

УДК 604.6+546.26-03

О.М. Бурлака, Я.В. Пірко, А.І. Ємець, Я.Б. БлюмІнститут харчової біотехнології та геноміки НАН України
м. Київ, вул. Осиповського, 2а, Україна, 04123

ВУГЛЕЦЕВІ НАНОТРУБКИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЇХ ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

***Ключові слова:** вуглецеві нанотрубки, генетична трансформація рослин*

Охарактеризовано властивості вуглецевих нанотрубок як перспективного для застосування у біотехнології класу наноматеріалів. Обговорюється питання функціоналізації вуглецевих нанотрубок для підвищення біологічної сумісності їх. Висвітлено переваги застосування вуглецевих нанотрубок для розроблення нових систем генетичної трансформації рослин та пов'язані із цим проблеми. Описано методику отримання диспергованих у воді комплексів ДНК з багатошаровими вуглецевими нанотрубками.

Протягом останнього десятиліття значно зріс інтерес до нових наноматеріалів та практичного застосування їх. Це зумовлено, з одного боку, технологічними досягненнями, що нарешті дали змогу теоретично та практично освоїти нанорівень, а з іншого – надзвичайно великими можливостями, які відкриває використання наноматеріалів. Оскільки нанотехнологія розробляє, отримує та вивчає нанорозмірні структури на рівні атомів, молекул чи макромолекул, біологічні системи відповідного масштабу активно включаються у нанотехнологічні розробки в таких галузях, як біомедицина та біотехнологія; в такому разі вона ідентифікується вже як нанобіотехнологія [1]. Нині інтенсивно розробляються методики використання наноматеріалів для адресної доставки лікарських засобів при лікуванні онкологічних та інших захворювань, а також для доставки різних біомолекул, зокрема ДНК, у живі клітини. Ведуться дослідження в напрямі створення біосенсорів і конструювання тканин. Важливу роль у розвитку нанобіотехнології з огляду на низку виняткових властивостей відіграють вуглецеві наноматеріали – фулерени й нанотрубки [2–6].

Характеристика вуглецевих нанотрубок

Уперше дані про вуглецеві нанотрубки (ВНТ) було опубліковано в 1991 р. [7]. Згодом було встановлено, що ВНТ властиві високі твердість, електро- й теплопровідність. Саме тому донедавна їх використовували здебільшого як каталізatori, для поглинання й екранування електромагнітних хвиль, перетворення енергії, в анодах літійових батарей, для зберігання водню, створення композитних матеріалів, датчиків, суперконденсаторів тощо. Проведення численних досліджень допомогло накопичити значний масив даних сто-

совно будови та властивостей цих наноматеріалів, що створило підґрунтя для розроблення методик застосування їх також у медицині та біотехнології [8].

Класифікація ВНТ базується на кількості їхніх шарів (стінок). Загалом ВНТ можуть містити до кількох сотень згорнутих у безшовну трубку шарів, де атоми вуглецю формують гексагональну решітку. У структурі ВНТ виокремлюють дві зони: власне трубку з гексагональним розміщенням атомів вуглецю та кепа (кінчики). Кепа складаються з п'яти- й шестичленних циклів, утворених атомами вуглецю, подібно до півсфери молекули фулерену [9]. Відповідно до цього ВНТ класифікуються як багатошарові вуглецеві нанотрубки (БШВНТ, англ. multi-walled carbon nanotubes – MWNTs) та одношарові вуглецеві нанотрубки (ОШВНТ, англ. single-walled carbon nanotubes – SWNTs) [10]. БШВНТ складаються з кількох коаксіальних циліндрів, кожен із яких являє собою згорнутий одинарний шар графену. Для отримання їх використовують дуговий заряд [11] або хімічне осадження з парової фази [12] за присутності каталізаторів. Зовнішній діаметр БШВНТ варіює від 2 до 100 нм, тоді як внутрішній діаметр у середньому становить 1–3 нм. Довжина БШВНТ може коливатися в межах від одного до кількох мікрометрів [13]. ОШВНТ складаються з одинарного графенового циліндра, а їхній діаметр становить 0,4–2 нм [14]. ОШВНТ за рахунок сил Ван-дер-Ваальса зазвичай утворюють гексагональні щільно впаковані пучки. ОШВНТ отримують за допомогою дугового заряду [15], лазерної абляції [16], хімічного осадження з парової фази [18] та газозфазних каталітичних процесів [19]. Синтез їх також потребує присутності металу-каталізатора (Fe, Ni, Co, Y, Mo). Залежно від того, яким чином двовимірна молекула графену згорнута стосовно її гексагональної решітки, ОШВНТ поділяють на три типи, які різняться за будовою та фізико-хімічними властивостями, – armchair, zig-zag і хіральні [19–21].

Варто зазначити, що описані методи одержання ВНТ досить витратні економічно. Так, дуговий розряд і лазерна абляція потребують великої кількості енергії для просторової реор-

ганізації взаємного розміщення атомів вуглецю [22], а каталізоване хімічне осадження з парової фази – для розщеплення низькомолекулярних газоподібних вуглеводнів [23]. Тому триває пошук альтернативних, менш витратних енергетично методів отримання ВНТ. Так, розроблено методи синтезу ВНТ з відновлюваних ресурсів – рослинних волокон (зокрема деревини *Pinus ponderosa*, сухого бамбука, органорозчинного лігніну, беззольного фільтрувального паперу, α -целюлози й мікрокристалічної целюлози) з використанням циклічного окиснення, що потребує менших витрат енергії та, відповідно, коштів [24].

Перед безпосереднім використанням ВНТ треба очистити, оскільки вони містять залишки металу-каталізатора й аморфного вуглецю. Тому розроблено спеціальні методи очищення ВНТ, що передбачають такі етапи: газо- чи парозфазне окиснення, вологе хімічне окиснення, центрифугування, фільтрацію, хроматографію тощо [25, 26]. Для оцінки якості ВНТ застосовують спектроскопію Рамана, спектроскопію близького інфрачервоного діапазону, термогравіметричний аналіз і комбінації цих аналітичних методів [27–29].

Функціоналізація ВНТ

Поверхня ВНТ має чітко виражені гідрофобні властивості. З огляду на це для біологічного застосування їх функціоналізують із метою одержання водних систем диспергованих ВНТ, а також підвищення біодоступності та зниження токсичності [30, 31]. Більше того, варто зазначити, що загалом ВНТ погано диспергуються у більшості розчинників. Сильна вандервальсова взаємодія між окремими ВНТ призводить до агрегації їх у рідкому середовищі [32]. Процес функціоналізації полягає у зміні поверхневих властивостей нанотрубок шляхом приєднання певних хімічних груп чи молекул. Ці агенти змінюють гідрофобні властивості стінок ВНТ на характерні для приєднаних молекул. Використовують поверхневу функціоналізацію ВНТ двох типів – ковалентну й нековалентну. Хімічні реакції утворення зв'язків із бічними

стінками ВНТ застосовують для ковалентної функціоналізації. Натомість нековалентна функціоналізація передбачає використання взаємодії між гідрофобними доменами амфифільних молекул та поверхнею ВНТ. При цьому відбувається супрамолекулярна адсорбція чи обгортання ВНТ різними функціональними молекулами. У такий спосіб одержують водні системи ВНТ. Хімічна функціоналізація надає ВНТ здатності взаємодіяти з певними сполуками, а також диспергуватися в різних середовищах з утворенням колоїдних розчинів. При цьому доцільно вживати термін «колоїдний», оскільки саме він характеризує дисперговані в рідкій фазі частинки, хоча б один із вимірів яких коливається в межах від кількох до тисячі нанометрів, а в істинних розчинах дисперговані молекули або іони утворюють комплекси розміром до кількох нанометрів. Водні системи ВНТ можуть мати різну стабільність. Це можна пояснити схильністю частинок у колоїдних розчинах поступово агрегувати й осідати [33]. Реактивність ВНТ пов'язано з розбіжністю π -орбіталей суміжних атомів карбону внаслідок деформації, індукованої просторовим викривленням [34]. Таку деформацію більше виражено в атомів вуглецю, розміщених на кепках, оскільки в цих зонах викривлення відбувається у двох площинах. Тому кепки ВНТ є більш реакційноздатними, аніж бічні стінки.

Ковалентна функціоналізація. Серед реакцій, що використовуються для ковалентної функціоналізації ВНТ, найчастіше застосовують окиснення азотною та сірчаною кислотою. При цьому дія потужних окисників спричиняє розрив ароматичних кілець на кепках і дефектах бічних стінок ВНТ та генерує виникнення карбоксильних груп, які можуть брати участь у дальших хімічних реакціях. Розрив ароматичних кілець на кепках унаслідок дії сильних окисників призводить до утворення так званих відкритих кінців ВНТ [35]. Хоча окиснені ВНТ здатні диспергуватися у воді, вони утворюють агрегати у присутності солей, оскільки відбувається екранування заряду. Тому такі ВНТ не можна безпосередньо використовувати у біологічних розробках через високий вміст солей у більшості біологічних розчинів. Подальша модифікація

ВНТ часто полягає у приєднанні гідрофільних полімерів, зокрема поліетиленгліколю (ПЕГ), до окиснених ВНТ. Це дає змогу отримати стабільні у біологічних середовищах кон'югати ВНТ–полімер [36, 37]. Так, ковалентне приєднання полі(*m*-амінобензолсульфонової) кислоти до ОШВНТ дає змогу одержати здатний диспергуватися у воді кополімер, який можна використовувати у біологічних дослідженнях [38].

Інший тип реакцій, які застосовують для ковалентної функціоналізації ВНТ, – циклоприєднання. Ця реакція здійснюється на ароматичних бічних стінках ВНТ, на відміну від окиснення, яке відбувається на кепках і дефектах бічних стінок. Циклоприєднання може відбуватися за рахунок фотохімічних реакцій ВНТ з азидами [39] чи карбен-генерувальними компонентами [40]. Окрім того, для ковалентної функціоналізації ВНТ використовують зв'язування доголандцогових вуглеводнів із відкритими кінцями ОШВНТ [41], приєднання амідних груп та етерифікацію окиснених ОШВНТ [42]. Застосовують також обробку такими високоактивними агентами, як карбени [43], фтор [44], арильні радикали [45] й азометинові іліди [46] тощо. Варто зазначити, що часто при ковалентній функціоналізації такі специфічні властивості ВНТ, як фотолюмінесценція та раманівське розсіювання, здебільшого втрачаються через порушення структури π -мережі ВНТ. Це внеможливує застосування оптичних методів аналізу щодо таких матеріалів [34].

Нековалентна функціоналізація ВНТ. Нековалентна функціоналізація ВНТ ґрунтується на використанні сил Ван-дер-Ваальса та π - π -взаємодій. Вона здійснюється за рахунок адсорбції чи згортання навколо поверхні ВНТ амфифільних молекул сурфактанту, ароматичних сполук, полімерів або біомолекул [32]. У такому разі структура π -мережі ВНТ не порушується. Відбувається лише вкорочення ВНТ внаслідок обробки ультразвуком, яку часто застосовують у процесі функціоналізації. При цьому за умов нековалентного приєднання функціональних сполук фізичні властивості ВНТ здебільшого зберігаються. Поліароматичні графенові поверхні ВНТ здатні зв'язувати ароматичні молекули за

рахунок π - π -стекінг-взаємодії. З огляду на здатність пірену вступати у π - π -взаємодію з поверхнею ВНТ похідні пірену використовують для нековалентної функціоналізації ВНТ [47, 48]. За аналогічним принципом застосовують інші ароматичні молекули, зокрема похідні порфірину [49]. Молекули сукцинімідолового ефіру 1-піренбутаноєвої кислоти нековалентно адсорбуються на гідрофобній поверхні ОШВНТ внаслідок π - π -стекінгу. Адсорбція їх на ВНТ уможливорює дальше приєднання білків за рахунок нуклеофільних реакцій заміщення сукцинімідилу аміногрупою білка [47]. Інше дослідження показало, що кон'юговані з ПЕГ молекули ФІПЦ (ізотіоціанату флуоресцеїну) своїми ароматичними доменами вступають у π - π -стекінг-взаємодію з поверхнею ВНТ. Унаслідок цього утворюються флуоресцентні комплекси, спроможні диспергуватися у водних середовищах і придатні для використання у біологічній детекції та візуалізації [50].

Амфільні речовини також можна застосувати для диспергування ВНТ у воді. Гідрофобні домени цих речовин взаємодіють із поверхнею ВНТ внаслідок дії сил Ван-дер-Ваальса та гідрофобних ефектів, у той час як полярні ділянки молекул забезпечують здатність диспергуватися у воді [51]. Використовують такі сурфактанти, як додецилсульфат натрію, бромід цетилтриметиламонію, «Тритон», «Твін» та «Плюронік» (pluronic triblock copolymer) [52]. Покриття на основі цих амфільних речовин з відносно високою критичною концентрацією міцел зазвичай є нестабільними без присутності надлишку молекул сурфактанту в розчині. Значні ж концентрації сурфактанту спричиняють руйнування клітинних мембран і денатурацію білків. Це перешкоджає використанню їх у біологічних об'єктах.

Загалом варто зазначити, що для оптимального нековалентного функціоналізованого покриття ВНТ в разі біологічного застосування має бути дотримано таких вимог:

- біологічна сумісність та нетоксичність функціоналізованих молекул;
- наявність у функціоналізованих агентах функціональних груп, здатних до біокон'

югації з молекулами, які беруть участь у комплексоутворенні;

- стабільність покриття й стійкість щодо від'єднання біомолекул від поверхні ВНТ у біологічних розчинах, які часто містять високі концентрації солей та білків. Це означає, що амфільні поверхневі молекули повинні мати дуже низьку критичну концентрацію міцел, щоб покриття ВНТ залишалось стабільним після видалення надлишку цих молекул [34].

З іншого боку, розглядаючи поведінку ВНТ у природних системах, зумовлену можливістю виникнення специфічних поверхневих взаємодій, варто зауважити таке. Проведені дослідження [53] дають підстави припускати, що вихідну гідрофобність ВНТ у природному середовищі, найімовірніше, можна усунути за рахунок взаємодії ВНТ з природними органічними речовинами, які є гетерогенною сумішшю рослинних і тваринних решток [54]. Спонтанно функціоналізовані таким чином мобільні наноматеріали, вочевидь, можуть брати участь у різноманітних процесах у навколишньому середовищі та в живих організмах.

Взаємодія ВНТ з ДНК та біомакромолекулами

Поряд із класичними підходами до функціоналізації ВНТ розроблено методики на основі приєднання біомолекул. Є повідомлення про використання одностанцюгових молекул ДНК для диспергування ОШВНТ у воді завдяки утворенню комплексів ОШВНТ з ДНК [55, 56]. Також розроблено метод функціоналізації окиснених ОШВНТ шляхом приєднання модифікованих додаванням кінцевих аміногруп молекул ДНК. Цей метод дає змогу отримати ОШВНТ-ДНК-комплекси, здатні до диспергування у воді [57]. Описано спосіб отримання водно-диспергованих комплексів ОШВНТ-ДНК за допомогою обробки водної суміші цих двох компонентів ультразвуком [58]. Механізм процесу зв'язування ВНТ з ДНК пояснюють π - π -стекінг-взаємодією між азотистими основами ДНК та бічними стінками ОШВНТ. Це спричиняє спіральне обгортан-

ня ДНК навколо нанотрубок таким чином, що гідрофільні цукро-фосфатні групи виявляються оберненими в бік розчину. Установлено, що молекули ДНК на поверхні ОШВНТ можуть розщеплюватися нуклеазами. Це дає підстави припускати, що функціоналізація ОШВНТ за допомогою ДНК може бути нестабільною в біологічних середовищах, які містять нуклеази [59]. Проте інші дослідження, пов'язані з вивченням можливості створення ДНК-зондів на основі ВНТ, свідчать про протилежне. Вони доводять, що зв'язування цільової одноланцюгової ДНК підвищує її стійкість щодо розщеплення нуклеазами та ефективність доставки у клітину порівняно з ДНК, не зв'язаною з ВНТ [60].

З огляду на здатність одноланцюгової та дволанцюгової ДНК нековалентно приєднуватися до поверхні ВНТ [5, 61, 62] детально вивчається можливість використання такої взаємодії для застосування у біотехнології. Розроблено методи необоротного та оборотного сполучення ДНК з ВНТ залежно від мети застосування отриманих комплексів [63]. Так, для іммобілізації ДНК на ВНТ з метою створення ДНК-зондів та інших наноконструкцій на основі ВНТ застосовують точкове ковалентне зв'язування. Використання іммобілізованих олігонуклеотидів ґрунтується на здатності їх до гібридизації з комплементарними послідовностями ДНК у зразку [64]. Створено методи ковалентної функціоналізації БШВНТ нуклеотидами ДНК [65]. Є дані про одержання ОШВНТ–ДНК-комплексів унаслідок карбодіімід-опосередкованого приєднання функціоналізованих олігонуклеотидів до окиснених ОШВНТ [66]. Можна зв'язувати ДНК через кінцеві аміногрупи з карбоксильними групами ВНТ, використовуючи реакції амідування. Також ДНК може ковалентно приєднатися до ВНТ, на яких генеровано термінальні аміногрупи [67].

Зазначеною здатністю ВНТ утворювати комплекси з дволанцюговою плазмідною ДНК можна скористатися при створенні переносників на основі ВНТ для доставки генів у клітину [5]. Є повідомлення про те, що дестабілізація ДНК та її конформаційні зміни, індуковані взаємодією з ОШВНТ, залежать від типу олігонуклеотидів

у полінуклеотидному ланцюзі. Наприклад, короткі олігонуклеотиди, які мають повторювані послідовності гуаніну й тиміну $((dGdT)_n$, де $n = 10-45$), можуть у вигляді спіралі обгортатися навколо ВНТ. Афінність азотистих основ до поверхні ВНТ зростає в такому порядку: цитозин < тимін < аденін < гуанін [68, 69].

Нековалентна модифікація ВНТ біомолекулами

Окрім здатності використовувати безпосереднє зв'язування ДНК з поверхнею ВНТ для транспортування ДНК у клітину, також активно вивчають можливість попередньої функціоналізації ВНТ. Вона передбачає приєднання до ВНТ певних біомолекул із бажаними властивостями, після чого за рахунок міжмолекулярних взаємодій з утвореними комплексами нековалентно зв'язується ДНК.

Важливий клас біомолекул із високою афінністю щодо бічних стінок ВНТ становлять білки. Можна сказати, що це природні поліамфоліти, які містять гідрофільні та гідрофобні домени. Їхня гідрофобність залежить від послідовності амінокислот у поліпептидному ланцюзі та від рН середовища. У ряді досліджень повідомлено про опосередковане обробкою ультразвуком роз'єднання агломератів ВНТ й диспергування гібридів ВНТ з білком у водних середовищах. Серед білків, що використовують для цього, – лізоцим [70], бичачий сироватковий альбумін [71, 72], гідрофобіни та синтетичні олігопептиди. Поміж останніх – оборотно-циклічні пептиди [73], пептиди на основі фенілаланіну [74], амфільні спіралеподібні пептиди [75, 76], пептиди на основі цистеїну [77], кремній-преципітувальні [78] та порфіринові пептиди [79]. Вивчення механізму, за допомогою якого обробка ультразвуком призводить до диспергування ВНТ у водних розчинах білків, показало, що адсорбовані на поверхні бічних стінок ВНТ молекули білку перебувають у частково розгорнутому стані порівняно з їхньою нативною структурою [71, 72]. Отже, процес диспергування ВНТ за допомогою водорозчинних білків пов'язано з розгортанням молекул білка внаслідок теплової

денатурації та подальшим оборотним згортанням. У розчинах папаїну й пепсину ВНТ не диспергувалися. Очевидно, це зумовлено незначною кількістю гідрофобних доменів та недостатнім просторовим розгортанням молекул. У випадку ж використання лізоциму та бичачого сироваткового альбуміну обробка ультразвуком дала змогу одержати водні системи диспергованих за допомогою цих білків ВНТ.

Інший клас біомолекул, здатних взаємодіяти з поверхнею ВНТ, – полісахариди. Є повідомлення про спроможність похідних хітозану кон'югувати з ВНТ з утворенням стабільних гібридів, які ефективно диспергуються у водних середовищах [80, 81]. Виявлено також, що альгінова кислота може ефективно диспергувати БШВНТ у воді, причому після додавання іонів лужноземельних та важких металів і лантанодів обгорнуті альгіновою кислотою ВНТ преципітують. У роботі [82] описано диспергування ОШВНТ у воді за допомогою гіалуронової кислоти. Розроблено методику нековалентної функціоналізації ОШВНТ пегільованими фосфоліпідами [36, 83]. Оскільки фосфоліпіди є основним компонентом клітинних мембран, вони безпечні щодо застосування у біологічних системах. Вуглеводневі ланцюги фосфоліпідів міцно «якоряться» на поверхні ВНТ, а гідрофільні ланцюги ПЕГ витягуються у водній фазі, забезпечуючи розчинність у воді та біологічну сумісність оброблених ВНТ. Суспендовані таким чином ОШВНТ стабільні в різних біологічних розчинах. Останні роботи стосовно дослідження можливостей використання похідних фосфоліпідів для функціоналізації ВНТ свідчать, що лізогліцерофосфоліпіди (фосфоліпіди з одним «хвостиком») із термінально приєднаними короткими залишками триметиламонію забезпечують безпрецедентну здатність ОШВНТ диспергуватися у воді, тоді як «двоххвостикові» гліцерофосфоліпіди демонструють набагато нижчу ефективність диспергування ОШВНТ [84, 85]. Паралельно було розроблено аналогічний метод модифікації поверхні коротких (завдовжки близько 200 нм) ОШВНТ за допомогою більш полярних «двоххвостикових» фосфоліпідів із термінально приєднаними молекулами ПЕГ чи декстрану [83,

86]. Модифіковані таким чином ВНТ було використано для опосередкованого ендоцитозом транспорту біомолекул у клітини. Ці та інші підходи до біологічної функціоналізації нанотрубок застосовують при розробленні методів селективної деструкції клітин пухлин за допомогою опромінення хвилями близького інфрачервоного спектра [83], транспорту РНК при генній терапії [87], розпізнавання пухлинних клітин [88], адресної доставки медикаментів [89] та флуоресцентного мічення поверхневих клітинних рецепторів і візуалізації клітин [90]. Окрім того, їх може бути використано при розробленні методів генетичної трансформації клітин за допомогою ВНТ.

Обґрунтованість використання ВНТ для розроблення новітніх методів генетичної трансформації рослин

Найпоширенішими нині методами генетичної трансформації рослин є агробактеріальна трансформація з використанням *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*, біобалістична трансформація, а також електропорація, мікроін'єкція та деякі інші. Але використання будь-якого з зазначених методів пов'язано з певними обмеженнями. Це спонукає до розроблення нових методів трансформації, зокрема таких, що базуються на застосуванні наноматеріалів, а саме ВНТ [4, 52, 91, 92]. Таким чином створюється сприятливе підґрунтя для формування ефективної системи генетичної трансформації за допомогою ВНТ, що пояснюється низкою особливих властивостей цих структур. Про ці властивості вже було згадано: це нанорозмір при великій площі поверхні, до якої можна приєднувати цільові молекули (наприклад, ОШВНТ теоретично можуть мати площу поверхні до 1300 м²/г) [93, 94]; здатність проходити крізь мембрану клітин та клітинну стінку рослин [95]; спроможність нековалентно взаємодіяти з ДНК й за рахунок π - π -стекинг-взаємодій зв'язувати її та транспортувати в клітину [3, 5, 62].

Постійно поповнюються дані про адаптацію ВНТ для різних сфер застосування в наукових дослідженнях за рахунок зміни поверхневих влас-

тивостей цих наноструктур. Накопичено масив знань щодо перспектив, можливостей та шляхів використання їх у біотехнологічних розробках. Отримано результати, які експериментально підтверджують та об'рунтовують використання ВНТ у біотехнології, зокрема в генетичній інженерії.

Вплив ВНТ на живі організми. Нині провадяться інтенсивні дослідження впливу ВНТ на фізіологічні процеси в живих клітинах, переважно тварин і людини, та оцінюються токсичність і ризик використання їх. Установлено, що нефункціоналізовані ВНТ можуть бути токсичними для клітин. Тому тривають дослідження, спрямовані на визначення умов, що впливають на прояв та вираженість токсичних ефектів унаслідок дії ВНТ на клітини різних організмів. Є відомості про те, що ОШВНТ пригнічують ріст клітин НЕК 293 (human embryonic kidney cells) [96] і фібробластів людини в культурі [97], а також спричинюють апоптоз ембріональних стовбурових клітин [98]. Існує припущення, що такі зміни пов'язано з виникненням оксидативного стресу, перекисним окисненням ліпідів плазматичних мембран із подальшим руйнуванням їх [96, 97, 98]. БШВНТ здатні також виявляти цитотоксичність та генотоксичність і призводити до апоптозу фібробластів людини [99, 100] й Т-лімфоцитів [101]. Деякі дослідження об'рунтовують подібність реалізації механізмів токсичності ВНТ й азбесту [102], в той час як інші, підтверджуючи негативний вплив ВНТ на клітини легень, підкреслюють відмінності токсичного впливу цих матеріалів [103]. Низка досліджень говорить про той факт, що функціоналізовані ВНТ, здатні диспергуватися у воді, мають меншу цитотоксичність або ж є цілком нетоксичними [30, 104, 105]. Так, установлено, що пегільовані ОШВНТ майже повністю виводяться з основних органів мишей протягом двох місяців за відсутності істотних проявів токсичності [106]. Результати інших досліджень виявили біодефункціоналізацію пегільованих ОШВНТ у печінці мишей протягом місяця після введення їх [107], що спонукає до детального вивчення всіх факторів, які впливають на поведінку ВНТ у живому організмі. Ці та інші дослі-

дження свідчать про дозо- та часозалежний характер впливу ВНТ на живі клітини. Також велику роль у реалізації того чи іншого ефекту як реакції на введення ВНТ відіграють поверхневі характеристики ВНТ, умови інкубації та ендогенні процеси в клітинах організму. Загалом функціоналізація поверхні ВНТ надає їм здатності включатися в метаболічні процеси в організмі та елімінуватися, тоді як інертна поверхня нефункціоналізованих ВНТ, вочевидь, ускладнює цей процес. З іншого боку, функціоналізовані ВНТ, ймовірно, більш метаболічно активні, й непередбачуваність цієї активності створює додатковий ризик, натомість нефункціоналізовані ВНТ можуть реалізувати негативний вплив на клітини через фізичні ушкодження. Також треба враховувати афінність багатьох біомолекул до поверхні ВНТ й здатність чистих ВНТ модифікуватися приєднанням цих молекул у біологічних середовищах.

Варто зазначити, що, порівняно з відомостями стосовно тварин, є не надто багато даних про вплив наноматеріалів, а саме ВНТ, на рослини [108]. Було виявлено як позитивний, так і негативний вплив різних наночастинок на життєдіяльність рослин на різних етапах їхнього розвитку [109, 110]. Тому триває дослідження механізмів поглинання, транслокації, накопичення та передавання наноматеріалів у рослинних клітинах і тканинах, а також впливу на репродукцію рослин [111, 112]. Зокрема повідомляють, що рослини рису, інкубовані із суспензією БШВНТ, функціоналізованих за рахунок приєднання природних органічних речовин, зацвітали на місяць пізніше, ніж контрольні, а рівень продукції насіння падав на 10,5%, зменшувалася й середня вага насінин [53]. Автори висловлюють припущення, що високі концентрації БШВНТ можуть блокувати нормальну діяльність коренів рослин на рівні кореневих волосків, на поверхні яких адсорбуються нанотрубки.

Результати дослідження впливу ОШВНТ на протопласти клітин листя арабідопсису й рису за допомогою методу EM-TUNEL (electron-microscopic terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) свідчать про те,

що ОШВНТ індукують оборотну клітинну відповідь, зокрема агрегацію клітин, конденсацію хроматину з TUNEL-позитивною реакцією, зміщення плазматичної мембрани та накопичення H_2O_2 [113]. Рівень виживання клітин був дозозалежним; так, концентрація ВНТ 25 мкг/мл спричиняла загибель 25% клітин протягом 6 год, тоді як активоване вугілля, яке не належить до групи наноматеріалів, не індукувало загибель навіть через 24 год. Ці дані свідчать про те, що нанорозмір частинок може бути критичним фактором токсичності. Імовірно, ОШВНТ чинять негативний вплив на протопласти, індукуючи оксидативний стрес.

В іншому дослідженні взаємодії високоочищених ОШВНТ із клітинами арабідопсису показано, що мічені ФІТЦ (флуоресцеїнізотіоціанатом) ВНТ проходили крізь клітинну стінку листя мезофілу, їх було виявлено у цитоплазмі, лізосомах, мітохондріях, ядрі, хлоропластах, вакуолях [114]. ОШВНТ у концентрації 50 мкг/мл та вище суттєво впливали на морфологію протопластів мезофілу арабідопсису й мали високу цитотоксичність. Апоптоз виникав у 70% клітин після 48 год інкубації, тимчасом як менші дози стимулювали виживання й розвиток протопластів. Було зафіксовано дозо- та часозалежне накопичення реактивних форм кисню у клітинах. Можна припустити, що ВНТ у мітохондріях порушують енергетичний метаболізм рослинної клітини, у хлоропластах – змінюють проходження фотосинтетичних реакцій, у ядрі – спричинюють розлад його нормального функціонування. Механізми токсичної дії ВНТ загалом пов'язують із генеруванням оксидативного стресу, токсичністю наявних залишків металів-каталізаторів і фізичним ушкодженням – розривом мембран [99, 115].

Водночас є повідомлення, що інкубування насіння томатів із БШВНТ підвищує частоту проростання та прискорює ріст проростків [108]. Звичайне насіння мало показники проростання 32% на 12-й день і 71% на 20-й, тоді як оброблене ВНТ – 74–82% та 90% відповідно. За чотири тижні рослини з експериментальної групи стали вдвічі вищими за контрольні. Вага сирієї вегетативної біомаси рослин, насіння яких пророщува-

ли на середовищі з ВНТ, була в 2,5 раза більшою порівняно з таким самим показником для рослин, що пророщували на звичайному середовищі. Виявлений позитивний вплив ВНТ на ріст і розвиток рослин томатів пов'язують із впливом їх на поглинання вологи насінням. Механізм дії ВНТ при цьому пояснюється створенням нанотрубокми нових пор в оболонці насінини при проникненні крізь неї. Установлено, що через два дні після початку пророщування на середовищі вміст вологи у контрольному насінні становив 38,9%, а в насінні, інкубованому з ВНТ, – 57,6%, у той час як вихідний показник вмісту вологи в обох групах насіння становив 18,4%. Результати спектроскопії Рамана й аналіз за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії говорять про присутність ВНТ всередині насінин, інкубованих із ВНТ. Це свідчить на користь гіпотези про проникнення ВНТ в насінину з формуванням пор у її оболонці. Також припускається, що ВНТ здатні регулювати роботу наявних водних каналів (аквапоринів), оскільки є повідомлення, що активність водних каналів можна модифікувати шляхом стресів різного типу, зокрема високого осмотичного тиску, аноксії, присутності важких металів, зміни рН, засолення тощо [116]. Зустрічаються повідомлення, що ВНТ пригнічують елонгацію коріння в томатів та посилюють елонгацію коріння в цибулі й огірка [117].

Дисперговані у воді ВНТ поліпшували ріст коріння, пагонів, а також галуження рослин нуту (*Cicer arietinum L.*) [112]. Інкубовані з ВНТ рослини відрізнялися від контрольних посиленням поглинанням води, що дало підставу припустити визначальну роль цього чинника для поліпшення росту рослин. Механізм дії в такому разі пояснюють можливим включенням ВНТ через коріння в судинну систему рослин і формування додаткової капілярної системи, яка прискорює надходження ксилемою води та розчинних солей у тканини рослин. Результати цієї роботи ілюструють відсутність проявів токсичності диспергованих у воді ВНТ в рослин і дають підставу вивчати можливості використання наноматеріалів для посилення росту рослин.

Загалом експериментальні дані свідчать про те, що характер впливу наноматеріалів на ріст і

розвиток рослин залежить від типу використаних наночастинок, їхньої концентрації, виду рослини та особливих умов експозиції. Деякі автори також зазначають важливу роль розміру й поверхневих характеристик наночастинок як факторів, що можуть спричинити фітотоксичність [118].

Проникнення ВНТ у клітини. Через особливості будови та специфічні поверхневі властивості ВНТ можуть проникати крізь біологічні бар'єри в клітинах ссавців [119], рослин [95] та мікроорганізмів [120]. Механізм поглинання клітиною ВНТ, а також їхню поведінку в клітині досі детально не вивчено, а одержані під час різних досліджень результати створюють суперечливу картину стосовно розуміння цього питання [121, 122]. Поширеним є той погляд, що ВНТ поглинаються клітинами шляхом клатрин-залежного ендоцитозу [6]. Було показано, що ОШВНТ, вкриті білком чи ДНК, проникають у клітину за рахунок енергетично залежних процесів [122]. Водночас є дані, що ВНТ можуть проникати у клітину енергетично незалежним шляхом, а механізм проникнення визначається поверхневими характеристиками їх [123, 124]. Щодо субклітинної локалізації ВНТ, то одні автори описують входження нанотрубок у клітину без проникнення в ядро [125], тоді як під час інших досліджень було зафіксовано факти оборотного проникнення ОШВНТ в ядро [114, 121, 124]. ВНТ також виявляються у цитоплазмі, ендосомах, лізосомах, вакуолях, мітохондріях, пластидах [114, 121, 126]. Відповідно до однієї з експериментально об'рунтованих моделей (на прикладі епітеліальних клітин нирки людського ембріона), БШВНТ проникають у клітину за рахунок реалізації двох різних механізмів. Поодинокі БШВНТ прямо проходять крізь мембрану клітини, при цьому коротші ВНТ частіше, аніж довгі, проникають крізь плазматичну мембрану. Натомість кластери (пучки) БШВНТ клітина захоплює у процесі ендоцитозу. Пучки ВНТ в ендосомах відокремлюють поодинокі ВНТ, які проходять у цитоплазму крізь мембрану ендосоми. Згодом усі ВНТ в клітині збираються у лізосомах та екскретуються. Підкреслено, що зв'язування з білками біологічних се-

редовищ може суттєво змінювати поверхневі характеристики ВНТ *in vivo* [124].

При дослідженні механізму транслокації ОШВНТ різного діаметра крізь мембрану клітини шляхом спонтанного проколювання (перпендикулярної вставки), індукованого лише тепловим рухом, було обчислено кількість енергії, яка потрібна для вставки ВНТ у модельний фосфоліпідний двошар [127]. Виявилося, що енергія розриву фосфоліпідного двошару набагато вища за енергію теплового руху ВНТ. До того ж проходження крізь мембрану під прямим кутом потребує меншої енергії, аніж під іншим. Спорідненість гідрофобних ВНТ до гідрофобного внутрішнього прошарку мембрани має також гальмувати проникнення ВНТ у клітину й ускладнювати проходження ВНТ крізь мембрани. Такі результати можуть непрямо свідчити на користь того, що проходження ВНТ у клітину відбувається за рахунок енергетично залежних процесів, зокрема ендоцитозу.

Докази опосередкованого ендоцитозом проникнення комплексів ВНТ з біомолекулами у клітини одержано в дослідях на тютюні [95]. Однак результати інших досліджень дали змогу виявити, що мічені ФІТЦ БШВНТ проникають у протопласти барвінку (*Catharanthus roseus L.*) здебільшого за рахунок вставки/дифузії через плазматичну мембрану. Набагато менше ВНТ потрапляють у клітину шляхом ендоцитозу [128]. Незначну роль ендоцитозу в цьому разі було підтверджено завдяки вивченню колокалізації сигналів ФІТЦ та барвника FM4-64, що є маркером ендоцитозу, оскільки включається лише у зовнішній шар клітинної плазматичної мембрани. Зниження температури також підтвердило відсутність зв'язку між інтенсивністю ендоцитозу й інтенсивністю внутрішньоклітинного сигналу від ВНТ–ФІТЦ. Також установлено, що збільшення концентрації ВНТ–ФІТЦ призвело до пригнічення ендоцитозу внаслідок збільшення тоничності середовища. При цьому, ймовірно, агрегати ВНТ у зовнішньому середовищі нездатні проникати у клітину безпосередньо крізь мембрану, тому, залишаючись іззовні, вони підвищують тоничність середовища, що, своєю чергою, інгібує процеси ен-

доцитозу. Натомість окремі ВНТ проходять крізь клітинну мембрану, уникаючи ендоцитозного циклу, накопичуються в цитоплазмі та мігрують в органели. Це створює підґрунтя для використання ВНТ як транспортерів цільових молекул у рослинні клітини, оскільки уникнення ендоцитозного циклу та безпосереднє проникнення в цитоплазму дасть змогу захистити молекулярний «вантаж» ВНТ від дії ферментів. Усередині клітини ВНТ проникали в усі органели, зокрема спостерігалися у пластидах, вакуолях, ядрі. Довші ВНТ виявляли переважно у цитоплазмі, ендоплазматичному ретикулумі, мітохондріях. Короткі ВНТ (менш від 100 нм) краще дифундували крізь клітинну мембрану й тяжіли до накопичення в ядрі, пластидах, вакуолях, що згодом може бути використано для адресної доставки певних молекул до цих структур.

У дослідженні [114] було встановлено, що після проникнення у протопласти арабідопсису ОШВНТ локалізувалися в лізосомах, потім проникали в цитоплазму та ядро. Вивчення інтенсивності флуоресцентного сигналу від ФІТЦ при витримуванні експериментальних зразків у різних температурних режимах також дало змогу дійти висновку про відсутність температурної залежності інтенсивності проникнення у клітини кон'югатів ФІТЦ–ОШВНТ. Це підтверджує припущення про те, що цього разу відбулося енергетично незалежне поглинання ВНТ рослинними клітинами.

Таким чином, питання щодо механізмів проникнення ВНТ у клітини потребує дальшого дослідження. Імовірно, неоднакові умови у клітині та властивості самих комплексів ВНТ–біомолекула призводять до того, що відбуваються різні процеси, внаслідок яких ВНТ виявляються інтерналізовані клітинами.

Генетична трансформація клітин за допомогою ВНТ. Є дані про успішне проведення генетичної трансформації клітин бактерій і тварин із використанням ВНТ. Описано зокрема створення системи доставки плазмід у бактеріальні клітини *Escherichia coli* з використанням функціоналізованих обробкою кислотами ВНТ під дією мікрохвильових імпульсів [129]. Цей підхід розроблено на основі модифікації класич-

ної методики електропорації. Дисперговані у воді комплекси ВНТ з плазмідною ДНК за рахунок електростатичної взаємодії спочатку адсорбуються на поверхні бактеріальних клітин. Далі під впливом мікрохвильового електромагнітного пульсуючого поля відбувається проникнення комплексів до клітин через тимчасові наноканали, що пояснено здатністю функціоналізованих ВНТ слугувати тимчасовими диполями.

Є також повідомлення про успішну трансформацію клітин ссавців за допомогою ВНТ, які були функціоналізовані окисненням і приєднанням аміногруп [130]. До речі, в цьому дослідженні зазначено, що функціоналізовані ВНТ виявляють набагато нижчий рівень цитотоксичності, ніж ряд комерційних трансформувальних агентів. Для зв'язування й транспорту плазмідної ДНК у клітини аденокарциноми альвеолярного базального епітелію людини (лінія А549) було використано ОШВНТ, функціоналізовані приєднанням аміногруп, та БШВНТ, функціоналізовані 1,3-диполярним циклоприєднанням [3, 5]. Із використанням функціоналізованих поліетиленіміном (ПЕІ 600К) окиснених БШВНТ для приєднання та доставки плазмідної ДНК було продемонстровано зіставну зі стандартною ефективність трансформації клітин лінії НЕК 293Т. Окрім того, ці комплекси виявляли нижчу цитотоксичність [131]. Відомо також про успішну доставку малої інтерферувальної РНК (міРНК), яка здатна інгібувати специфічну експресію генів шляхом РНК інтерференції, приєднаної до НТ. Після інкубування клітин із комплексами було зафіксовано сайленсинг відповідного гену [87, 132]. Було також показано, що доставка міРНК за допомогою ОШВНТ для певних типів клітин має більшу ефективність, ніж звичайні методи [133].

Окремими дослідженнями виявлено залежність поглинання клітинами ОШВНТ від типу функціоналізуючого покриття [30]. Порівняно з ОШВНТ, вкритими ПЕГ із молекулярною вагою 5,4 кДа, зразки з молекулярною вагою ПЕГ 2 кДа інтенсивніше поглиналися клітинами. Припускається, що у клітинах відбувається неповне покриття бічних стінок ВНТ і відкриті гідрофобні ділянки НТ впливають на інтерналі-

зацію ВНТ клітиною, взаємодіючи з гідрофобними доменами клітинної мембрани.

Вивчається також можливість вставки молекул ДНК у просвіт ВНТ для транспортування чужинної ДНК у клітину всередині ВНТ. Це може відбуватися за рахунок сил Ван-дер-Ваальса й гідрофобних взаємодій між ДНК і ВНТ. За таких умов ДНК буде захищено від дії нуклеаз та інших факторів, які порушують її функціональність [134].

Доставка цільових молекул у рослинні клітини ускладнюється через наявність щільного зовнішнього бар'єру – клітинної стінки. Це обмежує використання для рослин багатьох методів, прийнятних для ссавців. Порівняно зі звичними методами доставки молекул у рослинні клітини, такими, як біобалістика, електропорація, мікроін'єкція, розробки на основі використання наночастинок повинні мати ряд переваг. Ці переваги полягають у простоті, ефективності, розширеному спектрі речовин, які може бути транспортовано в клітину, тощо. Розроблення методів використання нанотрубок як нанотранспортерів для інтактних клітин рослин має велике практичне й фундаментальне значення не лише для генетичної трансформації, а й для клітинної біології, оскільки ці методи можна застосовувати для внутрішньоклітинного мічення та візуалізації [95]. Зокрема у дослідженні Liu et al. [95] було отримано комплекси ФІТЦ з окисненими ОШВНТ. Після інкубування їх із клітинами суспензійної культури тютюну BY-2 спостерігали інтенсивну внутрішньоклітинну флуоресценцію, пов'язану, на думку авторів, із проникненням цих комплексів у клітини. Механізмом, який опосередковує проникнення комплексів у клітини в цьому разі, вочевидь, є рідкофазний ендодитоз. На користь цього припущення свідчить установлення температурної залежності інтенсивності внутрішньоклітинної флуоресценції. Окрім того, обробка клітин інгібітором ендодитозу вортманіном спричиняла зменшення більш ніж удвічі інтенсивності флуоресцентного сигналу порівняно з необробленими клітинами. В іншій частині експерименту автори роботи [95] за допомогою обробки ультразвуком адсорбували на окиснених ОШВНТ одониткову ДНК, мічену ФІТЦ.

Отримані стабільно дисперговані у воді кон'югати ОШВНТ–ДНК–ФІТЦ також успішно проникли в клітину. Внутрішньоклітинна флуоресценція загалом спостерігалася у більш ніж 80% клітин, інкубованих з ОШВНТ–ДНК, що свідчить про ефективність перенесення молекул ДНК нанотрубками в інтактні клітини рослин. Слід зазначити, що у клітин, інкубованих з ОШВНТ–ФІТЦ, флуоресценція спостерігалася переважно у вакуолях, тоді як у клітин, інкубованих з ОШВНТ–ДНК–ФІТЦ, – у цитоплазмі. У згаданому вище дослідженні не було виявлено токсичності ВНТ для клітин рослин. Вони демонстрували нормальну морфологію, стан цитоплазми та рівень проліферації [95].

У рамках дослідження щодо розроблення системи генетичної трансформації рослинних клітин за допомогою ВНТ нами було проведено ряд експериментів із застосуванням ультразвукової обробки, в результаті яких отримано дисперговані у воді комплекси БШВНТ із плазмідною ДНК у вигляді стабільного колоїдного розчину [135]. Використана в цих експериментах методика концептуально наближена до методики, описаної японськими дослідниками в експериментах з ОШВНТ [58]. Отримані нами результати узгоджуються з результатами, наведеними у згаданому дослідженні, а саме: обробка ультразвуком індукує встановлення нековалентних зв'язків між поверхнею бічних стінок ВНТ і молекулами ДНК. Унаслідок цього утворюються комплекси, в яких азотисті основи ДНК вступають у π - π -стекинг-взаємодію з поверхнею ВНТ, а гідрофільні цукро-фосфатні групи виявляються спрямованими в бік дисперсного середовища – води. Тому ці комплекси набувають здатності диспергуватися у воді. Такий колоїдний розчин розглядають як трансформаційно-активну суміш, що містить цільові послідовності ДНК, адсорбовані на поверхні фізичного носія, яким слугує нанотрубка. Слід зазначити, що такий погляд ураховує здатність обробки ультразвуком лімітувати трансформаційну активність комплексу, оскільки ультразвук руйнує нативну структуру плазмідної ДНК.

Для встановлення ступеня ушкодження плазмідної ДНК методом полімеразної ланцюгової

реакції було використано комплекс БШВНТ – плазмідна ДНК – ген лактоферину із задалегідь підібраними до цього гену праймерами. Детекція специфічних ампліконів у ряді зразків може свідчити про наявність у комплексах або цілої плазмиди, або її частин (уламків), що містять згадану вище цільову послідовність. Окрім того, було одержано колоїдні розчини комплексів БШВНТ із дезоксирибонуклеотидтрифосфатами (дНТФ) унаслідок обробки суміші БШВНТ–дНТФ ультразвуком. Це підтверджує той факт, що взаємодія між ВНТ і ДНК відбувається на рівні структурних мономерів (дезоксирибонуклеотидтрифосфатів) останньої, які й окремо (суміш дНТФ), й у складі ланцюга молекули ДНК певним чином взаємодіють із ВНТ та орієнтуються щодо її поверхні. Розпочато дослідження здатності таких комплексів ДНК–БШВНТ трансформувати культуру клітин рослин із метою з'ясування експериментальних факторів, які впливають на цей процес, а також специфіки взаємодії та локалізації комплексів у рослинній клітині.

Безпечність використання ВНТ у генетичній інженерії

Зрозуміло, питання безпечності наноматеріалів загалом і ВНТ зокрема нерозривно пов'язано із будь-яким використанням доробку нанотехнології. Поглинання, біоаккумуляція, біотрансформація та можливий ризик через застосування наноматеріалів у досліджах на рослинах, у тому числі й на рослинах харчового призначення, й дотепер вивчено недостатньо [136]. Поки що детальніші дослідження в цьому напрямі здійснено з використанням фулеренів C_{70} як представників вуглецевих наноструктур [53, 137]. Обробка рослин водорозчинними фулеренами спричиняла порушення тканинного розподілу фітогормонів, клітинного поділу, організації мікротрубочок і мітохондріальної активності [137]. Окрім того, фулерени виявили здатність передаватися наступним поколінням рослин через насіння [53]. Наявні дані про здатність ВНТ за певних умов здійснювати токсичний вплив на рослинні клітини пояснюються фізичним уш-

кодженням клітини й субклітинних структур, генеруванням оксидативного стресу з подальшим апоптозом [113, 114]. Токсичність ВНТ для клітин рослин залежить від дози ВНТ та часу інкубації. До того ж важливу роль відіграють поверхневі характеристики ВНТ, зокрема тип функціоналізуючого покриття. Цілісне розуміння взаємодії наноматеріалів і рослин є критичним для подолання токсикологічних застережень при застосуванні нанотехнологій у сільському господарстві (у боротьбі з захворюваннями рослин, генетичній інженерії тощо). Тому в цьому напрямі нині розробляють сучасну базу для досліджень, які дають змогу інтегрувати генетичні, раманівські, фототермічні та фотоакустичні методи [138]. Як продемонстровано в зазначеній роботі, такий підхід допомагає здійснити детекцію поодиноких БШВНТ на рівні клітини. Усе це сприяє розробленню ефективніших методик взаємодії ВНТ з рослинними клітинами, зокрема методики генетичної трансформації рослин.

Слід нагадати, що БШВНТ, поглинаючись клітиною шляхом ендоцитозу, накопичуються в ендосомах, звідки вивільнюються в цільові органели (зокрема в ядро), а більша частина їх потрапляє до лізосом та екскретується клітиною [124]. Нещодавно було продемонстровано, що короткі БШВНТ (<100 нм) у рослинних протопластах специфічно спрямовуються до ядра, пластид і вакуолей [128]. Ці результати також мають важливе значення для дальшого розвитку технологій генетичної трансформації. Треба усвідомлювати, що генетична трансформація передбачає інкубування лише окремих рослинних клітин із ВНТ й трансформаційна подія відбувається на рівні окремої клітини. Окремі успішно трансформовані клітини дають початок трансгенним рослинам-регенерантам, із яких далі утворюють лінії рослин, що мають бажану ознаку. У такому разі кількість ВНТ, яка потрапила у трансформовану клітину, є незначною й згодом має цілком елімінуватися у процесі отримання рослин-регенерантів.

Таким чином, генетична інженерія рослин із використанням ВНТ не передбачає масштабної та хронічної експозиції рослин із нанотруб-

ками. З огляду на це немає підстав розглядати можливість міграції ВНТ харчовими ланцюжками в організм тварин і людини з рослин, одержаних унаслідок подібної трансформації. У такому контексті важливим залишається питання зменшення токсичності ВНТ, що має значення для підвищення рівня ефективності трансформації за допомогою їх. Певна річ, в інших випадках, зокрема у розробках, що стосуються можливості використання нанотрубок як факторів посилення проростання насіння, поліпшення росту сільськогосподарських рослин та як агентів доставки специфічних хімічних сполук у рослини, невід'ємним обмежним чинником є визначення долі ВНТ після введення у рослини й можливість потрапляння їх в організм людини чи тварин та в навколишнє середовище.

Висновки

Оскільки роль нанотехнологій у всіх сферах діяльності людини постійно зростає, у сучасній біотехнології дедалі важливішим і вельми перспективним напрямом стає практичне застосування різних наноматеріалів, зокрема ВНТ. З огляду на низку особливих властивостей ВНТ викликають значний інтерес щодо можливості використання їх як фізичних переносників молекул у клітині, зокрема в генетичній інженерії рослин. Сприятливе під'рунтя для розвитку цього напрямку зумовлено також численними дослідженнями в суміжних галузях, де створюється той базис інформації, що становить основу для розроблення методів трансформації рослин із використанням чужорідної ДНК за допомогою ВНТ. Першим етапом використання ВНТ як фізичних векторів для генетичної трансформації рослин є одержання функціоналізованих ВНТ із дотриманням низки вимог біологічної сумісності та ефективності функціоналізованого покриття. Відповідна функціоналізація дає змогу маскувати фактори, здатні обумовлювати цитотоксичність ВНТ. Окрім того, вона забезпечує спроможність отриманих комплексів диспергуватися у водному середовищі та приєднувати цільові молекули, призначені для доставки у клітину. Здатність ВНТ безпосередньо нековалентно

взаємодіяти з молекулами ДНК за рахунок гідрофобних зв'язків створює підстави для проведення експериментів щодо неопосередкованого зв'язування ДНК, яку планується перенести всередину клітин, зі стінками ВНТ. Потрібні далші дослідження можливості трансформувати рослинні клітини, вкриті клітинною стінкою, саме за допомогою цих комплексів.

Охарактеризовані свойства углеродных нанотрубок как перспективного для применения в биотехнологии класса наноматериалов. Обсуждается вопрос функционализации углеродных нанотрубок для повышения их биологической совместимости. Освещены преимущества применения углеродных нанотрубок для разработки новых систем генетической трансформации растений и связанные с этим проблемы. Описана методика получения диспергированных в воде комплексов ДНК с многослойными углеродными нанотрубками.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, генетическая трансформация растений

Properties of the carbon nanotubes as nanomaterials having great promises for biotechnological applications are characterized. The issue of increased biocompatibility functionalization of carbon nanotubes is discussed. The advantages and problems of using carbon nanotubes for the development of novel systems for plant genetic transformation are elucidated. Production of aqueous dispersion of multi-walled carbon nanotubes with DNA is described.

Key words: carbon nanotubes, plant genetic transformation

1. Roco M. C., Bainbridge W. S. Converging technologies for improving human performance. NSF Doc. Report. – The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – 482 p.
2. Applications of carbon nanotubes in biotechnology / Bekyarova E., Ni Y., Malarkey E.B et al. // J. Biomed. Nanotechnol. – 2005. – 1, N 1. – P. 3–17.
3. Functionalised carbon nanotubes for plasmid gene DNA delivery / Pantarotto D., Singh R., McCarthy D. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2004. – 43. – P. 5242–5246.
4. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes / A. Bianco, K. Kostarelos, C.D. Partidos, M. Prato // Chem. Commun. – 2005. – 5. – P. 571–577.
5. Binding and condensation of plasmid DNA onto carbon nanotubes: toward the construction of nanotube based gene delivery vectors / Singh R., Pantarotto D., McCarthy D. et al. // J. Amer. Chem. Soc. – 2005. – 127. – P. 4388–4396.
6. Kam N.W S., Liu Z.A., Dai H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: Generality and biological

- functionality // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2005. – **127**. – P. 6021–6026.
7. *Iijima S.* Helical microtubules of graphitic carbon // *Nature*. – 1991. – **354**. – P. 56–58.
 8. *Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Avouris P.* Carbon nanotubes: Synthesis, structure, properties and applications. – Berlin: Springer, 2001. – 451 p.
 9. *Dai H.* Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties // *Acc. Chem. Res.* – 2002. – **35**, N 12. – P. 1035–1044.
 10. *Iijima S., Ichihashi T.* Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter // *Nature*. – 1993. – **363**. – P. 603–605.
 11. *Ebbesen T.W., Ajayan P.M.* Large scale synthesis of carbon nanotubes // *Nature*. – 1992. – **358**. – P. 220–222.
 12. *Rao C.N.R., Govindaraj A.* Carbon nanotubes from organometallic precursors // *Acc. Chem. Res.* – 2002. – **35**. – P. 998–1002.
 13. *Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Eklund P.C.* Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes. – San Diego: Acad. Press, 1996. – 965 p.
 14. *Single-walled 4 A carbon nanotube arrays* / N. Wang, Z.K. Tang, G.D. Li, J.S. Chen // *Nature*. – 2000. – **408**. – P. 50–51.
 15. *Large scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique* / Journet C., Maser W.K., Bernier P. et al. // *Nature*. – 1997. – **388**. – P. 756–758.
 16. *Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: Process, product and characterization* / Rinzler A.G., Liu J., Dai H. et al. // *Appl. Phys. A*. – 1998. – **67**. – P. 29–37.
 17. *Su M., Zheng B., Liu J.* A scalable CVD method for the synthesis of single-walled carbon nanotubes with high catalyst productivity // *Chem. Phys. Lett.* – 2000. – **322**. – P. 321–326.
 18. *Gasphase catalytic growth of single-walled carbon nanotubes from carbon monoxide* / Nikolaev P., Bronikowski M.J., Bradley R.K. et al. // *Chem. Phys. Lett.* – 1999. – **313**. – P. 91–97.
 19. *Saito R., Dresselhaus G., Dresselhaus M.S.* Physical Properties of Carbon Nanotubes. – London: Imper. Coll. Press, 1998. – 258 p.
 20. *Optical properties of single-wall carbon nanotubes* / Kataura H., Kumazawa Y., Maniwa Y. et al. // *Synth. Met.* – 1999. – **103**. – P. 2555–2558.
 21. *Electronic structure control of single-walled carbon nanotube functionalization* / Strano M.S., Dyke C.A., Usrey M.L. et al. // *Science*. – 2003. – **301**. – P. 1519–1522.
 22. *Baddour C.E., Briens C.* Carbon nanotube synthesis: A review // *Inter. J. Chem. React. Eng.* – 2005. – **3**. – P. 3–20.
 23. *Lee Y.T., Kim N.S.* Temperature-dependent growth of carbon nanotubes by pyrolysis of ferrocene and acetylene in the range between 700 and 1000 C // *Chem. Phys. Lett.* – 2003. – **372**. – P. 853–859.
 24. *A method for producing carbon nanotubes directly from plant materials* / Xie X., Goodell B., Qian Y. et al. // *Forest Prod. J.* – 2009. – **59**, N 1–2. – P. 26–28.
 25. *Chromatographic purification and properties of soluble single walled carbon nanotubes* / Zhao B., Hu H., Niyogi S. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2001. – **123**. – P. 11673–11677.
 26. *Nitric acid purification of single-walled carbon nanotubes* / H. Hu, B. Zhao, M.E. Itkis, R.C. Haddon // *J. Phys. Chem. B*. – 2003. – **107**. – P. 13838–13842.
 27. *Single nanotube raman spectroscopy* / Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Jorio A. et al. // *Acc. Chem. Res.* – 2002. – **35**. – P. 1070.
 28. *Purity evaluation of as-prepared single-walled carbon nanotube soot by use of solution phase near-IR spectroscopy* / Itkis M.E., Perea D.E., Niyogi S. et al. // *Nano Lett.* – 2003. – **3**. – P. 309–314.
 29. *Thermogravimetric analysis of single-wall carbon nanotubes ultrasonicated in monochlorobenzene* / M. Zhang, M. Yudasaka, A. Koshio, S. Iijima // *Chem. Phys. Lett.* – 2002. – **364**. – P. 420–426.
 30. *Carbon nanotubes in biology and medicine in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery* / Z. Liu, S. Tabakman, K. Welsher, H. Dai // *Nano Res.* – 2009. – **2**. – P. 85–120.
 31. *Biocompatible carbon nanotubes* / Wu P., Chen X., Hu N. et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2008. – **47**, N 27. – P. 5022–5025.
 32. *Karousis N., Tagmatarchis N., Tasis D.* Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes // *Chem. Rev.* – 2010. – **110**, N 9. – P. 5366–5397.
 33. *Geckeler K.E., Premkumar T.* Carbon nanotubes: are they dispersed or dissolved in liquids? // *Nanosc. Res. Lett.* – 2011. – **6**, 136 (doi:10.1186/1556-276X-6-136).
 34. *Chemistry of singlewalled carbon nanotubes* / Niyogi S., Hamon M.A., Hu H. et al. // *Acc. Chem. Res.* – 2002. – **35**. – P. 1105–1113.
 35. *Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid* / I.D. Rosca, F. Watari, M. Uo, T. Akaska // *Carbon*. – 2005. – **43**. – P. 3124–3131.
 36. *Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery* / Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama, H. Dai // *ACS Nano*. – 2007. – **1**. – P. 50–56.
 37. *Synthesis and characterization of water soluble singlewalled carbon nanotube graft copolymers* / Zhao B., Hu H., Yu A.P. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2005. – **127**. – P. 8197–8203.
 38. *Zhao B., Hu H., Haddon R.C.* Synthesis and properties of a water soluble single-walled carbon nanotube-poly (m-aminobenzene sulphonic acid) graft copolymer // *Adv. Func. Mater.* – 2004. – **14**. – P. 71–76.
 39. *Lee K.M., Li L.C., Dai L.M.* Asymmetric endfunctionalization of multi-walled carbon nanotubes // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2005. – **127**. – P. 4122–4123.

40. *Functionalization* of single-walled carbon nanotubes via the Bingel reaction / K.S. Coleman, S.R. Bailey, S. Fogden, M.L.H. Green // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2003. – **125**. – P. 8722–8723.
41. *Solution* properties of singlewalled carbon nanotubes / Chen J., Hamon M.A., Hu H. et al. // *Science*. – 1998. – **282**. – P. 95–98.
42. *Ester-functionalized* soluble single-walled carbon nanotubes / Hamon M.A., Hu H., Bhowmik P. et al. // *Appl. Phys. A*. – 2002. – **74**. – P. 333–338.
43. *Covalent* bond formation to a carbon nanotube metal / Kamaras K., Itkis M.E., Hu H. et al. // *Science*. – 2003. – **301**. – P. 1501–1503.
44. *Fluorination* of single-wall carbon nanotubes / Mickelson E.T., Huffman C.B., Rinzler A.G. et al. // *Chem. Phys. Lett.* – 1998. – **296**. – P. 188–194.
45. *Functionalization* of carbon nanotubes by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: A bucky paper electrode / Bahr J.L., Yang J., Kosynkin D.V. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2001. – **123**. – P. 6536–6542.
46. *Organic* functionalization of carbon nanotubes / Georgakilas V., Kordatos K., Prato M. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2002. – **124**. – P. 760–761.
47. *Noncovalent* sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization / R.J. Chen, Y.G. Zhang, D.W. Wang, H.J. Dai // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2001. – **123**. – P. 3838–3839.
48. *Noncovalent* engineering of carbon nanotube surfaces by rigid, functional conjugated polymers / Chen J., Liu H.Y., Weimer W.A. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2002. – **124**. – P. 9034–9035.
49. *Novel* photoactive single-walled carbon nanotube-porphyrin polymer wraps: Efficient and longlived intracomplex charge separation / Guldi D.M., Taieb H., Rahman G.M. et al. // *Adv. Mater.* – 2005. – **17**. – P. 871–875.
50. *Noncovalent* functionalization of carbon nanotubes by fluorescein-polyethylene glycol: Supramolecular conjugates with pH-dependent absorbance and fluorescence / Nakayama-Ratchford N., Bangsaruntip S., Sun X.M. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2007. – **129**. – P. 2448–2449.
51. *Supramolecular* self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes / Richard C., Balavoine F., Schultz P. et al. // *Science*. – 2003. – **300**. – P. 775–778.
52. *Noncovalent* functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors / Chen R.J., Bangsaruntip S., Drouvalakis K.A. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2003. – **100**. – P. 4984–4989.
53. *Uptake*, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants / Lin S., Reppert J., Hu Q. et al. // *Small*. – 2009. – **5**. – P. 1128–1132.
54. *Natural* organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase / H. Hyung, J.D. Fortner, J.B. Hughes, J.H. Kim // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – **41**. – P. 179–184.
55. *DNA* assisted dispersion and separation of carbon nanotubes / Zheng M., Jagota A., Semke E.D. et al. // *Nat. Mater.* – 2003. – **2**. – P. 338–342.
56. *Structure-based* carbon nanotubesorting by sequence-dependent DNA assembly / Zheng M., Jagota A., Strano M.S. et al. // *Science*. – 2003. – **302**. – P. 1545–1548.
57. *DNA-functionalized* single-walled carbon nanotubes / Dwyer C., Guthold M., Falvo M. et al. // *Nanotechnology*. – 2002. – **13**. – P. 601–604.
58. *DNA* dissolves single-walled carbon nanotubes in water / Nakashima N., Okuzono S., Murakami H. et al. // *Chem. Lett.* – 2003. – **32**, N 5. – P. 456–457.
59. *Effect* of nucleases on the cellular internalization of fluorescent labeled DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes / H.K. Moon, C.I. Chang, D.-K. Lee, H.C. Choi // *Nano Res.* – 2008. – **1**. – P. 351–360.
60. *Wu Y., Phillips J.A., Liu H.* Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery // *ACS Nano*. – 2008. – **2**. – P. 2023–2028.
61. *DNA* functionalized single-walled carbon nanotubes for electrochemical detection / Hu C., Zhang Y., Bao G. et al. // *J. Phys. Chem. B*. – 2005. – **109**, N 43. – P. 20072–20076.
62. *Lu G., Maragakis P., Kaxiras E.* Carbon nanotube interaction with DNA // *Nano Lett.* – 2005. – **5**, N 5. – P. 897–900.
63. *Abu-Salah K.M., Ansari A.A., Alrokayan S.A.* DNA-based applications in nanobiotechnology // *J. Biomed. Biotech.* – 2010. – 715295 (doi: 10.1155/2010/715295).
64. *Wang J., Lin Y.* Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications // *Trends An. Chem.* – 2008. – **27**, N 7. – P. 619–626.
65. *Covalently* linked deoxyribonucleic acid withmultiwall carbon nanotubes-synthesis and characterization / Chen W.W., Tzang C.H., Tang J.X. et al. // *Appl. Phys. Lett.* – 2005. – **86**. – P. 103114:1–3.
66. *Confocal* fluorescence imaging of DNA-functionalized carbon nanotubes / M. Hazani, R., Naaman, F. Henrich, M.M. Kappes // *Nano Lett.* – 2003. – **3**, N 2. – P. 153–155.
67. *Covalently* bonded adducts of deoxyribonucleic acid (DNA) oligonucleotides with single-wall carbon nanotubes: Synthesis and hybridization / Baker S.E., Cai W., Lasserter T.L. et al. // *Nano Lett.* – 2002. – **2**. – P. 1413–1417.
68. *Li X., Peng Y., Qu X.* Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing BA transition in solution // *Nucl. Acid Res.* – 2006. – **34**, N 13. – P. 3670–3676.
69. *Johnson R.R., Johnson A.T.C., Klein M.L.* The nature of DNA-base-carbon-nanotube interactions // *Small*. – 2010. – **6**, N 1. – P. 31–34.
70. *Nepal D., Geckeler K.E.* pH-sensitive dispersion and debundling of single-walled carbon nanotubes: lysozyme as a tool? // *Small*. – 2006. – **2**. – P. 406–412.

71. *Selectivity* of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions / Matsuura K., Saito T., Okazaki T. et al. // *Chem. Phys. Lett.* – 2006. – **429**. – P. 497–502.
72. *Protein-assisted* solubilization of single-walled carbon nanotubes / Karajanagi S.S., Yang H., Asuri P. et al. // *Langmuir*. – 2006. – **22**, N 4. – P. 1392–1395.
73. *Diameter-selective* solubilization of single-walled carbon nanotubes by reversible cyclic peptides / Ortiz-Acevedo A., Xie H., Zorbas V. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2005. – **127**. – P. 9512–9517.
74. *Importance* of aromatic content for peptide/single-walled carbon nanotube interactions / Zorbas V., Smith A.L., Xie H. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2005. – **127**. – P. 12323–12328.
75. *Nanotube* network transistors from individual peptide-wrapped single-walled carbon nanotubes / Panhuis M., Gowrisanker S., Vanesko D.J. et al. // *Small*. – 2005. – **1**. – P. 820–823.
76. *Peptide* cross-linking modulated stability and assembly of peptide-wrapped single-walled carbon nanotubes / Xie H., Ortiz-Acevedo A., Zorbas V. et al. // *J. Mater. Chem.* – 2005. – **15**. – P. 1734–1741.
77. *Peptides* that non-covalently functionalize single-walled carbon nanotubes to give controlled solubility characteristics / Witus L.S., Rocha J.-D., Yuwono V.M. et al. // *J. Mater. Chem.* – 2007. – **17**. – P. 1909–1915.
78. *Peptide-mediated* formation of single-wall carbon nanotube composites / Pender M.J., Sowards L.A., Hartgerink J.D. et al. // *Nano Lett.* – 2006. – **6**. – P. 40–44.
79. *Nondestructive* formation of supramolecular nanohybrids of single-walled carbon nanotubes with flexible porphyrinic polypeptides / Saito K., Troiani V., Qiu H. et al. // *J. Phys. Chem. C* – 2007. – **111**. – P. 1194–1199.
80. *Dispersion* behavior and spectroscopic properties of singlewalled carbon nanotubes in chitosan acidic aqueous solutions / Takahashi T., Luculescu C.R., Uchida K. et al. // *Chem. Lett.* – 2005. – **34**. – P. 1516–1517.
81. *Manipulated* dispersion of carbon nanotubes with derivatives of chitosan / J. Zhang, Q. Wang, L. Wang, A. Wang // *Carbon*. – 2007. – **45**. – P. 1917–1920.
82. *Liquid* crystal behavior of single-walled carbon nanotubes dispersed in biological hyaluronic acid solutions / S.E. Moulton, M. Maugey, P. Poulin, G.G. Wallace // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2007. – **129**. – P. 9452–9457.
83. *Carbon* nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction / N.W.S. Kam, M. O'Connell, J.A. Wisdom, H. Dai // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – **102**. – P. 11600–11605.
84. *Coating* single-walled carbon nanotubes with phospholipids / Wu Y., Hudson J.S., Lu Q. et al. // *J. Phys. Chem. B*. – 2006. – **110**. – P. 2475–2478.
85. *Diameter-selective* solubilization of carbon nanotubes by lipid micelles / Tasis D., Papagelis K., Douroumis D. et al. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2008. – **8**. – P. 420–423.
86. *Selective* probing and imaging of cells with single walled carbon nanotubes as near-infrared fluorescent molecules / K. Welscher, Z. Liu, D. Daranciang, H. Dai // *Nano Lett.* – 2008. – **8**. – P. 586–590.
87. *Kam N.W.S., Liu Z., Dai H.* Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2005. – **127**. – P. 12492–12493.
88. *In vivo* biodistribution and highly efficient tumor targeting of carbon nanotubes in mice / Liu Z., Cai W., He L. et al. // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – **2**. – P. 47–52.
89. *Soluble* single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design / R.P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S.J. Lippard // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2007. – **129**. – P. 8438–8439.
90. *Carbon* nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice / De La Zerda A., Zavaleta C., Keren S. et al. // *Nat. Nanotechnol.* – 2008. – **3**. – P. 557–562.
91. *Nanotube* molecular transporters: Internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells / N.W.S. Kam, T.C. Jessop, P.A. Wender, H.J. Dai // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2004. – **126**. – P. 6850–6851.
92. *Near-infrared* fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells / P. Cherukuri, S.M. Bachilo, S.H. Litovsky, R.B. Weisman // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2004. – **126**. – P. 15638–15639.
93. *A nano-combinatorial* library strategy for the discovery of nanotubes with reduced protein-binding, cytotoxicity, and immune response / Zhou H.Y., Mu Q.X., Gao N.N. et al. // *Nano Lett.* – 2008. – **8**. – P. 859–865.
94. *Protein* binding by functionalized multiwalled carbon nanotubes is governed by the surface chemistry of both parties and the nanotube diameter / Mu Q., Liu W., Xing Y.H. et al. // *J. Phys. Chem. C*. – 2008. – **112**. – P. 3300–3307.
95. *Novel* carbon nanotube conjugates penetrate plant cells enabling the transport of molecular cargoes / Liu Q., Chen B., Wang Q. et al. // *Nano Lett.* – 2009. – **9**, N 3. – P. 1007–1010.
96. *Effect* of single wall carbon nanotubes on human HEK 293 cells / Cui D.X., Tian F.R., Ozkan C.S. et al. // *Toxicol. Lett.* – 2005. – **155**. – P. 73–85.
97. *Cytotoxicity* of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts / Tian F., Cui D., Schwarz H. et al. // *Toxicol. In Vitro*. – 2006. – **20**. – P. 1202–1212.
98. *Effects* of dendrimer-functionalized multi-walled carbon nanotubes on murine embryonic stem cells / Cui D., Zhang H., Wang Z. et al. // *ECS Trans.* – 2008. – **13**. – P. 111–116.

99. *Molecular* characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast / Ding L.H., Stilwell J., Zhang T.T. et al. // *Nano Lett.* – 2005. – **5**. – P. 2448–2464.
100. *Patlolla A., Knighten B., Tchounwou P.* Multi-walled carbon nanotubes cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells // *Ethn. Dis.* – 2010. – **20**. – P. 65–72.
101. *Multi-walled* carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis / Bottini M., Bruckner S., Nika K. et al. // *Toxicol. Lett.* – 2006. – **160**. – P. 121–126.
102. *Carbon* nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestoslike pathogenicity in a pilot study / Poland C.A., Duffin R., Kinloch I. et al. // *Nature Nanotech.* – 2008. – **3**. – P. 423–428.
103. *Adverse* effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells / Tabet L., Bussy C., Amara N. et al. // *J. Toxicol. Environ. Health. A.* – 2009. – **72**, N 2. – P. 60–73.
104. *Biomimetic* engineering of carbon nanotubes by using cell surface mimics / X. Chen, G.S. Lee, A. Zettl, C.R. Bertozzi // *Angew. Chem.* – 2004. – **43**. – P. 6112–6116.
105. *Interfacing* carbon nanotubes with living cells / Chen X., Tam U.C., Czapinski J.L. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2006. – **128**. – P. 6292–6293.
106. *Circulation* and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy / Liu Z., Davis C., Cai W. et al. // *Proceed. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – **105**, N 5. – P. 1410–1415.
107. *Bio-defunctionalization* of functionalized single-walled carbon nanotubes in mice / Yang S.-T., Wang H., Meziaini M.J. et al. // *Biomacromolecules.* – 2009. – **10**. – P. 2009–2012.
108. *Carbon* nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth / Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M. et al. // *ACS Nano.* – 2009. – **3**, N 10. – P. 3221–3227.
109. *Nanomaterials* in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects / Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E. et al. // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2008. – **27**. – P. 1825–1851.
110. *Lin D., Xing B.* Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition on seed germination and root growth // *Environ. Pollut.* – 2007. – **150**. – P. 243–250.
111. *Environmental* behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi / Navarro E., Baun A., Behra R. et al. // *Ecotoxicology* – 2008. – **17**. – P. 372–386.
112. *Tripathi S., Sonkar S.K., Sarkar S.* Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes // *Nanoscale.* – 2011. – **3**. – P. 1176–1181.
113. *Induction* of programmed cell death in *Arabidopsis* and rice by single-wall carbon nanotubes // Shen C.-X., Zhang Q.-F., Li J. et al. // *Am. J. Bot.* – 2010. – **97**, N 10. – P. 1602–1609.
114. *Single* walled carbon nanotubes exhibit dual-phase regulation to exposed *Arabidopsis* mesophyll cells / Yuan H., Hu S., Huang P. et al. // *Nanoscale Res. Lett.* – 2011. – **6**. – P. 44–53.
115. *Direct* imaging of single-walled carbon nanotubes in cells / Porter A. E., Gass M., Muller K. et al. // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – **2**. – P. 713–717.
116. *Plant* aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations / Tyerman S.D., Bohnert H.J., Maurel C. et al. // *J. Exper. Bot.* – 1999. – **25**. – P. 1055–10721.
117. *Effects* of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species / Canas J.E., Long M., Nations S. et al. // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2008. – **27**. – P. 1922–1931.
118. *Yang L., Watts D.J.* Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles // *Toxicol. Lett.* – 2005. – **158**. – P. 122–132.
119. *The effect* of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice / Qu G.B., Bai Y.H., Zhang Y. et al. // *Carbon.* – 2009. – **47**. – P. 2060–2069.
120. *Antibacterial* effects of carbon nanotubes: size does matter! / S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech // *Langmuir.* – 2008. – **24**. – P. 6409–6413.
121. *Uptake* of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells / Porter A.E., Gass M., Bendall J.S. et al. // *ACS Nano.* – 2009. – **3**. – P. 1485–1492.
122. *Kam N.W.S., Liu Z.A., Dai H.* Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: An investigation of the uptake mechanism and pathway // *J. Angew. Chem.* – 2006. – **45**. – P. 577–581.
123. *Cellular* uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type / Kostarelos K., Lacerda L., Pastorin G. et al. // *Nature Nanotechnol.* – 2007. – **2**. – P. 108–113.
124. *Mu Q., Broughton D.L., Yan B.* Endosomal leakage and nuclear translocation of MWCN // *Nano Lett.* – 2009. – **9**, N 12. – P. 4370–4375.
125. *Effects* of carbon nanotubes on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts / Zhang D.W., Yi C.Q., Zhang J.C. et al. // *Nanotechnol.* – 2007. – **18**. – P. 475102–475107.
126. *Cell* response to carbon nanotubes: size-dependent intracellular uptake mechanism and subcellular fate / Kang B., Yu D.C., Chang S.Q. et al. // *Nanotechnol.* – 2008. – **19**. – P. 1109–1113.

127. Pogodin S., Baulin V.A. Can a carbon nanotube pierce through a phospholipid bilayer? // *ACS Nano*. – 2010. – **4**, N 9. – P. 5293–5300.
128. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells / Serag M.F., Kaji N., Gaillard C. et al. // *ACS Nano*. – 2011. – **5**, N 1. – P. 493–499.
129. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *E. coli* cells / Rojas-Chapana J., Troszczyńska J., Firkowska I. et al. // *Lab. Chip*. – 2005. – **5**. – P. 536–539.
130. Carbon nanotube delivery of the GFP gene into mammalian cells / Gao L.Z., Nie L., Wang T.H. et al. // *Chem. Bio. Chem.* – 2006. – **7**. – P. 239–242.
131. Polyethylenimine grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA / Liu Y., Wu D.C., Zhang W.D. et al. // *Angew. Chem.* – 2005. – **44**. – P. 4782–4785.
132. Mello C.C., Conte D. Revealing the world of RNA interference // *Nature*. – 2004. – **431**. – P. 338–342.
133. SiRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon nanotube transporters / Z. Liu, M. Winters, M. Holodniy, H.J. Dai // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – **46**. – P. 2023–2027.
134. Spontaneous insertion of DNA oligonucleotides into carbon nanotubes / H. Gao, Y. Kong, D. Cui, C.S. Ozkan // *Nano Lett.* – 2003. – **3**, N 4. – P. 471–473.
135. Використання вуглецевих нанотрубок для генетичної трансформації рослин / О.М. Бурлака, Я.В. Пірко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2011. – Т. 11. – С. 223–228.
136. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain / Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M. et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – **59**, N 8. – P. 3485–3498.
137. Study of the inhibitory effect of water-soluble fullerenes on plant growth at the cellular level / Liu Q., Zhao Y., Wan Y. et al. // *ACS Nano*. – 2010. – **4**, N 10. – P. 5743–5748.
138. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions / Khodakovskaya M.V., de Silva K., Nedosekin D.A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – **108**, N 3. – P. 1028–1033.