\text{возб}}=376$  нм, длительность импульса 15 пс). Регистрация сигнала фотолюминесценции проводилась в нескольких окнах в районе 510, 570 нм шириной 20 нм.

При рассмотрении ансамбля одинаковых фотолюминесцирующих молекул частота перехода из возбужденного состояния в невозбужденное пропорциональна числу молекул, находящихся в возбужденном состоянии:

$$\frac{dn}{dt} = -k_{\phi}n,$$

где  $k_{\phi}$  – частота переходов.

Решение этого уравнения можно записать в следующем виде:

$$n(t) = n_0 e^{-t/\tau},$$

где  $\tau=(k_{\phi})^{-1}$  – время жизни фотолюминесценции

Таким образом, имея возможность регистрировать спектры тушения фотолюминесценции и аппроксимируя полученные зависимости экспоненциальными, можно определить значение времени жизни фотолюминесценции.

### 2.2.6. Микроскопия на основе подавления спонтанного испускания

Для исследования и получения изображений углеродных наночастиц в объеме клеток использовалась микроскопия на основе подавления спонтанного испускания (Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED). Этот метод был реализован с помощью комплекса Abberior STED (Рис. 29). Автор работы выражает благодарность руководителю Лаборатории фармацевтики университета Або (Турку, Финляндия) профессору Дж. Розенхольм за предоставленную возможность работы с прибором. Для получения сигнала фотолюминесценции исследуемых частиц использовался аргоновый лазер ( $\lambda_{\text{возб}}=488$  нм), а для стимулирования излучательных переходов в веществе по краям фокусного пятна использовался импульсный лазер ( $\lambda=775$  нм, длительность импульса 200 пс, частота повторения – 4 кГц). Регистрация проводилась при помощи лавинного фотодиода.

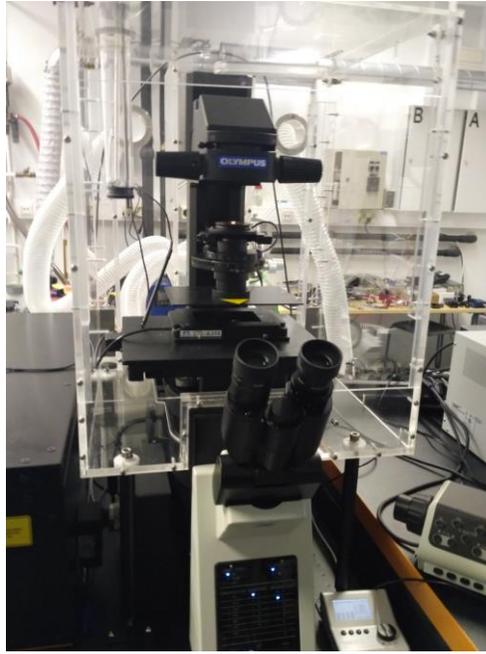


Рис. 29. Фотография STED-микроскопа Abberior STED в лаборатории БиоСити университета Або, Турку, Финляндия.

Рассмотрим основные принципы метода. На Рис. 30 изображена диаграмма Яблонского, типичная для флуорофора.  $S_0$  и  $S_1$  – основное и возбужденное состояния соответственно,  $L_i$  – колебательные уровни.

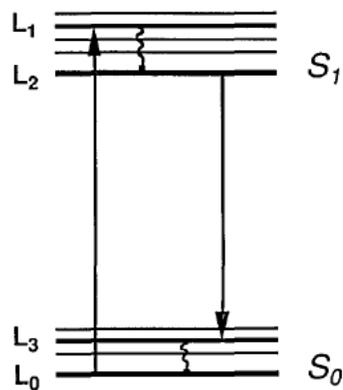


Рис. 30. Упрощенная диаграмма Яблонского.

Распределение интенсивности света в фокальной плоскости описывается выражением:

$$h_{\text{возб}}(\nu) \sim \left| \frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right|^2,$$

где  $J_1$  – функция Бесселя первого порядка,  $v=2\pi rNA/\lambda_{возб}$ ,  $NA$  – числовая апертура,  $r$  – расстояние до фокуса,  $\lambda_{возб}$  – длина волны возбуждающего излучения. Фактически, вышеописанное описывает процессы, наблюдаемые при использовании конфокальной микроскопии. Один из способов уменьшения пространственного разрешения  $h_{возб}(v)$  заключается в ограничении флуоресценции внешних областей  $h_{возб}(v)$ . Для этого используется второй STED лазер (Рис. 31), который стимулирует переходы  $L_2 \rightarrow L_3$ , вынужденным излучением истощая возбужденное состояние до появления флуоресценции. С помощью спиральной фазовой маски получают кольцообразное (в форме «пончика» (англ. *doughnut*)) изображение STED лазера в фокальной плоскости. Таким образом, сигнал флуоресценции с периферии подавляется за счет вынужденного излучения (в пространственной области перекрытия двух лазеров) и только внутренняя область основного максимума  $h_{возб}(v)$  дает вклад в регистрируемый сигнал флуоресценции. Важно отметить, что не любая пара лазерных источников может быть использована для реализации STED-микроскопии. При выборе STED-лазера нужно учитывать то, что, во-первых, вынужденное излучение существенным образом зависит от длины волны и, во-вторых, облучение STED-лазером может вызывать и другие переходы, например, переходы из основного состояния в возбужденное. Даже с учетом того, что, как правило, стараются подобрать такую пару лазеров, при которой  $\lambda_{STED}$  не пересекается со спектром возбуждения флуоресценции исследуемого образца, при использовании мощного STED-лазера возможна ситуация, при которой высокая интенсивность сигнала компенсирует малое сечение возбуждения на этой длине волны, что в свою очередь может привести к появлению фона на изображении. Длина волны STED-лазера выбирается таким образом, чтобы она была максимально дальше в красной области (Рис. 31), таким образом, чтобы найти баланс между минимизацией переходов  $S_0 \rightarrow S_1$  и максимизацией переходов  $L_2 \rightarrow L_3$ . То есть, STED лазер выбирается так, чтобы с одной стороны, не попасть в спектр возбуждения фотолюминесценции исследуемого объекта, и, с другой стороны, так, чтобы попасть в спектр испускания фотолюминесценции образца.

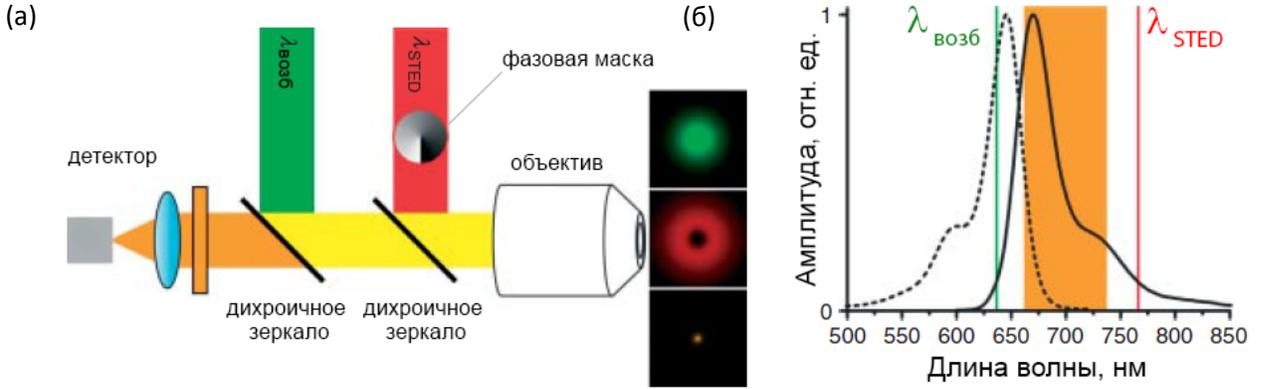


Рис. 31. Принципиальная схема STED – микроскопа (а). Спектр возбуждения флуоресценции (пунктирная линия), спектр испускания флуоресценции (сплошная линия), оранжевая закрапка – спектральное окно регистрации флуоресценции (б).

Для такой системы можно записать систему уравнений, описывающую временное и пространственное поведение системы:

$$\begin{aligned} \frac{dn_0}{dt} &= h_{\text{возб}}\sigma_{01}(n_1 - n_0) + \frac{1}{\tau_{\text{колеб}}}n_3, \\ \frac{dn_1}{dt} &= h_{\text{возб}}\sigma_{01}(n_0 - n_1) - \frac{1}{\tau_{\text{колеб}}}n_1, \\ \frac{dn_2}{dt} &= \frac{1}{\tau_{\text{колеб}}}n_1 + h_{\text{STED}}\sigma_{23}(n_3 - n_2) - \left(\frac{1}{\tau_{\text{флуор}}} + Q\right)n_2, \\ \frac{dn_3}{dt} &= h_{\text{STED}}\sigma_{23}(n_2 - n_3) + \left(\frac{1}{\tau_{\text{флуор}}} + Q\right)n_2 - \frac{1}{\tau_{\text{колеб}}}n_3, \end{aligned}$$

С условиями:

$$\sum_i n_i = 1,$$

$$n_0(t = 0) = 1$$

$\tau_{\text{флуор}}$  – среднее время флуоресценции (типичное время  $\sim 2$  нс),  $\tau_{\text{колеб}}$  – среднее время колебательной релаксации (типичное время  $\sim 1-5$  пс) для переходов  $L_1 \rightarrow L_2$  и  $L_3 \rightarrow L_0$ .  $\sigma_{01}h_{\text{возб}}$  – скоростной коэффициент поглощения,  $\sigma_{23}h_{\text{STED}}$  – скоростной коэффициент вынужденного излучения  $L_2 \rightarrow L_3$ .  $\sigma_{01}$  и  $\sigma_{23}$  – сечения поглощения  $L_0 \rightarrow L_1$  и  $L_3 \rightarrow L_2$  соответственно (типичные значения  $10^{-16}$  и  $10^{-17}$  см<sup>2</sup> соответственно).  $Q$  – скорость тушения (характерное время  $10^8$  с<sup>-1</sup>). Как видно из вышеуказанных оценок, среднее время спонтанного перехода на три порядка больше, чем среднее время колебательной релаксации. Ввиду того, что вышеописанная система имеет динамический

характер, для реализации метода выгодно использовать импульсный источник, с импульсами значительно короче, чем среднее время жизни на уровне  $L_2$ , то есть с длиной импульса в пикосекундном диапазоне.

В результате применения этого метода получается преодолеть дифракционный предел:

$$D = \frac{\lambda}{2NA},$$

где  $\lambda$  – длина волны,  $NA$  – числовая апертура.

Дифракционный предел для STED микроскопии определяется формулой:

$$D = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}},$$

где  $n$  – коэффициент отражения,  $I$  – интенсивность внутреннего пятна,  $I_{sat}$  – интенсивность насыщения, характерная для конкретного флуорофора ( $\sim 10 \text{ МВт} \cdot \text{см}^{-2}$ ).

### 2.2.7. Методы характеристики суспензий углеродных наночастиц

#### *Измерение квантового выхода флуоресценции УНЧ*

Измерение квантового выхода фотолюминесценции УНЧ проводилось методом эталонного красителя. Для определения абсолютного квантового выхода флуоресценции необходимо измерить число поглощенных и испускаемых фотонов во всей области частот с поправками на рассеянный свет, вторичное поглощение и т.д.

Площадь под кривой спектра флуоресценции пропорциональна числу испущенных фотонов флуоресценции, и можно воспользоваться соотношением:

$$\frac{F_2}{F_1} = \frac{\varphi_2}{\varphi_1} \cdot \frac{D_2}{D_1} \cdot \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2$$

где  $F_2$  и  $F_1$  – площади под кривыми спектров флуоресценции исследуемого и эталонного веществ,  $D_2$  и  $D_1$  – значения коэффициента оптического поглощения исследуемого и эталонного веществ на длине волны возбуждения флуоресценции,  $\varphi_2$  и  $\varphi_1$  – значения квантового выхода для исследуемого и эталонного веществ,  $n_1$  и  $n_2$  – значения показателя преломления среды, в которой находится исследуемое вещество и эталонное вещество.

Тогда, зная значение квантового выхода эталонного вещества  $\varphi_1$ , можно вычислить значение квантового выхода исследуемого вещества:

$$\varphi_2 = \frac{F_2}{F_1} \cdot \frac{D_1}{D_2} \cdot \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \cdot \varphi_1$$

В нашем случае в качестве эталона использовался разбавленный раствор (концентрация около  $10^{-6}$  М) красителя Родамина 6Ж в этаноле, квантовый выход для которого равен 0.95.

### *pH-метрия*

Для измерения водородного показателя водных суспензий использовался лабораторный ионометрический преобразователь Аквилон И-500, оснащенный рН электродом.

### *Дзета-сайзер*

Для определения значения дзета-потенциала наночастиц использовался прибор Malvern Zetasizer Nano.

В рассматриваемых суспензиях на границе раздела УНЧ-растворитель возникает двойной электрический слой (ДЭС), который представляет собой слой ионов, адсорбированных из раствора (то есть адсорбция молекул растворителя на поверхность наночастицы) или слой ионов, образовавшихся в результате полной или частичной диссоциации поверхностных соединений наночастиц (Рис. 32). Поверхность частицы, таким образом, приобретает поверхностный заряд, знак которого определяют ионы на поверхности наночастицы (потенциалопределяющий слой). Ионы противоположного знака, притягивающиеся к адсорбированным ионам, называют противоионами.

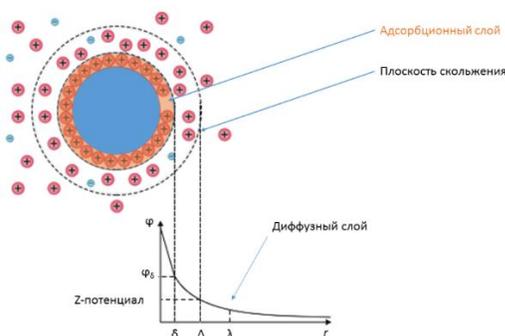


Рис. 32. Схематическое представление частицы и окружающих ее ионов для демонстрации последовательности слоев и поведение значения электрического потенциала в зависимости от расстояния от частицы.

Измерение дзета-потенциала суспензий используется для оценки стабильности коллоидных систем. Малое по модулю значение дзета-потенциала (меньше 20 мВ) характерно для систем с плохой устойчивостью – притяжение между частицами превышает отталкивание и частицы флокулируют/агрегируют.

## ГЛАВА 3. ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ С МОЛЕКУЛАМИ ОКРУЖЕНИЯ

В настоящей главе исследуются взаимодействия между молекулами окружения и УНЧ в различных растворителях методами лазерной спектроскопии. Знание этих взаимодействий критически важно не только для создания многофункционального наноагента, но и для создания устойчивых, стабильных суспензий УНЧ. Нет никаких сомнений в том, что без фундаментальных знаний о взаимодействиях между УНЧ и молекулами окружения невозможно эффективное применение УНЧ на практике.

### **§3.1. Взаимодействие детонационных наноалмазов с различной функционализацией поверхности с молекулами воды**

#### **3.1.1. Лазерная спектроскопия КР водных суспензий ДНА**

Исследование взаимодействий поверхностных групп ДНА с молекулами воды и влияния этих взаимодействий на водородные связи в суспензии проводилось с помощью лазерной спектроскопии КР. В качестве объектов исследования использовались ДНА с различной функционализацией поверхности:

- ДНА-поли
- ДНА-СООН 10 нм
- ДНА-ОН
- ДНА-Н

Были приготовлены водные суспензии ДНА в диапазоне изменения концентрации наночастиц от 0 до 5 г/л с шагом 0.2 г/л для ДНА-СООН, ДНА-ОН и ДНА-поли и с концентрациями 0-1 г/л с шагом 0.1 г/л для ДНА-Н.

С помощью лазерной корреляционной спектроскопии и дзета-сайзера были определены размеры агрегатов и дзета-потенциалы наночастиц в исследуемых суспензиях. Результаты характеристики образцов ДНА представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Результаты характеристики исследуемых водных суспензий ДНА.

Образец	Размер, нм*	Z-потенциал*, мВ*
ДНА-СООН 10 нм	10.9±1.1	-43±1
ДНА-ОН	11.2±1.6	31±1
ДНА-Н	12.2±1.4	29±1
ДНА-поли	11.5±2.7	38±1

\* - в скобках указано значение стандартного отклонения определяемой величины.

Как известно, валентная полоса ОН групп является весьма чувствительной к изменению межмолекулярных связей в воде, в первую очередь, к изменению силы водородных связей [146]. Поэтому для изучения влияния поверхностных групп ДНА на водородные связи в воде проводился анализ валентных полос ОН групп в исследованных суспензиях. Были получены спектры КР всех приготовленных суспензий ДНА в диапазоне от  $490\text{ см}^{-1}$  до  $8000\text{ см}^{-1}$  (Рис. 33). Регистрируемые спектры являются суперпозицией полос валентных ( $2800\text{ см}^{-1}$  -  $3800\text{ см}^{-1}$ ) и деформационных ( $1600\text{ см}^{-1}$  -  $1800\text{ см}^{-1}$ ) колебаний ОН-групп воды и полосы флуоресценции ДНА (см. Рис. 33).

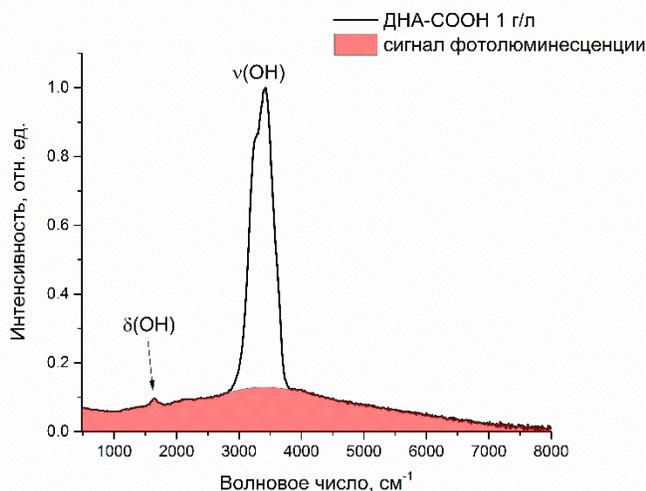


Рис. 33. Панорамный спектр КР и фотолуминесценции водной суспензии карбоксилированных ДНА.

Для выделения валентной полосы ОН из общего спектра вычитался сигнал флуоресценции ДНА, аппроксимируемый полиномиальной функцией (Рис. 33). Выделенные полосы валентных колебаний ОН групп воды в водных суспензиях ДНА с различной функционализацией

поверхности с наибольшей концентрацией, скорректированные на поглощение и нормированные на максимум полосы, показаны на Рис. 34.

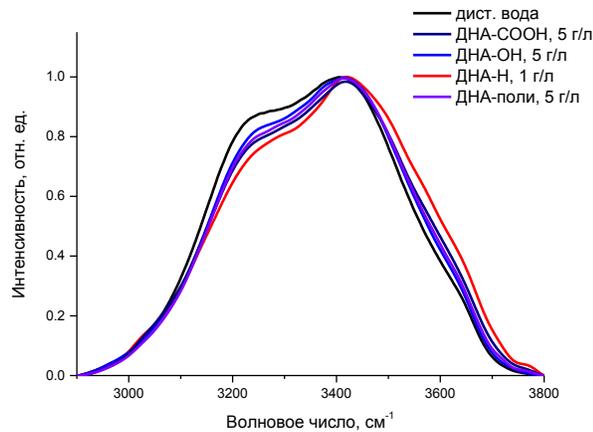


Рис. 34. Валентные полосы КР воды в водных суспензиях ДНА с различной функционализацией поверхности.

Как видно из Рис. 34, положение и форма валентных полос ОН существенно зависят от типа функциональных поверхностных групп ДНА. В качестве количественных параметров, описывающих изменения формы и положения валентных полос воды в водных суспензиях НА, использовались параметры  $\chi_{21}$  и  $\nu_{\text{цм}}$ , определяемые следующим образом:

- Параметр  $\chi_{21}$  равен отношению интенсивностей высоко- и низкочастотной областей валентной полосы ОН групп  $I_1$  и  $I_2$ . Точки  $\nu_1$  и  $\nu_2$  определялись по особым точкам первой производной валентной полосы КР воды (Рис. 35).

$$\chi_{21} = \frac{I_2(\nu_2)}{I_1(\nu_1)}$$

- Параметр  $\nu_{\text{цм}}$  – положение центра масс полосы - определяется как отношение суммы произведений интенсивности сигнала в каждом канале и частоты каждого канала к сумме сигналов во всех каналах (см. Рис. 35).

$$\nu_{\text{цм}} = \frac{\sum_i I_i(\nu_i) \cdot \nu_i}{\sum_i I_i(\nu_i)},$$

где  $i$  - частота/канал спектра.

По мнению авторов [146, 147], высокочастотная область валентной полосы (с максимумом  $I_2$ ) обусловлена колебаниями гидроксильных групп со слабыми водородными связями, а низкочастотная (с максимумом  $I_1$ ) – колебаниями ОН групп с сильными водородными связями.

Поэтому введенный параметр  $\chi_{21}$  характеризует долю слабосвязанных ОН групп в растворе по отношению к сильно связанным ОН группам. То есть увеличение параметра  $\chi_{21}$  и смещение положения центра масс  $\nu_{\text{цм}}$  в область бóльших волновых чисел означает ослабление водородных связей в суспензии.

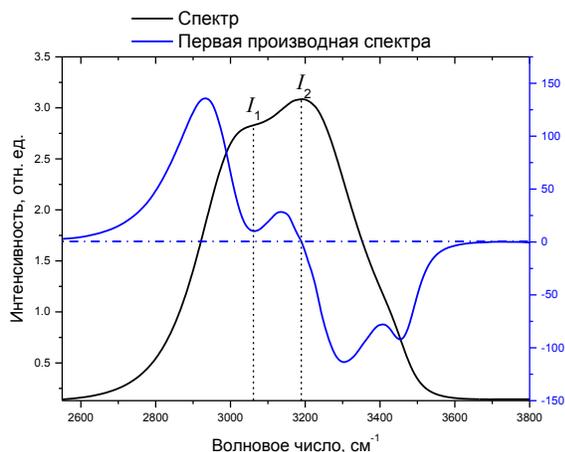


Рис. 35. Иллюстрация вычисления параметра  $\chi_{21}$ .

Для всех полученных валентных полос КР воды в водных суспензиях ДНА были рассчитаны и построены зависимости параметров  $\chi_{21}$  и  $\nu_{\text{цм}}$  от концентрации ДНА с различной функционализацией поверхности (Рис. 36).

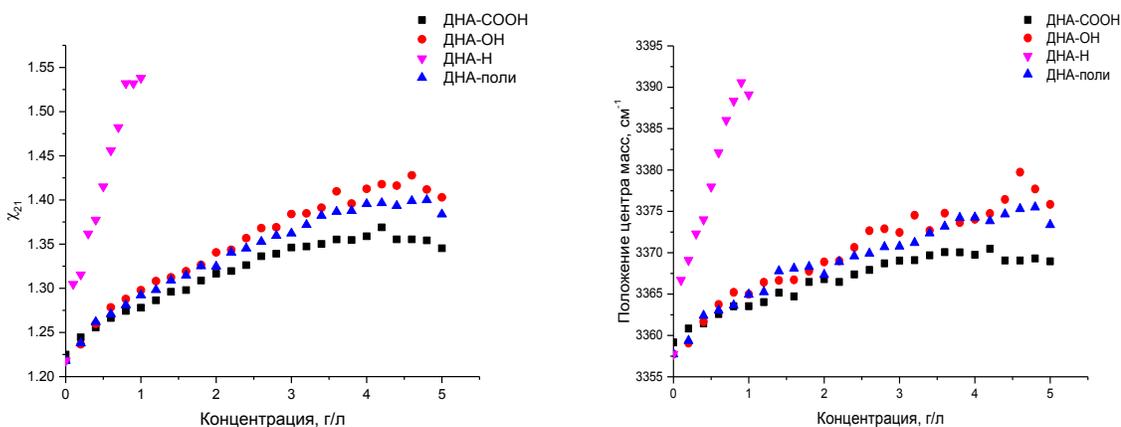


Рис. 36. Зависимости значений параметров  $\chi_{21}$  и  $\nu_{\text{цм}}$  валентных полос воды в водных суспензиях всех ДНА от их концентрации во всем диапазоне исследованных концентраций.

Из приведенных зависимостей параметров  $\chi_{21}$  и  $\nu_{\text{цм}}$  от концентрации ДНА в водных суспензиях видно, что для всех исследованных ДНА значения обоих параметров больше по сравнению со

значениями этих параметров для обычной воды. Это означает, что при диспергировании ДНА в воде все исследованные наночастицы взаимодействуют с окружающими молекулами воды так, что водородные связи в суспензии ослабляются. С ростом концентрации всех типов ДНА параметры  $\chi_{21}$  и  $\nu_{\text{цм}}$  увеличиваются. Однако при одинаковом изменении концентрации ДНА значение параметров увеличивается в разной степени - в зависимости от функционального покрова ДНА. Это означает, что степень ослабления водородных связей зависит типа функционального покрова ДНА. Валентная полоса КР воды в суспензиях ДНА-Н смещается в сторону больших волновых чисел при увеличении концентрации наночастиц гораздо сильнее, чем у других образцов, при одинаковом изменении концентрации наночастиц. Параметр  $\chi_{21}$  при этом также увеличивается гораздо сильнее. Это означает, что атомы водорода, находящиеся на поверхности наноалмаза, эффективно воздействуют на водородные связи в воде, при этом существенно больше ослабляя их по сравнению с поверхностными группами всех остальных ДНА. Наименьшее влияние на водородные связи в воде оказывают поверхностные группы COOH.

Анализируя зависимости  $\chi_{21}$  и  $\nu_{\text{цм}}$  от концентрации ДНА в суспензиях (Рис. 36), можно составить ряд по силе влияния ДНА с различной функционализацией поверхности на водородные связи в воде:



Таким образом, результаты спектроскопии КР водных суспензий ДНА с различной функционализацией поверхности показали, что: 1). при диспергировании в воде всех типов ДНА водородные связи в суспензии ослабляются по сравнению с водородными связями в воде без наночастиц; 2). ослабление водородных связей в водных суспензиях ДНА зависит от типа функциональных поверхностных групп: сильнее всего ослабляет водородные связи в воде поверхностный водород, а наименьшее влияние на водородные связи оказывают карбоксильные поверхностные группы.

### 3.1.2. Рентгеновское поглощение водных суспензий ДНА

Совместно с коллегами из Берлинского Центра материалов и энергии им. Гельмгольца были проведены исследования наших образцов методом спектроскопии рентгеновского поглощения. Метод основан на взаимодействии падающего излучения с веществом, при котором при прохождении рентгеновского излучения сквозь образец наблюдается уменьшение интенсивности рентгеновского излучения [148]. Для диапазона энергий квантов излучения  $\hbar\omega$  до 100 кэВ

наибольшее сечение имеет процесс фотоэлектронного поглощения, сопровождаемый появлением фотоэлектрона с энергией  $E = \hbar\omega - E_0$ , где  $E_0$  – энергия связи электронов в поглощающем атоме.

После того, как атом поглотил квант рентгеновского излучения, возможны два способа перехода обратно в основное состояние – за счет вырывания из атома оже-электронов с определенными энергиями, которые соответствуют уровням атомной системы и за счет флуоресценции (вероятность того или иного процесса зависит от заряда ядра). В нашем случае, при рассмотрении К-края кислорода, наиболее вероятен первый способ перехода.

С использованием синхротрона UVSOR-III (Япония) [149] были получены спектры рентгеновского поглощения водных суспензий с большими концентрациями наночастиц: 10 г/л для ДНА-СООН, ДНА-ОН и ДНА-поли и 5 г/л – для ДНА-Н (Рис. 37).

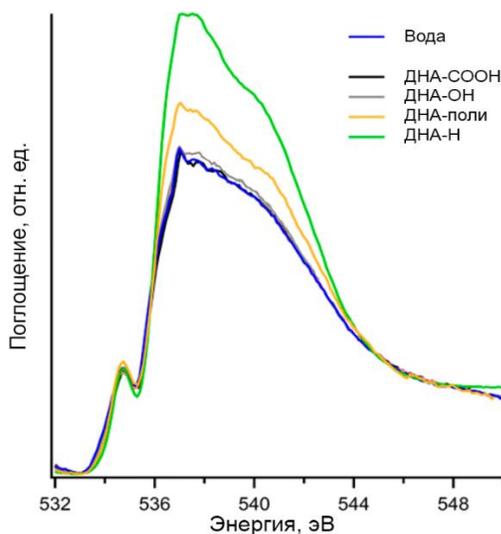


Рис. 37. Спектры рентгеновского поглощения исследуемых образцов.

Перед анализом полученных спектров следует сказать несколько слов о структуре получаемого спектра. При анализе спектров рентгеновского поглощения К-края кислорода используют три характерные области – пре-край (535 эВ), главный край (537 эВ) и пост-край (541 эВ) (Рис. 38).

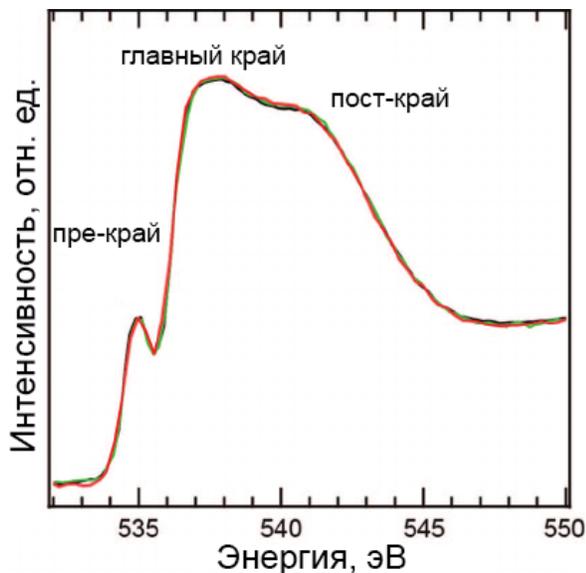
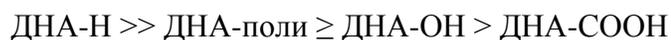


Рис. 38. Спектр рентгеновского поглощения жидкой воды [150].

В спектре рентгеновского поглощения жидкой воды возбуждение на локализованные низколежащие орбитали приводит к возникновению поглощения в областях пре-края и главного края, которые являются признаками слабых или искаженных водородных связей в воде. Поглощение в области пост-края обусловлено возбуждением в делокализованные состояния в зоне проводимости и пропорционально количеству сильных водородных связей. Экспериментально установлено [150], что при увеличении температуры жидкой воды в спектрах рентгеновского поглощения К края кислорода наблюдается увеличение поглощения в областях пре-края и главного края и уменьшение поглощения в области пост-края.

Из Рис. 37 можно сделать вывод о том, что различные функционализации НА в разной степени влияют на силы водородных связей в суспензии. Можно выделить следующий ряд по величине влияния:



Как видно из Рис. 37, водные суспензии ДНА-СООН и ДНА-ОН имеют очень близкие значения поглощения - немного большие, чем вода без ДНА. Слабое увеличение интенсивности поглощения в областях пре-края и главного края по сравнению с поглощением в воде без наночастиц свидетельствует о небольшом увеличении количества искаженных водородных связей. Это говорит о том, что карбоксильные и гидроксильные группы слабо влияют на силу водородных связей в водных суспензиях, что согласуется с результатами, полученными методом спектроскопии КР (см. раздел 3.1.1.). Спектры поглощения водных суспензий ДНА-Н и ДНА-поли

значительно отличаются от спектров суспензий других функционализаций ДНА и воды. Значительное увеличение интенсивности поглощения в областях главного и пост-края свидетельствуют о наличии дальнедействующего изменения структуры воды вокруг ДНА [90], т.е. переорганизация молекул воды вокруг ДНА-Н распространяется гораздо дальше первого гидратного слоя. Таким образом, результаты, полученные методами лазерной спектроскопии КР и рентгеновского поглощения, хорошо согласуются между собой.

### **3.1.3. Экспериментальное определение энергии водородных связей в водных суспензиях детонационных наноалмазов с различной функционализацией поверхности**

В данной диссертационной работе получены численные значения энергии водородных связей в водных суспензиях ДНА двумя способами - по температурным зависимостям экспериментальных спектров КР водных суспензий ДНА с помощью уравнения Вант Гоффа и в результате моделирования и теоретических расчетов с помощью теории функционала плотности.

Для проведения эксперимента были приготовлены водные суспензии ДНА с различной функционализацией поверхности: ДНА-Н с концентрацией 0.2 г/л, ДНА-ОН, ДНА-СООН 10 нм, ДНА-поли с концентрациями 1 г/л. Таким образом, сохранялась та же пропорция между максимальными концентрациями, что и в исследованиях, описанных в пп. 3.1.1 и 3.1.2.

Температурные зависимости спектров КР водных суспензий ДНА регистрировались на установке, описанной в Главе 2, п. 2.2.1. Температура изменялась в диапазоне от 20°C до 80°C с шагом 10°C. Полученные валентные полосы ОН групп водных суспензий ДНА при температуре 20°C представлены на Рис. 39.

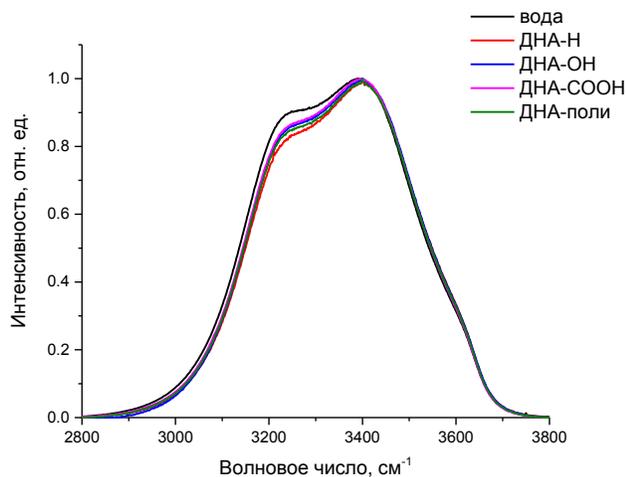


Рис. 39. Валентные полосы ОН групп водных суспензий ДНА с различной функционализацией поверхности при температуре 20°C. Полосы нормированы на максимум.

Для количественной оценки энергии водородных связей в суспензиях ДНА использовалось уравнение Вант Гоффа (3.1), позволяющее оценить влияние температуры на скорость химической реакции.

$$\ln(K) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (3.1)$$

где  $K$  – константа равновесия,  $\Delta H$  – изменение энтальпии,  $\Delta S$  – изменение энтропии,  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Под химической реакцией в нашем случае понимается превращение ОН групп молекул воды с сильной водородной связью в ОН группы воды со слабой водородной связью под действием температуры (при ее увеличении). Как известно, валентные полосы КР воды чувствительны именно к таким изменениям силы водородных связей [147,151-153]. Многие исследования показали, что с увеличением температуры воды интенсивность высокочастотной области валентной полосы, обусловленной колебаниями ОН групп со слабой водородной связью, растет, а интенсивность низкочастотной области, обусловленной сильносвязанными ОН группами, уменьшается, вся полоса смещается к высоким частотам и сужается [147,151,153]. Исходя из этого, для применения уравнения Вант Гоффа необходимо выявить два компонента реакции, в нашем случае – вклады в валентную полосу колебаний ОН групп с сильной и со слабой водородными связями. Указанные вклады определялись в результате разложения валентных полос ОН групп суспензий ДНА на составляющие гауссовой формы.

Полученные при различных температурах экспериментальные полосы валентных колебаний ОН групп водных суспензий ДНА с различной функционализацией поверхности раскладывались на составляющие гауссовой формы. С помощью генетических алгоритмов (ГА) определялись оптимальное количество компонентов и параметры каждого компонента. Применение ГА показало, что оптимальное количество составляющих гауссовой формы равно 5: отклонение экспериментального спектра от модельного минимально для всех спектральных каналов.

Зависимость корня ошибки аппроксимации  $\sqrt{\sum_i (I_{\text{эксп}}(v_i) - I_{\text{разл}}(v_i))^2}$  от числа компонент разложения представлен на Рис. 40 ( $I_{\text{эксп}}$  – интенсивность экспериментального спектра на частоте  $v_i$ ,  $I_{\text{разл}}$  – интенсивность спектра, полученного суперпозицией компонентов гауссовой формы на частоте  $v_i$ ).

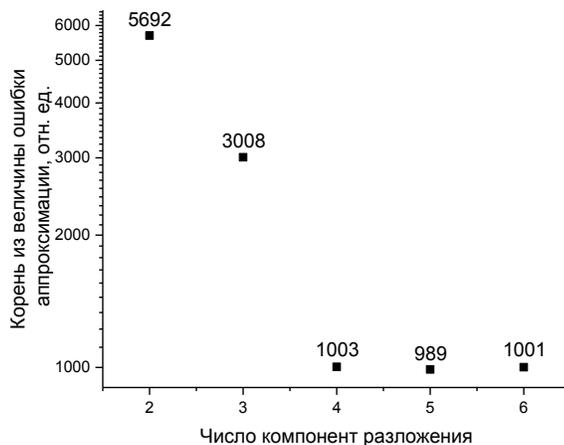


Рис. 40. Зависимость величины ошибки аппроксимации от количества компонент разложения полос.

Параметры этих компонент варьировались в следующих диапазонах: положение максимума – от  $2500 \text{ см}^{-1}$  до  $3800 \text{ см}^{-1}$ , площадь – от 0 до 100000 отн. ед., полуширина – от  $0 \text{ см}^{-1}$  до  $300 \text{ см}^{-1}$ . Пример полученного разложения на 5 компонент и ошибки этого разложения представлены на Рис. 41.

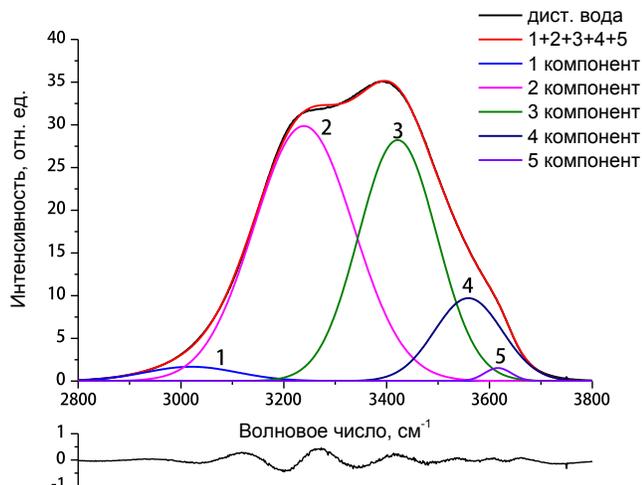


Рис. 41. Разложение валентной полосы воды на пять компонентов гауссовой формы с применением ГА.

Далее для применения уравнения (3.1) выделялись компоненты, соответствующие колебаниям ОН-групп с сильной и слабой водородными связями, и строилась зависимость натурального логарифма отношения их суммарных площадей – константы равновесия реакции  $K$  - от величины обратной температуры. «Принадлежность» компонента к ОН-группам с сильной и слабой водородной связью определялась в процессе анализа изменения площади компонента при изменении температуры (Рис. 42): если площадь компонента уменьшается при увеличении температуры, то он соответствует сильносвязанным ОН-группам, и наоборот. Как видно из Рис. 42, при разложении валентных полос ОН групп воды на 5 компонентов с помощью ГА можно выделить два компонента, чей вклад в полосу валентных ОН групп уменьшается (с максимумами в районе  $3015\text{ см}^{-1}$  и  $3235\text{ см}^{-1}$ ), и три компонента, чей вклад увеличивается (с максимумами в районе  $3420\text{ см}^{-1}$ ,  $3560\text{ см}^{-1}$ ,  $3617\text{ см}^{-1}$ ). Следует отметить, что изобестическая точка температурной зависимости валентных полос ОН групп образцов фактически разделяет все компоненты на две группы - те, чей вклад в суммарную интенсивность полос уменьшается при увеличении температуры, и те, чей вклад увеличивается (Рис. 42).

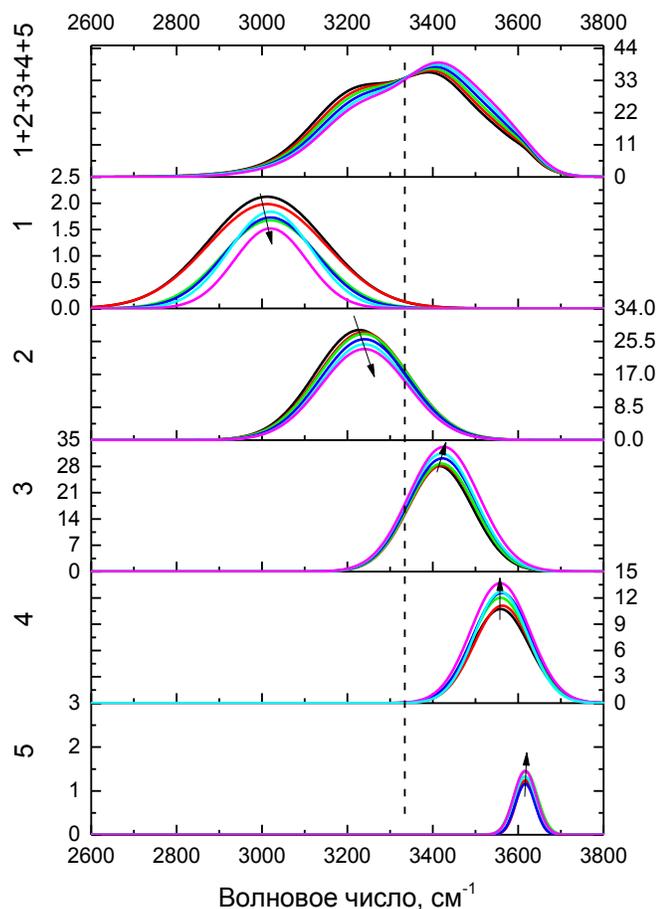


Рис. 42. Изменение площадей компонент разложения на 5 составляющих гауссовой формы при увеличении температуры воды от 20°C до 80°C с шагом 10°C. Тренды изменения площадей компонент при увеличении температуры указаны стрелками.

На Рис. 43 представлена рассчитанная зависимость натурального логарифма константы равновесия  $K$  от величины обратной температуры для воды. Аналогичные зависимости получены для водных суспензий всех исследуемых ДНА. Все зависимости  $\ln K(1/T)$  для воды и водных суспензий ДНА с различной функционализацией поверхности хорошо аппроксимируются линейной функцией.

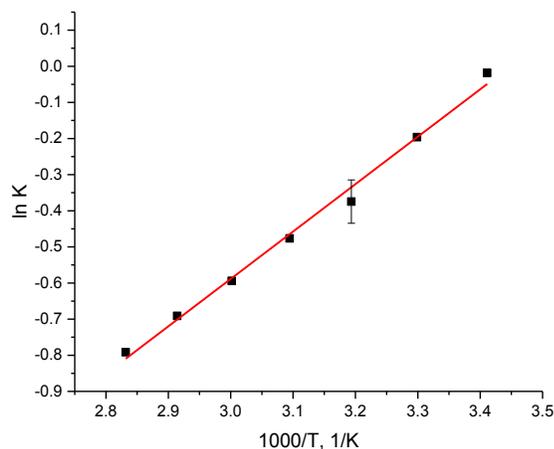
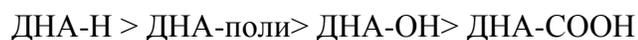


Рис. 43. Зависимости натурального логарифма константы равновесия от величины обратной температуры для воды.

По уравнению (3.1) были проведены соответствующие расчеты и получены оценки изменения энтальпии  $\Delta H$  при преобразовании групп ОН с сильными водородными связями в группы ОН со слабыми водородными связями с увеличением температуры воды и водных суспензий ДНА с различной функционализацией поверхности. Заметим, что интенсивность полосы валентных колебаний воды пропорциональна количеству групп ОН, а, согласно различным моделям структуры воды и количественным оценкам, среднее число водородных связей, приходящееся на одну молекулу воды, варьируется от 2 до 4 [154]. Таким образом, на одну группу ОН в воде приходится, в среднем, 1.5 водородных связи. С учетом этого были рассчитаны значения изменения энтальпии водородных связей в воде и водных суспензиях ДНА с различной функционализацией при увеличении температуры. Результаты приведены в Таблице 4.

Как видно из Таблицы 4, все исследованные ДНА ослабляют силы водородных связей в водных суспензиях, но в разной степени. Наиболее существенно ослабляются водородные связи при добавлении ДНА с гидрогенизированной поверхностью, наименьшее ослабление обнаружено для карбоксилированных ДНА. С учетом рассчитанных значений изменения энтальпии был выделен ряд по степени влияния различных функциональных поверхностных групп ДНА на водородные связи в водной суспензии:



Следует отметить, что значения энергий водородных связей в водных суспензиях ДНА с различной функционализацией, представленные в Таблице 4, получены впервые, поэтому сравнение этих величин с литературными данными невозможно.

Полученный ряд не полностью коррелирует с рядом, полученным при расчете зависимости параметра  $\chi_{21}$  от концентрации (ДНА-поли и ДНА-ОН поменялись местами) (см. п. 3.1.1.). Такое несоответствие объяснимо тем, что при данных концентрациях (1 г/л для ДНА-поли и ДНА-ОН) значения параметра  $\chi_{21}$  совпадают в пределах ошибки определения этого параметра.

### 3.1.4. Теоретические расчеты энергии водородных связей в водных суспензиях ДНА

Совместно с коллегами из Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А. Пластун И.Л. и Бокаревым А.Н. было проведено численное моделирование взаимодействий алмазоподобных структур с различными функциональными группами на поверхности и молекул воды. Моделирование взаимодействующих молекулярных групп и расчёт их спектров КР и ИК-поглощения осуществлялись с помощью метода теории функционала плотности (ТФП) [155] с использованием функционала B3LYP [155,156] и базисного набора 6-31G(d). Использовалось программное обеспечение Gaussian 09 [157].

Согласно ТФП, полная электронная энергия квантовой системы  $E_{DFT}$ , является функционалом электронной плотности  $\rho$  и включает несколько составляющих:

$$E_{DFT}[\rho] = T_s[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho]. \quad (3.2)$$

где  $T_s$  - кинетическая энергия системы, вычисляемая с использованием формально построенных орбиталей, отвечающих системе невзаимодействующих электронов (метод Кона-Шама) [158]:

$$T_s[\rho] = \sum_i^M \langle \varphi_i | -\frac{1}{2} \nabla_i^2 | \varphi_i \rangle, \quad (3.3)$$

где  $\varphi_i$  – пространственные функции молекулярных орбиталей, описание которых будет приведено ниже.

Второе и третье слагаемые суммы (3.2) - энергия притяжения электронов к ядрам и кулоновская энергия отталкивания электронов, соответственно, выражаются через электронную плотность точно так же, как в теории Хартри-Фока [159]:

$$E_{ne}[\rho(r)] = -\sum_{\alpha}^N \sum_i^M \int \varphi_i(r) \frac{Z_{\alpha}}{r} \varphi_i(r) dr = -\sum_{\alpha}^N \int \frac{Z_{\alpha}}{r} \rho(r) dr, \quad (3.4)$$

$$J_{ij}[\rho(r)] = \frac{1}{2} \iint |\varphi_i(r_1)|^2 \frac{1}{|r_1 - r_2|} |\varphi_j(r_2)|^2 dr_1 dr_2 = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2$$

Последнее слагаемое суммы (3.2) - корреляционно-обменный функционал, вычисляемый как сумма обменных  $E_X$  и корреляционных  $E_C$  функционалов, причем обменный член дает больший вклад (например, для атома Ne  $E_X = -12.11 a.e.$ ,  $E_C = -0.39 a.e.$ ). В методе B3LYP  $E_{XC}$  вычисляется следующим образом:

$$E_{XC} = E_{XC}^{B3LYP} = (1-a) E_X^{LSDA} + a E_X^{HF} + b \Delta E_X^{B88} + (1-c) E_C^{VWN} + c E_C^{LYP}. \quad (3.5)$$

Выражение (3.5) является суммой функционалов, построенной так называемым гибридным способом, когда в выражение для  $E_X$  вносится вклад  $E_X^{HF}$ , рассчитываемый точно также как обменная энергия в методе Хартри-Фока, но с использованием орбиталей Кона-Шама.

Сумма (3.5) представляет собой трехпараметровый функционал, предложенный Бекке (Веске, B3), где вместо градиентной коррекции корреляционного функционала  $\Delta E_C$ , приводимой Бекке в качестве последнего слагаемого, используется корреляционный функционал Ли, Янга и Парра (LYP)  $E_C^{LYP}$ . Это сочетание даёт известный акроним B3LYP. Коэффициенты a, b и c – подобранные Бекке константы, для подбора которых использовались экспериментальные данные.

В ходе численного моделирования был использован один из наиболее простых и часто используемых способов представления атомных орбиталей - в виде двух валентных функций одинаковой симметрии. Одна из них является более сжатой, сокращенной, другая – размытой, диффузной. Подбор коэффициентов, определяющих вклад каждой компоненты, осуществляется вариационной процедурой. Такое разделение (расщепление) производится только для валентных электронов, поскольку электроны внутренней оболочки не участвуют в образовании химической связи, поэтому базисные наборы такого типа называются валентно-расщепленными. Несмотря на то, что электроны внутренних орбиталей практически не участвуют в образовании химических связей, для представления этих орбиталей требуется большее число гауссовых примитив, поскольку внутренние орбитали дают наибольший вклад в полную энергию молекулы, поэтому их максимально точное описание исключит погрешности в расчёте энергетических характеристик.

В качестве модели гидрогенизированного наноалмаза использовался адамантан (Рис. 44 (а)), наноалмаза с поверхностными карбоксильными группами - 1,3,5,7-адамтантетракарбоновая кислота (Рис. 44 (б)), наноалмаза с гидроксильными группами - 1,3,5,7-адамтантетрол.

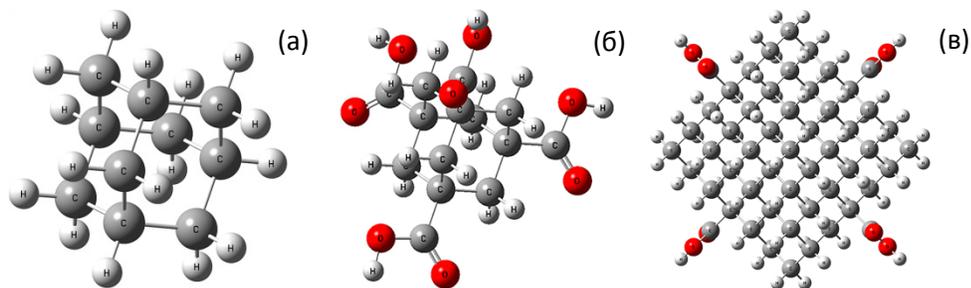


Рис. 44. Структура адамантана (а), 1,3,5,7-адамантантетракарбоновой кислоты (б), наноалмаза диаметром 1 нм с 4-мя поверхностными карбоксильными группами.

Правомерность такой замены следует из того, что во всех рассчитанных ИК-спектрах характеристические области хорошо согласуются с соответствующими областями экспериментальных ИК-спектров наноалмазов, функционализированных соответствующими группами (например, Рис. 45).

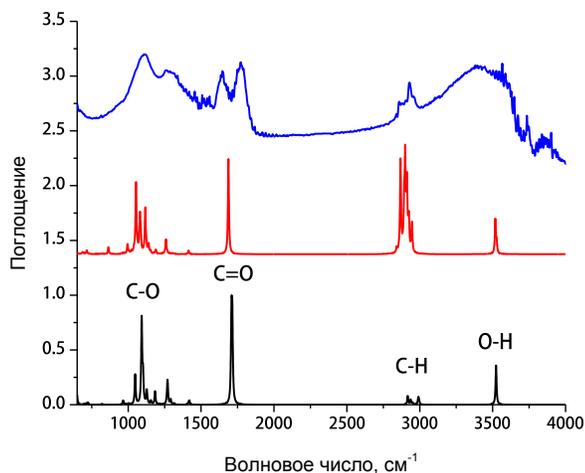


Рис. 45. Экспериментальный ИК-спектр карбоксилированных наноалмазов (верхний), рассчитанный ИК-спектр наноалмазов диаметром 1 нм с 4-мя поверхностными группами COOH (в центре) и 1,3,5,7-адамантантетракарбоновой кислоты (нижний).

В рассчитанном ИК-спектре наноалмаза с поверхностными группами COOH можно выделить 5 характеристических областей: область от 1000 до 1200  $\text{см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям связей C-O и C=O в карбоксильных и карбонильных группах, соответственно, валентным колебаниям связей C-C и деформационным колебаниям связей C-H; область от 1780 до 1800  $\text{см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям связей C=O в карбоксильных группах; две области - от 2915 до 2950  $\text{см}^{-1}$  и от 2980 до 2995  $\text{см}^{-1}$  - связаны с валентными симметричными и антисимметричными

колебаниями связей С-Н, соответственно, область  $3523\text{ см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям связей О-Н в карбоксильных группах. Частоты наиболее интенсивных пиков в указанных диапазонах составляют 1144, 1795, 2917, 2994 и  $3523\text{ см}^{-1}$ . Для проверки применимости адамантана и его функционализаций для расчетов, дополнительно было проведено сравнение 1,3,5,7-адамантантетракарбоновой кислоты и нанодиазмов диаметром 1 нм с 4-мя поверхностными группами СООН (Рис. 44 (в)). Как видно из Рис. 45, характеристические области хорошо согласуются с соответствующими областями в экспериментальном ИК-спектре нанодиаза, функционализированного карбоксильными группами (Рис. 44 (б)). Это даёт основание рассматривать 1,3,5,7-адамантантетракарбоновую кислоту в качестве модели карбоксилированных нанодиазмов на уровне качественных оценок образующихся связей с молекулами окружения и анализа их свойств.

Для учета ангармонизма во взаимодействиях и, соответственно, снижения степени расхождения между экспериментальными и вычисленными данными нами были выведены и использованы следующие масштабирующие множители для рассчитанных частот: 0.8742 (диапазон 0 —  $1000\text{ см}^{-1}$ ); 0.9306 (диапазон  $1000\text{ — }2000\text{ см}^{-1}$ ); 0.956 (диапазон выше  $2000\text{ см}^{-1}$ ).

Для моделирования водного окружения использовался набор из 100 молекул воды. На Рис. 46 показаны структура рассчитанного молекулярного комплекса (НА-СООН + 100 молекул воды), рассчитанный ИК спектр и экспериментально полученный спектр ИК водной суспензии ДНА-СООН.

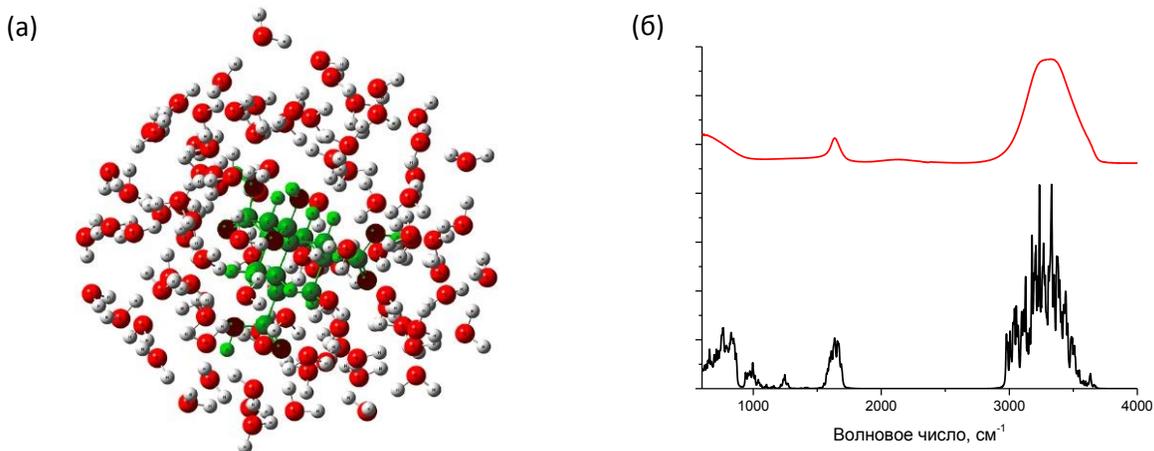


Рис. 46. Структура молекулярного комплекса 1,3,5,7-адамтантетракарбоновая кислота+100 молекул воды (слева). Рассчитанный ИК-спектр (справа) молекулярного комплекса 1,3,5,7-адамтантетракарбоновая кислота+100 молекул воды (внизу) и экспериментальный ИК-спектр водного раствора карбоксилированных наноалмазов (вверху).

Для всех оптимизированных комплексов ДНА в водном кластере были рассчитаны сдвиги частот  $\Delta\nu$  валентных симметричных колебаний ОН групп в суспензиях ДНА по сравнению с валентными симметричными колебаниями ОН групп непосредственно в водном кластере. Энергия водородных связей между функциональными поверхностными группами ДНА и окружающими молекулами воды рассчитывалась по формуле Иогансена [160,161]:  $-\Delta H = 0.3 \cdot \sqrt{\Delta\nu - 40}$ . Рассчитанные параметры водородных связей в оптимизированных конфигурациях представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Значения изменения энтальпии водородных связей в воде и водных суспензиях ДНА с различной функционализацией при увеличении температуры.

Образец	ГА 5 компонентов	Теоретические расчеты
	- $\Delta H$ , кДж/моль	- $\Delta H$ , кДж/моль
Вода	15.5±0.2	14.2
ДНА-СООН	14.0±0.2	13.0
ДНА-ОН	13.5±0.1	12.8
ДНА-поли	13.1±0.1	
ДНА-Н	12.7±0.1	12.6

Как видно из представленных в Таблице 4 результатов, теоретические и экспериментальные значения энергии водородных связей в водных суспензиях детонационных наноалмазов с различной поверхностной функционализацией согласуются между собой с учетом того, что значение силы водородной связи в воде по оценкам разных авторов составляет от 8 до

29 кДж/моль (в зависимости от метода определения) [162]. Тем не менее, полученные нами экспериментально и теоретически величины подтверждают полученный ранее ряд (см. п. 3.1.1, 3.1.2) по степени влияния различных поверхностных групп ДНА на энергию водородных связей с окружающими молекулами воды.

### **3.1.5. Влияние ДНА с различной поверхностной функционализацией на водородные связи в воде**

Как было показано в разделах 3.1.1 – 3.1.4, диспергирование ДНА с различными поверхностными функциональными группами в воде изменяет силу водородных связей в водной суспензии и это изменение зависит от функционального покрова ДНА. Одним из объяснений такого влияния ДНА на водородные связи в водных суспензиях является проявление суперпозиции электронных эффектов при взаимодействии поверхности ДНА с молекулами воды, а именно, индуктивного (I-эффект) и мезомерного (M-эффект) [163]. Индуктивным эффектом называют смещение электронной плотности по цепи  $\sigma$  связей при образовании ковалентной связи между атомами с различной электроотрицательностью [164]. Выделяют положительный (+I) и отрицательный (-I) эффекты, различающиеся по направлению смещения электронной плотности. Индуктивный эффект называют отрицательным, если заместитель (в нашем случае – поверхностная группа ДНА) уменьшает электронную плотность на атоме, с которым связан этот заместитель. Мезомерный эффект проявляется аналогичным образом, однако смещение электронной плотности происходит по  $\pi$  связям.

Известны работы, в которых была показана взаимосвязь электронных эффектов и силы водородных связей между молекулами воды и органическими молекулами при замещении функциональных групп фенола [165], комплексов формамида [166,167]. Так, в работе [165] с помощью теоретических расчетов один из атомов водорода бензольного кольца фенола замещался группами: -F, -Cl, -(NH<sub>2</sub>), -OH. Было показано, что при замещении водорода бензольного кольца электрон-акцепторной группой в пара-положении, энергия связывания комплекса с протон-акцепторной группой уменьшается.

Для рассматриваемых поверхностных групп (заместителей) известны направления смещения электронных плотностей [168], то есть знаки индуктивного и мезомерного эффектов. Они представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Знак электронного эффекта в зависимости от заместителя (функциональной группы на поверхности НА) [168].

Функциональная группа	I-эффект	M-эффект
COOH	-	-
OH	-	+
NO <sub>2</sub>	-	-
NH <sub>2</sub>	-	+
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-	0
CH <sub>3</sub>	Сильный +I эффект	0

Как видно из Таблицы 5, различные функциональные группы вызывают различное смещение электронной плотности. Так, для карбоксильной группы характерны отрицательный I-эффект и отрицательный M-эффект, в результате чего поверхность наночастицы имеет меньшую электронную плотность по сравнению, например, с наночастицей, покрытой гидроксильными функциональными группами, для которой характерны отрицательное значение и индуктивного и положительное значение мезомерного эффектов. Влияние полифункциональной поверхности ДНА является суперпозицией влияния каждой функциональной группы, находящейся на поверхности, и определяется процентным соотношением между различными группами. Особенность гидрогенизированной функционализации НА можно объяснить гидрофобной природой его поверхности, не образующей водородные связи с молекулами воды. Таким образом, степень влияния ДНА с различной поверхностной функционализацией на водородные связи растворителя определяется соотношением вкладов индуктивного и мезомерного эффектов.

### **§3.2. Лазерная спектроскопия взаимодействий углеродных наночастиц с молекулами окружения в протонных растворителях**

В дальнейшем особое внимание будет уделяться изучению ДНА с поверхностными карбоксильными группами. Такой выбор обусловлен тем, что ДНА с такой функционализацией поверхности являются наиболее биосовместимыми [10], лучше подходят для последующего прикрепления лекарства и, как было показано в предыдущем разделе, слабее изменяют водородные связи в своем окружении.

### 3.2.1. Влияние карбоксилированных ДНА на водородные связи в протонных растворителях

В качестве объектов исследования использовались ДНА-СООН с размерами 10 нм, в качестве растворителей использовались вода, метанол и этанол. Выбор этих растворителей обусловлен тем, что они характеризуются различными значениями полярности растворителя: полярность воды > полярности метанола > полярности этанола. Принято считать более полярным тот растворитель, у которого больше значение диэлектрической постоянной и дипольного момента молекулы растворителя.

Были приготовлены суспензии ДНА-СООН в воде, этаноле и метаноле с концентрациями от 0 до 1.8 г/л с шагом по концентрации 0.1 г/л. Для всех приготовленных суспензий наночастиц были получены спектры КР и флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$ ).

В качестве примера на Рис. 47 представлены спектры КР и флуоресценции суспензий ДНА-СООН с различными концентрациями в воде (Рис. 47 а) и в метаноле (Рис. 47 б). Широкая полоса от 500 до 700 нм с максимумом в районе 590 нм является флуоресценцией ДНА, полоса в районе 570-600 нм с максимумом в районе 586 нм соответствует валентным колебаниям ОН групп молекул воды, полосы с максимумами в районе 562-576 нм обусловлены валентными колебаниями групп СН.

Для исследования влияния диспергированных ДНА-СООН на водородные связи в протонных растворителях из всех полученных спектров посредством вычитания полосы флуоресценции ДНА были выделены валентные полосы ОН (Рис. 47, 48).

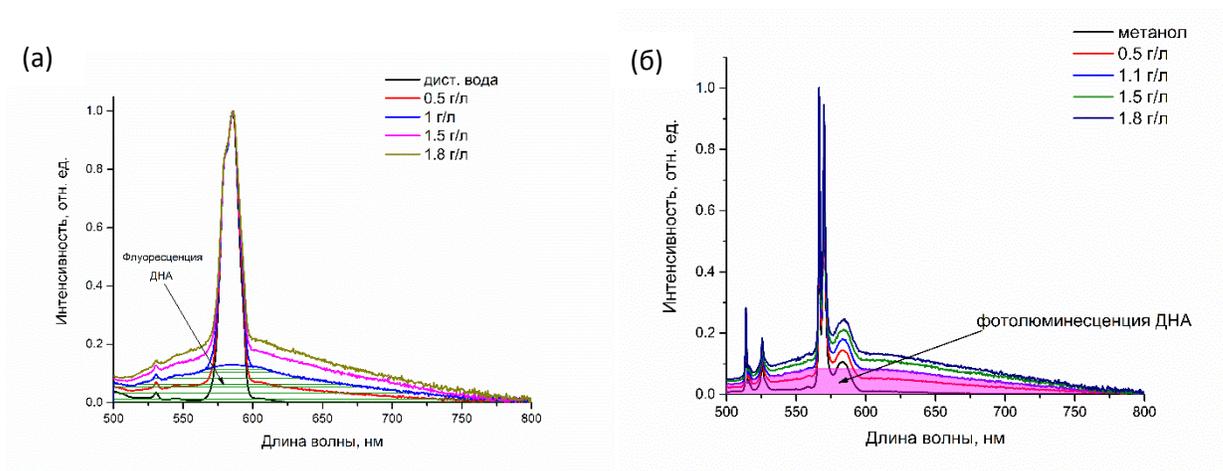


Рис. 47. Спектры КР и флуоресценции водных суспензий ДНА-СООН с различными концентрациями (а); Спектры КР и флуоресценции суспензий ДНА-СООН с различными концентрациями в метаноле (б).

Для количественных оценок изменения силы водородных связей в суспензиях ДНА-СООН были использованы параметры  $\chi_{21}$  и положение центра масс полосы валентных колебаний ОН групп (Рис. 35). Так как валентные полосы СН и ОН групп метанола и этанола перекрываются, то для корректного определения параметра  $\chi_{21}$  из каждого спектра спиртосодержащей суспензии вычитался вклад спирта (Рис. 48, штриховая и пунктирная синие линии для метанола и этанола, соответственно).

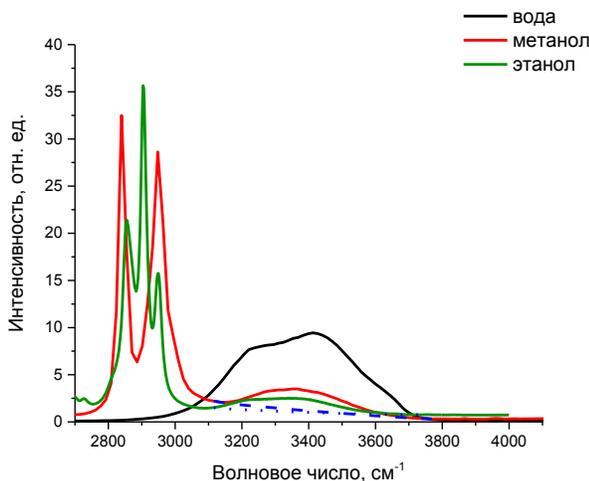


Рис. 48. Спектры КР метанола, этанола и воды в области валентных колебаний СН (2800 - 3000 см<sup>-1</sup>) и ОН (2800-3800 см<sup>-1</sup>) групп.

Анализ силы водородных связей в различных растворителях в присутствии ДНА-СООН был проведен на основании полученных зависимостей характеристик валентных полос колебаний ОН-групп  $\nu_{\text{цм}}$  и  $\chi_{21}$  от концентрации ДНА в суспензиях (Рис. 49).

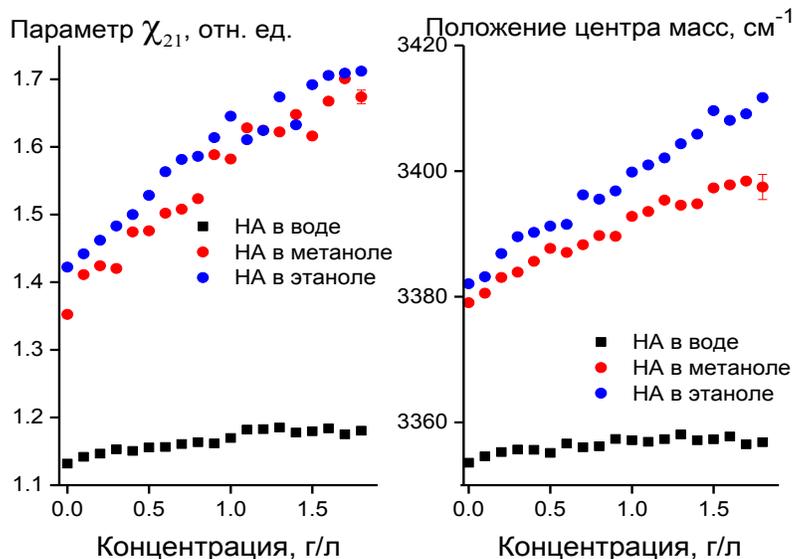


Рис. 49. Зависимости параметров валентной полосы колебаний ОН групп от концентрации ДНА-СООН в суспензии.

Как следует из полученных значений параметров  $\chi_{21}$  и  $\Delta\nu_{\text{цм}}$  (Рис. 49), в этаноле водородные связи слабее, чем в метаноле, и эти связи гораздо слабее по сравнению с водородными связями в воде. В присутствии ДНА-СООН водородные связи в растворителях ослабевают. Причем, при увеличении концентрации ДНА-СООН эти связи гораздо быстрее ослабевают в спиртах, чем в воде (Рис. 49). Более значимое ослабление силы водородных связей в случае спиртосодержащих суспензий может быть связано с тем, что молекулы рассматриваемых спиртов имеют только один атом водорода, способный участвовать в образовании водородных связей, в то время, как молекула воды может одновременно быть донором двух водородных связей. Кроме того, так как полярность этанола меньше, чем воды, водородные связи в нем слабее по сравнению с водородными связями в воде. Поэтому скорость изменения параметров  $\chi_{21}$  и  $\Delta\nu_{\text{цм}}$  больше в растворителях со слабыми водородными связями.

### 3.2.2. Влияние ОГ на водородные связи в протонных растворителях

Аналогичные исследования были проведены для суспензий ОГ в воде, метаноле и изопропанол. Растворители отличаются значением полярности следующим образом: полярность воды > полярности метанола > полярности изопропанола.

Были приготовлены суспензии ОГ в воде, этаноле и метаноле с концентрациями от 0 до 0.1 г/л с шагом по концентрации 0.01 г/л. Для всех приготовленных суспензий наночастиц были получены спектры КР и флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$ ). На Рис. 50 представлены спектры КР и флуоресценции суспензий ОГ в различных растворителях с концентрацией 0.1 г/л.

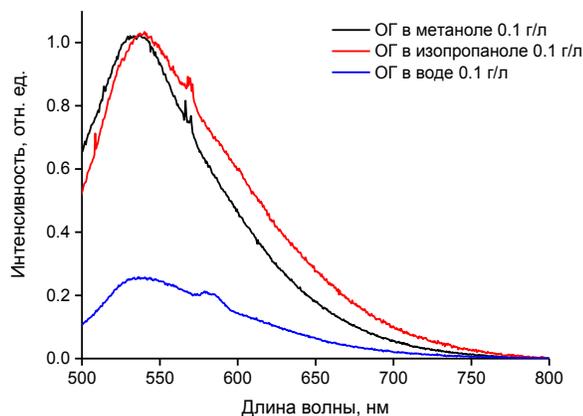


Рис. 50. Спектры КР и фотолюминесценции суспензий ОГ в различных растворителях с одинаковыми концентрациями.

Аналогично описанным в п.3.2.1. процедурам были выделены валентные полосы СН и ОН групп протонных растворителей (Рис. 51), рассчитаны параметры  $\chi_{21}$  для них и построены их зависимости от концентрации ОГ в суспензии с различными растворителями (Рис. 52).

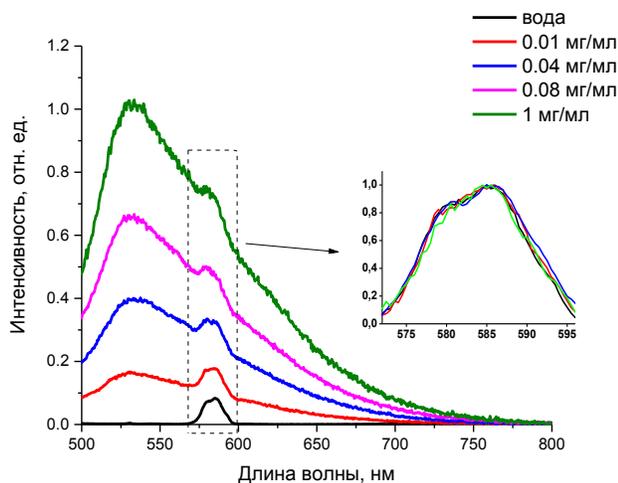


Рис. 51. Спектры КР и фотолюминесценции ОГ с различными концентрациями и выделенные полосы валентных колебаний ОН групп.

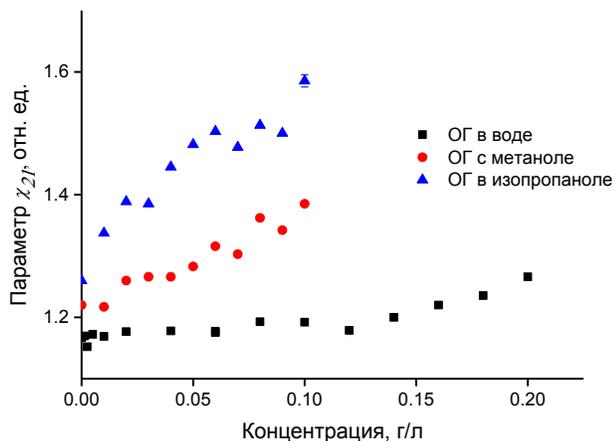


Рис. 52. Зависимости параметра  $\chi_{21}$  от концентрации ОГ в различных растворителях.

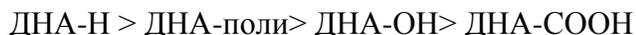
Анализ зависимостей параметра  $\chi_{21}$  валентной полосы ОН-групп растворителей от концентрации ОГ показал, что для растворителей в отсутствие наночастиц сила водородных связей убывает в ряду: вода > метанол > изопропанол; в присутствии ОГ водородные связи во всех растворителях ослабевают; при увеличении концентрации ОГ эти связи быстрее ослабевают в ряду: изопропанол > метанол > вода.

Как и метиловый спирт, изопропанол может участвовать в образовании одной водородной связи. Если принять за единицу число молекул воды в фиксированном объеме, то в том же самом объеме поместится 0.56 молекул этанола и 0.3 молекул изопропанола, поэтому наибольший парциальный

вклад в изменение водородных связей наблюдается в случае суспензии с изопропанолом. Дополнительно принимая во внимание то, что одна молекула воды может участвовать в образовании 4-х водородных связей [169], а молекулы исследуемых спиртов – двух, можно сделать вывод о том, что степень ослабления водородных связей зависит от их количества. Как и в случае ДНА, скорость изменения параметров  $\chi_{21}$  и  $\Delta v_{\text{цм}}$  рассматриваемых спиртов больше по сравнению с водой.

### *Заключение к Главе 3*

В настоящей главе экспериментально продемонстрировано существенное влияние детонационных наноалмазов на силу водородных связей в различных протонных растворителях. Показано, что изменение силы водородных связей в суспензиях зависит от типа поверхностных функциональных групп ДНА. Проведены численные расчеты энергии водородных связей в водных суспензиях исследованных ДНА с различным функциональным покровом. На основании полученных экспериментальных и теоретических данных, с учетом рассчитанных значений изменения энтальпии водородных связей, был построен следующий ряд по степени влияния различных функциональных поверхностных групп ДНА на водородные связи в водной суспензии:



Дано объяснение полученному ряду с привлечением индуктивного и мезомерного электронных эффектов.

Обнаружено аномальное поведение в воде гидрогенизированных ДНА по сравнению с другими модификациями ДНА и дано объяснение такому поведению, основанное на результатах спектроскопии КР, ИК и рентгеновского поглощения. Мы полагаем, что решающую роль во влиянии поверхности ДНА с различной функционализацией на водородные связи играет суперпозиция двух электронных эффектов – индуктивного и мезомерного.

Исследовано влияние ДНА на силу водородных связей в суспензиях протонных растворителей. Обнаружено, что при суспензировании ДНА водородные связи в протонных растворителях ослабляются. Причем, чем меньше полярность растворителя, тем сильнее ослабление водородных связей. Мы связываем это с различием количества водородных связей и их силы, характерных для каждого из рассматриваемых растворителей.

Такая же тенденция изменения водородного связывания в протонных растворителях была обнаружена и для других углеродных наночастиц – ОГ.

## ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ С МОЛЕКУЛАМИ ОКРУЖЕНИЯ НА ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ

Так как в рамках диссертационной работы предполагается разработка многофункциональных фотолюминесцентных маркеров на основе углеродных наночастиц, необходимо исследование влияния взаимодействий поверхностных функциональных групп этих наночастиц с молекулами окружения на свойства УНЧ, в первую очередь, фотолюминесценцию. Настоящая глава посвящена изучению фотолюминесцентных свойств УНЧ в различных окружениях и выработке подходов к управлению этими свойствами.

### §4.1. Фотолюминесцентные свойства детонационных наноалмазов в водных суспензиях

#### 4.1.1. Влияние функционализации поверхности детонационных наноалмазов на интенсивность фотолюминесценции в водных суспензиях

Как уже указывалось выше, одним из существенных преимуществ ДНА является возможность целенаправленной функционализации его поверхности для эффективного применения в конкретных задачах. В Главе 3 было обнаружено, что в зависимости от типа функциональных поверхностных групп ДНА по-разному влияют на силу водородных связей в воде.

В качестве объектов исследования использовались те же образцы, что и в Главе 3, а именно:

- ДНА-поли
- ДНА-СООН
- ДНА-ОН
- ДНА-Н

Были приготовлены водные суспензии ДНА в диапазоне изменения концентрации наночастиц от 0 до 5 г/л с шагом 0.2 г/л для ДНА-СООН, ДНА-ОН и ДНА-поли и с концентрациями от 0 до 1 г/л с шагом 0.1 г/л для ДНА-Н.

Полученные спектры фотолюминесценции водных суспензий всех образцов в диапазоне от 410 нм до 750 нм при возбуждении излучением лазерного диода с длиной волны 405 нм представлены на Рис. 53. Для того, чтобы исключить возможное искажение спектров за счет поглощения фотолюминесценции самим образцом (эффект внутреннего фильтра), спектры были скорректированы на спектры пропускания образцов.

Обработка спектров заключалась в следующем: вычитании пьедестала (минимального значения) рассеяния, коррекции на спектральную чувствительность системы регистрации, коррекции на спектр пропускания образца в диапазоне 410-750 нм, нормировки на площадь валентной полосы КР воды.

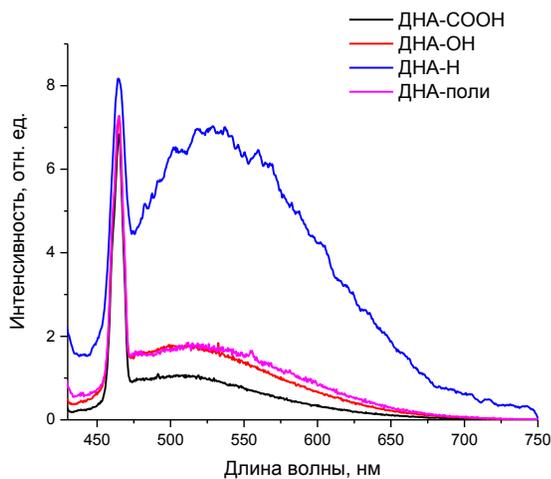


Рис. 53. Спектры фотолюминесценции водных суспензий ДНА с различными функциональными поверхностными группами. Концентрация каждого образца – 1 г/л.

Как видно из рисунка 4.1, при возбуждении на длине волны 405 нм фотолюминесценция ДНА представляет собой широкую полосу от 420 до 650 нм с максимумом в районе 525 нм.

Измеренные значения квантовых выходов фотолюминесценции ДНА с различной функционализацией поверхности варьировались в диапазоне 0.03-0.04. К сожалению, величина экспериментальной ошибки не позволяет достоверно использовать этот параметр для определения зависимости квантового выхода фотолюминесценции ДНА от функционализации поверхности и для определения влияния взаимодействий с окружением на эти свойства. Дополнительная трудность определения значения квантового выхода заключается в наличии нескольких типов флуорофоров, вносящих разный вклад в люминесцентный сигнал (см. п. 4.1.2). Поэтому в дальнейшем будет использоваться другой параметр –  $\Phi_0$ , равный отношению интегральной фотолюминесценции наночастиц к площади под полосой КР валентных колебаний ОН-групп [170]. Способ определения параметра  $\Phi_0$  показан на Рис. 54.

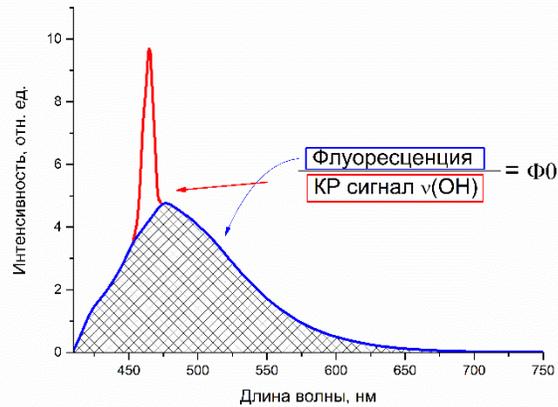


Рис. 54. Иллюстрация вычисления параметра  $\Phi_0$ .

Для всех приготовленных водных суспензий образцов были рассчитаны параметры  $\Phi_0$  и получены зависимости параметра  $\Phi_0$  от концентрации ДНА (Рис. 55) Видно, что при увеличении концентрации ДНА параметр  $\Phi_0$  линейно увеличивается для всех образцов. Однако для ДНА с разной функционализацией поверхности скорость изменения параметра  $\Phi_0$  с увеличением концентрации наночастиц различна и образует следующий ряд:



Полученный ряд коррелирует с рядом по степени влияния функционализации поверхности на энергию водородных связей в водных суспензиях, полученным в Главе 3. Для наших образцов это означает следующее: в водных суспензиях гидрогенизированных ДНА водородные связи самые слабые по сравнению с суспензиями остальных образцов, при этом эти наночастицы имеют самую интенсивную фотолюминесценцию в воде. Карбоксилированные ДНА, наоборот, меньше всех ослабляют водородные связи и имеют наименьшую интенсивность фотолюминесценции. Таким образом, ДНА, функциональные поверхностные группы которых сильнее всего ослабляют водородные связи в водных суспензиях, имеют более интенсивную фотолюминесценцию в воде.

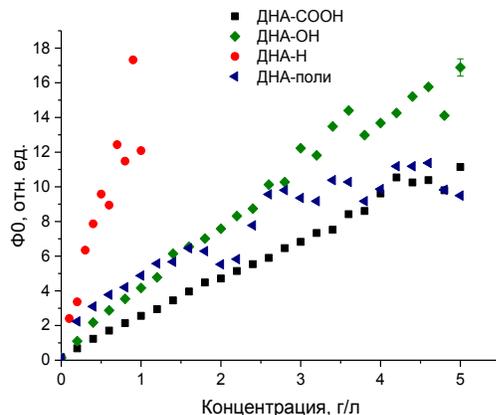


Рис. 55. Зависимости параметра  $\Phi_0$  от концентрации ДНА с различной функционализацией поверхности в воде.

#### 4.1.2. Кинетика затухания фотолюминесценции ДНА с различной функционализацией поверхности в водных суспензиях

Как было показано выше, спектр фотолюминесценции НА с различной функционализацией поверхности представляет собой широкую бесструктурную полосу, причем интенсивность фотолюминесценции изменяется в зависимости от функционализации поверхности. При этом вопрос о числе флуорофоров, которые вносят вклад в формирование спектра фотолюминесценции НА, остается открытым. Исследование кинетики затухания фотолюминесценции НА с различной функционализацией поверхности при лазерном возбуждении позволяет сделать вывод о числе флуорофоров, формирующих спектр фотолюминесценции, и о влиянии функционализации поверхности на эти флуорофоры.

В рамках выполнения данной работы проводилась пикосекундная фотолюминесцентная спектроскопия с временным разрешением водных суспензий НА с различным функциональным покровом: ДНА-СООН, ДНА-ОН, ДНА-Н и ДНА-поли с концентрациями 1 г/л, 4 г/л, 0.3 г/л, 1.4 г/л соответственно. Возбуждение сигнала фотолюминесценции осуществлялось лазером с длиной волны 376 нм и длительностью импульса 15 пс, сигнал фотолюминесценции регистрировался в двух спектральных «окнах» шириной 20 нм с центрами на длинах волн 510 нм и 570 нм (выделение полос регистрации сигнала осуществлялось с помощью фильтров). Такие спектральные диапазоны регистрации фотолюминесценции были выбраны из-за того, что они соответствуют максимальной интенсивности фотолюминесценции при возбуждении на длине

волны 405 нм («окно» с центром на 510 нм) (Рис. 53) и 488 нм («окно» с центром на 570 нм) (Рис. 47). Регистрация сигнала фотолюминесценции осуществлялась лавинным фотодиодом.

Некоторые из полученных кинетик затухания фотолюминесценции – зависимости интенсивности сигнала фотолюминесценции от времени задержки регистрации сигнала относительно возбуждающего лазерного импульса - представлены на Рис. 56. Экспериментальные кривые аппроксимировались одно-, двух-, трех экспоненциальными зависимостями. Было установлено, что наиболее обоснованным является аппроксимация двух экспоненциальной зависимостью. Полученные результаты представлены в Таблице 6.

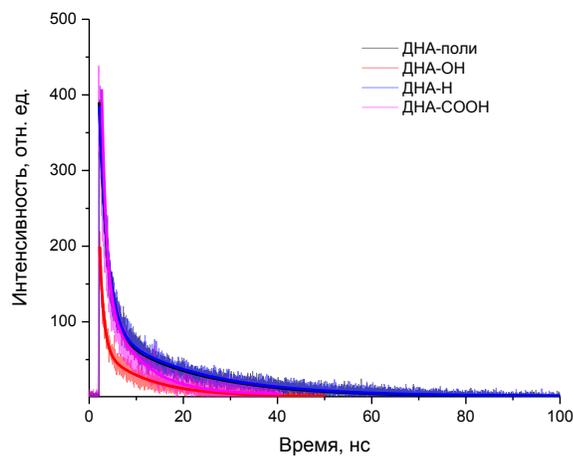


Рис. 56. Кинетика тушения фотолюминесценции образцов ДНА при возбуждении излучением с длиной волны 376 нм и длительностью импульса 15 пс. Регистрация проводилась на длине волны 570 нм.

Таблица 6. Рассчитанные значения времен жизни фотолюминесценции НА с различной функционализацией поверхности. В скобках указан вклад временной компоненты в общую кинетику тушения фотолюминесценции.

Образец	$\tau_1$ , нс (510 нм)		$\tau_2$ , нс (570 нм)	
	ДНА-СООН	$1.02 \pm 0.02$ (74)	$7.66 \pm 0.18$ (26)	$0.83 \pm 0.03$ (76)
ДНА-ОН	$0.90 \pm 0.02$ (92)	$10.22 \pm 0.24$ (8)	$1.80 \pm 0.01$ (80)	$9.92 \pm 0.25$ (20)
ДНА-Н	$1.74 \pm 0.02$ (81)	$18.92 \pm 0.23$ (19)	$1.24 \pm 0.02$ (82)	$15.02 \pm 0.29$ (18)
ДНА-поли	$1.73 \pm 0.01$ (79)	$18.41 \pm 0.24$ (21)	$1.00 \pm 0.22$ (77)	$11.23 \pm 0.29$ (23)

Как видно из Таблицы 6, полученные данные позволяют сделать вывод о наличии в спектрах фотолюминесценции как минимум двух компонент: «быстрой», со временем затухания 1-2 нс, которая вносит наибольший вклад в сигнал фотолюминесценции, и «медленной», со временем затухания 10-20 нс, что свидетельствует о наличии как минимум двух типов флуорофоров для всех рассматриваемых образцов НА. Функциональный покров на поверхности наночастиц влияет на кинетики затухания люминесценции. Как видно из таблицы, при регистрации кинетики тушения фотолюминесценции в спектральном «окне» с центром на 510 нм, время жизни обоих флуорофоров уменьшается после функционализации исходного наноалмаза (ДНА-поли) гидроксильными и карбоксильными группами. Гидрогенизация поверхности наноалмаза, напротив, практически никак не сказывается на времени жизни люминесценции. При регистрации кинетики тушения фотолюминесценции в спектральном «окне» с центром на 570 нм, можно заметить, что гидрогенизация исходных ДНА повлияла на время жизни фотолюминесценции исследуемого образца.

Эксперименты по исследованию кинетики затухания люминесценции показывают, что в люминесцентный сигнал детонационных наноалмазов вносят вклад несколько флуорофороф (как минимум два флуорофора), что согласуется с тем, что положение максимума люминесценции зависит от длины волны возбуждения.

#### **§4.2. Фотолюминесцентные свойства углеродных наночастиц в протонных растворителях**

В п. 4.1.1. было показано, что различные функционализации поверхности ДНА по-разному влияют на силы водородных связей в воде, а водородные связи, в свою очередь, могут влиять на фотолюминесцентные свойства ДНА. Для исследования влияния различных по силе водородных связей окружения на фотолюминесцентные свойства УНЧ в суспензиях были проведены эксперименты по изучению фотолюминесцентных свойств ДНА и ОГ с одним и тем же (фиксированным) поверхностным покровом в различных протонных растворителях.

В качестве объектов исследования использовались ДНА-СООН 5, функционализированные карбоксильными группами, наночастицы оксида графена. В качестве растворителей использовались вода, этанол, метанол и изопропанол (§3.2).

#### 4.2.1. Влияние водородных связей в протонных растворителях на фотолуминесцентные свойства ДНА

Спектры КР и фотолуминесценции суспензий ДНА-СООН в воде, метаноле и этаноле (Рис. 57) были получены во всем диапазоне изменений концентрации ДНА от 0 до 1.8 г/л с шагом 0.1 г/л. К сожалению, нам не удалось получить стабильных суспензий ДНА в изопропанолe. Для всех спектров были рассчитаны параметры  $\Phi_0$  и построены зависимости параметра  $\Phi_0$  от концентрации ДНА в растворителях (Рис. 58 а). Важно отметить, что параметр  $\Phi_0$ , который изначально вводился для водных растворов [170], в случае протонных растворителей рассчитывался другим образом. Для этого необходимо было выделить сигнал комбинационного рассеяния растворителя  $S_{\text{КР}}$ , сигнал фотолуминесценции  $S_{\text{ФЛ}}$  наночастиц и посчитать значение отношения их площадей (Рис. 58 б). Чтобы можно было корректно сравнить концентрационные зависимости параметра  $\Phi_0$ , полученные для различных растворителей, находилось соотношение между интегральной интенсивностью сигнала КР растворителя и интегральной интенсивностью сигнала КР от воды. Полученное значение умножалось на значение  $\Phi_0$ , посчитанное для исследуемого растворителя.

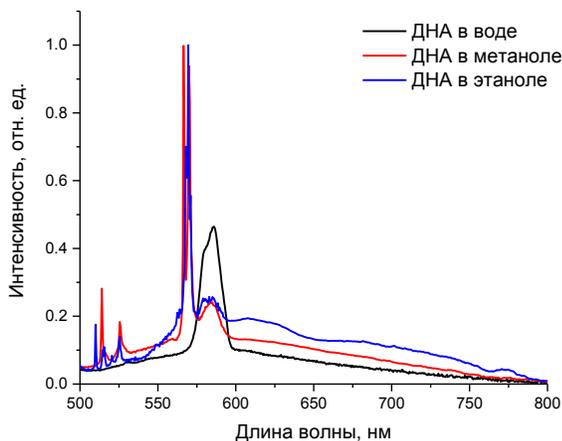


Рис. 57. Спектры КР и фотолуминесценции ДНА-СООН в различных растворителях.

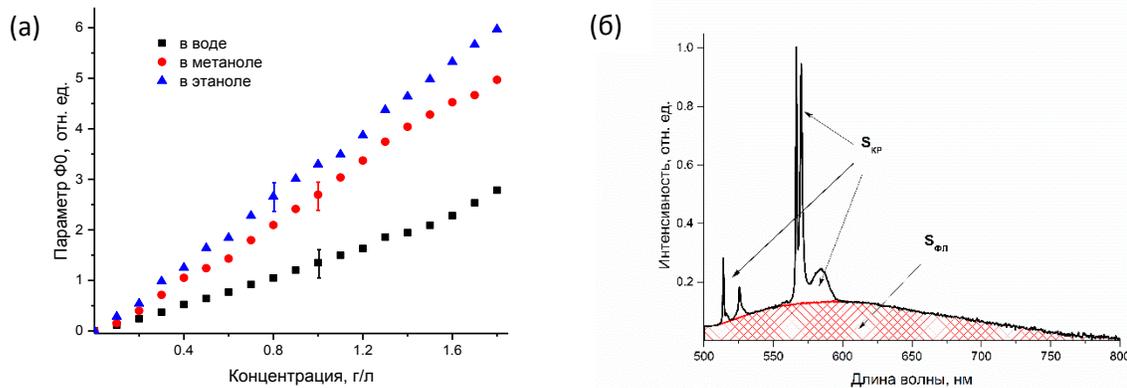


Рис. 58. Зависимости параметра  $\Phi_0$  от концентрации ДНА-СООН в различных растворителях (а); способ определения параметра  $\Phi_0$  для неводных суспензий (б).

Как известно, чем больше полярность протонного растворителя, тем сильнее, в среднем, водородные связи в нем. Из полученных результатов следует, что при одной и той же концентрации ДНА-СООН интенсивнее всего нанодиазды фотолуминесцируют в этаноле, а наименее всего – в воде. Таким образом, можно сделать вывод о том, что интенсивность фотолуминесценции ДНА с одними и теми же поверхностными группами в протонных растворителях существенно зависит от силы водородных связей в суспензиях: чем слабее водородные связи в окружении ДНА, тем интенсивнее флуоресценция наночастиц.

#### 4.2.2. Влияние водородных связей в протонных растворителях на фотолуминесцентные свойства оксида графена

Аналогичные исследования были проведены для суспензий ОГ в воде, метаноле и изопропанол. Концентрация ОГ варьировалась в диапазоне 0 - 0.1 г/л с шагом 0.01 г/л. На Рис. 50 показаны спектры КР и фотолуминесценции ОГ в различных растворителях при одинаковой концентрации 0.1 г/л. Как видно из рисунка, фотолуминесценция ОГ изменяется при изменении растворителя и уменьшается в ряду: изопропанол>метанол>вода. Полученный ряд коррелирует с рядом, полученным при изучении фотолуминесцентных свойств ДНА-СООН, из чего можно сделать вывод о схожести влияния водородных связей в полярных растворителях на фотолуминесцентные свойства рассматриваемых УНЧ.

Таким образом, была обнаружена существенная зависимость фотолуминесцентных свойств ОГ от силы водородных связей между их поверхностными группами и молекулами растворителя. Полученные результаты показали, что интенсивность фотолуминесценции УНЧ (при одной и той

же концентрации наночастиц в суспензиях) тем больше, чем слабее водородные связи между поверхностными функциональными группами УНЧ и окружающими молекулами растворителя. Существенная зависимость фотолюминесцентных свойств диспергированных ДНА и ОГ от молекулярных взаимодействий с окружающими молекулами подтверждает гипотезу о поверхностных механизмах флуоресценции изучаемых УНЧ.

#### **4.3. Фотолюминесцентные свойства ДНА в окружении биомакромолекул**

Для применения ДНА в качестве фотолюминесцентного биомаркера необходимо знать, как будет изменяться сигнал фотолюминесценции ДНА при взаимодействии его поверхности с биологическими объектами. В данном параграфе рассматривается влияние цепочек ДНК на фотолюминесцентные свойства ДНА.

В качестве объектов исследования использовались ДНА-СООН 5 нм, ДНА-СООН 10 нм и образцы цепочек ДНК вилочковой железы телят (DNA sodium salt from calf thymus, Регистрационный номер CAS 73049-39-5). В исходном состоянии цепочки ДНК представляют собой высушенные соединения, находящиеся в форме нитей. По паспорту используемая ДНК состоит на 58% из пар гуанин-цитозин и на 42% из пар аденин-тимин. Цепочки содержат 3000-8000 базовых пар. Так как в естественном окружении молекулы ДНК находятся в жидкой среде, все исследования проводились в физиологическом растворе (NaCl 0.9% в воде) или дистиллированной воде.

Были приготовлены исходные водные суспензии образцов ДНА с концентрациями: ДНА-СООН 5 нм – 1 г/л в воде, ДНА-СООН 10 нм – 1 г/л в воде, ДНК – 6.5 г/л в воде. В ходе работы исходные суспензии молекул ДНК и ДНА смешивались в соотношении 1:1. Таким образом, исследовались следующие суспензии ДНА и ДНК: для ДНА-СООН 5 и 10 нм – 0.5 г/л наночастиц и 3.15 г/л ДНК. Были получены спектры КР и фотолюминесценции водных суспензий наноалмазов, растворов ДНК и смесей ДНК+ДНА (Рис. 59,  $\lambda_{\text{возб.}} = 405 \text{ нм}$ ).

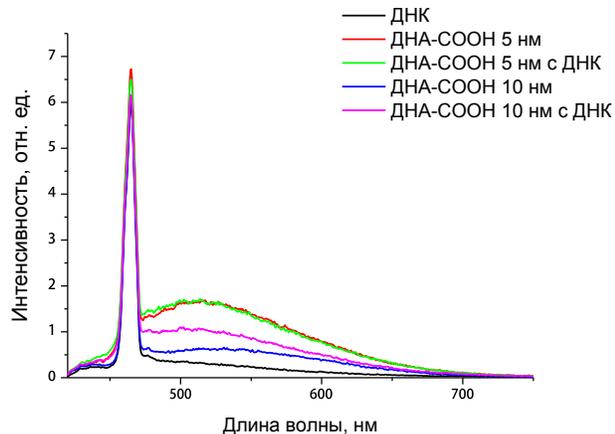


Рис. 59. Спектры КР и фотолюминесценции исследуемых ДНА в воде и в присутствии ДНК.

Для сравнительного анализа изменения фотолюминесценции ДНА в воде в результате взаимодействий с молекулами ДНК нами были рассчитаны относительные изменения интегральной интенсивности фотолюминесценции – параметры  $\Delta\Phi_0$ , равные отношению значения  $\Phi_0$  ДНА в присутствии ДНК к значению  $\Phi_0$  ДНА в воде (т.е. в отсутствии ДНК) (Рис. 60).

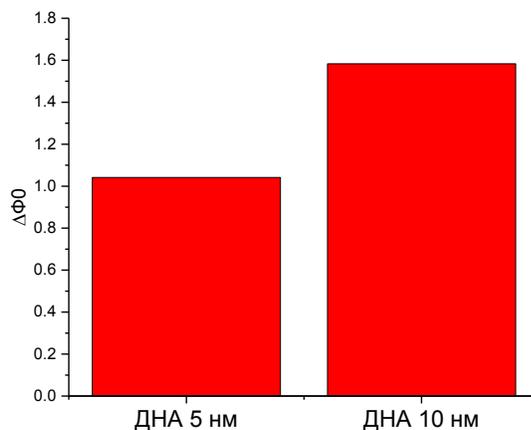


Рис. 60. Диаграмма относительного изменения площади фотолюминесценции наноалмазов - параметра  $\Delta\Phi_0$  – в присутствии и отсутствии ДНК.

Было обнаружено, что в результате взаимодействия цепочек ДНК с поверхностными группами ДНА параметр  $\Phi_0$  не уменьшается по сравнению с параметром  $\Phi_0$  для ДНА в водной суспензии без ДНК. Проведенные расчеты изменения параметра  $\Phi_0$  для каждого ДНА в окружении молекул ДНК показали следующее: для ДНА-СООН 5 нм не было обнаружено значительного изменения параметра  $\Phi_0$  ( $\Delta\Phi_0 = 2\pm 1\%$ ), для ДНА-СООН 10 нм увеличение  $\Phi_0$  составило ( $\Delta\Phi_0 = 49\pm 4\%$ ).

Такое значительное различие в изменении интенсивности флуоресценции исследованных детонационных НА может быть вызвано различиями в процедуре очистки ДНА и последующей функционализации. Для проверки этой гипотезы были получены спектры КР (Рис. 61) порошков исследуемых ДНА, которые показали, что на поверхности ДНА с размером 5 нм осталось некоторое количество  $sp^2$ -гибридизованного углерода (Рис. 61).

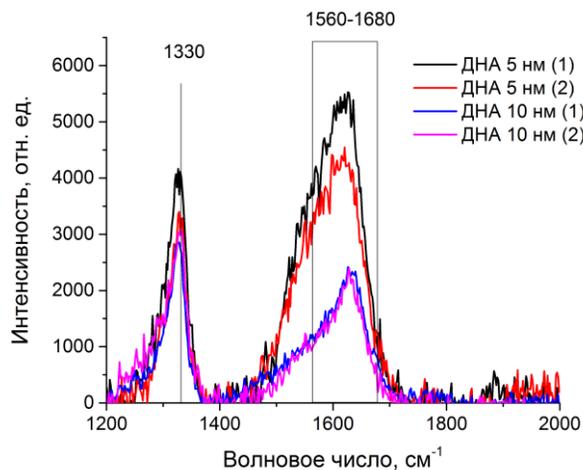


Рис. 61. Спектр КР порошков ДНА 5 и 10 нм. Обозначения (1) и (2) соответствуют двум различным пространственным точкам образца в микроскопе.

У обоих порошкообразных ДНА в спектрах КР наблюдается линия в районе  $1330\text{ см}^{-1}$ , присущая алмазам. ДНА 5 нм фотолюминесцируют гораздо сильнее, чем ДНА 10 нм (Рис. 59). Это может быть вызвано большим количеством  $sp^2$ -гибридизованного углерода на поверхности меньших по размеру ДНА.

Изменение интенсивности фотолюминесценции УНЧ при взаимодействии с цепочками ДНК может быть связано с тем, что последние экранируют поверхностные флуорофоры от молекул воды, которые обычно тушат флуоресценцию.

#### §4.4. Механизмы фотолюминесценции УНЧ

На сегодняшний день не существует теории, описывающей все наблюдаемые экспериментально фотолюминесцентные свойства детонационных наноалмазов. Известно, что макромасштабный алмаз не фотолюминесцирует в видимой области, так как величина его запрещенной зоны составляет 5.49 эВ (226 нм) [171]. Атомы углерода, находящиеся на поверхности наноалмаза, не могут образовывать 4 равноценных связи, в процессе синтеза одна из связей может замыкаться на

соседний поверхностный атом углерода, искажая сетку связей. Эти поверхностные дефекты приводят к образованию уровней в запрещенной зоне. Чем меньше размер наноалмаза, тем больше эти дефекты влияют на его свойства. Ситуация с ДНА особенна тем, что при синтезе на разорванную связь поверхностных атомов углерода присоединяются различные функциональные группы, в том числе, кислородсодержащие группы, которые являются причиной графитизации углерода, то есть наличия на поверхности некоторого количества углерода с  $sp^2$  гибридизацией.

Одной из гипотез природы фотолюминесценции ДНА является гипотеза о фотолюминесценции комплекса «углерод ДНА – функциональная группа» [172]. Фотолюминесценция этих комплексов обусловлена флуорофорами с электронными уровнями в запрещенной зоне ДНА, образованными различными поверхностными группами. Переходы электронов между возбужденными и основными состояниями этих уровней обуславливают фотолюминесцентные свойства наноалмазов. Причем, различным функциональным поверхностным группам соответствуют флуорофоры с различными фотолюминесцентными свойствами. Наблюдаемый спектр фотолюминесценции ДНА представляет собой суперпозицию спектров фотолюминесценции этих флуорофоров.

В настоящей диссертационной работе наличие различных флуорофоров комплекса «углерод ДНА – функциональная группа» для различных функциональных групп было подтверждено нами методами лазерной спектроскопии КР и фотолюминесценции (§4.1,4.2), а также методом пикосекундной спектроскопии с временным разрешением фотолюминесценции ДНА (п. 4.1.2).

Таким образом, мы предлагаем следующую модель влияния взаимодействий поверхностных групп ДНА с молекулами окружения на фотолюминесцентные свойства ДНА. В данной работе экспериментально и теоретически показано, что взаимодействие поверхностных функциональных групп ДНА с молекулами окружения (например, с молекулами воды (§4.3) или биомакромолекулами (§4.4)) происходит, по большей части, посредством водородных связей. Электростатическая природа водородных связей позволяет предположить, что под действием образованных водородных связей между поверхностными функциональными группами ДНА и молекулами воды в комплексе «углерод ДНА – функциональная группа» вследствие переноса заряда происходит изменение/смещение поверхностных электронно-возбужденных состояний. Именно таким смещением уровней объясняется обнаруженное нами влияние силы водородных связей на интенсивность фотолюминесценции ДНА с различным функциональным покровом.

В воде вокруг ДНА образуется равномерная однородная сетка сильных водородных связей. В метаноле и этаноле водородные связи гораздо слабее, кроме того, самих водородных связей в них меньше, чем в том же объеме воды. Поэтому сеть водородных связей, которую образуют молекулы этих растворителей с поверхностными функциональными группами ДНА, неплотная и неоднородная. В результате перенос заряда между поверхностью ДНА и молекулами воды происходит гораздо активнее, чем в метаноле и, тем более, в этаноле. В результате сдвиг энергетических уровней поверхностных состояний комплекса «углерод ДНА-функциональная группа» в воде оказывается большим по сравнению с более "размытым" сдвигом в растворителях со слабыми неравномерными водородными связями. Поэтому интенсивность фотолюминесценции ДНА в суспензиях при одних и тех же концентрациях наночастиц соответствует силе водородных связей в растворителях, а именно, возрастает с ослаблением водородных связей в ряду: вода, метанол, этанол, изопропанол.

Аналогичное объяснение обнаруженному влиянию силы водородных связей в суспензиях на интенсивность фотолюминесценции можно привести и для других углеродных наночастиц – оксидов графена.

Полученные в настоящей главе результаты позволяют сделать вывод о возможности управления фотолюминесцентными свойствами НА посредством функционализации поверхности НА (§4.1). При наличии возможности создания ДНА с поверхностью, функциональный покров которой может контролироваться, можно создавать ДНА с заранее заданной комбинацией свойств.

#### ***Заключение к Главе 4***

В Главе 4 экспериментально было установлено существенное влияние взаимодействий наночастиц с молекулами окружения на фотолюминесцентные свойства УНЧ. Обнаружено, что сила водородных связей в суспензиях наночастиц существенно влияет на интенсивность фотолюминесценции ДНА: наночастицы, функциональное покрытие которых сильнее всего ослабляют водородные связи в суспензиях, имеют большее значение интенсивности фотолюминесценции. Таким образом, функционализация поверхности ДНА может быть использована для управления фотолюминесцентными свойствами ДНА в суспензиях.

Выдвинута гипотеза о механизмах фотолюминесценции комплекса «углерод ДНА – функциональная группа», согласно которой в результате присоединения к поверхностному углероду НА различные функциональные группы образуют поверхностные электронно-

возбужденные состояния, обеспечивающие фотолюминесценцию соответствующих флуорофоров. Эта гипотеза подтверждается полученными в работе результатами лазерной спектроскопии КР и фотолюминесценции (§4.1,4.2), а также методом пикосекундной спектроскопии с временным разрешением фотолюминесценции ДНА (п. 4.1.2).

В результате исследования взаимодействий ДНА с цепочками ДНК было показано, что интенсивность фотолюминесценции ДНА при взаимодействии с цепочками ДНК не уменьшается по сравнению с фотолюминесценцией в отсутствие взаимодействий, т.е. биомакромолекулы слабее тушат фотолюминесценцию ДНА-СООН по сравнению с молекулами воды. Это очень важный вывод, позволяющий говорить о перспективах использования ДНА в качестве фотолюминесцентных маркеров для задач биомедицины.

## ГЛАВА 5. НАНОАЛМАЗЫ КАК АДСОРБЕНТЫ В БИОМЕДИЦИНЕ

Благодаря возможности целенаправленной функционализации или модификации поверхности НА, одной из возможных функций многофункционального углеродного маркера является адресная доставка лекарственных препаратов или адсорбция вредных веществ на свою поверхность с целью дальнейшего выведения их из организма. Очевидно, что для эффективного использования УНЧ в этом качестве необходимо всестороннее исследование сорбционных свойств поверхности наночастиц по отношению к окружению, в том числе, различным ионам, белкам, молекулам ДНК, лекарствам, - другими словами, изучение взаимодействий поверхностных групп наночастиц с указанными веществами. Знание механизмов таких взаимодействий обеспечит надежное удержание препарата на поверхности наночастиц, высокую селективность адсорбции вредных веществ и эффективное выведение их из организма. Кроме того, изучение указанных механизмов позволит разработать подходы к управлению адсорбционными свойствами углеродных наночастиц.

### **§5.1. Адсорбционные свойства детонационных НА по отношению к ионам неорганических солей**

В данной части работы исследовались адсорбционные свойства ДНА по отношению к ионам тяжелых металлов – меди и свинца - и нитрат-анионам. Выбор указанных ионов тяжелых металлов и нитратов связан с необходимостью вывода их из организма при превышении ими предельно допустимой концентрации. В качестве адсорбента этих ионов предлагается использовать ДНА, которые одновременно с ролью адсорбента будут выполнять роль флуоресцентных биомаркеров. Следует заметить, что ДНА в качестве адсорбентов ионов могут использоваться не только в медицине. Во многих технологических процессах необходимо поддерживать в производимом материале определенный уровень примесей неорганических солей, в том числе, нитратов и солей меди. В этом случае в качестве адсорбента удобно использовать именно ДНА благодаря их высокой механической, гидролитической и термической стабильностям.

При проведении экспериментов и получении результатов в данной Главе были выработаны некоторые общие подходы, использованные и в других исследованиях по изучению адсорбционных свойств ДНА. Остановимся на этих общих подходах.

#### **5.1.1. Общие подходы в изучении адсорбционных свойств наночастиц**

1). Принципиальная последовательность эксперимента по адсорбции заключается в следующем:

1. Приготовление исходных водных суспензий ДНА и водных растворов адсорбтива с известными концентрациями.

1.1. Характеризация приготовленных водных суспензий ДНА: измерение рН и размеров агрегатов методом ДСР.

1.2. Получение спектров КР (или спектров поглощения) приготовленных растворов адсорбтива для контроля концентрации адсорбтива/адсорбата по заранее полученным калибровочным зависимостям интенсивности характеристических спектральных линий КР (или по величине оптической плотности характерных полос в спектрах поглощения) каждого вещества от его концентрации в растворе.

1.3. Спектроскопия ИК поглощения выпаренных из суспензий ДНА для анализа функционального покрова наночастиц.

2. Реализация процесса адсорбции адсорбтива на поверхность НА.

2.1. Приготовление смесей – сливание вместе водных суспензий ДНА и растворов адсорбтива с известными концентрациями в известных пропорциях.

2.2. Отстаивание смесей-суспензий с постоянным помешиванием.

2.3. Фильтрация водных смесей-суспензий: выделение из них адсорбента с адсорбатом и супернатанта путем центрифугирования.

3. Повторное суспензирование

3.1 Добавление буферного раствора в объеме, равном объему изъятого супернатанта и повтор шагов 2.2, 2.3 для того, чтобы удостовериться, что изменение концентрации адсорбтива в первичном супернатанте обусловлено адсорбцией на НА, а не оседанием в процессе центрифугирования.

4. Анализ супернатантов.

4.1. Получение спектров КР выделенных супернатантов (первичного и вторичного) и определение концентрации неадсорбированного вещества в супернатантах по калибровочным прямым (см. п.1.2. настоящего списка).

4.2. Расчет и сравнительный анализ адсорбционной активности ДНА по отношению к адсорбируемому веществу. Под адсорбционной активностью в нашем случае мы понимаем

величину, равную отношению количества адсорбированного вещества, приходящуюся на суммарную адсорбирующую поверхность к площади этой поверхности.

Схематичное отображение описанной последовательности с используемыми на каждом этапе методами изображено на Рис. 62.

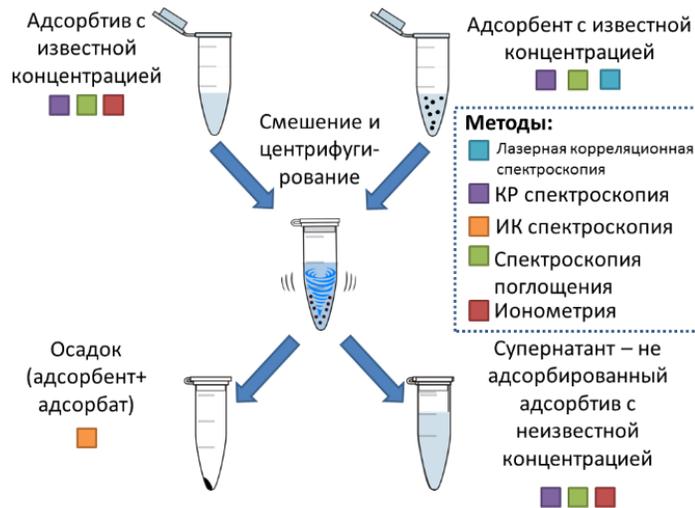


Рис. 62. Принципиальная последовательность-схема эксперимента при исследовании адсорбционных свойств ДНА.

## 2). Методы определения концентрации ионов в растворах

Для определения концентрации ионов в супернатантах применялись два метода, а именно: лазерная спектроскопия КР и абсорбционная спектроскопия. Применение комплекса методов обусловлено трудностью получения значений концентраций для каждого конкретного случая (простые ионы, такие как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , не имеют характерных линий колебаний в спектрах КР).

Определение концентрации ионов по спектрам КР заключалось в предварительном получении спектров КР растворов солей с известными концентрациями и построении калибровочной зависимости интенсивности характеристических линий от концентрации соли (Рис. 63) для определения концентрации ионов в супернатанте. Известно, что интенсивность линии колебаний в спектре КР линейно зависит от концентрации исследуемого вещества. Нитрат-ионы имеют интенсивную линию колебаний в районе  $1050 \text{ см}^{-1}$  [173], которая соответствует валентным колебаниям N-O. Именно эта линия была использована для определения концентрации нитрат-ионов в дальнейшем.

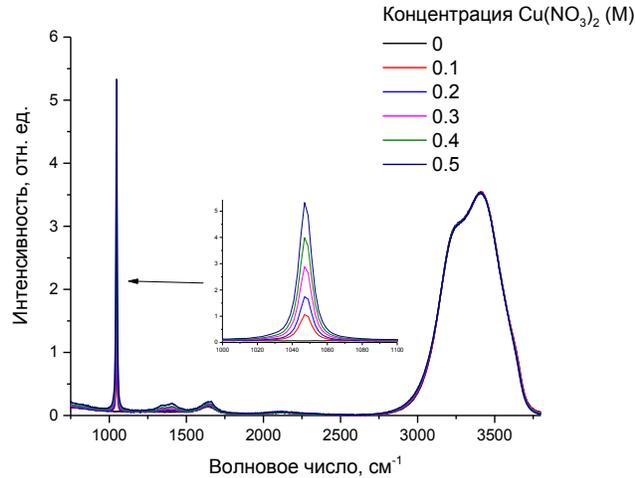


Рис. 63. Спектры КР водных растворов  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  различных концентраций.

Содержание ионов меди и свинца определялось по спектрам поглощения супернатантов. Предварительно были получены спектры растворов солей с известными концентрациями и построены калибровочные зависимости (Рис. 64). Согласно литературным данным [174], ионы свинца имеют полосу поглощения в районе 200 нм, а ионы меди – в районе 808 нм. С учетом интенсивностей этих полос по закону Бугера-Ламберта-Бера определялись концентрации указанных ионов.

$$I(l) = I_0 e^{-k_\lambda l} = I_0 e^{-\kappa_\lambda c l},$$

где  $I(l)$  – интенсивность света на выходе из поглощающей среды,  $I_0$  – интенсивность света на входе в среду,  $l$  – толщина слоя поглощающего вещества,  $k_\lambda$  – показатель поглощения, характеризующий свойство вещества (зависит от длины волны  $\lambda$ ),  $\kappa_\lambda$  – коэффициент, не зависящий от концентрации поглощающего вещества и характеризующий взаимодействие молекулы поглощающего вещества со светом с длиной волны  $\lambda$ ,  $c$  – концентрация растворенного вещества.

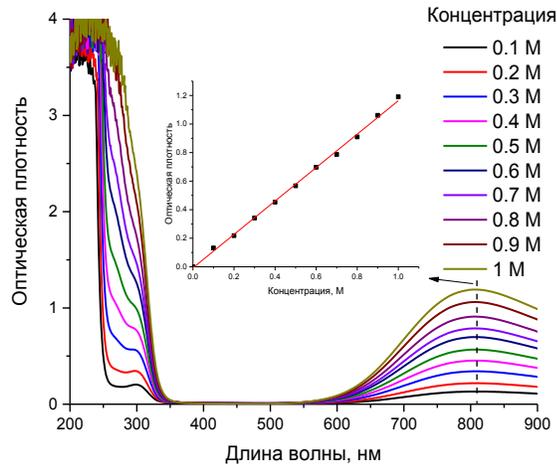


Рис. 64. Спектры поглощения растворов нитратов меди с известными концентрациями и построенная калибровочная зависимость. Точность определения концентрации  $10^{-3}$  М.

### 3). Адсорбционная активность наночастиц

Адсорбционную активность мы определяли как отношение количества адсорбированного вещества к суммарной площади адсорбционной поверхности. Площадь адсорбционной поверхности наночастицы определялась с учетом гидродинамических размеров частиц, полученных методом корреляционной лазерной спектроскопии (ДСР). Суммарная площадь адсорбирующей поверхности определялась в приближении того, что частицы адсорбента представляют собой шары с известным радиусом. Руководствуясь данными, полученными в [175], мы считали, что в данном случае можно пренебречь наличием пор и не учитывать их вклад в суммарную величину площади поверхности адсорбента.

#### 5.1.2. Влияние функционализации поверхности ДНА на его адсорбционные свойства по отношению к ионам неорганических солей

Для изучения адсорбции ионов неорганических солей использовались водные суспензии наноалмазов I6 с полифункциональной поверхностью и I6-COOH с поверхностными карбоксильными группами, а также водные растворы неорганических солей  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  и  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Были приготовлены исходные водные растворы нитратов меди и свинца с концентрациями 0.5 М и 0.75 М, а также исходные водные суспензии наноалмазов I6 и I6-COOH с концентрациями 0.5 г/л. Дальнейшая последовательность эксперимента описана в п. 5.1.1.

С помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии было обнаружено, что размеры функционализированных НА I6-COOH почти в три раза больше, чем у исходных (190 нм против 64.5 нм). Это значит, что при использовании этих наночастиц в водных суспензиях с одинаковой концентрацией, суммарная площадь поверхности карбоксилированных НА будет примерно в три раза меньше, чем у исходных НА. Результаты определения концентрации ионов в полученных после адсорбции супернатантах представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Концентрация исследуемых ионов в супернатантах после адсорбции.

Образец	Концентрация NO <sub>3</sub> , М *	Концентрация ионов Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , М
I6+Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.5 М	0.24/0.23	0.19
I6COOH+Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.5 М	0.24/0.25	0.18
I6+Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.75 М	0.33/0.37	0.27
I6+Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.75 М	0.32/0.26	0.25
I6+Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.5 М	0.21/0.26	0.16
I6COOH+Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.5 М	0.17/0.21	0.10
I6+Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.75 М	0.27/0.26	0.24
I6COOH+Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.75 М	0.25/0.22	0.24

\*первое значение соответствует концентрации, определенной методом поглощения, второе – с помощью КР

Как видно из представленной Таблицы, концентрации ионов в супернатантах, полученных после адсорбции исходными и функционализированными НА, имеют похожие значения. Расчет значения адсорбционной активности показывает, что эта величина почти в 3 раза больше для карбоксилированных НА. Для того, чтобы определить, насколько эффективным может считаться использование НА в качестве адсорбента, было проведено сравнение их адсорбционных свойств со свойствами широко известного адсорбента – активированного угля. Результаты представлены в Таблице 8.

Таблица 8. Сравнение адсорбционной активности УНЧ в водных суспензиях.

Объект	Адсорбционная активность к иону, *10 <sup>3</sup> М/см <sup>2</sup>			
	Cu <sup>2+</sup> в нитрате	Pb <sup>2+</sup> в нитрате	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> в нитрате меди	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> в нитрате свинца
I6	5.39	5.73	3.88	4.04
I6COOH	14.18	17.73	10.64	11.08
Активированный уголь	3.15	Не опр.	6.65	8.41

Как видно из приведенной таблицы, величина адсорбционной активности карбоксилированных НА больше, чем у других рассматриваемых УНЧ. Из этого можно сделать вывод о том, что функционализация поверхности НА карбоксильными группами улучшает их сорбционные свойства. Адсорбционная активность активированного угля по отношению к исследованным ионам практически такая же, что и адсорбционная активность I6, но слабее адсорбционной активности карбоксилированного НА. Полученные результаты в некоторой степени противоречат данным авторов [115,176,177], которые утверждают, что НА адсорбируют намного эффективнее угля, но подтверждают результаты авторов [178]. Эти результаты очень оптимистичны и важны для нас, так как в наших исследованиях, помимо адсорбента, ДНА выступает одновременно и в роли фотолюминесцентного маркера. Так как уголь не обладает фотолюминесцентными свойствами, то одинаковая адсорбционная активность угля и ДНА дает серьезное преимущество в применении ДНА в биомедицине.

### **5.1.3 Исследование механизмов адсорбции ионов неорганических солей на поверхность наноалмазов**

Для изучения механизмов адсорбции регистрировались спектры ИК порошков, полученных после выпаривания осадка «адсорбент+адсорбат», образованного после адсорбции и центрифугирования  
Рис. 65.

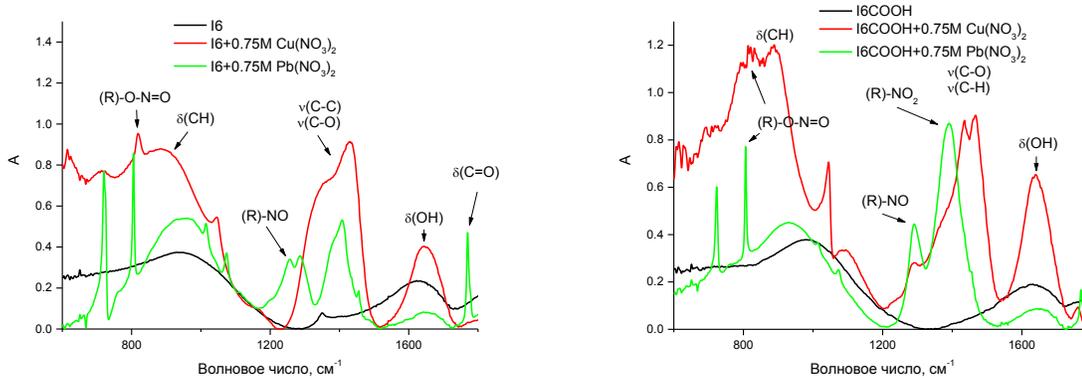


Рис. 65. Спектры ИК порошков адсорбат+адсорбент, полученные после центрифугирования смеси НА+адсорбтив.

Для расшифровки полученных ИК спектров в Таблице 9 приведены положения линий колебаний всевозможных связей в исследованных нами соединениях.

Таблица 9. Линии ИК и их расшифровка [179-181].

Частота, $\text{см}^{-1}$	Колебание	Частота, $\text{см}^{-1}$	Колебание
462	Pb-O	1049	$\text{ONO}_2^-$
675	Cu-O-H	1100	C-O-C
708	$\text{ONO}_2^-$	1300-1100	C-O
710-690	$\text{NO}_2$	1220-1020	C-N
712	$\text{ONO}_2^-$	1170-1045	$\text{NO}^-$
784	Cu-O-H	1300-1255	$\text{NO}_2$
840-800	$\text{NO}_2^-$	1360-1250	C-N
878	Cu-O-H	1430	C-O-H
870-840	N-O	1615-1565	C=N
930	C-O-H	1660-1620	N=O
1000-600	=C-H	1780-1740	C=O

По анализу изменения ИК спектров (появление/исчезновение линий) можно сделать вывод об образовании или исчезновении химических связей – в нашем случае, о возможной химической адсорбции ионов на поверхность ДНА. Известно, что в водных растворах нитрат-ионы не связываются друг с другом, не образуют кластеры, и все связи N=O являются двойными. В спектрах ИК адсорбент+адсорбат присутствуют линии, соответствующие как одинарным N-O связям, так и двойным N=O связям. Из этого можно сделать вывод о химической природе адсорбции нитрат-ионов на поверхность НА.

Новых линий, обусловленных колебаниями связей ионов меди с какими-нибудь поверхностными молекулярными группами НА (Cu-O, Cu-OH и др., см. Таблицу 9), ни в одном из ИК спектров порошков обнаружено не было. Эти результаты свидетельствуют о том, что наиболее вероятный механизм адсорбции катионов меди на поверхность НА - физический, без образования валентных связей. К сожалению, наша аппаратура не позволила зарегистрировать частотный диапазон, в котором находятся колебательные линии групп Pb-O, Pb-OH и т.д.

Из полученных данных можно сделать следующие выводы:

- 1) Ионы исследованных солей по-разному адсорбируются на поверхность ДНА.
- 2) Выявлена одновременная адсорбция нитрат-анионов и катионов.
- 3) Выявлены механизмы адсорбции ионов на поверхность ДНА – катионы меди адсорбируются без образования новой химической связи, а нитрат-анионы – посредством химической адсорбции.

## **§5.2. Адсорбционные свойства ДНА по отношению к молекулам ДНК**

### **5.2.1. Адсорбционные свойства ДНА по отношению к азотистым основаниям ДНК**

Понимание механизмов взаимодействия УНЧ с биологическим окружением чрезвычайно важно для их эффективного использования в задачах наномедицины. В настоящем параграфе рассматривается адсорбция азотистых оснований (АО) ДНК на поверхность карбоксилированных ДНА.

В качестве объектов исследования использовались детонационные наноалмазы с поверхностью, функционализированной карбоксильными группами (ДНА-COOH 10 нм), и азотистые основания (АО) ДНК - аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т) и цитозин (Ц) - фирмы SERVA. Для приготовления водных суспензий ДНА и АО ДНК использовалась деионизованная бидистиллированная вода (удельная электропроводность 0.1 мСм/см, pH=6.9).

Параллельно проводились два эксперимента по адсорбции АО ДНК на поверхность ДНА:

- 1). Для водных растворов А, Т и Ц с концентрациями 1.35 г/л, 1.26 г/л и 1.11 г/л, соответственно (показатель pH = 7.4-7.6). Концентрации АО были выбраны таким образом, чтобы, во-первых, обеспечить одинаковое количество молекул АО, приходящееся на один НА, и, во-вторых, чтобы эти концентрации были обнаружимы с помощью метода КР с хорошей точностью определения концентрации.

2). Для водных растворов А, Т, Ц и Г с концентрациями 4 г/л, 4 г/л, 4 г/л и 5 г/л, соответственно (показатель рН = 13.4). Чтобы обеспечить растворимость гуанина во втором эксперименте, во все растворы была добавлена щёлочь NaOH с концентрацией 0.5 М [182]. Концентрации АО были выбраны таким образом, чтобы обеспечить одинаковое количество молекул АО, приходящееся на один НА.

В обоих экспериментах начальная концентрация ДНА в водной суспензии составляла 2 г/л. Методом ДСР было получено, что размеры наноалмазных агрегатов в приготовленной водной суспензии составляют 10 нм.

Концентрации АО в растворах (до и после адсорбции) в экспериментах определялись с помощью лазерной спектроскопии КР - по зависимостям интенсивности их характеристических линий-маркеров в спектре КР от концентрации каждого из них в растворе. На Рис. 66 приведены полученные низкочастотные области спектров КР водных растворов (с добавлением NaOH) А, Т, Ц и Г с концентрацией 5 г/л и отмечены характеристические линии-маркеры каждого из АО: аденин – 704-771  $\text{см}^{-1}$ , тимин – 742-804  $\text{см}^{-1}$ , цитозин – 769-831  $\text{см}^{-1}$ , гуанин – 1255-1303  $\text{см}^{-1}$ .

В работе были получены зависимости интенсивности линий-маркеров А, Т и Ц от их концентрации в воде в диапазоне от 0 до 1.03 г/л, 1.26 г/л и 1.11 г/л, соответственно, с шагом по концентрациям для А и Т 0.13 г/л, для Ц – 0.11 г/л. Затем были построены такие же для всех АО в воде с добавлением NaOH в диапазоне от 0 до 5 г/л с шагом по концентрации 0.5 г/л. Оказалось, что все построенные зависимости хорошо аппроксимируются прямыми (Рис. 67). Причем, зависимости интенсивностей линий-маркеров от концентрации соответствующих АО в воде и в воде с добавлением NaOH практически совпали в соответствующих диапазонах концентраций АО. Ошибка определения концентрации составила: для аденина – 0.03 г/л; для гуанина – 0.05 г/л; для цитозина – 0.03 г/л; для тимина – 0.04 г/л.

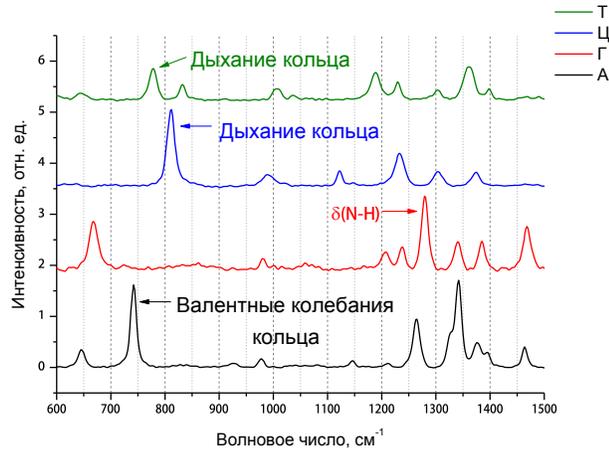


Рис. 66. Низкочастотные области спектров КР водных растворов азотистых оснований ДНК с концентрацией 5 г/л (рН = 13.4).

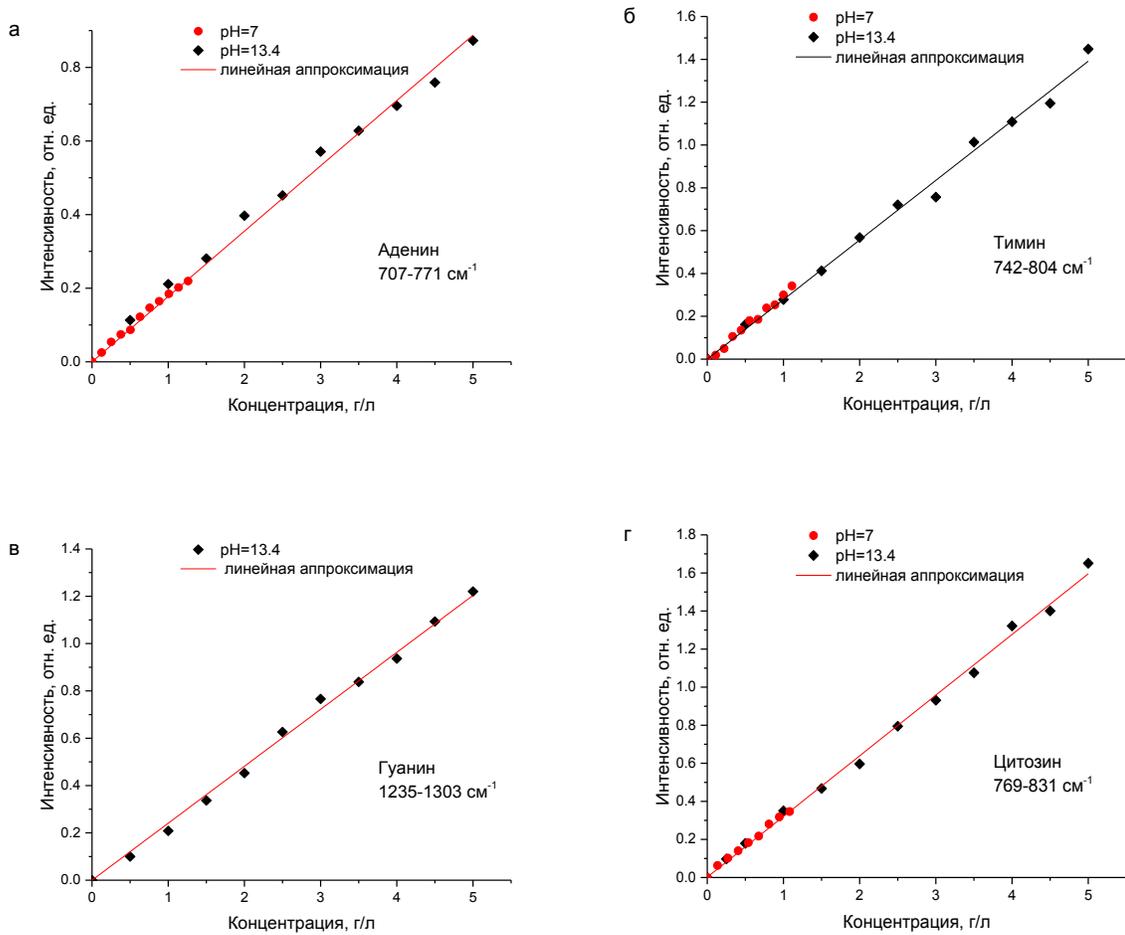


Рис 67. Калибровочные зависимости интенсивностей линий-маркеров АО от концентрации АО в околонеutralном диапазоне рН и щелочной среде.

С учетом значений концентраций АО в супернатантах, полученных после адсорбции, и размеров ДНА были рассчитаны величины адсорбционной активности ДНА по отношению к отдельным АО в обоих экспериментах (см.п.5.1.1.). Результаты расчетов адсорбционной активности представлены на диаграмме Рис. 68. Можно считать, что адсорбционная активность ДНА по отношению к тимину и аденину в пределах ошибки совпадают.

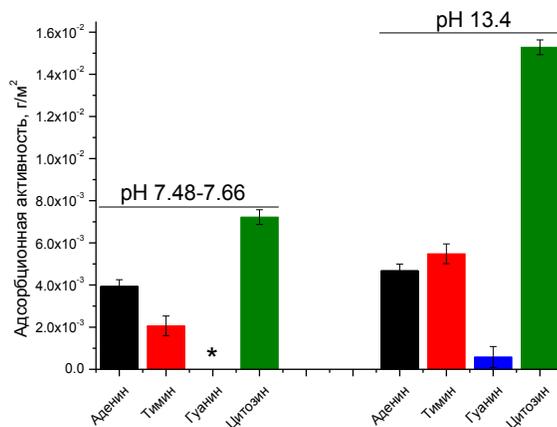


Рис. 68. Диаграмма адсорбционной активности ДНА по отношению к отдельным АО. \* - не определялось.

На основании полученных данных были выделены следующие ряды в порядке убывания адсорбционной активности ДНА по отношению к отдельным азотистым основаниям ДНК в щелочной и водной средах:

$$\text{цитозин} > \text{тимин} \sim \text{аденин} > \text{гуанин} \text{ (щелочная среда)} \quad (4.1)$$

$$\text{цитозин} > \text{аденин} > \text{тимин} \text{ (водная среда)} \quad (4.2)$$

К сожалению, мы не нашли ни теоретических, ни экспериментальных данных по исследованию адсорбции АО ДНК на поверхность наноалмазов. Имеются литературные данные по адсорбции АО ДНК на поверхность других углеродных наночастиц, а именно, углеродных нанотрубок [183-188] и графена [184,189-191], в которых получены следующие ряды по энергии взаимодействия АО ДНК с поверхностью указанных наноматериалов:

$$\text{гуанин} > \text{аденин} > \text{тимин} > \text{цитозин} \quad (4.3) \text{ углеродные трубки, графен [191]}$$

$$\text{гуанин} > \text{аденин} \sim \text{тимин} > \text{цитозин} \quad (4.4) \text{ углеродные трубки [192]}$$

$$\text{тимин} > \text{цитозин} > \text{аденин} > \text{гуанин} \quad (4.5), \text{ углеродные трубки [188]}$$

гуанин > тимин > цитозин > аденин (4.6), углеродные трубки [192]

аденин > тимин > цитозин > гуанин (4.7), углеродные трубки [192]

гуанин > тимин > аденин > цитозин (4.8), углеродные трубки [183]

Знаки > и ~ между А и Т соответствуют различным параметрам, задаваемым при проведении вычислений (разная пространственная оптимизация, различная хиральность углеродных нанотрубок и т.д.) [192].

Как видно, последовательность АО ДНК в указанных рядах (4.3) – (4.8) различается даже для одних и тех же углеродных материалов. Сравнивая результаты, полученные в рамках выполнения данной работы, с результатами, полученными для других углеродных наночастиц, можно сделать вывод, что адсорбция АО на поверхность ДНА отличается от адсорбции на поверхность других углеродных наноматериалов.

### **5.2.2. Адсорбция комплементарных пар азотистых оснований ДНК на поверхность детонационных наноалмазов**

Аналогичные эксперименты были проведены по исследованию адсорбции комплементарных пар азотистых оснований ДНК (А+Т) при рН = 7.48-7.66 в водной среде и (А+Т) и (Г+Ц) при рН = 13.4 в щелочной среде на поверхность детонационного наноалмаза. Для этого были приготовлены водные раствора АО ДНК с концентрациями А - 1.09 г/л и Т - 1.01 г/л (концентрации подбирались таким образом, чтобы обеспечить одинаковое количество молекул каждого АО, то есть, чтобы не оставалось АО, не образовавших комплементарную пару), водно-щелочные растворы АО с концентрациями А - 2 г/л, Т - 1.9 г/л, Г - 2 г/л, Ц - 1.5 г/л (концентрации подбирались таким образом, чтобы обеспечить одинаковое количество молекул каждого АО, то есть, чтобы не оставалось АО, не образовавших комплементарную пару) и водная суспензия НА с концентрацией 2 г/л.

Результаты измерений с помощью лазерной спектроскопии КР концентрации АО ДНК после адсорбции на поверхность наноалмаза представлены на Рис. 69.

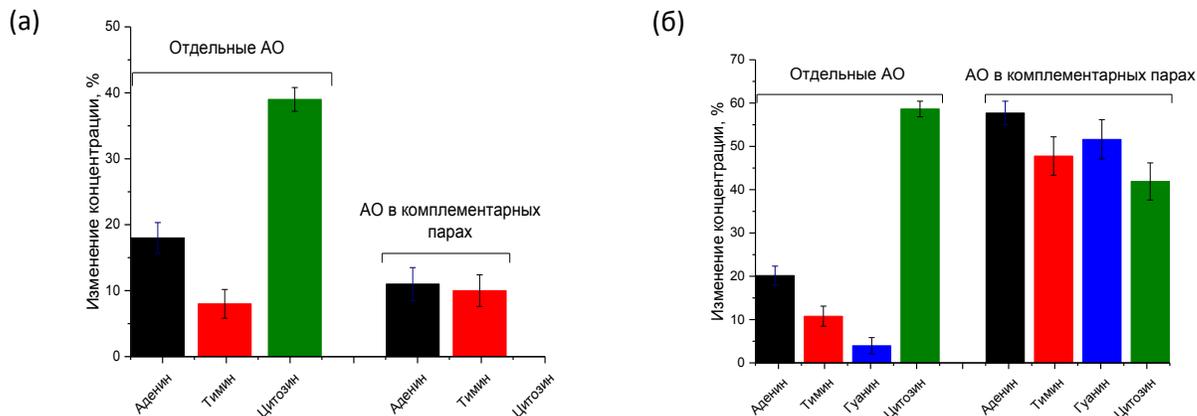


Рис. 69. Диаграммы изменения концентрации АО ДНК в растворах одиночных АО и комплементарных пар АО в результате адсорбции на поверхность ДНА в течение двух часов по сравнению с начальной концентрацией: а) в водной среде (рН = 7.48-7.66); б) в щелочной среде (рН = 13.4).

Из полученных результатов следует, что при адсорбции АО в составе комплементарных пар на поверхность ДНА в воде концентрация каждого из АО уменьшилась относительно начальной следующим образом: а) в водной среде А – на 11%, Т – на 10%; б) в щелочной среде А – на 58%, Г – на 55%, Ц – на 45%, Т – на 50%. Сравнительный анализ полученных экспериментальных результатов показал, что адсорбционные свойства отдельных АО и АО, связанных в комплементарные пары, существенно различаются (Рис. 69). В обоих экспериментах в случае адсорбции отдельных АО аденин адсорбируется больше, чем тимин. А соединенные водородными связями в пару А и Т адсорбируются на поверхность ДНА примерно одинаково. Аналогичная ситуация наблюдается и для пары (Г+Ц). В несвязанном состоянии гуанин практически не адсорбируется на поверхность ДНА, а цитозин адсорбируется лучше всех. В комплементарной паре и гуанин, и цитозин адсорбируются примерно одинаково. Это может означать, что при адсорбции в растворе, в котором присутствует пара, аденин адсорбируется вместе с тимином, а цитозин адсорбируется вместе с гуанином. То есть при взаимодействии с ДНА комплементарные пары не разрушаются – не происходит разрыва водородных связей между составляющими комплементарных пар.

Различие в количестве адсорбированных пар в водной и щелочной средах связано с изменением водородного показателя среды. Подобный эффект отмечался авторами [193,194]: при увеличении значения рН адсорбция доксорубицина [193] и ряда органических молекул (фенол, анилин, о-

аминофенол, нитробензол и др.) [194] на поверхность карбоксилированных ДНА происходит активнее.

### 5.2.3. Изучение механизмов адсорбции АО ДНК и их комплементарных пар на поверхность ДНА

Механизмы адсорбции комплементарных пар АО ДНК на поверхность наноалмазов исследовались посредством анализа экспериментальных спектров ИК поглощения адсорбента с адсорбатом и теоретически рассчитанных спектров ИК поглощения молекулярного комплекса «комплементарная пара АО – алмазоподобная наночастица с поверхностными группами -COOH» в окружении молекул воды.

#### 1). Спектроскопия ИК поглощения комплексов ДНА и адсорбированных АО ДНК

Как уже указывалось выше, в эксперименте по адсорбции отдельных АО ДНК и их комплементарных пар на поверхность ДНА были получены спектры ИК поглощения всех выделенных осадков – ДНА с адсорбированными на них АО. В качестве примера на Рис. 70 приведены спектры ИК поглощения осадков ДНА-COOH, комплементарной пары (A+T) и комплекса (ДНА-COOH)+(A+T).

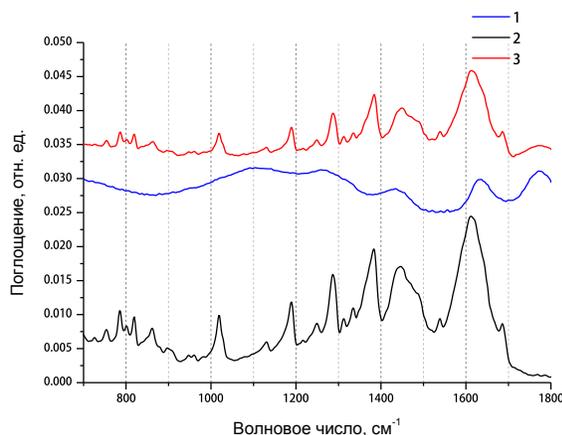


Рис. 70. Экспериментальные спектры ИК поглощения выпаренных из растворов ДНА+COOH (1), комплементарной пары (A+T) (2) и осадка (A+T)+(ДНА-COOH) после адсорбции A+T на поверхность ДНА (3).

Анализ полученных ИК спектров показывает, что в ИК спектрах адсорбентов с адсорбатами не появляется никаких новых линий по сравнению со спектрами ДНА-COOH и комплементарных пар

(А+Т) и (Ц+Г). Отсюда следует, что АО и их комплементарные пары взаимодействуют с поверхностью карбоксилированного ДНА посредством физической адсорбции.

## 2). Квантово-химические расчеты комплексов ДНА и адсорбированных АО ДНА

Совместно с сотрудниками кафедры «Информационной безопасности автоматизированных систем» Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А. Пластун И.Л. и Бокаревым А.Н. были проведены квантово-химические расчеты взаимодействий АО ДНК с поверхностными группами ДНА. Подробно методология расчетов изложена в п. 3.1.4. Стоит отметить, что для учета ангармонизма во взаимодействиях были выведены и использованы следующие масштабирующие множители для рассчитанных частот: 0.9713 (диапазон 0 — 1000  $\text{см}^{-1}$ ); 0.9744 (диапазон 1000 — 2000  $\text{см}^{-1}$ ); 0.956 (диапазон выше 2000  $\text{см}^{-1}$ ). В качестве модели наноалмаза с поверхностными карбоксильными группами, как и раньше, использовалась 1,3,5,7-адамантантетракарбоновая кислота. Далее при описании теоретических расчетов мы будем по-прежнему использовать обозначения ДНА или ДНА-СООН, подразумевая, что в качестве расчетной модели использовалась 1,3,5,7 - адамантантетракарбоновая кислота.

Были рассчитаны оптимизированные структуры комплементарной пары (А+Т), ДНА-СООН и комплекса (А+Т)+(ДНА-СООН) в окружении молекул воды (Рис. 71 а-г). Исследовалась возможность присоединения комплементарной пары к 1,3,5,7-адамантантетракарбоновой кислоте в двух вариантах - через тимин и через аденин. Как известно из литературных данных [195], при образовании комплементарной пары между аденином и тиминем возникают две водородных связи. Именно такая конфигурация комплементарной пары (А+Т) получилась в результате проведенных расчетов (связи 1 и 2, Рис. 71 а,в,г) с учетом окружающих пару (А+Т) молекул воды. Для комплекса комплементарной пары (А+Т) с ДНА-СООН, окруженного 6 молекулами воды, расчеты показали, что пара (А+Т) может присоединиться к молекуле карбоксилированного ДНА и через тимин, и через аденин. При этом между комплементарной парой и ДНА образуются две водородных связи - 3<sup>в</sup> и 4<sup>в</sup> при присоединении пары через тимин (Рис. 71 в), 8<sup>г</sup> и 9<sup>г</sup> при присоединении пары через аденин (Рис. 71 г), а между аденином и тиминем сохраняются обе водородных связи – 1 и 2 (Рис. 71 а,в,г). Таким образом, численно был смоделирован процесс адсорбции комплементарной пары (А+Т) на поверхность карбоксилированного ДНА в окружении 6 молекул воды. В дальнейшем количество окружающих комплекс молекул воды будет значительно увеличено. На основе рассчитанных спектров ИК поглощения отдельно комплементарной пары (А+Т), ДНА и молекулярного комплекса (А+Т)+(ДНА-СООН) в окружении 6 молекул воды был проведен анализ динамики изменения значений геометрических

параметров водородных связей между молекулами в процессе образования комплекса (А+Т)+(ДНА-СООН). Результаты расчетов представлены в Таблице П1. Номера водородных связей соответствуют нумерации связей на Рис. 71.

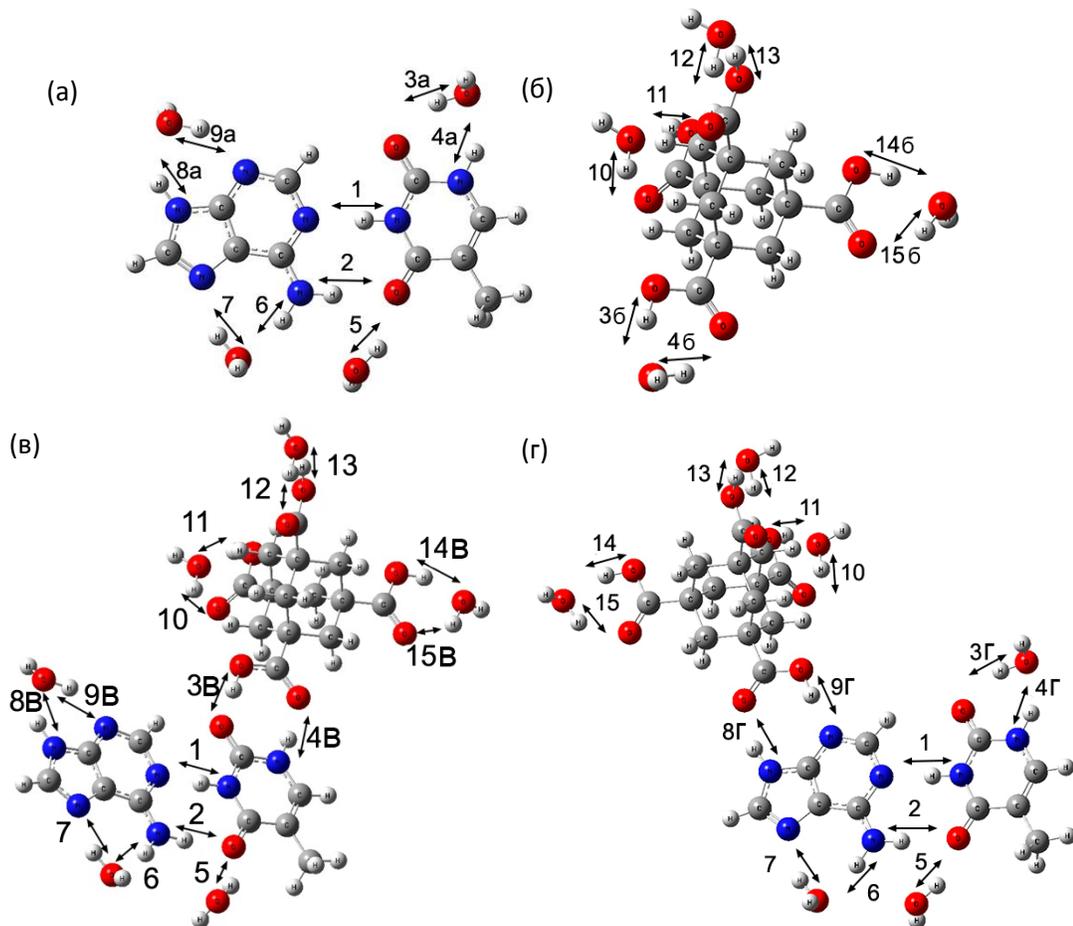


Рис. 71. Оптимизированные структуры комплементарной пары А+Т (а), ДНА-СООН (б), молекулярного комплекса (А+Т)+(ДНА-СООН) (для случая присоединения комплементарной пары к ДНА через тимин) (в) и молекулярного комплекса (А+Т)+(ДНА-СООН) (для случая присоединения комплементарной пары к ДНА через аденин) (г) в окружении молекул воды.

Для анализа динамики водородных связей (1,2), (3,4), (8,9) и (14,15) в процессе адсорбции комплементарных пар на поверхность ДНА были рассчитаны энергии этих связей (Таблица П2). Энергия связей рассчитывалась по формуле Иогансена [160,161]:  $-\Delta H = 0.3 \cdot \sqrt{\Delta\nu - 40}$ , где  $\Delta\nu$  – изменение частоты валентных колебаний молекулярной группы, являющейся донором при образовании водородных связей между ней и молекулой воды (случаи а и б) или в процессе взаимодействия пары и ДНА (случаи в и г).

Анализ рассчитанных параметров водородных связей в оптимизированных конфигурациях показал следующее:

- Комплементарная пара (А+Т) в присутствии молекул воды адсорбируется на поверхность ДНА-СООН двумя способами:

1) Посредством образования водородных связей между молекулярными группами тимина С-О и N-H и поверхностными карбоксильными группами ДНА О-Н и С-О, соответственно (связи 3<sup>В</sup> и 4<sup>В</sup>, Рис. 71 в). При таком присоединении (А+Т) через тимин наиболее сильной является водородная связь 3<sup>В</sup>. Связь 4<sup>В</sup> также усиливается по сравнению с водородной связью 4<sup>А</sup>.

2) Посредством образования водородных связей между молекулярными группами аденина N-H и С=N и поверхностными карбоксильными группами ДНА С-О и О-Н, соответственно (связи 8<sup>Г</sup> и 9<sup>Г</sup>, Рис. 71 г). При присоединении А+Т через аденин существенно усиливается водородная связь 9<sup>Г</sup>. Связь 8<sup>Г</sup> усиливается незначительно по сравнению с 8<sup>А</sup>. При этом сила водородной связи 9<sup>Г</sup> примерно на 17% больше силы водородной связи 3<sup>В</sup>. Таким образом, в конфигурациях (А+Т)+(ДНА-СООН) более прочным является присоединение комплементарной пары к ДНА через аденин.

- При адсорбции пары (А+Т) на поверхность ДНА-СООН в присутствии молекул воды водородные связи между аденином и тиминем (связи 1 и 2, Рис. 71 а,в,г) не разрушаются, но параметры связей 1 и 2 изменяются. В случае присоединения (А+Т) к ДНА через тимин происходит несущественное усиление связи 1<sup>В</sup> по сравнению с силой этой связи в неадсорбированной паре (А+Т) (1<sup>А</sup>). В случае присоединения (А+Т) к ДНА через аденин водородная связь 1 ослабляется (на 2.4%) по сравнению с 1<sup>А</sup>. Водородная связь 2 в обоих случаях остается практически неизменной.

- Сравнительный анализ сил водородных связей 3<sup>А</sup> и 3<sup>Г</sup>, 4<sup>А</sup> и 4<sup>Г</sup>, а также 8<sup>А</sup> и 8<sup>В</sup>, 9<sup>А</sup> и 9<sup>Г</sup> показывает, что в случае присоединения (А+Т) к ДНА через тимин водородные связи аденина с окружающими молекулами воды не изменяются. И, наоборот: в случае присоединения (А+Т) к ДНА через аденин водородные связи тимина с окружающими молекулами воды не изменяются.

- Сравнение силы водородных связей 14 и 15 между карбоксильными группами ДНА и окружающими молекулами воды показывает, что они практически не изменяются при обоих способах присоединения (А+Т) к ДНА.

- В комплексе адсорбат+адсорбент водородные связи между ДНА и аденином ( $8^Г$  и  $9^Г$ )/тиминном ( $3^В$  и  $4^В$ ) сильнее, чем водородные связи между неадсорбированной парой (А+Т) и молекулами воды ( $3^а$  и  $4^а$ ,  $8^а$  и  $9^а$ , 5,6,7). Следовательно, пара (А+Т) относительно прочно связана с поверхностными карбоксильными группами ДНА.

#### 5.2.4. Взаимодействие ДНА с цепочками ДНК

Для изучения взаимодействий ДНА с цепочками ДНК в качестве объектов исследования использовались ДНК вилочковой железы теленка (Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus) и ДНА с размерами 5 и 10 нм, функционализированные карбоксильными группами (ДНА-СООН). Так как линейные размеры ДНА и используемых молекул ДНК соизмеримы друг с другом, в настоящем параграфе будет употребляться понятие «взаимодействие» вместо «адсорбция» и «мера взаимодействия» вместо «адсорбционной активности».

Схема эксперимента аналогична описанной выше (п.5.1.1). Для эксперимента по исследованию взаимодействия ДНА с цепочками ДНК использовались водные суспензии ДНА с концентрацией 1 г/л и водный раствор ДНК с концентрацией 6.5 г/л. Концентрация ДНК была выбрана таким образом, чтобы можно было с удовлетворительной точностью определять концентрацию ДНК в растворе по интенсивности характеристических линий в спектре КР. Далее образцы ДНА и ДНК смешивались в соотношении 1 к 1 (по объему).

Концентрация непрореагировавших с ДНА молекул ДНК в супернатанте измерялась методом лазерной спектроскопии КР. Были получены спектры КР растворов ДНК в низкочастотной области и выделены линии-маркеры гуанина и цитозина в районе  $1000\text{ см}^{-1}$  и в районе  $1292\text{ см}^{-1}$ , соответственно (Рис. 72 (а)). Аппроксимация построенных калибровочных зависимостей интенсивности КР линий-маркеров от концентрации соответствующих АО ДНК обеспечила ошибку определения концентрации Г и Ц 0.04 г/л (Рис. 72(б),(в)).

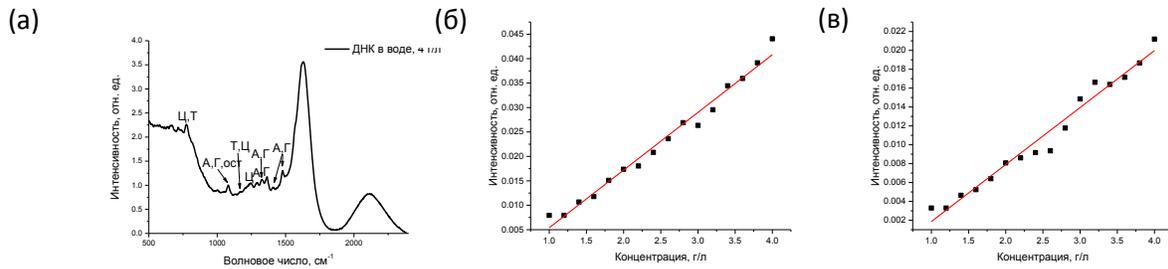


Рис. 72. Спектр КР ДНК в водном растворе с указанием маркеров азотистых оснований и фосфатного остова (ост) (а), калибровочные зависимости интенсивности сигнала КР характеристических линий Г (б) и Ц (в) от концентрации.

Для количественной оценки меры взаимодействия был введен параметр  $P$ , равный отношению массы провзаимодействовавших с ДНА цепочек ДНК к площади поверхности наночастиц. Результаты представлены на Рис. 73.

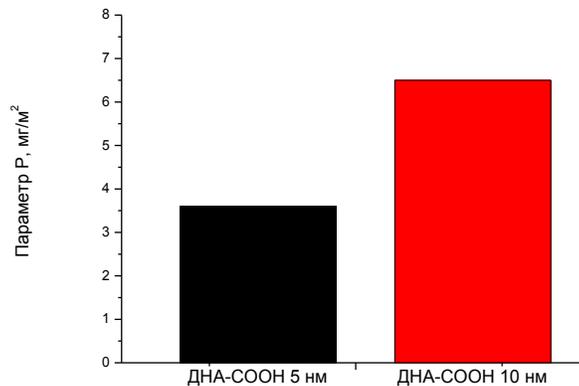


Рис. 73. Рассчитанные значения параметра взаимодействия  $P$ .

Как видно из представленных данных (Рис. 73), для ДНА 5 нм  $P$  является меньшим, что может быть связано с наличием графита на поверхности ДНА 5 нм, который слабо взаимодействует с молекулами ДНК.

Для выяснения механизмов взаимодействия ДНК с поверхностью ДНА с помощью ИК спектроскопии были исследованы осадки, полученные после центрифугирования смеси адсорбент+адсорбат (Рис. 74). Сравнительный анализ спектров ИК поглощения показал, что в спектре осадков все линии соответствуют или исходным линиям ДНК, или исходным линиям ДНА, то есть никаких новых линий, соответствующих появлению молекулярных групп,

образовавших химические связи с поверхностью НА, не появилось. Это означает, что молекулы ДНК и нанодиамазы взаимодействуют посредством физической адсорбции.

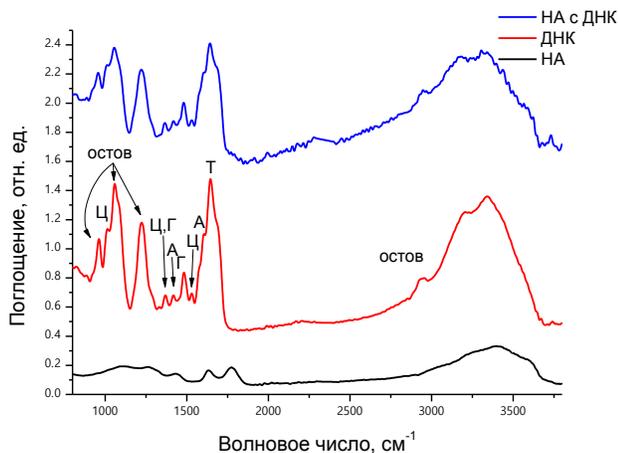


Рис. 74. Экспериментальные спектры ИК поглощения выпаренных из растворов ДНА+СООН, ДНК и осадка, полученного после центрифугирования смеси провзаимодействовавших ДНА и ДНК.

### §5.3. Взаимосвязь между фотолюминесцентными свойствами ДНА и адсорбцией/взаимодействием с молекулами окружения

Как было показано в Главе 4, фотолюминесцентные свойства углеродных наночастиц зависят от окружения, в частности, от взаимодействия с цепочками ДНК. Для создания и эффективного использования УНЧ в качестве многофункционального биомаркера важно найти возможные корреляции между адсорбционными и фотолюминесцентными свойствами УНЧ, в первую очередь, в биологическом окружении. В настоящем параграфе рассматривается взаимосвязь между адсорбционными и фотолюминесцентными свойствами ДНА-СООН 5 нм и ДНА-СООН 10 нм.

Как было показано в п. 4.4, взаимодействие ДНА с цепочками ДНК существенно повлияло на фотолюминесценцию ДНА-СООН 10 нм. Сопоставляя эти результаты с результатами, полученными в п. 5.2.3, можно заметить, что для ДНА-СООН 10 нм характерно и большее значение параметра взаимодействия  $R$ . Таким образом, можно сделать вывод о том, что интенсивность фотолюминесценции обоих ДНА-СООН может контролироваться количеством биомакромолекул, взаимодействующих с их поверхностью: чем больше молекул ДНК взаимодействует с поверхностью ДНА, тем интенсивнее его фотолюминесценция. Очевидно, такой эффект связан с тем, что молекулы ДНК «экранируют» поверхность ДНА от воды – активного тушителя фотолюминесценции растворенных веществ. Если говорить о перспективах использования ДНА как адсорбентов, то с их помощью можно решать и обратную задачу –

определять количество взаимодействующих с ДНА биомакромолекул с целью последующей оценки различных показателей, таких как, например, токсичность (если большое количество биомакромолекул покрывает поверхность НА, то может образоваться аналог тромба).

### *Заключение к Главе 5*

В Главе 5 были исследованы адсорбционные свойства наноалмазов детонационного метода синтеза по отношению к различным ионам солей тяжелых металлов, нитрат-ионам, азотистым основаниям ДНК, изучено взаимодействие цепочек ДНК с ДНА.

Обнаружена высокая адсорбционная активность исследованных ДНА к ионам меди и свинца, а также к нитрат-анионам. Проведено сравнение адсорбционных свойств ДНА с различной функционализацией поверхности и установлено, что покрытие поверхности ДНА карбоксильными группами увеличивает адсорбционную активность ДНА по отношению к исследуемым ионам почти в 3 раза. Таким образом, показано, что целенаправленное изменение типа функциональных поверхностных групп ДНА может быть использовано для управления сорбционными свойствами НА. С помощью колебательной спектроскопии выявлены механизмы адсорбции указанных ионов на поверхность ДНА: катионы адсорбируются за счет физической адсорбции, нитрат-анионы – посредством химической адсорбции.

Впервые исследовано взаимодействие ДНА с азотистыми основаниями ДНК. Установлен ряд по уменьшению адсорбционной активности ДНА по отношению к АО ДНК: Ц>Т≥А>Г для водно-щелочной среды и Ц>А>Т водной среды. Для оценки безопасности использования ДНА в биотехнологических методах было проведено исследование возможной деструкции комплементарных пар азотистых оснований при взаимодействии с ДНА. Экспериментально и теоретически показано, что при взаимодействии ДНА с комплементарной парой не происходит разрыва последней. Методом колебательной спектроскопии и квантово-механическими расчетами установлено, что ДНК взаимодействует с поверхностью ДНА посредством физической адсорбции.

## ГЛАВА 6. ОПТИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

Ввиду стремительного развития медицины и широких перспектив использования наночастиц для диагностики и терапии различных заболеваний (с 1989 года более 30 препаратов на базе наночастиц были утверждены Комитетом по надзору за продуктами и лекарствами (FDA) в США) принципиально важное значение имеет возможность визуализации наночастиц как в объеме всего организма, так и в относительно малом объеме – срезе ткани или клетке. Настоящая глава посвящена оптической визуализации УНЧ в биологической среде методами лазерной фотолюминесцентной спектроскопии с применением адаптивных методов анализа данных и микроскопии на основе подавления спонтанного испускания.

### **§6.1. Визуализация углеродных наночастиц в биоткани с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей**

Настоящий раздел посвящен решению обратных задач лазерной фотолюминесцентной спектроскопии – распознаванию многофункциональных биомаркеров и определению их концентрации в биологической среде по спектрам фотолюминесценции.

#### **6.1.1. Определение концентрации УНЧ в яичном белке по спектрам фотолюминесценции на фоне аутофлуоресценции белка**

В качестве биологической среды был выбран белок куриного яйца. Такой выбор обоснован тем, что обеспечивает легкую возможность помещения наночастиц непосредственно в клетку, так как яичный белок, по сути, является единственной клеткой, содержащей множество естественных флуорофоров. Для введения в клетку были приготовлены водные растворы ОГ с концентрацией 0.1 г/л и водные суспензии наноалмазов G01 с концентрацией 1 г/л. Приготовленные суспензии обрабатывались в течение 2 часов в ультразвуковой бане (Bandelin Sonorex rk 31).

Измерения размеров ОГ и НА в водных суспензиях методом динамического рассеяния света показали, что большинство частиц ОГ в воде имеют размеры порядка 6-9 нм, а 88% частиц НА в суспензии имеет размеры 35 нм.

На Рис. 75 представлены спектры КР и флуоресценции яичного белка, водных суспензий ОГ и НА, а также яичного белка с введенными в него наночастицами. Полоса с максимумом в области 470 нм является валентной полосой воды (процент содержания воды в белке – 85%).

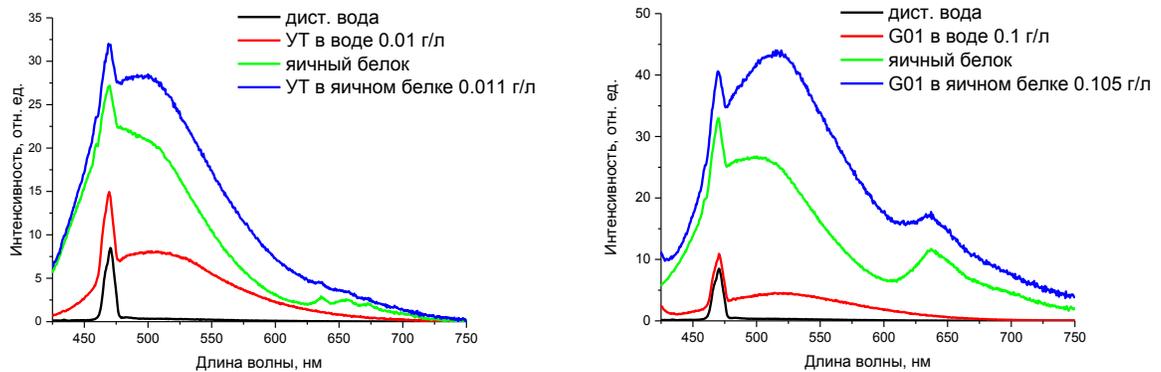


Рис. 75. Спектры КР и фотолюминесценции воды, яичного белка, водных суспензий ОГ и НА и яичного белка с введенными в него ОГ и НА.

Спектр естественной флуоресценции яичного белка в исследуемой области представляет собой совокупность нескольких полос: интенсивная широкая бесструктурная полоса в диапазоне от 430 до 730 нм с максимумом в районе 480 нм, более слабые полосы с максимумами 640 нм, 655-660 нм, 675 нм (Рис. 75). Известно [117], что в основную полосу флуоресценции яичного белка вносят флуоресцентные вклады пиридоксин, никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), флавины, липо-пигменты и т.д. Слабые полосы флуоресценции в районе 640-670 нм обусловлены флуоресценцией порфиринов.

Как видно из Рис. 75, при возбуждении излучением с длиной волны 405 нм ОГ фотолюминесцируют в диапазоне от 430 до 680 нм с максимумом в районе 500-505 нм, НА – в диапазоне от 430 до 680 нм с максимумом в районе 520-525 нм. Яичный белок флуоресцирует в диапазоне от 430 до 730 нм с максимумом, который варьируется для разных яиц в пределах от 480 до 520 нм. Таким образом, спектры фотолюминесценции наночастиц и яичного белка представляют собой в значительной мере перекрывающиеся бесструктурные полосы, отличающиеся положением максимумов и границами полос флуоресценции, что и является предпосылкой для успешного выделения вклада наночастиц.

Очевидно, что при изменении концентрации наночастиц в белке полоса их общей флуоресценции будет существенно изменяться по нескольким причинам, основные из которых следующие: 1) при изменении концентрации наночастиц изменяется интенсивность фотолюминесценции самих наночастиц; 2) за счет различных взаимодействий ОГ и НА с компонентами белка изменяется и флуоресценция белка, и фотолюминесценция наночастиц. Причем, эти взаимодействия весьма сложны и не изучены, поэтому невозможно построить аналитическую модель изменения полосы

общей флуоресценции яичного белка и наночастиц при изменении их концентрации. Это означает, что традиционными математическими методами невозможно решить задачу выделения фотолюминесцентного вклада изменяющегося количества наночастиц на фоне флуоресценции белка.

### Применение ИНС

В данной работе для решения указанной обратной задачи лазерной фотолюминесцентной спектроскопии применялись искусственные нейронные сети. Использовался подход «от эксперимента» (см. §1.7), т.е. ИНС обучались на экспериментальных данных. Для повышения устойчивости обученной ИНС к вариабельности биологических объектов использовались яичные белки различной давности и различных производителей. Как видно из Рис. 76, такой шаг себя полностью оправдывает, так как спектры флуоресценции различных белков существенно различаются.

В эксперименте для ОГ было получено две серии спектров КР и фотолюминесценции для двух различных яичных белков с введенными в них ОГ в диапазоне концентраций ОГ от 0 до 20 мг/л с шагом 0.75 мг/л и 1.50 мг/л (всего 43 спектра). Для НА было получено три серии спектров КР и фотолюминесценции для трёх различных белков в диапазоне концентраций НА от 0 до 30 мг/л с шагом 1 мг/л, 1.5 мг/л и 3 мг/л (всего 63 спектров).

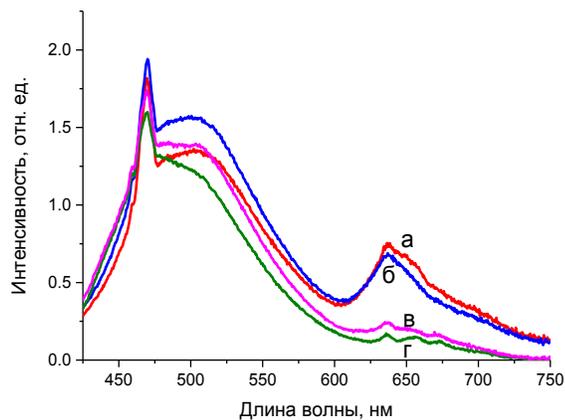


Рис. 76. Спектры флуоресценции различных белков: а, б, в - белки яиц различных производителей; г - белок с через 3 недели.

На Рис. 77 приведены примеры полученных экспериментальных спектров КР и фотолюминесценции яичного белка с наночастицами различных концентраций. Полученные экспериментальные кривые для ОГ и НА в яичных белках использовались для работы с ИНС - формирования тренировочного, валидационного и экзаменационного наборов.

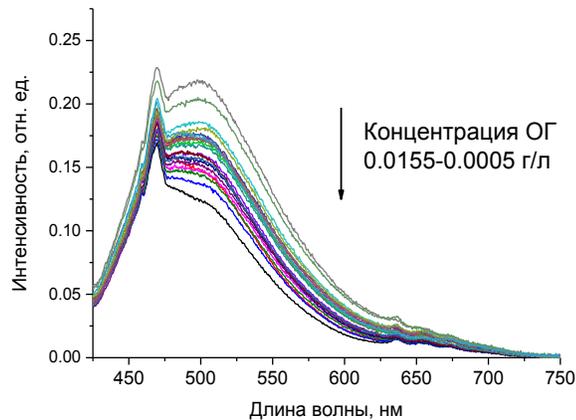


Рис 77. Одна из серий спектров КР и фотолюминесценции яичного белка с введенными в него ОГ различных концентраций.

Разбиение на тренировочный, валидационный и экзаменационный наборы проводилось случайным образом в соотношении 70:20:10, соответственно. В результате для спектров белка с ОГ были сформированы наборы 31:8:4 (всего 43 примера), а для спектров белка с НА 45:12:6 (всего 63). Для объективной оценки качества ИНС проводилось усреднение по десяти случайным разбиениям.

Для решения данной задачи использовался трехслойный персептрон (с 10 нейронами в единственном скрытом слое), обучаемый по алгоритму обратного распространения ошибки [196]. Персептрон имел следующие параметры: передаточная функция в скрытом и выходном слоях — гиперболический тангенс, скорость обучения 0.01, момент 0.5, начальный разброс весов 0.3, порядок предъявления примеров случайный, остановка через 100000 событий после минимума ошибки на тестовом наборе данных. Для выполнения всех вычислений использовался пакет программ NeuroShell 2 [197].

Следует заметить, что рассматриваемая задача в ее исходной постановке характеризуется крайне неблагоприятным соотношением числа примеров в тренировочном наборе (30-45) и числа входных признаков (651). Поэтому нами было проведено понижение входной размерности задачи. В работе [140] показано, что одним из наиболее эффективных способов понижения размерности

спектроскопических данных является агрегация каналов, при которой новые формируемые признаки представляют собой среднее арифметическое значение интенсивностей в нескольких соседних каналах спектра. Помимо агрегации каналов использовался также отбор существенных входных признаков, основанный на удалении части признаков по порогу снизу по стандартному отклонению, то есть, фактически, рассматривалось изменение интенсивности в каждом канале в зависимости от концентрации. Если это изменение в канале меньше, чем значение стандартного отклонения для всех других каналов в спектре, то этот канал считался несущественным.

В Таблицах 10 и 11 представлены наилучшие результаты применения ИНС к экзаменационным наборам для одного разбиения на тренировочный, валидационный и экзаменационный наборы и при усреднении по 10 разбиениям, соответственно. В обеих Таблицах приведены полученные ошибки концентраций УНЧ в белке для исходного массива данных и после использования методов понижения размерности пространства входных признаков. Как видно, на исходном массиве данных для ОГ ошибка определения на экзаменационном наборе, в среднем, составляет 2.2 мг/л, а для НА – 4 мг/л. Следует отметить высокое значение коэффициента множественной детерминации  $R^2$ , что свидетельствует об эффективном обучении ИНС.

Оба способа понижения размерности пространства входных признаков позволяют уменьшить ошибку определения концентрации УНЧ в белке. Для первого способа наилучшие результаты получены при агрегации по 4 каналам: ошибка уменьшилась в 1.4 раза в случае ОГ и в 2.3 раза в случае НА по сравнению с работой с исходными данными. При удалении малоинформативных каналов по стандартному отклонению интенсивности спектра ошибка на экзаменационном наборе, в среднем, уменьшилась в полтора раза.

Таблица 10. Результаты решения обратной задачи для лучшего из разбиений на тренировочный, валидационный и экзаменационный наборы (по ошибке на экзаменационном наборе данных).

	тип предобработки	количество каналов	$R^2$ на тренировочном наборе	средняя ошибка на экзаменационном наборе, мг/л
ОГ, 43 примера разбиение 31:8:4	без предобработки	651	0.9993	1.61
	агрегация	163	0.9833	1.14
	отбор	346	0.9525	0.70
НА, 63 примера разбиение 45:12:6	без предобработки	651	0.9948	2.41
	агрегация	165	0.9954	1.04
	отбор	330	0.9954	0.91

Таблица 11. Результаты решения обратной задачи при усреднении по десяти различным разбиениям на тренировочный, валидационный и экзаменационный наборы: среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

	тип предобработки	количество каналов	$R^2$ по всем примерам	средняя ошибка на экзаменационном наборе, мг/л
ОГ, 43 примера разбиение 31:8:4	без предобработки	651	0.918 $\pm$ 0.021	2.2 $\pm$ 0.4
	агрегация	163	0.935 $\pm$ 0.036	1.9 $\pm$ 0.5
	отбор	346	0.925 $\pm$ 0.027	1.4 $\pm$ 0.4
НА, 63 примера разбиение 45:12:6	без предобработки	651	0.837 $\pm$ 0.106	4.0 $\pm$ 2.0
	агрегация	165	0.832 $\pm$ 0.112	3.5 $\pm$ 1.6
	отбор	330	0.910 $\pm$ 0.084	2.5 $\pm$ 1.0

Полученные результаты показывают, что, в среднем, ошибка определения концентрации наночастиц в белке на экзаменационном наборе для ОГ в два раза меньше, чем для НА. Это объясняется, во-первых, тем, что интенсивность фотолюминесценции ОГ гораздо больше, чем интенсивность фотолюминесценции НА G01 (см. Рис. 75). Во-вторых, размеры НА G01 в несколько раз больше размеров ОГ, что вызывает более интенсивное рассеяние света на

наночастицах, а это, в свою очередь, может вносить дополнительную ошибку в регистрацию спектров.

Таким образом, результаты применения ИНС показали принципиальную возможность решения задачи определения концентрации УНЧ по спектрам фотолюминесценции на фоне аутофлуоресценции биосреды. При этом после понижения размерности пространства входных признаков на экзаменационном наборе данных достигается точность определения концентрации в исследуемом объеме ОГ до 2 мг/л, НА - до 3 мг/л. Среднее значение ошибки определения концентрации УНЧ составляет 10% от максимальной концентрации, что существенно меньше, чем средняя ошибка, допускаемая при использовании жидких медикаментов: согласно данным [198], ошибки допускаются примерно в 40% случаев при использовании жидких лекарств для детей. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [199], 54% фармацевтических ошибок является ошибкой дозирования. Мы считаем полученные значения точности определения концентрации УНЧ удовлетворительными.

#### **6.1.2. Контроль выведения УНЧ из организма с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей**

На следующем этапе работы разрабатывалась методика контроля выведения углеродных наноагентов из организма посредством урины для предотвращения их накопления в организме. По сути, задача сводилась к решаемой в п.6.1.1.: выделение фотолюминесцентного вклада УНЧ на фоне аутофлуоресценции урины. На Рис. 78 представлены полученные спектры фотолюминесценции и КР урины, а также суспензий ДНА в воде и в урине с одной и той же концентрацией 0.2 г/л. Полоса с максимумом в районе 464.5 нм (Рис. 78) соответствует валентным колебаниям ОН-групп воды. Как видно из Рис. 78, спектры фотолюминесценции ДНА (от 440 до 580 нм) и урины (от 400 до 700 нм) перекрываются в широком спектральном диапазоне.

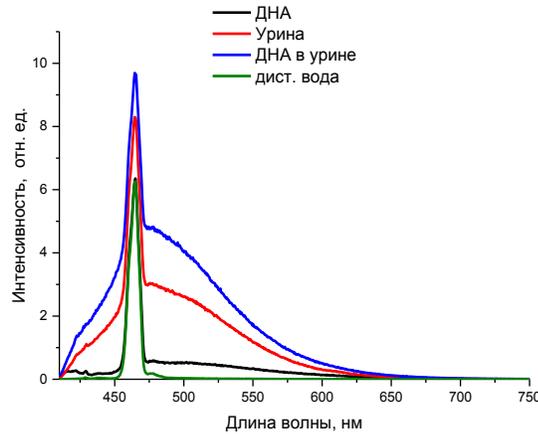


Рис. 78. Спектры КР и фотолюминесценции воды, урины, суспензий ДНА в воде и урине с концентрацией ДНА 0.2 г/л.

Следует отметить большую сложность работы с уриной из-за ее чрезвычайно существенной вариабельности. Как известно, состав урины зависит от возраста человека, от перенесенных и имеющихся заболеваний, от рациона питания и от многих других факторов. Поэтому и спектры фотолюминесценции, например, от различных доноров (Рис. 79), существенно отличаются и по положению максимума фотолюминесценции (положение варьируется от 479 нм до 510 нм), и по форме кривой. Эта вариабельность спектров проиллюстрирована на Рис. 80. Для всех полученных спектров фотолюминесценции и КР урины и ДНА в воде и в урине с концентрацией ДНА 0.2 г/л были рассчитаны параметры  $\Phi_0$  (§4.1) и разностные параметры  $\Delta\Phi_0$ : из параметра  $\Phi_0$  суспензии ДНА в воде или в урине вычиталось значение параметра  $\Phi_0$  спектра растворителя (без ДНА), т.е.  $\Delta\Phi_0 = \Phi_{0\text{суспензии}} - \Phi_{0\text{растворителя}}$ . В грубом приближении этот разностный параметр  $\Delta\Phi_0$  можно рассматривать как изменение фотолюминесцентных свойств ДНА в разных растворителях. Из сравнения значений  $\Delta\Phi_0$ , полученных для спектров фотолюминесценции суспензий ДНА в воде и в образцах урины от каждого из 15 доноров (Рис. 80), можно сделать следующие выводы: 1) фотолюминесцентные свойства ДНА существенно усиливаются в урине по сравнению с водой; 2) наблюдается высокая вариабельность изменения фотолюминесцентных свойств ДНА в зависимости от образца урины, что еще раз подтверждает наличие существенных нелинейных взаимодействий поверхностных групп ДНА с биомакромолекулами. В связи с изложенными фактами задача контроля выведения УНЧ с человеческой уриной решалась с помощью ИНС с использованием подхода «от эксперимента».

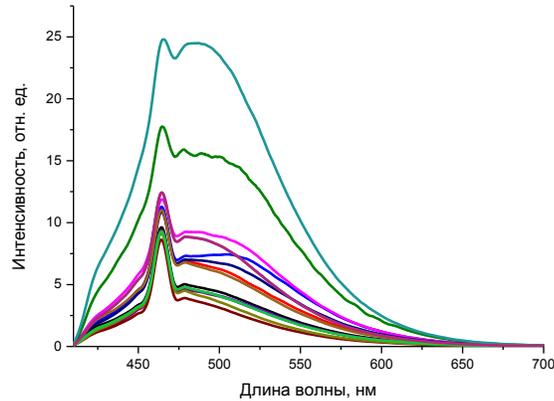


Рис. 79. Экспериментальные спектры флуоресценции образцов урины, полученных от 15 разных доноров.

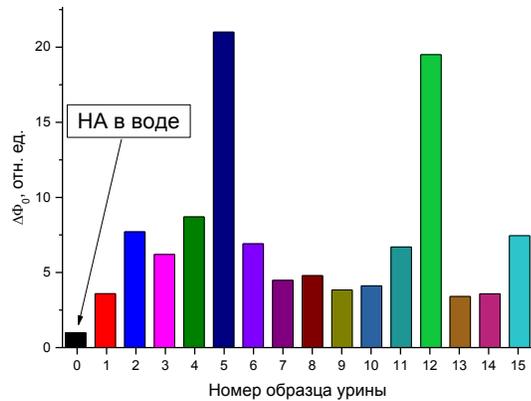


Рис. 80. Сравнение значений разностных параметров  $\Delta\Phi_0$  фотолюминесценции водной суспензии ДНА и суспензий ДНА в образцах урины от каждого из 15 доноров (при концентрации ДНА 0.2 г/л).

Для урины с ДНА было проведено 15 серий экспериментов (для 15 разных доноров). При этом концентрация ДНА в урине, разбавленной в 10 раз, изменялась от 0 до 0.2 г/л с шагом 0.01 г/л. В результате каждой серии был получен набор спектров КР и фотолюминесценции урины с ДНА в области 410-750 нм с разрешением 0.5 нм в зависимости от концентрации. Таким образом, было получено 315 спектров. Полученный массив кривых разделялся на три набора: тренировочный, валидационный и экзаменационный в соотношении 70:20:10, соответственно. Разделение проводилось двумя способами: 1) случайным образом из всех наборов, и 2) таким образом, чтобы одна серия целиком находилась только в экзаменационном наборе.

Поставленная задача решалась с использованием трехслойного персептрона (681 входной нейрон, 8, 16, 32 нейрона в единственном скрытом слое и 1 в выходном), обучаемого по алгоритму обратного распространения ошибки [196]. Персептрон имел следующие параметры: передаточная функция в скрытом и выходном слоях – гиперболический тангенс, скорость обучения 0.01, момент 0.5, порядок предъявления примеров случайный, остановка через 1000 событий после минимума ошибки на тестовом наборе данных. Для выполнения всех вычислений использовался пакет программ NeuroShell 2 [197]. Наилучшие результаты, полученные при использовании указанной архитектуры ИНС, представлены в Таблице 12. Оценка полученных результатов будет дана в п. 6.2.

Таблица 12. Результаты применения искусственных нейронных сетей к полученным наборам экспериментальных спектров.

Разделение массива данных	Количество нейронов скрытого слоя	Значение средней абсолютной ошибки (САО) на экзаменационном наборе, мг/л
1) Случайное	8	5.84
1) Случайное	16	10.88
2) 2-ой набор в качестве экзаменационного	32	4.80
2) 3-ой набор в качестве экзаменационного	32	4.97

## **§6.2. Мониторинг выведения из организма нанокompозитов на основе углеродных наночастиц с помощью лазерной спектроскопии**

В п. 6.1.2 фактически моделировалась ситуация, когда носитель лекарства на основе НА полностью отдал препарат и выводится из организма посредством мочевыделительной системы. То есть решалась однопараметрическая обратная задача по контролю выведения nanoалмазного носителя из организма с уриной. Представим более сложную ситуацию: носителем лекарства является нанокompозит на основе фотолюминесцирующей УНЧ, покрытой веществом (например, полимером), к которому посредством ковалентной связи прикреплено лекарство. В этом случае при введении такого нанокompозита в организм возможны следующие ситуации: 1) нанокompозит не отдал лекарство и выводится в неизменном виде; 2) нанокompозит отдал со своей поверхности

лекарство, и выводится компонент УНЧ+полимер; 3) от нанокompозита отделились лекарство и полимер, выводится УНЧ; 4) выводятся отдельно отделившийся полимер и излишек лекарства. Таким образом, в урине возможно наличие следующих 5 классов веществ: УНЧ+полимер+лекарство; УНЧ+полимер; УНЧ; полимер и лекарство. Таким образом, при работе с нанокompозитами необходимо решать многопараметрическую обратную задачу – мониторинг выведения и определение концентрации нанокompозита и его компонентов с уриной. В данной работе эта задача была решена с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей.

### **6.2.1. Характеризация и свойства нанокompозитов оксид графена+сополимер+фолиевая кислота**

В качестве тераностического агента в работе использовался нанокompозит, представляющий собой ОГ, покрытый сополимером поли(этилен-имин)-поли (этиленгликоль) (Соп), к которому прикреплялись лиганды фолиевой кислоты (ФК). Нанокompозиты были синтезированы нашими коллегами из Лаборатории фармацевтики Университета Або (Турку, Финляндия). Покрытие нанокompозита лигандами фолиевой кислоты обусловлено следующим. Как известно, фолиевая кислота необходима организму для развития и роста новых клеток, в том числе, и онкологических [200]. Поэтому для опухолей некоторых видов рака свойственна экспрессия мембранного белка - рецепторов фолиевой кислоты альфа. Рецепторы фолиевой кислоты альфа имеют высокое сродство к ФК, в результате чего опухоли активно «забирают» из организма свободную фолиевую кислоту, которую используют для своего роста [200]. В связи с этим в качестве терапии рака используют такие лиганды фолиевой кислоты, которые блокируют экспрессию рецепторов и предотвращают дальнейшее попадание фолиевой кислоты в клетку, которое могло бы привести к ее росту. Именно такие лиганды ФК были прикреплены к поверхности нанокompозитов ОГ-Соп.

Был проведен сравнительный анализ дисперсионных и фотолюминесцентных свойств частиц ОГ, ОГ+Соп и ОГ+Соп+ФК в буфере HEPES с концентрацией 1 г/л.

Для изучения изменения дисперсионных свойств исходных ОГ в процессе покрытия их сополимером и фолиевой кислотой была проведена характеризация их суспензий – измерены размеры частиц и дзета-потенциалы в буфере. Результаты характеризации суспензий синтезированных образцов представлены в Таблице 13.

Таблица 13. Гидродинамический радиус, дзета-потенциал и значение квантового выхода нанокompозитов и их компонентов в буфере HEPES (25 мМ, рН 7.2) с концентрацией 1 г/л.

Образец	Размер, нм	Z-потенциал, мВ	Квантовый выход
ОГ	114±2	-22.5±0.3	4.8
ОГ+Соп	34±2	13.7±0.3	6.2
ОГ+Соп+ФК	28±1	-4.6±0.6	7.1

Как следует из данных Таблицы 13, дисперсность ОГ, покрытых сополимером и ФК, существенно увеличивается. Это подтверждают и результаты, полученные с помощью ПЭМ (просвечивающий электронный микроскоп) (Рис. 81). Размеры отдельных частиц ОГ+Соп и ОГ+Соп+ФК, определяемые по изображениям СЭМ и ПЭМ после выпаривания суспензии, составили около 10 нм. Следовательно, покрытие ОГ сополимером и ФК существенно уменьшает вероятность агрегации ОГ, которая наблюдается в их исходной суспензии с концентрацией 1 г/л.

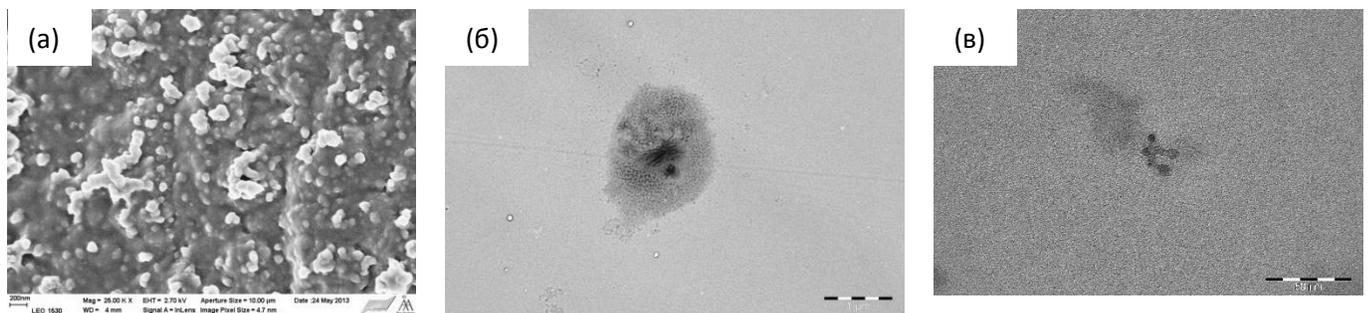


Рис. 81. Изображение частиц ОГ, полученное СЭМ (а); Изображение частиц комплекса ОГ+соп+ФК, полученное ПЭМ (б); Изображение частиц комплекса ОГ+соп+ФК, полученное ПЭМ (в).

Для изучения изменения фотолюминесцентных свойств исходных ОГ в процессе покрытия их сополимером и фолиевой кислотой были измерены значения квантового выхода исходных и получаемых нанокompозитов. Сравнительный анализ измеренных квантовых выходов показывает, что покрытие ОГ сополимером и ФК не вызывает тушения фотолюминесценции наночастиц в воде, а, наоборот, немного увеличивает ее интенсивность. Это означает, что новые синтезированные на основе ОГ нанокompозиты так же, как и исходные ОГ, являются перспективными медицинскими наноагентами для тераностики.

Совместно с нашими коллегами из Финляндии была продемонстрирована возможность визуализации нанокompозитов ОГ в клетках *HeLa* с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. Раковые клетки выращивались в питательной среде, содержащей ОГ+соп+ФК, в

течение 7 часов. При наблюдении в конфокальном флуоресцентном микроскопе выращенных клеточных линий (при возбуждении излучением с длиной волны 960 нм) была обнаружена яркая флуоресценция нанокомпозитов в клетках (Рис. 82). В результате различных экспериментов было установлено, что наночастицы равномерно распределяются внутри дочерних клеток и обеспечивают длительную визуализацию клеток (около недели), а лиганды фолиевой кислоты, находящиеся на поверхности нанокомпозитов, действительно блокируют рецепторы фолатов раковых клеток.

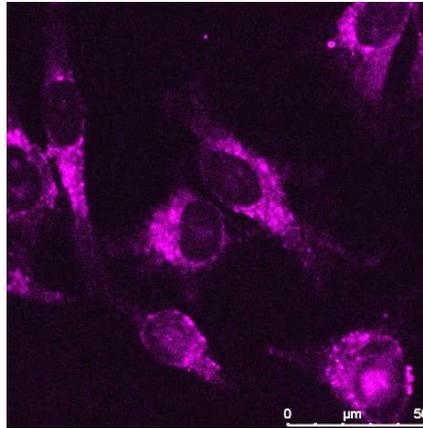


Рис. 82. Визуализация раковой клетки *HeLa*. Люминесцентное изображение клеток при введении в исходную клетку нанокомпозита ОГ+Соп+ФК, концентрация 10 мкг/мл.

### **6.2.2. Решение обратной задачи лазерной фотолюминесцентной спектроскопии по контролю выведения нанокомпозитов и их компонентов из организма**

Предварительные исследования целостности нанокомпозитов ОГ+Соп+ФК в суспензиях при изменении рН от 5 до 8 показали, что в суспензиях находятся исходные ОГ+Соп+ФК и компоненты ОГ+Соп и ФК. Поэтому решалась трехпараметрическая обратная задача по определению присутствия и концентрации в моче наиболее вероятных частиц - ОГ+Соп+ФК, ОГ+Соп и ФК. Конечно, в результате отдачи и полного усвоения ФК ее может и не быть в моче. Однако в данной работе мы демонстрируем принципиальную возможность определения ее присутствия и содержания в моче в случае излишков ФК в организме.

Задача контроля выведения нанокомпозитов ОГ+Соп+ФК и их компонентов из организма с мочой по спектрам фотолюминесценции решалась, как и в предыдущих разделах, на модельных образцах. В мочу вводились ОГ+Соп+ФК и его компоненты в известных количествах и различных сочетаниях, регистрировались и анализировались их спектры фотолюминесценции, а затем привлекались нейросетевые технологии. В данной работе с помощью ИНС одновременно решались задача определения присутствия в моче той или иной частицы, а также задача регрессии

- определения концентрации обнаруженных наночастиц в моче. Применялся подход «от эксперимента», т.е. для обучения ИНС была сформирована база экспериментальных данных, состоящая из спектров фотолюминесценции суспензий нанокмозитов и их компонент в моче.

Были приготовлены суспензии углеродных наноматериалов со всеми возможными 8 сочетаниями классов – {ОГ+Соп+ФК}, {ОГ+Соп}, {ФК}, {ОГ+Соп+ФК, ОГ+Соп}, {ОГ+Соп+ФК, ФК}, {ОГ+Соп, ФК}, {ОГ+Соп+ФК, ОГ+соп, ФК}, {урина без наночастиц} - в моче от трех доноров в возрасте от 18 до 25 лет в диапазоне концентраций каждого компонента от 0 мг/л до 2.15 мг/л.

Спектры фотолюминесценции регистрировались в диапазоне 400-800 нм. Каждый спектр содержал 1785 каналов/длин волн. Спектры однокомпонентных суспензий снимались каждый день с разной мочи, чтобы учесть вариабельность мочи, обусловленную сложным изменчивым химическим составом мочи. Всего было получено 1461 спектров фотолюминесценции. Обработка полученных спектров заключалась в вычитании пьедестала, обусловленного упругим рассеянием света, нормировке на спектральную чувствительность прибора и нормировке спектров на площадь валентных колебаний ОН-групп мочи.

Общий массив был разбит на тренировочный, валидационный и экзаменационный наборы случайным образом в соотношении 70:20:10, соответственно.

#### Обучение ИНС на полном наборе признаков

На первом этапе ИНС были обучены на полном наборе признаков - 1785 каналах спектра. Использовались следующие архитектуры многослойных персептронов: с одним скрытым слоем – N01 (с 8, 16, 32 и 64 нейронов в скрытом слое), с двумя скрытыми слоями – N02 (с (8+4), (16+8), (32+16), (64+32) нейронами в скрытых слоях). Во всех случаях тренировались 5 одинаковых нейронных сетей с различными начальными значениями весовых коэффициентов. Результаты их применения усреднялись для того, чтобы уменьшить влияние выбора начальных весовых коэффициентов. Все архитектуры ИНС имели 3 выхода. Первый выход соответствовал классу ОГ+Соп+ФК, второй выход – ОГ+Соп, третий выход – ФК.

В Таблице 14 представлены результаты, полученные с помощью всех использованных архитектур ИНС. Наилучшую точность определения содержания всех трех видов наночастиц в моче - ОГ+Соп+ФК, ОГ+Соп, ФК – обеспечил двуслойный персептрон с 8 и 4 нейронами в скрытых слоях.

Таблица 14. Результаты определения концентрации наноконпозитов и их компонентов в урине, полученные различными архитектурами ИНС.

Архитектура нейросети	Средняя абсолютная ошибка, $\times 10^{-4}$ г/л		
	ОГ+Соп+ФК	ОГ+Соп	ФК
N01(64)	4.57	2.69	4.54
N01(32)	4.55	2.64	4.60
N01(16)	4.47	2.77	4.48
N01(8)	4.48	2.68	4.49
N02(64+32)	4.47	2.66	4.51
N02(32+16)	4.50	2.66	4.52
N02(16+8)	4.49	2.77	4.45
N02(8+4)	4.39	2.95	4.69

Средняя абсолютная ошибка определения концентрации наночастиц на экзаменационном наборе, полученная с помощью двуслойного персептрона с 8 и 4 нейронами в скрытых слоях, составила 0.29 мг/л для наноконпозита ОГ+Соп+ФК, 0.44 мг/л для ОГ+Соп, 0.47 мг/л для ФК. Это составляет 13.5% для наноконпозита ОГ+Соп+ФК, 20.5% для ОГ+Соп, 21.9% для ФК от максимального содержания наночастиц в урине.

#### Способы улучшения решения задачи. Отбор признаков.

Для уменьшения входной размерности задачи и предотвращения возможного переучивания нейросети были проведены 4 альтернативные процедуры отбора существенных входных признаков: кросс-корреляция (КК), кросс-энтропия (КЭ), стандартное отклонение (СтО) и анализ весов нейронной сети (АВНС). Описание каждого алгоритма отбора было дано в Главе 1.

На Рис. 83 представлены результаты определения концентрации наноконпозитов и их компонентов в урине, полученные с помощью двуслойного персептрона с 8 и 4 нейронами в скрытых слоях на экзаменационных наборах отобранных входных признаков. Как видно, наилучший результат указанная архитектура ИНС продемонстрировала на наборе с 1000 значимыми входными признаками, которые были отобраны с помощью вычисления стандартного отклонения.

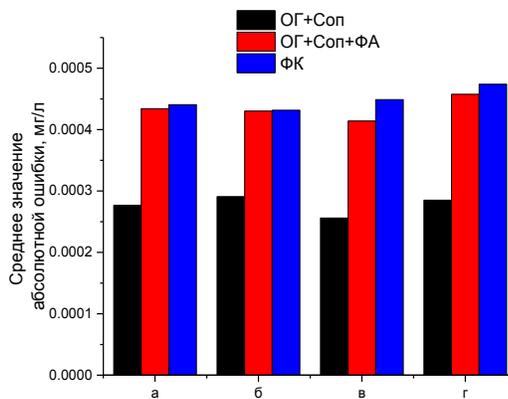


Рис. 83. Средние абсолютные ошибки определения содержания ОГ+Соп+ФК, ОГ+Соп, ФК в моче, полученные с помощью двуслойного персептрона с 8 и 4 нейронами в скрытых слоях на экзаменационном наборе с 1000 входных признаков, отобранных различными методами: а) по кросс-корреляции; б) по кросс-энтропии; в) по стандартному отклонению; г) по анализу весов нейронной сети.

Таким образом, средняя абсолютная ошибка на экзаменационном наборе составила 0.26 мг/л для нанокompозита ОГ+Соп+ФК, 0.41 мг/л для ОГ+Соп, 0.45 мг/л для ФК. Это составляет 12.1% для нанокompозита ОГ+Соп+ФК, 19.1% для ОГ+Соп, 20.9% для ФК от максимального содержания наночастиц в моче.

Сравнительный анализ полученных значений средних абсолютных ошибок определения концентрации наночастиц в моче при обучении на полном наборе и на отобранных признаках (Рис. 83) показал, что процедура отбора позволила увеличить точность определения концентрации на 7%.

### **6.2.3. Общие методологические принципы применения ИНС для контроля выведения наночастиц с мочой**

Полученные результаты применения ИНС к задаче контроля выведения нанокompозитов и их компонентов из организма с мочой показали широкие возможности нейросетевых методов. Даже к конкретной поставленной в данной работе задаче можно выделить несколько подходов решения:

1. Если необходимо быстро определить концентрацию всех классов наночастиц в моче, целесообразно использовать одну архитектуру ИНС, продемонстрировавшую лучший результат, усредненный по всем классам веществ. Улучшить результаты возможно посредством отбора существенных признаков. Именно такой подход был реализован в данной работе.

2. Если необходимо определить концентрацию всех классов наночастиц в моче с очень высокой точностью, то для идентификации каждого класса частиц целесообразно использовать определенную - «индивидуальную» для этого класса - архитектуру ИНС и применять определенную процедуру отбора существенных признаков. Естественно, время, затраченное на получение результата, будет пропорционально количеству классов веществ в исследуемом растворе.

3. Увеличение количества экспериментальных спектров может позволить увеличить число скрытых слоев и/или нейронов в скрытых слоях, что может, в свою очередь, улучшить качество решения обратной задачи.

Объединяя результаты, полученные в результате решения задачи контроля выведения наночастиц из организма с помощью лазерной люминесцентной спектроскопии и ИНС, можно составить таблицу, в которой указаны значения используемого диапазона концентраций УНЧ и точность их определения с применением разработанных методик (Таблица 15).

Таблица 15. Ошибки определения УНЧ и компонентов нанокompозита на основе УНЧ при реализации разработанных методик.

Образец	Диапазон концентраций, мг/л	Точность определения, мг/л
ДНА-СООН	0-200	0.58
ОГ+соп	0-2.15	0.26
ОГ+соп+ФК	0-2.15	0.41
ФК	0-2.15	0.45

Мы считаем, что полученные результаты являются удовлетворительными, так как они находятся в диапазоне доз, используемых при работе *in vivo*. Так, например, в работе [201] крысам инжесктировали восемь доз НА в течение месяца (с трехдневными интервалами между инъекциями). В процессе внутривенного вливания вводилась водная суспензия НА с концентрацией 0.5 г/л, что при пересчете на массу тела крысы составляет 4 мг НА на 1 кг массы тела. В другой работе [202] было определено, что до 90% НА аккумулируется в легких, селезенке и печени, и только 10% покидает организм посредством мочеполовой системы. Таким образом, концентрация НА, ожидаемая при выведении с мочой у крыс, составляет  $0.1 \cdot 0.5 = 0.05$  г/л. Принимая во внимание то, что масса человека почти в 100 раз больше, можно считать, что

полученные точности определения концентрации НА, указанные в Таблице 15, являются удовлетворительными.

Следует отметить, что полученная при решении многопараметрической задачи, описанной в разделе 6.2.2, точность определения концентрации выведенных наночастиц, приведена для максимального содержания наночастиц в моче 2.15 мг/л. На практике содержание нанокompозита может быть намного больше. Например, авторы работы [203] исследовали комплекс на основе ОГ, модифицированный 5-флуороурацилом – лекарства от онкологии. Было показано, что синтезированный нанокompлекс малотоксичен, значительно замедляет рост опухоли и метастазов в печени и продлевает время выживания мышей. В этих исследованиях в кровь мышей вводили суспензию нанокompозита из расчета 3 мг на 1 кг массы тела мыши. Если эти значения экстраполировать на систему кровообращения человека массой 70 кг (приблизительно 5 л крови), то мы получаем максимальное содержание нанокompозитов в крови 42 мг/л.

### **§6.3. Микроскопия УНЧ в клетках на основе подавления спонтанного испускания (STED-микроскопия)**

Разработанные и описанные в §§6.1, 6.2 методы оптической визуализации УНЧ в биологической ткани с помощью метода лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей позволяют определить количество УНЧ в диапазоне относительно большого количества частиц. Например, используя оценки, данные выше (п. 6.2.3), максимальное количество нанокompозитов, циркулирующее в системе кровообращения человека составляет порядка  $10^{17}$  частиц при размере частицы 5 нм и порядка  $10^{15}$  при размере наночастиц 30 нм. Таким образом, использование разработанных методик оправдано при рассмотрении задач, в которых объемы исследуемых проб и содержание наночастиц (в штуках) внутри которых являются относительно большими.

Для визуализации наночастиц в относительно малых объемах (например, объем клетки) можно использовать другие методы лазерной физики. Помимо вышеописанных результатов определения времени жизни фотолюминесценции ДНА и, как следствие принципиальной возможности визуализации ДНА посредством микроскопии визуализации времени жизни фотолюминесценции (FLIM-микроскопия), был рассмотрен еще один метод визуализации - микроскопия на основе подавления спонтанного испускания.

Как было сказано в Главе 1, для визуализации НА с азот-вакантными центрами активно используется метод, основанный на подавлении спонтанного испускания (STED-микроскопия). В настоящей работе была проведена попытка визуализации этим методом детонационных НА (Рис. 84) в объеме опухолевой клетки *HeLa*. Для этого суспензия ДНА добавлялась в питательную среду, используемую для роста клеток. В процессе роста, клетки поглощали питательную среду с ДНА и, таким образом, ДНА оказывались внутри клетки.

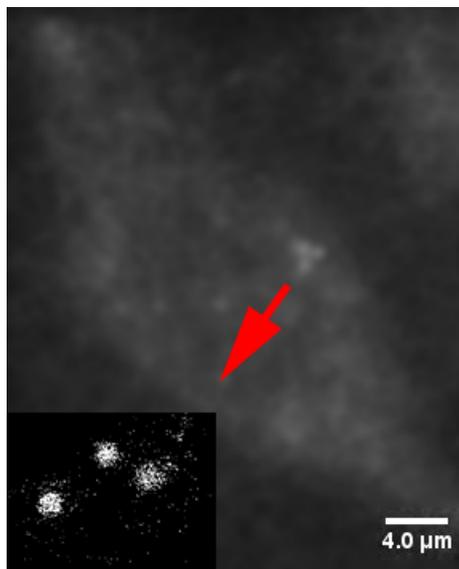


Рис. 84. Визуализация раковой клетки *HeLa*. Изображение, полученное с помощью конфокальной микроскопии и STED – микроскопии (врезка).

Из представленного рисунка видно, что метод STED-микроскопии позволяет увидеть три явно различимые точки (Рис. 84 врезка), которые плохо различались при использовании классической конфокальной микроскопии. Из этого можно сделать вывод о том, что метод STED-микроскопии применим и для визуализации НА детонационного метода синтеза.

### ***Заключение к Главе 6***

Продемонстрирована принципиальная возможность оптической визуализации УНЧ в биологической среде по спектрам фотолюминесценции с применением искусственных нейронных сетей. Показано, что разработанный метод позволяет распознать фотолюминесценцию ОГ и НА на фоне флуоресценции собственных флуорофоров яичного белка с достаточно низким порогом детектирования по концентрации, не превышающим 2 мг/л и 4 мг/л, соответственно. Было показано, что применение отбора существенных входных признаков позволяет повысить точность решения обратной задачи в 1.5 раза.

Разработан метод контроля выведения нанокompозита на основе УНЧ и его компонентов из организма с уриной. Впервые решена трехпараметрическая обратная задача определения количества каждого из выводимых компонентов нанокompозита по спектрам фотолюминесценции с помощью ИНС.

Проведено сопоставление полученных при реализации разработанного метода ошибок определения концентрации УНЧ и компонентов нанокompлекса в урине с характерными значениями концентраций УНЧ и их комплексов, используемых на сегодняшний день в области медицины. Результаты являются удовлетворительными, что открывает перспективы применения разработанных методов при использовании УНЧ и нанокompозитов на их основе в качестве тераностических агентов в медицине.

Впервые реализована STED-микроскопия нанокompозитов детонационного метода синтеза в клетках *HeLa*. Результаты открывают перспективы использования этого метода визуализации ДНА в клетках при наличии потребности сверхвысокого пространственного разрешения, например, для определения локализации ДНА в объеме клетки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты, полученные в настоящей диссертационной работе:

1. С помощью методов лазерной спектроскопии КР света изучены взаимодействия ДНА, покрытых различными функциональными группами – COOH, OH, H, - с молекулами воды в суспензиях. Обнаружено влияние диспергированных ДНА на силу водородных связей в воде. Показано, что степень влияния ДНА на водородные связи растворителя зависит от типа поверхностной функционализации наночастиц, определяется соотношением вкладов индуктивного и мезомерного электронных эффектов и ослабляется в следующем ряду:



2. Впервые экспериментально и теоретически по колебательным спектрам получены численные оценки энергии водородных связей в водных суспензиях ДНА с различной функционализацией поверхности: ДНА-Н – 12.7 кДж/моль, ДНА-поли – 13.1 кДж/моль, ДНА-ОН – 13.5 кДж/моль, ДНА-COOH – 14.0 кДж/моль. Подтверждена зависимость силы водородных связей в водных суспензиях ДНА от типа их функциональных поверхностных групп.

3. С помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и пикосекундной спектроскопии с временным разрешением изучено влияние взаимодействий ДНА-поли, ДНА-COOH, ДНА-ОН, ДНА-Н с молекулами окружения на фотолюминесцентные свойства наночастиц. Установлено, что фотолюминесцентные свойства углеродных наночастиц зависят от взаимодействий поверхностных групп наночастиц с молекулами окружения, в первую очередь, от силы водородных связей в суспензиях. Интенсивность фотолюминесценции ДНА в зависимости от функционализации поверхности коррелирует с рядом по степени влияния детонационных наноалмазов с различной поверхностной функционализацией поверхности на водородные связи воды. Показано, что посредством изменения функционализации поверхности детонационных наноалмазов возможно управление их фотолюминесцентными свойствами.

4. Исследовано влияние УНЧ на водородные связи в протонных растворителях с различной полярностью, изменяющейся в ряду: вода > метанол > этанол > изопропанол. Установлено, что чем меньше полярность растворителя, тем сильнее ослабление водородных связей в суспензиях УНЧ. Обнаружена зависимость фотолюминесцентных свойств УНЧ от полярности растворителя и сил водородных связей в нем. Чем слабее водородные связи в растворителе, тем интенсивнее фотолюминесценция УНЧ.

5. Исследованы адсорбционные свойства и рассчитаны значения адсорбционной активности ДНА с различной функционализацией поверхности по отношению к нитрат-ионам и ионам тяжелых металлов. Установлено, что наличие на поверхности ДНА групп COOH увеличивает адсорбционную активность ДНА по отношению к исследуемым ионам в 3 раза по сравнению с полифункциональной поверхностью ДНА. Показано, что целенаправленное изменение функционализации поверхности ДНА позволяет управлять сорбционными свойствами наночастиц. С помощью спектроскопии ИК поглощения выяснены механизмы адсорбции указанных ионов на поверхность ДНА: катионы меди и свинца адсорбируются за счет физической адсорбции, нитрат-анионы – посредством химической адсорбции.
6. Исследованы взаимодействия ДНА-COOH с молекулами ДНК. Определены значения адсорбционной активности ДНА по отношению к АО ДНК и установлены ряды по степени адсорбции АО на поверхность ДНА: Ц>Т≥А>Г для водно-щелочной среды и Ц>А>Т – для водной. Экспериментально и теоретически установлены механизмы адсорбции азотистых оснований ДНК и их комплементарных пар на поверхность ДНА. Обнаружено, что и АО, и их комплементарные пары адсорбируются на поверхность ДНА посредством физической адсорбции, при этом водородные связи в комплементарных парах не разрываются.
7. Разработан новый метод оптической визуализации УНЧ в биологической среде с помощью лазерной фотолюминесцентной спектроскопии и искусственных нейронных сетей. Показана принципиальная возможность обнаружения УНЧ по их спектрам фотолюминесценции на фоне аутофлуоресценции биологического окружения. Разработанный метод обеспечивает точность определения концентрации ОГ и ДНА в яичном белке 2 мг/л и 3 мг/л, соответственно.
8. Разработан метод мониторинга выведения из организма ДНА, углеродных НК и их компонентов: с помощью искусственных нейронных сетей решены задачи классификации выводимых компонентов НК и определения концентрации каждого компонента по их спектрам фотолюминесценции. Полученные точности определения концентрации ДНА (0.58 мг/л), НК и их компонентов (не хуже, чем 0.45 мг/л) являются удовлетворительными и открывают перспективы использования разработанного метода и исследованных наночастиц в медицине.
9. Впервые методом STED-микроскопии реализована визуализация ДНА в клеточных линиях *HeLa*.

Установленные зависимости фотолюминесцентных и сорбционных свойств УНЧ от типа их функциональных поверхностных групп и от параметров окружающей среды обеспечивают возможность управления стабильностью и интенсивностью фотолюминесценции, а также селективностью адсорбционных свойств наночастиц. Таким образом, полученные результаты исследования свойств ДНА и ОГ в воде и в биологической среде и разработанные методы оптической визуализации УНЧ в биоткани показывают широкие перспективы их использования в качестве многофункциональных фотолюминесцентных маркеров в медицине.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

А	аденин
АВНС	анализ весов нейронной сети
АО	азотистые основания
АСМ	атомно-силовой микроскоп
Г	гуанин
ГА	генетические алгоритмы
ДНА	наноалмаз детонационного метода синтеза
ИНС	искусственные нейронные сети
КК	кросс-корреляция
КР	комбинационное рассеяние
КЭ	кросс-энтропия
МПС	многослойный персептрон
НА	наноалмаз
НК	наноккомпозит
ОГ	оксид графена
ПЭМ	просвечивающий электронный микроскоп
САО	средняя абсолютная ошибка
Соп	сополимер
СТО	стандартное отклонение
Т	тимин
ТФП	теория функционала плотности
УНЧ	углеродные наночастицы
ФК	фолиевая кислота
Ц	цитозин

## БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение хочу выразить благодарность своему научному руководителю – Доленко Татьяне Альдефонсовне за поддержку и помощь в исследовательской деятельности. Без ее грамотного руководства (начиная с 2009 года) эта работа не состоялась бы. Большое спасибо хотелось бы сказать всему составу родной лаборатории Лазерной спектроскопии супрамолекулярных соединений и наноструктур за эти 9 лет увлекательных будней (и иногда выходных).

Хотелось бы выразить благодарность партнерам из дружественных лабораторий. Большое спасибо О. А. Шендеровой (Адамас Нанотехнолоджис, США) за предоставление уникальных образцов углеродных наночастиц и постоянную готовность к обсуждению получаемых результатов с точки зрения химии и синтеза. Хотелось бы выразить благодарность руководителю Лаборатории фармакологических наук Университета Або (Турку, Финляндия) Дж. М. Розенхольм не только за синтез наноконплексов, использованных в настоящей работе, но и за предоставление возможности поработать на STED-микроскопе. Большое спасибо заведующему Лабораторией углеродной нанофотоники ИОФ РАН И. И. Власову за возможность проведения измерений КР порошков используемых в работе наночастиц. Большое спасибо И. Л. Пластун и А. В. Бокареву за постоянную готовность к обсуждению новых идей и их реализации. Хотелось бы еще выразить благодарность Лаборатории адаптивных методов обработки данных НИИЯФ им. Д.В. Скобельцина за обучение современным методам анализа данных.

Хочу выразить благодарность кафедре квантовой электроники физического факультета МГУ в целом, и каждому сотруднику в частности. За 9 лет общий дух и настрой кафедры всегда показывал к чему стремиться.

Спасибо родным и друзьям за поддержку.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Mochalin V.N. и др. The properties and applications of nanodiamonds // *Nature Nanotechnology*. 2011. Т. 7. № 1. С. 11–23.
- [2] Dolmatov V.Y. Detonation-synthesis nanodiamonds: synthesis, structure, properties and applications // *Russian Chemical Reviews*. 2007. Т. 76. № 4. С. 339–360.
- [3] Faklaris O. и др. Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells // *ACS Nano*. 2009. Т. 3. № 12. С. 3955–3962.
- [4] Huang H. и др. Active Nanodiamond Hydrogels for Chemotherapeutic Delivery // *Nano Letters*. 2007. Т. 7. № 11. С. 3305–3314.
- [5] Li X. и др. TAT-conjugated nanodiamond for the enhanced delivery of doxorubicin // *Journal of Materials Chemistry*. 2011. Т. 21. № 22. С. 7966.
- [6] S.Hens, S.Wallen, O.Shenderova. US Patent 7569205, 2009
- [7] Krueger A., Lang D. Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond // *Advanced Functional Materials*. 2012. Т. 22. № 5. С. 890–906.
- [8] Costa G.C.C. и др. Thermochemistry of nanodiamond terminated by oxygen containing functional groups // *Carbon*. 2014. Т. 80. С. 544–550.
- [9] Lai L., Barnard A.S. Modeling the thermostability of surface functionalisation by oxygen, hydroxyl, and water on nanodiamonds // *Nanoscale*. 2011. Т. 3. № 6. С. 2566.
- [10] Paget V. и др. Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines // *Nanotoxicology*. 2013. Т. 8. № suppl. С. 46–56.
- [11] Laporte G., Psaltis D. STED imaging of green fluorescent nanodiamonds containing nitrogen-vacancy-nitrogen centers // *Biomedical Optics Express*. 2015. Т. 7. № 1. С. 34.
- [12] Kuo Y. и др. Fluorescence lifetime imaging microscopy of nanodiamonds in vivo // *Advances in Photonics of Quantum Computing, Memory, and Communication VI* / под ред. Z.U. Hasan и др. : SPIE, 2013.
- [13] Li M.M. и др. RBF neural networks for solving the inverse problem of backscattering spectra // *Neural Computing and Applications*. 2007. Т. 17. № 4. С. 391–397.
- [14] Yasmin M. и др. Neural Networks in Medical Imaging Applications: A Survey // *World Applied Sciences Journal*. 2013. Т. 22. № 1. С. 85-96.
- [15] Miller A.S., Blott B.H., James T.K. Review of neural network applications in medical imaging and signal processing // *Medical & Biological Engineering & Computing*. 1992. Т. 30. № 5. С. 449–464.
- [16] Dolenko T.A., Fadeev V.V., Gerdova I.V., Dolenko S.A., Reuter R. Fluorescence diagnostics of oil pollution in coastal marine waters using artificial neural networks. *Applied Optics*, 2002, v.41, №24, p.5155-5166
- [17] Белобров П. Самоорганизация низкоразмерных структур углерода в алмазной электронике «Высокие технологии в промышленности России». - М.: «МГТУ им. Баумана». (2015). С. 220-235.

- [18] Raccichini R. и др. The role of graphene for electrochemical energy storage // *Nature Materials*. 2014. Т. 14. № 3. С. 271–279.
- [19] Nasir S. и др. Carbon-Based Nanomaterials/Allotropes: A Glimpse of Their Synthesis, Properties and Some Applications // *Materials*. 2018. Т. 11. № 2. С. 295.
- [20] Даниленко В.В. Синтез и спекание алмаза взрывом. Энергоатомиздат, Москва, 2003.
- [21] Долматов В. Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза. – Санкт-Петербург: Изд-во СПбГПУ. 2003. С. 344.
- [22] Лин Э.Э. Физикохимия ультрадисперсных систем Сб. науч. тр. V Всерос. конф. МИФИ, Москва. 2000. С. 40.
- [23] Анисичкин В. Ф. О механизме выделения углерода при детонационном разложении веществ // *Физика горения и взрыва*. 1994. Т. 30. № 5. С. 100–106.
- [24] Titov V.M. и др. The Formation Kinetics of Detonation Nanodiamonds // *NATO Science Series. : Springer-Verlag*. С. 169–180.
- [25] Козырев Н. В и др. Исследование процесса синтеза ультрадисперсных алмазов из смесей тротила с гексогеном, октогеном и тэном // *Физика горения и взрыва*. 1992. 28, № 5. С. 119.
- [26] Gubarevich T.M. и др. Chemical purification of ultradispersed diamonds by hydrogen peroxide // *Journal Prikladnoi Khimii*. 1992. Т. 65, №. 11. С. 2512–2516.
- [27] Mitev D.P. и др. Screening of elemental impurities in commercial detonation nanodiamond using sector field inductively coupled plasma-mass spectrometry // *Journal of Materials Science*. 2014. Т. 49. № 10. С. 3573–3591.
- [28] Кошечев А. Термодесорбционная Масс-Спектрометрия в свете решения проблемы паспортизации и унификации поверхностных свойств детонационных наноалмазов // *Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*, 2008, Т. LII. № 5. С. 88-96.
- [29] Arnault J.-C. и др. Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. Т. 13. № 24. С. 11481.
- [30] Moche H. и др. Carboxylated nanodiamonds can be used as negative reference in in vitro nanogenotoxicity studies // *Journal of Applied Toxicology*. 2017. Т. 37. № 8. С. 954–961.
- [31] Tu J.-S. и др. Size-dependent surface CO stretching frequency investigations on nanodiamond particles // *The Journal of Chemical Physics*. 2006. Т. 125. № 17. С. 174713.
- [32] Ogale S. и др. Formation of diamond particulates by pulsed ruby laser irradiation of graphite immersed in benzene // *Solid State Communications*. 1992. Т. 84. № 4. С. 371–373.
- [33] Polo M.C. и др. Pulsed laser deposition of diamond from graphite targets // *Applied Physics Letters*. 1995. Т. 67. № 4. С. 485–487.
- [34] Baidakova M.V. и др. Structure of nanodiamonds prepared by laser synthesis // *Physics of the Solid State*. 2013. Т. 55. № 8. С. 1747–1753.

- [35] Martel-Estrada S.-A. Recent Progress in Biomedical Applications of Nanodiamonds // *Nanoscience and Nanotechnology*. 2018. Т. 8. № 1. С. 11-14.
- [36] Salava J. и др. Influence of air annealing on the luminescence dynamics of HPHT nanodiamonds // *Diamond and Related Materials*. 2016. Т. 68. С. 62–65.
- [37] Hummers W.S. Jr., Offeman R.E. Preparation of Graphitic Oxide // *Journal of the American Chemical Society*. 1958. Т. 80. № 6. С. 1339–1339.
- [38] Compton O.C., Nguyen S.T. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials // *Small*. 2010. Т. 6. № 6. С. 711–723.
- [39] Yan Q.-L. и др. Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials // *Nanoscale*. 2016. Т. 8. № 9. С. 4799–4851.
- [40] Turner S. и др. Determination of Size, Morphology, and Nitrogen Impurity Location in Treated Detonation Nanodiamond by Transmission Electron Microscopy // *Advanced Functional Materials*. 2009. Т. 19. № 13. С. 2116–2124.
- [41] Praver S. и др. The Raman spectrum of nanocrystalline diamond // *Chemical Physics Letters*. 2000. Т. 332. № 1–2. С. 93–97.
- [42] Praver S., Nemanich R.J. Raman spectroscopy of diamond and doped diamond // *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2004. Т. 362. № 1824. С. 2537–2565.
- [43] Ferrari A.C., Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon // *Physical Review B*. 2000. Т. 61. № 20. С. 14095–14107.
- [44] Wada N., Gaczi P.J., Solin S.A. “Diamond-like” 3-fold coordinated amorphous carbon // *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1980. Т. 35–36. С. 543–548.
- [45] Merkulov V.I. и др. uv Studies of Tetrahedral Bonding in Diamondlike Amorphous Carbon // *Physical Review Letters*. 1997. Т. 78. № 25. С. 4869–4872.
- [46] Ferrari A.C., Robertson J. Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbon // *Physical Review B*. 2001. Т. 64. № 7.
- [47] Osswald S. и др. Phonon confinement effects in the Raman spectrum of nanodiamond // *Physical Review B*. 2009. Т. 80. № 7.
- [48] Chung P.-H. и др. The particle size-dependent photoluminescence of nanodiamonds // *Surface Science*. 2007. Т. 601. № 18. С. 3866–3870.
- [49] Perumbilavil S. и др. White light Z-scan measurements of ultrafast optical nonlinearity in reduced graphene oxide nanosheets in the 400–700 nm region // *Applied Physics Letters*. 2015. Т. 107. № 5. С. 51104.
- [50] Zhao F.L. и др. Ultrafast optical emission of nanodiamond induced by laser excitation // *Applied Physics Letters*. 2004. Т. 85. № 6. С. 914–916.
- [51] Khomich A. и др. Anomalous enhancement of nanodiamond luminescence upon heating // *Laser Physics Letters*. 2017. Т. 14. № 2. С. 25702.

- [52] Kompan M.E. и др. Photoluminescence spectra of ultradisperse diamond // *Physics of the Solid State*. 1997. Т. 39. № 12. С. 1928–1929.
- [53] Алексенский А.Е. и др. Оптические свойства слоев наноалмазов // *Физика твердого тела*. 2001. Т. 43. № 1. С. 140-145.
- [54] Горелик В.С., Рахматуллаев И.А. Фотолюминесценция ультрадисперсных наноалмазов и алмазных пленок при ультрафиолетовом лазерном возбуждении // *Неорганические материалы*. 2004. Т. 40. № 7. С. 788-792.
- [55] Robertson J., O'Reilly E.P. Electronic and atomic structure of amorphous carbon // *Physical Review B*. 1987. Т. 35. № 6. С. 2946–2957.
- [56] Yan J.-A., Xian L., Chou M.Y. Structural and Electronic Properties of Oxidized Graphene // *Physical Review Letters*. 2009. Т. 103. № 8.
- [57] Chien C.-T. и др. Tunable Photoluminescence from Graphene Oxide // *Angewandte Chemie International Edition*. 2012. Т. 51. № 27. С. 6662–6666.
- [58] Field J. *The Properties of Natural and Synthetic Diamond*. 1992. С. 710.
- [59] Zaitsev A. *Handbook of Industrial Diamonds and Diamond Films*. 1998. С. 227–376.
- [60] Zaitsev A.M. Vibronic spectra of impurity-related optical centers in diamond // *Physical Review B*. 2000. Т. 61. № 19. С. 12909–12922.
- [61] Haque A., Sumaiya S. An Overview on the Formation and Processing of Nitrogen-Vacancy Photonic Centers in Diamond by Ion Implantation // *Journal of Manufacturing and Materials Processing*. 2017. Т. 1. № 1. С. 6.
- [62] Doherty M.W. и др. The nitrogen-vacancy colour centre in diamond // *Physics Reports*. 2013. Т. 528. № 1. С. 1–45.
- [63] Gruber A. Scanning Confocal Optical Microscopy and Magnetic Resonance on Single Defect Centers // *Science*. 1997. Т. 276. № 5321. С. 2012–2014.
- [64] Hauf M.V. и др. Chemical control of the charge state of nitrogen-vacancy centers in diamond // *Physical Review B*. 2011. Т. 83. № 8.
- [65] Grotz B. и др. Charge state manipulation of qubits in diamond // *Nature Communications*. 2012. Т. 3. № 1. С. 1-6.
- [66] Hui Y.Y., Chang H.-C. Recent Developments and Applications of Nanodiamonds as Versatile Bioimaging Agents // *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2013. Т. 61. № 1. С. 67–76.
- [67] Schirhagl R. и др. Nitrogen-Vacancy Centers in Diamond: Nanoscale Sensors for Physics and Biology // *Annual Review of Physical Chemistry*. 2014. Т. 65. № 1. С. 83–105.
- [68] Reineck P. и др. Visible to near-IR fluorescence from single-digit detonation nanodiamonds: excitation wavelength and pH dependence // *Scientific Reports*. 2018. Т. 8. № 1. С. 1-7.
- [69] Barnard A.S., Sternberg M. Can we predict the location of impurities in diamond nanoparticles? // *Diamond and Related Materials*. 2007. Т. 16. № 12. С. 2078–2082.

- [70] Bradac C. и др. Effect of the Nanodiamond Host on a Nitrogen-Vacancy Color-Centre Emission State // *Small*. 2012. Т. 9. № 1. С. 132–139.
- [71] Reineck P. и др. Effect of Surface Chemistry on the Fluorescence of Detonation Nanodiamonds // *ACS Nano*. 2017. Т. 11. № 11. С. 10924–10934.
- [72] Stehlik S. и др. Photoluminescence of nanodiamonds influenced by charge transfer from silicon and metal substrates // *Diamond and Related Materials*. 2016. Т. 63. С. 91–96.
- [73] Ōsawa E. Monodisperse single nanodiamond particulates // *Pure and Applied Chemistry*. 2008. Т. 80. № 7. С. 1365–1379.
- [74] Barnard A.S. Self-assembly in nanodiamond agglutinates // *Journal of Materials Chemistry*. 2008. Т. 18. № 34. С. 4038.
- [75] Hees J., Kriele A., Williams O.A. Electrostatic self-assembly of diamond nanoparticles // *Chemical Physics Letters*. 2011. Т. 509. № 1–3. С. 12–15.
- [76] Panich A.M., Aleksenskii A.E. Deaggregation of diamond nanoparticles studied by NMR // *Diamond and Related Materials*. 2012. Т. 27–28. С. 45–48.
- [77] Mitchell H. и др. The chemical composition of the adult human body and its bearing on the biochemistry of growth // *The Journal of Biological Chemistry*. 1945. Т. 158. С. 625–637.
- [78] Ji S. и др. FTIR study of the adsorption of water on ultradispersed diamond powder surface // *Applied Surface Science*. 1998. Т. 133. № 4. С. 231–238.
- [79] Pina-Salazar E.-Z. и др. Water Adsorption Property of Hierarchically Nanoporous Detonation Nanodiamonds // *Langmuir*. 2017. Т. 33. № 42. С. 11180–11188.
- [80] Korobov M.V. и др. Nanophase of Water in Nano-Diamond Gel // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007. Т. 111. № 20. С. 7330–7334.
- [81] Laikhtman A. и др. Interaction of water vapor with bare and hydrogenated diamond film surfaces // *Surface Science*. 2004. Т. 551. № 1–2. С. 99–105.
- [82] Manelli O., Corni S., Righi M.C. Water Adsorption on Native and Hydrogenated Diamond (001) Surfaces // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010. Т. 114. № 15. С. 7045–7053.
- [83] Batsanov S.S. и др. Giant dielectric permittivity of detonation-produced nanodiamond is caused by water // *Journal of Materials Chemistry*. 2012. Т. 22. № 22. С. 11166.
- [84] Batsanov S.S., Poyarkov K.B., Gavrilkin S.M. Orientational polarization of molecular liquids in contact with diamond crystals // *JETP Letters*. 2009. Т. 88. № 9. С. 595–596.
- [85] Batsanov S.S. и др. Orientation of water molecules by the diamond surface // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2011. Т. 85. № 4. С. 712–715.
- [86] Batsanov S.S. и др. Water shells of diamond nanoparticles in colloidal solutions // *Applied Physics Letters*. 2014. Т. 104. № 13. С. 133105.
- [87] Petit T. и др. Valence holes observed in nanodiamonds dispersed in water // *Nanoscale*. 2015. Т. 7. № 7. С. 2987–2991.

- [88] Tomchuk O.V. и др. Structural Characteristics of Aqueous Dispersions of Detonation Nanodiamond and Their Aggregate Fractions as Revealed by Small-Angle Neutron Scattering // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2014. Т. 119. № 1. С. 794–802.
- [89] Stehlik S. и др. Water interaction with hydrogenated and oxidized detonation nanodiamonds — Microscopic and spectroscopic analyses // *Diamond and Related Materials*. 2016. Т. 63. С. 97–102.
- [90] Petit T. и др. Probing Interfacial Water on Nanodiamonds in Colloidal Dispersion // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2015. Т. 6. № 15. С. 2909–2912.
- [91] Devanathan R. и др. Molecular Dynamics Simulations Reveal that Water Diffusion between Graphene Oxide Layers is Slow // *Scientific Reports*. 2016. Т. 6. № 1. С. 1-8.
- [92] Buchsteiner A., Lerf A., Pieper J. Water Dynamics in Graphite Oxide Investigated with Neutron Scattering // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006. Т. 110. № 45. С. 22328–22338.
- [93] Li Q. и др. Rapid Evaporation of Water on Graphene/Graphene-Oxide: A Molecular Dynamics Study // *Nanomaterials*. 2017. Т. 7. № 9. С. 265.
- [94] Leidenfrost J.G. On the fixation of water in diverse fire // *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 1966. Т. 9. № 11. С. 1153–1166.
- [95] Li L., Bedrov D., Smith G.D. Water-Induced Interactions between Carbon Nanoparticles // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006. Т. 110. № 21. С. 10509–10513.
- [96] Zhao L. и др. Solvent induced fluorescence enhancement of graphene oxide studied by ultrafast spectroscopy // *Chemical Physics*. 2018. Т. 508. С. 1–6.
- [97] Choi Y. и др. Morphology Tunable Hybrid Carbon Nanosheets with Solvatochromism // *Advanced Materials*. 2017. Т. 29. № 24. С. 1701075.
- [98] Lin S. и др. Solvatochromism of bright carbon dots with tunable long-wavelength emission from green to red and their application as solid-state materials for warm WLEDs // *RSC Advances*. 2017. Т. 7. № 66. С. 41552–41560.
- [99] Pramanik A., Biswas S., Kumbhakar P. Solvatochromism in highly luminescent environmental friendly carbon quantum dots for sensing applications: Conversion of bio-waste into bio-asset // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018. Т. 191. С. 498–512.
- [100] Sciortino A. и др. Solvatochromism Unravels the Emission Mechanism of Carbon Nanodots // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2016. Т. 7. № 17. С. 3419–3423.
- [101] Рычкова С. Физико-химические закономерности сорбции полярных органических соединений различных классов на пористом микродисперсном детонационном наноалмазе (Диссертация). 2016.
- [102] Shames A.I. и др. Structure and magnetic properties of detonation nanodiamond chemically modified by copper // *Journal of Applied Physics*. 2010. Т. 107. № 1. С. 14318.
- [103] Osipov V.Y., Gridnev I.D., Panich A.M. Natural limit of the number of copper ions chemisorbed on the surface of a detonation nanodiamond // *Mendeleev Communications*. 2018. Т. 28. № 4. С. 404–405.

- [104] Peristyy A., Paull B., Nesterenko P.N. Ion-exchange properties of microdispersed sintered detonation nanodiamond // *Adsorption*. 2016. Т. 22. № 3. С. 371–383.
- [105] Osipov V.Y. и др. Infrared absorption study of surface functional groups providing chemical modification of nanodiamonds by divalent copper ion complexes // *Diamond and Related Materials*. 2011. Т. 20. № 8. С. 1234–1238.
- [106] Zhu Y. и др. Nanodiamonds act as Trojan horse for intracellular delivery of metal ions to trigger cytotoxicity // *Particle and Fibre Toxicology*. 2015. Т. 12. № 1. С. 1-11.
- [107] Matsumoto K. и др. A Highly Efficient Adsorbent Cu-Perussian Blue@Nanodiamond for Cesium in Diluted Artificial Seawater and Soil-Treated Wastewater // *Scientific Reports*. 2018. Т. 8. № 1. С. 1-14.
- [108] Matsumoto K. и др. Effect of Nanodiamond on Removal of Cesium from Soil by Potassium Ferrocyanide // *Advanced materials and technologies*. 2016. № 3. С. 9–13.
- [109] Peristyy A.A. и др. Diamond based adsorbents and their application in chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2014. Т. 1357. С. 68–86.
- [110] Huang L.-C.L., Chang H.-C. Adsorption and Immobilization of Cytochrome c on Nanodiamonds // *Langmuir*. 2004. Т. 20. № 14. С. 5879–5884.
- [111] Aramesh M. и др. Surface charge effects in protein adsorption on nanodiamonds // *Nanoscale*. 2015. Т. 7. № 13. С. 5726–5736.
- [112] Yeap W.S., Tan Y.Y., Loh K.P. Using Detonation Nanodiamond for the Specific Capture of Glycoproteins // *Analytical Chemistry*. 2008. Т. 80. № 12. С. 4659–4665.
- [113] Fu C.-C. и др. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Т. 104. № 3. С. 727–732.
- [114] Purto V. и др. The interaction of linear and ring forms of DNA molecules with nanodiamonds synthesized by detonation // *Nanotechnology*. 2008. Т. 19. № 32. С. 325101.
- [115] Gibson N.M. и др. Electrostatically mediated adsorption by nanodiamond and nanocarbon particles // *Journal of Nanoparticle Research*. 2012. Т. 14. № 3. С. 1-12.
- [116] Grichko V., Grishko V., Shenderova O. Nanodiamond bullets and their biological targets // *NanoBiotechnology*. 2006. Т. 2. № 1–2. С. 37–42.
- [117] Wagnières G.A., Star W.M., Wilson B.C. In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications // *Photochemistry and Photobiology*. 1998. Т. 68. № 5. С. 603.
- [118] Beer A. J., Schwaiger M. Imaging of integrin  $\alpha\beta 3$  expression // *Cancer and metastasis reviews*. 2008. Т. 27. № 4. С. 631-644.
- [119] Tsien R.Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN // *Annual Review of Biochemistry*. 1998. Т. 67. № 1. С. 509–544.
- [120] Evanko D. The new fluorescent probes on the block // *Nature Methods*. 2008. Т. 5. № 3. С. 218–218.

- [121] Aldeek F. и др. Growth of Highly Fluorescent Polyethylene Glycol- and Zwitterion-Functionalized Gold Nanoclusters // *ACS Nano*. 2013. Т. 7. № 3. С. 2509–2521.
- [122] E Zhao L. и др. Surface-enhanced Raman scattering (SERS)-active gold nanochains for multiplex detection and photodynamic therapy of cancer // *Acta Biomaterialia*. 2015. Т. 20. С. 155–164.
- [123] Bolshakov A. и др. Photoluminescence of SiV centers in single crystal CVD diamond in situ doped with Si from silane // *physica status solidi (a)*. 2015. Т. 212. № 11. С. 2525–2532.
- [124] Hemelaar S. и др. The Response of HeLa Cells to Fluorescent NanoDiamond Uptake // *Sensors*. 2018. Т. 18. № 2. С. 355.
- [125] Tsai L.-W. и др. Nanodiamonds for Medical Applications: Interaction with Blood in Vitro and in Vivo // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Т. 17. № 7. С. 1111.
- [126] Ryu T.-K. и др. Bone-targeted delivery of nanodiamond-based drug carriers conjugated with alendronate for potential osteoporosis treatment // *Journal of Controlled Release*. 2016. Т. 232. С. 152–160.
- [127] Multifunctional biomedical applications of magnetic nanodiamond // *Journal of Biomedical Optics*. 2018. Т. 23. № 9. С. 1.
- [128] Shalaginov M.Y. и др. Characterization of nanodiamonds for metamaterial applications // *Applied Physics B*. 2011. Т. 105. № 2. С. 191–195.
- [129] Hell S.W., Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy // *Optics Letters*. 1994. Т. 19. № 11. С. 780.
- [130] Wildanger D. и др. Solid Immersion Facilitates Fluorescence Microscopy with Nanometer Resolution and Sub-Ångström Emitter Localization // *Advanced Materials*. 2012. Т. 24. № 44. С. OP309-OP313.
- [131] Lenhardt L. и др. Artificial neural networks for processing fluorescence spectroscopy data in skin cancer diagnostics // *Physica Scripta*. 2013. Т. T157. С. 14057.
- [132] Gudla P.R. и др. SpotLearn: Convolutional Neural Network for Detection of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Signals in High-Throughput Imaging Approaches // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2017. Т. 82. С. 57–70.
- [133] Arnold M.A., Liu L., Olesberg J.T. Selectivity Assessment of Noninvasive Glucose Measurements Based on Analysis of Multivariate Calibration Vectors // *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2007. Т. 1. № 4. С. 454–462.
- [134] Fernandez-Blanco E. и др. Automatic seizure detection based on star graph topological indices // *Journal of Neuroscience Methods*. 2012. Т. 209. № 2. С. 410–419.
- [135] Amato F. и др. Artificial neural networks in medical diagnosis // *Journal of Applied Biomedicine*. 2013. Т. 11. № 2. С. 47–58.
- [136] Holland J.H. *Adaptation in natural and artificial systems*. 1975. The University of Michigan Press.

- [137] Goldberg D. Genetic algorithms in search, optimization, and machine learning. 1989. Addison-Wesley Publishing Co., Inc.
- [138] Панченко Т. Генетические алгоритмы. 2007. Издательский дом «Астраханский университет», 87 с.
- [139] I. V. Gerdova и др. New opportunity solutions to inverse problems in laser spectroscopy involving artificial neural networks // *Izv. Akad. Nauk Ser. Fiz.* 2002. Т. 66. № 8. С. 1116–1124.
- [140] Dolenko S. и др. Comparison of Input Data Compression Methods in Neural Network Solution of Inverse Problem in Laser Raman Spectroscopy of Natural Waters // *Artificial Neural Networks and Machine Learning – ICANN 2012: Springer Berlin Heidelberg*, 2012. С. 443–450.
- [141] Petit T. и др. Unusual Water Hydrogen Bond Network around Hydrogenated Nanodiamonds // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2017. Т. 121. № 9. С. 5185–5194.
- [142] Vervald E.N. и др. DNA-nanodiamond interactions influence on fluorescence of nanodiamonds // *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. 2018. С. 64–66.
- [143] Laptinskiy K.A. и др. Adsorption of DNA Nitrogenous Bases on Nanodiamond Particles: Theory and Experiment // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2018. Т. 122. № 20. С. 11066–11075.
- [144] Dolenko T.A. и др. Study of adsorption properties of functionalized nanodiamonds in aqueous solutions of metal salts using optical spectroscopy // *Journal of Alloys and Compounds*. 2014. Т. 586. С. S436–S439.
- [145] Dolenko T.A. и др. Optical imaging of fluorescent carbon biomarkers using artificial neural networks // *Journal of Biomedical Optics*. 2014. Т. 19. № 11. С. 117007.
- [146] Ефимов Ю.Я., Наберухин Ю.И. Обоснование непрерывной модели строения жидкой воды посредством анализа температурной зависимости колебательных спектров // *Журнал структурной химии*. 1980. Т. 21. № 3. С. 95-104.
- [147] Walrafen G.E. Raman Spectral Studies of HDO in H<sub>2</sub>O // *The Journal of Chemical Physics*. 1968. Т. 48. № 1. С. 244–251.
- [148] Аксенов В.Л., Тютюнников С.И. EXAFS-спектроскопия на пучках синхротронного излучения // *Физика элементарных частиц и атомного ядра*. 2001. Т. 32. № 6. С. 1299-1358.
- [149] Nagasaka M. и др. Development of a liquid flow cell to measure soft X-ray absorption in transmission mode: A test for liquid water // *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. 2010. Т. 177. № 2–3. С. 130–134.
- [150] Nilsson A. и др. X-ray absorption spectroscopy and X-ray Raman scattering of water and ice; an experimental view // *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. 2010. Т. 177. № 2–3. С. 99–129.
- [151] Walrafen G.E. и др. Temperature dependence of the low- and high-frequency Raman scattering from liquid water // *The Journal of Chemical Physics*. 1986. Т. 85. № 12. С. 6970–6982.
- [152] Dolenko T.A. и др. Valence band of liquid water Raman scattering: some peculiarities and applications in the diagnostics of water media // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2000. Т. 31. № 8–9. С. 863–870.

- [153] Lednev V.N. и др. Quantifying Raman OH-band spectra for remote water temperature measurements // *Optics Letters*. 2016. Т. 41. № 20. С. 4625.
- [154] Rastogi A., K. A., Suresh S. Hydrogen Bond Interactions Between Water Molecules in Bulk Liquid, Near Electrode Surfaces and Around Ions // *Thermodynamics - Physical Chemistry of Aqueous Systems*. : InTech, 2011.
- [155] Kohn W. Nobel Lecture: Electronic structure of matter—wave functions and density functionals // *Reviews of Modern Physics*. 1999. Т. 71. № 5. С. 1253–1266.
- [156] Pople J.A. Nobel Lecture: Quantum chemical models // *Reviews of Modern Physics*. 1999. Т. 71. № 5. С. 1267–1274.
- [157] Frisch M.J. и др. *Gaussian 09, Revision A.1*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT. 2009.
- [158] Хурсан С.Л. Квантовая механика и квантовая химия. Конспекты лекций. 2005. С. 164.
- [159] Кон В., Попл Дж. А. Нобелевские лекции по химии — 1998 // *Успехи Физических Наук*. 2002. Т. 172. С. 335.
- [160] Iogansen A.V. Direct proportionality of the hydrogen bonding energy and the intensification of the stretching  $\nu(\text{XH})$  vibration in infrared spectra // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1999. Т. 55. № 7–8. С. 1585–1612.
- [161] Babkov L.M. и др. Modeling of the structure and vibrational spectra of 2-biphenylmethanol using B3LYP method // *Journal of Molecular Structure*. 2006. Т. 792–793. С. 68–72.
- [162] [http://www1.lsbu.ac.uk/water/water\\_sitemap.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_sitemap.html)
- [163] Nič M. и др. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2009
- [164] Stock L.M. The origin of the inductive effect // *Journal of Chemical Education*. 1972. Т. 49. № 6. С. 400.
- [165] Ahn D.-S. и др. Effects of Substituting Group on the Hydrogen Bonding in Phenol–H<sub>2</sub>O Complexes: Ab Initio Study // *The Journal of Physical Chemistry A*. 2003. Т. 107. № 1. С. 131–139.
- [166] Liu T. и др. Two-Way Effects between Hydrogen Bond and Intramolecular Resonance Effect: An Ab Initio Study on Complexes of Formamide and Its Derivatives with Water // *The Journal of Physical Chemistry A*. 2008. Т. 112. № 24. С. 5436–5447.
- [167] Parreira R.L.T. и др. Hydrogen bond and the resonance effect on the formamide-water complexes // *International Journal of Quantum Chemistry*. 2011. Т. 112. № 5. С. 1401–1420.
- [168] Dewick P. *Essentials of organic chemistry: For students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry*. Wiley. 2006.
- [169] Sun Q. Local statistical interpretation for water structure // *Chemical Physics Letters*. 2013. Т. 568–569. С. 90–94.

- [170] Клышко Д.Н., Фадеев В.В. Дистанционное определение концентрации примесей в воде методом лазерной спектроскопии с калибровкой по комбинационному рассеянию // Доклады Академии наук. 1978. Т. 238. № 2. С.320–323.
- [171] Buberman G.S. The band structure of diamond // Uspekhi Fizicheskikh Nauk. 1971. Т. 103. № 4. С. 675.
- [172] Xiao J. и др. Fluorescence Origin of Nanodiamonds // The Journal of Physical Chemistry C. 2015. Т. 119. № 4. С. 2239–2248.
- [173] Fung K.H., Tang I.N. Raman scattering from single solution droplets // Applied Optics. 1988. Т. 27. № 2. С. 206.
- [174] Tan C.H. и др. UV spectroscopy determination of aqueous lead and copper ions in water // Optical Sensing and Detection III / под ред. F. Berghmans, A.G. Mignani, P. De Moor.: SPIE, 2014.
- [175] Kachevskii S.A. и др. Palladium on ultradisperse diamond and activated carbon: the relation between structure and activity in hydrodechlorination // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2007. Т. 81. № 6. С. 866–873.
- [176] Gibson N.M. и др. Fluorescent dye adsorption on nanocarbon substrates through electrostatic interactions // Diamond and Related Materials. 2010. Т. 19. № 2–3. С. 234–237.
- [177] Gibson N.M. и др. Immobilization of mycotoxins on modified nanodiamond substrates // Biointerphases. 2011. Т. 6. № 4. С. 210–217.
- [178] Shenderova O. и др. Nanodiamond Particles in Electronic and Optical Applications // MRS Fall Meeting. 2009. С. 1-12.
- [179] Теренин А.Н. Спектры поглощения растворов электролитов // Успехи Физических Наук. 1937. Т. XVII, № 1, С. 1-54.
- [180] Stuart B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. 2004.
- [181] Arulmozhi K.T., Mythili N. Studies on the chemical synthesis and characterization of lead oxide nanoparticles with different organic capping agents // AIP Advances. 2013. Т. 3. № 12. С. 122122.
- [182] Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure.: Springer New York, 1984.
- [183] Das A. и др. Binding of nucleobases with single-walled carbon nanotubes: Theory and experiment // Chemical Physics Letters. 2008. Т. 453. № 4–6. С. 266–273.
- [184] Ramraj A. и др. Assessment of approximate quantum chemical methods for calculating the interaction energy of nucleic acid bases with graphene and carbon nanotubes // Chemical Physics Letters. 2010. Т. 484. № 4–6. С. 295–298.
- [185] Yamazaki T., Fenniri H. Imaging Carbon Nanotube Interaction with Nucleobases in Water Using the Statistical Mechanical Theory of Molecular Liquids // The Journal of Physical Chemistry C. 2012. Т. 116. № 28. С. 15087–15092.
- [186] Lv W. The adsorption of DNA bases on neutral and charged (8, 8) carbon-nanotubes // Chemical Physics Letters. 2011. Т. 514. № 4–6. С. 311–316.

- [187] Umadevi D., Sastry G.N. Quantum Mechanical Study of Physisorption of Nucleobases on Carbon Materials: Graphene versus Carbon Nanotubes // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2011. Т. 2. № 13. С. 1572–1576.
- [188] Frischknecht A.L., Martin M.G. Simulation of the Adsorption of Nucleotide Monophosphates on Carbon Nanotubes in Aqueous Solution // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2008. Т. 112. № 16. С. 6271–6278.
- [189] Sowerby S.J. и др. Differential adsorption of nucleic acid bases: Relevance to the origin of life // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. Т. 98. № 3. С. 820–822.
- [190] Varghese N. и др. Binding of DNA Nucleobases and Nucleosides with Graphene // *ChemPhysChem*. 2009. Т. 10. № 1. С. 206–210.
- [191] Šponer J., Riley K.E., Hobza P. Nature and magnitude of aromatic stacking of nucleic acid bases // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2008. Т. 10. № 19. С. 2595.
- [192] Sarmah A., Roy R.K. Understanding the Interaction of Nucleobases with Chiral Semiconducting Single-Walled Carbon Nanotubes: An Alternative Theoretical Approach Based on Density Functional Reactivity Theory // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2013. Т. 117. № 41. С. 21539–21550.
- [193] Yan J. и др. Experimental and theoretical evaluation of nanodiamonds as pH triggered drug carriers // *New Journal of Chemistry*. 2012. Т. 36. № 7. С. 1479.
- [194] Lanin S.N. и др. Modification of the surface chemistry of microdispersed sintered detonation nanodiamonds and its effect on the adsorption properties // *Adsorption*. 2017. Т. 23. № 5. С. 639–650.
- [195] Ten G.N. и др. Effect of hydrogen bonding on the structure and vibrational spectra of the complementary pairs of nucleic acid bases. II. adenine-thymine // *Journal of Structural Chemistry*. 2010. Т. 51. № 5. С. 854–861.
- [196] Hassoun M. *Fundamentals of Artificial Neural Networks*. MIT Press, 1995.
- [197] <http://www.neuroproject.ru/aboutproduct.php?info=ns2info>
- [198] Yin H.S. и др. Liquid Medication Dosing Errors in Children: Role of Provider Counseling Strategies // *Academic Pediatrics*. 2014. Т. 14. № 3. С. 262–270.
- [199] <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252274/9789241511643-eng.pdf;jsessionid=B10C17D3DE12609D7CCC713125FB8B70?sequence=1>
- [200] Kim Y.-I. Role of Folate in Colon Cancer Development and Progression // *The Journal of Nutrition*. 2003. Т. 133. № 11. С. 3731S–3739S.
- [201] Strojny B. и др. Long Term Influence of Carbon Nanoparticles on Health and Liver Status in Rats // *PLOS ONE*. 2015. Т. 10. № 12. С. e0144821.
- [202] Rojas S. и др. Biodistribution of Amino-Functionalized Diamond Nanoparticles. In Vivo Studies Based on <sup>18</sup>F Radionuclide Emission // *ACS Nano*. 2011. Т. 5. № 7. С. 5552–5559.
- [203] Zhang B. и др. A colon targeted drug delivery system based on alginate modified graphene oxide for colorectal liver metastasis // *Materials Science and Engineering: C*. 2017. Т. 79. С. 185–190.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица П1. Рассчитанные параметры водородных связей между молекулами в комплексе (А+Т)+(ДНА-СООН) в окружении 6 молекул воды.

№ Связи	Связь	а	б	в	г
		Длина, Å	Длина, Å	Длина, Å	Длина, Å
1	H...N	1.83		1.83	1.84
2	H...O	2.01		2.01	2.02
3	H...O	1.91	1.74	1.68	1.91
4	H...O	1.87	1.92	1.77	1.88
5	H...O	1.97		1.97	1.97
6	H...O	1.87		1.88	1.87
7	H...N	1.93		1.92	1.92
8	H...O	1.95		1.95	1.84
9	H...N	1.98		1.98	1.73
10	H...O		1.93	1.94	1.93
11	H...O		1.73	1.73	1.74
12	H...O		1.93	1.94	1.93
13	H...O		1.73	1.73	1.73
14	H...O		1.73	1.73	1.73
15	H...O		1.93	1.93	1.93

Таблица П2. Рассчитанные параметры водородных связей (3,4), (8,9) и (14,15).

Номер связи	Связь	$\nu, \text{cm}^{-1}$	$\Delta\nu, \text{cm}^{-1}$	$-\Delta H, \text{ккал/моль}$	Длина водородной связи, Å	
1	а	N-H	2860	585	7.00	1.83 (N...H)
	в	N-H	2845	600	7.10	1.83 (N...H)
	г	N-H	2886	559	6.83	1.84 (N...H)
2	а	N-H	3189	250	4.35	2.01 (N...H)
	в	N-H	3189	250	4.35	2.01 (N...H)

	г	N-H	3179	260	4.45	2.02 (N⋯H)
3	a	H-O	3379	186	3.62	1.91 (O⋯H)
	б	H-O	3063	460	6.15	1.74 (O⋯H)
	B	H-O	3007	516	6.55	1.69 (O⋯H)
	г	H-O	3379	186	3.62	1.91 (O⋯H)
4	a	N-H	3177	304	4.87	1.87 (O⋯H)
	б	H-O	3387	178	3.52	1.92 (O⋯H)
	B	N-H	3132	349	5.27	1.77 (O⋯H)
	г	H-O	3176	305	4.87	1.88 (O⋯H)
8	a	N-H	3262	228	4.11	1.95 (O⋯H)
	B	N-H	3263	227	4.10	1.95 (O⋯H)
	г	N-H	3220	270	4.55	1.84 (O⋯H)
9	a	H-O	3344	221	4.04	1.98 (N⋯H)
	B	H-O	3344	221	4.04	1.98 (N⋯H)
	г	H-O	2778	745	7.97	1.73 (N⋯H)
14	б	H-O	3059	464	6.18	1.73 (O⋯H)
	B	H-O	3058	465	6.18	1.73 (O⋯H)
	г	H-O	3063	460	6.15	1.73 (O⋯H)
15	б	H-O	3394	171	3.43	1.93 (O⋯H)
	B	H-O	3395	170	3.42	1.93 (O⋯H)
	г	H-O	3393	172	3.45	1.93 (O⋯H)