

УДК 60-022.513.2

НАНОДІАМАНТИ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ КЛІТИННИХ І СЕНСОРНИХ НАНОТЕХНОЛОГІЙ

В. І. НАЗАРЕНКО, О. П. ДЕМЧЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: Nazarenko@biochem.kiev.ua

Отримано 13.04.2013

Огляд присвячено аналізу властивостей та застосуванню флуоресцентних нанодіамантів, які є однією з форм вуглецевої наноструктури, що має атомарну будову і всі властивості діаманта, зокрема надзвичайно високі щільність, міцність та показник заломлення. Нанодіаманти мають майже сферичну форму, а їх малий розмір (~4–10 нм) зумовлює значну площу поверхні, яка здатна до адсорбції різних речовин, включаючи лікарські препарати. Їхня поверхня, утворена різними полярними групами (гідроксилами, карбоксилами та ін.), є також хімічно активною, і це дає змогу здійснювати модифікації різного типу, що уможливорює побудову найрізноманітніших функціональних наноматеріалів. Створено технології, що дозволяють зробити такі нанодіаманти флуоресцентними. Зокрема, подібних властивостей можна набути радіаційною обробкою, що призводить до утворення N–V-дефектів. Такі флуорофори поглинають світло і випромінюють у зручній для спостереження видимій ділянці спектра. Наночастинки не фотодеградують, що вкрай важливо для флуоресцентної мікроскопії клітин, не виявляють токсичності на рівні клітин та організму і завдяки своїй біосумісності можуть бути використані *in vivo* як контрастні агенти та носії ліків. Передбачається, що в майбутньому застосування цих наночастинок у біотехнології буде пов'язано зі створенням нанокомпозитів, які поєднуюватимуть в одній наночастинці необхідні функції.

Ключові слова: нанобіотехнологія, нанодіаманти, флуоресценція, нанокомпозити.

Серед значної кількості наноматеріалів, створених і досліджених наприкінці минулого сторіччя, нанодіаманти відіграють особливу роль. Відомі й інші наноструктури з чистого вуглецю, зокрема фулерени, графени, нанотрубки та графітові наночастинки, які було широко досліджено, у тому числі й українськими вченими [1–7]. Проте лише нанодіаманти, маючи sp^3 -гібридизацію атомів, характеризуються надзвичайно щільною і твердою структурою діаманта, для якої характерні дуже високі питома вага ($3,5 \text{ г/см}^3$) та показник заломлення (2,42). Водночас, крихітний розмір — від 4 до 10 нм, велике співвідношення поверхні до об'єму і, відповідно, до маси ($300\text{--}400 \text{ м}^2/\text{г}$) надають їм нових властивостей [8]. Поверхневі атоми вуглецю мають некомпенсовану валентність, результатом якої є їхня винятково висока поверхнева активність, тобто здатність до сорбції різних речовин і поверхневих модифікацій. Такі властивості не зали-

шилися поза увагою творців нанотехнологій біологічного і медичного призначення. Так, було запропоновано використовувати їх як носії ліків [9–12]. Тут, на відміну від інших структурно мобільних чи пористих наноматеріалів, де препарат включають у внутрішній об'єм, використовується активна зовнішня поверхня. Відсутність ефектів токсичності на рівні клітини і організму сприяла розвитку цього напрямку [13].

Виявлення та вивчення оптичних властивостей нанодіамантів відкрило новий аспект застосування їх як компонентів хімічних сенсорів і біосенсорів та репортерів під час побудови клітинних зображень [14, 15]. Більш того, вони виявилися цілком сумісними з іншими нанотехнологіями, що уможливорює розроблення нанокомпозитів багатопланового призначення. На цих властивостях буде сконцентровано основну увагу в цьому короткому огляді.

Відкриття нанодіамантів і методи їх одержання

Цікавою є історія відкриття нанодіамантів. У Радянському Союзі їх відкривали випадково як мінімум тричі [16], уперше — в 1963 році під час аналізу продуктів вибуху. Потім дослідження було зупинено, а згодом знову розпочато, коли з'явилась потреба в цих матеріалах. Таким чином, історично першим був метод синтезу нанодіамантів із продуктів вуглецю шляхом стискання за потужного вибуху в замкненому просторі. Значний внесок у розроблення технології їх виробництва зробили українські вчені [17]. Однак конфіденційність інформації стосовно таких розробок та відсутність масштабного ринку застосування не сприяли їх розвитку. Перше промислове виробництво нанодіамантів було налагоджено фірмою «Дюпон». Паралельно розвивалися й інші методи, які ґрунтувалися на каталітичному синтезі та застосуванні надвисоких температур, що давало змогу вирощувати кристали більшого розміру.

У розвитку сучасних нанотехнологій нанодіамантам належить важливе місце. Їх успішно використовують для створення наноконпозиційних матеріалів різного призначення, елементів наноелектроніки, селективних адсорбентів і каталізаторів. Застосування нанодіамантів істотно поліпшує властивості полірувальних сумішей та мастильних матеріалів, покриттів на різних поверхнях. Рівень виробництва нанодіамантів лише в Україні перевищує 100 кг на рік, що є рекордом для функціональних наноматеріалів.

Найбільш уживаним методом синтезу цих сполук є вибух у закритому об'ємі суміші гексогену й тринітротолуолу з наступним очищенням у кислотних середовищах для видалення неалмазних форм вуглецю з їхньої поверхні. Алмазна форма утворюється, якщо під час вибуху відбувається вивільнення атомів вуглецю за створених у цих умовах високих значень тиску і температури з послідовним миттєвим збільшенням об'єму та охолодженням. Таким чином, вибухівка тут є і джерелом вуглецю, і джерелом енергії для створення особливих умов для синтезу.

Цей метод відрізняється від методів створення діамантів більшого розміру, коли кристали вирощують повільно за особливих умов високого тиску і температури. Такі кристали розміром понад 100 нм, широким розподілом за розміром і за властивостями поверхні набули застосування в полірувальних і мастильних матеріалах, проте є менш придатними для використання в біотехноло-

гії. Одержані вибухом наночастинки утримують аморфний вуглець на своїй поверхні. Для їх очищення розроблено спеціальні умови — оброблення FeSO_4 та H_2O_2 за кислих значень pH у водних розчинах.

Властивості нанодіамантів

Як відомо, і графіт, і діамант мають однаковий хімічний склад — лише вуглець (рис. 1). Проте різниця в їхніх властивостях є суттєвою. Кристалічна гратка діаманта уможливорює просторове зближення атомів до $1,54 \text{ \AA}$ зі щільністю атомів $1,76 \cdot 10^{23} \text{ см}^{-3}$, що робить такий кристал найщільнішим з усіх відомих на Землі матеріалів. Завдяки величезній енергії зв'язку між атомами вуглецю (83 ккал/моль) та тетраедричній спрямованості цих зв'язків діамант є найміцнішою з відомих сполук. Немає іншого природного чи штучно створеного матеріалу, що поєднує такі унікальні властивості, як надзвичайна жорсткість і стабільність внутрішньої структури поряд з високими адсорбційними і реактивними властивостями поверхні.

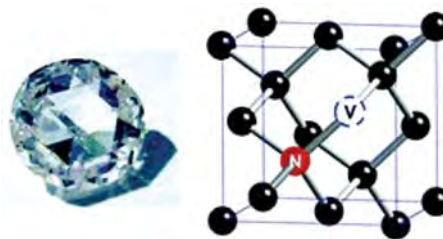


Рис. 1. Діамант і його атомарна структура, створена SP^3 -гібридизацією атомів вуглецю з N–V-домішкою

Створені вибуховою технологією нанодіаманти не мають властивостей поглинати і випромінювати світло видимого діапазону. Ці властивості виникають за наявності в них домішків атомів азоту за опромінення потоком протонів або електронів з високою енергією (2–3 MeV) з наступним відпалюванням за температури $\sim 800^\circ \text{C}$. При цьому виникають так звані N–V-дефекти [18]. Наявність саме кристалічної структури діамантів на наноскопічному рівні легко контролювати за допомогою Раман-спектроскопії, адже для вуглецевої структури у разі SP^3 -гібридизації атомів є характерною смуга при 1332 см^{-1} [19]. Якщо смуги спостерігаються за 1335 см^{-1} та 1575 см^{-1} , то вони зумовлені SP^2 -гібридизацією, що притаманна графіту. Нещодавно було повідомлено про нову технологію одержання флуоресцентних нанодіамантів

у великих кількостях шляхом бомбардування цих наночастинок іонами гелію. Такі частинки мають середній розмір 25 нм. За збудження лазерним світлом на довжині хвилі 532 нм вони випромінюють при 680–700 нм [20].

З'явилися повідомлення про створення нанодіамантів, яким притаманні оптичні й магнітні властивості [21]. Це розширює можливості відслідковувати поведінку цих наночастинок у живому організмі та відкриває шлях до застосування їх як контрастних агентів у ЯМР-томографії.

Природа флуоресценції нанодіамантів

Оптичні властивості нанодіамантів роблять їх дуже перспективними. Вони прозорі, а малий розмір (~2–10 нм) навіть за великого коефіцієнта заломлення не створює потужних ефектів розсіювання світла. Більш того, їм може бути притаманна інтенсивна флуоресценція у видимому діапазоні (рис. 2), що, як вважають, виникає в результаті існування точкових дефектів, зокрема негативно заряджених центрів азотних вакансій ($N-V^-$). Такі центри утворюються завдяки присутності під час створення нанодіамантів атомарного азоту, що включається в їхню структуру [22]. Найбільш інтенсивне оптичне поглинання таких наночастинок спостерігається за ~560 нм, а їх флуоресценція з максимумом спектра при ~700 нм істотно зміщена в довгохвильову ділянку. Якщо їхня молярна екстинкція є порівнянною з величинами, характерними для органічних барвників [23], то квантовий вихід флуоресценції сягає 100% [22], а час життя ~11 нс [24], проте може варіювати в досить широких межах (10–20 нс). Оскільки час життя флуоресценції значно довший, ніж власна флуоресценція клітин, це є вкрай важливим для клітинних досліджень [25].

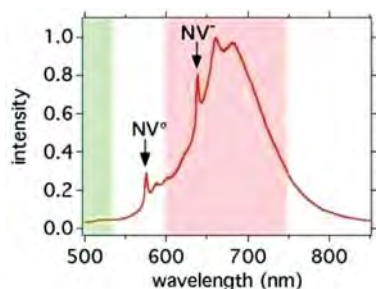


Рис. 2. Типовий спектр флуоресценції нанодіаманта за збудження хвилі завдовжки 532 нм.

Стрілками вказано положення безфонових ліній ($N-V^0$) і ($N-V^-$). Зеленим і рожевим кольором позначено спектральні зони, що можуть бути виділені у світовій мікроскопії для збудження і емісії відповідно [60]

Таким чином, у нанодіамантах реалізується одноцентрове однофотонне поглинання і випромінювання світла. Створені атомарні оптичні центри вбудовано в наноскопічну матрицю твердого тіла. Для випромінювання є характерним значний Стоксів зсув. Він виникає через існування метастабільних збуджених станів, тому для опису електронних переходів можна використовувати трирівневу діаграму [26]. При цьому існують і безвипромінювальні шляхи дезактивації збудженого стану.

Щодо ефективності двофотонного поглинання, то вона значно нижча, ніж у напівпровідникових точок і навіть нижча, ніж у багатьох органічних барвників. Її можна підсилити, створивши в нанокристалі велику кількість ($N-V^-$)-центрів. Нещодавно розроблено методику одержання нанодіамантів, що поглинають світло за ~470 нм і випромінюють зелену флуоресценцію (при ~530 нм) [27]. Вони є перспективними для застосування у флуоресцентній мікроскопії за двофотонного збудження.

Біокон'югація нанодіамантів

Активна поверхня нанодіамантів дає змогу зв'язувати на ній різноманітні за хімічною структурою молекули (рис. 3). У цьому можуть брати участь і фізична сорбція, і ковалентне мічення. Найбільш типовою модифікацією поверхні є карбоксилування з послідовним застосуванням інших методів органічного синтезу. Ці методи останнім часом активно розвиваються, про що свідчать численні публікації [8, 15, 19, 28, 29].

Слід відзначити і наявність низки робіт, де кон'югацію з біомолекулами проводили і з нефлуоресцентними нанодіамантами.

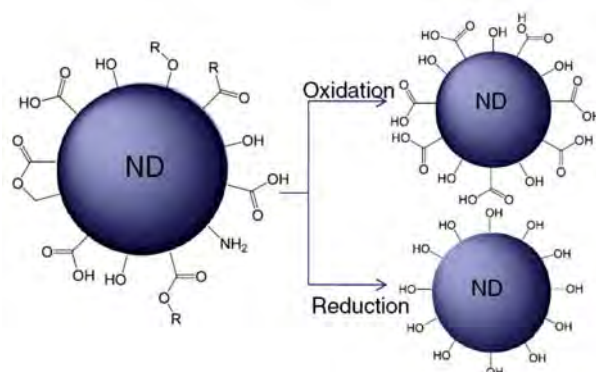


Рис. 3. Загальний принцип модифікації поверхні нанодіаманта: наночастинка з гетерогенним складом поверхні може бути окиснена з утворенням груп, що містять кисень, або відновлена з утворенням гідроксильних груп [61]

При цьому використовували флуоресцентно мічені ДНК [30], протеїни [19, 31, 32], антитіла [33] та інші функціонально активні молекули [12, 34]. Безперечно, використання власної флуоресценції нанодіамантів відкриває нові можливості, серед яких і візуалізація немічених молекул та структур, і створення багатоколірних наногібридів.

Серед запропонованих методів ковалентного зв'язування барвників з поверхнею нанодіаманта привертає увагу використання поліетиленгліколю для створення поверхневого шару і спейсера [35]. Для зв'язування на різних сайтах однієї наночастинки двох різних барвників може бути використана клік-хімія, що потребує наявності азидних та алкінових груп і уможливорює «ортогональне» мічення [36].

Кон'югати нанодіамантів із флуоресцентними барвниками

Оскільки обидва компоненти в такому нанокомпозиті здатні поглинати і випромінювати світло, поєднання в одній наноструктурі надає їм нових, дуже корисних властивостей. По-перше, барвник може моделювати молекулярні структури різного типу, які сорбуються на наночастинках. Перевагою тут є флуоресцентна відповідь, що дає змогу визначати кінетичні та рівноважні константи взаємодій. Увага дослідників спрямована передусім на контрольоване й адресне доставлення лікарських препаратів, багато яких належить саме до органічних барвників. Для ефективної нековалентної сорбції можуть бути використані як електростатична комплементарність сорбованого барвника [37], так і гідрофобні взаємодії [13, 35]. Такі кон'югати вже почали застосовувати для спостереження за входженням їх у клітину і подальшим внутрішньоклітинним розподілом.

Проте найбільшу увагу має привернути поєднання оптичних властивостей нанодіамантів із властивостями барвників різного типу, які можуть бути об'єднані в одну структуру, що уможливить одержання подвійного оптичного сигналу від однієї наноструктури. Це можна активно використовувати в різних сенсорних технологіях, зокрема коли виникає потреба реєструвати співвідношення інтенсивностей двох випромінювань. У цьому разі флуоресцентна відповідь несе інформаційний сигнал, якщо одна з них змінюється під впливом досліджуваних факторів, а друга — слугує каналом порівняння. Подібні системи за участю

напівпровідникових нанокристалів (квантових точок) вже відомі. Їх створення полегшується завдяки можливості змінювати спектри поглинання і випромінювання квантових точок шляхом варіювання їхнього розміру. У нанодіамантів така можливість відсутня, проте є інша перевага. У ділянці довжини хвиль 550–560 нм поглинають світло не лише нанодіаманти, а й багато органічних барвників (зокрема родаміни), що випромінюють з незначним Стоксовим зсувом. А це означає, що за їх одночасного збудження дві смуги флуоресценції будуть спектрально відокремлені, що даватиме змогу досить точно вимірювати їхню інтенсивність. Слід очікувати, що така можливість буде ефективно реалізована в майбутньому.

Окрім того, існує величезна потреба у створенні нанокомпозитів, які б поєднували декілька важливих різнопланових функцій. Зокрема, вони мають не просто випромінювати світло. Їхня флуоресцентна відповідь має містити інформацію про міжмолекулярну взаємодію, а це, у свою чергу, може бути використано для створення наносенсорів, які б, зв'язуючи аналіт, давали інформацію про його концентрацію. Оскільки за цими властивостями нанодіаманти істотно поступаються певним органічним барвникам [38, 39], то об'єднання в одну структуру з барвниками може значно поліпшити їхню ефективність. Із цією метою може бути використано обмін енергією електронного збудження між ними за механізмом безвипромінювального перенесення енергії (FRET). І тут є дві можливості. По-перше, можна спостерігати переключення флуоресценції між однією спектральною смугою (ефективний FRET, коли випромінює лише акцептор) і двома смугами (немає FRET, і флуорофори випромінюють незалежно). Наприклад, можна визначати в клітині активність протеаз чи нуклеаз, з'єднавши флуорофори олігомерним спейсером. Під час розщеплення структури спейсера флуорофори розходяться у просторі і FRET зникає, що досить легко реєструвати. Інша можливість — коли випромінює лише акцептор. А це може бути барвник з дуже високою чутливістю до міжмолекулярних взаємодій. За збудження наночастинки енергія збудження передається на барвник, і зміна його властивостей є флуоресцентною відповіддю. У цьому разі перевага у використанні наночастинки як донора FRET полягає у збільшенні яскравості й часу життя цього випромінювання.

Вже є повідомлення про створення FRET-пар, де нанодіамант є донором, а

флуоресцентний барвник — акцептором випромінювання [40]. У цитованій роботі створено умови, за яких може випромінювати лише один (N–V)-центр на наночастинку, яка зв'язана з однією молекулою барвника. Продemonстровано, що за фотоінактивації барвника флуоресценція змінюється ступінчасто. Проведені дослідження свідчать про можливість застосування таких нанокомпозитів у спектроскопії одиничних молекул.

Як зазначено вище, доступний спектральний діапазон у нанодіамантів значно вужчий, ніж у квантових точок. Тому акцепторами їх випромінювання мають бути барвники, що поглинають світло у червоній ділянці спектра. Нанокомпозити з такими барвниками вже розпочали активно вивчати [41].

Можливості створення міжфлуорофорних гібридів не вичерпуються органічними барвниками. Тут можуть бути використані й кон'юговані полімери (з розподіленою вздовж ланцюга π -електронною структурою), які дають змогу значно збільшити яскравість флуоресцентної відповіді [42].

Нанодіаманти як основа флуоресцентних нанокомпозитів

Наноструктури, створені шляхом сполучення молекул і частинок різної природи в один нанокомпозит, можуть поєднувати безліч корисних властивостей. Це дає змогу не лише локалізувати їх у клітині й організмі, а й управляти такою локалізацією, здійснювати транспортування і контрольоване вивільнення потрібних речовин, деструкцію клітин тощо. Створення таких нанокомпозитів відкриває широке поле для досліджень [43].

Для вирішення багатьох завдань наночастинки мають бути наділені афінними функціями, зокрема здатністю розпізнавати певні молекули чи зв'язуватись із певними структурами. Спостерігається швидкий прогрес і в цьому напрямі. Зокрема, кон'югація з фолієвою кислотою уможливорює адресне зв'язування з рецепторами на поверхні клітин [44]. А далі шляхом ендоцитозу такий композит вже потрапляє всередину клітини.

Для вивчення розподілу та локалізації наночастинок *in vivo* можна використовувати не лише оптичні, але й інші методи, зокрема позитронну емісійну томографію [45]. У цьому разі наночастинки можуть бути помічені ізотопом ^{18}F . Було показано, що їх утримання в різних тканинах та виведення з організму істотно залежать від їхнього розміру. Утім, спеціалісти вважають, що досягти оптимального поєднання чутливості та

роздільної здатності в томографії можна лише на основі приладів з використанням комбінованих методів детекції [46]. Цій меті можуть відповідати мультифункціональні наночастинки.

Починають з'являтися роботи, в яких показано, що нанодіаманти зв'язуються з наночастинками золота [47]. Такі нанокомпозити можуть поєднувати візуалізацію злоякісних пухлин із фотодинамічною або фототермальною дією. Власне, перенесення поєднання діамантів із золотом і платиною на нанорівень створює й інші цікаві можливості, зокрема надає таким матеріалам високих антиоксидантних властивостей.

І, врешті-решт, можна створити магнітні нанодіаманти, сфокусовані на тканину-мішень живого організму за допомогою зовнішнього магнітного поля [21]. Запропоновано створювати їх шляхом включення наночастинок заліза в графеновий шар на поверхні нанодіаманта.

Застосування нанодіамантів як хімічних наносенсорів перебуває ще в зародковому стані, але тут вже спостерігаються певні зрушення. Нещодавно запропоновано новий оригінальний принцип генерації сенсорної відповіді нанодіамантів [48]. Флуоресценція негативно заряджених (N–V)-центрів, що світять при 636 нм, може бути погашена за їх відновлення (гідрогенізації). А більш слабка флуоресценція (N–V)⁰-центрів, що світять при 575 нм — ні. Це призводить до зміни кольору флуоресценції, яку легко зареєструвати. Для створення флуоресцентних наносенсорів на основі цього принципу потрібен більш складний наступний крок — поєднати цю сенсорну відповідь з молекулярним механізмом зв'язування аналіта.

Застосування у флуоресцентній мікроскопії клітин

Останнім часом величезний обсяг інформації в клітинних дослідженнях одержано методом флуоресцентної мікроскопії з використанням органічних барвників і варіантів зеленого флуоресцентного протеїну. Проте низька фотостабільність цих флуоресцентних маркерів є серйозною перешкодою у багатьох дослідженнях. У застосуванні квантових точок існують й інші обмеження, пов'язані з їхніми великим розміром і цитотоксичністю. Нанодіаманти, які не мають таких вад, відіграють дедалі більшу роль у розширенні застосування цього методу [23].

Відносно довгий час життя флуоресценції (~20 нс) дає змогу практично повністю

виключити в клітинних дослідженнях фон власної флуоресценції пігментів клітини, що мають значно коротший час випромінювання. Це досягається за допомогою техніки time-gated fluorescence, де система реєстрації відфільтровує кванти світла, що надходять за короткий час емісії [25].

Окрім того, флуоресценція клітинних пігментів чудово відокремлюється через довгохвильове поглинання і значний Стоксів зсув [49]. Так, поглинання світла флавіном за збудження 532 нм вже не спостерігається, а флуоресценція цього пігменту при 700 нм і такому збудженні повністю відсутня. За цих умов нанодіаманти мають максимальну яскравість.

Методи двофотонної мікроскопії набули широкого застосування в мікроскопії клітин. Вони дають змогу досягти настільки великої чутливості, що стає можливим відслідкувати випромінювання окремих наночастинок чи навіть молекул, зокрема з використанням фотонкореляційної спектроскопії [50]. Нанодіаманти відносно легко проникають у клітини різного типу, проте накопичуються в основному в їхніх лізосомах і ендосомах [51]. Покриття фосфоліпідним шаром дозволяє локалізувати їх переважно у цитоплазмі й таким чином значно підвищувати рухливість [50]. На рис. 4 показана можливість спостерігати за рухом нанодіаманта в живій клітині досить тривалий час.

У мікроскопію прийшли нові методи, завдяки яким з'явилась можливість зняти дифракційні обмеження на роздільну здатність приладів і відслідкувати в широкому полі мікроскопа локалізацію і динаміку окремих наночастинок чи молекул. Проте вони потребують значної яскравості і фотостабільності флуорофорів. Перші роботи із застосування нанодіамантів демонструють широкі перспективи в розвитку цього напрямку [31].

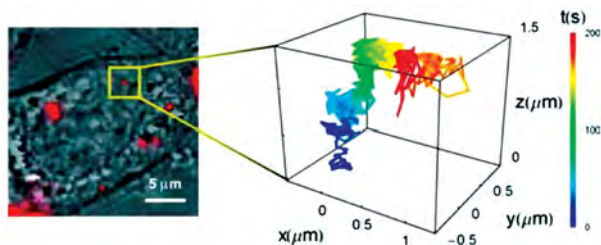


Рис. 4. Спостереження за рухом окремих наночастинок у живих клітинах.

Зліва накладені два зображення яскравого поля і епіфлуоресценції клітин HeLa, що демонструють розподіл нанодіамантів 35 нм. Інтенсивність флуоресценції є достатньо високою і стабільною, що дає змогу спостерігати за їх рухом у трьох вимірах упродовж 200 с (справа) [20]

Біомедичне застосування (біосумісність)

Клітинні дослідження показали низький рівень цитотоксичності нанодіамантів в умовах, коли ці наночастинки вносили в культуру клітин у концентрації до 100–1 000 мг/л [19, 25]. При цьому спостерігали проникнення їх у клітину без порушення її життєдіяльності. Механізм такого проникнення досі не з'ясовано. Очевидно, він може включати зв'язування на поверхні клітини і наступне входження шляхом клатринзалежного ендцитозу чи фагоцитозу. Ці процеси залежать від властивостей плазматичних мембран клітин. Важливим результатом є відсутність значного накопичення наночастинок в ендосомах. Цей факт свідчить про те, що сама клітина не відчуває небезпеки від проникнення нанодіамантів, і це уможливорює їх широке та безпечне застосування [25].

У досліджах *in vivo* за введення нанодіамантів під шкіру, з іжею, у м'язову тканину чи в кров'яне русло не було відзначено проявів токсичності [52]. Під час спостереження впродовж 5 поколінь у дослідних тварин не було зафіксовано зміни маси тіла і порушень репродукції. Такі результати показують перспективність застосування нанодіамантів як носіїв ліків і ентеросорбентів, що здатні зв'язувати токсини. Дослідження потенційно небезпечного входження в організм через дихальні шляхи також не виявило токсичної дії. Ці результати дуже контрастують з даними, одержаними для інших вуглецевих наночастинок, що демонструють значно вищий рівень токсичності [53]. Це може бути зумовлено малим розміром і сферичною формою нанодіамантів, а також відсутністю в їх генерації активних форм кисню за оптичного збудження [54]. Водночас, для частинок досить значного розміру (~50 нм) спостерігали їх тривалу локалізацію в печінці і легенях [55].

На рис. 5 показано флуоресцентне зображення організму нематоди *C. elegans*. Було продемонстровано, що вона легко переносить таке забарвлювання без виявів інтоксикації чи стресу [56].

Кількість публікацій, в яких ідеться про застосування нанодіамантів як носіїв ліків, невинно зростає. Так, було запропоновано вводити інсулін шляхом сорбції на їхній поверхні [9], а ковалентним сполученням створено кон'югат з протираковим препаратом паклітакселом [57]. Це лише окремі зі значної кількості робіт, що з'явилися останнім часом [10]. Найбільш перспективним є адресне доставлення лікарських препаратів, не розчинних у воді [10], з можливістю від-



Рис. 5. Зображення нематоди *C. elegans* із флуоресцентними включеннями, створеними розподілом уведених нанодіамантів [56]

слідкувати розподіл наночастинок в організмі. Значний успіх щодо дії на ракові пухлини та індукування в них апоптозу продемонстровано для кон'югату з доксорубіцином [58]. Успішною була і розробка методу доставлення і вивільнення в організмі анти-тіл терапевтичного призначення [59].

Підсумки і перспективи

Упродовж багатьох століть і навіть тисячоліть людство захоплювалось величчю і красою діамантів. Цей винятково твердий матеріал набув широкого технологічного застосування. Нові властивості відкрилися зі зменшенням його розміру до наночастинок. А після того, як сучасні технології зробили його флуоресцентним, зі збереженням високої стабільності й хімічної інертності, з'явилися нові перспективи застосування. Експерименти останнього часу свідчать про те, що

нанодіамантам притаманна краща біосумісність порівняно з іншими вуглецевими наноматеріалами [62, 63]. Їхню поверхню можна легко модифікувати ковалентним або нековалентним зв'язуванням інших молекул. Більш того, вони можуть бути перетворені на яскраві флуорофори в зручній для дослідження і використання видимій ділянці спектра. Такі флуорофори хімічно чи фотохімічно не деградують, що вкрай важливо для мікроскопії та спектроскопії одичних молекул.

Завдяки своїм унікальним властивостям нанодіаманти є ідеальною платформою для створення багатофункціональних наноконструктивів різноманітної структури та призначення. Цей науковий і технологічний напрям лише почав розвиватись. У таких композиціях оптична відповідь може поєднуватися з відповіддю, одержаною іншими методами, такими як Раман-спектроскопія і ЯМР. За кон'югації з іншими флуорофорами можна створювати наноструктури із сенсорними властивостями. Безліч варіантів існує для надання таким наноконструктивам здатності зв'язуватися з певними клітинними рецепторами, виявляти магнітні властивості чи здійснювати фотодинамічну або фототермічну дію на клітини-мішені, зв'язувати токсини та переносити хімічні лікарські препарати. Таким чином, нанодіаманти мають багатообіцяльні та обнадійливі перспективи використання в біотехнології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Гончаренко Ю. В., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новий клас матеріалів для біонанотехнології // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 55–66.
2. Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Бурлака А. П., Прилуцький Ю. І. Перспективи використання вуглецевих нанотрубок у протираковій терапії // Онкологія. — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 5–9.
3. Прилуцька С. В., Ротко Д. М., Прилуцький Ю. І., Рибальченко В. К. Токсичність вуглецевих наноструктур у системах *in vitro* та *in vivo* // Совр. пробл. токсикол. — 2012. — № 3–4. — С. 49–57.
4. Сагалянов І. Ю., Прилуцький Ю. І., Радченко Т. М., Татаренко В. А. Графенові системи: способи виготовлення й оброблення, структуроутворення та функціональні властивості // УФМ. — 2010. — Т. 11, № 1. — С. 95–138.
5. Ротко Д. М., Прилуцька С. В., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новітні матеріали для нейроінженерії // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 5. — С. 9–24.
6. Прилуцька С. В., Кічмаренко Ю. М., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Фулерен C_{60} та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи // Там само. — 2012. — Т. 5, № 3. — С. 9–17.
7. Голінко В. М., Чекман І. С., Пузиренко А. М., Горчакова Н. О. Роль капілярів у протіканні природних нанопроцесів // Укр. наук.-мед. молод. журн. — 2012. — № 4. — С. 5–9.
8. Krueger A. New Carbon Materials: Biological Applications of Functionalized Nanodiamond Materials // Chemistry — A. Eur. J. — 2008. — V. 14, N 5. — P. 1382–1390.
9. Shimkunas R. A., Robinson E., Lam R. et al. Nanodiamond — insulin complexes as pH — dependent protein delivery vehicles // Biomaterials. — 2009. — V. 30, N 29. — P. 5720–5728.
10. Chen M., Pierstorff E. D., Lam R. et al. Nanodiamond — mediated delivery of water — insoluble therapeutics // ACS Nano. — 2009. — V. 3, N 7. — P. 2016–2022.
11. Huang H., Pierstorff E., Osawa E., Ho D. Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery // Nano Lett. — 2007. — V. 7, N 11. — P. 3305–3314.

12. *Purtov K., Petunin A., Burov A. et al.* Nanodiamonds as Carriers for Address Delivery of Biologically Active Substances // *Nanosc. Res. Lett.* — 2010. — V. 5, N 3. — P. 631–636.
13. *Schrand A. M., Hens S. A. C., Shenderova O. A.* Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications // *Crit. Rev. Solid State Mat. Sci.* — 2009. — V. 34, N 1–2. — P. 18–74.
14. *Cuche A., Sonnefraud Y., Faklaris et al.* Diamond nanoparticles as photoluminescent nanoprobe for biology and near — field optics // *J. Luminesc.* — 2009. — V. 129, N 12. — P. 1475–1477.
15. *Krueger A.* New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials // *Chemistry.* — 2008. — V. 14, N 5. — P. 1382–1390.
16. *Даниленко В. В.* Из истории открытия синтеза наноалмазов // *Физ. тверд. тела.* — 2004. — V. 46, N 4. — P. 581–584.
17. *Новиков Н. В., Богатырева Г. П., Волошин М. Н.* Детонационные алмазы в Украине // *Там же.* — 2004. — V. 46 — P. 585–590.
18. *Yu S. J., Kang M. W., Chang H. C. et al.* Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity // *J. Am. Chem. Soc.* — 2005. — V. 127, N 50. — P. 17604–17605.
19. *Chao J. I., Perevedentseva E., Chung P. H. et al.* Nanometer — sized diamond particle as a probe for biolabeling // *Biophys. J.* — 2007. — V. 93, N 6. — P. 2199–2208.
20. *Chang Y. R., Lee H. Y., Chen K. et al.* Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds // *Nat. Nanotechnol.* — 2008. — V. 3, N 5. — P. 284–288.
21. *Chang I. P., Hwang K. C., Chiang C. S.* Preparation of fluorescent magnetic nanodiamonds and cellular imaging // *J. Am. Chem. Soc.* — 2008. — V. 130, N 46. — P. 15476–15481.
22. *Davies G., Lawson S. C., Collins A. T. et al.* Vacancy — related centers in diamond // *Phys. Rev. B.* — 1992. — V. 46, N 20. — P. 13157–13170.
23. *Faklaris O., Botsoa J., Sauvage T. et al.* Photoluminescent nanodiamonds: Comparison of the photoluminescence saturation properties of the NV color center and a cyanine dye at the single emitter level, and study of the color center concentration under different preparation conditions // *Diamond Rel. Mat.* — 2010. — V. 19, N 7–9. — P. 988–995.
24. *Beveratos A., Brouri R., Gacoin T. et al.* Nonclassical radiation from diamond nanocrystals // *Phys. Rev. A.* — 2001. — V. 64, N 6. — P. 061802.
25. *Faklaris O., Garrot D., Joshi V. et al.* Detection of Single Photoluminescent Diamond Nanoparticles in Cells and Study of the Internalization Pathway // *Small.* — 2008. — V. 4, N 12. — P. 2236–2239.
26. *Aharonovich I., Castelletto S., Simpson D. A. et al.* Two — level ultrabright single photon emission from diamond nanocrystals // *Nano Lett.* — 2009. — V. 9, N 9. — P. 3191–3195.
27. *Wee T. L., Mau Y. W., Fang C. Y. et al.* Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications // *Diamond Rel. Mat.* — 2009. — V. 18, N 2–3. — P. 567–573.
28. *Vial S., Mansuy C., Sagan S. et al.* Peptide — grafted nanodiamonds: preparation, cytotoxicity and uptake in cells // *Chembiochemistry.* — 2008. — V. 9, N 13. — P. 2113–2119.
29. *Krueger A., Lang D.* Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond // *Adv. Funct. Mat.* — 2012. — V. 22, N 5. — Doi: 10.1002/adfm.201102670.
30. *Knickerbocker T., Strother T., Schwartz M. P. et al.* DNA — Modified Diamond Surfaces // *Langmuir.* — 2003. — V. 19, N 6. — P. 1938–1942.
31. *Tzeng Y. K., Faklaris O., Chang B. M. et al.* Superresolution imaging of albumin — conjugated fluorescent nanodiamonds in cells by stimulated emission depletion // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* — 2011. — V. 50, N 10. — P. 2262–2265.
32. *Huang L. C. L., Chang H. C.* Adsorption and Immobilization of Cytochrome c on Nanodiamonds // *Langmuir.* — 2004. — V. 20, N 14. — P. 5879–5884.
33. *Kossovsky N., Gelman A., Hnatyszyn H. J. et al.* Surface — modified diamond nanoparticles as antigen delivery vehicles // *Bioconjug. Chem.* — 1995. — V. 6, N 5. — P. 507–511.
34. *Chung P. H., Perevedentseva E., Tu J. S. et al.* Spectroscopic study of bio — functionalized nanodiamonds // *Diamond Rel. Mat.* — 2006. — V. 15, N 4–8. — P. 622–625.
35. *Takimoto T., Chano T., Shimizu S. et al.* Preparation of Fluorescent Diamond Nanoparticles Stably Dispersed under a Physiological Environment through Multi-step Organic Transformations // *Chem. Mat.* — 2010. — V. 22, N 11. — P. 3462–3471.
36. *Barras A., Szunerits S., Marcon L. et al.* Functionalization of Diamond Nanoparticles Using «Click» Chemistry // *Langmuir.* — 2010. — V. 26, N 16. — P. 13168–13172.
37. *Gibson N. M., Luo T. J. M., Shenderova O. et al.* Fluorescent dye adsorption on nanocarbon substrates through electrostatic interactions // *Diamond Rel. Mat.* — 2010. — V. 19, N 2–3. — P. 234–237.
38. *Demchenko A. P.* Introduction to fluorescence sensing. — Amsterdam: Springer Verlag, 2009. — 586 p.
39. *Demchenko A. P.* Visualization and sensing of intermolecular interactions with two — color

- fluorescent probes // *FEBS Lett.* — 2006. — V. 580, N 12. — P. 2951–2957.
40. *Tisler J., Reuter R., Lämmle A. et al.* Highly Efficient FRET from a Single Nitrogen — Vacancy Center in Nanodiamonds to a Single Organic Molecule // *ACS Nano.* — 2011. — V. 5, N 10. — P. 7893–7898.
 41. *Chen Y., Shu H., Kuo Y., Tzeng Y. et al.* Measuring Förster resonance energy transfer between fluorescent nanodiamonds and near — infrared dyes by acceptor photobleaching // *Diamond Rel. Mat.* — 2011. — V. 20, N 5–6. — P. 803–807.
 42. *Maitra U., Jain A., George S. J., Rao C. N. R.* Tunable fluorescence in chromophore — functionalized nanodiamond induced by energy transfer // *Nanoscale.* — 2011. — V. 3, N 8. — P. 3192–3197.
 43. *Maggini L., Bonifazi D.* Hierarchised luminescent organic architectures: design, synthesis, self-assembly, self-organisation and functions // *Chem. Soc. Rev.* — 2012. — V. 41, N 1. — P. 211–241.
 44. *Zhang B., Li Y., Fang C. Y. et al.* Receptor-mediated cellular uptake of folate-conjugated fluorescent nanodiamonds: a combined ensemble and single-particle study // *Small.* — 2009. — V. 5, N 23. — P. 2716–2721.
 45. *Rojas S., Gispert J. D., Martin R. et al.* Biodistribution of amino- functionalized diamond nanoparticles. In vivo studies based on ^{18}F radionuclide emission // *ACS Nano.* — 2011. — V. 5, N 7. — P. 5552–5559.
 46. *Louie A.* Multimodality imaging probes: design and challenges // *Chem. Rev.* — 2010. — V. 110, N 5. — P. 3146–3195.
 47. *Ismaili H., Workentin M. S.* Covalent diamond — gold nanodiamond hybrids via photochemically generated carbenes // *Chem. Commun. (Camb).* — 2011. — V. 47, N 27. — P. 7788–7790.
 48. *Petráková V., Taylor A., Kratochvílová I. et al.* Luminescence of Nanodiamond Driven by Atomic Functionalization: Towards Novel Detection Principles // *Adv. Funct. Mat.* — 2011. — N 24. — P. 1697–1702.
 49. *Fu C. C., Lee H. Y., Chen K. et al.* Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, N 3. — P. 727–732.
 50. *Hui Y. Y., Zhang B., Chang Y.-C.* Two-photon fluorescence correlation spectroscopy of lipid-encapsulated fluorescent nanodiamonds in living cells // *Opt. Express.* — 2010. — V. 18, N 6. — P. 5896–5905.
 51. *Schrand A. M., Lin J. B., Hens S. C., Hussain S. M.* Temporal and mechanistic tracking of cellular uptake dynamics with novel surface fluorophore — bound nanodiamonds // *Nanoscale.* — 2011. — V. 3, N 2. — P. 435–452.
 52. *Puzyr A. P., Baron A. V., Purtov K. V. et al.* Nanodiamonds with novel properties: A biological study // *Diamond Rel. Mat.* — 2007. — V. 16, N 12. — P. 2124–2128.
 53. *Schrand A. M., Dai L., Schlager J. J. et al.* Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds // *Ibid.* — 2007. — V. 16, N 12. — P. 2118–2123.
 54. *Schrand A. M., Huang H., Carlson C. et al.* Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic? // *J. Phys. Chem. B.* — 2006. — V. 111, N 1. — P. 2–7.
 55. *Yuan Y., Chen Y., Liu J.-H. et al.* Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo // *Diamond Rel. Mat.* — 2009. — V. 18, N 1. — P. 95–100.
 56. *Mohan N., Chen C. S., Hsieh H. H. et al.* In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans* // *Nano Lett.* — 2010. — V. 10, N 9. — P. 3692–3699.
 57. *Liu K. K., Zheng W. W., Wang C. C. et al.* Covalent linkage of nanodiamond- paclitaxel for drug delivery and cancer therapy // *Nanotechnology.* — 2010. — V. 21, N 31. — P. 315106.
 58. *Chow E. K., Zhang X. Q., Chen M. et al.* Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment // *Sci. Transl. Med.* — 2011. — V. 3, N 73. — P. 73ra21.
 59. *Smith A. H., Robinson E. M., Zhang X. Q. et al.* Triggered release of therapeutic antibodies from nanodiamond complexes // *Nanoscale.* — 2011. — V. 3, N 7. — P. 2844–2848.
 60. *Faklaris O., Joshi V., Irinopoulou T. et al.* Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells // *ACS Nano.* — 2009. — V. 3, N 12. — P. 3955–3962.
 61. *Say J., van Vreden C., Reilly D. et al.* Luminescent nanodiamonds for biomedical applications // *Biophys. Rev.* — 2011. — V. 3, N 4. — P. 171–184.
 62. *Vaijayanthimala V., Chang H.-C.* Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications // *Nanomedicine.* — 2009. — V. 4, N 1. — P. 47–55.
 63. *Yun X., Liming D.* Nanodiamonds for nanomedicine // *Ibid.* — 2009. — V. 4, N 2. — P. 207–218.

НАНОАЛМАЗЫ ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ И СЕНСОРНЫХ НАНОТЕХНОЛОГИЙ

В. И. Назаренко
А. П. Демченко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины,
Киев

E-mail: Nazarenko@biochem.kiev.ua

Обзор посвящен анализу свойств и применению флуоресцентных наноалмазов, которые являются одной из форм углеродной наноструктуры, имеющей атомарное строение и все свойства алмаза, в частности чрезвычайно высокие плотность, прочность и показатель преломления. Наноалмазы имеют почти сферическую форму, а их малый размер (~4–10 нм) обуславливает значительную площадь поверхности, которая способна к адсорбции различных веществ, включая лекарственные препараты. Их поверхность, образованная различными полярными группами (гидроксилами, карбоксилами и др.), также является химически активной, что позволяет осуществлять различные модификации. Это создает множество возможностей для построения различных функциональных наноматериалов. Созданы технологии, позволяющие сделать такие наноалмазы флуоресцентными. В частности, подобные свойства достигаются радиационной обработкой, что приводит к образованию N–V-дефектов. Такие флуорофоры поглощают свет и излучают в удобной для наблюдения видимой области спектра. Наночастицы не фотодegradируют, что чрезвычайно важно для флуоресцентной микроскопии клеток, не проявляют токсичности на уровне клеток и организма и благодаря своей биосовместимости могут быть использованы *in vivo* как контрастные агенты и носители лекарств. Предполагается, что в будущем применение этих наночастиц в биотехнологии будет связано с созданием наноконкомпозитов, сочетающих в одной наночастице необходимые функции.

Ключевые слова: нанобиотехнология, наноалмазы, флуоресценция, наноконкомпозиты.

NANODIAMONDS FOR FLUORESCENT CELL AND SENSOR NANOTECHNOLOGIES

V. I. Nazarenko
O. P. Demchenko

Palladian Institute of Biochemistry
of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: Nazarenko@biochem.kiev.ua

This review addresses the analysis of properties and applications of fluorescent nanodiamonds. They are carbon nanostructures with atomic arrangement of a diamond and carry all its properties, including record — high density, rigidity and refraction index. They are of almost spherical shape, and their small size (~4–10 nm) creates substantial surface area that can be used for absorption of different compounds including drugs. Their surface is formed by different chemical groups (hydroxyls, carboxyls, etc.) exhibits also chemical reactivity that allows different types of modifications. This opens innumerable possibilities for constructing different functional nanomaterials. The technologies have been developed for making these nanodiamonds fluorescent. Particularly, these properties are achieved by radioactive treatment with the formation of N–V impurities. These particles absorb and emit light in convenient for observation visible range of spectrum. They do not photobleach, which is very attractive for fluorescent microscopy of the cell. And, finally, these nanoparticles do not display toxicity on the cellular or whole — body level, and because of their biocompatibility they can be used *in vivo* as contrast agents and drug carriers. It is expected that future biotechnological applications of these nanoparticles will be connected with the creation of nanocomposites that combine multiple useful functions.

Key words: nanobiotechnology, nanodiamonds, fluorescence, nanocomposites.