

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В КЛЕТКАХ

Е. Н. Голубева^{1*}, М. В. Шуба², Н. В. Васильев¹, Т. А. Кулагова¹

УДК 535.375.5;620.3

¹ Белорусский государственный университет,

220030, Минск, просп. Независимости, 4, Беларусь; e-mail: golubeva.ln.87@gmail.com

² Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

(Поступила 20 июня 2018)

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР) в комбинации с конфокальной микроскопией исследованы суспензии одностенных и двустенных углеродных нанотрубок различной длины, а также многостенных углеродных нанотрубок. Показано, что интенсивность G-моды в спектре КР углеродных нанотрубок прямо пропорциональна концентрации нанотрубок, времени экспозиции, мощности и глубине фокусировки возбуждающего излучения в исследуемом прозрачном образце. Установлено, что спектры КР более длинных углеродных нанотрубок (~1 мкм) характеризуются большей интенсивностью G-моды по сравнению с короткими нанотрубками (~250–450 нм). Полученные зависимости использованы для определения локальной внутриклеточной концентрации углеродных нанотрубок в пределах перетяжки возбуждающего лазерного пучка с целью создания карты распределения углеродных нанотрубок внутри клеток.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, спектроскопия комбинационного рассеяния света, клетки глиомы, локальная концентрация, внутриклеточное распределение.

Suspensions of single- and double-walled carbon nanotubes of various lengths, as well as multi-walled carbon nanotubes, have been studied by Raman spectroscopy in combination with confocal microscopy. It is shown that the intensity of the G mode in the Raman spectra of the carbon nanotubes is directly proportional to the nanotube concentration, the exposure time, the power and focusing depth of the exciting radiation in the transparent sample under study. It is found that the Raman spectra of longer carbon nanotubes (~1 μm) are characterized by a higher intensity of the G mode compared with the short nanotubes (~250–450 nm). The dependences obtained have been used to determine the local intracellular concentration of the carbon nanotubes within the waist of the exciting laser beam in order to create a map of the distribution of the carbon nanotubes inside the cells.

Keywords: carbon nanotubes, Raman spectroscopy, glioma cells, local concentration, intracellular distribution.

Введение. Одностенные углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой полые цилиндрические структуры длиной от сотен нанометров до сотен микрометров и характерным диаметром 0.8–2.0 нм [1]. Вследствие электростатического взаимодействия УНТ объединяются в пучки диаметром от единиц до нескольких десятков нанометров. Для биологических и медицинских целей УНТ предлагают применять в качестве переносчиков ДНК [2], маркеров [3] и различных лекарственных препаратов [4, 5] внутрь живых клеток, а также в качестве частиц для селективной фототермической абляции опухолевых клеток [6]. Наиболее пригодными для таких применений считаются короткие УНТ (длиной 100–300 нм), так как они хорошо проникают в клетку и менее токсичны по сравнению с длинными УНТ [7].

RAMAN SPECTROSCOPY APPLICATION FOR ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF CARBON NANOTUBES IN LIVING CELLS

L. N. Golubewa^{1*}, M. V. Shuba², M. V. Vasiliev¹, T. A. Kulahava¹ (¹ Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220030, Belarus; e-mail: golubeva.ln.87@gmail.com; ² Research Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus)

Вследствие малых размеров УНТ их небольшие скопления в клетке очень трудно зарегистрировать с использованием оптической микроскопии. Для визуализации распределения УНТ в клетках в основном используют их функционализацию флуорофорами, что влияет на физико-химические свойства наноматериалов и может приводить к изменению их локализации в клетках. В связи с этим для исследования механизмов взаимодействия УНТ с живыми клетками и особенностей распределения УНТ в цитоплазме клеток необходима разработка новых методов визуализации УНТ, основанных на использовании для детектирования локализации УНТ свойств самих наноматериалов, а не функциональных групп. Пространственное распределение УНТ в клетках можно эффективно регистрировать, пользуясь методами спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР) без дополнительного использования флуоресцентных красителей [8—11]. Это связано с тем, что КР одностенными УНТ (ОУНТ) является резонансным при совпадении частоты падающего излучения с частотой межзонного перехода [12]. Кроме того, если УНТ находятся в водной среде, то возбуждающее излучение может иметь высокую интенсивность, не вызывая при этом нагрев и окисление УНТ, так как поглощенная световая энергия успевает рассеяться в окружающей среде. Интенсивность КР УНТ относительно слабо зависит от типа нековалентной модификации УНТ и окружающей среды [13]. Следует отметить, что конфокальная сканирующая спектроскопия КР позволяет получить сигнал КР от УНТ, находящихся в малом объеме (1 мкм^3), а время накопления сигнала может составлять секунды. Таким образом, спектроскопия КР является неразрушающим, быстрым и высокочувствительным методом детектирования распределения УНТ и может быть использована для исследования локализации УНТ в биологических объектах.

В некоторых экспериментальных работах приводятся карты распределения интенсивности различных мод КР УНТ внутри биологических тканей [13, 14] или клеток [10, 15—17]. В [10] сделана попытка количественной оценки средней интегральной концентрации УНТ внутри различных органов. Однако взаимосвязь между параметрами регистрации спектров КР УНТ, интенсивностью мод в спектрах КР и локальной концентрацией УНТ (в пределах объема 1 мкм^3) в живых клетках не установлена. Ранее в работе [18] на основе спектроскопии КР тонких пленок УНТ показана возможность количественной оценки концентрации УНТ в плотных скоплениях (агломератах) нанотрубок.

В настоящей работе с целью выявления закономерностей распределения УНТ внутри отдельных живых клеток и установления механизмов взаимодействия УНТ с внутриклеточными структурами применен и оптимизирован метод спектроскопии КР для локального определения количества УНТ в цитоплазме клеток.

Эксперимент. Использованы следующие УНТ: короткие ОУНТ (к-УНТ) длиной 100—400 нм (средняя длина ~ 250 нм, средний диаметр 1 нм) и длинные ОУНТ (д-УНТ) длиной 0.1—2.0 мкм (средняя длина ~ 1 мкм), полученные методом газофазного катализа (методом HiPCO) (Nanointegris Technology Inc.); двустенные УНТ (ДУНТ) длиной 100—400 нм, внутренним диаметром 0.5—2.5 нм, внешним диаметром 1.2—3.2 нм, синтезированные CVD-методом с использованием Co:Mo-MgO в качестве катализатора (IJL, UMR Universite de Lorraine-CNRS, Франция); многостенные УНТ (МУНТ) длиной 100—600 нм (средняя длина ~ 450 нм, средний внешний диаметр 13 нм), произведенные CVD-методом (Bayer Baytubes). к-УНТ, ДУНТ получены в результате разработанного нами метода ломки УНТ [19], включающего в себя длительную ультразвуковую обработку нанотрубок в смеси азотной и серной кислот при низкой температуре.

Для исследования характеристик КР УНТ готовили суспензии согласно следующей методике. УНТ диспергировали с использованием ультразвукового диспергатора УЗДН-2Т в 1 %-ном водном растворе додецилсульфата натрия в течение 1 ч, концентрация УНТ 30—100 мкг/мл. Полученную суспензию дважды центрифугировали при 5000g в течение 15 мин. После каждого центрифугирования отбирали супернатант, не содержащий крупных агломерированных частиц из УНТ. Спектры поглощения суспензий УНТ в диапазоне 200—1110 нм измерены на спектрофотометре (“Солар”, Беларусь) в кварцевой кювете толщиной 1 см. Концентрация УНТ в полученной суспензии определена по оптической плотности на $\lambda = 500$ нм с использованием калибровочных кривых. Для построения калибровочных кривых МУНТ известную массу МУНТ диспергировали в заданном объеме, после чего измеряли оптическую плотность; для построения калибровочных кривых ОУНТ использована промышленно произведенная суспензия ОУНТ с известной концентрацией (Nanointegris Technology Inc). Детектирование сигнала КР осуществлялось в капле суспензии УНТ на кремниевой подложке с использованием конфокального 3D-сканирующего (флуоресцентного) КР-микроскопа NanoFinder HighEnd (Tokyo Instruments, Япония – Lotis ТП, Беларусь) при $\lambda_{\text{возб}} = 532$ нм и воздушного объекти-

ва 50× (Olympus, Япония) при различных временах накопления сигнала и мощности возбуждающего излучения.

Нековалентную функционализацию к-УНТ проводили в растворе NaCl (0.15 моль/л), содержащем ДНК в концентрации 300 мкг/мл. Суспензию подвергали воздействию ультразвука с использованием ультразвукового диспергатора УЗДН-2Т в течение 30 мин, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 5000g, чтобы осадить крупные агломераты УНТ, не подвергшиеся нековалентной функционализации. Для работы использовали супернатант, представляющий собой стабильную суспензию комплексов к-УНТ+ДНК.

Клетки глиомы крысы линии С6 культивировали в чашках Петри на поверхности кремниевых пластин в среде Дюльбекко (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 %-ной сыворотки плодов коров (HyClone, США), $8 \cdot 10^{-4}$ г/мл гентамицина (“Белмедпрепараты”, Беларусь) и $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л глутамин (Sigma-Aldrich, США) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Количество клеток при пере­се­ве $0.5 \cdot 10^5$ в 1 мл. к-УНТ+ДНК добавляли в культуральную среду к клеткам через 6 ч после пере­се­ва клеток (контролировали, чтобы клетки адгезировали на поверхность пластин к моменту добав­ле­ния комплексов к-УНТ+ДНК). Через 18 ч монослой клеток на пластине промывали дважды НЕРЕС-буфером и изучали внутриклеточное содержание УНТ на конфокальном микроскопе NanoFinder HighEnd с использованием лазера с $\lambda = 532$ нм (3.2 мВт, время экспозиции 3.0 с, шаг ска­ни­рования 1.5 мкм).

Данные представляли с помощью программных пакетов OriginPro 8.0 и Microsoft Excel 2007.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1, а представлены типичные спектры поглощения суспензии д-УНТ, ДУНТ и МУНТ. Оптическая плотность суспензий всех типов УНТ возрастает с уменьшением длины волны, что объясняется наличием плазмонного резонанса в УФ области, характерным для гексагональной углеродной решетки. Спектр д-УНТ имеет полосы поглощения в диапазонах 500—800 и 1000—1100 нм, соответствующих межзонным оптическим переходам. На рис. 1, б представлены зависимости оптической плотности на $\lambda = 500$ и 900 нм от концентрации УНТ в суспензии. Поскольку зависимости имеют линейный характер, они использованы в качестве калибровочных кривых, позволяющих по оптической плотности определять концентрацию УНТ в суспензии.

Спектры КР используемых УНТ приведены в дополнительном материале к [20]. Эти спектры состоят из тангенциальных мод D (1330 см^{-1}), G (1590 см^{-1}) и G' (2600 см^{-1}) [1]. КР-спектры ОУНТ и ДУНТ имеют еще радиальные дыхательные моды ($120\text{—}350 \text{ см}^{-1}$), частоты которых зависят от диаметра трубок. Интенсивность сигнала КР пропорциональна концентрации трубок. Так как G -мода имеет наибольшую интенсивность, концентрацию УНТ лучше всего определять по интенсивности этой моды I_G .

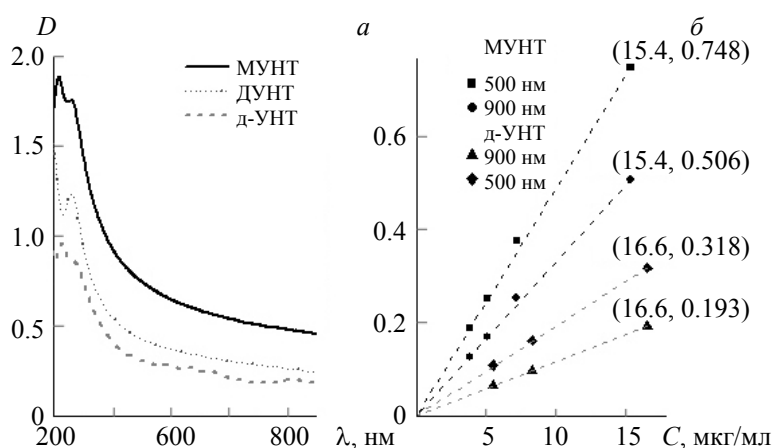


Рис. 1. Определение концентрации УНТ в суспензии по оптической плотности: а — типичные спектры поглощения суспензии из д-УНТ (16.6 мг/мл), ДУНТ (22.4 мг/мл) и МУНТ (15.4 мг/мл); б — оптическая плотность суспензии МУНТ и д-УНТ на $\lambda = 500$ и 900 нм в зависимости от концентрации УНТ в среде

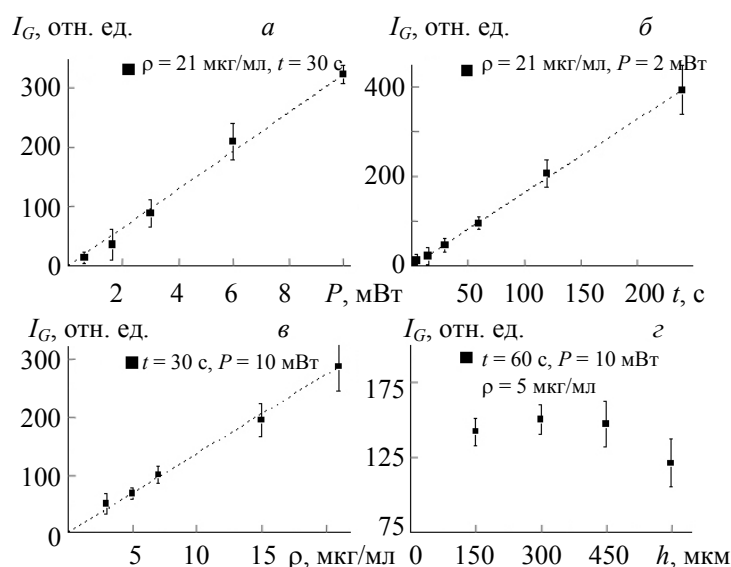


Рис. 2. Зависимость интенсивности I_G сигнала КР на частоте G -моды 1589 см^{-1} от мощности возбуждающего излучения P (а), времени накопления сигнала t (б), плотности распределения трубок ρ (в) и положения сфокусированного пятна для суспензии к-УНТ (з)

Установлены прямо пропорциональные зависимости интенсивности I_G сигнала КР на частоте G -моды (1589 см^{-1}) от мощности возбуждающего излучения, времени накопления сигнала и концентрации УНТ для суспензии к-УНТ (рис. 2). Кроме того, на рис. 2, з представлена зависимость интенсивности сигнала КР, получаемого от УНТ, находящихся в перетяжке лазерного луча в прозрачном образце, от глубины фокусировки луча в образце. Шаг сканирования вдоль вертикальной оси 150 мкм . Из рис. 2, з следует, что интенсивность сигнала КР незначительно изменяется в зависимости от положения сфокусированного луча внутри образца, однако в пределах живой адгезированной к поверхности клетки, размеры которой $15\text{--}25 \text{ мкм}$ вдоль вертикальной оси. Этими изменениями можно пренебречь.

Для МУНТ, ДУНТ и д-УНТ также получены аналогичные представленным на рис. 2, а, б зависимости (не показаны). Следует отметить, что при одинаковых времени накопления, мощности излучения и концентрации УНТ интенсивность КР более чем в четыре раза больше для д-УНТ, чем для к-УНТ, и более чем в 10 меньше для МУНТ, чем для к-УНТ. Такие различия объясняются тем, что в отличие от МУНТ КР ОУНТ является резонансным, так как частота возбуждающего излучения совпадает с частотой межзонного перехода части ОУНТ. Из сравнения калибровочных кривых д-УНТ и ДУНТ можно заключить, что интенсивность КР ДУНТ выше, чем д-УНТ.

Так как согласно рис. 2 интенсивность G -моды пропорциональна мощности лазера P , времени накопления сигнала t и концентрации УНТ, используем эти параметры для расчета числа трубок в перетяжке лазерного пучка как в суспензиях, так и в живых клетках, накопивших УНТ. Для дальнейшего количественного анализа считаем, что суспензия состоит из одинаковых ОУНТ длиной L и диаметром d , плотность трубок в суспензии ρ (в $\text{кг}/\text{м}^3$). Такое упрощение позволяет представить, какое число УНТ заданного размера вносило бы свой вклад в детектируемый сигнал КР, а также найти реальную плотность углерода в месте фокусировки возбуждающего излучения. Масса одной УНТ

$$m_{cn} = \frac{16\pi dLM}{3\sqrt{3}a^2 N_A}, \quad (1)$$

где $a = 0.142 \text{ нм}$ — кратчайшее расстояние между соседними атомами в кристаллической решетке графена; $M = 0.012 \text{ кг}/\text{моль}$ — молярная масса углерода; $N_A = 6.02 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$ — постоянная Авогадро.

Считаем, что лазер возбуждает и регистрирует сигнал от трубок, находящихся в перетяжке сфокусированного пучка. Для наших экспериментов объем перетяжки $V_F = 1 \text{ мкм}^3$. В этом объеме будут находиться трубки количеством $N = m/m_{cn}$ и общей массой $m = \rho V_F$. Поскольку интенсивность

G -моды пропорциональна мощности лазера P , времени накопления сигнала t и концентрации УНТ (т. е. числу трубок N в перетяжке пучка), можно записать

$$I_G = \alpha N P t, \quad (2)$$

где α — коэффициент пропорциональности, который найдем из результатов эксперимента. При плотности к-УНТ $\rho = 5$ мкг/мл, длине УНТ 400 нм и диаметре 1 нм их количество в объеме $V_F = 1$ мкм³ составляет $N = 5.2$. При мощности лазера 10 мВт, времени накопления 140 с и числе трубок в перетяжке пучка 5.2 получена интенсивность G -моды $I_G = 144$ ед. Это позволяет найти коэффициент для к-УНТ $\alpha = 0.046$ ед./($\text{мВт} \cdot \text{с}$). Зная величины P , t , α , I_G , m_{cn} , из формулы (2) можно рассчитать количество трубок и их плотность в перетяжке пучка.

Например, при $t = 3$ с, $P = 3$ мВт и $I_G = 3000$ ед. получаем, что в перетяжке пучка находится 7250 трубок длиной 400 нм и диаметром 1 нм. Следовательно, их плотность $\rho = 6.9$ кг/м³. Для сравнения плотность графита 2200 кг/м³.

Экспериментально полученные α для различных типов трубок при их определенных размерах указаны в табл. 1. На основании данных табл. 1 и формулы (1) методом сканирующей КР-микроскопии определена локальная концентрация к-УНТ внутри живой клетки глиомы крысы линии С6. На рис. 3, а показана микрофотография живой клетки в среде культивирования, на рис. 3, б — схема эксперимента. Методом сканирующей КР-микроскопии получена карта распределения трубок в горизонтальном сечении клетки, восстановленная по интенсивности G -моды (1590 см^{-1}) в спектре КР к-УНТ (рис. 3, в). Видно, что в клетке после 18 ч культивирования в присутствии к-УНТ выявлены области локализации сконцентрированных нанотрубок. Используемые для расчета локальных концентраций УНТ в клетках спектры КР представлены на рис. 3, г. Спектры имеют пики, соответствующие возбуждению фоновых колебаний с волновыми числами 1330 см^{-1} (D -мода), 1590 см^{-1} (G -мода) и 2650 см^{-1} (G' -мода). Низкая интенсивность моды D относительно G указывает на то, что используемые к-УНТ имеют невысокое содержание дефектов в кристаллической структуре. Как видно из рис. 3, д, в перетяжку лазерного пучка при сканировании клетки попадают области локального скопления УНТ с количеством трубок от 97 до 1400.

Т а б л и ц а 1. Коэффициент α для к-УНТ, д-УНТ, ДУНТ, МУНТ длиной L , диаметром D и массой m_0

УНТ	D , нм	L , нм	$m_0 \cdot 10^{-22}$ кг	α , ед./($\text{мВт} \cdot \text{с}$)
к-УНТ	1	400	9.56	0.046
д-УНТ	1	800	19.1	0.20
МУНТ	7.5—15*	400	1170	0.86
ДУНТ	0.783, 1.135*	400	18.3	0.028

*Указаны внешний и внутренний диаметры.

В недавних работах продемонстрировано использование КР-микроскопии для получения карт распределения ДУНТ в клетках РС3 и HeLa [21] по интенсивности радиальной моды в КР-спектре ДУНТ и распределения функционализированных ДУНТ в клетках Т24 с использованием D -моды в спектре КР [10]. Представлены данные лишь о накоплении ДУНТ в клетках, однако количественный анализ (концентрация УНТ в клетках, число УНТ в отдельных агломератах, образовавшихся в результате проникновения УНТ в цитоплазму клеток) не проведен. В свою очередь количественное определение локальной концентрации УНТ в опухолевых клетках важно при проведении противоопухолевой терапии (например, термической абляции для точного определения длительности экспозиции опухоли к лазерному излучению, а также определения мощности излучения, что зависит от концентрации УНТ в клетках). Быстрый метод оценки локальной концентрации УНТ в живых клетках позволит также проводить исследования динамики накопления УНТ. В работе [22] приведена методика определения кинетики накопления УНТ в лимфе, крови и некоторых тканях. Описанный метод основан на использовании проточной цитометрии, что обуславливает его высокую стоимость, сложность подготовки образца для проведения измерений и низкую чувствительность, так как регистрация сигнала возможна в случае, когда агломераты УНТ достигают размеров нескольких микрометров. Изменение концентрации в тканях определяли по относительному изменению интенсивности D -моды в спектрах КР.

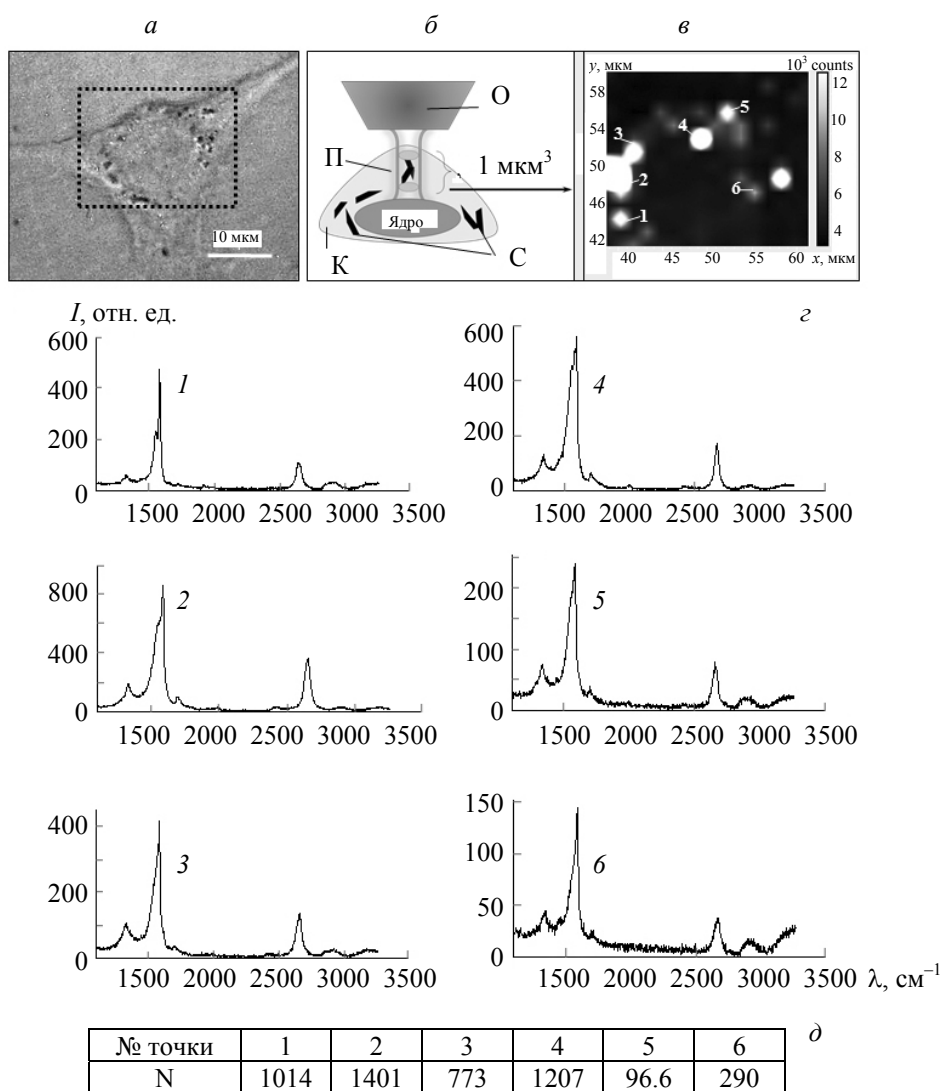


Рис. 3. Распределение к-УНТ в клетках глиомы крысы линии С6: *a* — микрофотография живой клетки в отраженном свете в среде культивирования; *б* — схема эксперимента (С — скопления к-УНТ, К — клетка, П — перетяжка лазерного пучка, О — объектив микроскопа); *в* — карта распределения трубок в горизонтальном сечении клетки, восстановленная по интенсивности G-моды (1590 см^{-1}) в КР-спектре к-УНТ; *г* — спектры КР, соответствующие областям 1—6 на рис. 3, *д* — локальные концентрации к-УНТ в данных областях клетки, шаг сканирования 1.5 мкм

Заключение. Разработан метод, позволяющий быстро количественно оценить локальную концентрацию углеродных нанотрубок в живых клетках. Указанный метод не требует длительной подготовки исследуемого образца и серьезных затрат на проведение измерений, характеризуется высокой чувствительностью (позволяет выявлять агломераты коротких углеродных нанотрубок в живых клетках с числом >5 в 1 мкм^3). Конфокальная микроскопия комбинационного рассеяния применена для определения локальной концентрации углеродных нанотрубок в суспензии, т. е. концентрации трубок в пределах перетяжки возбуждающего лазерного пучка. Установлены линейные зависимости интенсивности комбинационного рассеяния света от концентрации нанотрубок, времени экспозиции, мощности лазерного луча в исследуемом прозрачном образце для суспензий из одностенных углеродных нанотрубок различной длины и зависимость интенсивности сигнала комбинационного рассеяния от времени экспозиции и мощности лазерного излучения для двустенных и многостенных углеродных нанотрубок. Выявлено, что интенсивность комбинационного рассеяния больше для более длинных нанотрубок. Полученные зависимости применены для определения концентрации коротких одностенных углеродных нанотрубок внутри живой клетки. Показано, что метод сканирующей кон-

фокальной микроскопии комбинационного рассеяния может применяться для визуализации и количественной оценки локальной концентрации углеродных нанотрубок в живых клетках без использования дополнительных флуоресцентных меток и красителей.

- [1] **S. Reich, C. Thomsen, J. Maultzsch.** Carbon Nanotubes: Basic Concepts and Physical Properties, Darmstadt, Wiley (2008) 3—4
- [2] **D. Pantarotto, R. Singh, D. McCarthy, M. Erhardt, J. P. Briand, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, N 39 (2004) 5242—5246
- [3] **Z. Liu, S. Tabakman, K. Welsher, H. Dai.** *Nano Res.*, **2**, N 2 (2009) 85—120
- [4] **S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, A. M. Seifalian.** *Int. J. Nanomed.*, **6** (2011) 2963—2979
- [5] **A. M. Elhissi, W. Ahmed, I. U. Hassan, V. R. Dhanak, A. D’Emanuele.** *J. Drug Deliv.* (2012) 2012:837327
- [6] **H. K. Moon, S. H. Lee, H. C. Choi.** *ACS Nano*, **3**, N 11 (2009) 3707—3713
- [7] **S. Jain, S. R. Singh, S. Pillai.** *J. Nanomed. Nanotechnol.*, **3**, N 5 (2012); doi:10.4172/2157-7439.1000140
- [8] **V. M. Irurzun, M. P. Ruiz, D. E. Resasco.** *Carbon*, **48**, N 10 (2010) 2873—2881
- [9] **C. Zavaleta, A. de la Zerda, Z. Liu, S. Keren, Z. Cheng, M. Schipper, X. Chen, H. Dai, S. S. Gambhir.** *Nano Lett.*, **8**, N 9 (2008) 2800—2805
- [10] **C. Lamprecht, N. Gierlinger, E. Heister, B. Unterauer, B. Plochberger, M. Brameshuber, P. Hinterdorfer, S. Hild, A. Ebner.** *J. Phys. Condens. Matter.*, **24**, N 16 (2012)
- [11] **C. Bertulli, H. J. Beeson, T. Hasan, Y. Y. Huang.** *Nanotechnol.*, **24**, N 26 (2013) 265102
- [12] **C. Fantini, A. Jorio, M. Souza, M. S. Strano, M. S. Dresselhaus, M. A. Pimenta.** *Phys. Rev. Lett.*, **93** (2004) 147406
- [13] **Z. Liu, C. Davis, W. Cai, L. He, X. Chen, H. Dai.** *PNAS*, **105** (2008) 1410—1415
- [14] **Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen, H. Dai.** *Nature Nanotechnol.*, **2**, N 47 (2007) 47—52
- [15] **D. A. Heller, S. Baik, T. E. Eurell, M. S. Strano.** *Adv. Mater.*, **17** (2005) 2793
- [16] **J. W. Kang, F. T. Nguyen, N. Lue, R. R. Dasari, D. A. Heller.** *Nano Lett.*, **12** (2012) 6170—6174
- [17] **B. D. Holt, K. N. Dahl, M. F. Islam.** *Small*, **7** (2011) 2348—2355
- [18] **I. V. Anoshkin, I. I. Nefedova, D. V. Lioubtchenko, I. S. Nefedov, A. V. Räsänen.** *Carbon*, **116** (2017) 547—552
- [19] **M. V. Shuba, A. G. Paddubskaya, P. P. Kuzhir, S. A. Maksimenko, V. Ksenevich, G. Niaura, D. Seliuta, I. Kašalynas, G. Valusis.** *Nanotechnol.*, **23** (2012) 495714
- [20] **M. V. Shuba, A. Paddubskaya, P. P. Kuzhir, S. M. Maksimenko, E. Flahaut, V. Fierro, A. Celzard, G. Valusis.** *J. Phys. D*, **50**, 08LT01 (2017)
- [21] **V. Neves, E. Heister, S. Costa, C. Tilmaciu, E. Borowiak-Palen, C. E. Giusca, E. Flahaut, B. Soula, H. M. Coley, J. McFadden, S. R. P. Silva.** *Adv. Funct. Mater.*, **20**, N 19 (2010) 3272—3279
- [22] **A. S. Biris, E. I. Galanzha, Z. Li, M. Mahmood, Y. Xu, V. P. Zharov.** *J. Biomed. Opt.*, **14**, N 2 (2009) 021006