

**BIOLOGICZNE ZASTOSOWANIA
NANOLUMINOFORÓW DOMIESZKOWANYCH
LANTANOWCAMI**

**BIOLOGICAL APPLICATIONS OF LANTHANIDE
DOPED NANOMARKERS**

**Małgorzata Misiak^{1,2}, Katarzyna Prorok²,
Artur Bednarkiewicz^{1,2*}**

¹ *Institut Niskich Temperatur I Badań Strukturalnych, PAN,
ul. Okolna 2, 50-422 Wrocław, Polska*

² *Wrocławskie Centrum Badań EIT+,
ul. Stabłowicka 147/149, 54-066 Wrocław, Polska*

**e-mail: A.Bednarkiewicz@int.pan.wroc.pl*

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Właściwości spektroskopowe lantanowców
 - 1.1. Mechanizmy wzbudzenia
 - 1.2. Właściwości luminescencyjne
 - 1.3. Mechanizmy konwersji energii w górę
 - 1.4. Istotne biologicznie właściwości nanoluminoforów
2. Zastosowania w naukach biologicznych
 - 2.1. Testy heterogeniczne
 - 2.2. Testy homogeniczne
 - 2.3. Nanoczujniki luminescencyjne
 - 2.4. Bioobrazowanie
 - 2.5. Terapia fotodynamiczna
 - 2.6. Nanotermometria
 - 2.7. Hypertermia – zlokalizowane podgrzewanie
 - 2.8. Platformy nanobiotechnologiczne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr Małgorzata Misiak studiowała w latach 2005–2010 na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W roku 2010 uzyskała tytuł magistra chemii ze specjalnością chemia biologiczna za pracę magisterską „Kompleksy jonów wapnia i magnezu z ligandami bisfosfonianowymi” (promotor prof. T. Kowalik-Jankowska) wykonaną w Zespole Chemii Bioinorganicznej i Biomedycznej. Od 2011 roku jest zatrudniona we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ w projekcie NanoMat podzadaniu NAOMIS na stanowisku chemika. W ramach projektu jest uczestnikiem studium doktoranckiego w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Obecnie zajmuje się syntezą i cha-

rakterystyką nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców. Jej zainteresowania obejmują ponadto możliwości zastosowania syntezowanych związków w naukach biologicznych.



mgr Katarzyna Prorok w 2011 roku ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego na specjalizacji Chemia fizyczna. Pracę magisterską wykonywała w Zespole Dielektryków. W pracy tej zajmowała się zjawiskiem konwersji energii wzbudzenia z zakresu podczerwonego na widzialny w ScVO_4 domieszkowanym jonami Tm^{3+} , Yb^{3+} . Od 2011 roku jest zatrudniona w WCB EIT+, w projekcie NanoMat, w podzadaniu NAOMIS, którego kierownikiem jest dr inż. Artur Bednarkiewicz. Jej zainteresowania naukowe obejmują syntezę oraz charakterystykę nanoluminoforów, a także ich zastosowanie w biobrazowaniu i biodetekcji.



dr Artur Bednarkiewicz ukończył Wydział Inżynierii Biomedycznej na Politechnice Wrocławskiej w 1998 roku. Tytuł doktora nauk fizycznych uzyskał w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych (INTiBS) Polskiej Akademii Nauk (PAN) we Wrocławiu w 2003 roku. Zarówno pracę magisterską (dotyczącą laserów neodymowych) jak i pracę doktorską (dotyczącą laserów i spektroskopii kryształów domieszkowanych jonami iterbu) wykonał w grupie prof. dr hab. Wiesława Stręka. Po 3 letnim stażu podoktorskim w Joint Research Centre, Italy, Komisji Europejskiej, powrócił do INTiBS PAS i równocześnie zainicjował powstanie interdyscyplinarnego zespołu w ramach Wrocławskiego Centrum

Badań EIT+. Grupa skupia się na wykorzystaniu nanoluminoforów do biodetekcji i biobrazowania – NAOMIS (ang. *Nanoparticle Assisted Molecular Imaging and Sensing*).

ABSTRACT

Fluorescence is one of the most commonly used methods of biodetection, mainly due to the high sensitivity, non-invasiveness, simplicity, and also due to the availability of the whole range of powerful light sources, a wide range of photodetectors, and numerous and sensitive measuring methods. From the point of view of biodetection and bioimaging, the important characteristics of such fluorophores are large Stokes shift, narrow absorption/emission lines as well as stable and efficient luminescence.

Traditional organic dyes applied in biology reveal very fast photobleaching and limited opportunities for simultaneous detection of many biomolecules, what stimulate development of new fluorescent markers. Fast and intensive development of nanotechnology and chemical engineering observed in recent years, aims at designing the nanophosphors or luminescent nanoplatforms, that demonstrate desirable properties and devised functionality. However, new phosphors are not included yet in broad practical applications, mainly because of the need to adapt the measuring apparatus so as to fully exploit their potential. From among the fluorescent nano-particles, silica dye doped nanoparticles, quantum dots, nanocolloidal metallic nanoparticles, and lanthanide doped nanoluminophores show the largest application potential. This article discusses the unique physico-chemical properties of lanthanide doped nanoparticles, which beside very long luminescence lifetimes and narrow emission bands, enable to obtain a visible emission under the near infrared photoexcitation (called anti-Stokes emission), offering improved sensitivity, stability, repeatability and accuracy of the fluorescent biodetection and bioimaging methods.

In this review, physico-chemical properties of lanthanide doped nanoluminophores and many examples of their biological applications have been discussed. The first chapter presents spectral characteristics of rare-earth ions with particular regard to the mechanism of energy transfer and up-conversion, which is a fundamental difference and the decisive advantage compared with other known fluorescent markers. The luminescent properties of lanthanides are demonstrated based on the most commonly used nanomaterials singly doped with Eu^{3+} and Tb^{3+} and the codoped matrices, like Yb^{3+} - Tm^{3+} , Yb^{3+} - Er^{3+} or Yb^{3+} - Ho^{3+} co-doped phosphores. The features of these materials are best suited from the point of view of biodetection and bioimaging. The next chapter gives an overview of the applications of lanthanide doped nanoluminophores in biological sciences. Different types of hetero-/homo-genous tests and luminescence based sensors for pH, CO_2 , the level of glucose, and other analytes are presented. Then, basic aspects of bioimaging, photodynamic and thermo-therapy, nanothermometry as well as nano-bio-technology platforms have been summarized. In conclusion suggestions of new research directions and new biological applications of lanthanide doped nanoparticles have been presented.

Słowa kluczowe: nanoluminofory konwertujące w górę, luminescencja, biotesty, zastosowania biomedyczne

Keywords: up-converting nanoparticles, luminescence, bioassays, biomedical applications

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AF	– autofluorescencja (ang. <i>Autofluorescence</i>)
APBA	– kwas aminofenyloboronowy (ang. <i>Amino Phenyl Boronic Acid</i>)
APTE	– sumowanie fotonów na drodze transferu energii (fr. <i>Addition de Photons par Transferts d'Énergie</i>)
BTB	– błękit bromotymolowy (ang. <i>Bromothymol Blue</i>)
CFU	– jednostka tworząca kolonię (ang. <i>Colony Forming Unit</i>)
CR	– relaksacja krzyżowa (ang. <i>Cross-Relaxation</i>)
CT	– przeniesienia ładunku (ang. <i>Charge-Transfer</i>)
DDS	– matryca krzemionkowa domieszkowana barwnikami organicznymi (ang. <i>Dye-Doped Silica</i>)
ESA	– absorpcja ze stanu wzbudzonego (ang. <i>Excited-State Absorption</i>)
ETU	– sumowania fotonów na drodze transferu energii (ang. <i>Energy-Transfer Upconversion</i>)
F	– fluorofor (ang. <i>Fluorophore</i>)
FRET	– Försterowski rezonansowy transfer energii (ang. <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
FWHM	– szerokość połówkowa (ang. <i>Full Width at Half Maximum</i>)
GSA	– absorpcji ze stanu podstawowego (ang. <i>Ground-State Absorption</i>)
HSA	– ludzka albumina surowicza (ang. <i>Human Serum Albumin</i>)
IgG	– immunoglobulina G (ang. <i>Immunoglobulin G</i>)
Ln:NC	– nanoluminofor domieszkowany jonami lantanowców (ang. <i>Lanthanide:Nanocrystal</i>)
LRET	– luminescencyjny rezonansowy transfer energii (ang. <i>Luminescence Resonance Energy Transfer</i>)
MRI	– obrazowanie rezonansem magnetycznym (ang. <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
NIR	– nisko energetyczne promieniowanie podczerwone (ang. <i>Near Infrared</i>)
NP	– nanocząsteczki (ang. <i>Nanoparticles</i>)
OCT	– optyczna koherentna tomografia komputerowa (ang. <i>Optical Coherence Tomography</i>)
PA	– proces lawinowej emisji fotonów (ang. <i>Photon Avalanche</i>)
PDT	– terapia fotodynamiczna (ang. <i>Photodynamic Therapy</i>)

PET	– pozytonowa emisyjna tomografia komputerowa (ang. <i>Positron emission tomography</i>)
Q	– wygaszacz (ang. <i>Quencher</i>)
QDs	– kropki kwantowe (ang. <i>Quantum Dots</i>)
RET	– rezonansowy transfer energii (ang. <i>Resonance Energy Transfer</i>)
RhBITC	– izotiocyanian rodaminy B (ang. <i>Rhodamine B Isothiocyanate</i>)
SHG	– generacja drugiej harmonicznej (ang. <i>Second Harmonic Generation</i>)
siRNA	– małe inerferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
TCSPC	– metoda zliczania pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo (ang. <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>)
test ELISA	– test immunoenzymatyczny lub immunoenzymosorbcyjny (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
TPE	– emisja dwufotonowa (ang. <i>Two-Photon Emission</i>)
UC	– konwersja energii w górę (ang. <i>Upconversion</i>)
UCNPs	– konwertujące w górę nanoluminofory domieszko- wane jonami lantanowców (ang. <i>Upconverting Nano- particles</i>)
UV	– ultrafiolet (ang. <i>Ultraviolet</i>)

WSTĘP

Nanotechnologia jest nową dziedziną nauki skupiającą się na tworzeniu funkcjonalnych materiałów, urządzeń i systemów. Obserwuje się znaczny postęp w opracowywaniu i optymalizacji technik syntezy, modyfikacji powierzchni oraz nowych i coraz liczniejszych zastosowań nanomateriałów. Szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się funkcjonalne nanomateriały i nanocząsteczki (NP) o wymiarach poniżej 50 nm w zastosowaniach biotechnologicznych i biologicznych. Ich wielkość jest wówczas porównywalna z rozmiarem wielu biomolekuł, a tym samym umożliwia wnikanie w głąb komórek. Pokrycie powierzchni NP odpowiednimi biomolekułami (np. przeciwciałami) powoduje, że mogą krążyć w organizmie nawet przez kilka dni i w sposób selektywny akumulować się w zadanych miejscach organizmu (np. komórkach nowotworów), by następnie umożliwić określenie ich położenia za pomocą obrazowania lub też inicjować zlokalizowaną chemioterapię, termoterapię czy też terapię fotodynamiczną [1, 2].

Istotną zaletą stosowania nanomateriałów jest możliwość łatwej i precyzyjnej kontroli oraz optymalizacji ich właściwości fizyko-chemicznych. Przykładem może być wpływ rozmiaru kropek kwantowych na ich właściwości luminescencyjne [3]. Innym ciekawym przykładem jest odpowiednio zaprojektowana chemiczna modyfikacja powierzchni nanopręcików złota, które pod wpływem obniżonego pH w nowotworach agregują, umożliwiając wykonanie zabiegu zlokalizowanej termoterapii [4, 5]. Nanomateriały wykazują bardzo często właściwości fizykochemiczne istotnie odbiegające od ich makroodpowiedników. Przykładem mogą być kropki kwantowe i nanowytrącenia metali szlachetnych, a także nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców, których właściwości luminescencyjne w skali nano zależą od otoczenia chemicznego [6]. Unikalne właściwości optyczne, elektryczne czy też magnetyczne powodują, że nanomateriały mogą być precyzyjnie zaprojektowane tak, by spełniały równocześnie jedną lub więcej funkcji biotechnologicznych. Istnieją liczne próby łączenia różnych metod obserwacji nanomateriałów (np. metod optycznych, pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej PET oraz rezonansu magnetycznego MRI [7]), funkcji czujnikowych (np. pomiar pH, CO₂, temperatury, obecności analitu, stopnia uwolnienia leku itp.) czy też równoczesnego dostarczenia i uwalniania leków do chorobowo zmienionych tkanek.

Jednym z najpowszechniej stosowanych sposobów biodetekcji czy bioobrazowania jest wykorzystanie znaczników fluorescencyjnych ze względu na ich funkcjonalność, znikomą inwazyjność oraz wysoką czułość pomiaru fluorescencji [8]. Niebagatelne znaczenie mają również aspekty techniczne sposobu detekcji, m.in. dostępność źródeł światła wzbudzenia oraz detektorów zdolnych do rejestracji sygnałów (intensywności, widma, kinetyki, anizotropii itp.). Pomiar fluorescencji pozwala ponadto na zdalny i bezdotykowy odczyt, łatwą integrację i brak interakcji z innymi metodami obrazowania (ang. *Optical Coherent Tomography*, OCT; ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) czy detekcji (np. pomiary impedancji). Istotne jest również tzw. multipleksowanie, czyli zdolność wykrywania wielu ana-

litów w jednej próbce, możliwe dzięki spektralnej dekonwolucji emisji pochodzącej z wielokolorowych fluoroforów obecnych w próbce. Ta właściwość wpływa na wydajność i przepustowość testów diagnostycznych, co z kolei odgrywa istotną rolę w badaniach nowych leków czy w testach schorzeń genetycznych.

W ostatnich latach, jako sondy fluorescencyjne w biologicznej detekcji stosowano barwniki organiczne, białka fluorescencyjne, a także chelaty lantanowców (Eu^{3+} i Tb^{3+}). Posiadają one wiele zalet takich jak biokompatybilność, łatwość ich modyfikacji poprzez kowalencyjną koniugację molekuł oraz relatywnie wysoką wydajność fluorescencji. Znaczniki te wykazują jednak krótkie czasy życia stanów wzbudzonych (prócz kompleksów lantanowców), są toksyczne, ulegają fotowysbieleniu i chemicznej degradacji. Dodatkowo barwniki organiczne zazwyczaj charakteryzują się względnie szerokimi pasmami absorpcji oraz emisji, przez co utrudniona jest ich detekcja [9]. Ponieważ trudno jest selektywnie wzbudzić pojedynczy fluorofor, trudno jest również spektralnie odseparować emisję pochodzącą od różnych znaczników.

Aby uzyskać stabilne i wydajne luminofory, opracowane zostały nanowymiarowe hybrydy organiczno/nieorganicznych nanocząstek, składających się z polimeru bądź też krzemionkowej matrycy domieszkowanej barwnikami organicznymi [10]. W przypadku pokrycia polimerem (np. polistyrenem) otrzymane cząsteczki wykazywały jednak skłonność do aglomeracji, a także uszkodzenia powłoki, co w konsekwencji prowadziło do wycieku barwników i uniemożliwiało ich zastosowanie w charakterze biomarkerów luminescencyjnych [11]. Znacznie korzystniejsze parametry udało się uzyskać w przypadku luminoforów składających się z matrycy krzemionkowej domieszkowanej barwnikami organicznymi (ang. *Dye Doped Silica*, DDS). Poprawie uległa wydajność kwantowa fluorescencji oraz fotostabilność. Uzyskane związki można stosunkowo łatwo zdyspergować w wodzie, a także zmodyfikować ich powierzchnię poprzez sprzężenie bioaktywnych molekuł. Ponadto, wielkość cząstek i zakres spektralny fluorescencji mogą być stosunkowo łatwo dostosowane do wymagań konkretnego zastosowania. Krzemionka separuje cząsteczki barwnika od środowiska zewnętrznego, przez co są one chronione przed działaniem tlenu, wody, a także rozpuszczalników, dzięki czemu ograniczone jest ich fotowysbielenie oraz degradacja [12]. Co więcej, krzemionka jest fotochemicznie obojętna, przezroczysta dla światła widzialnego, nie bierze udziału w procesie transferu energii ani elektronów. W zależności od wielkości krzemionkowej nanocząsteczki można w niej umieścić od kilkuset do kilku tysięcy molekuł barwników, co może skutkować nawet 10 000-krotnym zwiększeniem intensywności sygnału fluorescencji w porównaniu z pojedynczymi molekułami fluoroforów organicznych [13]. DDS były stosowane jako sondy dla ultraczułego bioobrazowania i detekcji [14], a także, do monitorowania złożonych procesów biologicznych na poziomie komórkowym [15]. DDS pozwalają również na selektywne znakowanie szerokiej gamy biomolekuł, komórek rakowych i mikroorganizmów [16].

Molekuły barwników umieszczone w krzemionkowej matrycy charakteryzują się szerokimi pasmami absorpcji i emisji oraz krótkimi czasami życia fluorescencji. Utrudnia to analizy, które wymagają znakowania i śledzenia wielu, jednocześnie przebiegających procesów biologicznych. Interesujące rozwiązanie tego problemu zaproponowali Wang i Tan [13], którzy domieszkowali nanocząsteczki krzemionkowe kilkoma różnymi rodzajami cząsteczek barwników fluorescencyjnych. Spektralne kody barwne powstały na skutek wielokrotnego rezonansowego transferu energii (FRET) między poszczególnymi barwnikami w DDS. Uzyskane w ten sposób duże przesunięcie Stokesa oraz możliwość stworzenia wielu kodów barwnych jest bardzo interesującym rozwiązaniem z punktu widzenia analiz wieloparametrycznych [13].

Wraz z rozwojem nanotechnologii, jako alternatywa dla typowych bioznaczników fluorescencyjnych pojawiły się nowe materiały luminescencyjne o konkurencyjnych właściwościach fizykochemicznych. Przykładem są półprzewodnikowe kropki kwantowe (ang. *Quantum Dots*, QDs) oraz nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców (ang. *Lanthanide Doped Nanocrystal*, Ln:NC).

Kropki kwantowe są kilku nanometrowymi, półprzewodnikowymi krystalitami składającymi się z atomów II-VI (np. CdS, CdTe, CdSe, ZnSe) oraz III-V (np. InP, InAs) grupy układu okresowego [17]. Luminescencja tych nanocząsteczek wynika z efektów kwantowych, które wpływają na dyskretyzację gęstości dozwolonych stanów elektronowych. Właściwości spektroskopowe QDs w dużej mierze zależą od rozmiaru i kształtu krystalitu, te parametry z kolei mogą być precyzyjnie kontrolowane podczas syntezy przez dobór czasu i temperatury oraz odpowiednie ligandy [18–20]. Ponadto, kropki kwantowe cechują się szerokim zakresem absorpcji promieniowania UV oraz emisją w zakresie widzialnym zależną od rozmiaru nanokrystalitu [21]. Szerokość połowkowa pasma emisji (ang. *Full Width Half Maximum*, FWHM) kropek kwantowych w zależności od ich składu i rozmiaru wynosi 40–80 nm. Jest ona wystarczająca do dekonwolucji spektralnej emisji i detekcji co najmniej kilku analitów znakowanych różnymi kropkami kwantowymi w jednej próbce. Poprzez umieszczenie różnych kropek kwantowych a także regulację ich względnych koncentracji w krzemionkowych kulkach, uzyskuje się kody barwne [22, 23]. Takie znaczniki są za duże, by mogły być wykorzystane w biologicznych badaniach *in vivo*, jednak nadają się do testowania leków czy też badań przesiewowych schorzeń genetycznych. Wydajna luminescencja kropek kwantowych może być również użyta w czujnikach opartych na efekcie FRET, tj. Försterowskim rezonansowym transferze energii, gdzie pełnią one funkcję donora dla organicznych akceptorów [24, 25]. Ze względu na toksyczność metali ciężkich, wchodzących w skład typowych kropek kwantowych (Cd, Se itp.), a także w celu poprawy ich właściwości spektroskopowych (np. wyeliminowania fotomigotania, fotowysielania, poprawy bezwzględnej intensywności emisji) opracowano metody syntezy pozwalające na uzyskanie struktur typu rdzeń–powłoka. Pokrycie QD nieorganiczną warstwą (np. ZnS [26], SiO₂ [27]), bądź też organicznym polimerem [28] minimalizuje ich cytotoxyczność [29]

i poprawia biokompatybilność oraz właściwości emisyjne. Powłoka chroni również półprzewodnikowy rdzeń przed chemiczną degradacją. Pokrycie powłoką ma szczególne znaczenie z punktu widzenia nanotoksykologii, ograniczonej akumulacji i zdolności do wydalania tych nanokrystalitów z organizmu [30].

W niniejszym artykule, omówione zostały właściwości oraz zastosowania biotechnologiczne innej, obiecującej grupy nanoluminoforów, których luminescencja pochodzi z optycznie aktywnych jonów lantanowców zamkniętych w nanorozmiarowych matrycach dielektrycznych. Zaletami tych nanoluminoforów są m.in. wąskie linie absorpcyjne i emisyjne (FWHM 10–20 nm), długie czasy zaniku luminescencji (μs –ms), bardzo duża fotostabilność, a także możliwość uzyskania wydajnej emisji anty-Stokesowskiej. Stosowane matryce dielektryczne nie zawierają szkodliwych komponentów, więc w przeciwieństwie do wielu barwników organicznych czy kropek kwantowych uważane są za nietoksyczne [31]. Istniejące doniesienia literaturowe potwierdzają znikomą toksyczność chemiczną tych związków [32, 33], jednak problem toksykologii nanomateriałów jest bardziej złożony i nie ogranicza się jedynie do składu chemicznego. Współczesna toksykologia dopiero wypracowuje metody szacowania szkodliwości wytworów nanotechnologii, mając na uwadze zarówno mały rozmiar, wysoką reaktywność chemiczną nanocząsteczek, ich głęboką penetrację i długą retencję w organizmie, oraz wysoki stosunek powierzchni do objętości nanocząsteczek [34, 35].

Biologiczne zastosowania nanomateriałów wymagają jednak opracowania i optymalizacji metod modyfikacji ich powierzchni [36–38]. Funkcjonalizacja i biokoniugacja powierzchni nanoznaczników zapewnia nie tylko biokompatybilność, ale przede wszystkim jest istotna dla uzyskania biospecyficzności, czyli selektywnego wykrywania biomolekuł (np. białek, antygenów, DNA, RNA, komórek nowotworowych itp.) [39]. Zarówno nanoluminofory domieszkowane lantanowcami, jak i metody ich biodetekcji czy bioobrazowania pozwalają zminimalizować lub nawet wyeliminować wpływ innych biokomponentów obecnych w próbkach biologicznych. Jak wiadomo, komórki i tkanki silnie rozpraszają, absorbują lub emitują światło, co w wielu przypadkach utrudnia prowadzenie ultraczułych pomiarów [40]. Ponadto, możliwość projektowania właściwości optycznych tych nanoluminoforów przez dobór matrycy, syntezę kompozytów i struktur typu rdzeń–powłoka, kontrolę fazy krystalicznej czy też składu domieszek, może prowadzić do szeregu nowych biotechnologicznych zastosowań. Może to służyć przyspieszaniu i uproszczeniu pomiarów biologicznych, takich jak testy obecności drobnoustrojów chorobotwórczych, czy też wykrywania mutacji genetycznych w testach przesiewowych [41].

1. WŁAŚCIWOŚCI SPEKTROSKOPOWE LANTANOWCÓW

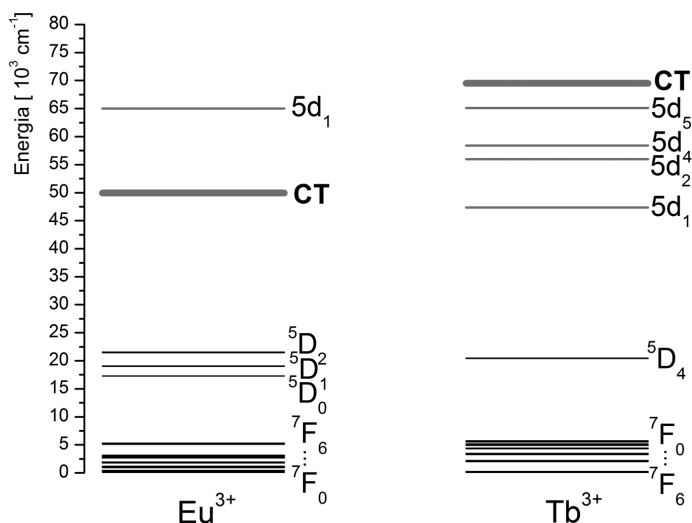
1.1. MECHANIZMY WZBUDZENIA

Luminescencja jonów lantanowców może być wynikiem trzech rodzajów przejść elektronowych: przeniesienia ładunku (ang. *charge transfer*, CT), przejść pomiędzy powłokami 4f i 5d oraz najbardziej charakterystycznych dla jonów lantanowców przejść w obrębie powłoki 4f. Przejścia CT związane są z przeniesieniem elektronu walencyjnego z liganda na orbital metalu lub z procesem odwrotnym, z jonu metalu na ligand. Przejścia te są dozwolone regułami Laporte, co wiąże się z wysokim przekrojem czynnym na absorpcję. Najczęściej występują przy wzbudzeniu wysokoenergetycznym promieniowaniem UV o energii około 40000 cm^{-1} ($\lambda < 250\text{ nm}$). Wyjątek stanowią jony, które mogą być relatywnie łatwo zredukowane do +2 stopnia utlenienia (Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+}), bądź też utlenione do +4 (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Tb^{3+}). W tym przypadku przejście CT występuje przy energii około $30\,000\text{ cm}^{-1}$ ($\lambda < 330\text{ nm}$) [42]. Przejścia te skutkują pojawieniem się szerokich pasm o intensywności zależnej od symetrii otoczenia jonu centralnego. Na Rysunku 1 przedstawiono schemat poziomów energetycznych jonów Eu^{3+} oraz Tb^{3+} z uwzględnieniem poziomów 5d oraz pasm CT. Często obserwowanym przejściem CT w widmach elektronowych pierwiastków ziem rzadkich jest przejście $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$, którego maksimum znajduje się przy około 250 nm. W przypadku jonów Eu^{3+} przejście to pełni funkcję tak zwanej anteny efektywnie absorbującej energię wzbudzenia i przekazującej ją do poziomów ${}^4\text{F}_6$. Jako skutek tego transferu obserwuje się emisję światła o większej intensywności niż w przypadku luminoforu, w którym CT nie zachodzi, a proces wzbudzenia odbywa się przez przejścia f-f [43]. Wykorzystanie nanoznaczy, w których istnieje możliwość wywołania luminescencji poprzez wzbudzenie pasma CT, jest jednak problematyczne z kilku powodów. Po pierwsze, światło ultrafioletowe z tego zakresu jest szkodliwe dla komórek i tkanek. Po drugie, promieniowanie to jest silnie rozpraszane na strukturach komórkowych oraz pochłaniane przez chromofory tkankowe, indukując w wielu przypadkach ich autofluorescencję (AF). Jeśli jednak AF jest zaniechywalna, a pomiar następuje w biotestach *in vitro*, nanoluminofory mogą być bardzo interesującą alternatywą, np. dla chromatografii czy elektroforezy zastępując kłopotliwe testy izotopowe [44, 45].

Kolejnym rodzajem przejść elektronowych, występującym w jonach ziem rzadkich, są przejścia pomiędzy powłokami 4f \rightarrow 5d. Ich energia w dużej mierze zależy od środowiska otaczającego jon metalu, gdyż zewnętrzne orbitale 5d wchodzi w bezpośrednią interakcję z orbitalami otaczającymi je ligandów. Jako przykład mogą posłużyć trójodwartne jony ceru, których długość emitowanej fali może wynosić od 290 do 400 nm w zależności od matrycy, w której są umieszczone. Przejścia 4f \rightarrow 5d wymagają użycia wysokoenergetycznego promieniowania i są obserwowane tylko dla niektórych trójodwartnych jonów, takich jak Ce^{3+} , Pr^{3+} , Tb^{3+} oraz dwudodwartnych np. Eu^{2+} , Yb^{2+} , Sm^{2+} [42]. Przejścia 4f \rightarrow 5d są przejściami dozwolonymi regułami

wyboru, co skutkuje szerokimi i intensywnymi pasmami emisji, oraz relatywnie krótkimi czasami życia stanu wzbudzonego (kilka μs).

W większości przypadków widzialna emisja lantanowców pochodzi z przejść elektronowych w obrębie powłoki f ($4f \rightarrow 4f$). Przejścia te są przejściami zabronionymi regułami Laporte, więc przekrój czynny na absorpcję takich materiałów jest około 2–3 rzędy mniejszy niż dla barwników organicznych czy kropek kwantowych. Z kolei czasy życia luminescencji (tj. średni czas przebywania elektronów w stanie wzbudzonym) sięga dziesiątek mikrosekund, do nawet pojedynczych milisekund. Elektrony znajdujące się na powłoce 4f są silnie ekranowane przez całkowicie zapełnione powłoki $5s^2$ i $5p^6$, dzięki czemu są one chronione od otaczającego je środowiska. Słabo oddziałują z otoczeniem i nie biorą udziału w tworzeniu wiązań chemicznych. W konsekwencji czynniki zewnętrzne (np. pole krystaliczne) mają niewielki wpływ na właściwości spektroskopowe jonów lantanowców na +3 stopniu utlenienia. Konsekwencją są wąskie pasma absorpcji i emisji jonów lantanowców umieszczonych w nieorganicznej matrycy (FWHM wynosi około 10–20 nm), które przypominają zazwyczaj widma wolnego jonu [46]. Z powodu wąskich i słabych pasm absorpcji lantanowców, korzystne jest stosowanie wąskich spektralnie i intensywnych źródeł światła, np. laserów lub diod LED. Z kolei dostępne na rynku ultraczułe fotodetektory, umożliwiają detekcję pojedynczych fotonów. Tak więc, mimo stosunkowo niedużej bezwzględnej intensywności luminescencji znaczników zawierających jony lantanowców, detekcja czy biobrazowanie z ich użyciem nie stanowi technicznej przeszkody. Ponadto, niewielka szerokość połówkowa emisji lantanowców w matrycach krystalicznych pozwala na łatwą interpretację widm w przypadku, gdy dochodzi do nakładania się pasm emisji kilku jonów. Długie czasy zaniku fluorescencji umożliwiają również, w technicznie prosty sposób, poprzez pomiary rozdzielcze w czasie, zniwelować autofluorescencję komponentów biologicznych. Jedną z podstawowych zalet matryc (współ)domieszkowanych jonami lantanowców jest możliwość uzyskania wydajnej emisji anty-Stokesowskiej, tj. emisji wysokoenergetycznych fotonów przy wzbudzeniu fotonami o mniejszej energii. Zjawiska dwufotonowej emisji barwników organicznych i kropek kwantowych są znane i stosowane w biologii i obrazowaniu biologicznym, jednak lantanowce oferują kilka rzędów wielkości wyższą efektywność tych procesów [37, 47, 48]. Procesy transferu energii i konwersji energii w górę, zostaną omówione poniżej.



Rysunek 1. Schemat poziomów energetycznych jonów Eu^{3+} oraz Tb^{3+}
 Figure 1. Energy level diagram of Eu^{3+} and Tb^{3+} ions

1.2. WŁAŚCIWOŚCI LUMINESCENCYJNE

Emisja jonów ziem rzadkich obejmuje cały zakres spektralny od UV (Gd^{3+}) poprzez promieniowanie widzialne (Tm^{3+} – niebieskie, Tb^{3+} – zielone, Sm^{3+} – pomarańczowe, Eu^{3+} – czerwone) do zakresu NIR (Pr^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) [49]. Dwa jony, La^{3+} i Lu^{3+} , nie wykazują przejść f-f, dlatego w ich przypadku nie obserwuje się emisji światła. Położenie pasm emisji f-f nie zależy od składu chemicznego matrycy oraz od fizycznych rozmiarów kryształitów. Jednak struktura tych pasm oraz względna intensywność, a także czasy życia emisji podlegają zmianom przy redukcji rozmiarów. Wynika to z rosnącego wówczas stosunku powierzchni do objętości nanokryształitów, i wszystkich, wynikających z tego faktu konsekwencji. Na powierzchni nanokryształitów obecne są ligandy, których drgania mogą modyfikować procesy transferu energii lub modulować emisję promienistą i niepromienistą. W nanomateriałach obserwuje się mniejszą gęstość fononów niż w matrycach mikrokrystalicznych [50]. Ponadto, przejścia dipolowo-dipolowe silnie zależą od współczynnika załamania ośrodka, w którym następuje emisja fotonów [6, 51]. W przypadku nanomateriałów efektywny współczynnik załamania, zależny od parametrów matrycy oraz chemicznego otoczenia, determinuje właściwości emisyjne jonów lantanowców [6]. Jedną z najcenniejszych zalet nanoluminoforów domieszkowanych lantanowcami w zastosowaniach biologicznych jest możliwość uzyskania emisji anty-Stokesowskiej [52]. Zjawisko to, nazywane konwersją energii w górę (ang. *Up-conversion*, UC), jest nieliniowym procesem optycznym, w którym wzbudzając nisko energetycznym promieniowaniem podczerwonym (NIR) otrzymuje się emisję światła widzialnego, bądź też ultrafioletowego, o energii fotonów wyższej niż energia foto-

nów promieniowania pompującego. Pojęcie konwersji energii w górę zostało pierwszy raz sformułowane przez Auzela, w połowie lat sześćdziesiątych. W 1966 roku, zademonstrowano luminofor CaWO_4 współdomieszkowany jonami Yb^{3+} i Er^{3+} , w którym zachodziła efektywna konwersja dwóch niskoenergetycznych fotonów (~ 1000 nm) na fotony o wyższej energii (540 i 650 nm) [53]. Dalsze badania zjawiska konwersji promieniowania podczerwonego na widzialne umożliwiły rozwój takich urządzeń jak detektory kwantowe [54], czujniki temperatury [55] oraz lasery [56]. Wykorzystanie efektu UC ograniczone było przez ponad 30 lat jedynie do materiałów monokrystalicznych i mikrometrycznych proszków. Wzrost zainteresowania nanotechnologią i nanocząsteczkami nastąpił na początku lat dziewięćdziesiątych. Dostrzeżono możliwość zastosowania konwertujących w górę nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców (ang. *Up-converting Nanoparticles*, UCNPs) w testach bioanalitycznych oraz w obrazowaniu luminescencyjnym [38]. Jednakże wykorzystanie zjawiska konwersji energii w biologii i medycynie było ograniczone głównie ze względu na trudność syntezy nanorozmiarowych cząstek, które wykazywałyby wysoką intensywność emisji oraz wysoką dyspersję i stabilność koloidalną w zawiesinach wodnych. Dopiero pod koniec lat dziewięćdziesiątych UC została wykorzystana w testach biologicznych i obrazowaniu medycznym [57].

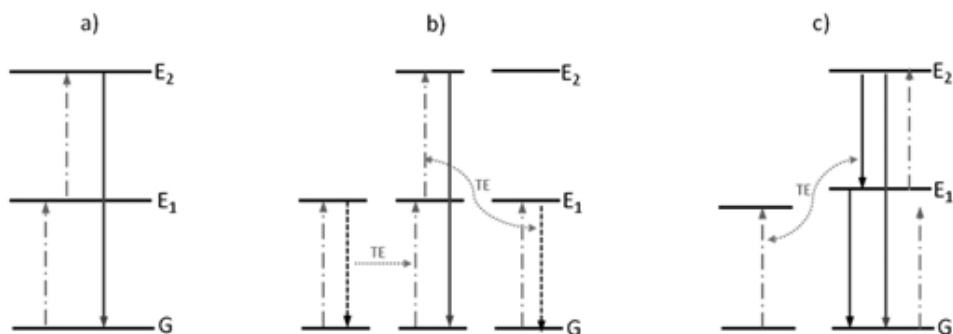
Konwertujące w górę nanoluminofory koloidalne syntezowane są zwykle jako nieorganiczne matryce – najczęściej halogenki lub tlenki np. NaYF_4 , LaF_3 , YF_3 , Y_2O_3 , domieszkowane optycznie aktywnymi trójwartościowymi jonami lantanowców np. Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} . Większość luminoforów zawiera jony Yb^{3+} stosowane jako uczulacz, a także jony Er^{3+} , Tm^{3+} , Ho^{3+} , rzadziej Pr^{3+} w charakterze emitera. Badania wykazały, że ze względu na właściwości fononowe, najbardziej efektywnymi w procesie konwersji energii w górę są kryształy fluorków $\beta\text{-NaYF}_4$ domieszkowane jonami $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ lub $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ [58–60].

1.3. MECHANIZMY KONWERSJI ENERGII W GÓRĘ

Proces konwersji energii w górę może zachodzić według jednego z następujących mechanizmów: (1) absorpcji ze stanu wzbudzonego ESA (ang. *Excited State Absorption*), (2) sumowania fotonów (fr. *Addition de Photons par Transferts d'Énergie*, APTE) na drodze transferu energii ETU (ang. *Energy Transfer Up-conversion*) oraz (3) w procesie lawinowej emisji fotonów PA (ang. *Photon Avalanche*). Procesy te polegają na absorpcji kolejnych fotonów wzbudzających, a sam mechanizm fizyczny znacznie się różni od wielofotonowej absorpcji i generacji wyższych harmonicznych. UC wmatrycy $\beta\text{-NaYF}_4$ domieszkowanej jonami Er^{3+} oraz Yb^{3+} charakteryzuje się około 10^5 razy większą wydajnością niż ma to miejsce w przypadku rodaminii 6G oraz fluoresceiny, w których emisja światła jest wynikiem dwufotonowej absorpcji [61]. Zademonstrowano, że sprawność konwersji energii w górę (η_{UC}) jest 3 [47] do 10^7 [48] razy większa w porównaniu do wydajności dwufotonowej absorpcji w kropkach kwantowych (η_{QDs}). Istnieją również inne możliwe procesy konwersji energii

w górę, jak na przykład kooperatywna emisja (obserwowana w parach jonów Yb^{3+}), kooperatywne uczulanie (np. w Yb^{3+} - Eu^{3+}) czy też procesy nieliniowe (np. generacja drugiej harmonicznej). Wydajność tych procesów jest jednak 3 do 10 rzędów niższa niż proces APTE [62].

Na Rysunku 2a przedstawiono mechanizm absorpcji ze stanu wzbudzonego, w którym wzbudzenie następuje poprzez absorpcję kolejnych fotonów pompujących $h\nu_{\text{ex}}$, w obrębie jednego jonu. W wyniku absorpcji fotonu $h\nu_{\text{ex}} = E_1 - G$, elektron ze stanu podstawowego G jest przeniesiony do stanu E_1 . Proces ten nosi nazwę absorpcji ze stanu podstawowego (GSA). Absorpcja kolejnego fotonu przez ten sam jon, powoduje wzbudzenie elektronów, tym razem z poziomu E_1 do kolejnego wyższego poziomu E_2 , z którego następuje emisja światła ($E_2 \rightarrow G$), przy czym $E_2 - G > h\nu_{\text{ex}}$. Absorpcja ze stanu wzbudzonego jest bezpośrednim skutkiem metastabilnego charakteru stanów wzbudzonych w jonach lantanowców, co wiąże się z dużym prawdopodobieństwem absorpcji fotonów przez wzbudzony jon. Dodatkowym warunkiem zaistnienia ESA jest dopasowanie energetyczne fotonów wzbudzających i różnicy energetycznej $\Delta E = E_2 - E_1$ pomiędzy wzbudzonymi poziomami E_1 i E_2 .



Rysunek 2. Schemat najbardziej wydajnych mechanizmów konwersji energii w górę. a) Absorpcja ze stanu podstawowego (GSA) $G \rightarrow E_1$, i absorpcja ze wzbudzonego (ESA) $E_1 \rightarrow E_2$; b) sumowanie fotonów (APTE) na drodze transferu energii (ETU); c) proces lawinowy (PA). Czerwoną linią -.-. zaznaczono wzbudzenie, czarną linią ---- bezpromienistą relaksację, natomiast linią ciągłą - emisję.

Figure 2. Most efficient UC processes found in lanthanide doped nanoparticles. a) Excited state absorption (ESA), b) energy transfer upconversion (ETU), c) photon avalanche (PA). The dash-dotted red, dashed black and solid arrows represent photon excitation, nonradiative relaxation and emission processes, respectively.

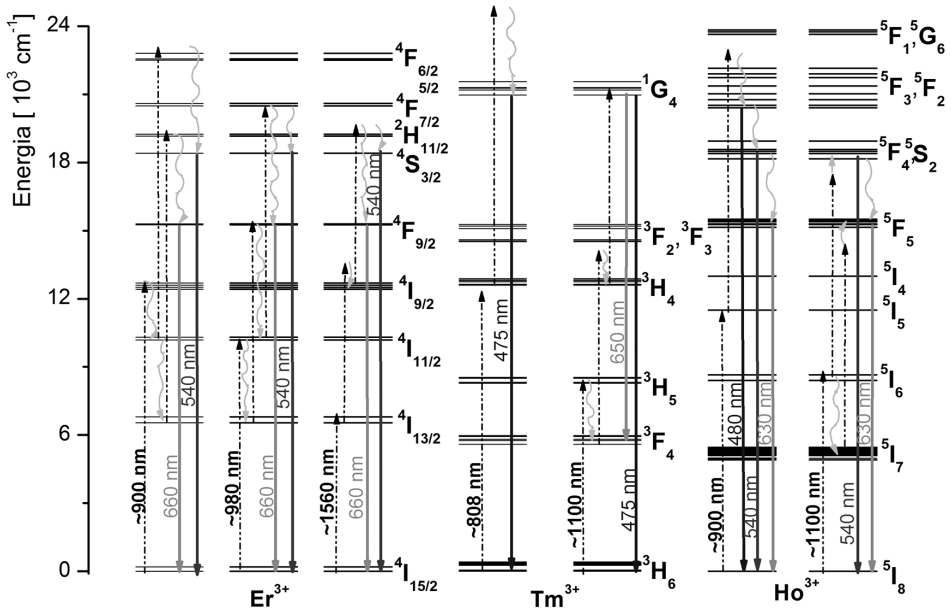
Na wydajność procesu konwersji w górę, ma również wpływ różnica energii ΔE między poziomem emitującym a dowolnym, niżej leżącym, poziomem energetycznym (tzw. przerwa energetyczna). Zgodnie z prawem przerwy energetycznej [63], wraz ze wzrostem tej różnicy, prawdopodobieństwo depopulacji poziomów wzbudzonych na drodze bezpromienistej maleje eksponencjalnie. Depopulacja bezpromienista staje się nieefektywna, gdy wartość ΔE jest przynajmniej pięciokrotnie większa od energii fononów dostępnych w matrycy. Proces ten ma krytyczne znaczenie dla obsadzenia poziomów energetycznych i wydajności kwantowej emisji. Jak

pokazano na Rysunku 3, jony Er^{3+} oraz Tm^{3+} posiadają stosunkowo duże przerwy energetyczne pomiędzy poziomami pośrednimi a emitującymi, co skutkuje wydajną emisją anty-Stokesowską. Prawo przerwy energetycznej ma szczególne znaczenie przy wyborze matrycy, która będzie domieszkowana. Poszukiwane są materiały o jak najmniejszej częstotliwości odcięcia (ω_{max}), tzn. o niskoenergetycznych drganiach sieci krystalicznej, po to, by zminimalizować bezpromienistą depopulację poziomów energetycznych. Dlatego matryce fluorkowe (np. NaYF_4 , LaF_3 , SrF_2) oraz chlorkowe (np. LaCl_3) o $\omega_{\text{max}} \sim 250\text{--}350\text{cm}^{-1}$ pozwalają uzyskać wydajniejszą luminescencję anty-Stokesowską w porównaniu do matryc tlenkowych (np. YAlO_3 , $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) o $\omega_{\text{max}} \sim 550\text{--}700\text{cm}^{-1}$ [64].

Przykładem absorpcji ze stanu wzbudzonego jest anty-Stokesowska emisja obserwowana w jonach Er^{3+} . Różnica energetyczna pomiędzy poziomem ${}^4\text{I}_{11/2}$ a ${}^4\text{I}_{15/2}$ ($\sim 10350\text{ cm}^{-1}$) jest w przybliżeniu równa różnicy energetycznej pomiędzy poziomem ${}^4\text{F}_{7/2}$ a ${}^4\text{I}_{11/2}$ ($\sim 10370\text{ cm}^{-1}$). Dzięki takiej konfiguracji poziomów energetycznych ${}^4\text{I}_{15/2}$, ${}^4\text{I}_{11/2}$ oraz ${}^4\text{F}_{7/2}$, jony erbu przy wzbudzeniu promieniowaniem 980 nm wykazują konwersję energii w górę. Na Rysunku 3 przedstawiono schematy konwersji energii w górę w jonach Er^{3+} , Tm^{3+} oraz Ho^{3+} , które często stosowane są jako aktywatory. Luminofory domieszkowane pojedynczo lantanowcami charakteryzują się jednak niską wydajnością procesów konwersji energii, głównie ze względu na procesy wygaszania koncentracyjnego oraz niekorzystnie niskie przekroje czynne na ESA. Źródłem wygaszania koncentracyjnego jest tzw. relaksacja krzyżowa (ang. *Cross-relaxation*, CR), która w wyniku transferu energii między dwoma jonami prowadzi do depopulacji stanów wzbudzonych. Na podstawie schematu energetycznego przedstawionego na Rysunku 2b, proces wygaszania koncentracyjnego można wyjaśnić następująco. Dwa sąsiadujące jony znajdujące się w stanach podstawowym G oraz wzbudzonym E_2 , przechodzą w wyniku procesu CR do poziomów energetycznych E_1 . Proces relaksacji krzyżowej jest zależny od dopasowania energii między odpowiednimi poziomami ($E_1 - G$ względem $E_2 - E_1$), a także od koncentracji jonów aktywnych, a tym samym od odległości między nimi.

Kolejnym mechanizmem konwersji energii w górę, który może zachodzić pomiędzy jonami lantanowców, jest proces lawinowej emisji fotonów. Schemat tego procesu został przedstawiony na Rysunku 2c. Charakterystyczny dla tego procesu jest brak absorpcji ze stanu podstawowego, wynikający z niedopasowania energetycznego pomiędzy poziomem G a E_1 z energią fali wzbudzającej. Promieniowanie pompujące jest natomiast rezonansowo dopasowane do przejść pomiędzy metastabilnym poziomem E_1 a stanami o wyższej energii E_2 . Poziom E_1 jest początkowo pusty, a jego obsadzenie buduje się powoli w wyniku emisji $E_2 \rightarrow E_1$ lub w wyniku procesów niepromienistego transferu energii (np. relaksacji krzyżowej). Objawia się to występowaniem progowej wartości mocy wzbudzenia, powyżej której obserwuje się lawinowy wzrost intensywności emisji. Po przekroczeniu progu procesu lawinowego, promieniowanie wzbudzające jest silnie absorbowane w wyniku ESA, a intensywność fluorescencji wzrasta o kilka rzędów. Proces lawinowej emisji fotonów jest bardzo interesującym, ale niezbyt często spotykanym zjawiskiem, gdyż zależy od

subtelnego współgrania wielu parametrów takich jak czasy życia stanów wzbudzonych, schemat poziomów energetycznych, wielkość niedopasowania energii między odpowiednimi poziomami elektronowymi [65–71].

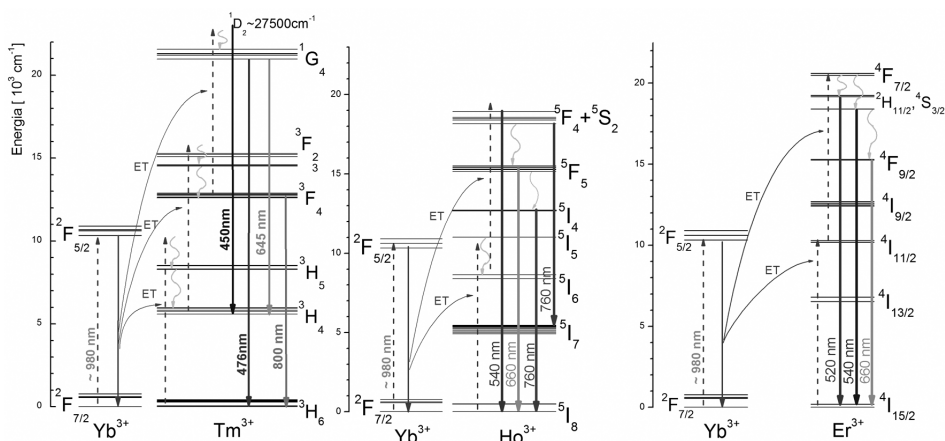


Rysunek 3. Schematy poziomów energetycznych i mechanizmów konwersji energii w górę w jonach Er^{3+} , Tm^{3+} oraz Ho^{3+} dla różnych linii wzbudzających (900, 980, 1560 nm dla Er^{3+} , 808 i 110 nm dla Tm^{3+} oraz 900 i 1100 nm dla Ho^{3+}). Linia przerywaną zaznaczono wzbudzenie; linią falowaną wielofononową relaksację, linią ciągłą – emisję.

Figure 3. Schematic energy level diagram showing typical UC processes for Er^{3+} , Tm^{3+} and Ho^{3+} using different excitation light. The dashed, wavy and solid arrows represent photon excitation, multiphonon relaxation and emission processes, respectively.

Aby uniknąć niepromienistej depopulacji poziomów wzbudzonych koncentracja jonów aktywatorów winna być odpowiednio niska i dobrana do stosowanej matrycy. Stosowanie niskich stężeń jonów domieszkujących prowadzi niestety do obniżenia bezwzględnej intensywności luminescencji. Dodatkowo, większość jonów ziem rzadkich, posiada niski czynny przekrój na absorpcję promieniowania z zakresu NIR, co powoduje, że materiały zawierające tylko jeden rodzaj domieszki, charakteryzują się niską wydajnością konwersji energii wzbudzenia. Istotny wzrost efektywności tych procesów następuje w przypadku dodawania fotonów zgodnie z mechanizmem ETU, którego schemat został przedstawiony na Rysunku 2b. W tym celu matrycę współdomieszkują jony aktywatorów oraz jony spełniającymi rolę uczulacza, głównie jonami Yb^{3+} . Jony te posiadają prosty schemat poziomów energetycznych, tylko z jednym stanem wzbudzonym $^2\text{F}_{5/2}$ (Rys. 4). Intensywne pasmo absorpcji przy około 980 nm, można przypisać przejściu $^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$. Pasmo to może być skutecznie pompowane bardzo wydajnymi diodami laserowymi (np.

InGaAs/GaAs 900–1100 nm). Wzbudzone jony iterbu wykazują długie czasy zaniku luminescencji dzięki czemu są zdolne do magazynowania energii. Struktura elektronowa iterbu minimalizuje dodatkowo niekorzystne procesy tłumienia koncentracyjnego, więc stężenie jonów Yb^{3+} w matrycy może 10–20 krotnie przewyższać ilość jonów aktywatora. Istnieją też nanomateriały pełnokoncentracyjne, np. $\text{NaYbF}_4:\text{Tm}^{3+}$ [72, 73], które mogą bardzo efektywnie absorbować promieniowanie wzbudzające obniżając tym samym próg emisji. Co ważne, wspomniane przejście jest quasi-rezansowe w stosunku do przejść f-f wielu innych lantanowców, co sprzyja efektywnemu transferowi energii między jonami uczulacza a aktywatora. Najbardziej efektywną konwersję energii w górę wykazują matryce współdomieszkowane parami jonów: $\text{Er}^{3+}-\text{Yb}^{3+}$ [59] oraz $\text{Tm}^{3+}-\text{Yb}^{3+}$ [74]. Na Rysunku 4 przedstawiono schematy energetyczne procesów konwersji energii w wymienionych parach jonów.



Rysunek 4. Schematy energetyczne przedstawiające proces UC zachodzący w parach jonów $\text{Yb}^{3+}-\text{Tm}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+}-\text{Ho}^{3+}$ oraz $\text{Yb}^{3+}-\text{Er}^{3+}$. Linia przerywaną oznaczono wzbudzenie, falowaną wygaszanie bezpromienne, natomiast linią ciągłą przedstawiono emisję fotonów.

Figure 4. Upconversion mechanism of the Yb/Er, Yb/Tm and the Yb/Ho co-doped UCNPs. The dashed, wavy and solid arrows represent photon excitation, multiphonon relaxation and emission processes, respectively.

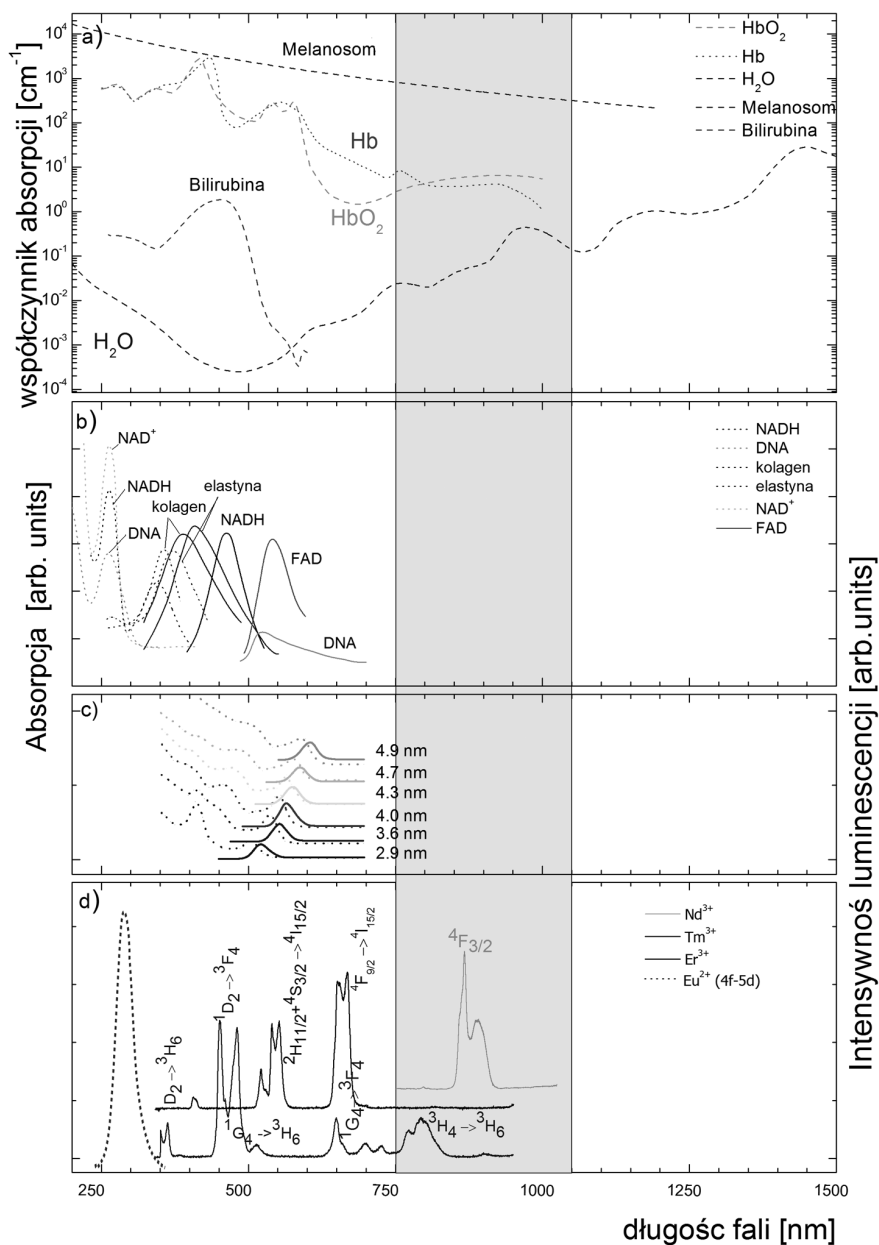
Absorpcja promieniowania o długości fali 980 nm przez jon uczulacza (Yb^{3+}) prowadzi do transferu energii i wzbudzenia jonów aktywatora (np. Tm^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+}), w których obserwuje się emisję światła widzialnego. W przypadku jonów Tm^{3+} silna niebieska emisja powstaje w wyniku przejścia $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{F}_4$ oraz $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$. Natomiast emisja światła czerwonego, o mniejszej intensywności, pochodzi z przejścia $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_4$. W przypadku domieszkowania jonami $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$, obserwowana emisja pochodzi z przejść: $^2\text{H}_{11/2} + ^5\text{S}_2 \rightarrow ^5\text{I}_8$, $^5\text{F}_5 \rightarrow ^5\text{I}_8$, $^5\text{I}_4 \rightarrow ^5\text{I}_8$, $^2\text{H}_{11/2} + ^5\text{S}_2 \rightarrow ^5\text{I}_7$. W parze jonów $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, na skutek UC następuje emisja głównie z poziomów $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2}$ oraz $^4\text{F}_{9/2}$ do poziomu podstawowego $^4\text{I}_{15/2}$.

W porównaniu z typową emisją Stokesowską zachodzącą w organicznych barwnikach fluorescencyjnych oraz w kropkach kwantowych, proces konwer-

sji w górę wykazuje liczne zalety. Zastosowanie wzbudzenia promieniowaniem z zakresu podczerwieni pozwala uniknąć problemów, które pojawiają się w przypadku wzbudzenia materiału biologicznego promieniowaniem UV. Po pierwsze, promieniowanie ultrafioletowe ma ograniczoną zdolność penetracji tkanek, których składniki z jednej strony silnie rozpraszają, a z drugiej strony silnie absorbują padające fotony. Chromofory tkankowe takie jak kolagen, elastyna, porfiryny, NADH, FAD czy DNA, pod wpływem UV, wykazują silną autofluorescencję. Rezultatem jest obniżona dokładność i czułość detekcji. Złożonym zagadnieniem jest również wyodrębnienie użytecznego sygnału oraz poprawa stosunku sygnału do szumu. Zastosowanie promieniowania NIR do wzbudzenia luminoforów pozwala wyeliminować autofluorescencję gdyż w tkankach brak jest endogennych absorberów fal z tego zakresu. Można wówczas uzyskać znacznie większą czułość analiz niż w przypadku tradycyjnie stosowanych barwników fluorescencyjnych. Pozwala to znacznie uprościć konstrukcję układów do wzbudzenia i detekcji, a tym samym zwiększyć przepustowość analiz, zmminiaturyzować systemy czujnikowe oraz zwiększyć dostępność i powszechność szybkich testów diagnostycznych. Stosowanie wzbudzenia NIR pozwala również ograniczyć fotouszkodzenie komórek i tkanek przy jednoczesnym wzroście głębokości penetracji, d_p , światła wzbudzającego. Dla światła z zakresu UV d_p wynosi nie więcej niż kilka milimetrów, natomiast dla promieniowania podczerwonego wartość ta może sięgać nawet 10-15 centymetrów w przypadku tkanki tłuszczowej [75]. Problematyka ta jest szerzej omówiona w rozdziale poświęconym obrazowaniu.

1.4. ISTOTNE BIOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI NANOLUMINOFORÓW

Trudno jest jednoznacznie wskazać, które z nanoluminoforów takich jak kropki kwantowe, kulki krzemionkowe wypełnione barwnikami organicznymi, czy też domieszkowane lantanowcami nanokrystality wykazują cechy najkorzystniejsze z punktu widzenia zastosowań biologicznych. Na Rysunku 5 porównano przykładowe widma absorpcji i luminescencji jonów lantanowców, kropek kwantowych oraz barwników organicznych a także wyjaśniono pojęcie „okna optycznego skóry”. Długie czasy życia poziomów wzbudzonych lantanowców oraz odporność na fotowysbielanie, które jest wyjątkowo uciążliwe i problematyczne w przypadku barwników organicznych, umożliwiają prowadzenie obrazowania *in vivo* w czasie rzeczywistym, pozwalając tym samym na zrozumienie wielu procesów zachodzących w żywej komórce bądź całym organizmie.



Rysunek 5. Zestawienie widm absorpcji (linie przerywane) i luminescencji (linie ciągłe) różnych fluoroforów organicznych oraz nanoluminoforów, tzn. a) chromoforów tkankowych i wody; b) molekuł organicznych [49]; c) kropek kwantowych [70]; d) widma luminescencji jonów Nd³⁺, Tm³⁺, Er³⁺ oraz Eu²⁺. Szary obszar 750–1100 nm to tzw. okno optyczne skóry

Figure 5. The absorption (dashed lines) and emission (solid lines) spectra of different organic fluorophores and luminescent nanoparticles, i.e. a) tissue chromophores, water absorption and the optical window of skin; b) luminescence spectra of biological molecules [49]; c) emission and absorption spectra of quantum dots [70]; d) luminescence spectra of the Nd³⁺, Tm³⁺, Er³⁺ and Eu²⁺ ions

W porównaniu z kropkami kwantowymi konwertujące w górę nanoluminofory wykazują dłuższe czasy życia luminescencji i brak tak zwanego „migotania” podczas emisji. Dodatkowo, nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców pozwalają na uzyskanie dużej ilości kodów barwnych do równoczesnej detekcji wielu analitów w jednej próbce poprzez zmianę rodzaju lub stężenia jonów domieszkujących [59]. Podobne możliwości oferują kulki krzemionkowe domieszkowane mieszaninami kropek kwantowych [77] lub barwników organicznych [78], jednak tylko nanoluminofory domieszkowane lantanowcami pozwalają równocześnie zachować skalę nanometryczną.

Z punktu widzenia zastosowań biologicznych wadą nanoluminoforów jest niewielki przekrój czynny na absorpcję oraz mało wydajna, choć stabilna luminescencja. Ze względu na mechanizm fizyczny emisji anty-Stokesowskiej w lantanowcach, proces konwersji energii w górę obserwowany w UCNP jest wydajniejszy od emisji dwufotonowej (ang. *Two-Photon Emission*, TPE) czy też generacji drugiej harmonicznej (ang. *Second Harmonic Generation*, SHG). W przeciwieństwie do procesów TPE oraz SHG, które wynikają z nieliniowych właściwości materiałów przy odpowiednio silnym pobudzeniu, emisja anty-Stokesowska w jonach lantanowców wynika z sumowania fotonów w procesach transferu energii między rzeczywistymi i długo żyjącymi poziomami elektronowymi. Maestro i współpracownicy [47] porównali względną intensywność emisji UCNP (20 nm α -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺, $\lambda_{exc} = 980$ nm, $\lambda_{emi} = \sim 540$ and 650 nm), sferycznych kropek kwantowych o średnicy 4 nm ($\lambda_{em} \sim 650$ nm) oraz nanoprecinków złota (45 × 10 nm, $\lambda_{surf.plasmon} \sim 830$ nm, $\lambda_{emi} = 570$ –680 nm). Pod wpływem 100-fs impulsowego wzbudzenia (1 MW/cm²), UCNP wykazywały odpowiednio ~ 2 i ~ 3 razy większą efektywność emisji anty-Stokesowskiej niż kropki kwantowe i nanoprecinki złota w przeliczeniu na jedną nanocząsteczkę. Jednak pod wpływem wzbudzenia podczerwonym laserem pracy ciągłej (1 MW/cm²), emisję widzialną wykazywały jedynie UCNP. Z kolei Heer wraz ze współpracownikami [48] porównali 1% wag. zawiesiny koloidalne β -NaYF₄: 20%Yb³⁺, 2%Er³⁺ oraz 5 nm kropki kwantowe Cd-Se-ZnS używając tej samej geometrii pomiarowej oraz laserowego wzbudzenia ciągłego 10 kW/cm² odpowiednio na 974 oraz 909 nm. Zarejestrowano 7 rzędów wielkości większą intensywność luminescencji fluorkowych UCNP w porównaniu do dwu-fotonowej emisji kropek kwantowych czy nanoprecinków złota, ale wyniki nie były normalizowane do pojedynczych nanocząsteczek jak w pracy Maestro. Wysoka efektywność emisji anty-Stokesowskiej oraz relatywnie niska progowa intensywność wzbudzenia konwertujących w górę nanocząstek pozwala na znaczne uproszczenie aparatury i upowszechnienie tych metod badawczych. Jak dotąd, spośród znanych znaczników luminescencyjnych, jedynie UCNP pozwoliły uzyskać dwu-fotonowe obrazowanie z wykorzystaniem nielaserowych źródeł światła, czy też wysokorozdzielcze i głębokie obrazowanie dwu-fotonowe w mikroskopii szerokiego pola [79].

Kolejnym ważnym zagadnieniem dotyczącym zastosowań nanoluminoforów w naukach biomedycznych, jest brak rozpuszczalności większości nanocząsteczek w roztworach wodnych [80]. Nieorganiczne nanokryształy mają zdolność pozosta-

wania w formie koloidalnych zawiesin wodnych jedynie po modyfikacji powierzchni [59], czyli funkcjonalizacji. Proces ten polega na wprowadzeniu hydrofilowych grup funkcyjnych (np. -OH), które umożliwiają zdyspergowanie nanoznaczyków w roztworach wodnych. Kolejnym krokiem, niezbędnym do zastosowania nanoluminoforów w naukach biologicznych, jest ich biokoniuagacja, czyli kowalencyjne lub adsorpcyjne dołączanie specyficznych molekuł biologicznych (np. przeciwciał [81], białek [82] czy też aptamerów, czyli krótkich nici DNA/RNA [83]) do powierzchni nanocząsteczek. Proces ten jest szczególnie istotny i niezbędny dla uzyskania specyficzności detekcji i użyteczności tych związków w biologii oraz medycynie.

Należy również zwrócić uwagę na kwestię toksyczności nanoznaczyków. W porównaniu do najpowszechniej stosowanych kropek kwantowych (np. CdSe), wykorzystujących związki kadmu i selenu, omawiane nanoluminofory nie wykazują praktycznie żadnej chemicznej toksyczności pierwotnej. Niemniej jednak konieczne są dalsze badania toksyczności *in vivo*, wynikającej z potencjalnej dekompozycji nanokrystalitów, rozmiaru hydrodynamicznego tych nanoluminoforów (opisującego tendencję do aglomerowania), albo zaburzenia funkcjonowania organów w wyniku zatkania kapilarnych naczyń krwionośnych. Wiele przeprowadzonych eksperymentów biologicznych wskazuje na brak toksyczności tych materiałów, sugerując tym samym możliwość zastosowania ich w biologii i medycynie [31, 46]. Można jednak przypuszczać, że w związku z odkładaniem się nanoluminoforów w organach wewnętrznych [84], głównie w wątrobie i śledzionie [85], dominującym sposobem wykorzystania tych obiecujących materiałów w biologii będą zastosowania *in vitro* w testach przesiewowych. Dalsza optymalizacja i poprawa biokompatybilności nanocząsteczek może w przyszłości umożliwić zastosowania *in vivo* w ludzkim organizmie.

2. ZASTOSOWANIA W NAUKACH BIOLOGICZNYCH

Wyjątkowe właściwości spektroskopowe jonów lantanowców, takie jak wąskie pasma emisji, zdolność do konwersji energii w górę, odporność na fotowysielanie i stabilna luminescencja spowodowały wzrost zainteresowania możliwością wykorzystania tych związków w naukach biologicznych. Listę różnych nanoluminoforów, domieszkowanych jonami lantanowców, wraz ze stosowaną metodą funkcjonalizacji/biokoniuagacji oraz ich zastosowaniem przedstawiono w Tabeli 1.

W naukach biomedycznych UCNPs mogą być wykorzystane w obrazowaniu optycznym [61, 86], w testach fluorescencyjnych zarówno homogenicznych (wykorzystujących mechanizm FRET [41, 87]) jak i heterogenicznych [88, 89], a także w terapii fotodynamicznej [90]. Istnieją również przykłady badań nanoluminoforów pod kątem zastosowań w nanotermometrii [91], zlokalizowanej hipertermii [92] czy też wykorzystania ich jako platformy nano-biotechnologicznej [93]. W literaturze obcojęzycznej ukazało się kilka interesujących artykułów przeglądowych opisujących wykorzystanie konwertujących w górę nanoluminoforów w naukach biologicz-

nych [38, 46, 94]. W polskiej literaturze brakuje podobnych prac na temat aktualnego stanu wiedzy z dziedziny omawianej w niniejszym artykule.

Tabela 1. Zestawienie stosowanych w biologii nanomateriałów luminescencyjnych domieszkowanych lantanowcami. Przedstawiono skład matrycy, zastosowaną domieszkę, ligand oraz docelowe zastosowanie.

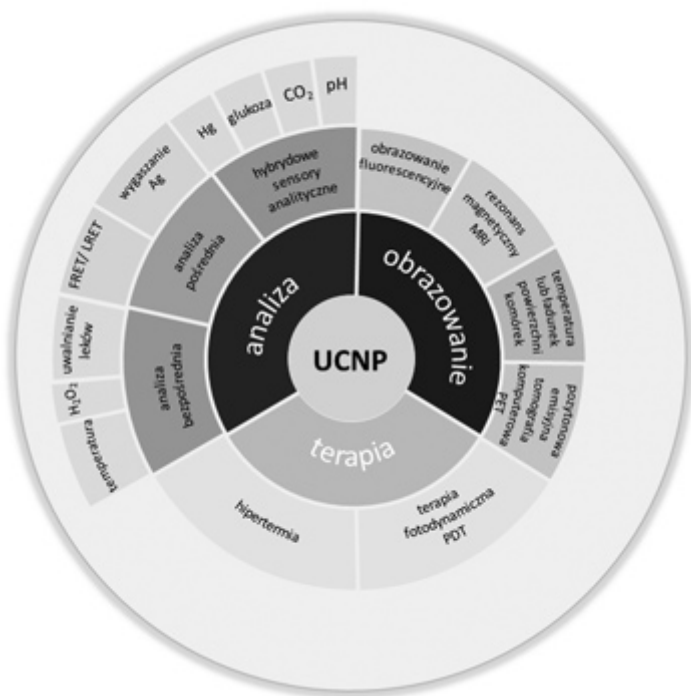
Table 1. A list of available nanocolloidal luminescent materials used in biological experiments. The composition, dopant ions, ligands and target application was compared.

Matryca	Domieszka	Ligand	Zastosowanie	Ref.
Fe ₃ O ₄ /Gd ₂ O ₃	Eu ³⁺	Neutrawidyna, DNA	wykrywanie mutacji w DNA	[95]
Gd ₂ O ₃	Yb ³⁺ , Er ³⁺	Poli(tlenek etylenu) PEG	znacznik fluorescencyjny, kontrast w MRI	[96]
Gd ₂ O ₃	–	SiO ₂ , PEG	multimodalneobrazowanie	[2]
La ₂ O ₂ S	Yb ³⁺ , Er ³⁺	przeciwciała anti-E2	oznaczenie estradiolu	[97]
LaF ₃	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂	dostarczanie leków, bioobrazowanie, biosensing	[98]
LaF ₃	Ce ³⁺ , Tb ³⁺	Chlorowodorek polialilolaminy PAH) Polistyrenosulfonian sodu (PSS) Chitozan Glukoza	oznaczanie glukozy	[99]
LaF ₃	Ce ³⁺ , Tb ³⁺	Kopolimer kwasu metakrylowego i styrenu	niespecyficzna sonda DNA	[100]
NaGdF ₄	Tm ³⁺ , Er ³⁺ , Yb ³⁺	Kwas azelainowy	multimodalne obrazowanie <i>in vivo</i>	[101]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	PEG	kontrast w OCT obrazowanie <i>in vivo</i>	[102]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Tm ³⁺	kwas poliakrylowy (PAA)	długoterminowe obrazowanie <i>in vivo</i>	[33]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	streptawidyna	detekcja DNA	[103]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂ + kwas foliowy (FA)	detekcja komórek rakowych	[104]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂ , przeciwciała	znakowanie i obrazowanie komórek HeLa, terapia fotodynamiczna	[90, 105]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	Poli(etylenoimina) PEI ftalocyjaninazyńku	terapia fotodynamiczna	[106]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	Kwas foliowy chitosan	obrazowanie komórek nowotworowych płuc	[107]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	PEI	obrazowanie <i>in vivo</i> nicieni	[108]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺ , Gd ³⁺	Cytrynian/kwas oleinowy (OA), ¹⁸ F	multimodalna tomografia emisyjna, rezonans magnetyczny	[7]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂	obrazowanie siRNA w żywych komórkach	[109]

Matryca	Domieszka	Ligand	Zastosowanie	Ref.
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Tm ³⁺ Yb ³⁺ , Ho ³⁺ Yb ³⁺ , Ho ³⁺ , Ce ³⁺	–	obrazowanie <i>in vivo</i>	[110]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	NaYF ₄ /SiO ₂	terapia fotodynamiczna	[95]
NaYF ₄	Nd ³⁺		hipertermia	[92]
NdF ₃	–	SiO ₂	obrazowanie NIR-NIR <i>in vivo</i>	[111]
Y ₂ O ₃	Er ³⁺	PEG	detekcja komórek rakowych	[112]
Y ₂ O ₃	Yb ³⁺ , Er ³⁺	PEG streptawidyna	biologiczne znakowanie	[113]
YVO ₄	Eu ³⁺	–	oznaczanie H ₂ O ₂ i silnych utleniaczy	[114]

Ze względu na unikalne właściwości fizyko-chemiczne (omówione w sekcji 1.2.), nanoluminofory domieszkowane lantanowcami mogą być stosowane w wielu dziedzinach nauk biologicznych [38, 94, 115–118]. Na Rysunku 6 przedstawiono klasyfikację biologicznych zastosowań nanoluminoforów. Podzielono je na 3 kategorie: zastosowania pasywne (obrazowanie), modulacyjne (czujniki) oraz aktywne (terapię).

W większości udokumentowanych badań, Ln:NPs stanowią pasywne luminofo-ry, których właściwości spektroskopowe zasadniczo nie podlegają wpływom chemicznego otoczenia. Po odpowiedniej modyfikacji powierzchni nanoluminofory selektywnie wiążą się z odpowiednimi grupami funkcyjnymi na powierzchni komórek. W wyniku akumulacji tak zmodyfikowanych znaczników w preparatach biologicznych możliwe jest obrazowanie morfologii i struktury tkanek, komórek i struktur subkomórkowych (Rozdział 3.4.). Zalety UCNPs w zastosowaniach pasywnych, wynikają z wysokiej fotostabilności [119] tych związków, a także z możliwości obrazowania ich lokalizacji w tkankach i organach w długotrwałych eksperymentach *in vitro* lub *in vivo*. Ponadto wykorzystanie metod dwufotonowych pozwala badać lokalizację nanoznaczników nie tylko w cienkich preparatach komórkowych, ale również w całych organach lub nawet w małych zwierzętach. Takie nanoluminofory wykorzystuje się również chętnie do obrazowania innymi, wymienionymi na Rysunku 6 i omówionymi w Rozdziale 3.4. i 3.6., metodami.



Rysunek 6. Schemat przedstawiający grupy biologicznych zastosowań nanoluminoforów domieszkowanych lantanowcami

Figure 6. Major groups of biological applications of lanthanide doped NPs

W drugiej analitycznej grupie zastosowań, luminescencja Ln:NPs jest modulowana przez inne cząsteczki (np. barwniki) lub w odpowiedzi na określone parametry biofizyczne otoczenia. Przykładem mogą być czujniki hybrydowe omówione w Rozdziale 3.3., w których barwnik organiczny zaadsorbowany na powierzchni nanokrystalitu absorbuje fotony emitowane przez UCNP. Do konstrukcji tych czujników wybierane są barwniki, których widmo absorpcji zmienia się w zależności od otoczenia (np. pH czy CO₂), przy czym barwnik ten nie musi wykazywać własnej luminescencji. Jest to istotne, ponieważ łatwiej jest skonstruować czujnik, w którym pomiar polega na rejestracji względnych zmian emisji UCNP, niż na określaniu absorbancji. Przykładem takiego barwnika może być czerwień fenolowa, która jest wrażliwa na zmiany pH lub błękit bromotymolowy, który reaguje zmianą barwy na obecność CO₂.

Kolejny typ czujników aktywnych opiera się na analizie pośredniej, która wykorzystuje zjawisko rezonansowego transferu energii (RET) między UCNP jako donorem oraz inną cząsteczką (barwnikiem, plazmonami metalicznego złota) jako akceptorem (Rozdział 3.1. i 3.2.). Czujnik, w odpowiedzi na bodziec (tj. obecność akceptora w bliskim sąsiedztwie donora), reaguje zmianą intensywności luminescencji donora, skróceniem czasów życia poziomów wzbudzonych donora, lub

pojawieniem się emisji akceptora. Zjawisko to jest powszechnie wykorzystywane w biologii do badania procesów biochemicznych, badania konformacji białek czy też wykrywania nukleotydów. W porównaniu z tradycyjnie stosowanymi w tym celu barwnikami organicznymi, zastosowanie UCNPs do konstrukcji tych czujników umożliwia znaczne uproszczenie metod pomiarowych, gdyż wykonanie testów nie wymaga wyrafinowanego oczyszczania i przygotowania próbek biologicznych. Takie rozwiązanie oferuje również znaczną poprawę czułości poprzez wyeliminowanie sygnału tła.

Ostatnią grupą zastosowań modulacyjnych omawianych znaczników jest analiza bezpośrednia, gdzie zmianom otoczenia (np. temperatury, stężenia związków chemicznych) towarzyszą zmiany właściwości spektroskopowych samych lantanowców wbudowanych w znaczniki. Zastosowania te są omówione w Rozdziałach 3.3., 3.5. i 3.6.

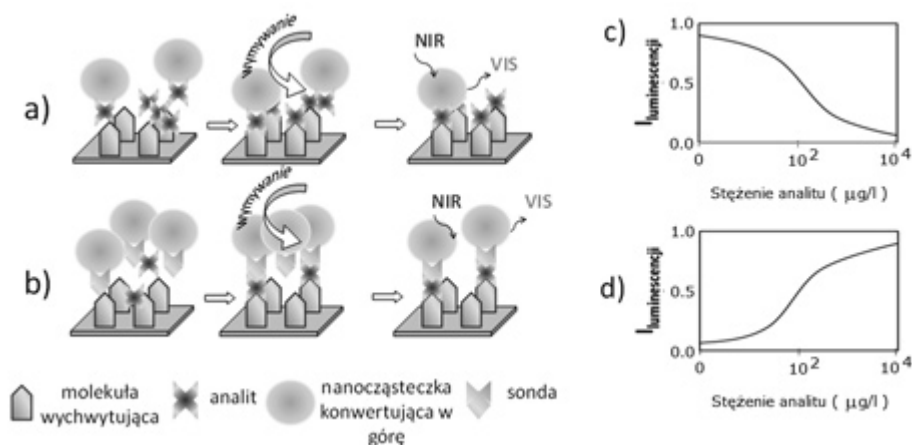
Domieszkowane lantanowcami nanoznaczniki mogą również aktywnie oddziaływać na komórki. Zarówno możliwość lokalnego podgrzania otoczenia, jak i intencjonalne generowanie wolnych rodników, doskonale nadają się do zastosowań w hipertermii lub terapii fotodynamicznej nowotworów. Największą zaletą UCNP w tej grupie zastosowań jest możliwość wykorzystania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni, które zapewnia głębokie wnikanie światła wzbudzającego w tkanki i mało inwazyjną terapię. Zagadnienia te zostały omówione w Rozdziale 3.5. i 3.7. Interesujące są również hybrydy, czyli platformy nanobiotechnologiczne, które łączą w sobie kilka z w/w cech, umożliwiając wielomodalne obrazowanie skojarzone z wielomodalną terapią. Takie hybrydy omówiono w Rozdziale 3.8.

Aktualnie jednym z najpowszechniej rozwijanych zastosowań znaczników luminescencyjnych są analizy pozaustrojowe, gdyż odgrywają ważną rolę w badaniach materiału biologicznego i szybkim wykrywaniu substancji będących wskaźnikami zagrożenia zdrowia ludzkiego, czy też środowiska naturalnego [120]. W obszarze zainteresowań są testy przesiewowe chorób genetycznych, obecności zanieczyszczeń bakteryjnych w wodzie i produktach spożywczych oraz wykrywanie zakażeń drobnoustrojowych itp. [121]. Idealne testy powinny umożliwiać przeprowadzenie analizy w sposób szybki i wysoce wydajny bez konieczności złożonego przygotowania próbek, co powinno nie tylko znacząco skracać czas analizy, ale także obniżyć jej koszty. Ze względu na czułość i techniczną prostotę metod pomiarowych, a także dostępność czułych detektorów i efektywnych źródeł światła, w testach biologicznych najczęściej stosuje się metody bazujące na fluorescencji.

Testy wykorzystujące luminescencję można podzielić na testy heterogeniczne oraz homogeniczne. Testami heterogenicznymi nazywane są testy prowadzone w układach wielofazowych zawierających fazę stacjonarną i fazę ruchomą. Wymagany jest w nich etap oddzielania substancji będących zanieczyszczeniami i tych, które nie brały udziału w przeprowadzanej reakcji. Testy homogeniczne z kolei są prowadzone w układach jednofazowych i nie wymagają etapu rozdzielania, co jest niewątpliwą zaletą i może znacznie uprościć oraz przyspieszyć analizy.

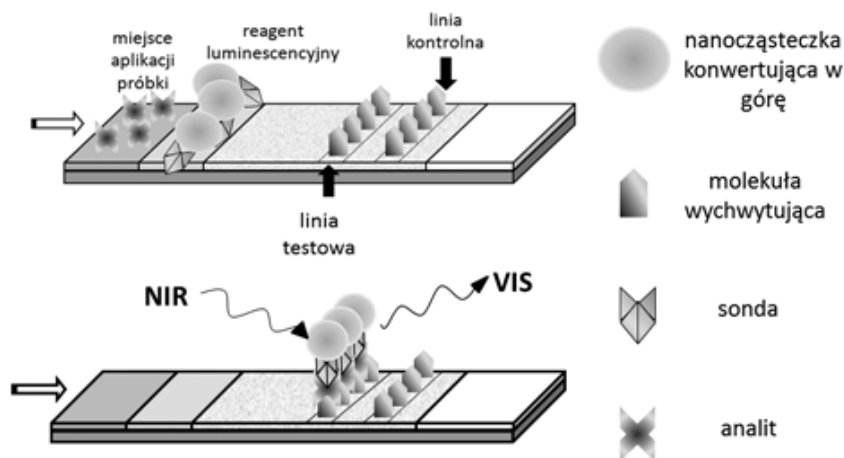
2.1. TESTY HETEROGENICZNE

Rozróżniane są dwa rodzaje testów heterogenicznych: test konkurencyjny oraz niekonkurencyjny [46]. W przypadku testu konkurencyjnego, przedstawionego na Rysunku 7a, analit konkuruje ze znakowaną sondą w wiązaniu do wychwytyjącej molekuly przeciwciała. Intensywność luminescencji uzyskana w takim eksperymencie jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia analitu w badanej próbce, co jest pokazane na wykresie 7c. W teście niekonkurencyjnym, przedstawionym schematycznie na Rysunku 7b, znakowana sonda przyłącza się do molekuly wychwytyjącej dopiero po uprzednim przyłączeniu cząsteczki analitu. Jak przedstawiono na Rysunku 7d uzyskana intensywność sygnału jest więc wprost proporcjonalna do stężenia analitu w próbce.



Rysunek 7. Schemat testu heterogenicznego z udziałem nanocząstek konwertujących w górę
Figure 7. Schematic illustration of heterogenic assay with up-converting nanoparticles

Jednym z bardziej znanych testów heterogenicznych jest test przepływu boczno-inaczej zwany testem kasetkowym. Na Rysunku 8, pokazano najczęściej stosowany test kasetkowy, w którym płytka testowa jest podzielona na kilka obszarów. Na płytce wydzielona jest strefa, na którą naniesiona zostaje próbka z analitem. Tuż za nią znajduje się kolejna strefa płytki z cząsteczkami odpowiedzialnymi za selektywne przyłączenie analitu i generację sygnału podlegającego późniejszej detekcji. Dzięki działaniu sił kapilarnych, badana próbka przepływa wzdłuż płytki, a cząsteczki analitu wiążą się z odpowiednimi biomolekułami, które są znakowane luminoforami. Następnie, takie koniugaty przemieszczają się wraz z roztworem wzdłuż membrany nitrocelulozowej, gdzie są selektywnie wyłapywane przez molekuly wychwytyjące, które osadzono na liniach testowych oraz kontrolnych. Przykładem wykorzystania testu kasetkowego z użyciem konwertujących w górę nanocząstek luminoforów był test na obecność narkotyków w ślinie, a także wykrywanie obecności bakterii *Escherichia coli* O157:H7 [122].



Rysunek 8. Test przepływu bocznego z użyciem konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów
Figure 8. Lateral flow test with up-converting nanoluminophores

Odróżnienie analitów następowało w wyniku rejestracji położenia luminescencyjnego kompleksu na płytce jak i barwę charakterystyczną dla wychwyconego luminoforu.

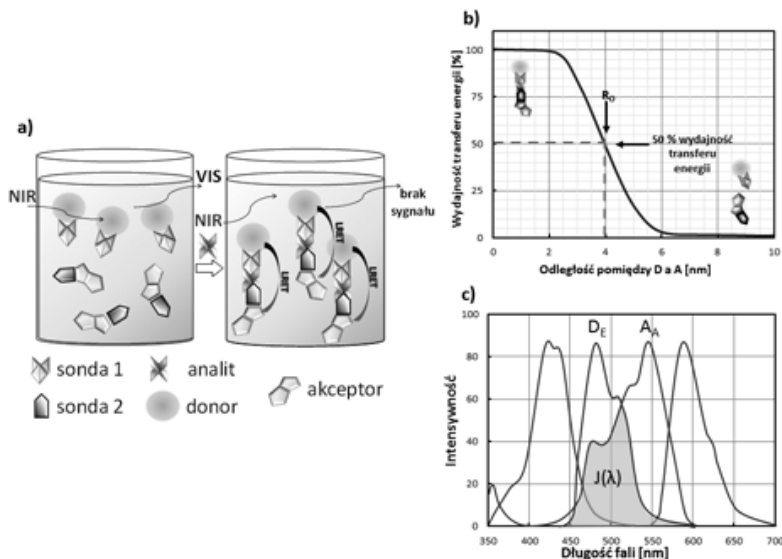
Test kasetkowy z użyciem konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów został również wykorzystany do detekcji małych Gram-ujemnych pałeczek bakterii *Yersinia pestis* [123]. Dolny limit detekcji wyniósł 10^4 CFU/ml. Ilość ta jest wystarczająca do wykrycia bakterii we krwi organizmu zakażonego *Y. pestis* [123]. Zastosowany schemat testowy był dziesięciokrotnie bardziej czuły niż test immunochromatograficzny oparty na koloidalnych cząsteczkach złota [124]. Mader [125] w swojej rozprawie doktorskiej przedstawiła badania nad możliwością wykrywania ludzkiej albuminy surowiczej HSA (ang. *human serum albumin*) w oparciu o konkurencyjny model testu heterogenicznego.

Corstjens [126] wraz ze współpracownikami opracowali heterogeniczny niekonkurencyjny test kasetkowy do wykrywania nawet 0,7 fmoI pojedynczej nici oligonukleotydu oparty na mechanizmie hybrydyzacji kanapkowej. Test przepływu bocznego z użyciem nanocząsteczek $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ został także wykorzystany do detekcji kwasu 3-fenoksybenzoesowego. Związek ten jest traktowany jako wskaźnik ekspozycji na insektycydy pyretroidowe – grupę organicznych związków naturalnych bądź syntetycznych używanych do ochrony roślin przed szkodnikami [127]. Dzięki wykorzystaniu nanoluminoforów osiągnięto limit detekcji kwasu fenoksybenzoesowego na poziomie 1,4 $\mu\text{g/l}$ [128]. W teście ELISA (ang. *enzyme-linked immuno-sorbent assay*) dla tego samego analitu dolny limit detekcji wynosi 0,1 ng/ml co świadczy o nieznacznie większej czułości standardowego testu [127]. Jednak czułość testu nie zawsze ma decydujące znaczenie w wyborze metody pomiarowej, szczególnie tam, gdzie liczy się koszt, szybkość i prostota wykonania analizy.

Testy kasetkowe znajdują również szerokie zastosowanie w analizach ilościowych, do wykrywania wielu analitów jednocześnie [122]. Poprawa stosunku sygnału do szumu, poprzez użycie znaczników zdolnych do konwersji energii w górę, zwiększa możliwości wykorzystania takiego schematu testowego do analizy pozaustrojowej wielu biologicznych komponentów. Wzbudzenie światłem podczerwonym pozwala zwiększyć czułość analiz, przede wszystkim poprzez wyeliminowanie autofluorescencji.

2.2. TESTY HOMOGENICZNE

Innym przykładem testów luminescencyjnych są testy homogeniczne wykorzystujące mechanizm LRET (ang. *Luminescence Resonance Energy Transfer*). Mechanizm LRET jest analogiczny do znanego zjawiska Försterowskiego bezpromienistego transferu energii (FRET) [129, 130]. Zjawisko to polega na bezpromienistym i rezonansowym przekazaniu energii z donora (D), będącego w stanie wzbudzonym, do znajdującego się w bezpośrednim sąsiedztwie akceptora (A) w stanie podstawowym. Efektywność transferu energii η_{DA} między D i A zależy od stopnia nakładania się widm emisji donora D_E i absorpcji akceptora A_A (tzw. całki nakładania $J(\lambda)$), względnej orientacji dipoli obu molekuł oraz od odległości między nimi R_{DA} . Opisane zależności wraz ze schematem testu homogenicznego przedstawiono na Rysunku 9.



Rysunek 9. Schemat testu jednorodnego wykorzystującego mechanizm LRET (a). Zależność wydajności procesu transferu energii LRET od odległości pomiędzy molekułami donora i akceptora (b), $J(\lambda)$ oznacza całkę pokrywania się emisji donora D_E i absorpcji akceptora A_A (c)

Figure 9. A schematic illustration of homogenous assay exploiting the LRET mechanism (a). The dependence of LRET efficiency on distance between donor and acceptor molecules (b), $J(\lambda)$ denotes overlap integral of donor's emission D_E and acceptor's absorbance A_A (c)

Mechanizm FRET zachodzi poprzez oddziaływania dipol–dipol dalekiego zasięgu i jest efektywny w obrębie odległości pomiędzy D i A porównywalnych z wymiarami większości biologicznych makromolekuł, tj. od 1 do 10 nm. FRET znajduje powszechne zastosowanie w naukach biologicznych i służy do badania zmian konformacji białek, reakcji asocjacji lub dysocjacji, charakteryzacji miejsca wiązania antygen–przeciwciała, hybrydyzacji DNA/RNA i w konsekwencji bioobrazowania i biodetekcji. Wynika to z faktu, że efektywność FRET zależy monotonicznie od odległości R_{DA} , dzięki czemu zjawisko to zyskało nazwę „linijki spektroskopowej” [131].

Zbliżaniu się molekuł donora i akceptora towarzyszy bezpromienisty transfer energii, co skutkuje wygaszaniem fluorescencji donora i pojawieniem się emisji światła z molekuł akceptora [41, 131]. Najbardziej wiarygodną metodą pomiaru stężenia analitu jest jednak porównanie czasów życia luminescencji donora w obecności akceptora (τ_{DA}) i czasów życia emisji izolowanego donora (τ_D) [131]. Znajomość τ_{DA} oraz τ_D ($\tau_{DA} < \tau_D$) pozwala w prosty sposób wyznaczyć efektywność transferu energii ($\eta = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$). Tak uzyskana wartość η , pozwala z kolei oszacować odległości R_{DA} między molekułami donora i akceptora. Wynika to z faktu, że sprawność transferu energii η jest równocześnie funkcją odległości R_{DA} , zgodnie z równaniem $\eta = [1 + (R_{DA}/R_0)^6]^{-1}$. R_0 jest odległością Forstera, czyli odległością, przy której $\eta = 50\%$ i jest to stała, zależna od użytych molekuł D i A.

Jako donory i akceptory tradycyjnie stosowano molekuły barwników organicznych. Ich cechy foto-fizyczne wprowadzają jednak wiele niejednoznaczności i potencjalnych źródeł błędów, zarówno na etapie pomiaru jak i interpretacji danych. Ich bardzo krótkie czasy życia, na poziomie piko-/nanosekund, znacznie komplikują stronę techniczną pomiaru. Zmuszają do stosowania ultrakrótkich impulsów światła wzbudzającego oraz ultraszybkich detektorów (fotopowielaczy, fotodiod lawinowych), a także techniki zliczania fotonów (ang. *time correlated single photon counting*, TCSPC). Barwniki organiczne wymagają wzbudzenia w zakresie ultrafioletu lub wysokoenergetycznej części światła widzialnego, co sprzyja pojawieniu się autofluorescencji biomolekuł i przyczynia się do obniżenia czułości biotestów. Ponadto, molekuły organiczne wykazują niewielkie przesunięcie Stokes’a i bardzo szerokie pasma emisji, co sprzyja nakładaniu się pasm emisji donora i akceptora, i ze względu na stosowaną metodę detekcji pozornie podnosi efektywność transferu energii. Molekuły organiczne podlegają również fotowysyblaniu, co ogranicza czas prowadzenia eksperymentu i w konsekwencji zmniejsza czułość biotestów.

Jako molekuły donorów, stosowane są również chelaty i kryptaty lantanowców. Związki te charakteryzują się większą foto-stabilnością oraz długimi czasami życia luminescencji. Jednak w porównaniu z nanoluminoforami, chelaty i kryptaty jonów lantanowców w roztworach wodnych wykazują większe wygaszanie luminescencji lantanowca, gdyż zapewniają mniejszą ochronę przed oddziaływaniem z molekułami rozpuszczalnika [132]. Sondy luminescencyjne, zawierające jon lantanowca, muszą charakteryzować się wysoką stabilnością termodynamiczną, inertywnością oraz wysyceniem sfery koordynacyjnej centralnego jonu lantanowca. Zaprojektowanie

i synteza takich organicznych związków specyficznie chelatujących jony lantanowców wymaga dużego doświadczenia. Większość chelatowych związków jonów lantanowców wymaga obecności organicznych ligandów służących jako anteny lub uczulacze jonu Ln^{3+} . Większość organicznych uczulaczy jest jednak podatna na fotowybielanie, co uniemożliwia długotrwałe i efektywne pomiary [133]. Poza tym, wygaszanie luminescencji takiego kompleksu może zachodzić również poprzez transfer elektronu między jonem lantanowca a ligandem [134].

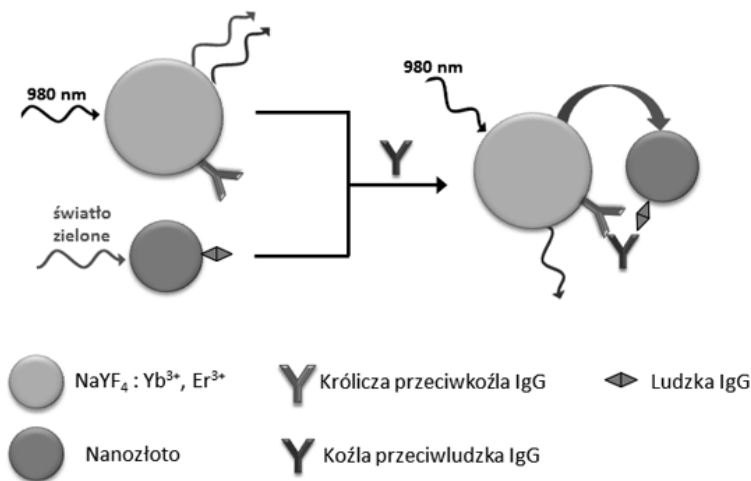
W charakterze akceptorów można również użyć innych luminoforów, np. kropek kwantowych. Te wykazują jednak „migotanie” a maksimum emisji jest zależne od wielkości krystalitów. W większości przypadków kropki kwantowe wymagają, podobnie jak barwniki organiczne, wzbudzenia w zakresie światła UV lub niebieskiego, co indukuje autofluorescencję tła i skutkuje spadkiem czułości prowadzonych analiz. W przypadku jonów lantanowców i ich związków kompleksowych można zaniedbać autofluorescencję poprzez użycie wzbudzenia impulsowego oraz zastosowanie technik pomiarów/obrazowania rozdzielczych w czasie. Techniki te są jednak bardziej skomplikowane i czasochłonne w porównaniu do bezpośrednich pomiarów intensywności luminescencji. Wadą większości kropek kwantowych jest ich cytotoksyczność. Przypuszcza się, że jest ona spowodowana w głównej mierze uwalnianiem jonów Cd^{2+} z rdzenia kropek kwantowych a także oddziaływaniem ze składnikami żywej komórki [135].

Metody detekcji LRET pozwalają wykryć niewielki nawet sygnał z uczulanej donorem emisji akceptora. Stosuje się pomiary czasów życia luminescencji donora lub samej intensywności emisji donora, które wynikają z oddziaływania między donorem a akceptorem. Dzięki wykorzystaniu mechanizmu FRET możliwe jest wykrycie analitu nawet w niewielkich subnanomolowych stężeniach [136]. Ma to krytyczne znaczenie, ponieważ minimalizuje objętość próbek i ilość użytych reagentów.

Po wzbudzeniu światłem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) w nieobecności analitu obserwuje się sygnał w postaci światła widzialnego. W obecności analitu dochodzi do bezpromienistego przekazania energii zgodnie z mechanizmem LRET od donora do akceptora i obserwowana emisja donora zanika, a czas życia jego luminescencji ulega skróceniu.

Testy homogeniczne oparte na mechanizmie LRET znalazły zastosowanie między innymi w wykrywaniu śladowych (nanomolowych) stężeń awidyny w próbkach biologicznych [137]. Wykorzystano do tego celu przyłączone do biotyny nanokoloidalne złoto oraz biotynyłowane nanoluminofory konwertujące w górę. W celu wykorzystania w analizach ilościowych metody FRET zmierzono widma luminescencyjne w funkcji stężenia awidyny w próbce. Luminescencja była wygaszana stopniowo wraz ze wzrostem stężenia awidyny. Wykazano liniową zależność między względną intensywnością luminescencji a stężeniem awidyny w przedziale od 0,5 nM do 370 nM. Odpowiedzialne za ten efekt są specyficzne interakcje między biotyną i awidyną, które umożliwiają łączenie biotynyłowanych nanocząsteczek złota z powierzchnią biotynyłowanych UCNPs i tym samym zajście zjawiska LRET.

Innym przykładem wykorzystania mechanizmu FRET był test immunologiczny koziej przeciwludzkiej immunoglobuliny G (IgG) przedstawiony schematycznie na Rysunku 10 [138]. Test ten umożliwił detekcję i ilościowe oznaczenie przeciwciał, na podstawie spadku intensywności luminescencji nanoluminoforów UCNP. Na skutek reakcji immunologicznej pomiędzy kozią przeciwludzką IgG (przeciwciało pierwszorzędowe) i dwoma innymi białkami (antygen na powierzchni donora i drugorzędowe przeciwciało na powierzchni akceptora) następowało zmniejszenie odległości pomiędzy donorem i akceptorem. W wyniku zbliżenia się molekuł, energia wzbudzonego promieniowaniem NIR donora ($\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$) była bezpromieniście wygaszana przez nanocząsteczki złota, pełniące rolę akceptora.



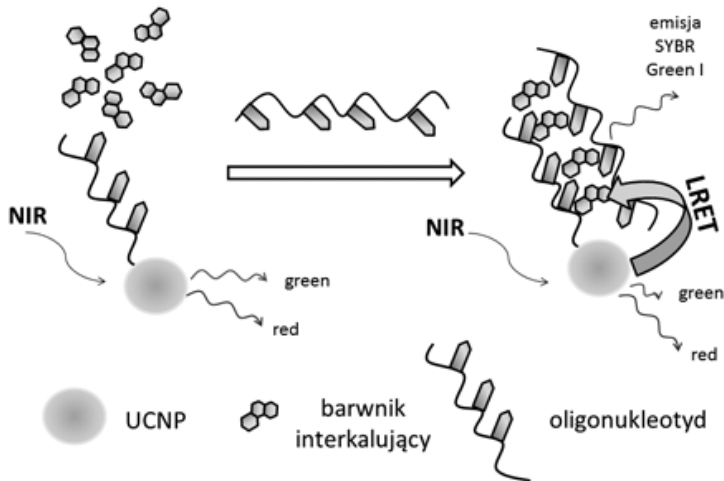
Rysunek 10. Schemat procesu LRET pomiędzy $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ (donor) a nanocząstką Au (akceptor)

Figure 10. Scheme of LRET process between $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ (donor) and Au nanoparticle (acceptor)

Przedstawiony mechanizm może być wykorzystany w różnorodnych testach służących do wykrywania innych bio-molekuł. Kumar i Zhang [136] opisali sposób wykorzystania UCNP do detekcji DNA. Stosowanie nanoluminoforów w testach DNA/RNA, nie wymaga użycia radioaktywnych izotopów przez co ogranicza problemy produkcji, użycia i utylizacji radioaktywowanych testów, które stosowane są jeszcze obecnie.

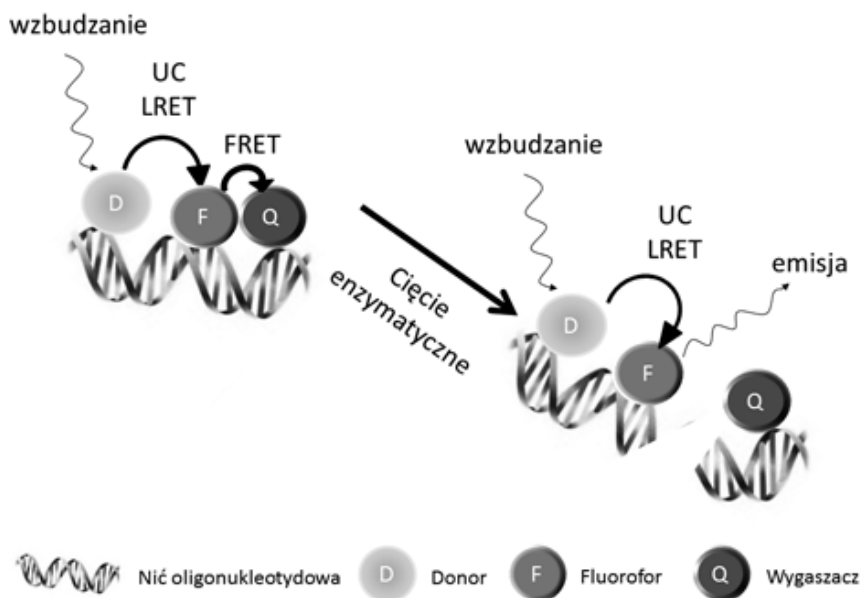
Na Rysunku 11 przedstawiono schemat działania sondy DNA wykorzystujący mechanizm LRET. Sonda oligonukleotydowa połączona z UCNP wiąże się z komplementarnym fragmentem DNA lub RNA. Barwnik interkalujący wbudowuje się w podwójną nić kwasu nukleinowego, tym samym zmniejsza się odległość dzieląca go od konwertujących w górę nanocząsteczek i możliwy jest transfer LRET między UCNP a barwnikiem. Wydajność kwantowa luminescencji barwnika znacznie wzrasta po dodaniu do badanego roztworu nici komplementarnej do nici DNA znakowanej nanocząsteczkami. Wydajność wiązania barwnika organicznego do poje-

dynczej nici DNA jest niska i dlatego przy braku nici docelowej (komplementarnej do nici znakowanej), emisja barwnika interkalującego jest nieznaczna. W obecności docelowej nici DNA dochodzi do hybrydyzacji z sondą i barwnik interkaluje między dwie nici z wydajnością znacznie większą niż w przypadku nici pojedynczych. Opracowany test pozwala na czułe analizy ilościowe z progiem detekcji na poziomie 20 fmol. Tak wysoką czułość osiągnięto dzięki wzbudzeniu w zakresie światła podczerwonego, co pozwala uniknąć bezpośredniego wzbudzenia barwnika organicznego oraz autofluorescencji materiału biologicznego. Z kolei Jiang i Zhang [109] wykorzystali mechanizm FRET do badania cząsteczek siRNA (ang. *small interfering RNA*) w żywych komórkach. Cząsteczki siRNA to małe interferujące dwuniciowe RNA odpowiedzialne za specyficzne i wybiórcze wyciszenie genów w zależności od ich sekwencji nukleotydu. Użycie nanocząsteczek w dostarczaniu siRNA do wybranych komórek może znaleźć zastosowanie w terapii klinicznej.



Rysunek 11. Sondy DNA wykorzystujące mechanizm LRET
Figure 11. DNA probes using LRET mechanism

Podobna metoda została wykorzystana do analizy aktywności endonukleazy – enzymu odpowiedzialnego za proces cięcia oligonukleotydów [139]. Rysunek 12 przedstawia reakcję hydrolizy enzymatycznej katalizowaną przez endonukleazę, która prowadzi do rozdzielenia fluoroforu (F) i wygaszacza (Q), które są ulokowane w różnych miejscach oligonukleotydu. W konsekwencji odblokowana zostaje emisja fluoroforu wzbudzanego na drodze mechanizmu LRET przez konwertującą w górę nanocząsteczkę luminoforu również przyłączoną do nici oligonukleotydu. W tym przypadku obserwacja emisji świadczy o obecności w układzie aktywnej formy enzymu endonukleazy. Ten test umożliwia bezpośredni pomiar aktywności bez konieczności znakowania analizowanego białka.



Rysunek 12. Wykrywanie aktywności enzymatycznej
Figure 12. Enzymatic activity detection

Kolejnym przykładem wykorzystania konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów i mechanizmu FRET, może być, przedstawiony przez Wang'a i Li [99], nieenzymatyczny pomiar glukozy w roztworach wodnych. W doświadczeniu wykorzystany został mechanizm LRET, w którym nanokryształy $\text{LaF}_3:\text{Ce}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ modyfikowane glukozą służyły jako donory, a modyfikowany kwasem aminofenyloboronowym (APBA) izotiocyanian rodamin B (RhBITC) jako akceptor energii. Dodanie glukozy do systemu zwiększa efektywną odległość między donorem a akceptorem poprzez konkurencyjne wiązanie wolnej i związanej z nanokryształami glukozy do grup kwasu boronowego.

Interesująca jest także przedstawiona przez Kuningasa i współpracowników metoda wykrywania estradiolu w surowicy krwi [97, 140]. W eksperymencie użyto nanoluminofory $\text{La}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ pokryte przeciwciałami E2, które w procesie konkurencyjnego wiązania estradiolu z surowicy krwi pozwoliły na wykrywanie jego nanomolowych stężeń bez skomplikowanego, czasochłonnego przygotowania i oczyszczania próbek.

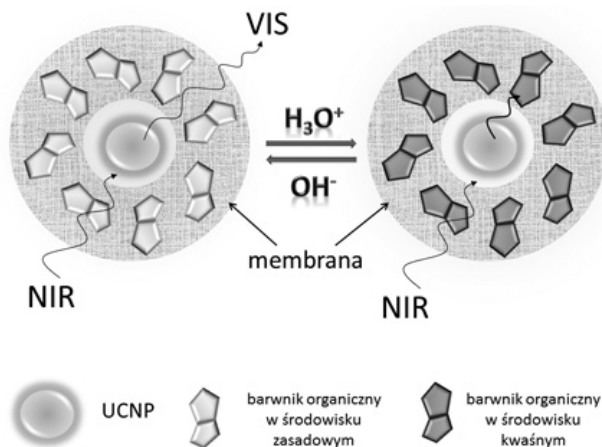
Nanoluminofory wykorzystano także jako niespecyficzne sondy DNA [100]. Nanokryształy $\text{LaF}_3:\text{Ce}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$ okryte polimerem wykazują fluorescencję głównie ze względu na przejścia energetyczne zachodzące w jonie Tb^{3+} . Wykazano, że fluorescencja pochodząca z jonów terbu może być wygaszana przez kwasy nukleinowe. Wygaszanie zachodzi po utworzeniu wiązań wodorowych między DNA i resztą kwasu karboksylowego polimeru okrywającego nanoluminofor. Ze względu na bliskie położenie molekuł związanych wiązaniami wodorowymi możliwy jest transfer

energii między jonem terbu, a molekułą DNA. Oznaczenie stężenia DNA z wykorzystaniem tego efektu było możliwe poprzez pomiar zmian intensywności luminescencji jonów Tb^{3+} .

2.3. NANOCZUJNIKI LUMINESCENCYJNE

Konwertujące w górę nanoluminofory mogą być także użyte, jako czujniki pH [141], tlenu [142], dwutlenku węgla [143] czy też amoniaku [144]. Ponieważ proces konwersji energii w górę nie zależy od parametrów układu innych niż temperatura [115], konieczne jest stosowanie nanokrystalitów w połączeniu z odpowiednio dobranymi związkami wrażliwymi na dany parametr, np. eterami koronowymi czy barwnikami organicznymi. Pod wpływem zmiany danego parametru układu, molekuly te reagują zmianą położenia pasm lub intensywności absorpcji i w ten sposób modulują emisję nanoluminoforu.

Na Rysunku 13 przedstawiono schemat czujników pH opartych na UCNP. Po wzbudzeniu nanokrystalitu promieniowaniem z zakresu podczerwieni następuje emisja promieniowania widzialnego, którego intensywność jest modulowana przez zmieniającą się pod wpływem jonów wodorowych absorpcję barwnika organicznego. Podstawowym wymogiem jest nakładanie się widma emisji UCNP i absorpcji wskaźnika, który nie powinien wykazywać luminescencji. Takie sondy pH działają więc na zasadzie efektu wewnętrznego filtra.



Rysunek 13. Schemat działania czujników pH opartych na konwertujących w górę nanoluminoforach
Figure 13. A scheme of pH sensors based on up-converting nanoluminophores

Sun wraz ze współpracownikami [141] zbudowali czujnik składający się z nanoprecytów $NaYF_4:Er^{3+}, Yb^{3+}$ oraz błękitu bromotymolowego BTB będącego powszechnie używanym wskaźnikiem pH. Zależnie od tego czy BTB jest obecny w swojej formie zasadowej czy kwasowej, wykazuje on różną absorpcję czerwonej i zielonej

emisji pochodzącej od cząsteczek luminoforu. Główną zaletą tego rozwiązania jest możliwość obserwacji zmian pH w próbkach biologicznych i w głębszych obszarach tkanek, poprzez wykorzystanie wzbudzenia promieniowaniem podczerwonym i eliminację autofluorescencji. Taka sonda może służyć również, jako wskaźnik rozpuszczonych gazów o odczynie kwasowym (np. CO_2) [143] lub zasadowym (np. NH_3) [144], a także jako bioczuJNIK w reakcjach enzymatycznych, w których protony są wytwarzane bądź konsumowane.

W czujnikach gazów zwykle używana jest membrana selektywnie przepuszczająca cząsteczki gazów, ale nieprzepuszczająca protonów. Taka osłona czyni czujnik niewrażliwym na zmiany zewnętrznego pH [144]. W oparciu o podobną zasadę działania, Ali ze współpracownikami zademonstrował czujnik dwutlenku węgla pozwalający na wykonywanie pomiarów w zakresie stężeń 0,11 do 3% [143].

Analitem, którego pomiar odgrywa istotną rolę w fizjologii, diagnostyce i technologii klinicznej oraz badaniach środowiskowych, jest tlen. Achatz ze współpracownikami zaprojektowali pierwszy wzbudzany promieniowaniem NIR czujnik tlenu oparty na nanokrystalitach $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ i związku kompleksowym irydu(III) [142]. Luminescencja UCNP w zakresie widzialnym po wzbudzeniu promieniowaniem podczerwonym jest wykorzystana do fotowzbudzania kompleksu irydowego, który z kolei jest wygaszany przez tlen cząsteczkowy. Wykazano całkowicie odwracalny wzrost i spadek emisji pochodzącej od kompleksu irydu(III) przy pomiarach prowadzonych odpowiednio w środowisku argonu i czystego tlenu.

Opisana w tym rozdziale zasada działania czujników hybrydowych jest bardzo prostym, ale skutecznym i poszukiwanym sposobem pomiarów wielu analitów chemicznych i biologicznych. Przykładem może być wykrywanie wewnątrzkomórkowych molekuł sygnalizacyjnych (np. cząsteczek nadtlenu wodoru H_2O_2), które znajduje liczne zastosowania w zrozumieniu procesów zachodzących w komórkach. Zdolność komórki do generowania różnych odpowiedzi na sygnały, w powstawanie których zaangażowane są te same przekaźniki drugiego stopnia nie jest obecnie wystarczająco poznana, a wynika to z braku odpowiednich metod pomiarowych. Casanova ze współpracownikami [114] wykorzystali szczególne własności nanokrystalitów YVO_4 domieszkowanych jonami Eu^{3+} do ilościowych i dynamicznych pomiarów stężenia H_2O_2 w żywych komórkach. Jony Eu^{3+} mogą być fotoredukowane do jonów Eu^{2+} . Utlenianie zredukowanych jonów europu, a tym samym przywrócenie luminescencji Eu^{3+} , zależy od stężenia H_2O_2 w badanej próbce. Odpowiedź czujnika nie jest specyficzna dla H_2O_2 – podobna regeneracja fluorescencji może zostać wykorzystana do pomiaru stężenia innych utleniaczy fizjologicznych np. ClO^- lub NO .

2.4. BIOOBRAZOWANIE

Obrazowanie optyczne jest jedną z najpowszechniej stosowanych metod badawczych w biologii i medycynie. Obrazowanie z wykorzystaniem znaczników

i metod fluorescencyjnych pozwala badać nie tylko morfologię i strukturę organizmów żywych, ale zrozumieć również funkcjonowanie oraz mechanizmy wielu zjawisk i procesów biologicznych.

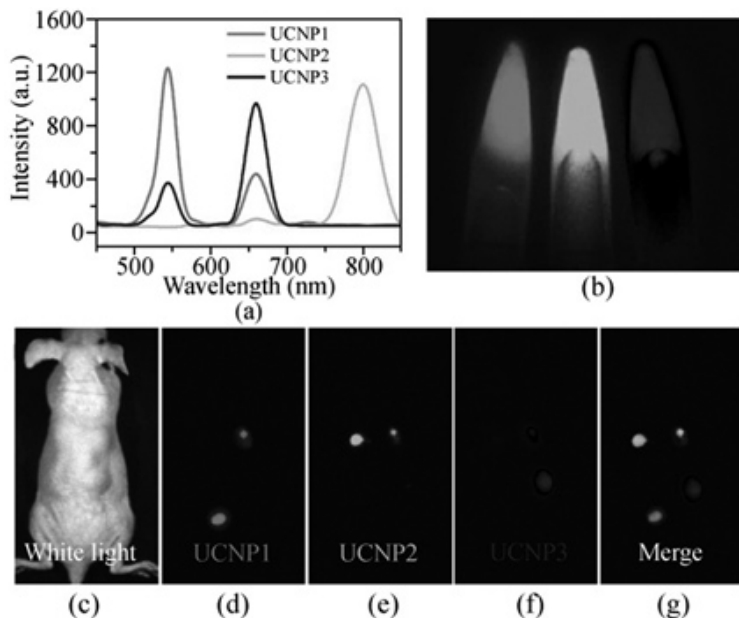
Jednym z podstawowych problemów związanych z wykorzystaniem tradycyjnych fluorescencyjnych barwników organicznych, kropek kwantowych oraz domieszkowanych barwnikami organicznymi nanocząstek krzemionkowych jest rozpraszanie światła wzbudzającego i emitowanego. Problematyczny jest także wysoki współczynnik absorpcji chromoforów tkankowych oraz obecność autofluorescencji biochemicznych składników tkanek. Długości fali światła stosowane do wzbudzania nanocząsteczkowych luminoforów konwertujących w górę mieszczą się w zakresie tzw. okna optycznego skóry. Światło o energii z tego zakresu jest słabiej absorbowane przez składniki skóry, przez co zdolne jest do głębszej penetracji tkanek i wzbudzenia nanoluminoforów.

Obrazowanie optyczne z wykorzystaniem konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów znajduje coraz więcej zastosowań głównie dzięki niewielkiej inwazyjności, głębokiej penetracji wzbudzającego światła podczerwonego a także odporności nanocząsteczek na fotowysyblanie. Nanokrystaliny NaYbF_4 , domieszkowane jonami Er^{3+} , Tm^{3+} oraz Ho^{3+} , wykorzystano w obrazowaniu komórek nowotworowych [73]. Współdomieszkowanie jednej matrycy kilkoma jonami lantanowców pozwala uzyskać emisję w zakresach długości fal odpowiadających różnym barwom. Znana jest także praca przedstawiająca obrazowanie przewodów pokarmowych nicieni *Caenorhabditis elegans* [145].

Pierwszy eksperyment z użyciem UCNP obrazujący *in vivo* tkanki małych ssaków został przeprowadzony z nanokrystalinami $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ pokrytymi polietylenoiminą [31]. Badacze obrazowali także *in vitro* komórki macierzyste szpiku kostnego, wykazując brak toksyczności stosowanych nanokrystalin. Badania prowadzono stosując roztwory nanokrystalin o stężeniach 1 $\mu\text{g/ml}$ i 25 $\mu\text{g/ml}$, przy czasie ekspozycji od 24 do 48 godzin [31].

Tian wraz ze współpracownikami [110] zademonstrowali możliwość wielobarwnego bioobrazowania żywych organizmów. Aby uzyskać obrazy pozbawione autofluorescencji, wykorzystano nanoluminofory $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ i $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}/\text{Ce}^{3+}$ wzbudzone wiązką światła o długości fali 974 nm. Dzięki selektywnej biofunkcjonalizacji powierzchni tych różnobarwnych nanokrystalin, ukazano możliwość jednoczesnego obrazowania kilku różnych tkanek [110]. Inną metodę uzyskania różnobarwnej emisji anty-Stokesowskiej zaproponował Cheng ze współpracownikami. Zespół ten zsyntetyzował serię nanoluminoforów NaYF_4 wykazujących różnokolorową emisję, którą to modyfikowano zmieniając względną ilość i rodzaj jonów domieszkujących (Y^{3+} , Yb^{3+} , $\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$) [146]. Obrazowanie luminescencji *in vivo*, przedstawione na Rysunku 14, zademonstrowano wstrzykując żywej myszy nanokrystaliny pokryte amfifilowym polimerem. Nanoluminofory wykorzystano w multipleksowanym mapowaniu naczyń limfatycznych. Zsyntetyzowanych nanocząstek użyto także do wielokolorowego znakowania komórek nowotworowych i śledzenia komórek *in vivo* przez obrazowanie luminescencji

nanoluminoforów. Dodatkowo, autorzy porównali czułość kropek kwantowych i nanoluminoforów w obrazowaniu *in vivo*. Ze względu na autofluorescencję tła, limit detekcji UCNP był o rząd wielkości niższy niż konwertujących w dół kropek kwantowych.



Rysunek 14. Wielokolorowe bioobrazowanie. a) Widma emisji trzech zawiesin UCNPs po wzbudzeniu światłem lasera przy 980 nm. b) Zdjęcie fluorescencji trzech roztworów nanokrystalitów. c) Zdjęcie żywej myszy. d), e), f), wielokolorowe obrazy luminescencji *in vivo* żywej myszy po wstrzyknięciu różnych roztworów UCNPs. g) Złożenie obrazu trzech kolorów UCNPs. Umieszczono za zgodą z [141], L. Cheng, K. Yang, S. Zhang, M. Shao, S. Lee, Z. Liu, *Nano Res*, 3 (2010), pp. 722–732

Figure 14. Multicolor imaging. A) Emission spectra of three UCNPs solutions after excitation with laser radiation at 980 nm. B) Photography of the fluorescence of three nanocrystals solutions. C) Photo of live mouse. d), e), f), multicolor *in vivo* images of luminescence in live mouse after injection of three UCNPs solutions. g) Image of three colors of UCNPs. Reproduced with permission from [141], L. Cheng, K. Yang, S. Zhang, M. Shao, S. Lee, Z. Liu, *Nano Res*, 3 (2010), pp. 722–732

Jalil ze współpracownikami badali biokompatybilność UCNP $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ pokrytych otoczką krzemionkową [147]. Nanokrystality wykazały dobrą biokompatybilność zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Badane komórki pozostawały żywe nawet przy wysokich stężeniach nanokrystalitów. Badania biodystrybucji *in vivo* wykazały, że płuca oraz serce są organami docelowymi dla nanozwiązków. Dowiedziono jednak, że już po 7 dniach od wstrzyknięcia organy te są oczyszczone z wprowadzonych UCNP. W długim czasie po podaniu tych nanocząsteczek stwierdzono, że odkładają się one w wątrobie i śledzionie. Zagadnienia nanotoksykologii omawianych znaczników luminescencyjnych jak i samych związków lantanowców są znacznie bardziej złożone [33, 148–150] i wykraczają poza ramy niniejszej pracy.

Wykorzystanie emisji w zakresie podczerwieni stwarza możliwość obrazowania głębiej położonych tkanek wskutek mniejszego rozpraszania i tłumienia promieniowania z tego zakresu spektralnego. Zhou ze współpracownikami (89) przeprowadzili inny eksperyment wykorzystujący obrazowanie NIR-NIR. Do tego celu wykorzystano nanoluminofory $\text{NaGdF}_4:\text{Tm}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ pokryte kwasem azelainowym. Kompleksy paramagnetycznego gadolinu są równocześnie najpowszechniej stosowanym środkiem kontrastującym w technice rezonansowego obrazowania magnetycznego (MRI) [61]. Jony Gd^{3+} wbudowane w matrycę domieszkowaną innymi lantanowcami, pozwalają na prowadzenie obrazowania multimodalnego, tzn. zarówno metodami fluorescencyjnymi ($\text{UV} \rightarrow \text{Vis}$), wykorzystując właściwości konwersji energii w górę ($\text{NIR} \rightarrow \text{Vis}$, NIR) jak i rezonansowego obrazowania MRI [151].

W innym eksperymencie wykorzystano nanokrystality NdF_3 pokryte otoczką krzemionkową SiO_2 , które po wzbudzeniu światłem o długości fali 730 nm emitowały światło w zakresie podczerwieni o długości fali 1056 nm [111]. Poza obrazowaniem badano także dystrybucję nanokrystalitów NdF_3 w żywym organizmie. Eksperyment pokazał, że badane nanokompozyty nie agregują, ani nie osadzają się w płynach ciała, natomiast podlegają niespecyficznemu wychytowi przez różne organy. Nanomateriały domieszkowane jonami Nd^{3+} są atrakcyjne ze względu na swoją wyjątkową charakterystykę spektralną emisji i wzbudzenia, fotostabilność, niską toksyczność oraz wysoko wydajny proces fluorescencji w żywych tkankach.

Do obrazowania *in vitro* komórek nowotworowych oraz *in vivo* myszy zaproponowano wykorzystanie wzbudzania światłem o długości fali 915 nm, które w przeciwieństwie do światła 980 nm, nie powoduje lokalnego przegrzania tkanek, gdyż jest słabiej absorbowane przez molekuły wody. Uzyskane przez badaczy widma fluorescencji potwierdziły, że wzbudzanie wiązką o długości 915 nm jest korzystniejsze w głębokim obrazowaniu tkanek niż użycie wiązki 980 nm [72].

Wyzwaniem dla dzisiejszej onkologii jest udoskonalenie metod wczesnego wykrywania nowotworów. Zako wraz ze współpracownikami [112] zademonstrowali możliwość obrazowania komórek nowotworowych z użyciem nanokrystalitów połączonych z cyklicznym peptydem RGD. Peptyd ten specyficznie rozpoznaje integralną $\alpha_v\beta_3$, która jest eksponowana na powierzchni komórek niektórych nowotworów, ale nie występuje w znaczących ilościach na komórkach zdrowych tkanek. Konwertujące w górę nanoluminofory badano również pod względem użyteczności we fluorescencyjnej tomografii dyfuzyjnej [86]. Wyjątkowo dobry stosunek sygnału do szumu pozwala wyeliminować artefakty powstające przy rekonstrukcji obrazu, które pojawiają się w przypadku stosowania tradycyjnych fluoroforów. Nieliniowy proces konwersji w górę jest zależny od mocy wzbudzenia i dlatego pozwala uzyskać lepszą rozdzielczość przestrzenną rozmieszczenia fluoroforów i wyraźniejsze obrazy trójwymiarowe. Stabilne nanoluminofory o długotrwałej luminescencji zostały wykorzystane do obrazowania różnych organów żywej myszy [152]. W zależności od zastosowanej modyfikacji powierzchni nanozwiązków uzyskiwano specyficzne znakowanie różnych organów.

Komórki macierzyste dostarczane do organów patologicznie zmienionych wykazują duże możliwości terapeutyczne. Wciąż nie ma jednak wystarczającej wiedzy na temat rozmieszczenia i miejsca przeznaczenia wprowadzonych komórek, przez co znacznie utrudnione jest efektywne wykorzystanie terapii z ich udziałem. Idris ze współpracownikami [153] opisali eksperyment z użyciem nanoluminoforów, który w przyszłości może rozwiązać ten problem. Do śledzenia komórek macierzystych *in vitro* oraz *in vivo* wykorzystano nanoluminofory $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ pokryte otoczką SiO_2 . Wykazano, że zastosowane nanokrystality pozwalają na:

- (i) jednoznaczną wysokorozdzielczą detekcję przeszczepionych komórek,
- (ii) obrazowanie w całkowicie unaczynionych głębokich tkankach,
- (iii) dynamiczne obrazowanie *in vivo* w czasie rzeczywistym dzięki wysokiej fotostabilności,
- (iv) nieinwazyjne obrazowanie komórek w organizmach żywych przez przynajmniej jeden tydzień od wprowadzenia do żywego systemu.

Użycie UCNP umożliwiło otrzymanie kontrastu pozwalającego na wysokorozdzielcze obrazowanie tkanek i struktur subkomórkowych do głębokości $\sim 1\text{--}2$ mm, co jest porównywalne z wynikiem otrzymanym w wysokorozdzielczej mikroskopii dwufotonowej. Głębokość penetracji promieniowania podczerwonego w głąb tkanek może sięgać nawet 10–15 cm w zależności od struktury i składu badanych tkanek. Wówczas jednak rozdzielczość optyczna jest na tyle mała, że można mówić jedynie o obrazowaniu miejsc, w których następuje chwilowa zwiększona akumulacja UCNP.

Innym ważnym w naukach biologicznych zagadnieniem, jest możliwość obserwacji pojedynczych biomolekuł. Celem jest badanie oddziaływań molekularnych w żywych komórkach. Znane są prace przedstawiające wyniki badań dotyczące wykorzystania do tego celu nanorurek diamentowych [154, 155], kropek kwantowych [156] i nanowiązków złota [157]. Beaurepaire ze współpracownikami [158] zaproponowali wykorzystanie nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców. Jednym z pierwszych tego typu badań było obrazowanie rozmieszczenia kanałów sodowych w miocytach mięśnia sercowego. Eksperyment ten pokazał możliwość zastosowania nanoluminoforów w długoterminowych badaniach dynamiki dyfuzji biomolekuł i określaniu położenia docelowych receptorów, migracji kompleksów sygnalizujących czy też czynników patogennych w komórkach i tkankach.

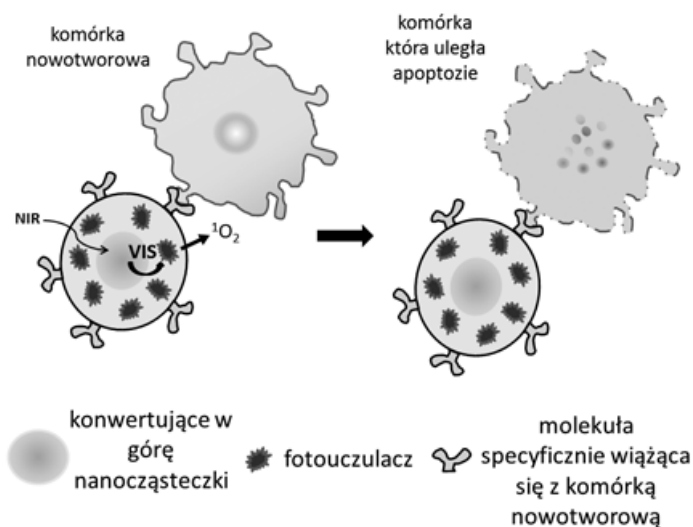
2.5. TERAPIA FOTODYNAMICZNA

Diagnostyka i terapia fotodynamiczna jest jedną z nowoczesnych metod wykrywania i leczenia nowotworów. Po ogólnoustrojowym lub miejscowym wprowadzeniu fotouczulacza, następuje inkubacja i jego selektywna akumulacja w pobliżu komórek nowotworowych. Mechanizm wychwytu i retencji fotouczulacza nie jest do końca poznany [159, 160]. Jako fotouczulacze stosuje się pochodne porfiryn

(np. Fotofrin®), chlorofilu (np. Chlorin e6) lub prekursory fotouczulaczy (np. kwas δ -aminolewulinowy, δ -ALA, dostępny pod nazwą handlową Levulan®) [161–163]. Fotouczulacz pod wpływem naświetlania inicjuje reakcję fotochemiczną i prowadzi do powstania wolnych rodników hydroksylowych lub molekuł wysoce reaktywnego tlenu singletowego [164]. Powstające molekuły mają zdolność niszczenia biomolekuł znajdujących się w pobliżu cząsteczek fotouczulacza, co w konsekwencji prowadzi do intencjonalnego uszkodzenia całych komórek i tkanek.

Trzy główne mechanizmy, prowadzące do zniszczenia tkanki nowotworowej, to bezpośrednia fotodestrukcja komórek nowotworowych, zamknięcie naczyń krwionośnych dostarczających substancje odżywcze do zmienionej tkanki i aktywacja odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym [165]. Procesy te są ograniczone do obszarów, w których selektywnie zgromadził się fotouczulacz.

Terapia fotodynamiczna, PDT, (ang. *photodynamic therapy*) jest inicjowana tylko w obecności światła o odpowiednim natężeniu i odpowiedniej długości fali. Dzięki małej inwazyjności procedury naświetlania, a także dzięki ograniczeniu terapii tylko do obszaru poddanego naświetlaniu, terapia fotodynamiczna stanowi alternatywę dla wysoce inwazyjnych zabiegów chirurgicznych, chemioterapii czy radioterapii.



Rysunek 15. Schemat terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem nanocząsteczek konwertujących w górę
Figure 15. Schematic illustration of photodynamic therapy with the use of up-converting nanoparticles

Konwencjonalna terapia fotodynamiczna wykorzystuje promieniowanie z zakresu widzialnego bądź UV, które ogranicza skuteczność terapeutyczną metody w związku z silnym rozpraszaniem i pochłanianiem promieniowania wzbudzonego przez materiał biologiczny.

Konwertujące w górę nanocząstki znalazły zastosowanie jako nośniki fotouczulaczy i wtórne źródła światła wzbudzonego w terapii przeciwnowotworowej [90,

166]. Umożliwiło to wzbudzenie fotouczulaczy promieniowaniem podczerwonym, którego głębokość penetracji w tkankach przewyższa kilkukrotnie tę dla promieniowania z zakresu widzialnego. Warto zaznaczyć, że nanoluminofory stosowane jako źródło światła wzbudzającego fotouczulacz, stanowią trwałe i stabilne w czasie znaczniki luminescencyjne do obserwacji kinetyki i obszaru akumulacji biofunkcjonalizowanych nanozwiązków. Na Rysunku 15 przedstawiono schemat terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem konwertujących w górę nanoluminoforów. Rdzeń składający się z UCNP jest okryty powłoką, w którą wbudowane są cząsteczki fotouczulacza. Taka struktura jest powierzchniowo aktywowana molekułami, które umożliwiają specyficzne łączenie się z komórkami nowotworowymi. Pod wpływem wzbudzającego światła podczerwonego konwertujący w górę rdzeń emituje światło widzialne, które z kolei wzbudza cząsteczki fotouczulacza i za jego pośrednictwem powoduje generowanie reaktywnych form tlenu. Duża zdolność niszczenia i niewielka zdolność dyfuzji tlenu singletowego powoduje, że w głównej mierze niszczone są komórki nowotworowe w pobliżu których zlokalizowane są omawiane nanomateriały. Pokazano, że zastosowane nanoluminofory generują milimolowe ilości tlenu singletowego pod wpływem promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni o intensywności wzbudzenia dużo mniejszej niż stosowane w przypadku innych technik dwufotonowych.

Przykładem wykorzystania struktur typu rdzeń/powłoka/powłoka może być ich użycie w terapii fototermicznej komórek nowotworowych [95]. W tym przypadku, nanowymiarowe złoto zostało osadzone na pokrytych powłoką krzemionkową nanokrystalitach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$. Poprzez wzbudzenie nanoluminoforów, wyemitowane fotony promieniowania zielonego ulegały sprzężeniu z plazmonami powierzchniowymi nanocząstek Au, prowadząc do konwersji energii światła w energię cieplną. Wspomniane doświadczenie umożliwia potencjalne zastosowanie badanych nanozwiązków w jednoczesnym obrazowaniu i terapii fototermicznej komórek nowotworowych.

2.6. NANOTERMOMETRIA

Wielu reakcjom zachodzącym w komórkach towarzyszą zmiany temperatury [167]. Jednak wykonanie pomiarów temperatury z wystarczającą mikrometryczną rozdzielczością przestrzenną i odpowiednią rozdzielczością temperaturową ($\Delta T < 1^\circ\text{C}$) jest jednym z trudniejszych zagadnień w biologii komórki. Badania umożliwiają śledzenie wielu mechanizmów zachodzących na poziomie komórkowym i obserwację zmian w żywych tkankach. Optyczna detekcja temperatury może opierać się na pomiarach bezwzględnej lub względnej intensywności fluorescencji, a także na zmianach położenia pików luminescencyjnych materiałów nanokrystalicznych. Zależność intensywności przejść bezpromienistych od temperatury umożliwia wykorzystanie barwników fluorescencyjnych do pomiaru temperatury żywych komórek w diagnostyce nowotworów. Organiczne fluorofory ulegają jednak dość

szybko wybielaniu, uniemożliwiając prowadzenie pomiarów długoterminowych [168]. Rozwiązaniem tego problemu może być użycie nieorganicznych luminoforów odpornych na fotowysbielanie, np. nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców. Znane są także nanotermometry złożone z nanorurek węglowych wypełnionych ciekłym Ga, które umożliwiają pomiar temperatury z wysoką rozdzielczością przestrzenną [169].

Dzięki wykorzystaniu zależnej od temperatury luminescencji nanokrystalitów NaYF_4 domieszkowanych jonami Er^{3+} i Yb^{3+} , możliwy stał się pomiar rozkładu temperatury w układach biologicznych z rozdzielczością przestrzenną umożliwiającą badanie pojedynczych komórek. Vetrone ze współpracownikami [91] zademonstrowali możliwość użycia wrażliwej na temperaturę zielonej konwersji w górę nanoluminoforu $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$ jako czujnika temperatury w roztworach oraz komórkach nowotworowych HeLa. W pomiarach wykorzystano pasma emisji odpowiadające przejściom ${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ i ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ jonu Er^{3+} , mierząc stosunek ich intensywności w funkcji zmian temperatury. Ze względu na niewielką różnicę energetyczną między wymienionymi poziomami wzbudzonymi (wynoszącą $\sim 720 \text{ cm}^{-1}$), wzbudzenie poziomu ${}^2\text{H}_{11/2}$ następuje z ${}^4\text{S}_{3/2}$ na drodze termicznej. Wykonano pomiary temperatury w żywych komórkach od 25°C do termicznie indukowanej śmierci komórek w 45°C . Wykazano, że badane luminofory mogą być użyte jednocześnie do obrazowania oraz w charakterze nanotermometrów. Z kolei Alencar wraz ze współpracownikami [170] badali nanokrystality $\text{BaTiO}_3:\text{Er}^{3+}$. Mierzona intensywność luminescencji zależy od intensywności procesów relaksacji bezpromienistej zależnych z kolei od wielkości nanokrystalitów. W literaturze opisanych jest wiele luminoforów (w tym konwertujących w górę) wykorzystywanych w termometrii. Obszerny opis związków używanych do pomiarów temperatur podczas różnych procesów znajduje się m.in. w przeglądowej publikacji Aldena i współpracowników [171]. Większość z nich służy jednak do pomiaru bardzo wysokich temperatur. Wykorzystywane są w pomiarze temperatury podczas procesów spalania lub pirolizy, do analizy rozprzestrzeniania się płomieni w pożarach, do pomiarów temperatur podczas procesów zachodzących w turbinach gazowych czy też w silnikach spalinowych. Z punktu widzenia nauk biologicznych interesujące są materiały zapewniające pomiary o dużej rozdzielczości w zakresie fizjologicznych zmian temperatury. Dokładna kontrola i optymalizacja procesu wytwarzania nanomateriałów pozwala otrzymywać jednorodne biokompatybilne nanokrystality o optymalnej wielkości i pożądanych właściwościach.

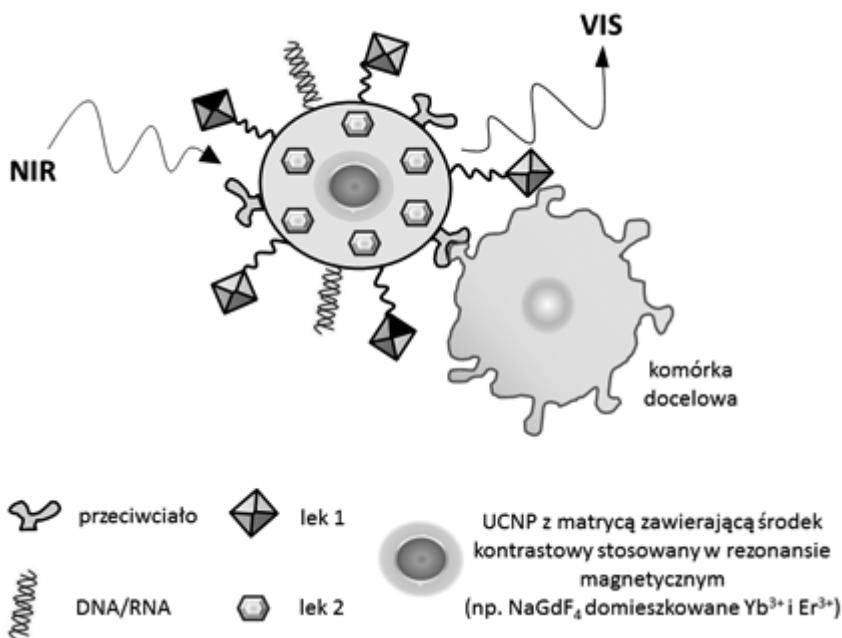
2.7. HIPERTERMIA – ZLOKALIZOWANE PODGRZEWANIE

Już w XIX wieku udało się skorelować spektakularną regresję zmian nowotworowych u pacjentów z wysoką (około 40°C) temperaturą, która towarzyszyła infekcjom bakteryjnym. Obserwacja ta sprawiła, że zainteresowano się możliwością leczenia nowotworów z wykorzystaniem podwyższonej temperatury [172, 173].

Udowodniono, że terapia ciepłem niszczy tkanki nowotworowe lub działa synergistycznie do innych metod leczenia, takich jak radioterapia czy chemioterapia. Głównym źródłem terapii jest aktywacja limfocytów T, uwalnianie białek szoku termicznego, aktywacja czynników transkrypcyjnych NF- κ oraz komórek *natural killers*, a także wzrost ekspresji genu kodującego immunogeny peptyd HSP90 eksponowany na powierzchni komórek nowotworowych. Niestety, ogólnoustrojowe podwyższenie temperatury działa destrukcyjnie nie tylko na tkanki nowotworowe prowadząc do osłabienia całego organizmu i niekiedy nieodwracalnych zmian w zdrowych tkankach. W celu zminimalizowania uszkodzeń zdrowych organów ważne stało się opracowanie metody przestrzennego ograniczenia zabiegu hipertermii. Zlokalizowana hipertermia jest terapią, która pozwala na dokładną kontrolę i miejscowe stosowanie hipertermii w celu niszczenia wybranych tkanek. Terapia ta, wykorzystuje nanowymiarowe cząsteczki zdolne do przekształcenia energii zewnętrznego źródła (np. fotonów czy też pola magnetycznego) w energię cieplną, która jest przekazywana do otaczających tkanek i komórek. Przestrzenna lokalizacja jest zwykle osiągnięta poprzez aktywację nanocząsteczek biomolekułami np. antygenami, pozwalającymi uzyskać wybiórcze i specyficzne biologicznie wiązanie do określonych komórek. W praktyce klinicznej stosowane były nanocząstki złota z przyłączonym fluoroforem, oraz Fe_3O_4 jako kontrastem do obrazowania rezonansem magnetycznym i kropkami kwantowymi jako luminoforami [174]. Postępy leczenia były obserwowane za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, który jest jednak niekomfortową i kosztowną metodą obrazowania. Niedawno wykazano, że zlokalizowane podgrzewanie można uzyskać za pomocą dwufunkcyjnych nanocząstek NaYF_4 silnie domieszkowanych jonami Nd^{3+} . Nanokrystality te mogą służyć do zlokalizowanej fototerapii z jednoczesnym bioobrazowaniem NIR-NIR [92].

2.8. PLATFORMY NANOBIOTECHNOLOGICZNE

Różnorodność zastosowań i zalety nanoluminoforów konwertujących w górę opisane w poprzednich rozdziałach pozwalają przewidzieć, że ich cząsteczki mogą być w prosty sposób zaadaptowane do pełnienia więcej niż jednej funkcji [175]. Rysunek 16 przedstawia schematycznie nanocząstkę pełniącą rolę platformy nanobiotechnologicznej. Przykładowo platformy, przenoszące chemioterapeutyki w celu kontrolowanego i przedłużonego uwalniania leków, mogą dodatkowo przenosić fotouczulacze stosowane w terapii fotodynamicznej. Dodatkowo platformy te, mogą zawierać środki kontrastujące stosowane w magnetycznym rezonansie jądrowym, pozytronowej tomografii PET, a także w tradycyjnym obrazowaniu fluorescencyjnym [176]. Kumulacja tych nanokompozytów w obszarach chorobowych jest wysoce selektywna dzięki aktywacji powierzchni nanocząstek z odpowiednimi molekułami.



Rysunek 16. Schemat przedstawiający wielofunkcyjne nanoplatfomy

Figure 16. Schematic illustration of multifunctional nanoplatfoms

Hu wraz ze współpracownikami [104] wykorzystali pokryte osłonką krzemionkową nanokryształy NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ do specyficznego obrazowania komórek nowotworowych. Pokrycie krzemionką umożliwia wprowadzenie do otoczki organicznego barwnika fluorescencyjnego oraz odpowiednią modyfikację powierzchni nanokompozytów. Tak powstały kompleks pokryty cienką osłonką z nanocząsteczek złota, a następnie warstwą glikolu polietylenowego i kwasu foliowego, który umożliwił lokowanie się nanocząsteczek w obszarach o obniżonym pH. Tak zsyntetyzowane nanoluminofory mogą służyć zarówno do obrazowania za pomocą luminescencji [104], jak i rezonansu magnetycznego, a także mogą być zastosowane w terapii fototermicznej [1].

Innym przykładem wykorzystania wielofunkcyjnych nanocząsteczek było zaprojektowanie nanozwiązków zawierających paramagnetyczny rdzeń Gd₂O₃ [2]. W eksperymencie pokazano możliwość jednoczesnego obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego oraz fluorescencji. Son i współpracownicy [177] wykorzystali wielofunkcyjne nanokryształy do wykrywania mutacji w pojedynczym nukleotydzie. Dzięki wykorzystaniu nanokrysztalitów Fe₃O₄/Gd₂O₃:Eu³⁺, zmutowane fragmenty DNA mogły być odseparowane od reszty próbki poprzez działanie pola magnetycznego. W eksperymencie wykorzystano zarówno właściwości magnetyczne jak i luminescencyjne nanokrysztalitów.

PODSUMOWANIE

Konwertujące w górę nanoluminofory znajdują zastosowania w konstrukcji biotestów i biocujników, w znakowaniu biologicznym, a także w obrazowaniu i terapii fotodynamicznej. Jedną z największych zalet UCNP jest możliwość wykonania analiz opartych na zjawisku LRET. Ta technika pomiarowa otwiera drogę do szybkich i przesiewowych testów chorób, mutacji genetycznych a także testowania leków *in vitro*, po to by zawęzić olbrzymią bazę „proto-leków” do najbardziej obiecujących związków [178]. Testy wykorzystujące mechanizm LRET są jednorodne, nie wymagają separacji ani wymywania, znacznie ułatwiając detekcję analitu w próbkach bezpośrednio po pobraniu. Ze względu na relatywnie długi zasięg LRET’u, jako bioaktywne makromolekuły mogą być użyte białka, przeciwciała, itp., posiadające znaczne rozmiary. Zapewnia to wysoką biologiczną specyficzność i wiarygodność detekcji. Możliwość wykrycia nawet mało intensywnego sygnału z pomiarów intensywności luminescencji, a także czasów życia donora znacznie minimalizuje objętość próbki i ilość reagentów prowadząc do obniżenia kosztów analiz.

Kolejną zaletą nanoluminoforów oraz nanokrystalitów wielofunkcyjnych, jest możliwość użycia ich, jako nośniki leków. Zastosowanie odpowiednich nanonośników może poprawić rozpuszczalność, biodostępność czy też odporność chemoterapeutyków na degradację enzymatyczną. Wielofunkcyjne nanoplatfomy pozwalają ponadto na łączenie kilku metod obrazowania, umożliwiają równoczesną weryfikację uwalniania leków oraz inicjują zlokalizowaną foto- lub termoterapię. Mimo wielu potencjalnych zalet nanotechnologii w badaniach *in vivo*, konieczna jest weryfikacja wpływu nanocząsteczek na organizmy żywe i środowisko. Te same cechy, które są pożądane i użyteczne z punktu widzenia technologii czy biomedycyny (np. mały rozmiar, przenikanie bariery krew-mózg itp.), mogą przyczynić się do niespodziewanej nanotoksyczności.

PODZIĘKOWANIA

Praca została sfinansowana ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu „Wykorzystanie Nanotechnologii w nowoczesnych materiałach” – NanoMat (POIG.01.01.02-02-002/08) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2). A.B. dziękuje również za finansowe wsparcie Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Nr N N507 58 49 38.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] L. Cheng, K. Yang, Y. Li, J. Chen, C. Wang, M. Shao, S.T. Lee, Z. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 7385.
- [2] J.-L. Bridot, A.-C. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Josserand, J.-L. Coll, L. Vander Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 5076.
- [3] W.W. Yu, Y.A. Wang, X. Peng, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 4300.
- [4] Y.H. Chang, D.T. Bau, Y.S. Lee, C.Y. Chen, H.J. Huang, F.J. Tsai, C.H. Tsai, C.Y.C. Chen, *Adv. Mater. Res.*, 2009, **79-82**, 565.
- [5] J. Ye, P. Van Dorpe, W. Van Roy, K. Lodewijks, I. De Vlaminck, G. Maes, G. Borghs, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 3110.
- [6] R.S. Meltzer, S.P. Feofilov, B. Tissue, H.B. Yuan, *Phys. Rev. B*, 1999, **60**, 14012.
- [7] J. Zhou, M. Yu, Y. Sun, X. Zhang, X. Zhu, Z. Wu, D. Wu, F. Li, *Biomaterials*, 2011, **32**, 1148.
- [8] F. Wang, W.B. Tan, Y. Zhang, X. Fan, M. Wang, *Nanotechnology*, 2006, **17**, R1.
- [9] M. Wang, G. Abbineni, A. Clevenger, C. Mao, S. Xu, *Nanomedicine: NBM*, 2011, **7**, 710.
- [10] A. Burns, H. Ow, U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 1028.
- [11] S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 4988.
- [12] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 4056.
- [13] L. Wang, W. Tan, *Nano Lett.*, 2005, **6**, 84.
- [14] S. Santra, D. Dutta, B.M. Moudgil, *FBP*, 2005, **83**, 136.
- [15] S.W. Bae, W. Tan, J.-I. Hong, *Chem. Commun.*, 2011.
- [16] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res*, 2008, **1**, 99.
- [17] W.C.W. Chan, D.J. Maxwell, X. Gao, R.E. Bailey, M. Han, S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 40.
- [18] X. Peng, L. Manna, W. Yang, J. Wickham, E. Scher, A. Kadavanich, A.P. Alivisatos, *Nature*, 2000, **404**, 59.
- [19] T.T. Tan, S.T. Selvan, L. Zhao, S. Gao, J.Y. Ying, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 3112.
- [20] T. Jin, F. Fujii, E. Yamada, Y. Nodasaka, M. Kinjo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9288.
- [21] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, *Science*, 2005, **307**, 538.
- [22] D.K. Yi, S.T. Selvan, S.S. Lee, G.C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J.Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 4990.
- [23] X. Gao, S. Nie, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 11575.
- [24] L. Shi, V. De Paoli, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10378.
- [25] J.H. Kim, S. Chaudhary, M. Ozkan, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 195105.
- [26] F. Dubois, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris, C. Mioskowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **129**, 482.
- [27] P. Yang, N. Murase, J. Yu, *Colloids Surf., A*, 2011, **385**, 159.
- [28] T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A.L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile, W.J. Parak, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 703.
- [29] A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia, *Nano Lett.*, 2003, **4**, 11.
- [30] X. Gao, L. Yang, J.A. Petros, F.F. Marshall, J.W. Simons, S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005, **16**, 63.
- [31] D.K. Chatterjee, A.J. Rufaihah, Y. Zhang, *Biomaterials*, 2008, **29**, 937.
- [32] L. Cheng, K. Yang, M. Shao, X. Lu, Z. Liu, *Nanomedicine*, 2011, **6**, 1327.
- [33] L. Xiong, T. Yang, Y. Yang, C. Xu, F. Li, *Biomaterials*, 2010, **31**, 7078.
- [34] A. Elsaesser, C.V. Howard, *Adv. Drug Del. Rev.*, 2012, **64**, 129.

- [35] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Small, 2008, **4**, 26.
- [36] F. Meiser, C. Cortez, F. Caruso, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, **43**, 5954.
- [37] J. Shen, L.-D. Sun, C.-H. Yan, Dalton Trans., 2008, 5687.
- [38] H.S. Mader, P. Kele, S.M. Saleh, O.S. Wolfbeis, Curr. Opin. Chem. Biol., 2010, **14**, 582.
- [39] L. Ding, H. Ju, J. Mater. Chem., 2011, **21**, 18154.
- [40] T. Ukonaho, T. Rantanen, L. Jämsen, K. Kuningas, H. Pääkilä, T. Lövgren, T. Soukka, Anal. Chim. Acta, 2007, **596**, 106.
- [41] T. Soukka, T. Rantanen, K. Kuningas, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2008, **1130**, 188.
- [42] J.-C.G. Bünzli, Acc Chem Res, 2005, **39**, 53.
- [43] Y. Wang, X. Guo, T. Endo, Y. Murakami, M. Ushirozawa, J. Solid State Chem., 2004, **177**, 2242.
- [44] A. Mayer, S. Neuenhofer, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, **33**, 1044.
- [45] T. Soukka, H. Härmä, *Lanthanide Nanoparticules as Photoluminescent Reporters* [w:] *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*, P. Hänninen, H. Härmä (Ed.), Springer Ser Fluoresc (2011) 7: 89–114, DOI 10.1007/4243_2010_11, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, published online: 26 October 2010.
- [46] F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu, X. Chen, X. Liu, Analyst, 2010, **135**, 1839.
- [47] L.M. Maestro, E.M. Rodriguez, F. Vetrone, R. Naccache, H.L. Ramirez, D. Jaque, J.A. Capobianco, J.G. Solé, Opt. Express, 2010, **18**, 23544.
- [48] S. Heer, K. Kömpe, H.U. Güdel, M. Haase, Adv. Mater., 2004, **16**, 2102.
- [49] J.-C.G. Bünzli, S. Comby, A.-S. Chauvin, C.D.B. Vandevyver, J. Rare Earths, 2007, **25**, 257.
- [50] A. Bednarkiewicz, M. Mączka, W. Strek, J. Hanuza, M. Karbowski, Chem. Phys. Lett., 2006, **418**, 75.
- [51] M.L. Debasu, D. Ananias, A.G. Macedo, J. Rocha, L.s.D. Carlos, J. Phys. Chem. C, 2011, **115**, 15297.
- [52] F. Auzel, Chem. Rev., 2003, **104**, 139.
- [53] F. Auzel, C.R. Acad. Sci., 1966, **262**, 1016.
- [54] Z. Hong-Lou, L. Ning, X. Da-Yuan, Z. Xu-Chang, L. Wei, L. Hui-Chun, Chin. Phys. Lett., 2005, **22**, 1806.
- [55] P.V. dos Santos, M.T. de Araujo, A.S. Gouveia-Neto, J.A. Medeiros Neto, A.S.B. Sombra, Appl. Phys. Lett., 1998, **73**, 578.
- [56] H. Scheife, G. Huber, E. Heumann, S. Bär, E. Osiać, Opt. Mater., 2004, **26**, 365.
- [57] H.J. Zijlmans, J. Bonnet, J. Burton, K. Kardos, T. Vail, R.S. Niedbala, H.J. Tanke, Anal. Biochem., 1999, **267**, 30.
- [58] K.W. Krämer, D. Biner, G. Frei, H.U. Güdel, M.P. Hehlen, S.R. Lüthi, Chem. Mater., 2004, **16**, 1244.
- [59] J.F. Suyver, J. Grimm, K.W. Krämer, H.U. Güdel, J. Lumin., 2005, **114**, 53.
- [60] H. Schäfer, P. Ptacek, K. Kömpe, M. Haase, Chem. Mater., 2007, **19**, 1396.
- [61] P. Il, J.H. Kim, K.T. Lee, K.-S. Jeon, H. Bin Na, J.H. Yu, H.M. Kim, N. Lee, S.H. Choi, S.-I. Baik, H. Kim, S.P. Park, B.-J. Park, Y.W. Kim, S.H. Lee, S.-Y. Yoon, I.C. Song, W.K. Moon, Y.D. Suh, T. Hyeon, Adv. Mater., 2009, **21**, 4467.
- [62] F. Auzel, Chem. Rev., 2004, **104**, 139.
- [63] S.A. Payne, C. Bibeau, J. Lumin., 1998, **79**, 143.
- [64] A.A. Kaminskii, *Crystalline lasers: physical processes and operating schemes*, CRC Press Boca Raton 1996.
- [65] J. Marie-France, Opt. Mater., 1999, **11**, 181.
- [66] F. Auzel, Y.H. Chen, J. Lumin., 1995, **65**, 45.
- [67] W.E. Case, M.E. Koch, A.W. Kueny, J. Lumin., 1990, **45**, 351.

- [68] N. Garnier, R. Moncorge, H. Manaa, E. Descroix, P. Laporte, Y. Guyot, *J. Appl. Phys.*, 1996, **79**, 4323.
- [69] S. Guy, M.F. Joubert, B. Jacquier, C. Linares, *Ann. Phys.*, 1995, **20**, 117.
- [70] M. Malinowski, A. Wnuk, Z. Frukacz, G. Chadeyron, R. Mahiou, S. Guy, M.F. Joubert, *J. Alloys Compd.*, 2001, **323**, 731.
- [71] S. Xiao, L. Zhou, Q.Q. Wang, H. Deng, S.H. Yang, *Chin. Phys. Lett.*, 2009, **26**, 124209.
- [72] Q. Zhan, J. Qian, H. Liang, G. Somesfalean, D. Wang, S. He, Z. Zhang, S. Andersson-Engels, *Acs Nano*, 2011, **5**, 3744.
- [73] M. Wang, C. Mi, Y. Zhang, J. Liu, F. Li, C. Mao, S. Xu, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 19021.
- [74] J.F. Suyver, J. Grimm, M.K. van Veen, D. Biner, K.W. Krämer, H.U. Güdel, *J. Lumin.*, 2006, **117**, 1.
- [75] F. Wang, D.K. Chatterjee, Z. Li, Y. Zhang, X. Fan, M. Wang, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 5786.
- [76] W. Jiang, E. Papa, H. Fischer, S. Mardyani, W.C.W. Chan, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 607.
- [77] Y.-C. Cao, Z.-L. Huang, T.-C. Liu, H.-Q. Wang, X.-X. Zhu, Z. Wang, Y.-D. Zhao, M.-X. Liu, Q.-M. Luo, *Anal. Biochem.*, 2006, **351**, 193.
- [78] R.P. Bagwe, C. Yang, L.R. Hilliard, W. Tan, *Langmuir*, 2004, **20**, 8336.
- [79] J. Pichaandi, J.-C. Boyer, K.R. Delaney, F.C.J.M. van Veggel, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 19054.
- [80] S. Majuru, M.O. Oyewumi, [w:] *Nanotechnology in Drug Delivery*, M.M. Villiers, P. Aramwit, G.S. Kwon (Eds), Springer New York, New York, 2009.
- [81] T. Soukka, H. Härmä, J. Paukkunen, T. Lövgren, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 2254.
- [82] J.-Q. Gu, J. Shen, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 6589.
- [83] J.K. Herr, J.E. Smith, C.D. Medley, D. Shangguan, W. Tan, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2918.
- [84] C. Buzea, I.I. Pacheco, K. Robbie, *Biointerphases*, 2008, **4**, MR17.
- [85] C. Salthouse, S. Hildebrand, R. Weissleder, U. Mahmood, *Opt. Express*, 2008, **16**, 21731.
- [86] C.T. Xu, J. Axelsson, S. Andersson-Engels, *Appl. Phys. Lett.*, 2009, **94**, 251107.
- [87] K. Kuningas, T. Rantanen, T. Ukonaho, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7348.
- [88] P. Corstjens, M. Zuiderwijk, A. Brink, S. Li, H. Feindt, R.S. Niedbala, H. Tanke, *Clin. Chem.*, 2001, **47**, 1885.
- [89] P.L.A.M. Corstjens, L. van Lieshout, M. Zuiderwijk, D. Kornelis, H.J. Tanke, A.M. Deelder, G.J. van Dam, *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**, 171.
- [90] P. Zhang, W. Steelant, M. Kumar, M. Scholfield, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 4526.
- [91] F. Vetrone, R. Naccache, A. Zamarrón, A. Juarranz de la Fuente, F. Sanz-Rodríguez, L. Martínez Maestro, E. Martín Rodríguez, D. Jaque, J. García Solé, J.A. Capobianco, *Acs Nano*, 2010, **4**, 3254.
- [92] A. Bednarkiewicz, D. Wawrzynczyk, M. Nyk, W. Strek, *Appl. Phys. B*, 2011, **103**, 847.
- [93] C. Wang, L. Cheng, Z. Liu, *Biomaterials*, 2011, **32**, 1110.
- [94] C. Bouzigues, T. Gacoin, A. Alexandrou, *Acs Nano*, 2011, **5**, 8488.
- [95] L.P. Qian, L.H. Zhou, H.-P. Too, G.-M. Chow, *J. Nanopart. Res.*, 2010, **13**, 499.
- [96] R.M. Petoral, F. Söderlind, A. Klasson, A. Suska, M.A. Fortin, N. Abrikosova, L.a. Selegård, P.-O. Käll, M. Engström, K. Uvdal, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 6913.
- [97] K. Kuningas, T. Ukonaho, H. Päkikilä, T. Rantanen, J. Rosenberg, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 4690.
- [98] Y. Yang, Y. Qu, J. Zhao, Q. Zeng, Y. Ran, Q. Zhang, X. Kong, H. Zhang, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, **2010**, 5195.
- [99] L. Wang, Y. Li, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 4203.
- [100] L. Wang, P. Li, L. Wang, *Luminescence*, 2009, **24**, 39.
- [101] J. Zhou, Y. Sun, X. Du, L. Xiong, H. Hu, F. Li, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3287.
- [102] G. Zhang, Y. Liu, Q. Yuan, C. Zong, J. Liu, L. Lu, *Nanoscale*, 2011, **3**, 4365.
- [103] Z. Chen, H. Chen, H. Hu, M. Yu, F. Li, Q. Zhang, Z. Zhou, T. Yi, C. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 3023.

- [104] H. Hu, L. Xiong, J. Zhou, F. Li, T. Cao, C. Huang, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 3577.
- [105] M. Wang, C.-C. Mi, W.-X. Wang, C.-H. Liu, Y.-F. Wu, Z.-R. Xu, C.-B. Mao, S.-K. Xu, *Acs Nano*, 2009, **3**, 1580.
- [106] D.K. Chatterjee, Z. Yong, *Nanomedicine*, 2008, **3**, 73.
- [107] Q. Chen, X. Wang, F. Chen, Q. Zhang, B. Dong, H. Yang, G. Liu, Y. Zhu, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 7661.
- [108] J. Chen, C. Guo, M. Wang, L. Huang, L. Wang, C. Mi, J. Li, X. Fang, C. Mao, S. Xu, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 2632.
- [109] S. Jiang, Y. Zhang, *Langmuir*, 2010, **26**, 6689.
- [110] Z. Tian, G. Chen, X. Li, H. Liang, Y. Li, Z. Zhang, Y. Tian, *Lasers Med. Sc.*, 2009, **25**, 479.
- [111] X.F. Yu, L.D. Chen, M. Li, M.Y. Xie, L. Zhou, Y. Li, Q.Q. Wang, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4118.
- [112] T. Zako, H. Nagata, N. Terada, A. Utsumi, M. Sakono, M. Yohda, H. Ueda, K. Soga, M. Maeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2009, **381**, 54.
- [113] M. Kamimura, D. Miyamoto, Y. Saito, K. Soga, Y. Nagasaki, *Langmuir*, 2008, **24**, 8864.
- [114] D. Casanova, C. Bouzigues, T.-L. Nguyen, R.O. Ramodiharilafy, L. Bouzahir-Sima, T. Gacoin, J.-P. Boilot, P.-L. Tharaux, A. Alexandrou, *Nat Nano*, 2009, **4**, 581.
- [115] D.E. Achatz, R. Ali, O.S. Wolfbeis, [w:] *Luminescence Applied in Sensor Science*, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni (Eds), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010.
- [116] D.K. Chatterjee, M.K. Gnanasammandhan, Y. Zhang, *Small*, 2010, **6**, 2781.
- [117] J. Shen, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *Dalton Trans.*, 2008, 5687.
- [118] D. Vennerberg, Z. Lin, *Sci. Adv. Mater.*, 2011, **3**, 26.
- [119] G. Tian, Z. Gu, L. Zhou, W. Yin, X. Liu, L. Yan, S. Jin, W. Ren, G. Xing, S. Li, Y. Zhao, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 1226.
- [120] N.B. Ramírez, A.M. Salgado, B. Valdman, *Braz. J. Chem. Eng.*, 2009, **26**,
- [121] P.L. Corstjens, S. Li, M. Zuiderwijk, K. Kardos, W.R. Abrams, R.S. Niedbala, H.J. Tanke, *IEE Proc. Nanobiotechnol.*, 2005, **152**, 64.
- [122] R.S. Niedbala, H. Feindt, K. Kardos, T. Vail, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle, R. Vallejo, *Anal. Biochem.*, 2001, **293**, 22.
- [123] Z. Yan, L. Zhou, Y. Zhao, J. Wang, L. Huang, K. Hu, H. Liu, H. Wang, Z. Guo, Y. Song, H. Huang, R. Yang, *Sens. Actuators, B*, 2006, **119**, 656.
- [124] B.Y. Jung, S.C. Jung, C.H. Kweon, *J. Food Prot.*, 2005, **68**, 2140.
- [125] H.S. Mader, M. Link, D.E. Achatz, K. Uhlmann, X. Li, O.S. Wolfbeis, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 5416.
- [126] P.L. Corstjens, M. Zuiderwijk, M. Nilsson, H. Feindt, R. Sam Niedbala, H.J. Tanke, *Anal. Biochem.*, 2003, **312**, 191.
- [127] G. Shan, H. Huang, D.W. Stoutamire, S.J. Gee, G. Leng, B.D. Hammock, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 218.
- [128] M. Nichkova, D. Dosev, S.J. Gee, B.D. Hammock, I.M. Kennedy, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 6864.
- [129] K.E. Sapsford, L. Berti, I.L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**, 4562.
- [130] B. Herman, V.E. Centonze Frohlich, J.R. Lakowicz, T.J. Fellers, M.W. Davidson, *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy* [online], Olympus FluoView Resource Center: FRET Introductory Concepts, [2012-05-23]. Dostępny w Internecie: <http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>.
- [131] L. Stryer, R.P. Haugland, *PNAS*, 1967, **58**, 719.
- [132] I. Hemmilä, V. Laitala, *J. Fluoresc.*, 2005, **15**, 529.
- [133] X. Xiao, J.P. Haushalter, K.T. Kotz, G.W. Faris, *Biomed. Opt. Express*, 2011, **2**, 2255.
- [134] J.-C.G. Bünzli, C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 1048.

- [135] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A.M. Seifalian, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4717.
- [136] M. Kumar, P. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 2431.
- [137] L. Wang, R. Yan, Z. Huo, L. Wang, J. Zeng, J. Bao, X. Wang, Q. Peng, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 6054.
- [138] M. Wang, W. Hou, C.-C. Mi, W.-X. Wang, Z.-R. Xu, H.-H. Teng, C.-B. Mao, S.-K. Xu, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 8783.
- [139] T. Rantanen, M.-L. Järvenpää, J. Vuojola, K. Kuningas, T. Soukka, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 2008, **47**, 3811.
- [140] K. Kuningas, H. Pakkila, T. Ukonaho, T. Rantanen, T. Lovgren, T. Soukka, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 145.
- [141] L.-N. Sun, H. Peng, M.I.J. Stich, D. Achatz, O.S. Wolfbeis, *Chem. Commun.*, 2009,
- [142] D.E. Achatz, R.J. Meier, L.H. Fischer, O.S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 260.
- [143] R. Ali, S.M. Saleh, R.J. Meier, H.A. Azab, I.I. Abdelgawad, O.S. Wolfbeis, *Sens. Actuators, B.*, 2010, **150**, 126.
- [144] H.S. Mader, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5002.
- [145] S.F. Lim, R. Riehn, W.S. Ryu, N. Khanarian, C.-k. Tung, D. Tank, R.H. Austin, *Nano Lett.*, 2005, **6**, 169.
- [146] L. Cheng, K. Yang, S. Zhang, M. Shao, S. Lee, Z. Liu, *Nano Res.*, 2010, **3**, 722.
- [147] R. Abdul Jalil, Y. Zhang, *Biomaterials*, 2008, **29**, 4122.
- [148] L. Cheng, K. Yang, M. Shao, X. Lu, Z. Liu, *Nanomedicine*, London, England, 2011,
- [149] A. Elsaesser, C.V. Howard, *Adv. Drug Del. Rev.* 64, **2012**, 129.
- [150] S. Hirano, K.T. Suzuki, *Environ. Health Perspect.*, 1996, **104**, 85.
- [151] A. Xia, Y. Gao, J. Zhou, C.Y. Li, T.S. Yang, D.M. Wu, L.M. Wu, F.Y. Li, *Biomaterials*, 2011, **32**, 7200.
- [152] Q. Le Masne de Chermont, C. Chaneac, J. Seguin, F. Pelle, S. Maitrejean, J.P. Jolivet, D. Gourier, M. Bessodes, D. Scherman, *P. Nat. Acad. Sci.*, 2007, **104**, 9266.
- [153] N.M. Idris, Z. Li, L. Ye, E.K. Wei Sim, R. Mahendran, P.C.-L. Ho, Y. Zhang, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5104.
- [154] O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi, F. Druon, J.-P. Boudou, T. Sauvage, P. Georges, P.A. Curmi, F. Treussart, *Small*, 2008, **4**, 2236.
- [155] O. Faklaris, V. Joshi, T. Irinopoulou, P. Tauc, M. Sennour, H. Girard, C.I. Gesset, J.-C. Arnault, A. Thorel, J.-P. Boudou, P.A. Curmi, F.o. Treussart, *ACS Nano*, 2009, **3**, 3955.
- [156] M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller, *Science*, 2003, **302**, 442.
- [157] D. Lasne, G.A. Blab, S. Berciaud, M. Heine, L. Groc, D. Choquet, L. Cognet, B. Lounis, *Biophys. J.*, 2006, **91**, 4598.
- [158] E. Beaufrepaire, V. Buissette, M.-P. Sauviat, D. Giaume, K. Lahlil, A. Mercuri, D. Casanova, A. Huignard, J.-L. Martin, T. Gacoin, J.-P. Boilot, A. Alexandrou, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 2079.
- [159] J.V. Moore, C.M.L. West, C. Whitehurst, *Phys. Med. Biol.*, 1997, **42**, 913.
- [160] G.-I. Sengee, N. Badraa, Y.K. Shim, *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, **9**, 1407.
- [161] R. Allison, H. Mota, C. Sibata, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 263.
- [162] A. Castano, T. Demidova, M. Hamblin, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 279.
- [163] R. Allison, G. Downie, X.H. Hu, C. Childs, C. Sibata, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 27.
- [164] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1998, **90**, 889
- [165] M. Olivo, R. Bhuvanewari, S.S. Lucky, N. Dendukuri, P. Soo-Ping Thong, *Pharmaceuticals*, 2010, **3**, 1507.

- [166] B. Ungun, R.K. Prud'homme, S.J. Budijon, J. Shan, S.F. Lim, Y. Ju, R. Austin, *Opt. Express*, 2009, **17**, 80.
- [167] M. Suzuki, V. Tseeb, K. Oyama, S.i. Ishiwata, *Biophys. J.*, 2007, **92**, L46.
- [168] J. Lee, N.A. Kotov, *Nano Today*, 2007, **2**, 48.
- [169] Z. Liu, Y. Bando, J. Hu, K. Ratinac, S.P. Ringer, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 3681.
- [170] M.r.A.R.C. Alencar, G.S. Maciel, C.B. de Araújo, A. Patra, *Appl. Phys. Lett.*, 2004, **84**, 4753.
- [171] M. Aldén, A. Omrane, M. Richter, G. Särner, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 2011, **37**, 422.
- [172] U. Hobohm, *Cancer Immunology, Cancer Immunol. Immunother.*, 2001, **50**, 391.
- [173] P. Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, P.M. Schlag, *The Lancet Oncology*, 2002, **3**, 487.
- [174] F.-Y. Cheng, C.-H. Su, P.-C. Wu, C.-S. Yeh, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3167.
- [175] D. Bechet, P. Couleaud, C.I. Frochot, M.-L. Viriot, F.o. Guillemin, M. Barberi-Heyob, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 612.
- [176] Q. Liu, Y. Sun, C.G. Li, J. Zhou, C.Y. Li, T.S. Yang, X.Z. Zhang, T. Yi, D.M. Wu, F.Y. Li, *ACS Nano*, 2011, **5**, 3146.
- [177] A. Son, A. Dhirapong, D.K. Dosev, I.M. Kennedy, R.H. Weiss, K.R. Hristova, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 1829.
- [178] V. Bergendahl, T. Heyduk, R.R. Burgess, *Appl. Environ. Microb.*, 2003, **69**, 1492.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 marca 2012

