



МИННО-ГЕОЛОЖКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. ИВАН РИЛСКИ"
ГЕОЛОГОПРОУЧВАТЕЛЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "ИНЖЕНЕРНА ГЕОЕКОЛОГИЯ"

инж. маг. Полина Пламенова Младенова

**ВНЕДРЯВАНЕ НА МУЛТИФУНКЦИОНАЛНИ ВЪГЛЕРОДНИ
НАНОЧАСТИЦИ, КАТО ДИАГНОСТИЧНИ МАРКЕРИ И
БИОСЕНЗОРИ В МИНЕРАЛНИТЕ БИОТЕХНОЛОГИИ И
ОПАЗВАНЕ НА ОКОЛНАТА СРЕДА**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление 4.4. Науки за земята
Научна специалност: „Системи и устройства за опазване на околната среда“

София
2018

Дисертационният труд съдържа 156 страници, 70 фигури и 3 таблици. В библиографската справка са включени 119 заглавия, всичките на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра Инженерна геоекология и частично в Университета Сайтама, Япония.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на катедра Инженерна геоекология към Геологопроучвателния факултет на Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски” – София.

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р
2. Проф. д-р

Защитата на дисертационния труд ще се състои на г. от часа в в сградата на Минно-технологичния факултет към Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски”, гр. София - 1700, ул. “Проф. Боян Каменов”. Материалите по защитата се намират на разположение в сектор “Следдипломна квалификация”.

Дисертационният труд е обсъден на разширен учебно-научен съвет, при катедра Инженерна геоекология, Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски”, на заседание състояло се на г. и е насочен за разкриване на процедура за защита пред научно жури, сформирани със Заповед №..... на Ректора на Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски” – София.



МИННО-ГЕОЛОЖКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. ИВАН РИЛСКИ"
ГЕОЛОГОПРОУЧВАТЕЛЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "ИНЖЕНЕРНА ГЕОЕКОЛОГИЯ"

инж. маг. Полина Пламенова Младенова

**ВНЕДРЯВАНЕ НА МУЛТИФУНКЦИОНАЛНИ ВЪГЛЕРОДНИ
НАНОЧАСТИЦИ, КАТО ДИАГНОСТИЧНИ МАРКЕРИ И
БИОСЕНЗОРИ В МИНЕРАЛНИТЕ БИОТЕХНОЛОГИИ И
ОПАЗВАНЕ НА ОКОЛНАТА СРЕДА**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление 4.4. Науки за земята
Научна специалност: „Системи и устройства за опазване на околната среда“

Научен ръководител: доц. дн Александър Луканов

София
2018

Използвани съкращения

Bodipy-dUTP	<i>Бодипи-деоксиуридинтрифосфат</i>
CA	<i>Лимоненакиселина</i>
C-dots	<i>Въглеродни квантови точки</i>
CNT	<i>Въглеродни нанотръби</i>
DAPI	<i>4',6-диамино-2-фенилиндол</i>
DLS	<i>Динамично светлоразсейване</i>
DMSO	<i>Диметилсулфоксид</i>
dsDNA	<i>Двойно верижна дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК)</i>
FAM-сонда	<i>Флуоресцеинова ДНК сонда</i>
FRET	<i>Флуоресцентна резонансна енергия</i>
FRIT	<i>Инфрочервена спектроскопия с Фурие-трансформация</i>
EDA	<i>1,2-етилендиамин</i>
EDC	<i>Енергийно-диспергиращ рентгенов спектър</i>
EDTA	<i>Етилендиамин тетраоцетна киселина</i>
EDS	<i>Енергийно дисперсионен спектър</i>
EELS	<i>Електронен спектър на загуба на енергия</i>
ESI	<i>Електронно спектроскопично изображение</i>
EtOAc	<i>Етилацетат</i>
GO	<i>Графен оксид</i>
GFP	<i>Зелен флуоресцентен белтък</i>
HEPES	<i>4- (2-хидроксиетил) -1-пиперазинетансулфонова киселина</i>
HLB	<i>Хидрофилно-липофилно равновесие</i>
I-dU	<i>Инкорпориран йод</i>
ICP-AES	<i>Индуктивно свързана плазмена атомно-емисионна спектроскопия</i>
ICP-MS	<i>Индуктивно свързана плазмена масспекрометрия</i>
Milli-Q	<i>Ултрачиста вода от " тип 1 "</i>
MS medium	<i>Средата по Мурашиджи Скоог</i>
MWCNT	<i>Многостенни въглеродни нанотръби</i>
PDI	<i>Индекс на полидисперсност</i>
PEG	<i>Полиетиленгликол</i>
PEI	<i>Полиетиленимин</i>
PGPR	<i>Полиглицерол полирицинолеат</i>
pH	<i>Водородният показател</i>
PL	<i>Фотолуминесценция</i>
PSD	<i>Разпределението на частиците по размер</i>
Qdots	<i>Полупроводникови квантови точки</i>
SCNT	<i>Едностенни въглеродни нанотръби</i>
Span80	<i>Сорбитан моноолеат</i>
TEM	<i>Трансмисионен електронен микроскоп</i>
Tobaco BY-2	<i>Тютюневите BY-2 клетки</i>
ТТТ	<i>Тимидин трифосфат</i>
W/O	<i>Емулсия вода в масло</i>
X-ray	<i>Рентгенова анализ</i>
XPS	<i>Рентгенова фотоелектронна спектроскопия</i>

Внедряване на мултифункционални въглеродни наночастици, като диагностични маркери и биосензори в минералните биотехнологии и опазване на околната среда

инж. маг. Полина Пламенова Младенова

АНОТАЦИЯ

В настоящата дисертация са разработени наночастици, базирани на въглерода (известни още, като въглеродни квантови точки или C-dots), като наносензори за откриване на аналити (предимно метални йони) в замърсени природни обекти или акумулирани в населяващите ги микроорганизми. Селективността на наносензорите се дължи на вида и съотношението между органичните функционални групи по повърхността на наночастиците. Вследствие на протичането на специфични реакции се образуват метални хелатни комплекси, които влияят на оптичните свойства на наносензорите. Условието за реагиране зависят също и от рН на разтвора, наличието на окислителни, както и от химичната природа на взаимодействащите агенти. Освен за мониторинг наночастиците бяха успешно използвани и за извличане на замърсителите от природни водни обекти. Това беше осъществено благодарение на химично свързване на въглеродните наноточки към супер парамагнитни наночастици от железен оксид. По този начин, при прилагане на външно магнитно поле беше извлечен разтворен уран (VI) в замърсени природни води, което доведе и до тяхното успешно пречистване. При модифициране на повърхността на C-dots със сяра-съдържащи функционални групи беше осъществено мониторинг и анализ на разтворен калций, а по този начин се определи и степента на твърдост на водата. Това сензорно приложение на C-dots им позволява да се използват практически, при решаването на редица проблеми свързани с екологията на твърдите води. Съществен принос в дисертационният труд е и използването на въглеродните наночастици, като наносензори за проследяване на акумулирани тежки метали в биоиндикаторни микроорганизми. Нищожния размер на C-dots (около 1.5 nm) им позволява да проникват дълбоко във вътреклетъчното пространство на еукариотни клетки. В конкретния случай примерите бяха демонстрирани с едноклетъчни водорасли *Toxoplasma* Y-2, използващи ендозитоза за набавяне на хранителни вещества. Чрез флуоресцентен микроскопичен анализ, базиран на фоточувствителна CCD камера беше определено съдържанието на желязо в биоиндикаторните едноклетъчни водорасли. Освен за вътреклетъчен анализ на акумулирани замърсители въглеродните квантови квантоци точки бяха внедрени в т. нар. ДНК микрочипове за биотехнологичен скрининг на специфични нуклеинови киселини. При проведените

експерименти ролята на C-dots беше да загасват флуоресценцията, произтичаща в резултат на успешно протеклата хибридизация между ДНК в микрочипа и анализирания нуклеотиден фрагмент в разтвора. Накрая, чрез провеждане на корелативен микроскопски подход беше установено, че освен високата флуоресценция е необходимо в състава на наночастиците да присъстват и специфични химични елементи (например бор), които им позволяват да се използват и като наносензорни репортери за проследяване на целеви биомолекули в единични клетки или тъкани. При електронно микроскопско наблюдение и прилагане на техника, известна като електронно-спектроскопско изобразяване беше визуализирано появата на ново-синтезирани ДНК участъци в генома на Ешерихия коли, както и по-нататъшните динамични промени на ултраструктурно клетъчно ниво. Разработването на този нов подход създава нови възможности за задълбочено изучаване на многобройни геномни процеси на клетъчно и вътреклетъчно ниво, в присъствието на замърсители, което е от огромен практически интерес, както за екологията, така и за минералните биотехнологии.

I. УВОД

Въглеродните наночастици, известни още като въглеродни квантови точки (или C-dots) са открити случайно през 2004 г. при пречистването на едностенни въглеродни нанотръби. Те са нискотоксични наноматериали, характеризиращи се с уникални оптични свойства. Това откритие предизвиква обширни проучвания, свързани с практическите им приложения през последното десетилетие. Оказва се, че свойствата и потенциалните приложения са тясно свързани с начина им на получаване. Като обособяващ се нов клас флуоресцентни въглеродни наноматериали, на наноточките са придадени атрактивни свойства, като висока стабилност, добра проводимост, ниска токсичност, екологосъобразност и уникални физико-химични и оптични свойства сравними с тези на полупроводниковите квантови точки и органичните багрила.

Установено е че в зависимост от вида и съотношението на органичните функционални групи по повърхността на наночастиците, въглеродните квантови точки могат да взаимодействат селективно с определени метални йони, вследствие на което протичат комплексни реакции. Металния йон остава здраво свързан под формата на комплексен йон на повърхността на наночастицата. Вследствие на реакцията може да се наблюдава повишаване на интензитета на флуоресценция (както е при цинк и сребро) или силно загасване (както е при желязо, уран, калций и др.). Чрез този подход въглеродните наноточки се явяват, като нов вид наносензори за детекция и мониторинг на целевите метали.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на изследването в настоящия дисертационен труд е да се разработят **мултифункционални наноматериали, на базата на въглерода**, които да се използват, като диагностични маркери и/или нанобиосензори. Изискванията към наноматериалите са да бъдат водоразтворими, нискотоксични (или биологично съвместими), флуоресцентни с висок квантов добив и с възможност за моделиране на техните физико-химични и повърхностно химични свойства с цел приложение, при решаване на конкретни задачи, както в биотехнологично направление, така и при мониторинг на замърсители, т.е. при опазването на околната среда.

За постигане на целите в настоящия дисертационен труд е необходимо да се разработят следните конкретни задачи:

1. **Дизайн и получаване на мултифункционални наноматериали, базирани на въглерода.** Тази задача е свързана с проектирането и синтезата на многообразни наночастици, които могат да бъдат органични или хибридни (включващи неорганичен компонент в органичната матрица). С оглед на приложението им тези наночастици трябва да притежават определни повърхностни функционални химични групи, които да осигурят, както добрата им разтворимост във водни разтвори, така и висока им мобилност в природни и биологични обекти. Наноматериалите трябва да притежават подходящо моделирани оптични свойства, които да им придадат необходимите наносензорни приложения. Наносензорното приложение е тясно свързано, както със селективността на разпознавателната химична или биохимична реакция към дадено вещество (аналит), така и с възможността за използване в реални природни обекти.
2. **Демонстриране на наносензорни приложения и мониторинг на неорганични замърсители в реални природни среди.** За да се демонстрира наносензорното приложение наночастиците трябва да бъдат покрити с подходящи функционални органични химични групи (карбоксилни, аминокиселини, хидроксилни и сяра-съдържащи), които да взаимодействат с висока селективност към дадения замърсител. Ако в случая замърсителя е разтворима или мобилна форма на тежък метал (например уран, арсен и др.) повърхностните функционални групи трябва да взаимодействат с него, така че да се получат комплексни и/или хелатни съединения с голяма стабилност. На базата на образуваните комплекси тежките метали трябва да бъдат уловени и извлечени от дадения замърсен природен обект под формата на комплексни йони. Ефективността на наносензорите трябва да се демонстрира в реални природни условия (например киселинно-руднични отпадни води).

3. **Токсикологичен анализ доказващ ниската токсичност на наноматериалите в растителни или животински клетки и екологичната им съвместимост.** Този вид анализ е особено необходим с оглед да се докаже тяхната екологична съвместимост и безопасност на експлоатация при реалното им приложение в лабораторни условия (дори и от специалисти, които не притежават задълбочени познания по нанохимия и наноматериали). Друга основна цел на този анализ е да се докаже, че използването им не замърсява в околната среда, защото могат да се асимилират в природата от микробиологичните популации. Това дава пряка възможност за използване на наночастиците в големи полупромишлени мащаби, при екологични дейности като ефективно извличане с едновременен мониторинг на замърсители в природни обекти и цялостно понижаване на щетите върху околната среда.

4. **Измерване на акумулативното натрупване на замърсители в растителни биоиндикаторни организми.** Тук може да се използват първоначално изкуствени липозомни структури, съдържащи водни разтвори на наночастици и флуоресцентно измерване на интензитета на тяхната емисията. По-нататък, количественото определяне на концентрацията на наночастиците в липозомите, може да се извърши чрез използване на подходящи софтуерни продукти (например програмата ImageJ). От получените данни следва да се изработи линейна калибровъчна зависимост между интензитета на флуоресценцията и концентрацията на наноматериалите или замърсителя. На базата на получените контролни данни следва да се извърши реален експеримент, при който да се анализира количеството на дадения замърсител (например неорганична сол на тежък метал), който е акумулиран във вътреклетъчния състав на биоиндикаторния организъм. Като моделни биоиндикаторни организми с успех са използвани растителни клетки *TobaccoBY-2*.

5. **Разработване на наносензорни биорепортери за проследяване на единични биологични макромолекули в биоиндикаторни организми.** За тази цел трябва да се използват органични материали, които притежават подходящи абсорбционни и флуоресцентни свойства, необходими за визуализирането им, чрез съвременните оптични методи и апарати (флуоресцентен, конфокален микроскоп, лазери и др.) от една страна, както и подходящи химични елементи, чрез които могат да се изобразят и посредством аналитична електронна микроскопия от друга. Като подходящи кандидати в дисертационния труд са флуоресцентните сензорни багрила, разработени на базата на органичното багрило бодипи, които съдържат елемента бор в химичния си състав.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Използвани апарати

За осъществяване на горе-посочените задачи са използвани следните апарати, които са налични в Лабораторията по инженерна нанобиотехнология. Дестилирана вода, получена от дестилатор – Robotika; центрифуга M-24A BOECO за получаване на финнамикро-суспензия; веществата са претеглят на електронна везна Kern-ABJ. Разтворите бяха приготвени, чрез магнитна бъркалки – HI 190 M. Абсорбционните спектри бяха получени посредством абсорбционен спектрофотометър UV-1600PC VWR. Квантовия добив на наночастиците е измерен, чрез система за абсолютния флуоресцентен квантов добив (HamamatsuPhotonics, C9920-03G). Дължината на вълната за възбуждане на пробата се избира, чрез подходящ монохроматор на ксенонова лампа. Всички получени образци бяха наблюдавани, посредством флуоресцентен светлинен микроскоп – Kopus, с прилежаща към него CCD камера. За подготовка на някои образци е използван също светлинен микроскоп КМЦ. рН на всички разтвори бяха измерени посредством рН-метър с дигитален процесор. Някои от флуоресцентните изображения са получени, чрез InvertedResearchMicroscope ECLIPSE Ti (Nikon) и Biologicalmicroscope BX53 (Olympus) в Университета Сайтама.

2. Материали

Всички химикали бяха използвани без предварителна подготовка или пречистване. За получаване на въглеродни квантови точки, чрез микровълнова пиролиза бяха използвани следните вещества: лимонена киселина (Wako), 1,2- етилендиамин (Wako), флуоресцентните багрила флуоресцин (Sigma-Aldrich), флуоресцеинизотиоцианат (Sigma-Aldrich), DAPI и други. Солна киселина (Wako), натриева основа (Wako), натриев карбонат (Wako), етилен гликол (Wako) и други. Органичните разтворители (хексадекан) и повърхностно-активното вещество Span 80 са дарение от Университета Сайтама – Япония.

3. Методи

Синтез на въглеродни квантови точки. В типичния синтез се разтваря в 10 ml дестилирана вода 1 g лимонена киселина и 0.2 ml (0.18 g) етилендиамин. Полученото рН на разтвора е около 3.5. Разтворът се разбърква енергично до пълно разтваряне на прекурсорите и избистряне. След това прозрачната реакционна смес се подлага на микровълново лъчене (пиролиза) в продължение на 3 минути в 600 W микровълнова фурна.

Синтез на супер парамагнитни наночастици

Първо се приготвя разтвор на желязо със стехиометрично съотношение между желязните йони $Fe^{3+} : Fe^{2+}$ равно на 2 : 1, съответно чрез разтваряне на 3.38 g $FeCl_3$ (0.2 M) и 2.07g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.1 M) в 100 ml дистилирана (Milli-Q) вода. Второ, реакционната смес се поддържа при 80 °C в продължение на един час. Трето, 3.33 g от NaOH (0.8 M) в 100 ml горещ (до варене) разтвор се прибавя бързо (в рамките на 10 секунди) в смесения разтвор на желязото. Крайният реакционен разтвор се поддържа при около 100 °C в продължение на 1 – 2 часа, като през целия този период от време се разбърква непрекъснато с магнитна бъркалка.

Приготвяне на липозоми с инкорпорирани флуоресцентни наносензори

За да се получат липозоми с инкорпорирани наносензори се подготвят два вида изходни разтвори. Разтвор А съдържа въглеродни квантови точки във воден разтвор с известна концентрация (100, 50, 10, 1 и 0.1 mg/ml). pH на разтвора е неутрален. Интензитета на абсорбцията на така приготвените изходни разтвори се измерва. Към тях могат да се прибавят соли на тежки метали с известна концентрация (желязо (III), сребро (I), уран (VI) и др.). Разтвор Б съдържа хексадекан с Span 80 в съотношение 10 : 1. Към органичния разтвор Б се добавя, чрез микропипета 10~50 μ l от гореполученият разтвор А. Получената смес се разбърква интензивно с магнитна бъркалка до получаването на стабилна бяла на цвят микро-емулсия, съдържаща липозомни структури.

Маркиране на новосинтезирана ДНК на E. коли с Bodipy-dUTP

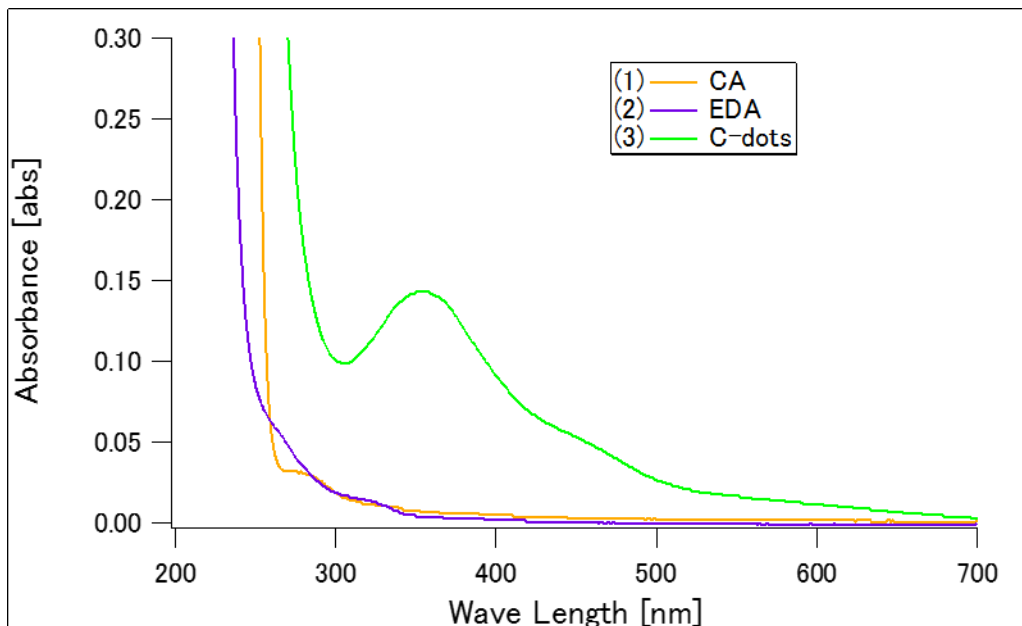
Във всички експерименти беше използван щама JC5495, който е мутант на E. коли K12 и не притежава ензима, отговорен за синтезата на тимин. Клетките бяха инокуирани и отглеждани при 37 °C в хранителна среда M9, съдържаща 0.5 % глюкоза, 0.4 % касаминова киселина, 50 μ g/ml триптофан и 10 μ g/ml тимин. В средата на логаритмичната фаза на бактериалния растеж ($OD_{280} = 0.449$, time = 270 min) 100 μ L от клетъчната суспензия се центрифугира (при скорост 3 × 1000 RPM за 5 min) и се промива два пъти с хранителна среда M9, съдържаща 0.5 % глюкоза, 0.4 % касаминова киселина и 50 μ g/ml триптофан.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Оптична характеристика на ултрамалки въглеродни наносензори, получени чрез микровълнова пиролиза

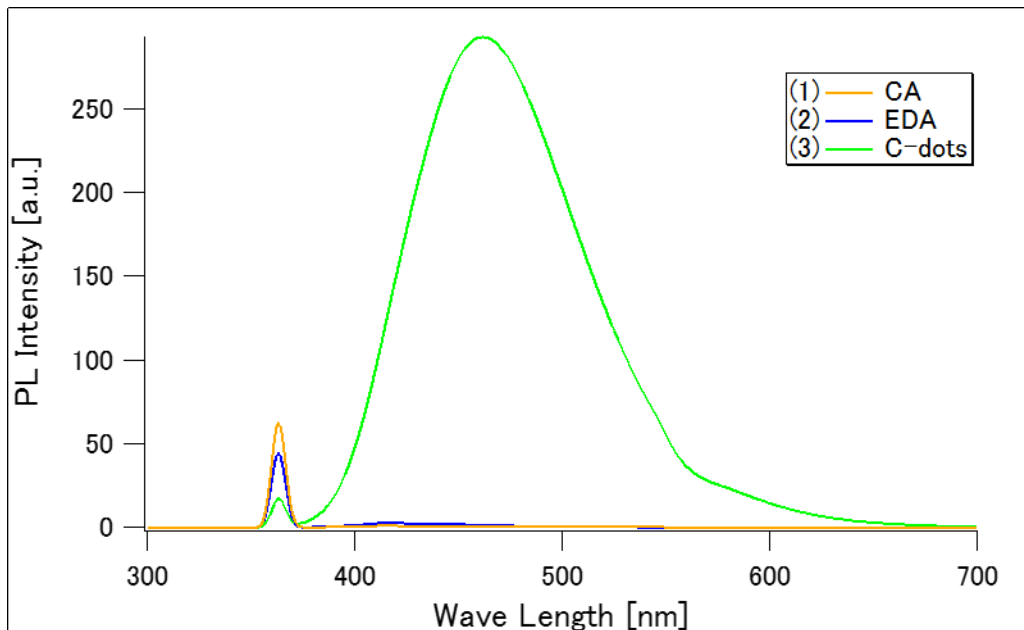
Лимонената киселина (CA) и 1,2-етилendiамин (EDA) не притежават абсорбционни пикове, както е показано на фиг. 1. Когато тези прекурсори реагират по между си, чрез микровълновата пиролиза се получават високо-флуоресцентни въглеродни квантови

точки, които притежават силен абсорбционен пик, центриран около 360 nm, както е показан на фигура 1.



Фигура 1. Абсорбционни спектри на прекурсорите лимонената киселина (CA) в оранжев цвят, 1,2-етилендиамин (EDA) в лилав цвят и получените въглеродни квантови точки в зелен цвят

Въглеродните нанокатализатори поглъщат светлина предимно в близката ултравиолетова част от спектъра на светлината, което е свързано с електронен преход на p- и n- електроните, принадлежащи на карбонилните и карбоксилните химични групи, разположени по повърхността на наночастиците. Забелязва се, че абсорбцията преминава и във видимата част на спектъра, чак до червената светлина (при 600 nm). Този ефект е видим и дори с невъоръжено око се забелязва жълтия отенак на разтвор на квантови точки. На фигура 2 са показани съответно флуоресцентните спектри на прекурсорите и синтезираните въглеродни квантови точки. Изходните прекурсори не проявяват флуоресцентни свойства. Когато обаче реагират по между си в присъствието на микровълново лъчение получените въглеродни наноточки проявяват силна флуоресценция със син цвят, т.е. с дължина на вълната между 400 ~ 550 nm. Излъчената синя флуоресценция зависи от ненаситената структура на графеновото ароматно ядро на наночастиците. Интензитета на флуоресценцията зависи предимно от химичните функционални групи по повърхността на наночастиците (това са предимно amino и карбоксилните групи). Експериментално се установява, че в отсъствие на amino-групите интензивността на пика драстично намалява. Квантовия добив е по-малък от 5 %, което на практика ги лишава от сензорните свойства в биологични среди.



Фигура 2. Флуоресцентни спектри на прекурсорите лимонената киселина (CA) в оранжев цвят, 1,2-етилендиамин (EDA) в лилав цвят и получените въглеродни квантови точки в зелен цвят

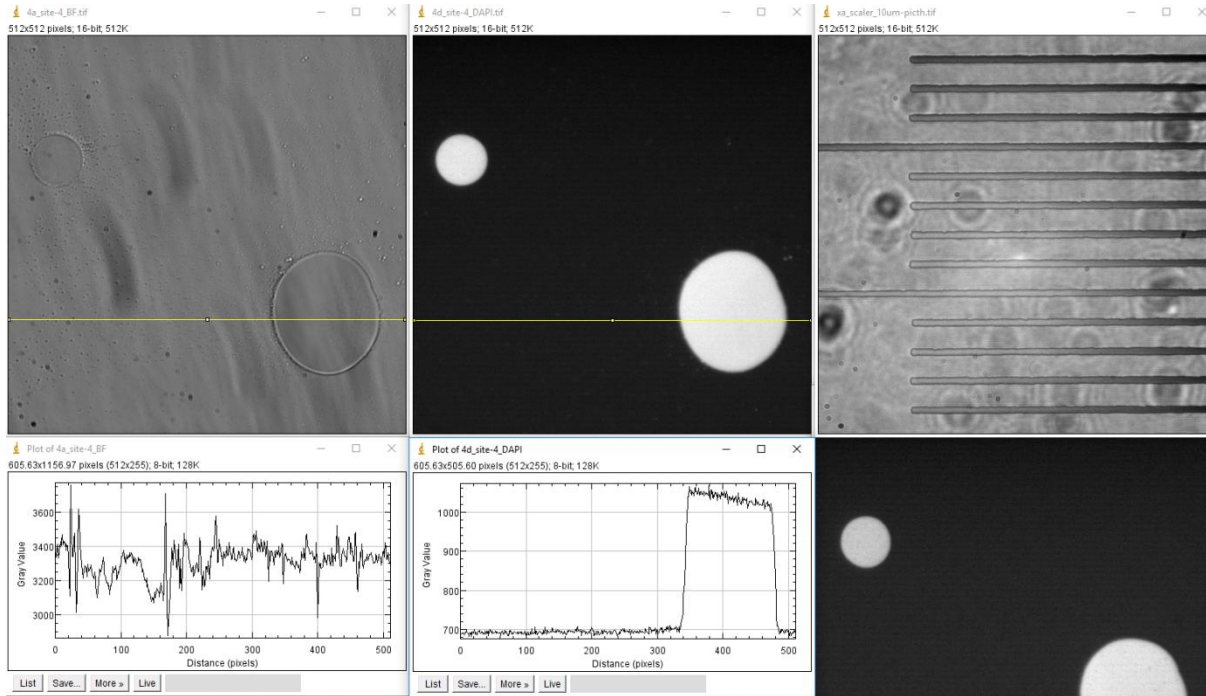
Интензивността на флуоресценцията зависи също и от рН на средата, както е показано на фигура 3. Причината за това е свързана със състоянието на функционалните групи на повърхността. Когато карбоксилните и аминокиселинните групи са протонирани или депротонирани те променят химичната и електронната си структура. Това води и до рязка промяна на състоянието на повърхността и понижаване на интензитета на флуоресценцията.



Фигура 3. Промяна на флуоресценцията с промяна рН.

След като са изследвани задълбочено оптичните и сензорни свойства на наночастиците във водни разтвори е естествено да се потърси възможност за тяхното приложение в биологични системи – единични клетки или тъкани. За да се разработи *in vivo* сензорно приложение е необходимо първо да се създаде опитен модел върху

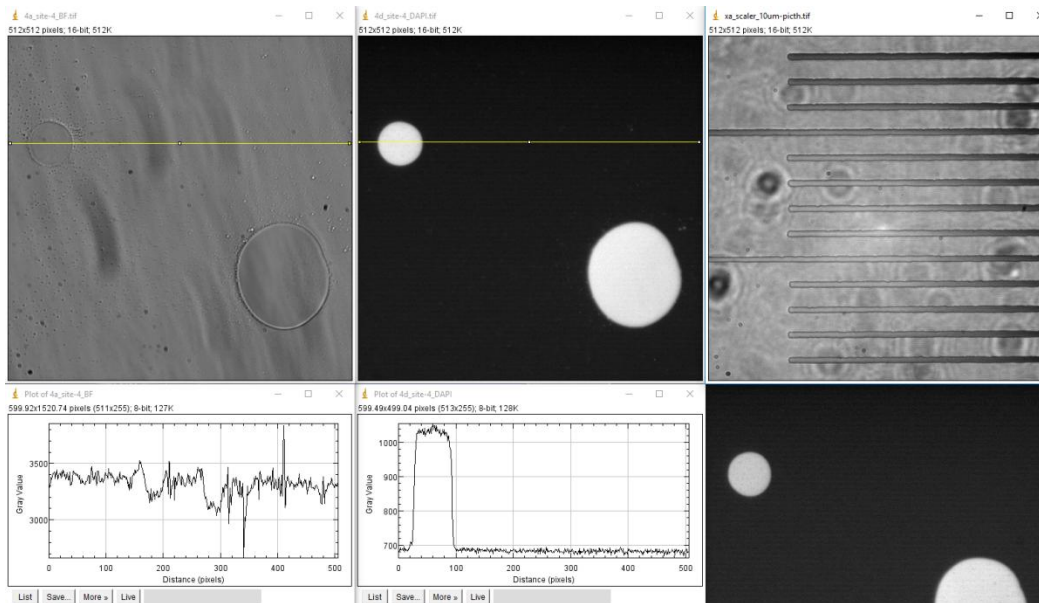
който да се изпитат съответните способности за детекция. Този опитен модел по размери трябва да се доближава до размерите на еукариотните клетки. На фигура 4 са представени изкуствени липозоми с размери между 15~25 μm .



Фигура 4. Микроскопски изображения на изкуствени липозоми в конфокален микроскоп. Разстоянието между вертикалните чертички на дясната-горна снимка е $10 \mu\text{m}$ и се използва, като скала за измерване на диаметъра на частиците. Под снимките са представени (PlotProfile) профила на интензивност, получен при софтуерна обработка на изображението с програмата ImageJ

На фигурата са изобразени микроскопски снимки две липозоми с различни размери, получени чрез повърхностно активното вещество Span 80. Външния разтвор (или черния фон на снимката) е неполярен органичен разтворител (хексадекан). Той не поглъща светлина и не излъчва емисия. Поради тази причина се вижда, като черен фон. Във вътрешността на липозомата се намира воден разтвор с въглеродни квантови точки с известна концентрация (100 mg/ml). За изобразяване на обекта е използван DAPI филтър, който има дължина на вълната при възбуждане при 400~418 nm (т.е. в синята и близката ултравиолетова област) и съответно пропуска емисия с дължина на вълната при 478~495 nm.

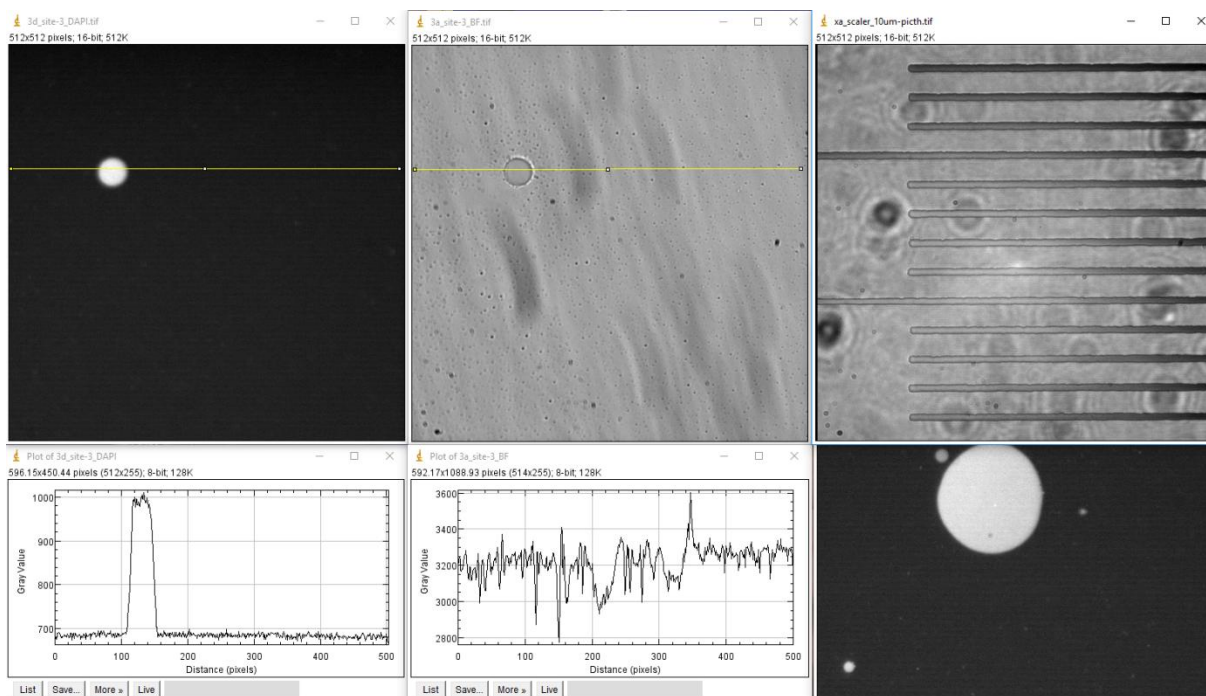
Съгласно абсорбционния спектър на въглеродните наночастици те абсорбират в синята и близко-ултравиолетова част на спектъра с максимум $\lambda_{\max} = 360 \text{ nm}$, което съответства на излъчвателния прозорец на DAPI филтъра. Наночастиците излъчват синя или синьо-зелена флуоресценция, която е в зависимост от рН на разтвора с максимум около $\lambda_{\max} = 460 \text{ nm}$, която съответства на пропускателния прозорец на филтъра. Чрез флуоресцентен спектрофотометър може да се измери с голяма точност интензивността на емисия в обемен разтвор. CCD камерата не притежава такава, чувствителност, като спектрофотометричния детектор, но въпреки това може да заснема и отразява интензитета на изображението. При подходяща софтуерна обработка, на получените микрографски снимки, може да се измери в известна степен интензитета на флуоресценция и да се отнесе към концентрацията на квантовите точки във вътрешността на липозомата. За правилното извършване на такова измерване е необходимо да се вземат под внимание следните съображения. Първо, за предпочитане е липозомите да притежават еднакъв или близък размер. Второ, концентрацията на липозомните капки в разтвора трябва да бъде еднаква и по възможност по-ниска. По този начин количеството на опалесценция (noise или шумов фон) е по-малък и така стойностите на интензитет на черния фон се доближават до нулата. При проведеното изследване се установява, че размера на капката не влияе силно върху стойностите на сигнала, както е показано на фигурите 4 и 5.



Фигура 5. *Микроскопски изображения на изкуствени липозоми в конфокален микроскоп. Разстоянието между вертикалните чертички на дясната-горна снимка е $10 \mu\text{m}$ и се използва, като скала за измерване на диаметъра на частиците. Под снимките*

епредставен (PlotProfile) профила на интензивност, получен при софтуерна обработка на изображението с програмата ImageJ

И на двете фигури са заснети липозоми с различни размери. На фиг. 20, размера на изследваната липозома е около 30 μm , а на фигура 6 размера е около 15 μm . При аналитична софтуерна обработка на интензитета на профила на изображението се установява, че и в двата случая сигнала е около 1200 единици. Това е много важен резултат, който показва че интензивността на изображението силно зависи от концентрацията на наночастици в обекта и в по-малка степен от неговите размери. За да се провери Тази хипотеза е проведен допълнителен контролен експеримент с липозома, чиито размери са значително по-малки (фиг. 6).

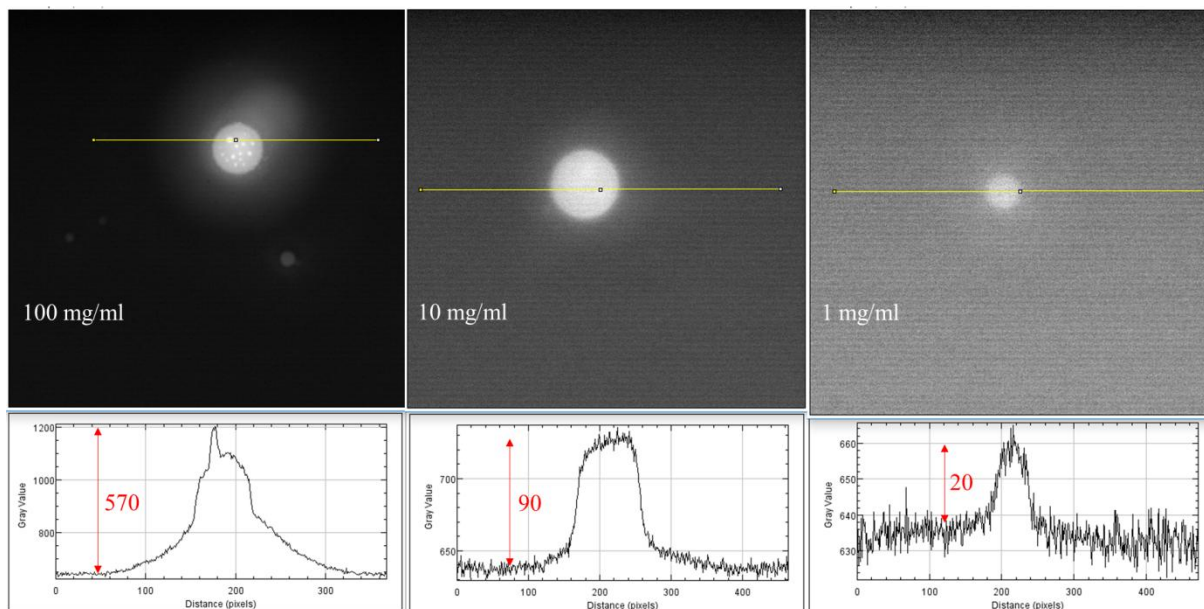


Фигура 6. Микроскопско изображение на изкуствена липозома в конфокален микроскоп, извършен чрез DAPI филтър. Разстоянието между вертикалните чертички на дясната-горна снимка е = 10 μm и се използва, като скала за измерване на диаметъра на частиците. Под снимките е представен (PlotProfile) профила на интензивност, получен при софтуерна обработка на изображението с програмата ImageJ

Контролният експеримент показва еднозначно, че влиянието на размера оказва слабо влияние върху интензитета на измерената емисия. При липозома с размер по-малък от 10 μm измереният сигнал е приблизително равен с този на тройно по-голямата

капка на фиг. 4. Заключение от проведените до тук експерименти и получените данни е, че при еукариотните клетки сигнала на излъчената емисия от страна на въглеродните квантови точки трябва да зависи от рН в клетката, концентрацията на наночастиците, присъствието на специфични соли и ниските стойности на опалесценция на обкръжаващата среда (фона), но не и от размера на клетката или обекта, който е подложен на анализ.

След като интензитета, измерван чрез CCD камерата зависи преди всичко от концентрацията следва да се конструира калибровачна зависимост между интензитета и концентрацията на наносензорите. За целта са необходими да се заснемат близки по размери липозоми, но съдържащи наночастици с различна и точно определена концентрация за получаване на калибровъчната права. Такъв експеримент е предложен на фигура 7.

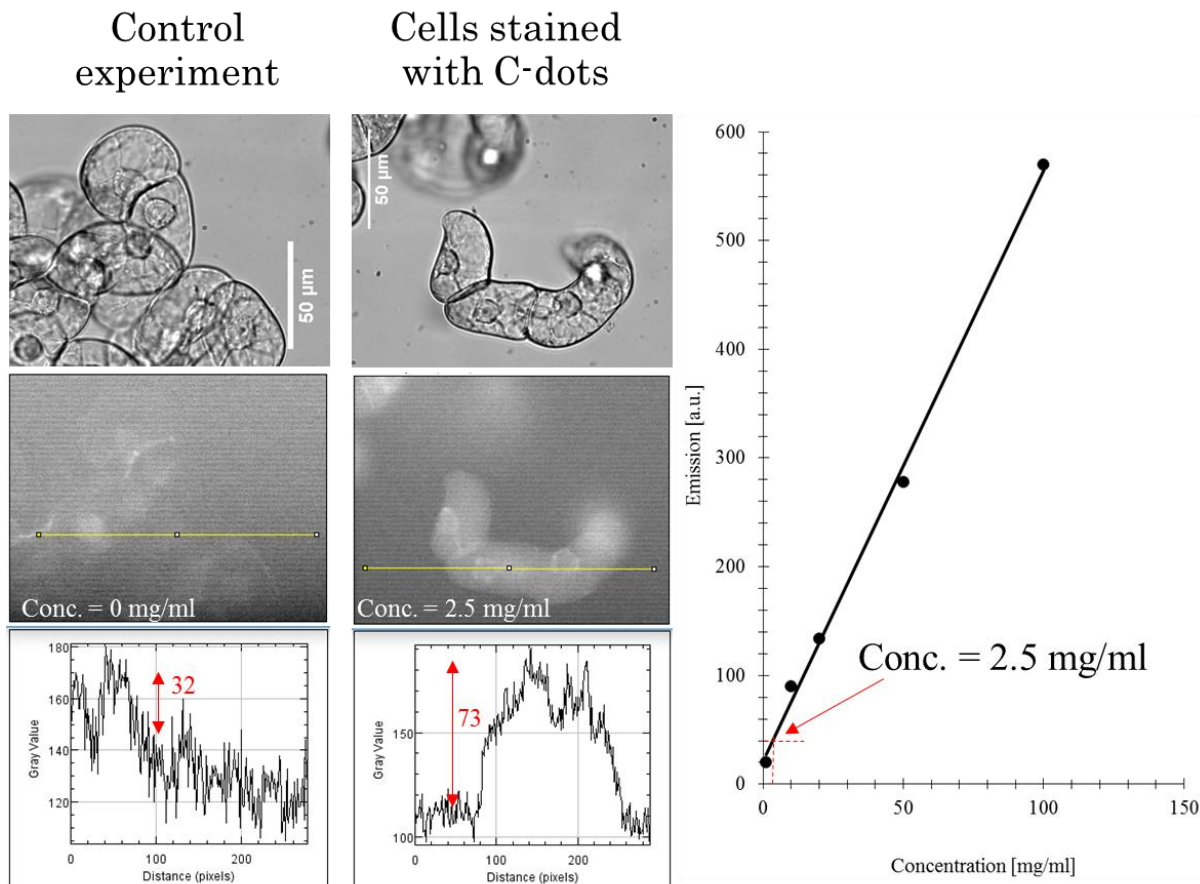


Фигура 7. Изкуствени липозоми с различна концентрация на въглеродни квантови точки във вътрешността си. Концентрацията на наночастиците намалява от 100 mg/ml, 10 mg/ml до 1 mg/ml. Измерения интензитет се променя съответно от 570, 90 и 20 единици

От фигурата се вижда, че колкото по-висока е концентрацията, толкова по-нисък е шума на опалесценция около липозомата. Този шум се увеличава с понижаване на концентрацията. Въпреки това се отчита зависимо линейно намаление на интензитета, което започва от 570 единици и стига до 20 при ниски концентрации около 1 mg/ml на

наночастиците. Около тези стойности работи и сензорния обхват на предложените въглеродни квантови точки.

Линейната калибровъчна зависимост е представена на фигура 8. От нея се забелязва ясно връзката между концентрация и интензивност на изображението. Установява се че долния обхват на сензорната способност е близо до 1 mg/ml. Тази стойност обаче е достатъчна за *in vivo* детекция на въглеродни наночастици в еукариотни растителни клетки. На същата фигура са показани микроскопски изображения на тютюневи клетки Тобасо ВУ-2, култивирани с въглеродни квантови точки.



Tobacco Cells ВУ

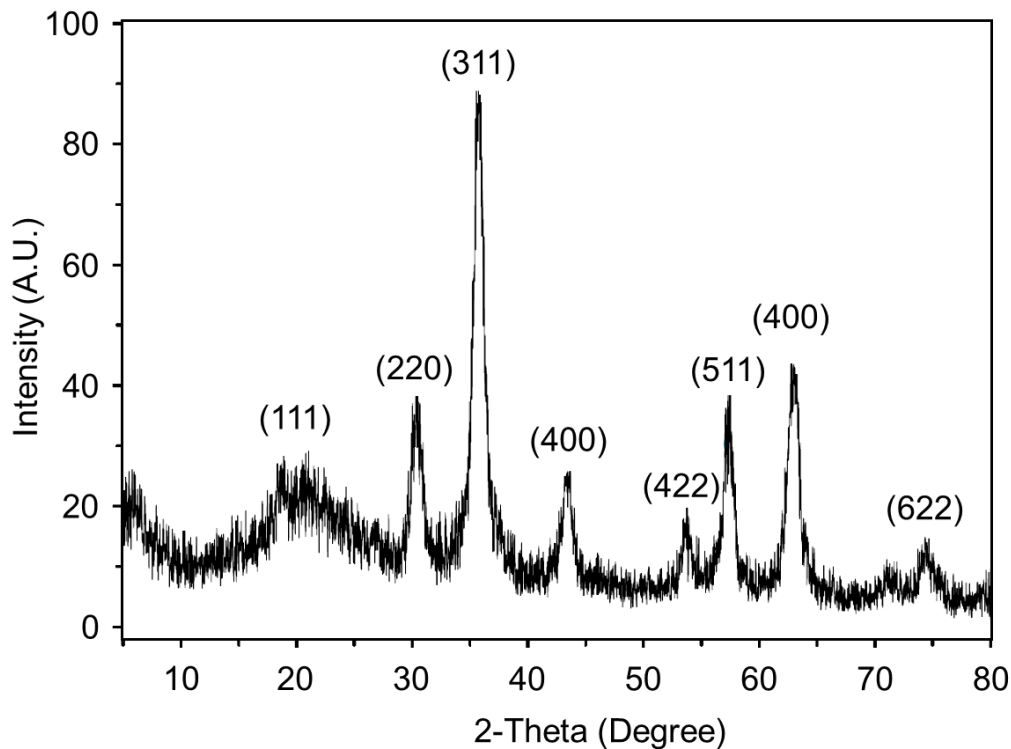
Calibration curve of concentration vs emission

Фигура 8. Микроскопски изображения на тютюневи клетки Тобасо ВУ-2. На лявата снимка са представени клетки, които не са култивирани с наночастици (контролен експеримент). На дясната снимка са представени клетки, които са култивирани и съответно погълнали въглеродни квантови точки. Под снимките е измерен профила на емисия, посредством ImageJ. От дясната страна на фигурата е представена

линейната калибровъчна зависимост между концентрацията и интензитета на емисия на въглеродните квантови точки. След екстракция на шума от снимките се измерва, че концентрацията на погълнатите наночастици е около 2.5 mg/ml с най-високи стойности около клетъчното ядро

2. Характеризиране на азот-дотиранисупер-парамагнитни $Fe_3O_4@C$ -dots наночастици

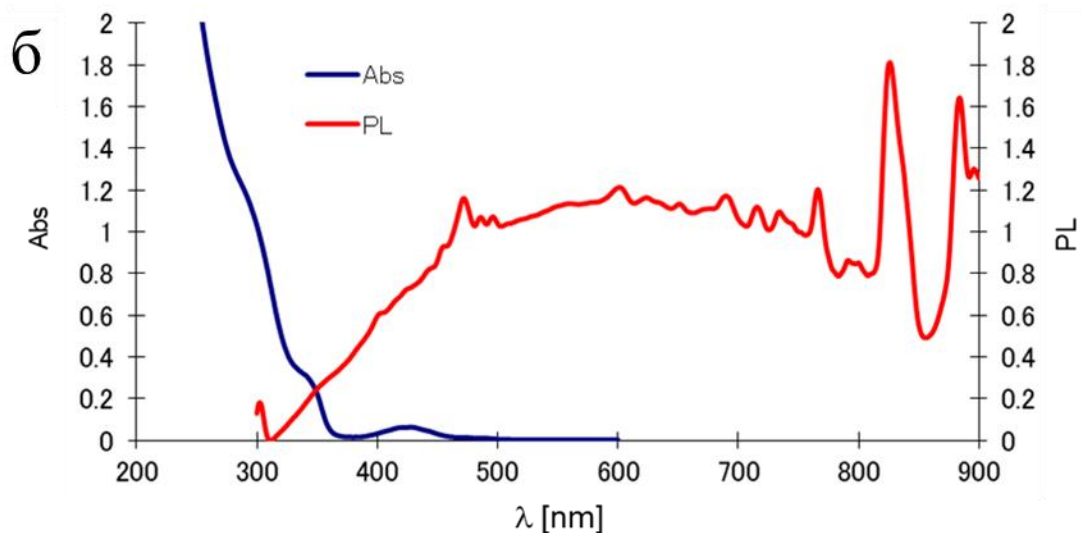
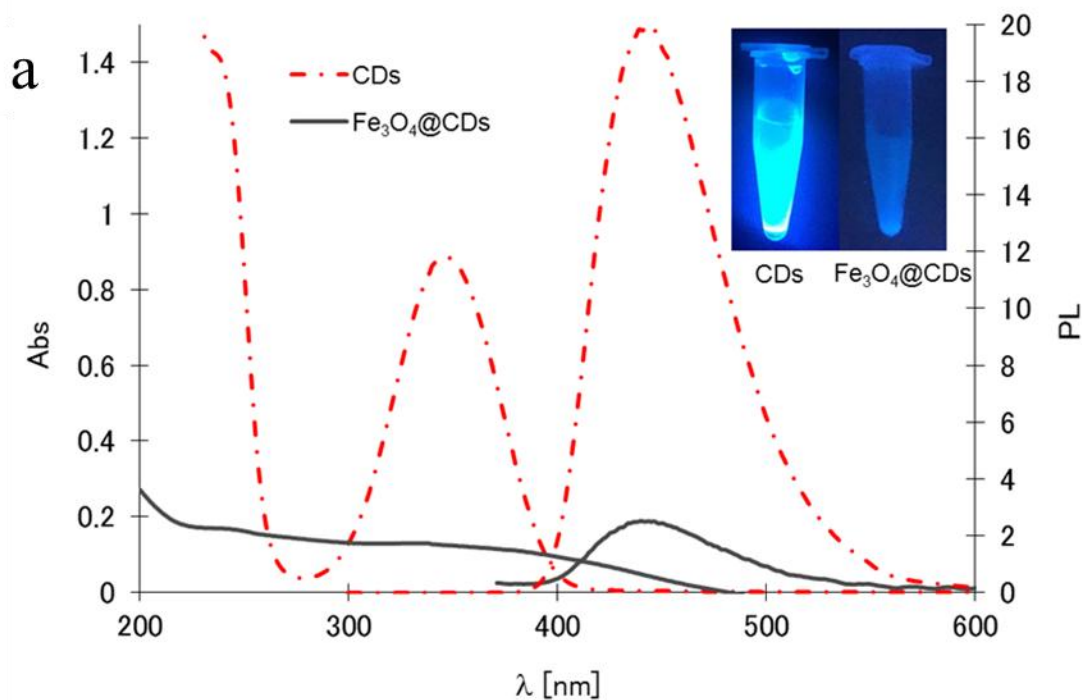
Дифракционните рентгенови данни на пригответените изсушени $Fe_3O_4@C$ -dots наночастици показват характерните широки пикове за магнетит, както е показано на Фиг. 9.



Фигура 9. Рентгенова дифракция на наночастици от $Fe_3O_4@C$ -dots в прахообразно състояние. Характерните пикове за магнетита са идентифицирани, чрез техните индекси, както следва (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440) и (622)

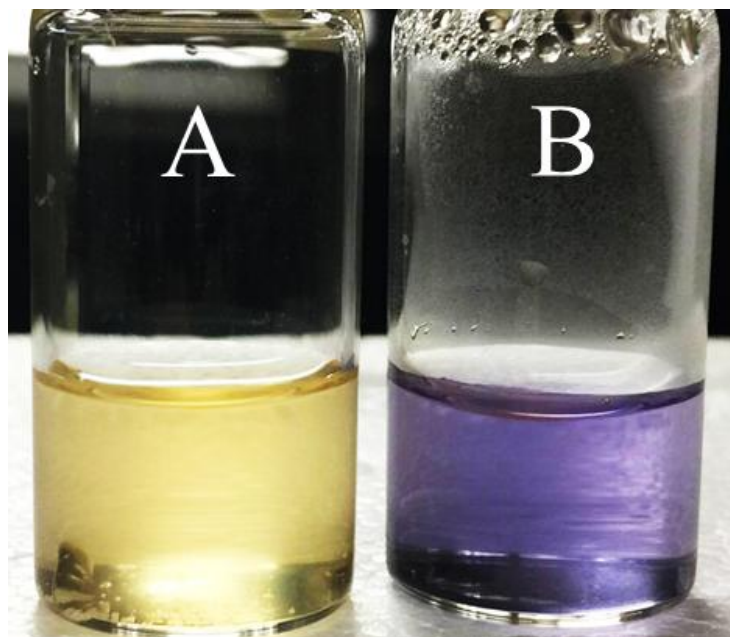
На Фиг. 10А са показани оптичните свойства (абсорбция и флуоресценция) на голи квантови точки (червена прекъснатата линия) и супер-парамагнитни $Fe_3O_4@C$ -dots (черна непрекъснатата линия) от рода ядро-обвивка. Спектрите на абсорбция и фотолуминесценция на уранил (VI) ацетата са показани на Фиг. 10Б. Немодифицираните супер-парамагнитни наночастици от Fe_3O_4 не притежават абсорбция и флуоресцентни

пикове. Причините за това са две. Първата е че по повърхността им няма наличие на хромофорни органични групи и втората е, че тези частици не са с полупроводникови свойства. Следователно т. нар. квантов ефект, който се проявява при повечето полупроводникови нанокристали с диаметър по-малък от 10 nm тук не е налице. За разлика от тях въглеродните квантови точки притежават специфични оптични свойства, дължащи са, както на повърхностните им хромоформни групи, така и на ароматните домейни, концентрирани в ядрото им. Структурата им наподобява третичната структура на протеинова молекула, при която хидрофобните групи са насочени в сърцевината на макромолекулата, а хидрофилните групи са разположени по повърхността ѝ.



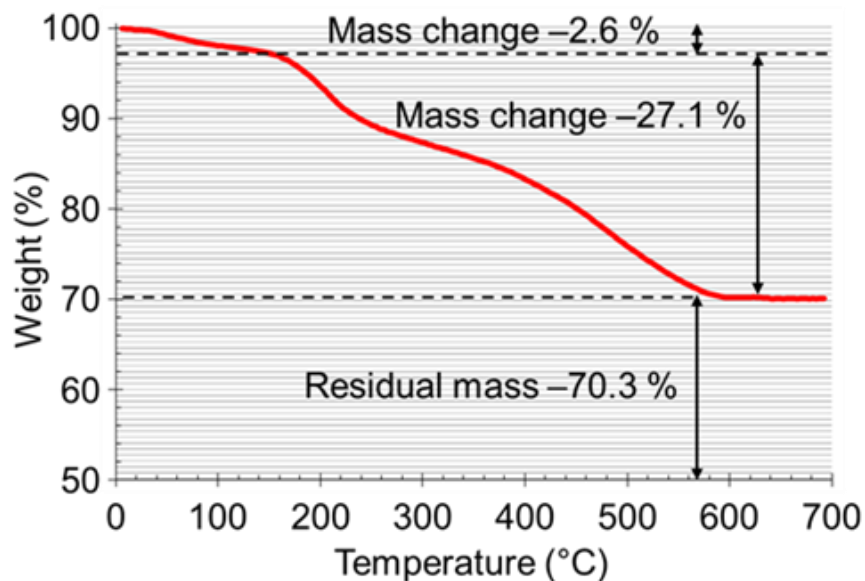
Фигура 10. (А) Ултравioletов и видим абсорбционен спектър (в ляво) и флуоресцентен спектър (в дясно) на голи въглеродни квантови точки (червена прекъсната линия) и $Fe_3O_4@C$ -dots наночастици от рода ядро-обвивка (черна непрекъсната линия). В горния десен ъгъл на фигурата се сравняват емисиите на въглеродните квантови точки и $Fe_3O_4@C$ -dots наночастици. (Б) Абсорбционни и фотолуминесцентни спектри на ураниев (VI) ацетат. Във флуоресцентния спектър на ураниевите йони се откриват излъчвателни пикове в близката инфра-червена област

С увеличаване на дължината на вълната на възбуждащата светлина, пикът на емисията постепенно се измества към по-дълги дължини на вълните (т.е. регистрира се червено отместване) и интензивността му намалява. Този ефект не се наблюдава при голите квантови точки в контролния експеримент. Имобилизирването на въглеродни квантови точки върху повърхността на магнитните наночастици може да се докаже качествено, чрез използване на нинхидринов тест, както е показано на Фиг. 11.

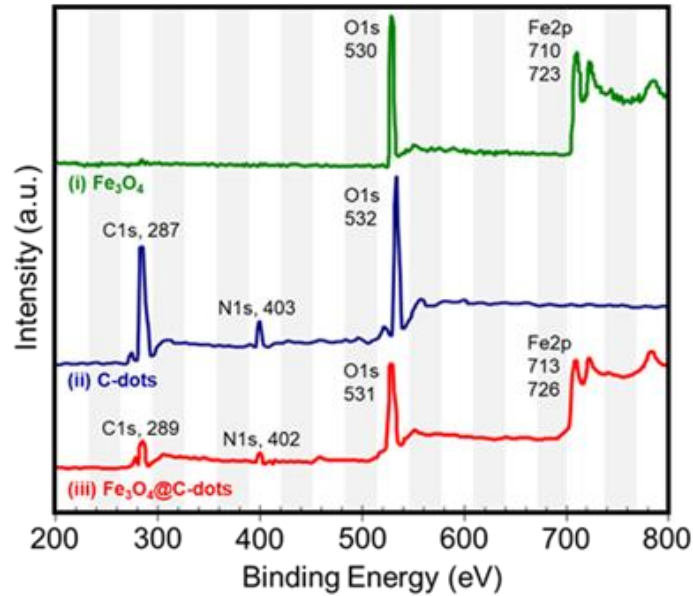


Фигура 11. Нинхидринов тест за детекция на аминокрупите, намиращи се по повърхността на въглеродните квантови точки. (А) контролен експеримент с не покрити магнитни Fe_3O_4 наночастици, и (В) положителна реакция, показваща промяната на цвета от жълто към лилаво, дължаща се на наличието на имобилизирани въглеродни квантови точки по повърхността на магнитните Fe_3O_4 наночастици

Непокрытите супер-парамагнитни наночастици не могат да реагират с нинхидрин, както е показано с жълто оцветената проба (Фиг. 11А), т.е. в този случай контролният експеримент е отрицателен. Наличието на амини от имобилизираните въглеродни квантови точки върху Fe_3O_4 наночастиците води до образуването на типичния лилав цвят, характерен за тази качествена реакция, т.е. теста е положителен (Фиг. 11Б). Количествения анализ на органиката имобилизирани въглеродни квантови точки по повърхността на магнитните наночастици се определя, чрез т. нар. термогравиметричен анализ (Фиг. 12). Наночастиците от $\text{Fe}_3\text{O}_4@C$ -dots ядро-обвивка проявяват загуба на теглото си, изразена в три стъпки, съответно при 160 °C, между 200 и 500 °C и над 600 °C. Първоначалната загуба на теглото (т.е. първата стъпка при температура < 160 °C) се дължи на изпарението на молекулите на водата или на други слабо свързани молекули от пробата. Това причинява около 2.6 % понижение на общата маса.



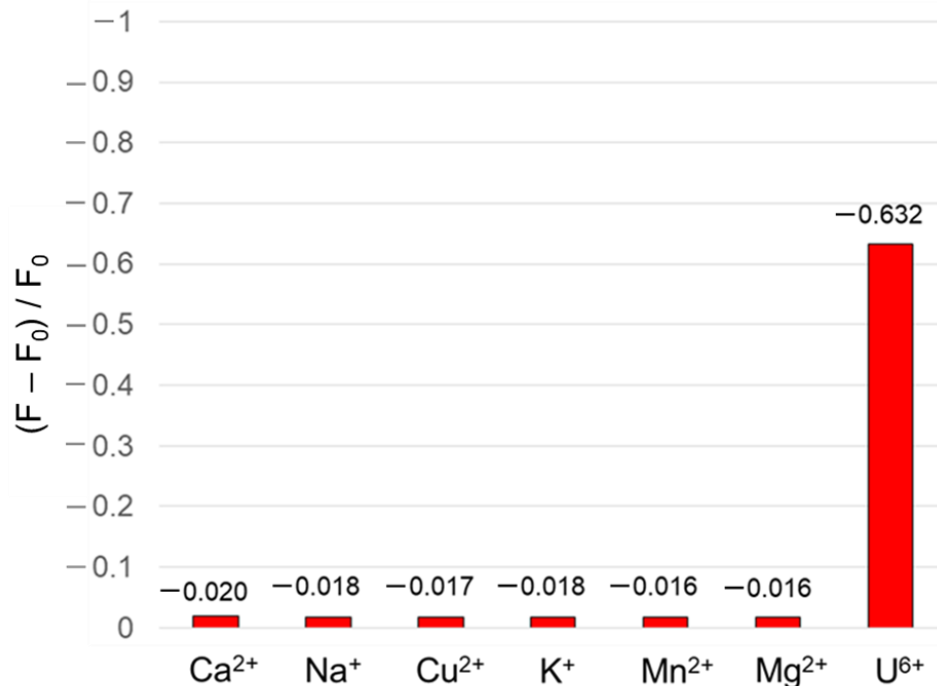
Фигура 12. Графика на полученият термогравиметричен анализ на супер-парамагнитни наночастици от $\text{Fe}_3\text{O}_4@C$ -dots от типа ядро-обвивка



Фигура 13. Рентгенови фотоелектронни сканиращи спектри на (i) непокрити Fe_3O_4 наночастици (зелен цвят), (ii) въглеродни квантови точки (син цвят) и (iii) $Fe_3O_4@C$ -dots наночастици от типа ядро-обвивка (червен цвят)

Лекото изменение на масата предполага, че $Fe_3O_4@C$ -dots наночастици са стабилни до тази температура. Значителната загуба на теглото (около цели 27.1 %) в диапазона между 200 – 500 °C показва, че органичната обвивка на въглеродните квантови точки постепенно се окислява и се разгражда в този температурен диапазон. В присъствие на кислород тези процеси могат да преминат и в горене и са типично срещани при органичните съединения. Окончателната 70.3 % остатъчна маса съответства на съдържанието на магнетит (или Fe_3O_4). Едновременно с термогравиметричния анализ беше проведен и рентгенов фотоелектронен анализ на наночастиците, за да се докаже убедително протичането на повърхностната модификация, т.е. имобилизацията с въглеродни квантови точки. Резултатите от анализа са представени на Фиг. 13. Рентгеновия фотоелектронен спектър на непокритите магнитни наночастици е представен на фигурата със зелен цвят. Както е показано те съдържат голямо количество кислород (O1s, 530 eV) и желязо (Fe2p, 710 и 723 eV), както и незначително малко количество въглерод (примес останал от синтетичната реакция). В рентгеновия фотоелектронен спектър на въглеродните квантови точки (син цвят) се наблюдават три отделни пика, центрирани при 287 eV (C1s), 403 eV (N1s) и 532 eV (O1s). Червения спектър на фигурата убедително показва всички пикове, необходими за характеризирането на наночастиците $Fe_3O_4@C$ -dots. Анализът известен още, като зета потенциал (Z-potential) допълнително доказва модификацията на повърхността на наночастиците, заради промяната на техния заряд.

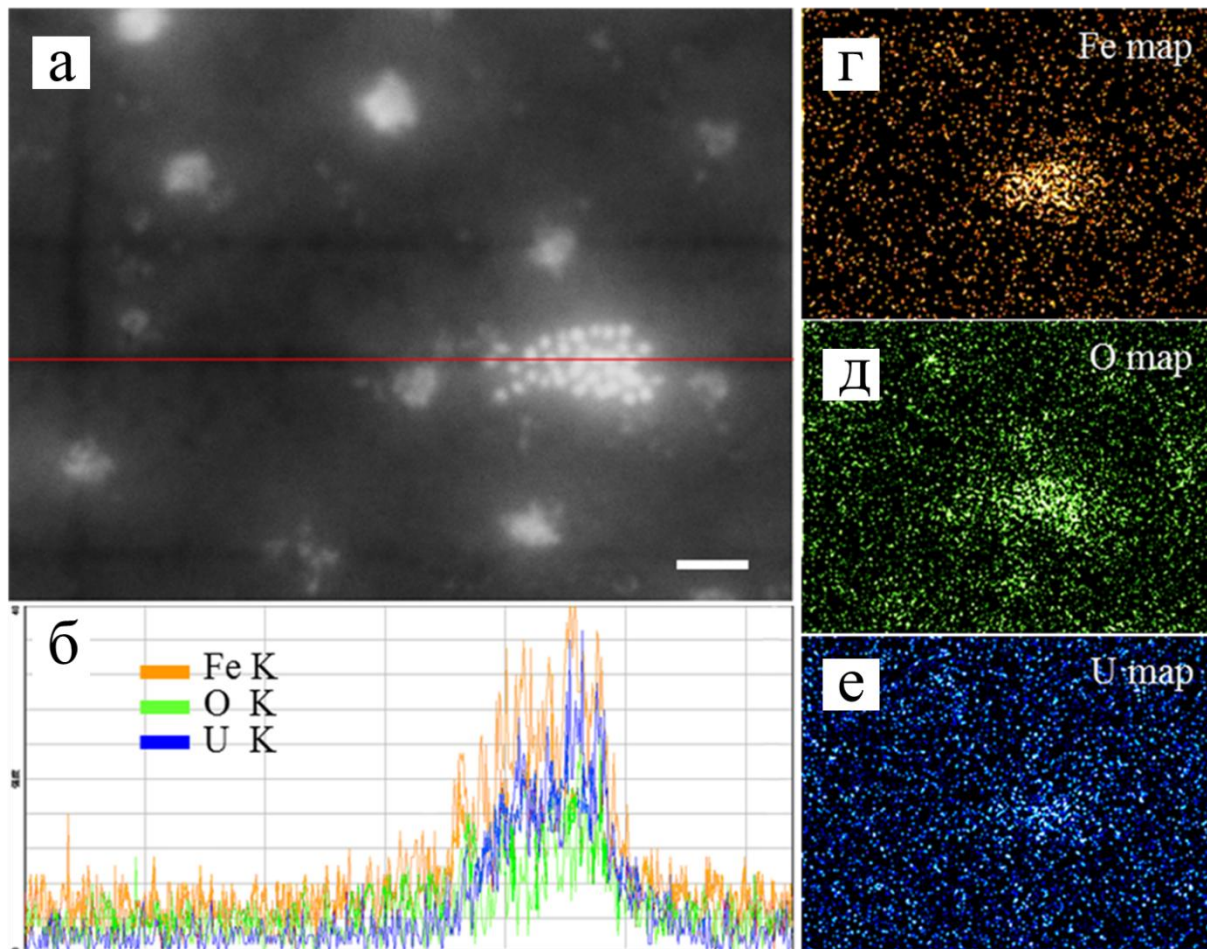
В нашите експерименти $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C-dots}$ наночастици постигат максимален сорбционен капацитет при pH 4.5 в присъствието на бикарбонати, поради реакцията на обмен на лиганди. Полученият практически добив е съответно $160 \sim 164 \text{ mg g}^{-1}$ в аеробна среда и около $167 \sim 172 \text{ mg g}^{-1}$ в анаеробна водна среда при стайна температура. Тези данни съответстват на 97 ~ 99 % отстраняване на общото количество уран в аликвотата. Реакцията на адсорбция също се потвърждава и наблюдава, чрез UV-VIS измерване. Първоначалният наносорбент от $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C-dots}$ притежава абсорбционен максимум при около 350 nm (зелената непрекъсната линия) с относително по-нисък интензитет. Адсорбцията на уран (VI) върху органичната обвивка от въглеродни квантови точки причинява синьо отместване към ~ 327 nm и значително повишава неговия интензитет (около два пъти в проведения експеримент). Тази промяна на абсорбцията е свързана с образуването на здрави химични хелатни комплекси по повърхността на въглеродните квантови точки. Комплексът се проявява също и с друг абсорбционен пик, но с по-ниска интензивност във видимия участък при ~ 440 nm. Ефектът на флуоресцентното загасване се изследва в моделен разтвор на киселинно-руднични отпадни води без присъствието на уран, за да се потвърди селективността и специфичността на $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C-dots}$, като наносензори. Металните йони, като Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} не показват никакво забележимо загасване на флуоресценцията, както е показано на Фиг. 14.



Фигура 14. Флуоресцентен отговор на воден разтвор на въглеродни квантови точки към добавянето на различни метални йони с концентрация 100 μM . F и

F₀ съответстват флуоресцентната интензивност на разтвора в присъствие или отсъствие на съответния метален йон Mⁿ⁺

Данните от енергийно дисперсионния анализ показват съществуването на пикове при L α и K α , принадлежащи на желязото, съответно при 0.7 keV и 6.4 keV, както K α пик на кислорода при 0.5 keV и K α пик на въглерода при 0.27 keV в химичния състав на анализираниите наночастици. Желязото и кислородът се приписват на магнитното ядро от Fe₃O₄ нанокристал и въглеродът показва органичния скелет на обвивния слой. В настоящите спектри се регистрира също и K α сигнал, който се дължи на присъствието на мед. Медта не се съдържа в химичния състав на наночастиците. От нея е направена мрежичката, използвана за наблюдение на образците в трансмисионния сканиращ електронен микроскоп. За линеен елементен анализ са избрани високо-интензивната M линия на урана, K α линия на желязото и K α линия на кислорода, както е показано на Фиг. 15 а,б. С този анализ може категорично да се потвърди, че съдържанието на тези елементи се припокрива напълно върху микрографското изображение. Елементното разпределение на желязо, кислород и уран върху електронно микроскопското изображение се определя, чрез EDS картографиране, както е показано на Фиг. 15 г,д,е. Техните характеристични пикове са достатъчно диференцирани в спектъра, което значително улеснява картографирането им върху микрографското изображение. Чрез аналитичния електронен микроскоп се доказва еднозначно адсорбирането на уран от супер парамагнитните наночастици.



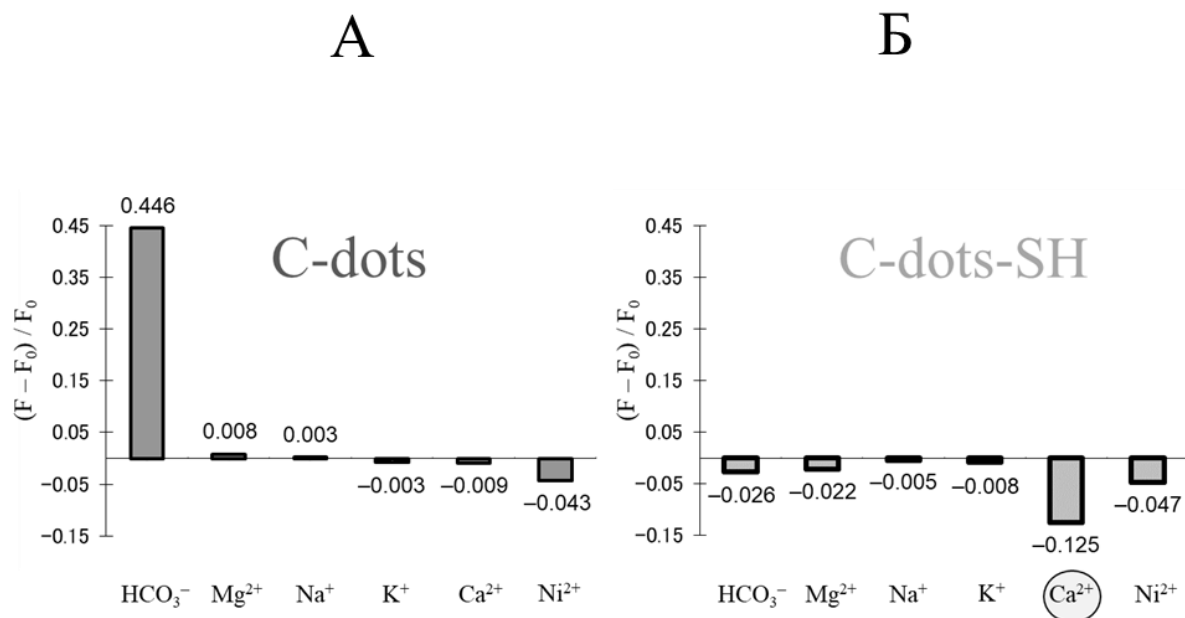
Фигура 15.STEM-EDS анализ на наночастиците $Fe_3O_4@C$ -dots от тип ядро-обвивка, които са адсорбировали уран. (а) Изображение получено чрез сканиращ трансмисионен електронен микроскоп на наночастици върху микрографската мрежа, (б) анализ на линейно сканиране на желязо, кислород и уран, съответстващи на техните $K\alpha$, $K\beta$ и M сигнали, и елементно картиране на (в) желязо, (г) кислород и (д) уран

3. Сулфат-дотирани флуоресцентни въглеродни квантови точки, като наносензори за бърз и чувствителен мониторинг на калций в природни твърди води

Разработени са въглеродни квантови точки, дозирани със сяра, като флуоресцентен наносензор за бързо и чувствително определяне на концентрацията на разтворените калциеви йони и твърдостта на водата на природни води. Наночастиците са синтезирани, чрез зелена микровълнова пиролиза на смес от лимонена киселина и цистеамин. Те проявяват силно интензивна синя флуоресценция при облъчване с ултравиолетова светлина (дължина на възбуждане 365 nm) и висок квантов добив около 49 %. Специфичната сензорна селективност към разтворения калций възниква благодарение на

множеството органични функционални групи по повърхността на наночастицата и наличието на сяра. Процесът на откриване е базиран на загасване на фотолуминесценцията на въглеродните квантови точки и линейната зависимост между концентрацията на калциевите йони и флуоресцентната интензивност. От друга страна, флуоресценцията на аминокиселините въглеродни наноточки е чувствителна към общото съдържание на бикарбонати в разтвора. В допълнение, наличието на полярни органични групи на повърхността на въглеродните квантови точки подобрява тяхната разтворимост в естествени водни среди и особено в подземните води, които са известни с голямото си разнообразие на йонна сила и разтворени соли. Наночастиците могат да бъдат регенерирани и многократно използвани отново, чрез изплакване на разтвора със солна киселина и последващо пречистване, чрез обезсоляваща колона. По-нататък, количеството на калциевите в комерсиална минерална вода, определено чрез въглеродни квантови точки е в съответствие с количеството изписано на етикета ѝ. Това предполага потенциално приложение на въглеродните квантови точки за мониторинг на естествени води.

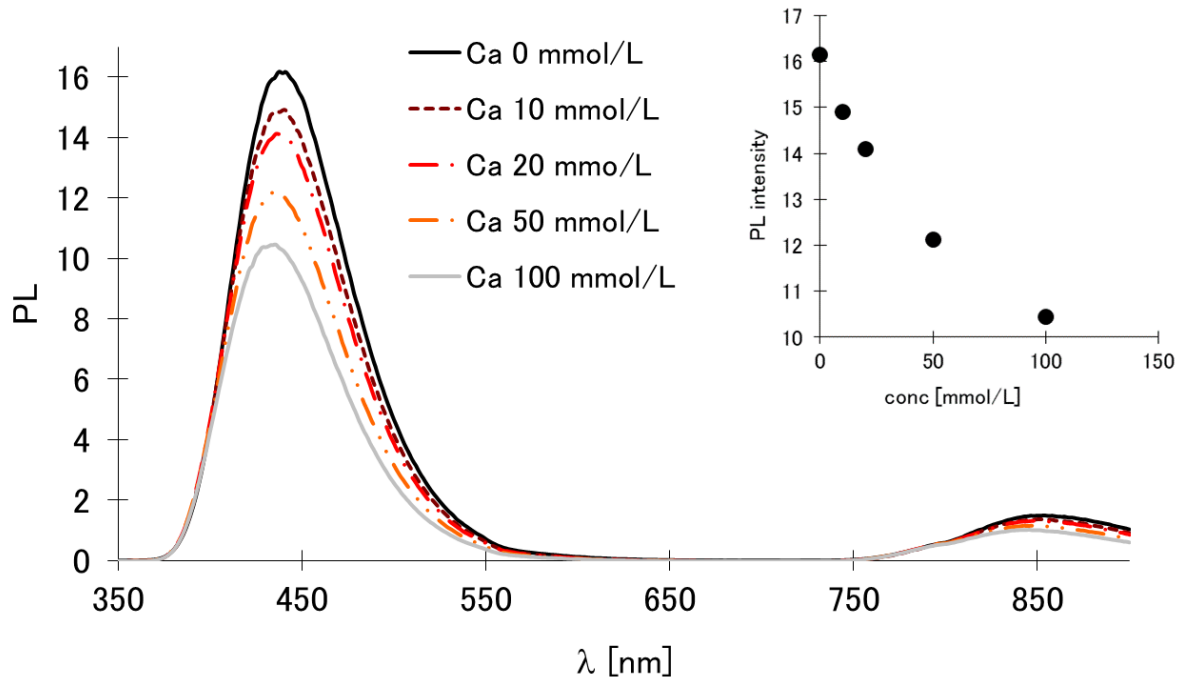
Високо флуоресцентните въглеродни квантови точки са широко използвани за чувствителна детекция на различни метални йони. В повечето случаи детекцията е базирана на индуцирано флуоресцентно загасване, но има и изключения при които се наблюдава обратното явление – усилване на интензитета на флуоресценцията. На Фиг. 16 е показано влиянието на метални йони и бикарбонати върху флуоресцентния интензитет на въглеродни наноточки във воден разтвор (MilliQ).



Фигура 16. Флуоресцентни спектри на (А) немодифицирани въглеродни наноточки, (Б) сяра-съдържащи въглеродни квантови точки в присъствието на различни йони с

концентрация = 10^{-2} mol/L. $\lambda_{ex} = 365$ nm. F и F_0 означава измерения интензитет на флуоресценцията на анализирания проба и първоначалния интензитет на флуоресценцията на контролната проба

Алкалните катиони почти не проявяват ефект върху интензитета на флуоресценцията, както на въглеродните наноточки, така и на сярна-съдържащите въглеродни квантови точки в разтвори от слабо кисело до неутрално pH. Получените данни потвърждават и незначителния ефект на магнезиевите йони, които са често срещан компонент в състава на твърдите води. Силната синя емисия на сярна-съдържащите въглеродни квантови точки се загасва значително, когато към разтвора се прибавят калциеви йони. Добавянето на разтворен калций намалява интензитета на флуоресценцията на наночастиците, но няма ефект върху локализирането на максимума, както е показано на Фиг. 17.



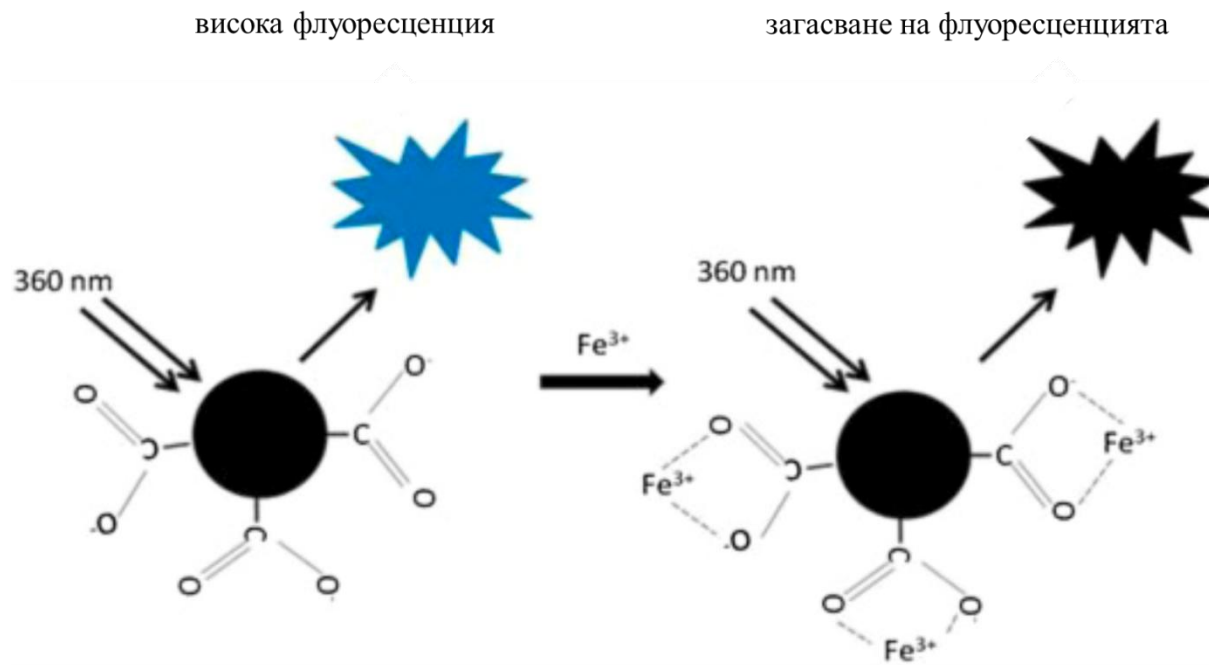
Фигура 14. Флуоресцентни спектри на сярна-съдържащи въглеродни квантови точки (с концентрация = 80 μ g/ml) в присъствието на различни концентрации на калциеви йони (0-100 mmol/L). В горния десен ъгъл е показана връзката между концентрацията на калциеви йони и интензитета на флуоресценцията

4. Високо луминесцентни въглеродни квантови точки, като наносензори за мониторинг на тежки метали

При по-нататъшните изследвания високо луминесцентните въглеродните квантови точки бяха разработени, като сензори за мониторинг на тежки метали във водни разтвори в микроскопични по размер обекти. Сензорните системи притежават селективност и

чувствителност при детекцията на някои биологично важни метални йони, като Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и др. За да се постигне тази цел наночастиците бяха синтезирани чрез микровълнова пиролиза. Техният квантов добив е над 50 % и пика на тяхната синя луминисценция е с дължина на вълната 450 nm. Наночастиците при фиксирана концентрация бяха тествани с различни разтворими метални йони. За първи път наблюдаваната химическа индуцирана флуоресценция беше детектирана чрез флуоресцентен микроскоп и CCD камера. По този начин се дава възможност за измерване на генерирания сигнал в микроскопични обекти чрез софтуера ImageJ. Резултатите показват, че повърхността на наночастиците проявява висок сензорен афинитет към pH на пробата и някои разтворени йони.

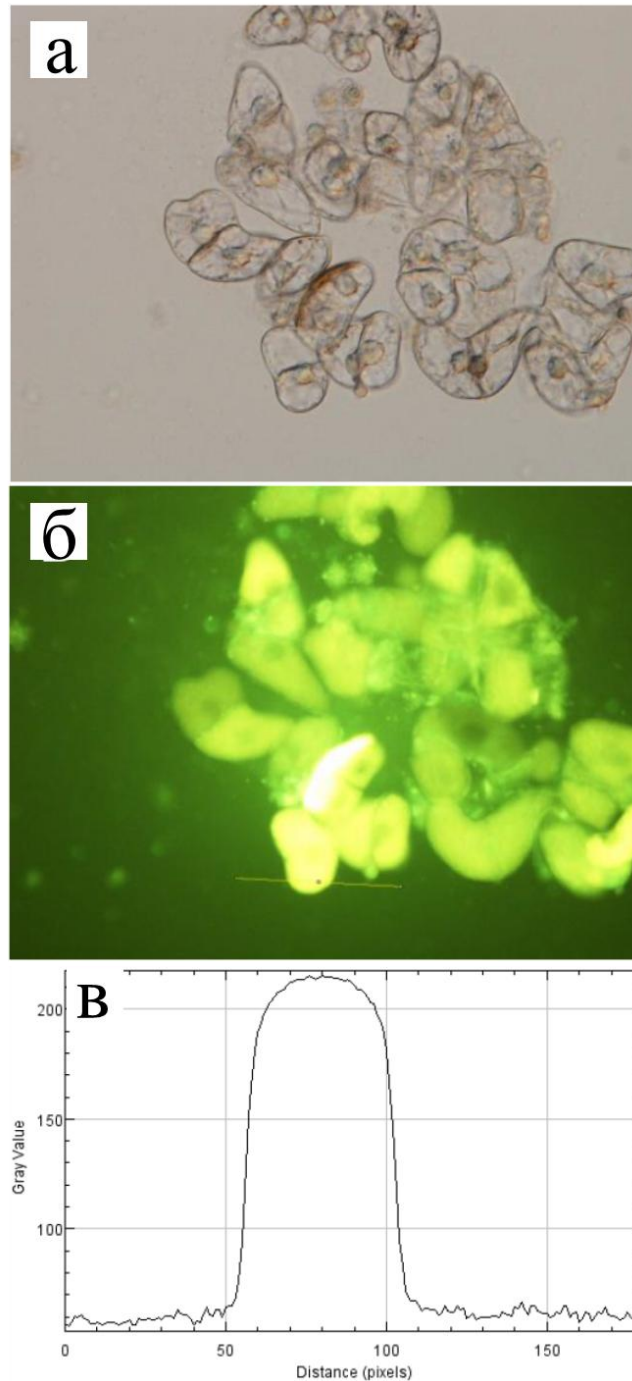
Интензитетът на фотолуминесценция на въглеродни наноточки е значително погасен, когато се приложи в разтвор на желязо (Fe^{3+}) в HEPES буфер. Установява се, че интензитетът намалява с увеличаване на концентрацията на желязни йони, но пика остава на същата позиция (не се регистрира отместване), дори и в случаите на висока концентрация на Fe^{3+} . Наблюдаваното флуоресцентно загасване на наночастиците, както беше споменато по-горе се дължи на неизлъчвателен електронен преход между възбуденото състояние на въглеродните наноточки и d-орбиталите на желязния йон, играещ ролата на комплексообразовател, както е показано на Фиг. 18.



Фигура 18. Загасване на флуоресценцията на въглеродни квантови точки, вследствие на специфична сензорна реакция с желязо.

На фигурите 18 и 19 са показани флуоресцентни микроскопични изображения на клетки, боязани с въглеродни наноточки. Еукариотните клетки първо се маркират с въглеродни наноточки и след това се фиксират с 2 % разтвор на глутаралдехид. В

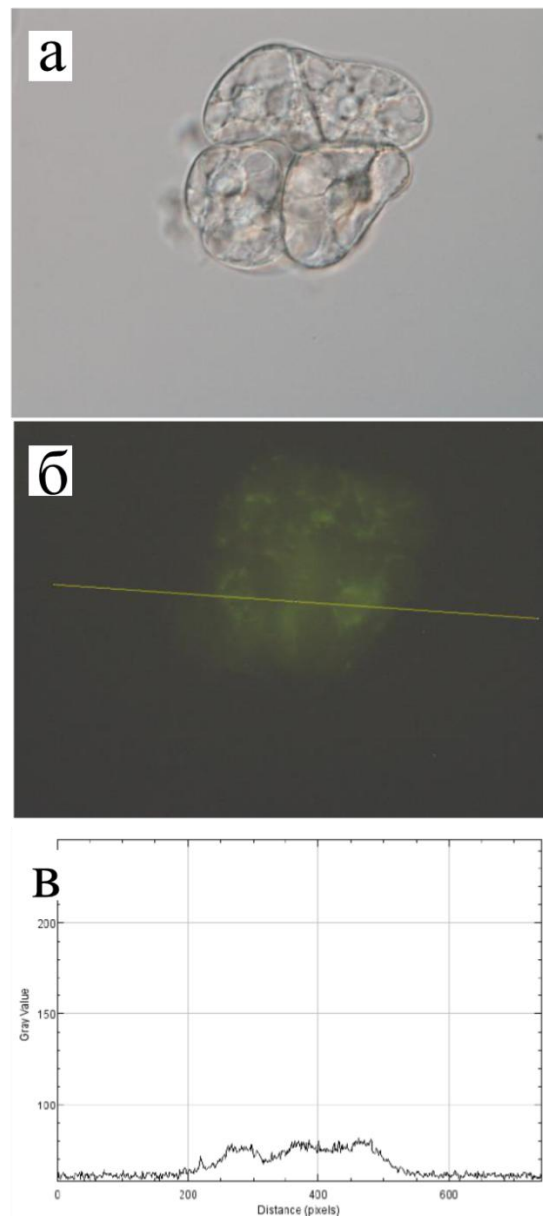
контролния експеримент белязаните клетки се измиват с ултра-чиста вода преди да бъдат подложени на наблюдение във флуоресцентен микроскоп. Както е показано на Фиг. 19 те притежават висока фотолуминесценция при облъчване със светлинен микроскоп. Под снимката е представен графичен профил на изображението на който се установява много висок пик (над 200 единици).



Фигура 19. *Контролен експеримент, при който растителни клетки се белязват с въглеродни наноточки, фиксират се и промиват с ултра-чиста вода. (а) светлинно-*

микроскопско изображение, (б) флуоресцентно микроскопско изображение, (в) графичен плот на флуоресцентното микроскопско изображение. Представените клетки са на растението *Tabaco*

Измерените флуоресцентни данни на изображението съответстват на високия квантов добив на въглеродните наноточки. Ако представените маркирани клетки се третира с разтвор, съдържащ железни (III) йони в буферна среда с концентрация 10 mg/L се наблюдава силен загасващ ефект на флуоресценцията, както е показано на Фиг. 20.



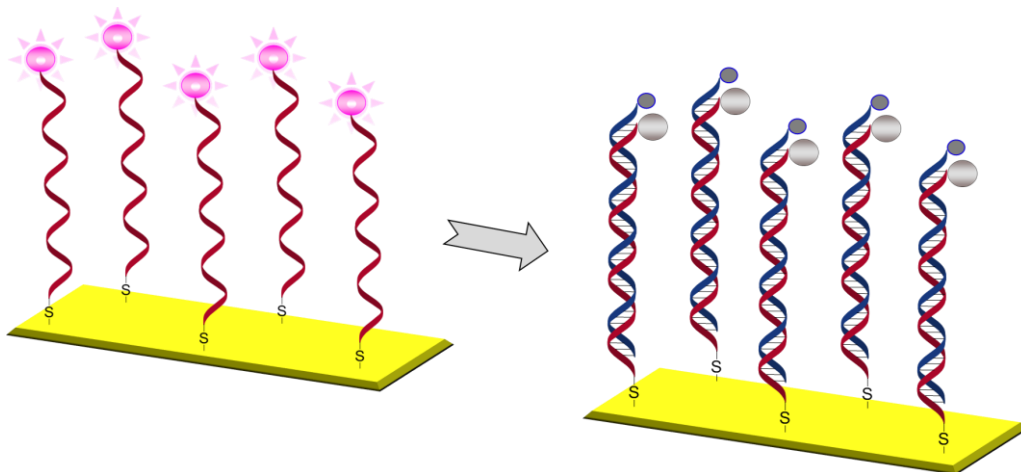
Фигура 20. Експеримент представящ биосензорния мониторинг на железните метални йони в растителните клетки. (а) светлинно микроскопско изображение, (б)

флуоресцентно микроскопско изображение, (г) графичен профил на флуоресцентното микроскопско изображение. Наличието на висока концентрация от железни йони води до загасване на флуоресценцията на въглеродните наноточки, използвани като наносензори

5. Въглеродни наноточки покрити с олигонуклеотиди, като флуоресцентни хибридационни сонди за ДНК микрочипове

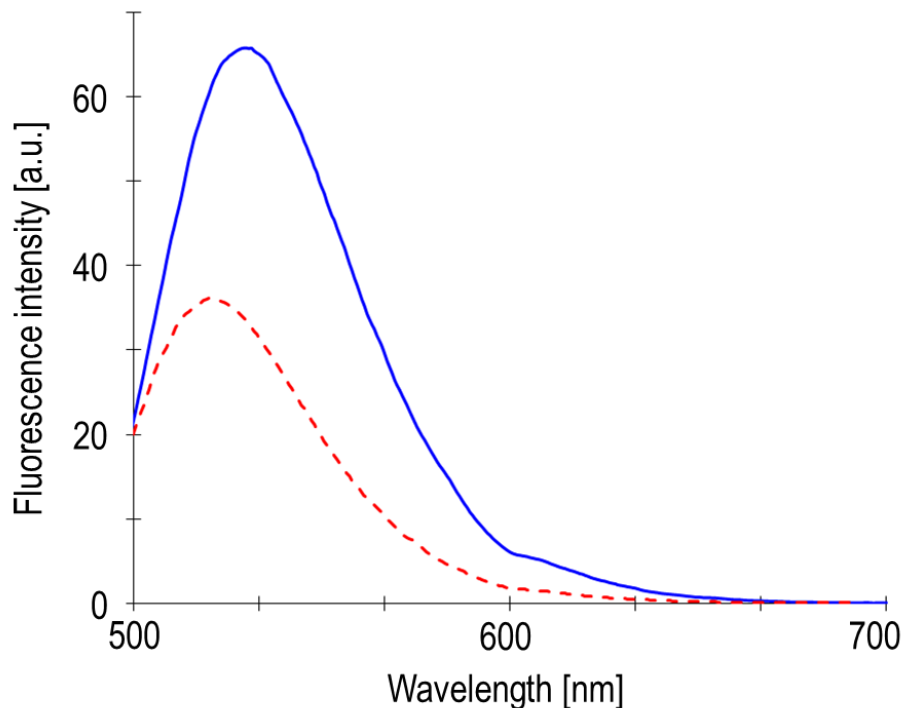
Въглеродните наноточки по-нататък бяха прикрепени (конюгирани) към едноверижни олигонуклеотиди с цел получаването на ефикасни хибридационни сонди, като ДНК микрочипове. Тези нано-инструменти позволяват бързо откриване и количествено определяне на нуклеинови киселини. Основното предимство на въглеродните квантови точки спрямо конвенционалните органични багрила е тяхната устойчивост към фото-избелване, която подобрява интензитета на сигнала и по този начин може да се детектират по-малки количества ДНК материал. В допълнение, повърхностното пасивиране на въглеродни квантови точки с етилендиамин води до повишаване на квантовия им добив и респективно интензитета на фотолуминесценцията, което е от голямо значение, тъй като за много биологични анализи генетичното количество е изключително ограничено. В настоящия дисертационен труд бяха използвани въглеродни наноточки дотирани с азот, като ефективни нано агенти за загасване на флуоресценцията при хибридационните ДНК микрочипове. Тяхната био-съвместимост и стабилност ги прави обещаващи флуоресцентни сонди или ДНК за приложения, като био-маркиране и био-изобразяване.

Основният принцип на ДНК микрочипа за флуоресцентна детекция в настоящия дисертационен труд е представен на Фигура 21.



Фигура 21. Схематично илюстриране на ДНК микрочип, флуоресцентно базирана детекция, чрез загасване на флуоресциновата емисия с въглеродни наноточки

За да се потвърди предложеният механизъм за сензорна реакция на Фиг. 21 беше изследвано флуоресцентното поведение на FAM-сондата при различни експериментални условия. На Фиг. 56 е показано, че в отсъствие на въглеродни наноточки, FAM-сондата проявява силна флуоресцентна емисия (синя непрекъсната линия). Но след хибридизация с едноверижен олигонуклеотид, модифициран с въглеродни наноточки се регистрира значително потушаване на флуоресценцията (червена прекъсната линия).



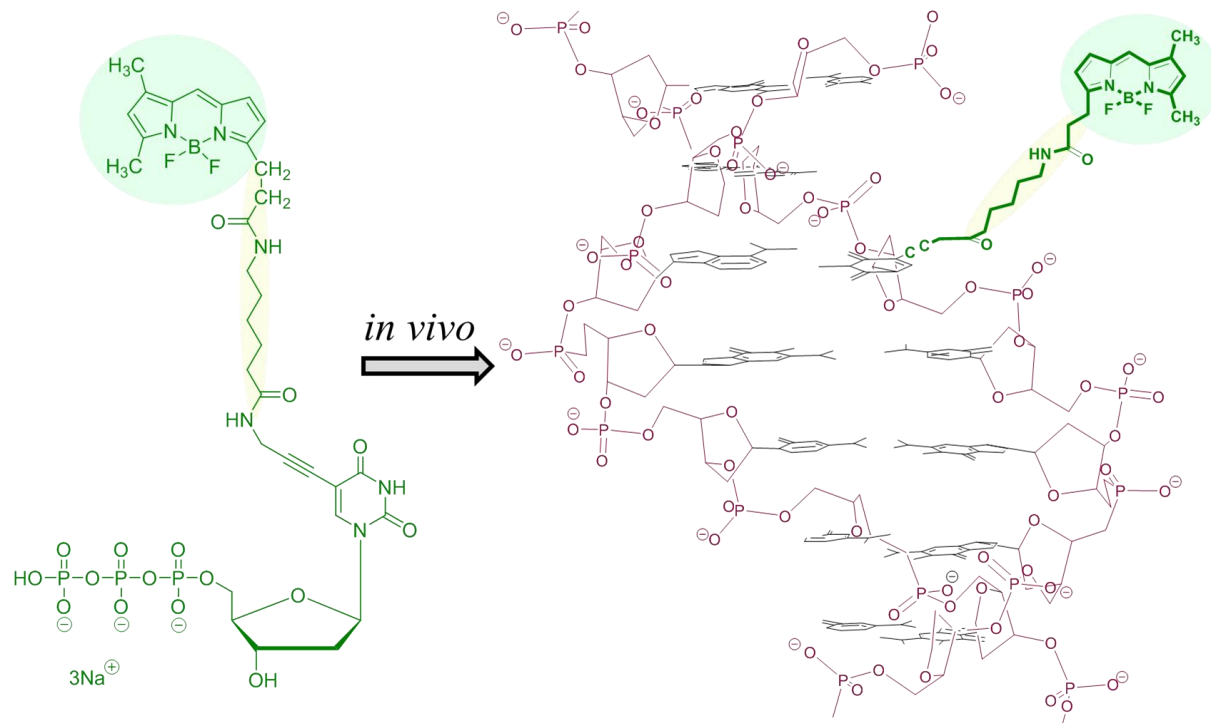
Фигура 22. Флуоресцентни емисионни спектри на FAM-сонда в Tris-HCl буфер (синя непрекъсната линия). FAM-сонда хибридизирана с олигонуклеотиди белязани с въглеродни наоточки в Tris-HCl буфер (червена прекъсната линия)

6. Визуализиране на естествената форма на ДНК в *E. коли*, белязана с бодипи, чрез корелативна микроскопия

Природната форма и вътреклетъчно разпределение на новосинтезирана ДНК беше визуализирана, чрез корелативна (светлинна и електронна) микроскопия в замръзнати клетки на *E. коли*. За тази цел деоксиуридин, модифициран с бодипи беше ензимно инкорпориран в генома на щам *E. коли*, мутант К 12, който не може да синтезира тимин. Успешното инкорпориране на този флуоресцентно белязан тиминов аналог се потвърди първо, чрез флуоресцентен микроскоп, в който клетките се наблюдаваха в типичния за

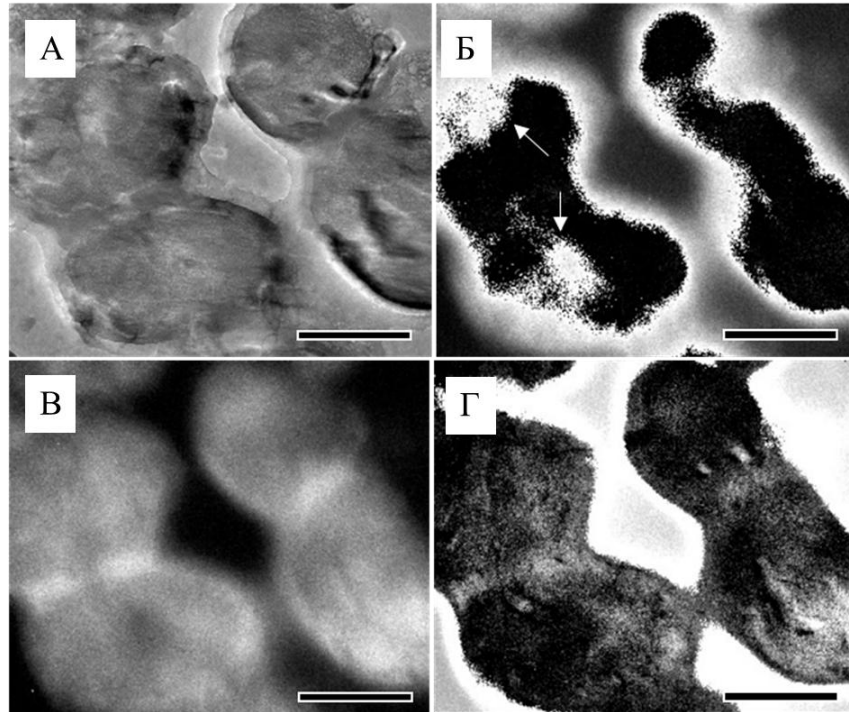
бодипи зелен цвят на емисията. По-късно предварително избраните маркирани клетки бяха наблюдавани в биологичен електронен микроскоп, където разпределението на новосинтезираната ДНК белязана с бор беше визуализирана с висока разделителна способност, чрез техниката електронно спектроскопично изображение (ESI). Практическото ограничение за откриване на бор е изчислено на база експериментални данни около $5 \sim 10 \text{ nmol/kg}$ в площ от $0.1 \mu\text{m}^2$, което показва, че ESI е подходящ метод за изучаване на цитохимията и локализиране на белязаните нуклеинови фрагменти в цитоплазмената хромозомна област. В допълнение, фините клетъчни влакнести и хромозомни ултраструктури се разкриват *in situ*, чрез комбиниране на фазова пластинка с трансмисионен електронен микроскоп (TEM) и ESI. Получените резултати заключават, че корелацията между флуоресцентната микроскопия с фазовата пластинка и TEM-ESI е мощен подход за изследване на структурната и конформационна динамика на ДНК репликационната машина в замразени клетки, които са близки до жизненото им състояние.

В настоящото изследване новосинтезираната ДНК беше визуализирана, чрез добавяне на смес от TTT и Bodipy-dUTP (в съотношение 3:1) в хранителната среда на микробиологичната суспензия.



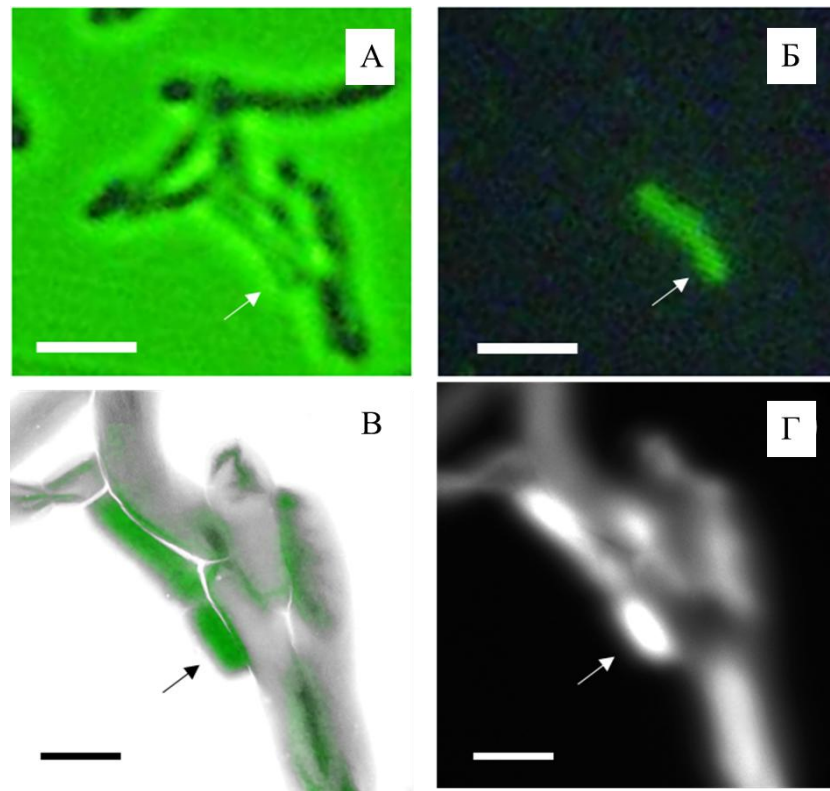
Фигура 23. Ензимно *in vivo* инкорпориране на BODPIY FL-14-dUTP в клетъчния геном на *E. coli* и позициониране на пропиниловата група в главната бразда на двойноспиралната ДНК молекула

Клетките маркирани с бодипи бяха анализирани в ТЕМ с ускоряващо напрежение от 300 kV и доза на електронния лъч около 7×10^7 електрони nm^{-2} . Съотношението сигнал към шум беше дефинирано между стандартното отклонение и извлечения сигнал, съгласно метода описан в експерименталната част на дисертацията. Чувствителността на откриване на бор в нашия експеримент се изчислява в обхвата $5 \sim 10$ nmol/kg (образците се различават по размер и физиологична активност). Изчислението е базирано на съотношението между коефициент и стандартното му отклонение за площ от $0.1\text{-}1\ \mu\text{m}^2$. Този резултат е в съответствие с публикуваните референтни данни. Оказва се, че количеството на бор в маркираните Е. коли е в рамките на $14 \sim 21$ nmol/kg за $0.1\text{-}1\ \mu\text{m}^2$, което е по-голямо от споменатата долна граница на откриване. Този интензивен сигнал на бора се открива във вътреклетъчната хромозомна ултраструктура на Е. коли, където се локализира също и новосинтезираната ДНК. Тя се припокрива с пика за фосфор L_1 , който има енергийно излъчване в близост до пик К на енергийното излъчване на бор. Независимо от това, в проведения експеримент електронно спектроскопските изображения са филтрирани и измерени при точна загуба на енергията. Останалата част от сигнала за загуба на енергия и сигналът идващ от фосфора са извадени, както е описано по-горе. По този начин сигналът, съответстващ на бор се отличава от сигналите за въглерод и фосфор. Изображенията на Фиг. 24 показват ТЕМ наблюдение и електронно спектроскопско изображение на Е. коли, К 12. Този образец беше използван, като алтернативен контролен експеримент, защото маркираните с бодипи клетки бяха закупени, като търговски продукт. На конвенционалната трансмисионно-електронна снимка (Фиг. 24 А) клетките са показани в техните естествени размери и форми.



Фигура 24. Електронно микроскопски анализ и електронно спектроскопско картографиране на елементното разпределение на бор в изсушени *E. coli*, K-12 клетки. (А) TEM микрографско изображение на цели клетки, (Б) електронно спектроскопско картиране и разпределение на бор в клетките, чрез филтриране на сигнала получен при $\Delta E = 188$ eV от сигнала на фосфора. Картите съответстват на (В) елементен въглерод, (Г) елементното разпределение на фосфор при енергиен прозорец от 188 eV. След филтриране на въглеродния и фосфорния сигнал техните електронно спектроскопски изображения се появяват, като хомогенен фон на анализираниите клетки. Скалата на изображенията А, Б, В и Г = 1 μ m

След филтриране на сигналите за фосфор и въглерод картографирането на елементното съдържание на бор се появява на микрографската снимка с ясна форма и очертания (както е показано със стрелките на фигура 24Б). Хомогенният фон върху микрографските снимки за въглерод (Фиг. 24В) и фосфор (Фиг. 24Г) подсказват, че съответното съотношение между сигнал и шум е твърде високо. Това доказва, че сигналът получен от елементното разпределение на бор е било извлечено успешно в проведения експеримент.



Фигура 25. Корелативно микроскопско наблюдение и ортогонални изображения, получени чрез светлинен и електронен микроскоп на смес между маркирана *E. coli* с *Vodipy-dUTP* и немаркирани клетки. (А) Светлинно микроскопично изображение, (Б) флуоресцентно микроскопично изображение, (В) TEM снимка на същия образец, и (Г) електронно спектроскопско изображение на смесени клетки. Скала на снимките А, Б, В и Г = 5 μm

В разработения корелативен подход се наблюдава един и същ образец, чрез два различни микроскопа – флуоресцентен и трансмисионен електронен. Получените данни се обединяват и анализират. Във флуоресцентния микроскоп маркираните клетки се изсушават и наблюдават директно върху въглеродния филм. След това същата проба се подлага на TEM наблюдение и анализ. Както е показано на ортогоналните микрографски снимки, смес от маркирани и немаркирани клетки на *E. coli* се наблюдават в светлинен микроскоп (Фиг. 25 А, Б).

ОСНОВНИ ИЗВОДИ

В представените изследвания са разработени въглеродни наночастици, като сензори за анализ и мониторинг на тежки метали, както в замърсени природни обекти, така и акумулирани в микроорганизми. Изводите и заключенията са обобщени, както следва:

1. Представените експериментални данни подкрепят хипотезата, че супер парамагнитните наночастици от рода $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C-dots}$ ядро-обвивка могат едновременно да извличат и определят концентрацията на разтворени ураниеви йони в киселинно-руднични отпадни води.
2. Високата способност на отстраняване, ниската граница на откриване, както и селективността на $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C-dots}$ наночастици ги прави приложими и екологично съвместими наносензори и наносорбенти за мониторинг на уран в замърсени природни обекти.
3. Регенерацията на наночастиците, ниската им цена на получаване, както и възможностите им за многократно използване им дава възможност също и за практическо приложение в пречиствателни съоръжения за третиране и ремедиация на замърсени минни води.
4. Сяра-съдържащите модифицирани въглеродни квантови точки притежават висока синя луминисценция и висок квантов добив. Благодарение на съдържанието им на сяра по повърхността наночастиците взаимодействат селективно с разтворения калций в природни води.
5. Получените резултати потвърждават сензорната способност на сяра-съдържащи въглеродни квантови точки за мониторинг на ниски концентрации на разтворен калций в минерална питейна вода.
6. Получена е линейна корелационна зависимост между концентрацията на калциевите йони и загасването на флуоресценция на сяра-съдържащите въглеродни квантови точки.
7. Разработения сензорен подход притежава предимства, като бързо откриване, добра възпроизводимост, висока селективност и ниска цена на изпълнение. Методът има и потенциално приложение за определяне на калциеви йони в биологични проби, чрез флуоресцентни микроскопични техники.
8. Въглеродните квантови точки могат да се използват, като биосензори за детекция на тежки метали (например желязо) в едноклетъчни водорасли, използвани като биоиндикаторни организми. Чрез този метод се измерва пряко микробиологичната акумулация на желязо в повърхностни природни води. В проведените експерименти са използвани растителни тютюневи клетки TobaccoBY-2 за които е известно, че поглъщат хранителни вещества от заобикалящата ги среда, чрез ендоцитоза. Най-високите концентрационни стойности са измерени в областта около клетъчното ядро (2.5 mg/ml). Чрез атомно-силов микроскоп и динамично светлоразсейване е измерена средната големина на наночастиците (~ 2 nm). Тази големина позволява на наночастиците да преминават през някои вътреклетъчни органели, като например клетъчното ядро. Други клетъчни органели,

като митохондриите са непроницаеми за въглеродните квантови точки. По този начин те не оказват токсично въздействие върху клетките.

9. Концентрацията на желязо в индивидуални еукариотни клетки може да бъде определена, чрез корелация на получените флуоресцентни изображения и техните диаграмни участъци на флуоресцентния интензитет (хоризонтален плот), измерен чрез подходящ софтуер (ImageJ). Благодарение на тази калибровъчна зависимост е възможно също да се определи количеството на наночастици във вътрешността на еукариотните клетки. Установено е че разпределението на наночастиците по концентрация във вътрешността на клетката е различна при отделните клетъчни органели.
10. Въглеродните квантови точки могат с успех да се използват и като нано-гасители в т. нар. ДНК микрочипове. Различни видове ДНК фрагменти могат да бъдат откривани, чрез този метод известен, като хибридизация.
11. Линейния динамичен интервал на откриване на ДНК микрочиповете е между 0.45 и 500 pM.
12. Бор-съдържащи въглеродни наночастици са подходящи маркери в корелативната (светлинната и електронна) микроскопия за проследяване на единични биомолекули в клетки и тъкани.
13. Чрез този подход може да се изучават физиологични промени в биоиндикаторните микроорганизми, породени от различни дразнители в природата.

НАУЧНО ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. Разработени са въглеродни квантови точки, като наносензори за мониторинг и извличане на неорганични замърсители в природата. Чрез тях може да се определя концентрацията на анализа, както в природни води, така и тяхната акумулация в прилежащите към тях биоиндикаторни едноклетъчни микроорганизми.
2. Чрез химична модификация на повърхностните органични групи на въглеродните наночастици е разработен наносензор за лесно и ефективно определяне на твърдостта на водата.
3. Чрез включване на подходящи елементи (бор) в химичния състав на наносензорите могат да се проследяват единични биомолекули и анализи в биоиндикаторни едноклетъчни организми, чрез корелационен микроскопски подход.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ КЪМ ДИСЕРТАЦИЯТА

PolinaMladenova, Alexandre Loukanov, Anatoly Angelov, Carbon nanodots coated with oligonucleotides as fluorescent hybridization probes for DNA microarray. Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski" (2017). 60: 143 – 147. ISSN: 1312-1820

▪ **PolinaMladenova, Alexandre Loukanov, Anatoly Angelov**, Highly-luminescent carbon nanoparticles as sensors for monitoring of heavy metals. Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski" (2016). 59: 152–155. ISSN: 1312-1820

▪ Alexandre Loukanov, **PolinaMladenova**, HibikiUdono, ZsomborMiskolzy, Anatoly Angelov, Laszlo Biczok, Seiichiro Nakabayashi, Sulfur doped fluorescent carbon dots as nanosensors for rapid and sensitive monitoring of calcium in hard water, Journal of Chemical Technology and Metallurgy (2018). Under Review, **Impact Factor: 0.061**

▪ Alexandre Loukanov, **PolinaMladenova**, SvetlinToshev, HibikiUdono, Seiichiro Nakabayashi, Visualization of the native shape of bodipy-labeled DNA in Escherihia coli by correlative microscopy, Microscopy Research and Technique (2017). 80: In press. ISSN: 1097-0029, **Impact Factor: 1.593**

▪ Alexandre Loukanov, HibikiUdono, Ryo Takakura, **PolinaMladenova**, Naritaka Kobayashi, Ryuzo Kawamura, Seiichiro Nakabayashi, Monitoring and extraction of uranium in polluted acid mine drainage by super-paramagnetic nanoparticles coated with carbon nanodots. J RadioanalNuckChem (2017). 314: 1149–1159. **Impact Factor: 1.282**

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Международна научна сесия в МГУ "Св. Иван Рилски", 2016
2. Международна научна сесия в МГУ "Св. Иван Рилски", 2017

УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ

1. Project № DDVU 02/36-20.12.2010. Title: "Purification of wastewaters from textile industry by nanostructured oxides and biotechnologies.
2. Project № BG051PO001-3.3.05-0001. Title: "Development of microbial fuel cell for xenobiotic transformation from wastewater by introducing catalytic nanomaterials".

3. Project № GPF 167-07.06.2013, Funded by University of Mining and Geology. Title: "Development of method for nanostructured electrodes fabrication for microbial fuel cell".

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята благодарност на научния си ръководител доц. дн Александър Луканов за оказаната подкрепа, насърчаване и помощ през целия период на изготвяне на настоящия дисертационен труд.