

Институт фотонных технологий РАН Федерального государственного
учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и
фотоника» Российской академии наук»

На правах рукописи

Трифанова Екатерина Максимовна

**Спектральное преобразование лазерного излучения
биосовместимыми матричными структурами**

Специальность 2.2.2. – «Электронная компонентная база микро- и
наноэлектроники, квантовых устройств»

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук
Попов Владимир Карпович

Москва – 2023

Оглавление

Оглавление.....	2
Введение.....	5
Актуальность темы	5
Цель и задачи.....	7
Научная новизна.....	8
Практическая значимость	9
Положения, выносимые на защиту	10
Личный вклад автора.....	11
Степень достоверности и апробация результатов.....	11
Глава 1. Люминесцентные наночастицы и материалы для оптической визуализации и тканевой инженерии.....	15
1.1. Типы люминесцентных наномаркеров	15
1.1.1. Органические люминесцентные наномаркеры.....	16
1.1.2. Неорганические люминесцентные наномаркеры.....	17
Глава 2. Характеризация наноразмерных апконвертирующих фосфоров....	19
2.1. Типы апконвертирующих нанофосфоров	19
2.2. Материалы и методы	21
2.3. Результаты и обсуждения.....	23
Выводы к главе 2.....	35
Глава 3. Фантомы биологических тканей.....	36
3.1. Виды оптических фантомов биологических тканей	36
3.2. Исследование изменений спектра фотолюминесценции наночастиц при прохождении сквозь фантомы.....	37
3.2.1. Материалы и методы	37

3.2.2. Результаты и обсуждения	41
Выводы к главе 3.....	51
Глава 4. Мультимодальные апконвертирующие нанофосфоры для биоимиджинга.....	53
4.1. Окна прозрачности биоткани.....	53
4.2. НАФ $\alpha\text{-NaYbF}_4\text{:Er}_{0.02}\text{Ce}_{0.02}\text{Zn}_{0.1}$ для биоимиджинга в видимом и инфракрасном диапазонах.....	54
4.2.1. Материалы и методы	54
4.2.2. Результаты и обсуждения	55
Выводы к главе 4.....	60
Глава 5. Биосовместимые матричные структуры	61
5.1. Методы изготовления матричных структур	61
5.1.1. Электроспиннинг	61
5.1.2. Трехмерная печать.....	62
5.2. Материалы для биосовместимых матричных структур.....	63
5.2.2. Синтетические полимеры	64
5.3. Формирование полимерных матричных структур, импрегнированных НАФ, и изучение их оптических свойств.....	66
5.3.1. Материалы и методы	66
5.3.2. Химическая стабилизация коллагена	73
5.3.3. Механические испытания ЭС ПЛГ	78
5.3.4. Изготовление полимерных матриц, импрегнированных НАФ, и их характеристика	78
5.3.5. Клеточные испытания	90
5.3.6. Исследования <i>in vivo</i>	93

5.3.7. Гистологическое исследование	95
Выводы к главе 5.....	98
Заключение	100
Перечень условных обозначений и сокращений	102
Благодарности	104
Список литературы:	105

Введение

Актуальность темы

Разработка принципиально новых элементов и устройств эффективного преобразования оптического излучения из одного диапазона длин волн в другой является одним из ключевых направлений развития квантовой электроники и оптической техники. В основе таких устройств лежат хорошо изученные физические явления и процессы, к числу которых, в первую очередь, следует отнести фотолюминесценцию, спонтанное и вынужденное комбинационное рассеяние света, нелинейно-оптическую генерацию гармоник и параметрическое смешение частот, а также различные квантово-размерные и многофотонные эффекты. Предметом настоящей диссертационной работы является решение задачи эффективного спектрального преобразования лазерного излучения биосовместимыми матричными структурами с использованием наноразмерных апконвертирующих фосфоров (НАФ) [1]. В результате процесса последовательного заселения высокоэнергетических уровней редкоземельных ионов, входящих в структуру НАФ, эти наночастицы позволяют преобразовывать лазерное излучение из области $0,9 \div 2,5$ мкм (SWIR диапазон) в фотолюминесценцию в УФ, видимом и ближнем ИК диапазонах с высоким (до 10%) коэффициентом конверсии излучения. Благодаря своим уникальным свойствам НАФ обладают узкими полосами фотолюминесценции и ее большими (до нескольких сотен нанометров) частотными сдвигами по отношению к возбуждающему излучению [2], химической и фотостабильностью [3], и, как следствие, могут служить эффективными компонентами систем мультимодальной оптической диагностики различных процессов и объектов [4]. Эти наночастицы идеально подходят как для приповерхностной, так и для глубокой оптической визуализации живых тканей в ближнем ИК диапазоне (700-1000 нм) в так называемых “окнах прозрачности биотканей” [5]. Возможность регистрации оптического сигнала в более коротковолновой (по сравнению с длиной волны возбуждения) области спектра позволяет исключить вклад автолюминесценции

исследуемых объектов [6]. Детектирование и анализ нелинейно зависящей от интенсивности возбуждения антистоксовой фотолюминесценции НАФ являются необходимыми для разработки и реализации новых технологий оптического биоимиджинга с высоким пространственным разрешением. Все это открывает широкие перспективы для дальнейшего развития современной биомедицины, в частности таких ее направлений, как терапевтическое воздействие лазерного излучения на различные биоткани и оптическая диагностика происходящих в них процессов в реальном масштабе времени. Однако, на сегодняшний день однозначных количественных данных об изменениях фотолюминесцентных свойств НАФ как при их внедрении в биосовместимые матричные структуры, так и при биodeградации последних явно недостаточно. Все это и обуславливает актуальность темы диссертационной работы.

Практическая значимость диссертационной работы связана с активным использованием в настоящее время разнообразных неинвазивных методов визуализации и диагностики различных тканей и органов организма человека и животных, а также происходящих в них процессов в реальном масштабе времени. Эти методы играют огромную роль как в проведении передовых биомедицинских исследований, так и в повседневной клинической практике, имеющей большую социальную значимость. Рентгеновская и компьютерная томография, позитронно-эмиссионная, однофотонная эмиссионная и магнитно-резонансная томографии, а также ультразвуковая, оптическая, и мультимодальная визуализации [7] позволяют сегодня решать широкий круг важнейших фундаментальных и прикладных задач. Оптические методы визуализации, основанные на фотолюминесценции, имеют ряд преимуществ над другими методами визуализации. Они интуитивно понятны и используют безопасные для организма диапазоны излучения [8, 9]. Также оптическая визуализация может быть применена неинвазивно и позволяет одновременно изучать несколько процессов в одном объекте, что делает эту методику экономически выгодной и дает возможность получить более полное представление о функционировании живых систем [10]. Поэтому развитие и

дальнейшее совершенствование этих и подобных им методов на основе и с привлечением новой компонентой базы является чрезвычайно актуальной задачей.

Современные материалы и методы тканевой инженерии позволяют создавать тканеинженерные конструкции (ТИК) для эффективного замещения дефектов нативных тканей организма человека и животных, а также для их направленной регенерации [11]. Основой таких биомедицинских изделий являются трехмерные биосовместимые матриксы, обеспечивающие эффективное прикрепление, дифференцировку и пролиферацию различных клеточных культур [12] и, по сути, представляющие собой элементы передовой технологической платформы для изготовления так называемых “умных матриксов” (smart scaffolds) [13]. Имплантируемые матриксы должны иметь физико-химические и биохимические характеристики, максимально приближенные к нативным тканям реципиента. Поэтому сегодня для этих целей широко применяются полимеры природного происхождения, такие как коллаген и гиалуроновая кислота.

Как правило, контроль состояния и функционирования ТИК внутри организма требует вывода из эксперимента используемых лабораторных животных в определенные промежутки времени для удаления этих матриксов вместе с прилегающими тканями с целью их дальнейшего морфологического исследования [14]. Отсутствие возможности высококонтрастной прижизненной визуализации ТИК и окружающих их биотканей значительно усложняют проведение подобных исследований состояния ТИК внутри организма. Фотолюминесцентные характеристики НАФ, в принципе, позволяют не только реализовывать и совершенствовать процессы высококонтрастной визуализации гибридных биосовместимых структур и нативных тканей *in vivo*, но также позволяют использовать их для элементов компонентной базы высокотехнологичного оборудования для современного биоимиджинга.

Цель и задачи

Целью настоящей работы является изучение процессов спектрального преобразования лазерного излучения наноразмерными апконвертирующими

фосфорами, распределенными в биосовместимых полимерных матриксах, изготовленных различными методами, а также исследование изменения их фотолюминесцентных характеристик в процессе взаимодействия с живыми объектами (клетками и биотканями).

Для достижения поставленных целей необходимо было решить следующие задачи:

- Изучить оптические характеристики НАФ $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ и их коллоидных растворов в полярных и неполярных растворителях;
- Исследовать зависимости физико-химических свойств НАФ в зависимости от их размеров, состава, наличия или отсутствия у них оболочек разных толщин;
- Исследовать спектры фотолюминесценции разработанных матриксов на основе коллагена, гиалуроновой кислоты и алифатических полиэфиров, импрегнированных НАФ, а также процессы их преобразования в условиях *in vitro* и *in vivo*.
- Разработать процесс формирования и стабилизации пространственной структуры коллагеновых матриксов;
- Разработать и изготовить экспериментальные образцы биорезорбируемых матриксов на основе различных полимеров природного и синтетического происхождения, импрегнированных НАФ, и исследовать возможность их применения для решения задач тканевой инженерии;
- Разработать новые подходы к визуализации и диагностике тканеинженерных конструкций и происходящих с ними процессов *in vivo* в реальном масштабе времени.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы состоит в следующем:

1. Впервые экспериментально исследовано преобразование лазерного излучения ближнего ИК диапазона в фотолюминесценцию видимого и УФ диапазонов различными НАФ, инкапсулированными в коллагеновые матриксы, изготовленные методом электроспиннинга.

2. Разработан процесс химической стабилизации структуры и механических свойств коллагеновых матриц, изготовленных методом электроспиннинга, который, с одной стороны, позволяет контролировать скорость их биодegradации *in vitro* и *in vivo*, а с другой – не влияет на фотолюминесцентные свойства содержащихся в них НАФ, что позволит использовать такие матрицы для высококонтрастной визуализации.
3. Впервые показано, что биодegradация полимерных матриц в условиях *in vitro* приводит к изменению соотношения интенсивностей «красного» (в области 658 нм) и «зеленого» (в области 544 нм) пиков фотолюминесценции инкапсулированных в них НАФ, что дает возможность изучать кинетику этих процессов в режиме реального времени.
4. Установлено, что фотолюминесцентные свойства высокопористых матриц, импрегнированных НАФ, изменяются в зависимости от их микроокружения, что позволяет осуществлять не только высококонтрастную визуализацию коллагеновых, полиэфирных и гиалуроновых структур в фантомах биологических тканей организма, но и проводить их мониторинг *in vivo* в реальном масштабе времени.

Практическая значимость

1. Разработан процесс экструзионной 3D печати с последующим фотоотверждением биосовместимых матриц на основе глицидил метакрилата гиалуроновой кислоты, импрегнированной НАФ $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$, и изучены их оптические характеристики.
2. Разработан процесс электроспиннинга биорезорбируемых матриц на основе коллагена и полилактогликолида, импрегнированных НАФ $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$, и изучены их фотолюминесцентные свойства.
3. Разработан процесс химической стабилизации структуры и механических характеристик коллагеновых матриц.

4. Реализована дистанционная визуализация высокопористых матриц, содержащих НАФ, из коллагена, гиалуроновой кислоты и алифатических полиэфиров в фантомах биологических тканей организма *in vitro*, имитирующих условия в живой ткани *in vivo*.

5. С помощью МТТ-теста, световой и конфокальной флуоресцентной микроскопии исследована цитотоксичность коллагеновых, полиэфирных и гиалуроновых матриц, импрегнированных НАФ, и показана их высокая биосовместимость.

6. Изучено спектральное преобразование лазерного излучения биосовместимыми матрицами, импрегнированными НАФ, с использованием *in vivo* модели их подкожной имплантации самкам мышей линии BALB/c.

Полученные в работе данные и экспериментальные результаты могут быть использованы для разработки новых подходов к оптической визуализации и диагностике тканеинженерных конструкций и “умных матриц”, а также для мониторинга происходящих с ними процессов *in vivo* в реальном масштабе времени.

Положения, выносимые на защиту

1. Высокопористые коллагеновые, полиэфирные и гиалуроновые матрицы, импрегнированные НАФ $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$, позволяют проводить эффективное преобразование лазерного излучения из ближнего ИК в видимый диапазон длин волн.

2. НАФ на основе кристаллической решетки $\alpha\text{-NaYbF}_4$ за счет резонансного расселения уровней ионов Er^{3+} (выше $^4\text{I}_{13/2}$) при взаимодействии с ионами Ce^{3+} в концентрации 2 моль% могут использоваться в качестве фотолюминесцентных наномаркеров в диапазоне длин волн от 650 до 1000 нм.

3. Химическая стабилизация структуры и механических свойств коллагеновых матриц, изготовленных методом электроспиннинга, с одновременным добавлением диглицидилового эфира 1,4-бутанодиола (ДГЭБ) в исходный раствор и использованием растворов изопропанола с 15 масс.% ДГЭБ, позволяет не только контро-

лизовать скорость их биодegradации *in vitro* и *in vivo* (от нескольких часов до нескольких недель), но и не влияет на фотолюминесцентные характеристики содержащихся в них НАФ $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$.

4. Высвобождение наноразмерных апконвертирующих фосфоров $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ из полимерных матриц в окружающую среду в ходе гидролитической деградации последних вызывает изменение соотношения интенсивностей «красного» (в области 658 нм) и «зеленого» (в области 544 нм) пиков фотолюминесценции НАФ, что позволяет изучать кинетику этих процессов в режиме реального времени.

5. Полимерные матрицы, импрегнированные НАФ $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$, не проявляют выраженной острой цитотоксичности, а физико-химические свойства их поверхности и объемной структуры обеспечивают требуемые условия для эффективного прикрепления, пролиферации и дифференцировки клеток, необходимые для направленной регенерации биотканей.

Личный вклад автора

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных автором лично либо при его активном участии, в период с 2018 по 2023 гг. Личный вклад автора в диссертационную работу состоит в анализе литературы, подготовке аналитического и измерительного оборудования, сборке экспериментальных установок, отладке их работы, проведении собственных экспериментов по измерению фотолюминесцентных свойств наночастиц, изготовлению фантомов и фотолюминесцентных матриц, подбору оптимальных параметров процессов электроспиннинга, изучению изменения фотолюминесценции в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также обработке, анализе и оформлению полученных результатов в виде научных докладов и публикаций.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность изложенных в диссертационной работе результатов подтверждается независимыми физическими экспериментами, согласованием

полученных результатов с результатами других исследований, систематическим характером проведенных исследований, использованием современной аппаратуры и методов исследования.

Основные результаты работы представлены на всероссийских и международных конференциях: II Всероссийский форум научной молодежи «Богатство России» (Москва, 2018), X Научно-практическая конференция с международным участием «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» (Ростов-на-Дону, 2019), IV Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019), VIII Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, 2020), VII Троицкая конференция с международным участием «Медицинская физика» (Троицк, 2020), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020), Vth Sechenov International Biomedical Summit (Москва, 2021), Школа-конференция с международным участием по оптоэлектронике, фотонике и нанобиоструктурам SaintPetersburg OPEN (Санкт-Петербург, 2022), IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция "Химия, физика, биология: пути интеграции" (Москва, 2022), 9th Nanotech & Nanomaterials Research Conference (Rome, 2023).

Исследования поддерживались грантом РФФИ «Трансформации спектров флуоресценции нанофосфоров биосовместимыми матричными структурами» № 20-32-90218_Аспиранты (руководитель Попов В.К.).

Материалы, изложенные в диссертации, опубликованы в 8 статьях в рецензируемых журналах из перечня ВАК:

1. Дунаев А.Г. Физико-химические методы повышения гидрофильности поверхности алифатических полиэфилов для тканеинженерных конструкций / Дунаев А.Г., Марьянац А.О., Сячина М.А., Трифанова Е.М., Попов В.К. // Физика и химия обработки материалов – 2019. – № 6 – С.72–78.

2. Арутюнян И.В. Деградация D,L-полилактидов в биологических средах: эксперимент и модель / Арутюнян И.В., Боровиков П.И., Дунаев А.Г., Кротова Л.И.,

Свиридов А.П., Трифанова Е.М., Фатхудинов Т.Х., Сухих Г.Т., Попов В.К. // Перспективные материалы – 2020. – № 7 – С.40–51.

3. Трифанова Е.М. Синтез и характеристика наноразмерных апконвертирующих фосфоров $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ / Трифанова Е.М., Николаева М.Е., Попов В.К. // Перспективные материалы – 2021. – № 12 – С.40–50.

4. Trifanova E.M. Natural and synthetic polymer scaffolds comprising upconversion nanoparticles as a bioimaging platform for tissue engineering / Trifanova E.M., Khvorostina M.A., Mariyanats A.O., Sochilina A. V, Nikolaeva M.E., Khaydukov E. V, Akasov R.A., Popov V.K. // Molecules – 2022. – Т. 27 – № 19 – С.6547.

5. Trifanova E.M. Photoluminescent $\alpha\text{-NaYbF}_4:\text{Er}_{0.02}\text{Ce}_{0.02}\text{Zn}_{0.1}$ nanoparticles for bioimaging in visible and infrared ranges / Trifanova E.M., Koshelev A. V., Khaydukov K. V., Krylov I. V., Popov V.K. // St. Petersburg Polytechnic University Journal: Physics and Mathematics – 2022. – Т. 15 – № 3.2 – С.306–310.

6. Trifanova E.M. Photoluminescent scaffolds based on natural and synthetic biodegradable polymers for bioimaging and tissue engineering / Trifanova E.M., Babayeva G., Khvorostina M.A., Atanova A. V, Nikolaeva M.E., Sochilina A. V, Khaydukov E. V, Popov V.K. // Life – 2023. – Т. 13 – № 4 – С.870.

7. Арутюнян И.В. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на физико-химические и механические свойства полиэфирных матриксов различной архитектуры / Арутюнян И.В., Дунаев А.Г., Трифанова Е.М., Хворостина М.А., Ельчанинов А.В., Соболева А.Г., Фатхудинов Т.Х., Попов В.К. // Перспективные материалы – 2023. – № 5 – С.22–34.

8. Трифанова Е.М. Трансформации спектров фотолюминесценции наноразмерных апконвертирующих фосфоров фантомами биологических тканей / Трифанова Е.М., Николаева М.Е., Свиридов А.П., Попов В.К. // Оптика и спектроскопия – 2023. – Т. 131 – № 6 – С.787–796.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав и заключения. Работа содержит 129 страниц печатного текста, 52 рисунка и 7 таблиц. В библиографическом списке содержится 196 ссылок на источники.

Глава 1. Люминесцентные наночастицы и материалы для оптической визуализации и тканевой инженерии

В настоящее время хорошо разработан целый ряд различных методов биоимиджинга. К ним, в первую очередь, следует отнести: флуоресцентный анализ [15], компьютерную и магнитно-резонансную томографии [16, 17], спектроскопию комбинационного рассеяния [18], темнопольную микроскопию [19], двухфотонную флуоресценцию [20] и фотоакустическую визуализацию [21]. У каждого из них есть свои достоинства и недостатки, особенности и границы применения.

Методы, основанные на фотолюминесценции, интуитивно понятны и требуют относительно невысоких затрат [8]. Оптическая визуализация не использует радиацию и другие вредные виды излучения и может быть применена неинвазивно – без разрезов и других повреждений тканей – что делает ее одним из самых безопасных методов прижизненного биоимиджинга. Также она может быть использована для исследования различных биологических объектов: клеток, тканей и органов [9]. Оптическая визуализация позволяет одновременно изучать несколько процессов в одном объекте, что дает возможность получить более полное представление о функционировании живых систем [10]. Сегодня для визуализации живых клеток и их органелл при проведении разнообразных исследований *in vitro* довольно активно используются различные люминесцентные наномаркеры [22, 23].

1.1. Типы люминесцентных наномаркеров

Люминесцентные наномаркеры для оптической визуализации должны быть не токсичными, гидрофильными и обладать способностью достаточно долго (от часов до нескольких дней) находиться внутри организма, обеспечивая возможность проведения длительных наблюдений [24, 25]. Люминесцентные свойства таких наночастиц (спектральные характеристики, значения квантового выхода фотолюминесценции и т.д.) при их введении в организм не должны меняться со временем. В то же время, для адекватного отражения состояния исследуемых

биотканей они должны меняться строго контролируемым образом в зависимости от свойств их микроокружения [26]. Также для реализации контрастного биоимиджинга не только в приповерхностных зонах, но и в глубоких (до нескольких сантиметров) слоях изучаемого объекта важно, чтобы спектр их фотолюминесценции находился в пределах оптических “окон прозрачности” соответствующих биотканей [5].

Преимущество таких материалов заключается в том, что их оптическими свойствами легко управлять путем изменения их состава и/или структуры [27]. Эти свойства делают люминесцентные наномаркеры подходящим компонентом систем для оптической диагностики и прижизненной визуализации.

Различные биологические ткани имеют разную химическую и физическую структуру, что может повлиять на эффективность использования наномаркеров. Существует огромное количество различных люминесцентных наномаркеров, и подбор определенного типа наномаркеров под каждое конкретное исследование является важной его частью. Этот выбор должен быть обусловлен не только целями исследования, но и на требуемой точностью и чувствительностью метода. Наномаркеры можно разделить на две большие группы: на органические [28] и неорганические [29].

1.1.1. Органические люминесцентные наномаркеры

Органические наноматериалы можно разделить на несколько семейств, из которых самыми известными являются флуоресцентные красители и полимерные наночастицы.

Самыми распространенными органическими флуоресцентными красителями являются цианины [30]. Они применяются для визуализации как в видимом и ближнем ИК диапазоне (600 – 900 нм) [31], так и в диапазоне больше 1000 нм [32]. Также можно добиться управления длиной волны фотолюминесценции цианинов в красной и ИК областях при возбуждении разной длиной волны (552 и 808 нм) [33].

Полимерные наночастицы [34] могут использоваться как для терапии раковых опухолей [35], так и для их флуоресцентной визуализации [15]. Они

являются перспективным наноматериалом для биоимиджинга, однако их клиническое применение требует дальнейшего изучения их цитотоксичности при участии в метаболических процессах, способствующих их деградации [36].

Органические люминесцентные материалы обладают высокой биосовместимостью, однако они менее стабильны и имеют худшие люминесцентные характеристики, чем неорганические [27].

1.1.2. Неорганические люминесцентные наномаркеры

Наночастицы золота являются очень распространенным материалом [37], так как они могут быть использованы не только для визуализации [38], но и для терапии [39], доставки лекарств [40], спектроскопии комбинационного рассеяния [41] и детектирования различных веществ [42]. Они стабильны [43] и могут применяться в компьютерной томографии [16], магнитно-резонансной томографии [44], темнопольной микроскопии [19] и фотоакустической визуализации [21]. Однако, вопрос об их токсичности все еще остается открытым [45].

Наноматериалы на основе графена – оксид графена, восстановленный оксид графена, графеновые квантовые точки и их производные [46] – применяются для разных типов имиджинга: флуоресцентной визуализации [47], магнитной резонансной томографии при совместном использовании с наночастицами оксида железа [48], спектроскопии комбинационного рассеяния при добавлении алюминия, золота или серебра [18], двухфотонной флуоресценции [20], компьютерной томографии при добавлении наночастиц серебра [49].

Квантовые точки (КТ) представляют собой полупроводниковое кристаллическое ядро, покрытое одной или несколькими оболочками [50]. Самыми распространенными материалами для ядра являются CdSe, CdS, CdTe, InP, или InAs [51], для оболочки – ZnS или ZnSe [52]. В основном КТ применяются в микроскопии [53] и клеточной визуализации [54]. КТ обладают широкими спектрами как поглощения, так и фотолюминесценции, что позволяет делать разноцветную визуализацию при использовании одного источника возбуждающего излучения [51]. Они обладают относительно высоким квантовым выходом (до 27%) [55], однако без модификаций и покрытия специальной оболочкой они токсичны

[56]. Более того, из-за своей высокой стабильности они могут долго находиться в организме и после деградации оболочки снова становятся токсичными [24].

Наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ), легированные ионами редкоземельных элементов, способны люминесцировать в различных диапазонах спектра, что обеспечивает широкие возможности для биоимиджинга [57]. Сегодня НАФ активно применяются в системах доставки лекарств и таргетной терапии [58]. Они обладают рядом преимуществ перед другими флуоресцентными наноматериалами: высокой химической и фотостабильностью [3], отсутствием фотомигания, узкими полосами и большими антистоксовыми сдвигами фотолюминесценции в несколько сотен нанометров по сравнению с возбуждающим излучением [2]. Мультимодальность также является одним из преимуществ НАФ. Токсичность НАФ довольно хорошо изучена и зависит от их размера, концентрации и способов модификации их поверхности [59]. Кроме того, НАФ могут быть покрыты различными оболочками, способными усиливать и изменять их свойства для определенных целей (например, биоинертными и гидрофильными оболочками [60]). Все вышперечисленные свойства НАФ делают их привлекательными для использования в составе матриц для ТИК.

Глава 2. Характеризация наноразмерных апконвертирующих фосфоров

2.1. Типы апконвертирующих нанофосфоров

Наноразмерные апконвертирующие фосфоры представляют собой неорганическую кристаллическую матрицу, легированную ионами лантаноидов. Структура НАФ обуславливает нелинейные процессы поглощения фотонов с последовательной передачей энергии, что обеспечивает их уникальные фотолюминесцентные свойства [61]. Множество факторов влияет на характеристики фотолюминесценции наночастиц, прежде всего – особенности методики их создания, а также условия окружающей среды [62], химический и фазовый состав, размер наночастиц [63], а также наличие или отсутствие оболочки и ее состав [60]. В зависимости от поставленной задачи можно варьировать характеристики НАФ, изменяя как состав кристаллической матрицы, так и типы легирующих ионов.

Катионами для кристаллической матрицы могут служить как ионы щелочных и щелочноземельных металлов Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^+ , Ba^+ [64–66], так и ионы лантаноидов La^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+} и другие [67]. При использовании гадолиния (NaGdF_4) и лютеция (NaLuF_4) в качестве легирующих ионов можно получить изображения как за счет фотолюминесценции, так и методами магнитно-резонансной [3] и компьютерной томографий [68]. Состав кристаллической решетки влияет в основном на интенсивность пиков фотолюминесценции, в то время как положение пиков фотолюминесценции наночастиц будет зависеть от расположения энергетических уровней легирующих ионов [69]. Эти ионы делятся на активаторы и сенсибилизаторы [70].

Одним из наиболее распространенных активаторов является эрбий (Er^{3+}). Эрбиевые НАФ активно используются для имиджинга живых клеток *in vitro* и тканей *in vivo* (в живом организме), а также для биологического детектирования [71]. На основе подобных НАФ изготавливают биосенсоры, например, для локального измерения температуры [72, 73], так как эрбиевые наночастицы имеют пик фотолюминесценции на длине волны $\lambda = 544$ нм, который попадает в спектр

поглощения бенгальского розового. Этот фотосенсибилизатор при возбуждении «зеленым» светом индуцирует образование активных радикалов, что способствует неинвазивной фотохимической сшивке дермального коллагена [74].

НАФ, которые имеют в качестве активатора тулий (Tm^{3+}), характеризуются интенсивными пиками фотолюминесценции в ультрафиолетовой (УФ) и синей областях спектра (345-475 нм). При облучении в этом диапазоне длин волн фотосенсибилизатор рибофлавин участвует в генерации активных форм кислорода, разрушающих раковые клетки [75]. Также нанокристаллы $NaYF_4$, легированные ионами Yb^{3+} и Tm^{3+} , были успешно использованы для биоимиджинга линии клеток рака яичников (CaOV3) на длине волны 800 нм [76].

Для локального измерения температуры могут быть использованы наночастицы $NaGdF_4$, легированные Ho^{3+}/Nd^{3+} или Er^{3+}/Nd^{3+} с парными пиками фотолюминесценции в ИК диапазоне (1.18–1.34 мкм и 1.55–1.34 мкм) [77].

Одним из важнейших параметров НАФ является коэффициент конверсии (КК) излучения. КК определяется как отношение мощности фотолюминесценции на определенной длине волны к мощности поглощенного излучения [78]. Снижение КК при уменьшении размеров НАФ может быть обусловлено увеличением соотношения площади поверхности наночастиц к их объему [79]. Также наличие стоксовой люминесценции, кросс-релаксация и поверхностное тушение могут уменьшать эффективность апконверсии излучения [62]. Поверхностные дефекты и взаимодействие с молекулами внешней среды могут влиять на процессы безызлучательного переноса энергии от легирующих ионов, в частности это приводит к увеличению частоты таких переносов энергии от ионов сенсibilизатора к поверхности наночастицы, а не внутри ее объема, что и вызывает так называемое поверхностное тушение фотолюминесценции [80]. Количество безызлучательных переносов энергии к поверхности можно уменьшить за счет уменьшения отношения площади поверхности наночастицы к ее объёму, то есть просто увеличить размер наночастиц. Покрытие наночастицы оболочкой также может уменьшить поверхностное тушение фотолюминесценции. Существуют разные типы оболочек: инертная [81] и активная [82]. Как правило,

перенос энергии между ионами сенсibilизатора и внешней средой очень эффективен. С помощью формирования инертной оболочки можно увеличить расстояние между молекулами внешней среды и ионами сенсibilизатора. Это в свою очередь приведет не только к повышению квантового выхода фотолюминесценции [83] за счет снижения вероятности подобных безызлучательных переходов [7], но и к увеличению эффективности апконверсии за счет эффективного экранирования фотолюминесцентных центров от поверхностных дефектов [76]. Активная оболочка способствует усилению апконверсии путем переноса энергии от возбужденных ионов Yb^{3+} в активной оболочке к ионам в ядре, которые пространственно разделены, тем самым ограничивая эффективность концентрационного тушения [82].

Одним из распространенных методов синтеза НАФ является метод термического разложения фторидных прекурсоров в среде высококипящих растворителей. Этот метод позволяет синтезировать частицы с достаточной степенью монодисперсности, что имеет решающее значение для фотолюминесцентного анализа [85].

2.2. Материалы и методы

β -гексагональная фаза наночастиц $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ синтезирована методом термолиза трифторацетатных комплексов в олеиновой кислоте (Sigma-Aldrich, США) и 1-октадецене (Sigma-Aldrich, США), описанным в [86], сотрудниками ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Часть синтезированных наночастиц была покрыта кристаллической инертной оболочкой состава NaYF_4 .

С помощью сканирующих электронных микроскопов (СЭМ) Scios (FEI, США) при ускоряющем напряжении 2 кВ с использованием детектора вторичных электронов (детектор Эверхарта-Торнли) в режиме Optiplan и LEO 1450 (Carl Zeiss, Tescan VEGA) при ускоряющем напряжении 10 кВ и просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) Tecnai G²12 SPIRIT (Thermo Fisher Scientific, США) анализировали размеры и морфологию поверхности наночастиц. Для

исследования с помощью СЭМ наночастицы, диспергированные в гексане, наносили на полированные кремниевые пластины. Затем на кремниевые пластины с наночастицами напыляли смесь золота и палладия (толщина слоя напыления - 20 нм). Количественная оценка распределения наночастиц по размерам проводилась при помощи программы ImageJ [87].

Для исследования фотолюминесцентных свойств наночастицы, диспергированные в гексане, осаждали на предметное стекло. Спектры фотолюминесценции образцов регистрировали с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция) при возбуждении непрерывным излучением. В качестве источника возбуждающего излучения использовали полупроводниковый лазер LDD-10 (АО "Полупроводниковые приборы", Россия) с оптоволоконным выходом и длиной волны 976 нм.

Для оценки коэффициента конверсии (КК) ИК излучения в видимый диапазон спектра использовали специально разработанную экспериментальную установку на основе интегрирующей сферы Labsphere, покрытой сильно рассеивающим материалом в диапазоне от 300 до 2000 нм. Образец устанавливали внутри интегрирующей сферы на специальном держателе. В качестве фотоприемника использовался лавинный фотодиод ФД-24К с напряжением смещения -19,6 В для обеспечения линейного режима его работы. Для учета чувствительности фотоприемника вводился поправочный коэффициент. Перед фотодиодом размещали стеклянные светофильтры ИКС-1 и СЗС-26 для регистрации сигнала только на необходимых длинах волн.

Время жизни фотолюминесценции измеряли при возбуждении излучением полупроводникового лазера с длиной волны 976 нм в импульсном режиме. Пучок возбуждающего излучения делился сплиттером ~ 20/80%. 20% излучения шло на кремниевый фотоприемник APDF, а остальные 80% - на фотоумножитель (ФЭУ, Hamamatsu, Япония). Сигнал ФЭУ, соответствующий кинетике затухания, регистрировали на быстродействующем осциллографе WaveRunner 9000-MS (Teledyne LeCroy, США).

Проведено сравнение интенсивности фотолюминесценции вышеуказанных наночастиц в неполярном гексане (Химмед, Россия) и в полярном 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанолe (ГФИП) (ЗАО НПО "ПиМ-Инвест", Россия)

2.3. Результаты и обсуждения

Использованы наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ двух типов – в двух размерных диапазонах. На Рисунках 2.1 и 2.2 представлены результаты анализа с помощью сканирующей электронной микроскопии и гистограммы распределения по размерам наночастиц I типа и II типа, полученные на основе их СЭМ-изображений. Сферические наночастицы I типа имеют практически монодисперсное распределение по размерам (средний диаметр 13 ± 4 нм) и инертную эпитаксиальную оболочку NaYF_4 толщиной 3 нм. Наночастицы II типа представляют собой гексагональные кристаллы со средним размером 265 нм и толщиной оболочки 45 нм. Как видно из гистограмм, нанесение инертных оболочек NaYF_4 на поверхность наночастиц не оказало заметного влияния на их морфологию и монодисперсность.

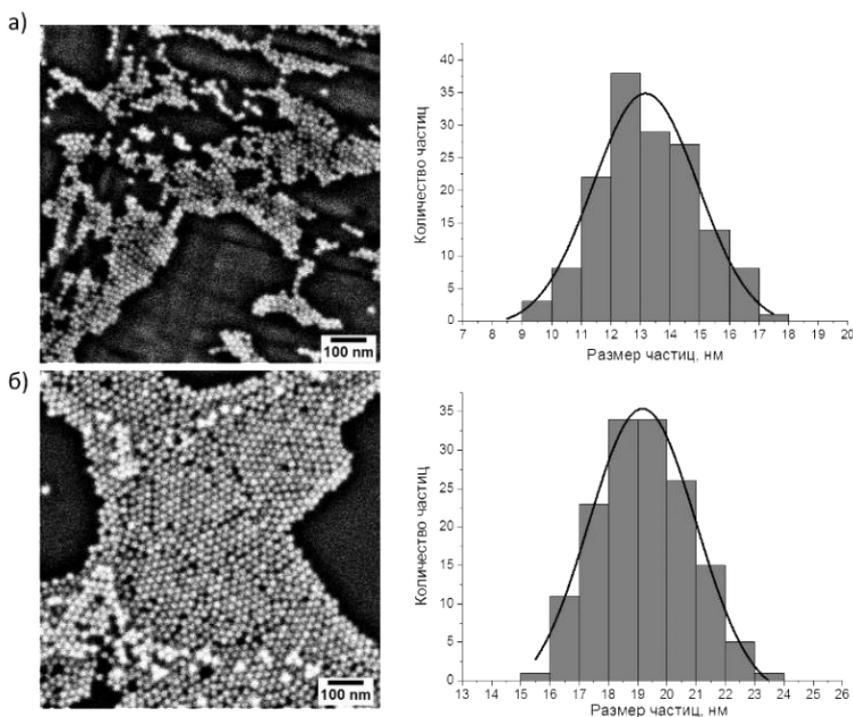


Рисунок 2.1 – СЭМ-изображения и гистограммы распределения по размерам наночастиц $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ I типа со структурой (а) «ядро» и (б) «ядро/оболочка» [86].

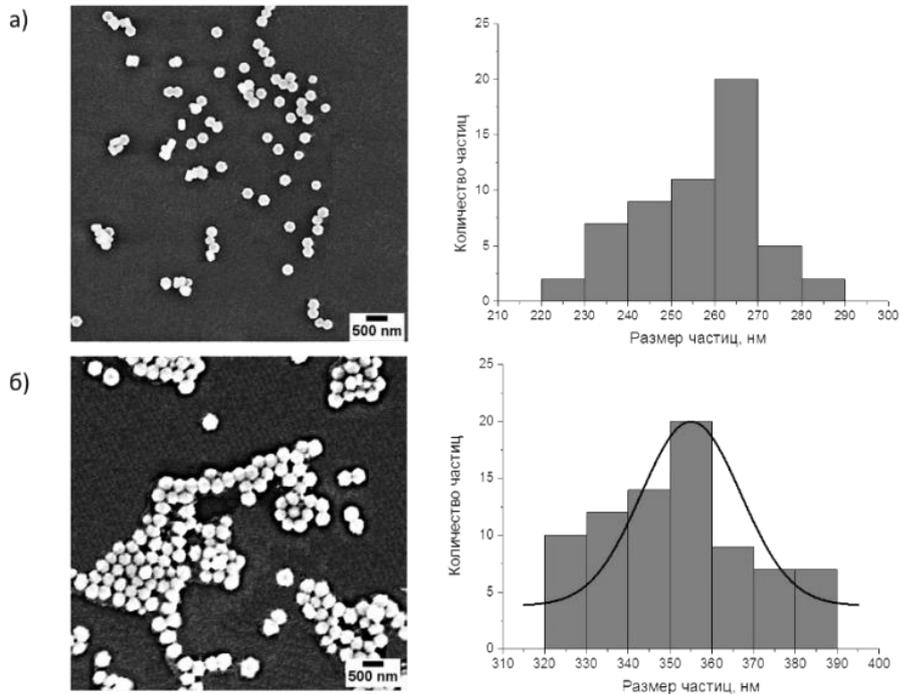


Рисунок 2.2 – СЭМ-изображения и гистограммы распределения по размерам наночастиц $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ II типа со структурой (а) «ядро» и (б) «ядро/оболочка» [86].

Сенсибилизатор, ион иттербия (Yb^{3+}), поглощает инфракрасное излучение на длине волны 976 нм, возбуждается и переходит из состояния $^2\text{F}_{7/2}$ в $^2\text{F}_{5/2}$ (Рисунок 2.3). Он может безызлучательно передавать поглощенную энергию соседним ионам Yb^{3+} , которые в свою очередь тоже могут поглощать и передавать энергию дальше, образуя множество близко расположенных возбужденных ионов иттербия в кристаллической решетке. Затем энергия может быть захвачена активатором, ионом эрбия Er^{3+} [62]. Это происходит за счет безызлучательного резонансного переноса энергии без промежуточного испускания фотонов и является результатом диполь-дипольного взаимодействия. Ион Er^{3+} переходит в метастабильное возбужденное состояние $^4\text{I}_{11/2}$, в то время как ион Yb^{3+} снова переходит в состояние $^2\text{F}_{7/2}$. После этого вокруг иона Er^{3+} остаются другие возбужденные ионы Yb^{3+} , с

которыми он может участвовать в синхронном энергообмене. В результате нескольких последовательных энергообменов активатор переходит на более высокие энергетические уровни ${}^4F_{7/2}$ и ${}^2G_{7/2}$. Из энергетического уровня ${}^4F_{7/2}$ ион Er^{3+} может безызлучательно перейти в нижележащие энергетические уровни ${}^2H_{11/2}/{}^4S_{3/2}$. С этих уровней может произойти два перехода: переход на энергетический уровень ${}^4F_{9/2}$ с последующим переходом на уровень ${}^4I_{15/2}$ или переход сразу на уровень ${}^4I_{15/2}$. Во время первого перехода происходит испускание фотона на длине волны 544 нм, во время второго – на длине волны 658 нм [88].

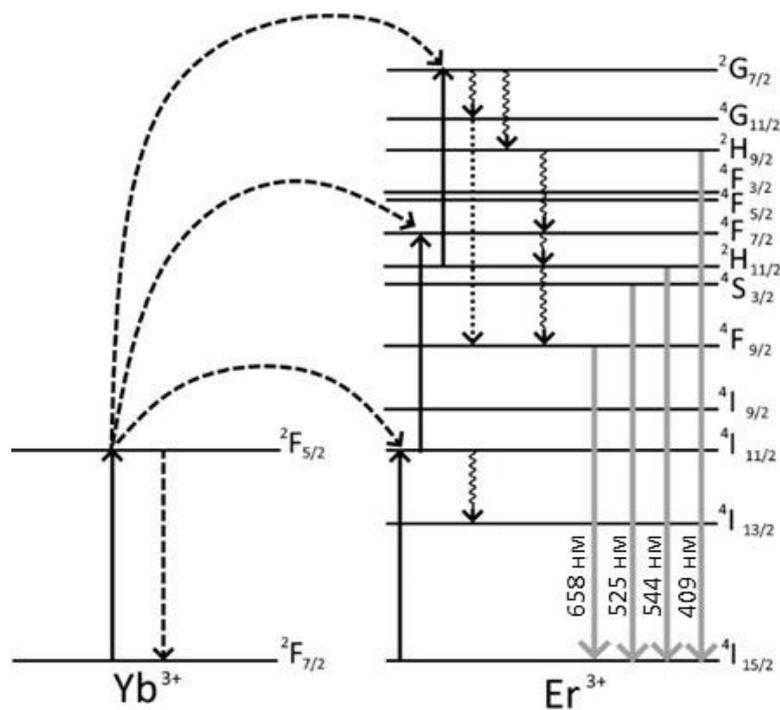


Рисунок 2.3 – Диаграмма энергетических уровней НАФ $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$.

На Рисунке 2.4 представлены характерные спектры фотолюминесценции НАФ I и II типов со структурами «ядро» и «ядро/оболочка». Интенсивность фотолюминесценции наночастиц с оболочкой существенно выше по сравнению с наночастицами со структурой только «ядро».

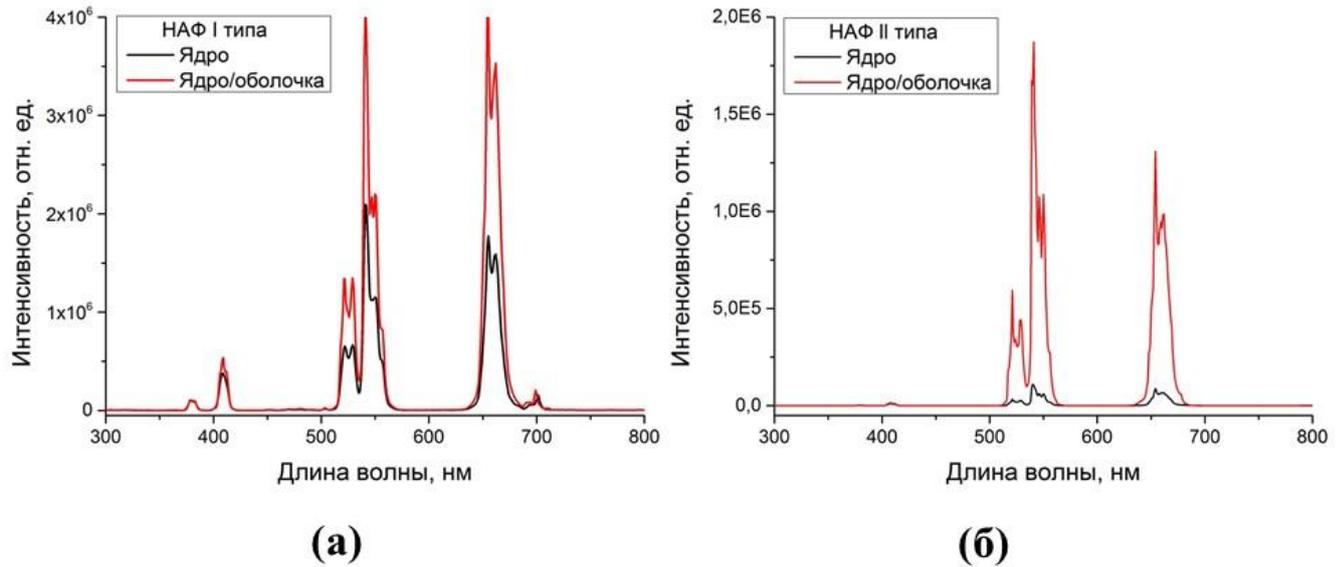


Рисунок 2.4 – Характерный спектр фотолюминесценции синтезированных НАФ (а) I типа и (б) II типа.

На Рисунке 2.5 представлены результаты сравнительного исследования зависимости интенсивности фотолюминесценции на длинах волн 544 и 658 нм для описанных выше наночастиц I и II типа при наличии и при отсутствии инертной оболочки от плотности мощности возбуждающего излучения. Линейные коэффициенты наклона прямых зависимости интенсивности фотолюминесценции НАФ в двойном логарифмическом масштабе для интенсивностей возбуждающего излучения ниже 300 Вт/см^2 составляют от 1.29 до 1.92. Это указывает на двухквантовый процесс заселения уровней. При высокой плотности мощности возбуждающего излучения (более 300 Вт/см^2) из-за эффекта насыщения перехода можно наблюдать уменьшение коэффициента наклона прямых [89].

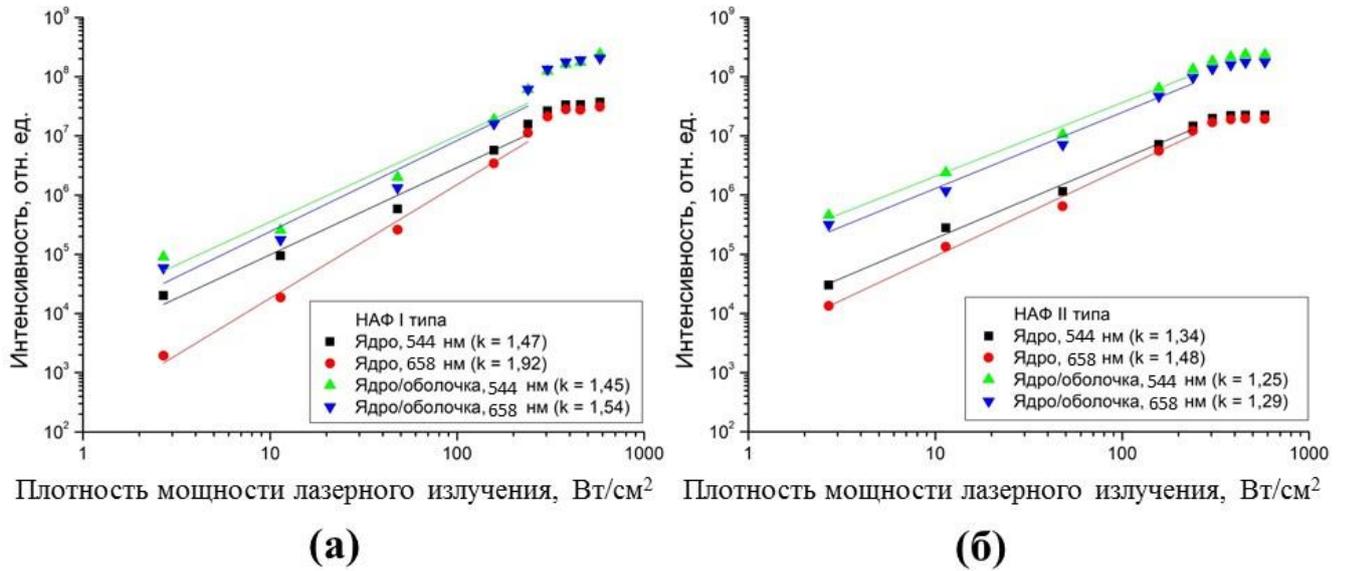


Рисунок 2.5 – Зависимость интенсивности фотолюминесценции НАФ (а) I типа и (б) II типа на длинах волн 544 нм и 658 нм от плотности мощности возбуждающего излучения в двойном логарифмическом масштабе.

Из графиков, представленных на Рисунке 2.6, видно, что отношение интенсивностей (R/G) «красного» пика фотолюминесценции на длине волны 658 нм (R) к «зеленому» на длине волны 544 нм (G) растет с увеличением плотности мощности возбуждающего излучения для всех типов наночастиц. Это происходит из-за заселения более высоких уровней Er^{3+} (${}^4\text{G}_{11/2}$ и ${}^4\text{G}_{7/2}$) при увеличении плотности мощности возбуждающего излучения. Вероятность безызлучательного перехода с этих уровней на уровень ${}^4\text{F}_{9/2}$ больше, чем вероятность перехода на уровни ${}^2\text{H}_{11/2}/{}^4\text{S}_{3/2}$ [90]. Отношение R/G НАФ I типа в режиме насыщения при 300 Вт/см² составляет 0,79 и 1,07 для структур «ядро» и «ядро/оболочка», соответственно, тогда как у наночастиц II типа эти отношения составляют 0,86 и 0,74 для структур «ядро» и «ядро/оболочка», соответственно. При высокой плотности мощности возбуждающего излучения (более 300 Вт/см²) отношение интенсивностей R/G выходит на плато. У НАФ I типа со структурой «ядро/оболочка» это отношение выше, чем у наночастиц II типа, что можно наблюдать и на соответствующих спектрах наночастиц (Рисунок 2.4). Это

указывает на увеличение количества безызлучательных переходов на уровень ${}^4F_{9/2}$ для наночастиц I типа.

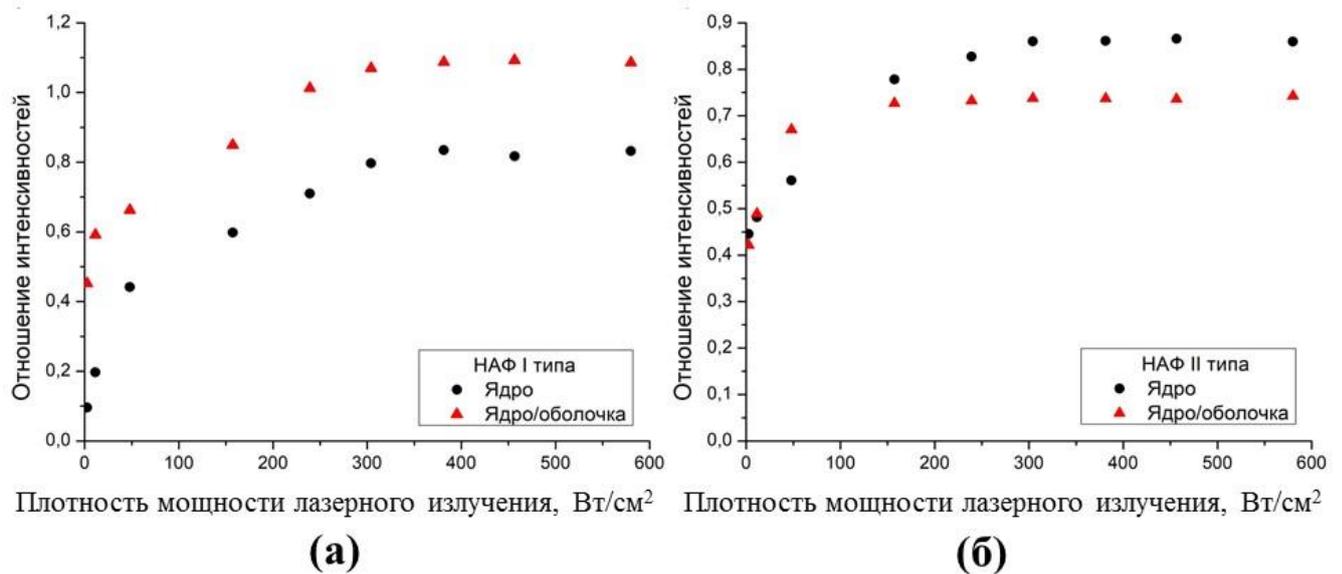


Рисунок 2.6 – Зависимость отношения интенсивности «красной» полосы фотолюминесценции на длине волны 658 нм к интенсивности «зеленой» на длине волны 544 нм НАФ (а) I типа и (б) II типа от плотности мощности возбуждающего лазерного излучения.

В таблице 2.1 представлены времена жизни фотолюминесценции наночастиц на длинах волн 409, 525, 544 и 658 нм, измеренные при плотности мощности возбуждающего излучения 500 Вт/см^2 . Видно, что у более крупных наночастиц (II типа) время жизни их фотолюминесценции увеличивается, что обусловлено уменьшением отношения площади поверхности к объему наночастиц и ростом содержания ионов лантаноидов в объемах наночастиц [80].

Таблица 2.1. Время жизни фотолюминесценции НАФ I и II типов.

Время жизни фотолюминесценции, мкс				
Длина волны, нм	НАФ I типа		НАФ II типа	
	ядро	ядро/оболочка	ядро	ядро/оболочка
409	45,1 ± 0,5	68,7 ± 0,3	275,7 ± 1,8	324,3 ± 1,4
525	72 ± 0,3	91 ± 1,2	526,6 ± 3,8	657,8 ± 6,7
544	109,9 ± 0,7	130,5 ± 1,7	594,5 ± 2,9	753,6 ± 4,9
658	133,4 ± 2,9	253 ± 15	624,8 ± 6,7	651,7 ± 7,5

Интегральный коэффициент конверсии излучения НАФ η определяется как отношение мощности фотолюминесценции к поглощённой мощности возбуждающего излучения. Его можно рассчитать по следующей формуле:

$$\eta = \frac{I_{\text{нафлюм}}}{I_{976} - I_{\text{НАФ}976}}, \quad (2.1)$$

где $I_{\text{нафлюм}}$ – интенсивность фотолюминесценции образца, I_{976} – интенсивность лазерного излучения в отсутствие поглощения, $I_{\text{НАФ}976}$ – интенсивность лазерного излучения, рассеянная образцом. Интегральный КК определялся для всех длин волн фотолюминесценции НАФ в видимом диапазоне спектра (380 – 780 нм).

Величину интенсивности сигнала лазерного излучения в отсутствие поглощения регистрировали следующим образом. Внутри сферы вместо исследуемого образца помещали матовую сапфировую пластинку, и интенсивность рассеянного ею излучения принималось за опорный сигнал I_{976} . На Рисунке 2.7 показаны зависимости величины интегрального КК излучения НАФ от интенсивности возбуждающего излучения.

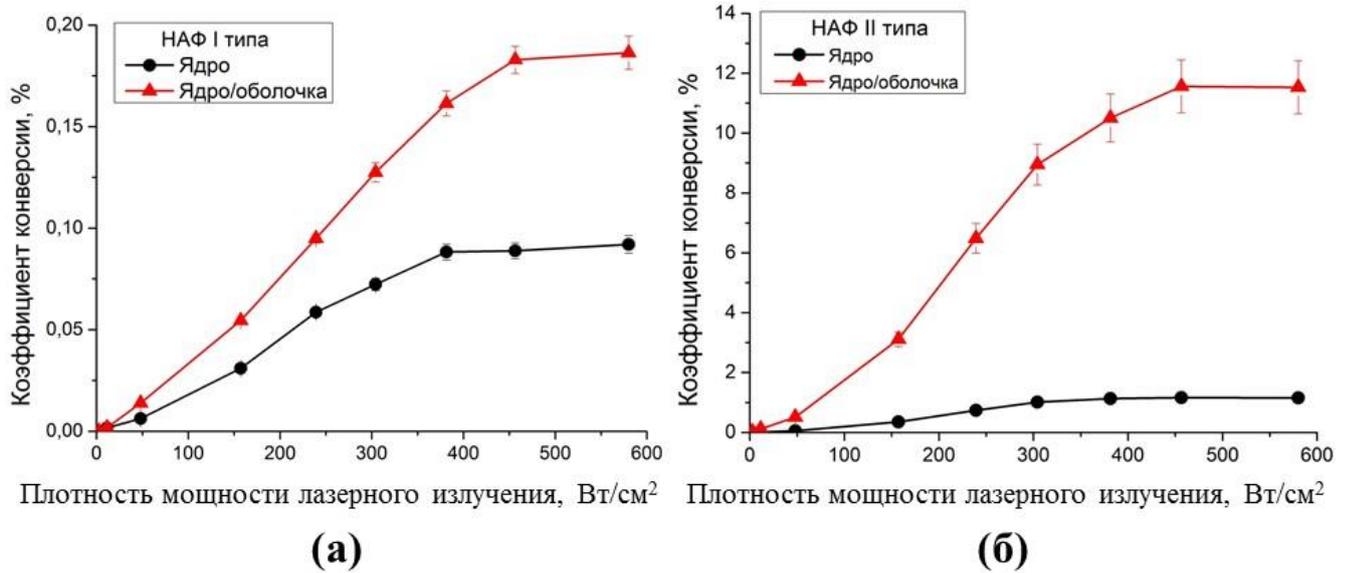


Рисунок 2.7 – Зависимости интегрального коэффициента конверсии наночастиц (а) I типа и (б) II типа от интенсивности возбуждающего излучения.

Наночастицы II типа со структурой «ядро/оболочка» обладают более высоким (~11,5%) интегральным коэффициентом конверсии излучения в режиме насыщения по сравнению с НАФ II типа со структурой только «ядро» (~1,15%). Интегральный КК излучения НАФ I типа также увеличивается для наночастиц с оболочкой и составляет 0,09% и 0,18% для структур «ядро» и «ядро/оболочка», соответственно. Увеличение интегральных коэффициентов конверсии НАФ со структурой «ядро/оболочка» может быть объяснено несколькими причинами. Во-первых, синтез наночастиц из редкоземельных оксидов позволяет соблюдать точное стехиометрическое соотношение реагентов. Во-вторых, монодисперсные нанокристаллы формируются благодаря резкому повышению температуры в начале синтеза и мгновенному охлаждению в конце. В-третьих, наличие инертной оболочки на поверхности наночастиц позволяет экранировать активные центры от тушащих факторов.

Для последующего использования синтезированных НАФ в создании исходных композиций для электроспиннинга биосовместимых матричных структур на основе растворов коллагена и полилактогликолида в ГФИП проведено сравнение интенсивности фотолюминесценции вышеуказанных наночастиц в

неполярном гексане и в полярном ГФИП при различной плотности мощности возбуждающего излучения (Рисунки 2.8 и 2.9). Показано, что интенсивность фотолюминесценции НАФ снижается в полярном ГФИП. При этом линейные коэффициенты наклона прямых зависимости интенсивности люминесценции НАФ на длинах волн 544 и 658 нм в гексане и в ГФИП для низких (до 10 Вт/см²) интенсивностей возбуждения составляют от 1,67 до 2,27. При высокой плотности возбуждения (50 и более Вт/см²) наклоны прямых уменьшаются (1,07 ÷ 1,28). Отношение интенсивностей «красного» пика на длине волны 658 нм к «зеленому» на длине волны 544 нм растет с увеличением плотности мощности возбуждающего излучения (Рисунок 2.10). При высокой плотности мощности излучения (более 150 Вт/см²) отношение интенсивностей пиков растет уже не так заметно.

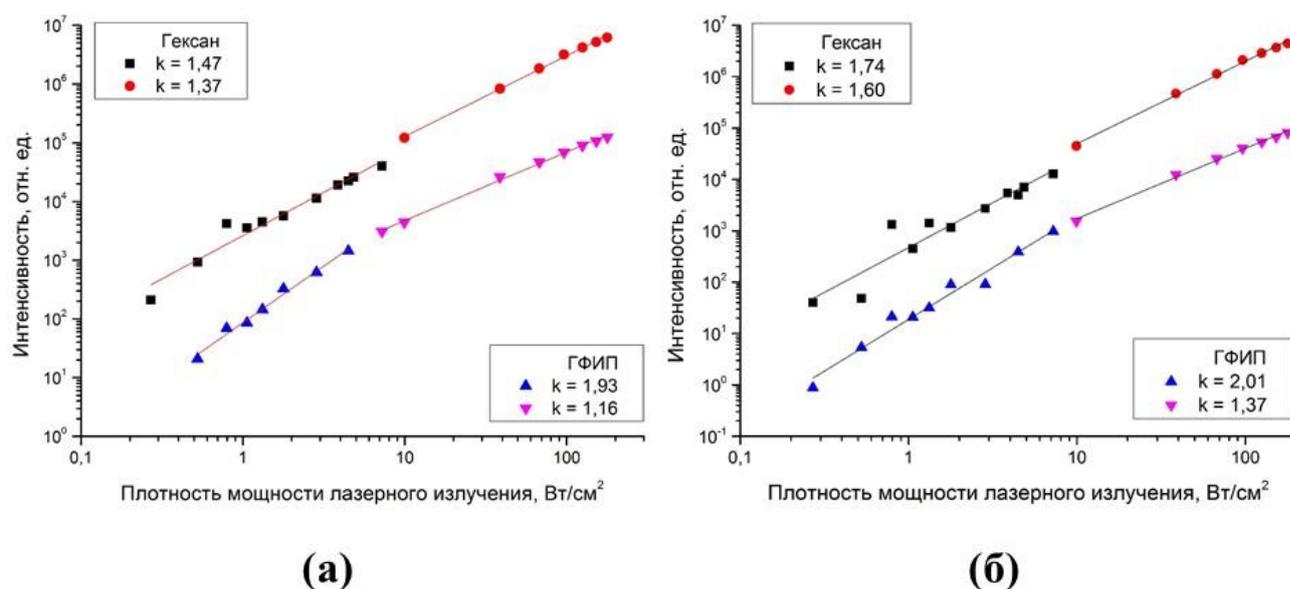


Рисунок 2.8 – Зависимость интенсивности фотолюминесценции НАФ I типа со структурой «ядро/оболочка» на длинах волн 544 нм (а) и 658 нм (б) в гексане и в ГФИП от плотности мощности лазерного излучения.

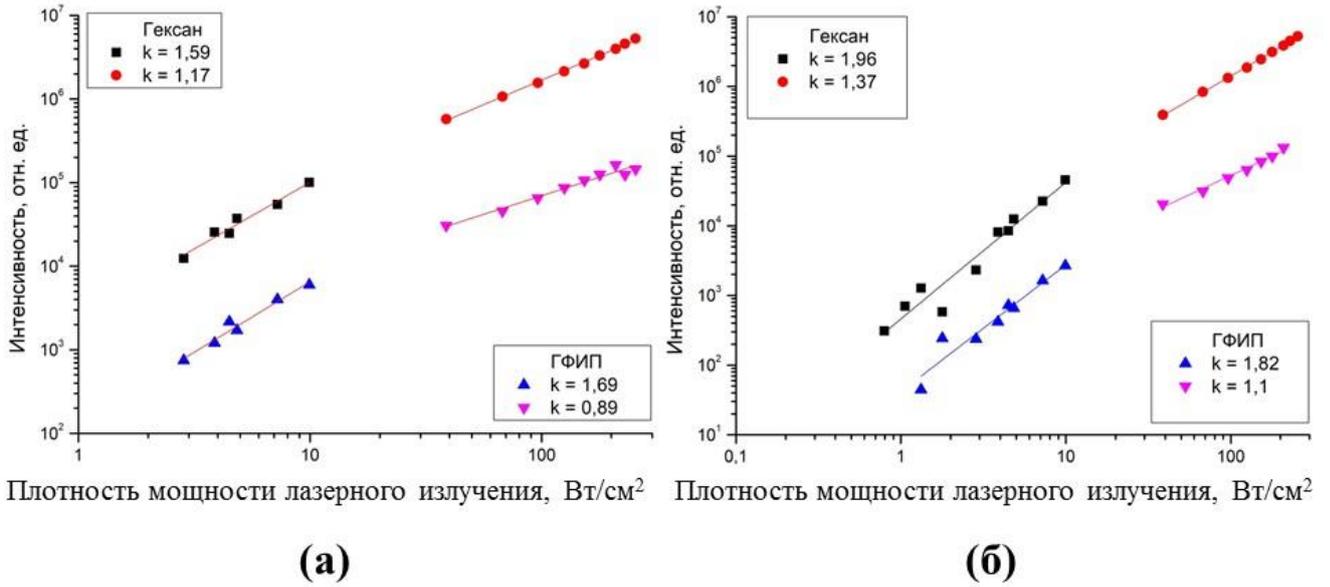


Рисунок 2.9 – Зависимость интенсивности фотолуминесценции на длинах волн 544 нм (а) и 658 нм (б) НАФ II типа со структурой «ядро/оболочка» в гексане и в ГФИП от плотности мощности лазерного излучения.

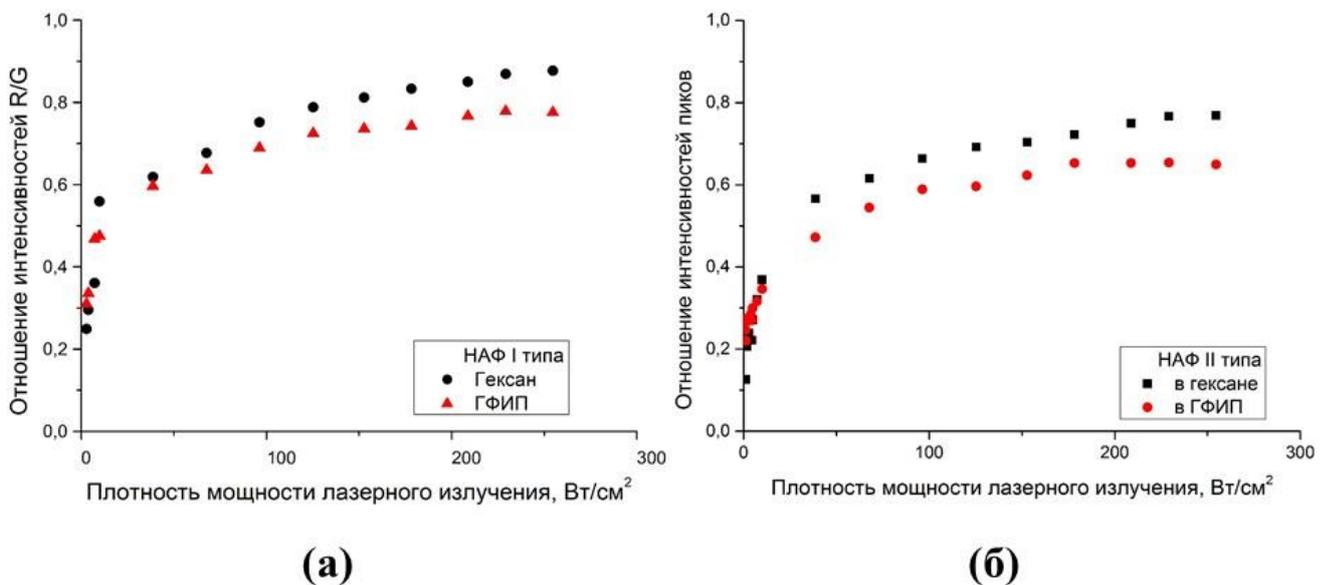


Рисунок 2.10 – Зависимость отношения интенсивности «красного» пика НАФ со структурой «ядро/оболочка» I типа (а) и II типа (б) на длине волны 658 нм к интенсивности «зеленого» на длине волны 544 нм от плотности мощности лазерного излучения.

В Таблице 2.2 приведены результаты измерений времени жизни фотолюминесценции НАФ I и II типов в ГФИП. Видно, что наличие инертной оболочки обеспечивает практически одинаковые значения времени жизни фотолюминесценции на длине волны 409 нм как в неполярном, так и в полярном растворителях. Из-за взаимодействия с молекулами полярного растворителя время жизни уменьшается на длинах волн 525 и 544 нм, что соответствует «зеленому» пику фотолюминесценции. Это происходит за счет колебательного резонансного взаимодействия ионов Er^{3+} с -ОН остатком и приводит не только к тушению фотолюминесценции, но и стимулирует безызлучательный переход ${}^4\text{I}_{13/2} \rightarrow {}^4\text{F}_{9/2}$, вызывающий усиление «красного» пика на 658 нм [76]. И, как следствие, увеличивается время жизни фотолюминесценции на этой длине волны.

Таблица 2.2. Время жизни фотолюминесценции НАФ II типа в ГФИП.

Время жизни фотолюминесценции НАФ II типа в ГФИП, мс		
Длина волны, нм	ядро	ядро/оболочка
409	$0,28 \pm 0,03$	$0,312 \pm 0,014$
525	$0,43 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,01$
544	$0,46 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,05$
658	$0,65 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,016$

Для дальнейших исследований критически важно определить оптимальный размер наночастиц, при котором наблюдается резкий рост коэффициента конверсии излучения при увеличении плотности мощности возбуждающего излучения. Это необходимо для разработки неинвазивных методов прижизненной визуализации организма, так как это позволит использовать наночастицы, которые

легко проникают в живые ткани и при этом имеют высокий коэффициент конверсии излучения, достаточный для проведения визуализации.

Также были изучены фотолюминесцентные свойства НАФ β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ III типа со структурой «ядро/оболочка» с характерным диаметром частиц 21 ± 6 нм и толщиной оболочки 1,2 нм. На Рисунке 2.11 показан характерный спектр, ПЭМ-изображения и гистограммы распределения по размерам наночастиц.

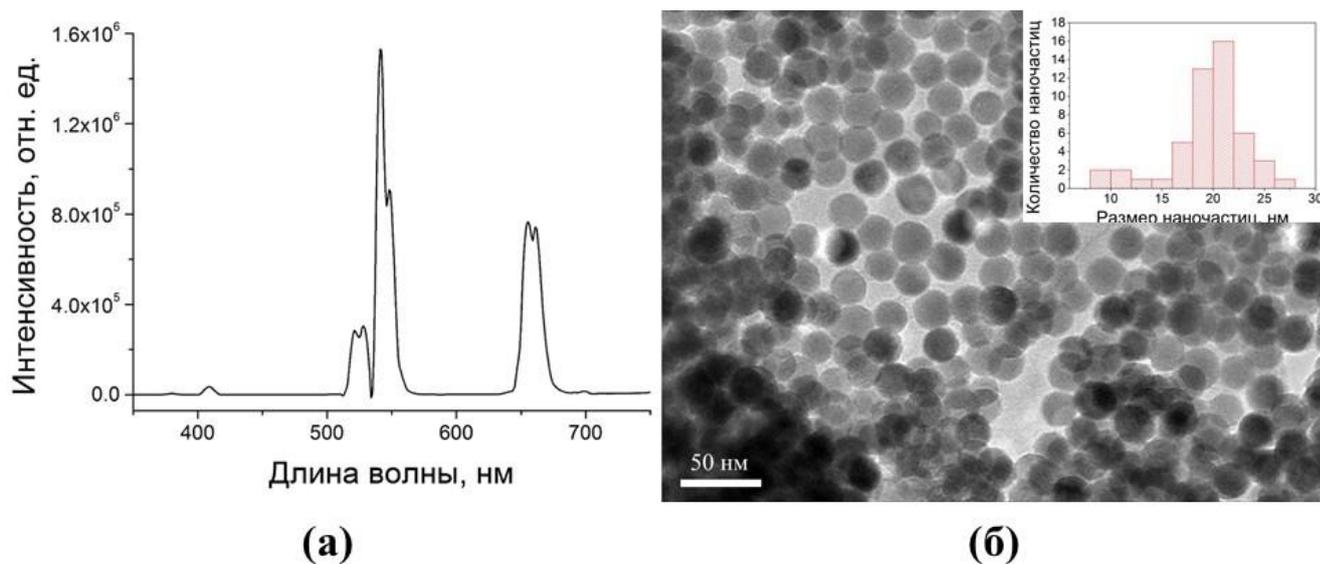


Рисунок 2.11 – Спектр фотолюминесценции НАФ III типа (а); ПЭМ-изображения и гистограммы распределения по размерам этих наночастиц (б).

На Рисунке 2.12 показаны зависимости величины интегрального КК излучения НАФ от интенсивности возбуждающего излучения и отношение интенсивности «красной» полосы фотолюминесценции на длине волны 658 нм к интенсивности «зеленой» на длине волны 544 нм. В режиме насыщения эти НАФ имеют более высокие значения КК излучения, чем НАФ I типа (0,36% и 0,18% соответственно). Размер наночастиц различается всего на 10% (19 и 21 нм с учетом оболочек), однако значения КК излучения увеличиваются в 2 раза.

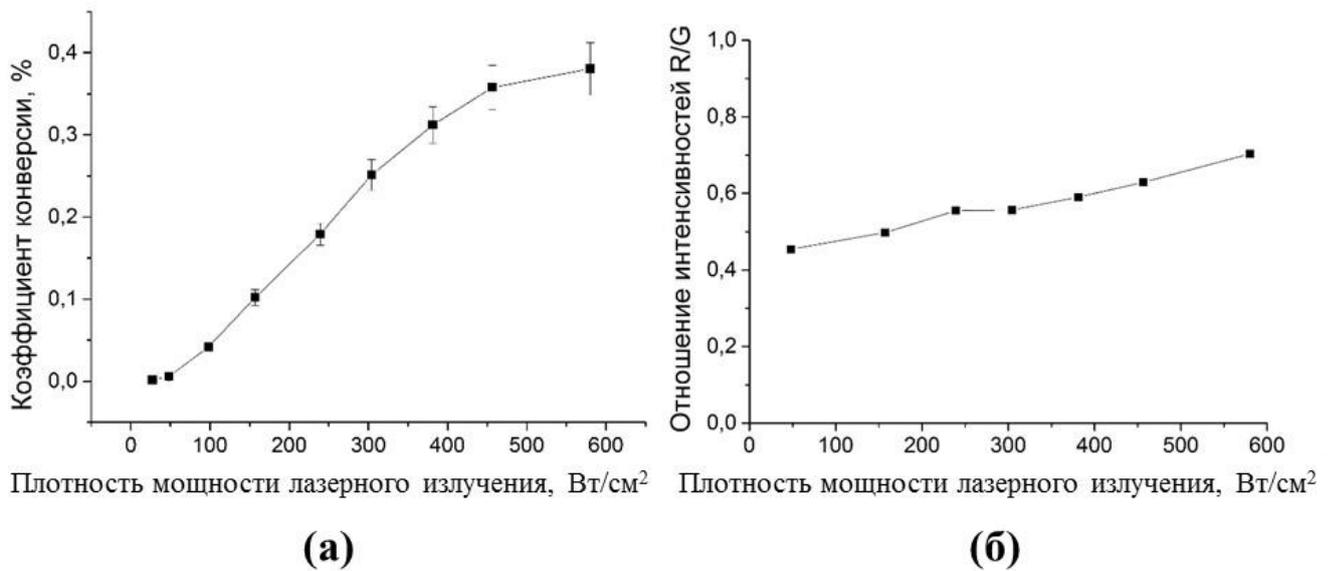


Рисунок 2.12 – Зависимости интегрального коэффициента конверсии наночастиц III типа от интенсивности возбуждающего излучения (а); Отношение интенсивности пика фотолюминесценции этих НАФ на длине волны 658 нм к интенсивности пика на длине волны 544 нм (б).

Вышеописанные преимущества НАФ III типа делают их наиболее подходящими для дальнейших исследований и инкапсуляции в полимерные матрицы.

Выводы к главе 2

1. Путем изменения структуры и размеров можно подобрать апконвертирующие наночастицы под конкретные задачи.
2. Показано, что время жизни, интенсивность и коэффициент конверсии излучения апконвертирующих наночастиц $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ зависят как от структуры и размеров самих наночастиц, так и от наличия или отсутствия у них инертной оболочки, а также их микроокружения и плотности мощности возбуждающего излучения лазера.

Глава 3. Фантомы биологических тканей

Биологическая ткань обладает сложной иерархической структурой, характеризуемой множеством различных параметров. При этом, даже для одного типа ткани эти параметры могут варьироваться в достаточно широких пределах. Так, например, коэффициент оптического пропускания кожи зависит от количества содержащегося в ней меланина [91].

Каждый метод исследования опирается на конкретные свойства биоткани. Поэтому при изготовлении фантомов, имитирующих свойства биологических тканей, часто уделяют внимание только одной или двум характеристикам конкретной живой ткани. Существуют фантомы, имитирующие диэлектрические [92, 93], акустические [94], теплофизические [95] и оптические [96] характеристики. Также известны и гибридные фантомы, позволяющие моделировать сразу несколько характеристик, например, оптоакустические [97, 98].

3.1. Виды оптических фантомов биологических тканей

Оптические фантомы различаются по структуре и составу. Самыми распространенными являются фантомы из тканей животного происхождения [99]. Они имеют наиболее схожие с живой тканью параметры, однако они недолговечны, и не всегда удается изготовить фантом подходящих геометрических параметров (толщина, размер) на их основе.

Синтетические фантомы делятся на твердые, полутвердые и жидкие [100]. Твердые фантомы наиболее стабильны, лучше всего передают геометрические параметры, однако они наиболее сложны в изготовлении. Самыми распространенными материалами для создания твердых фантомов являются различные полиуретаны [101], силикон [102, 103] и воск [104].

Полутвердые гидрогели менее стабильны, чем твердые, однако их гораздо проще изготовить, следовательно, при необходимости проще изменить их состав. Чаще всего для оптических исследований используют фантомы на основе агарозы [105] и желатина [106].

Жидкие фантомы являются самыми простыми в изготовлении и удобными для изменения их состава, но при этом наименее стабильными и долговечными [107].

Для придания фантомам необходимых оптических свойств используют различные модельные среды. Самые распространенные рассеивающие среды – это оксид титана [108], Липозин [109], Интралипид [110] и молоко [111]. Также используются поглощающие среды такие как меланин [112], графит [104] и чернила [113].

3.2. Исследование изменений спектра фотолюминесценции наночастиц при прохождении сквозь фантомы

3.2.1. Материалы и методы

В экспериментах использовались апконвертирующие наночастицы III типа ядро/оболочка β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/(\text{NaYF}_4)$ со средним диаметром 21 ± 6 нм, описанные в Главе 2. В качестве исходного материала для формирования матриксов использовали полилактогликолид (ПЛГ) марки Purasorb ПЛГ 7507 (PURAC Biochem bv, Нидерланды). ПЛГ композицию для антисольвентного формирования матрикса готовили методом растворения полимера в тетрагликоле (Sigma Aldrich, США) в соотношении 10 масс.% [114]. Также в композицию замешивали НАФ в соотношении 1 масс.% от массы полимера в ультразвуковой ванне в течение 30 минут. В силиконовую форму диаметром 5 мм и толщиной 2 мм, закрепленную на дне чашки Петри, помещали готовую композицию, после чего чашку Петри заливали водой и оставляли на 24 часа до полного отверждения.

Фантомы биологической ткани изготавливали на основе агарозы (Serva, США). 150 мг порошка агарозы заливали 4 мл дистиллированной воды, нагревали до 95°C и перемешивали с помощью магнитного якоря до полного растворения. В качестве оптических модельных сред использовали ультрапастеризованное молоко 3,5% (ОАО "Белгородский молочный комбинат", Россия) и меланин («Русские корни», Россия). Для изготовления рассеивающих фантомов на основе молока часть дистиллированной воды (5 и 10%) замещали молоком. Для изготовления

поглощающих фантомов в раствор с агарозой добавляли меланин в концентрации 0,5 и 1 мг/мл. Затем раствор с агарозой выливали в чашку Петри диаметром 6 см. После полного остывания при нормальных условиях, чашки Петри с полученными фантомами толщиной 1 мм хранили в холодильнике при температуре 4°C. Для получения фантома толщиной 2 мм количество всех материалов увеличивали в два раза.

Спектры фотолюминесценции образцов при возбуждении непрерывным излучением полупроводникового лазера с длиной волны 976 нм регистрировали с использованием спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция). Измерения коэффициента пропускания фантомов проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США). Для регистрации спектра фотолюминесценции сквозь фантом его помещали непосредственно поверх образца (Рисунок 3.1). Для оценки изменения спектра НАФ при взаимодействии с фантомом 40 мкл коллоидного раствора наночастиц в гексане (концентрация 17,5 мг/мл) было нанесено на бумагу (1x1 см, Фах Стандарт 210 мм, Россия).

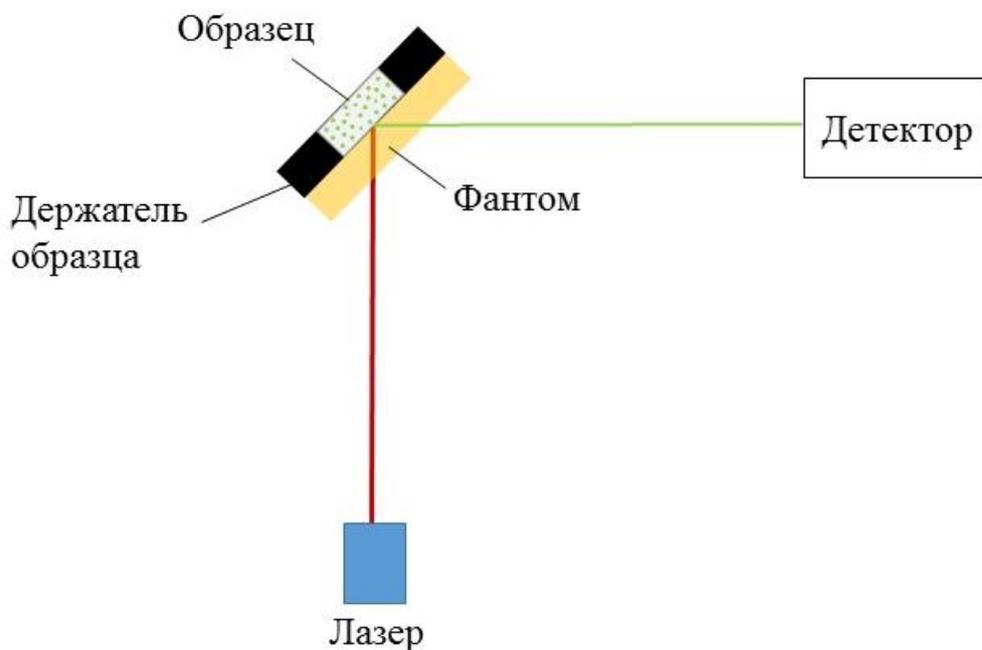


Рисунок 3.1 – Схема эксперимента для регистрации спектра фотолюминесценции сквозь фантом.

Измерение оптических характеристик фантома проводили на установке на основе двух интегрирующих сфер (диаметр 75 мм) [115] (Рисунок 3.2), покрытых изнутри стандартным диффузно рассеивающим материалом. Образец фантома располагали между сферами. В сферу 1 заводили излучение белого света от галогенового источника HL-2000 (Ocean Optics, США). Спектры излучений в сферах регистрировали с помощью спектрометра USB4000 (Ocean Optics, США) с диапазоном длин волн 200 – 1100 нм.

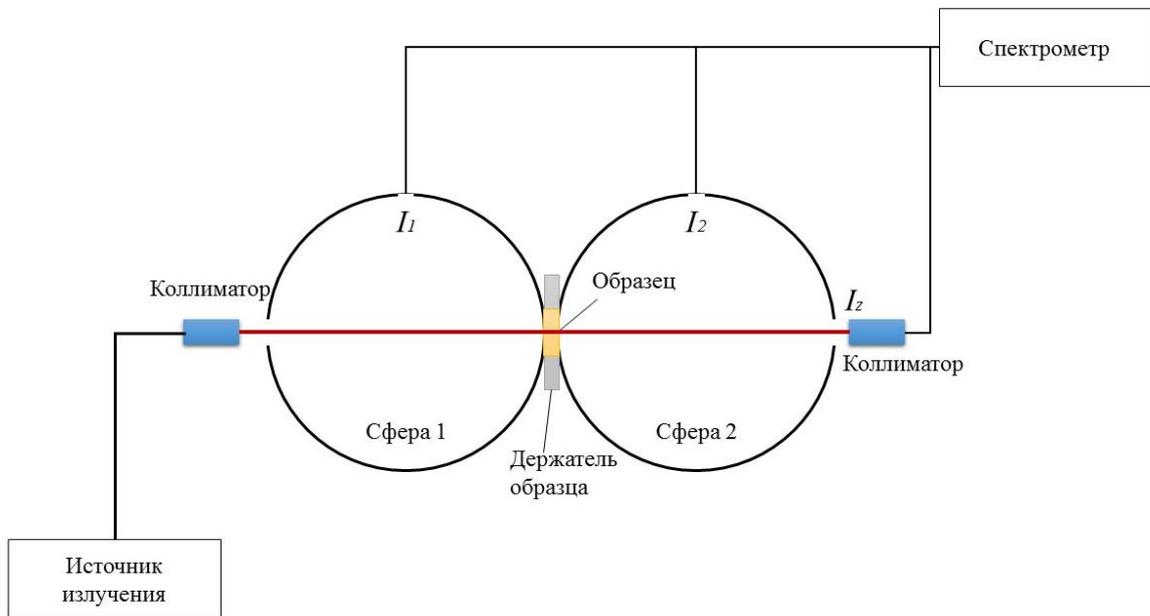


Рисунок 3.2 – Схема установки для определения оптических характеристик фантомов.

Для расчёта коэффициентов диффузного рассеяния R_d , диффузного пропускания T_d и коллимированного пропускания T_c использованы следующие соотношения [115]:

$$R_d = \frac{I_1}{I_{01}}; T_d = \frac{I_2}{I_{01}}; T_c = \frac{I_z}{I_{0z}}; \quad (3.1)$$

где I_{01} – интенсивность излучения в сфере 1 при условии, что вместо образца стоит заглушка, покрытая стандартным диффузно рассеивающим материалом, I_1 – интенсивность излучения в сфере 1 в присутствии образца, I_2 – интенсивность в сфере 2 в присутствии образца, I_{0z} – интенсивность излучения на выходе из сферы

2 в отсутствии образца, I_z – интенсивность излучения на выходе из сферы 2 с образцом.

Количественная оценка интенсивности фотолюминесценции наночастиц, импрегнированных в матрикс, проводилась при помощи программы ImageJ [87].

Для визуализации НАФ использовали имиджинговую систему (Рисунок 3.3), описанную в [116], оснащенную сканаторной головкой Raylase (Германия), с помощью которой происходит отклонение лазерного луча инфракрасного света по осям x и y . Регистрация сигнала происходит с помощью EMCCD камеры (Raptor Photonics Incorporated, USA) с высокой чувствительностью в диапазоне 400–850 нм и лазерным гальванометрическим сканером, управляемым с ПК (Техноцентр Атеко, Россия) для точного наведения лазерного луча на образец. В качестве источника света на длине волны 976 нм использован полупроводниковый лазер LDD-10 (АО "Полупроводниковые приборы", Россия) с волоконным выходом. Интенсивность лазерного излучения составляла 200 мВт/см². Фокусировку камеры осуществляли с помощью оптического объектива $F=0,95$, а для отсекающего возбуждающего излучения (976 нм) применяли систему интерференционных фильтров (Semrock, США).

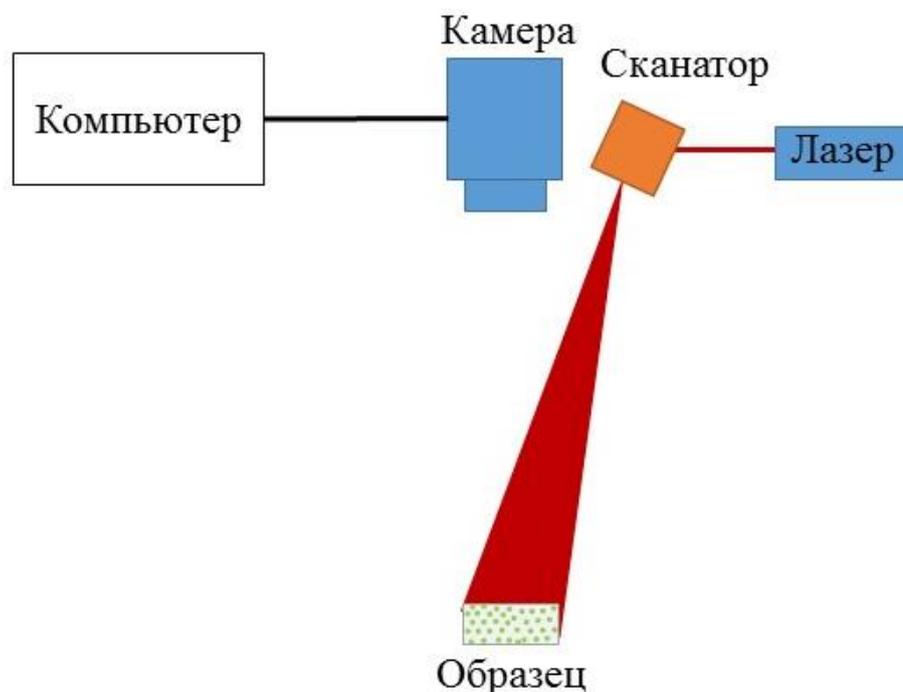


Рисунок 3.3 – Схема установки для фотолюминесцентной визуализации в видимом диапазоне.

3.2.2. Результаты и обсуждения

Отношение интенсивностей «красного» пика 658 нм к интенсивности «зеленого» на длине волны 544 нм НАФ представлены на Рисунке 3.4б. Соотношение интенсивностей R/G исходных наночастиц растет при увеличении плотности мощности возбуждающего излучения и не превышает 0,6 при плотности мощности 300 Вт/см², что указывает на высокую интенсивность «зеленого» пика при условии, что наночастицы ни с чем не взаимодействуют [117].

Спектр НАФ, внедренных в ПЛГ матрикс, отличается, так как наночастицы окружают молекулы полимера (Рисунок 3.4). Отношение интенсивностей здесь не превышает 1,4 при плотности мощности возбуждающего излучения 300 Вт/см² (Рисунок 3.4б). Далее все спектры фотолюминесценции и отношения интенсивностей, полученные при использовании фантомов, будут сравниваться с данными о НАФ, внедренных в ПЛГ матрикс.

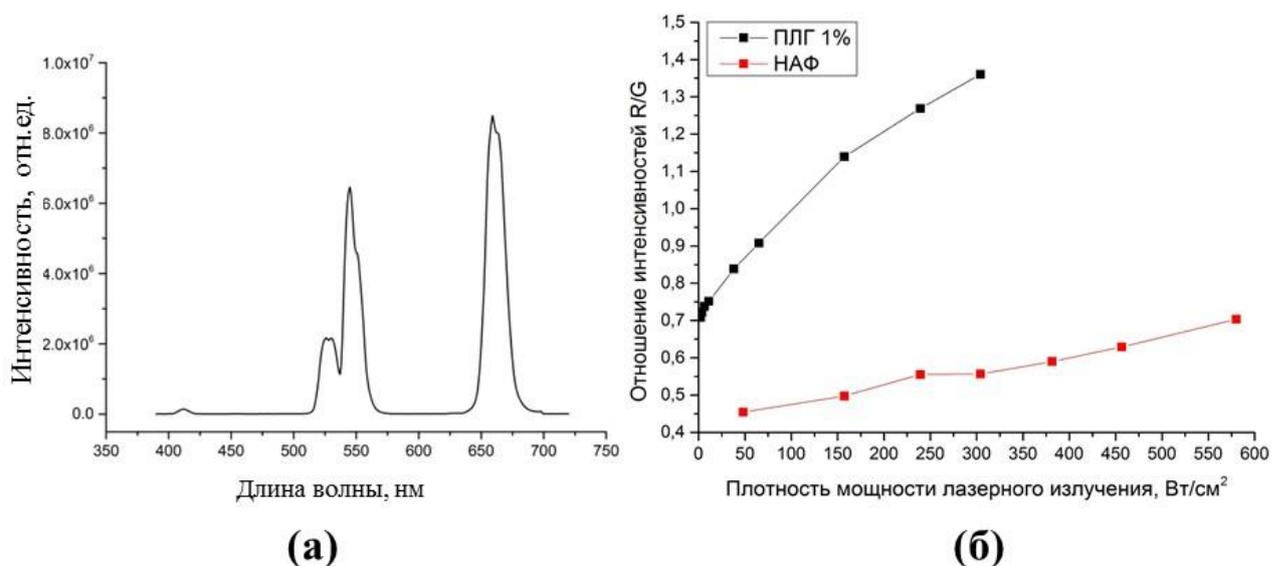


Рисунок 3.4 – Спектр фотолюминесценции НАФ $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$, внедренных в ПЛГ матрицы (а); Зависимость отношения интенсивности «красного» пика 658 нм к интенсивности «зеленого» на длине волны 544 нм НАФ ядро/оболочка от плотности мощности лазерного излучения (б).

На рисунке 3.5 показаны коэффициенты пропускания T фантомов в зависимости от длины волны. Коэффициент пропускания T уменьшается как при увеличении концентрации модельного вещества, так и при увеличении толщины фантома. В видимом диапазоне это не так выражено для фантомов на основе молока, в отличие от фантомов на основе меланина. По данным для коэффициента пропускания можно предположить, что самая низкая интенсивность фотолюминесценции будет регистрироваться с использованием фантома с добавлением 10% молока толщиной 2 мм.

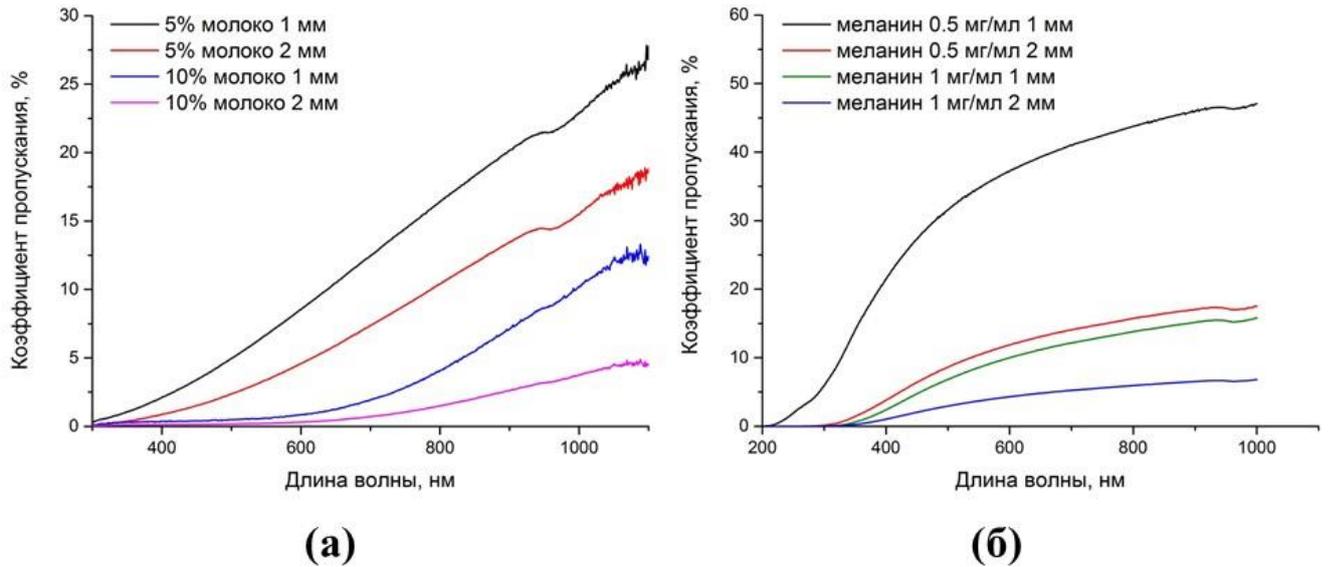


Рисунок 3.5 – Коэффициент пропускания фантомов на основе агарозы с различным содержанием молока (а) и меланина (б).

С помощью установки с двумя интегрирующими сферами получены зависимости коэффициентов диффузного рассеяния R_d для всех фантомов (Рисунок 3.6). Из графика видно, что на длине волны 544 нм этот коэффициент имеет большее значение, чем на длине волны 658 нм и 976 нм, и только монотонно растет с увеличением концентрации модельного вещества.

На основе полученных экспериментальных данных (коэффициентов диффузного рассеяния R_d , диффузного пропускания T_d и коллимированного пропускания T_c) рассчитаны оптические характеристики фантомов методом Монте-Карло, описанным в [115], для трех длин волн 544, 658 и 976 нм. Рассчитаны фактор анизотропии g , коэффициенты поглощения μ_a и рассеяния μ_s для всех фантомов. Из таблицы 3.1 видно, что фактор g растет с увеличением как длины волны, так и количества рассеивающего вещества. Коэффициент рассеивания растет с увеличением количества молока на всех длинах волн.

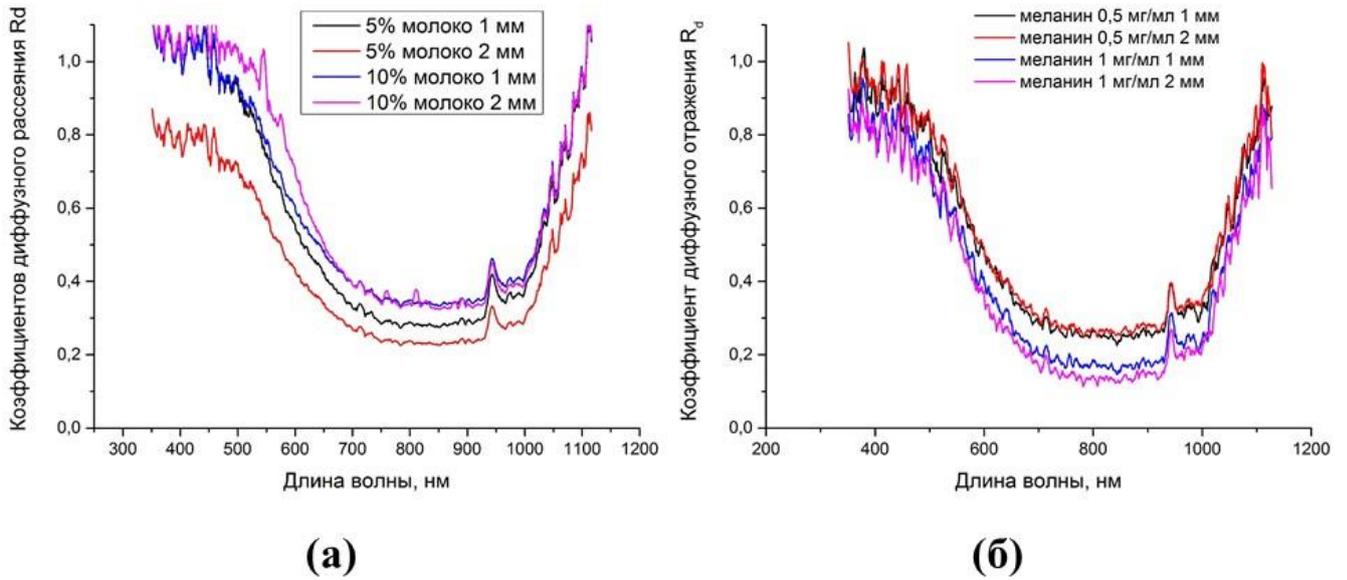


Рисунок 3.6 – Зависимости коэффициентов диффузного рассеяния R_d от длины волны для фантомов на основе агарозы с различным содержанием молока (а) и меланина (б).

Таблица 3.1. Расчетные и экспериментальные оптические характеристики фантомов на основе агарозы с добавлением молока. (Погрешность для фактора g , а также коэффициентов μ_s и μ_a составляет ± 0.05 , 3 см^{-1} и 0.05 см^{-1} , соответственно).

Тип фантома	Длина волны, нм	R_d	T_d	$\mu_s, \text{см}^{-1}$	$\mu_a, \text{см}^{-1}$	g
Молоко 5%, 1 мм	544	0.65	0.31	42	0.20	0.15
	658	0.40	0.51	36	0.45	0.60
	976	0.33	0.59	30	0.50	0.65
Молоко 5%, 2 мм	544	0.58	0.34	74	0.35	0.60
	658	0.31	0.61	86	0.45	0.90
	976	0.28	0.59	82	0.75	0.90
Молоко 10%, 1 мм	544	0.49	0.47	59	0.15	0.70
	658	0.45	0.51	57	0.25	0.70
	976	0.39	0.53	43	0.60	0.70
Молоко 10%, 2 мм	544	0.50	0.41	106	0.20	0.80
	658	0.46	0.51	116	0.25	0.85
	976	0.38	0.48	110	0.50	0.90

Таблица 3.2. Расчетные и экспериментальные оптические характеристики фантомов на основе агарозы с добавлением молока. (Статистическая обработка фактора g , а также коэффициентов μ_s и μ_a приведена с погрешностью $\pm 0.1, 2 \text{ см}^{-1}$ и 0.5 см^{-1} , соответственно).

Тип фантома	Длина волны, нм	Rd	Td	$\mu_s, \text{ см}^{-1}$	$\mu_a, \text{ см}^{-1}$	g
Меланин 0,5 мг/мл, 1 мм	544	0.65	0.25	17	1.5	0.1
	658	0.34	0.45	15	1.5	0.1
	976	0.33	0.50	13	1.5	0.1
Меланин 0,5 мг/мл, 2 мм	544	0.67	0.18	44	4	0.3
	658	0.31	0.20	40	4	0.5
	976	0.34	0.23	34	3	0.3
Меланин 1 мг/мл, 1 мм	544	0.59	0.14	27	7	0.1
	658	0.26	0.15	25	6	0.1
	976	0.25	0.20	20	5	0.1
Меланин 1 мг/мл, 2 мм	544	0.56	0.06	55	9	0.5
	658	0.24	0.08	53	8	0.5
	976	0.22	0.09	46	8	0.5

На основе модели, предложенной в [111], рассчитаны коэффициенты полной экстинкции для всех фантомов:

$$-\ln(T_c)/d = \mu_{\Sigma} = (\mu_a + \mu_s); \quad (3.2)$$

где d – толщина фантома, μ_a – коэффициент поглощения, μ_s – коэффициент рассеяния. На рисунке 3.7 видно, что коэффициент полной экстинкции для фантомов с добавлением молока выше, чем для фантомов с добавлением меланина.

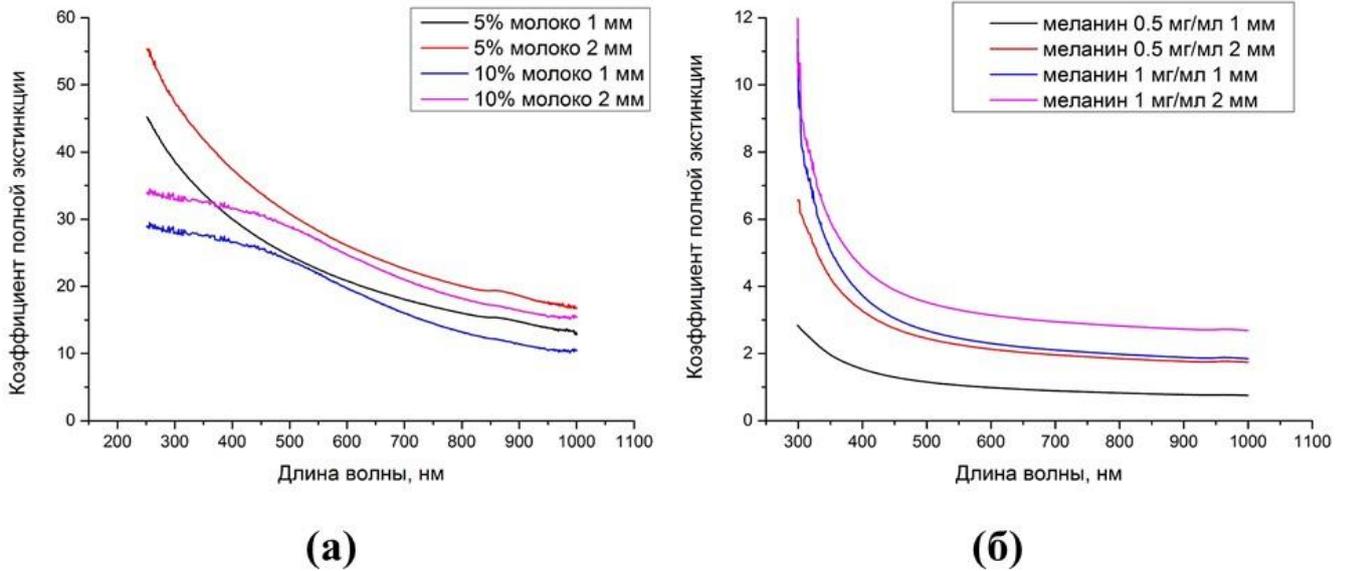


Рисунок 3.7 – Зависимость полного коэффициента экстинкции μ_e [см^{-1}] от длины волны для фантомов с добавлением молока (а) и меланина (б).

Изменение спектров фотолюминесценции НАФ, внедренных в матрикс, может происходить как за счет поглощения, так и за счет рассеяния излучения фантомом. Так как возбуждающее излучение проходило сквозь фантом, то при одной и той же входной мощности излучения плотность мощности возбуждающего излучения менялась и была рассчитана с учетом коэффициента пропускания фантома.

Визуализация матриксов через фантомы в видимом диапазоне осуществлялась на установке имиджинговой системы. Как видно из Рисунков 3.8-3.11, с увеличением толщины фантома интегральная интенсивность на длинах волн 409, 544 и 658 нм снижается. Это подтверждается как анализом полученных изображений, так и рассчитанными оптическими характеристиками из таблицы 1. При количественном подсчете интенсивности можно увидеть, что самая низкая интенсивность фотолюминесценции (в относительных единицах) наблюдается при прохождении сквозь фантом с 10% молока толщиной 2 мм, что хорошо согласуется с Рисунком 3.5. Более того, за счет рассеяния излучения границы образца при визуализации сквозь фантомы становятся менее четкими.

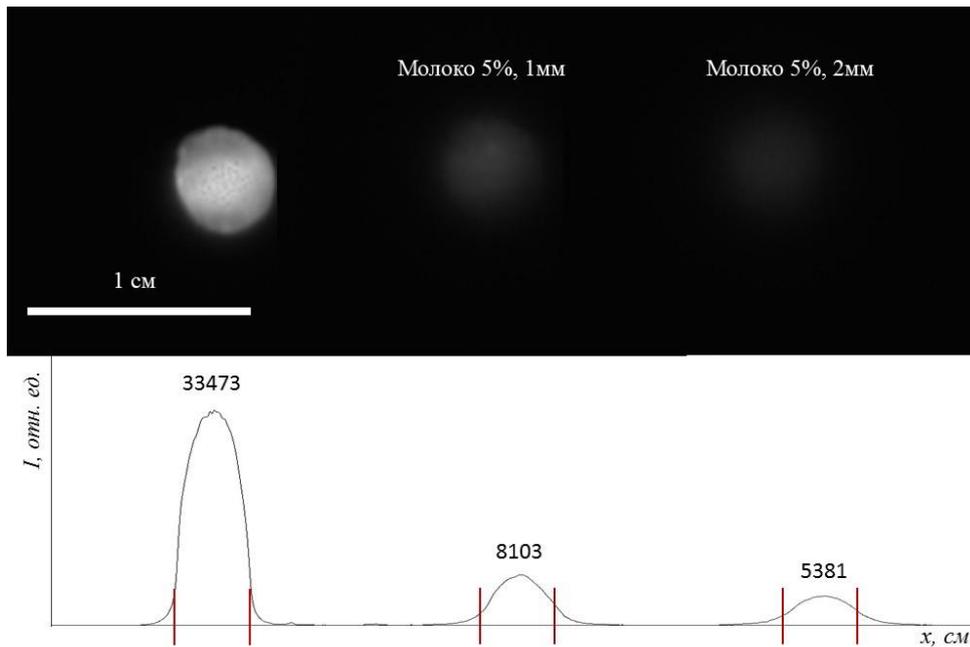


Рисунок 3.8 – Фотография исходного матрикса и сквозь фантомы с добавлением 5% молока и соответствующий анализ интенсивности. Красными линиями обозначены границы образца.

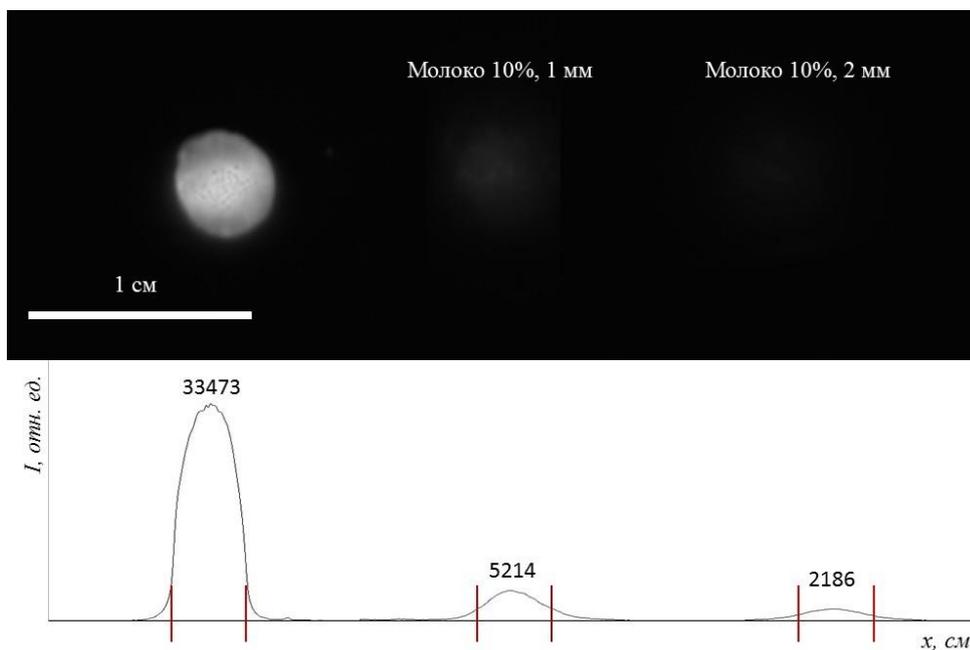


Рисунок 3.9 – Фотография исходного матрикса и сквозь фантомы с добавлением 10% молока и соответствующий анализ интенсивности. Красными линиями обозначены границы образца.

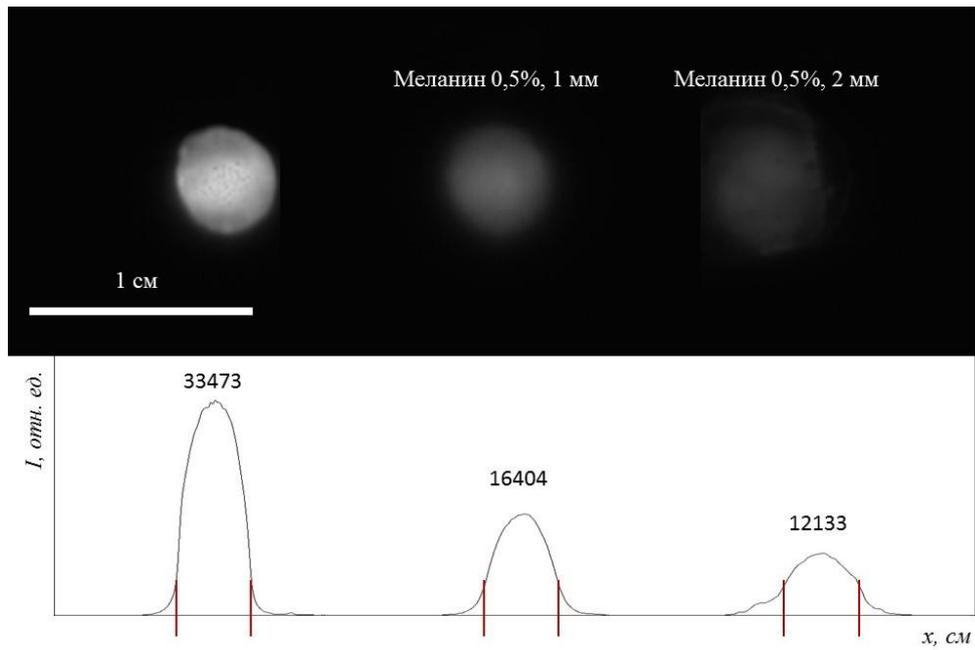


Рисунок 3.10 – Фотография исходного матрикса и сквозь фантомы с добавлением 0,5% меланина и соответствующий анализ интенсивности. Красными линиями обозначены границы образца.

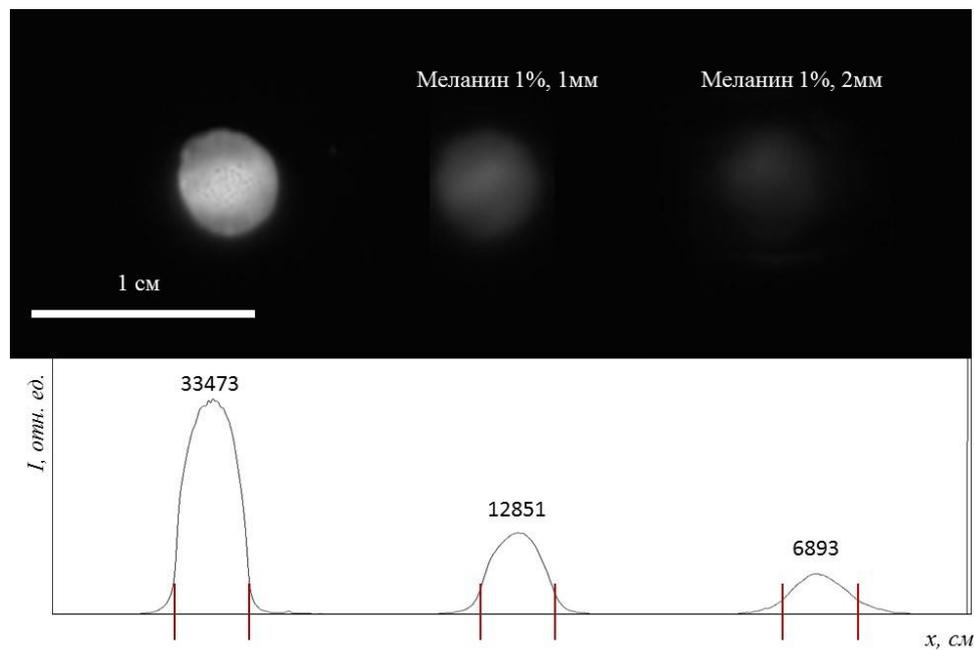


Рисунок 3.11 – Фотография исходного матрикса и сквозь фантомы с добавлением 1% меланина и соответствующий анализ интенсивности. Красными линиями обозначены границы образца.

Для фантомов с добавлением молока значение интегральной интенсивности фотолюминесценции гораздо ниже (на 60-70%), чем для фантомов с добавлением меланина.

При этом изменяется не только интегральная интенсивность, но и отношение интенсивности «красного» пика 658 нм к интенсивности «зеленого» на длине волны 544 нм (R/G) (Рисунок 3.12а). Для НАФ, внедренных в ПЛГ матрикс, при увеличении содержания модельного рассеивающего вещества интенсивность красного пика растет. Для фантомов толщиной 1 мм разница в концентрации молока не так заметна, как для фантомов толщиной 2 мм. При увеличении концентрации с 5 до 10% отношение R/G растет с 1,17 до 1,3. Это можно объяснить законом рассеяния Релея – чем больше длина волны, тем меньше интенсивность рассеиваемого свет [118].

Также рассчитаны отношения для наночастиц, внедренных в матрикс, в зависимости от находящегося между ним и детектором фантома с меланином (Рисунок 3.12б). При увеличении толщины фантома интенсивность «красного» пика 658 нм растет, как и при увеличении концентрации меланина в целом. Это можно объяснить несколькими причинами. При увеличении толщины фантома коэффициент пропускания на длине волны 658 нм уменьшается в 3 раза, а на длине волны 544 нм – в 3,4 раз. При увеличении концентрации меланина видна схожая картина.

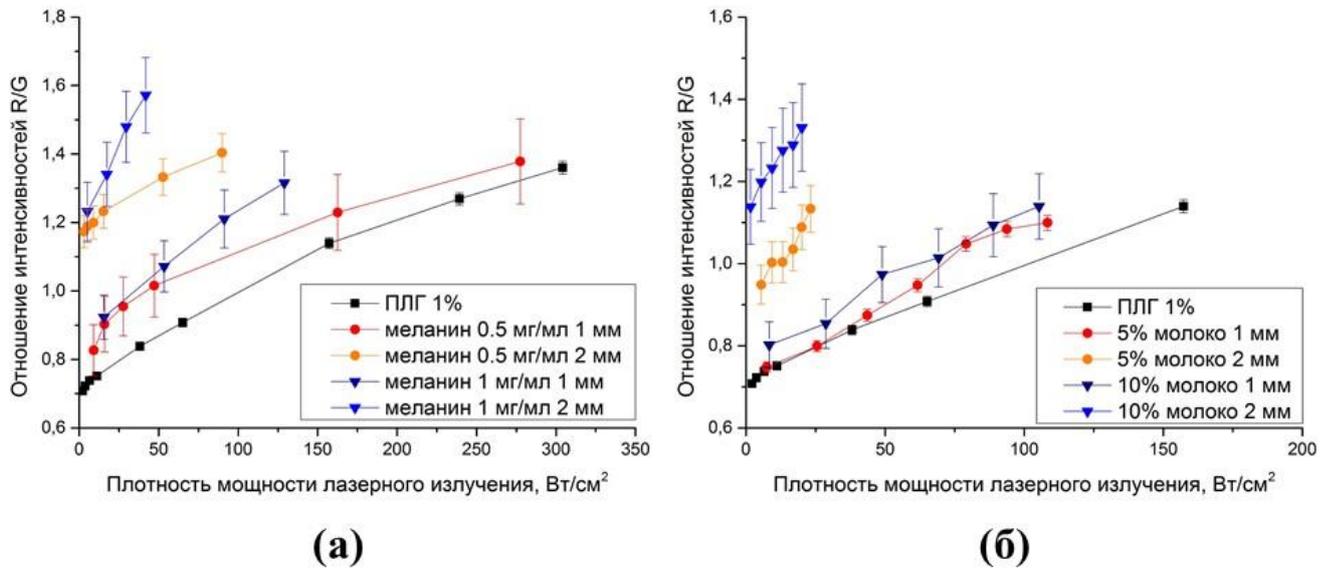


Рисунок 3.12 – Зависимость отношения интенсивности «красного» пика 658 нм к интенсивности «зеленого» на длине волны 544 нм НАФ, внедренных в ПЛГ матрикс, от плотности мощности лазерного излучения сквозь фантомы на основе агарозы с добавлением молока (а) и меланина (б).

Из-за взаимодействия НАФ с водой спектр наночастиц изменяется: увеличивается интенсивность «красного» пика из-за безызлучательных переходов [88]. Поэтому при взаимодействии с фантомом ожидаемо у частиц тоже будет расти интенсивность «красного» пика – у исходных наночастиц при плотности мощности лазерного излучения в 150 Вт/см² этот коэффициент равен 0,5, а у НАФ, нанесенных на бумагу и взаимодействовавших с фантомом – более 0,8 (Рисунок 3.13). Таким образом, при расчете отношения интенсивностей необходимо учитывать не только оптические свойства фантома, но и влияние окружения самих наночастиц.

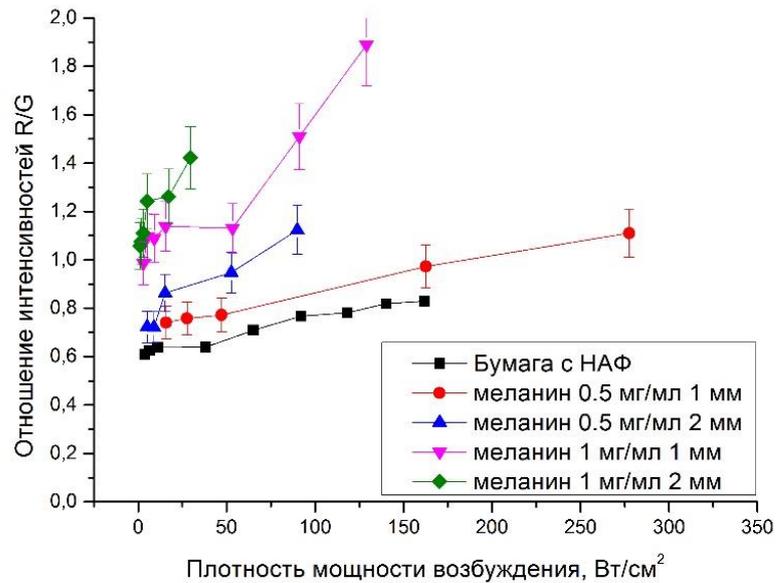


Рисунок 3.13 – Зависимость отношения интенсивности «красного» пика 658 нм к интенсивности «зеленого» на длине волны 544 нм НАФ, нанесенных на бумагу, от плотности мощности лазерного излучения сквозь фантомы на основе агарозы с меланином.

Оптические свойства биотканей очень сильно варьируются в зависимости от их типа и состава. Даже в пределах одного типа тканей (например, кожи) в литературе можно встретить различные значения коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s на одной и той же длине волны. Так, в [119] для кожи разных пациентов μ_a на длине волны 500 нм варьируется в диапазоне от 3.8 до 15.3. Таким образом, подобрав оптимальную концентрацию рассеивающих и поглощающих компонентов модельных сред, можно имитировать оптические свойства конкретной биоткани.

Выводы к главе 3

1. В результате проведенных экспериментов исследованы оптические характеристики двух типов фантомов биологических тканей, изготовленных на основе рассеивающих и поглощающих модельных сред, в зависимости от толщины фантома и концентрации составляющих его веществ.

2. Проанализированы изменения спектров фотolumинесценции НАФ со структурой ядро/оболочка $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ при ее прохождении сквозь фантом. Рассчитаны отношения интенсивности «красного» пика 658 нм фотolumинесценции НАФ к интенсивности «зеленого» пика на длине волны 544 нм в зависимости от типа фантома, его толщины и концентрации модельных веществ.

3. Показано, что при одной и той же плотности мощности поглощающего излучения отношения интенсивности «красного» пика фотolumинесценции на длине волны 658 нм к интенсивности «зеленого» пика на длине волны 544 нм как исходных НАФ, так и НАФ, содержащихся в полилактогликолидных матриксах (размещенных в этих фантомах) увеличиваются при увеличении как толщины фантома с добавлением меланина, так и концентрации этого вещества.

Глава 4. Мультимодальные апконвертирующие нанофосфоры для биоимиджинга

4.1. Окна прозрачности биоткани

Неинвазивные оптические технологии, работающие в ИК области спектра, обычно используют для биоимиджинга три окна прозрачности биотканей (ОПБ): I-ОПБ (650–950 нм), II-ОПБ (1000–1350 нм), III-ОПБ (1500–1870 нм) [5]. Биологическая ткань имеет большую глубину проникновения и локальный минимум коэффициента потерь в этих диапазонах длин волн по сравнению с видимым диапазоном спектра [120]. Технологии, использующие I-ОПБ и III-ОПБ, вызывают значительный интерес благодаря высокому отношению сигнал/шум, высокому пространственному и временному разрешению и низкой автолюминесценции [121]. Биологические ткани имеют различный состав, но почти все они содержат в себе воду [122, 123]. Вода имеет высокий коэффициент поглощения в III-ОПБ, что может затруднить визуализацию на этих длинах волн [124]. Поэтому для реализации биоимиджинга сразу в нескольких ОПБ, в зависимости от оптических свойств исследуемого биологического объекта, важно разработать универсальные мультимодальные наномаркеры, которые имеют несколько пиков фотолюминесценции в разных диапазонах спектра, позволяя за счет этого проводить визуализацию при помощи нескольких различных методик одновременно [125]. Мультимодальные апконвертирующие нанофосфоры, легированные ионами лантанидов (Ln^{3+}), продемонстрировали требуемые спектральные характеристики [6].

В зависимости от конкретной задачи фотолюминесцентные характеристики НАФ можно варьировать, получая фотолюминесценцию в одном или нескольких окнах прозрачности биоткани. Наночастицы NaYbF_4 , легированные Er^{3+} и Ce^{3+} , могут быть использованы для быстрой *in vivo* визуализации головного мозга в ИК-диапазоне выше 1500 нм [126]. Нанокристаллы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ были успешно использованы для биоимиджинга на длине волны 800 нм, то есть в I-ОПБ [76]. Наночастицы NaGdF_4 , легированные $\text{Ho}^{3+}/\text{Nd}^{3+}$ или $\text{Er}^{3+}/\text{Nd}^{3+}$ с пиками

фотолюминесценции в ИК диапазоне использованы для локального измерения температуры через II-ОПБ и III-ОПБ [77].

4.2. НАФ $\alpha\text{-NaYbF}_4\text{:Er}_{0.02}\text{Ce}_{0.02}\text{Zn}_{0.1}$ для биоимиджинга в видимом и инфракрасном диапазонах

4.2.1. Материалы и методы

Методом термолиза наночастицы, имеющие в основе кристаллическую решетку $\alpha\text{-NaYbF}_4$, легированную ионами Er, Ce и Zn в концентрациях 2, 2 и 1 мол.%, соответственно, синтезированы сотрудниками ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН [127, 128]. Для возбуждения НАФ использовали полупроводниковый АТС-лазер с пиком излучения на длине волны 976 нм (Semiconductor Devices, Россия). Исследование спектра фотолюминесценции наночастиц проводили на спектрофлуориметре Fluorolog 3 (HJY, Франция). Время жизни фотолюминесценции измеряли методом, описанным в Главе 2.

ПЭМ-анализ был выполнен на электронном микроскопе Tecnai Osiris (FEI, Hillsboro, OR, USA), работающем на 200 кВ и оснащенный высокочувствительным EDX-спектрометром Super-X SDD.

Экспериментальные образцы готовили следующим образом: две полоски (1x10 мм) белой бумаги покрывали НАФ. Полоски бумаги помещали на кварцевую кювету с зазором между ними 0,7 мм.

В качестве сильно рассеивающей среды было выбрано коровье молоко 3,5% жирности, а в качестве среды с высоким коэффициентом поглощения на длине волны 1530 нм – дистиллированная вода. Для эксперимента с дистиллированной водой использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1–11 мм.

Для визуализации в видимом диапазоне использовали специально разработанную систему визуализации, описанную в Главе 3. Для визуализации в ИК-диапазоне использовали метод фотолюминесцентной визуализации с временным стробированием (Рисунок 4.1) с помощью InGaAs-камеры (Hamamatsu, Япония), обладающей высокой чувствительностью в диапазоне 1000-1700 нм. Между камерой InGaAs и образцом устанавливали кремниевую пластину и затвор-

чопер. Кремниевая пластина использовалась в качестве светофильтра из-за своей прозрачности только в необходимой области спектра (1,2 – 15 мкм), чтобы предотвратить попадание возбуждающего излучения в камеру во время настройки. Скорость вращения затвора-чопера регулировалась оптическим модулятором MC2000B (Thorlabs, США). Источник питания лазера подключался к двухканальному цифровому запоминающему осциллографу TDS 2022C (Tektronix Inc., США). Широкий лазерный пучок ($d = 13$ мм) проходил через коллиматор (F220SMS-980, Thorlabs, США) и освещал образец. Этот метод позволяет сигналу лазерного возбуждения и автолюминесценции с коротким временем жизни затухнуть до того, как будет получен сигнал от образца с большим временем жизни фотолюминесценции [129], тем самым увеличивая пространственное разрешение.

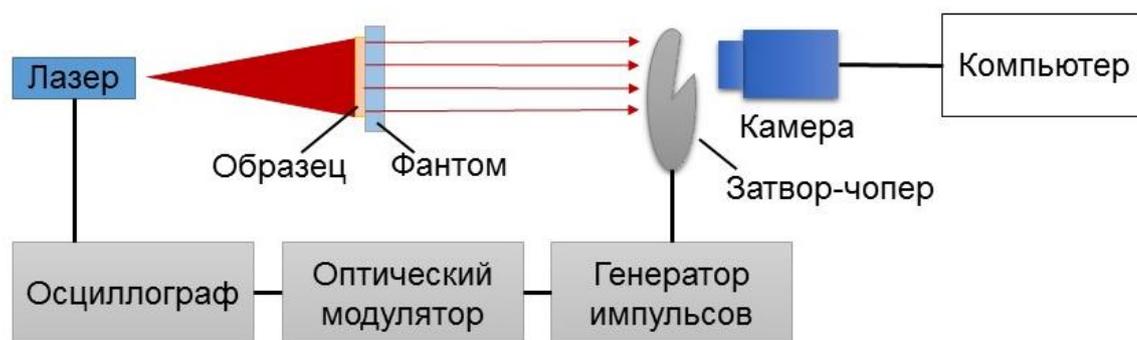


Рисунок 4.1 – Схема установки для фотолюминесцентной визуализации с временным стробированием.

4.2.2. Результаты и обсуждения

По данным ПЭМ полученные наночастицы представляли собой монодисперсные частицы неправильной формы со средним размером 36 нм (Рисунок 4.2).

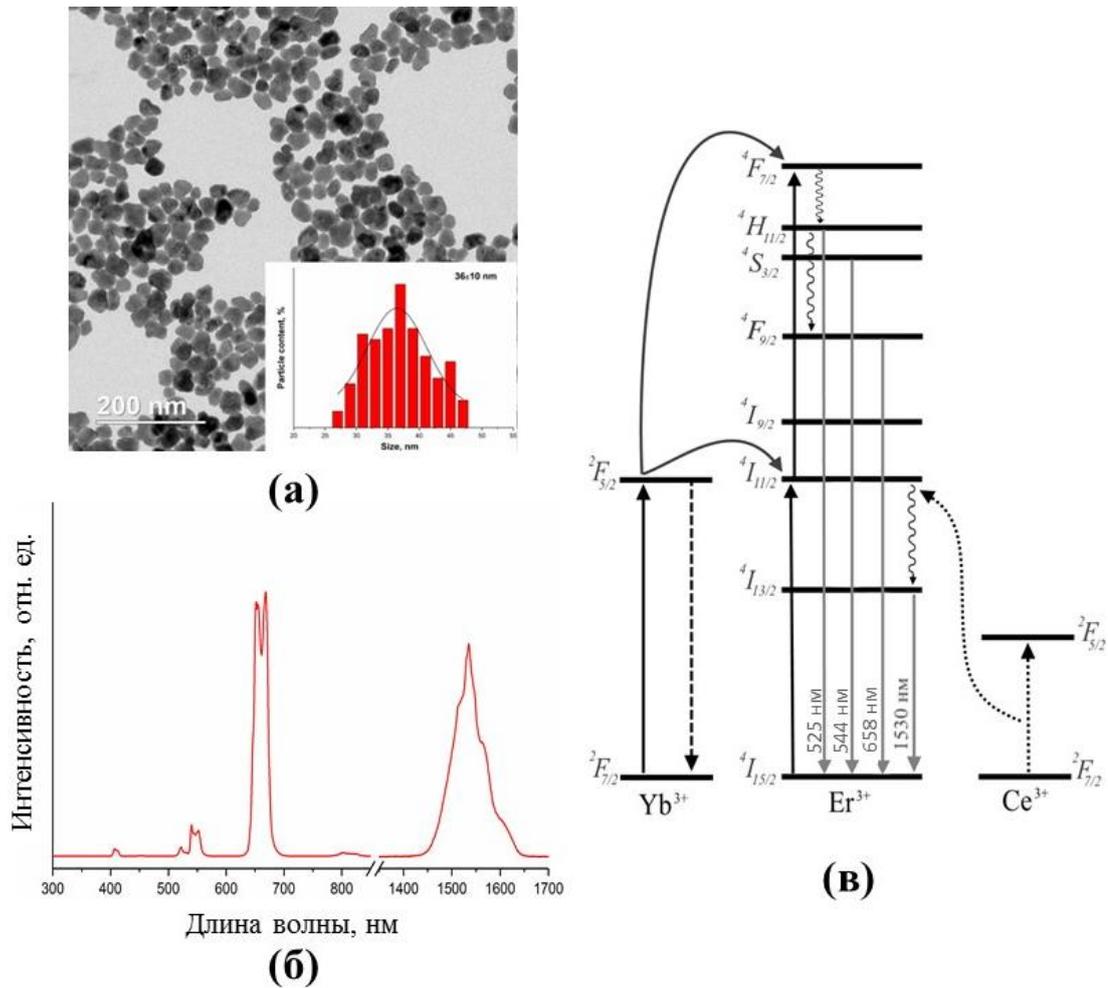


Рисунок 4.2 – ПЭМ-изображения и гистограммы распределения по размерам наночастиц α - $NaYbF_4:Er_{0.02}Ce_{0.02}Zn_{0.1}$ (а); их характерный спектр (б) и диаграмма энергетических уровней (в).

Фотолюминесцентные свойства наночастиц обусловлены последовательным поглощением фотонов ионами иттербия и последующей резонансной безызлучательной передачей энергии ионам эрбия внутри кристаллической матрицы. Спектр фотолюминесценции наночастиц представлен на Рисунке 4.2б. В спектре наблюдаются пики люминесценции в видимой и ИК областях спектра, соответствующие характерным электронным переходам в ионе Er^{3+} . Ионы Yb^{3+} заселяют возбужденный уровень $^2F_{5/2}$ при поглощении ИК-излучения на длине волны 976 нм. Затем этот ион безызлучательно передает эту энергию близко расположенному соседнему Er^{3+} . Ион Er^{3+} заселяет метастабильное возбужденное состояние $^4I_{11/2}$, где он может участвовать в синхронном обмене энергией с

соседним возбужденным ионом Yb^{3+} , так что у Er^{3+} заселяются более высокие энергетические уровни ${}^4\text{F}_{7/2}$ и ${}^2\text{G}_{7/2}$. Из возбужденных состояний ${}^2\text{H}_{9/2}$, ${}^2\text{H}_{11/2}/{}^4\text{S}_{3/2}$ возможны излучательные переходы в состояние ${}^4\text{I}_{15/2}$ с испусканием фотонов с длиной волны 409, 525 и 544 нм соответственно. Также возможен безызлучательный переход в возбужденное состояние ${}^4\text{F}_{9/2}$ с последующим переходом в состояние ${}^4\text{I}_{15/2}$ с испусканием фотона на длине волны 658 нм. При взаимодействии с ионами Ce^{3+} происходит резонансное расселение уровней ионов Er^{3+} выше ${}^4\text{I}_{13/2}$ (Рисунок 4.2в) [127]. В результате наночастицы имеют интенсивный пик фотолюминесценции на длине волны 1530 нм. Изучение влияния легирования кристаллической решетки ионами Zn на спектр наночастиц приведено в исследовании [130]: при легировании ионы решетки замещаются на ионы Zn^{2+} , что приводит к изменению локальной симметрии кристалла.

Измерено время жизни фотолюминесценции (табл. 4.1). На длине волны 1530 нм оно составляет 5,7 мс, что подходит для визуализации фотолюминесценции с временным стробированием.

Таблица 4.1. Время жизни фотолюминесценции НАФ $\alpha\text{-NaYbF}_4\text{:Er}_{0.02}\text{Ce}_{0.02}\text{Zn}_{0.1}$.

Длина волны, нм	Время жизни фотолюминесценции, мс
409	0.061 ± 0.03
544	0.48 ± 0.04
658	0.67 ± 0.05
1530	5.7 ± 0.7

Получены изображения образцов в видимом и ИК-диапазонах спектра через 1 мм слой коровьего молока 3,5% жирности. В первом случае зазора между полосками бумаги не наблюдается, невозможно отделить изображение одной полоски бумаги от другой (Рисунок 4.3а). Во втором случае изображение получено на длине волны 1530 нм (Рисунок 4.3б). Две фотолюминесцентные полоски хорошо видны. Это обусловлено законом рассеяния Релея (чем больше длина волны, тем меньше интенсивность рассеяния света) [118].

$$I \sim \omega^4 \sim \frac{1}{\lambda^4}; \quad (3)$$

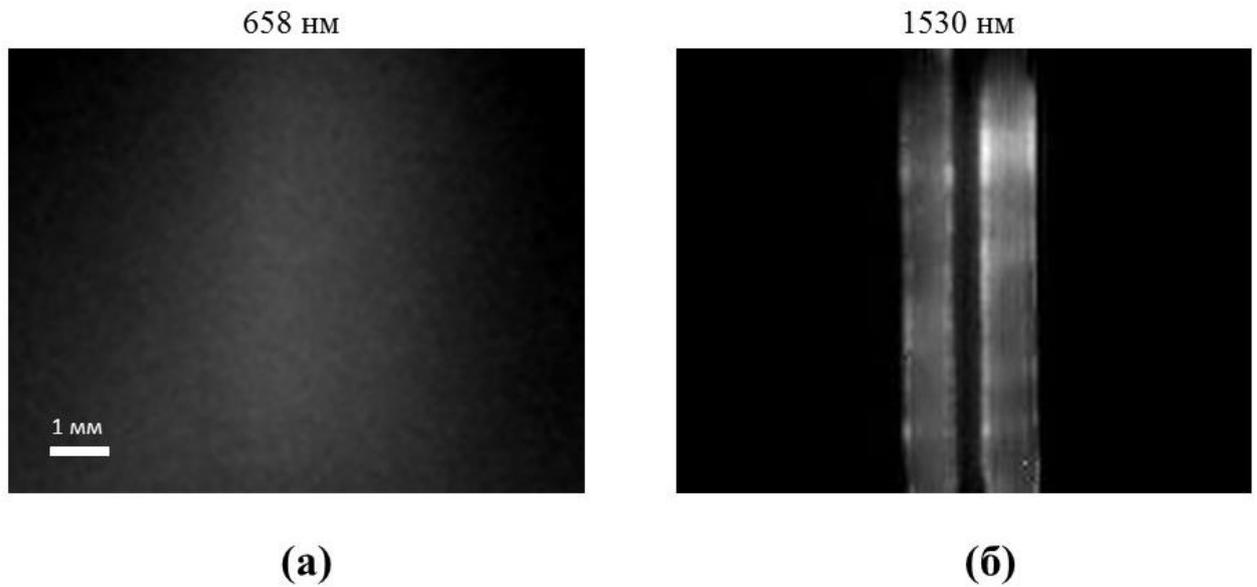
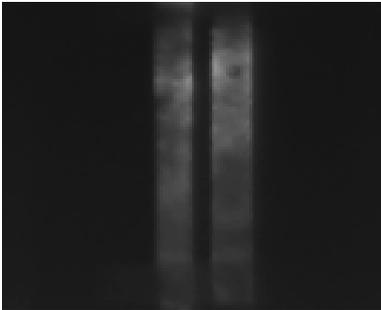
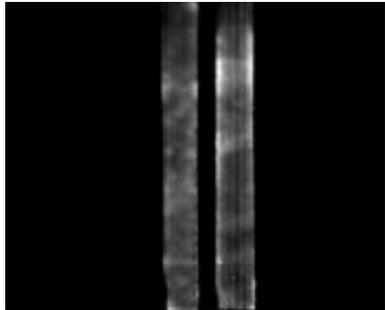
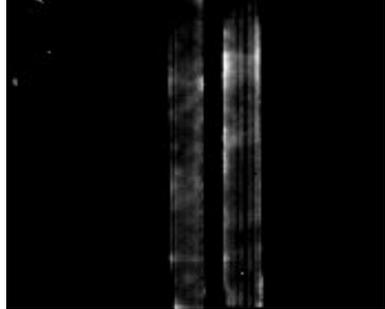
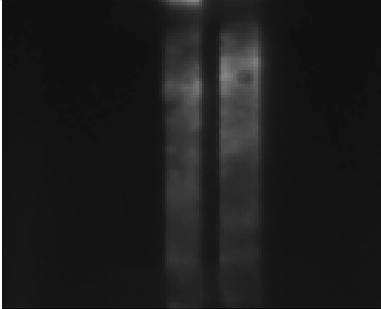
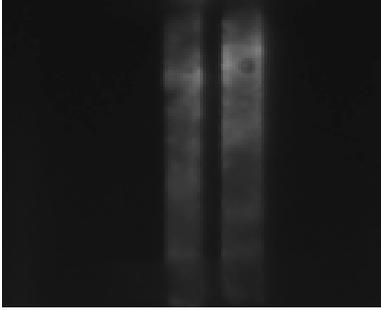
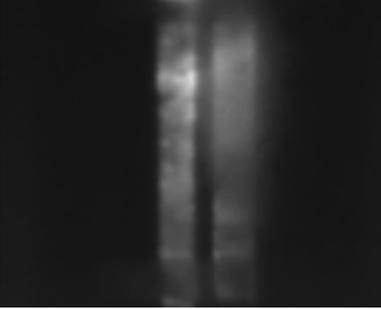


Рисунок 4.3 – Изображения двух бумажных полос, покрытых НАФ, получены через 1 мм слой молока жирностью 3,5% в видимой (а) и ближней ИК (б) области спектра.

Проведено несколько экспериментов с дистиллированной водой. Результаты показаны в Таблице 4.2. Толщина слоя воды увеличена с 1 мм до 11 мм. При толщине слоя воды больше 4 мм изображение в ИК диапазоне пропадает. Это связано с высоким коэффициентом поглощения воды на длине волны 1530 нм $\sim 103 \text{ см}^{-1}$, тогда как на длине волны 658 он составляет всего $\sim 10^{-2} \text{ см}^{-1}$ [124]. В видимом диапазоне – в I-ОПБ – изображение сохраняется до слоя толщиной 11 мм, на всех изображениях отчетливо виден зазор, отчетливо различимы бумажные полоски.

Таблица 4.2. Изображения двух бумажных полос, покрытых НАФ, полученных через воду в видимой и ближней ИК области спектра. Изображения в ИК области спектра через слой воды толщиной более 4 мм получить не удалось (н/д).

Толщина слоя воды	I-ОПБ	III-ОПБ
1 мм		
2 мм		
3 мм		
6 мм		н/д
11 мм		н/д

Выводы к главе 4

1. Различные задачи визуализации требуют индивидуального решения. Поэтому так важно найти универсальные многофункциональные наномаркеры, осуществляющие фотолюминесцентное излучение в разных диапазонах спектра. Четкие изображения наночастиц \square - $\text{NaYbF}_4:\text{Er}_{0,02}\text{Ce}_{0,02}\text{Zn}_{0,1}$ на поверхности бумажных полосок получены через среды с разными оптическими свойствами. Показано, что для визуализации через сильно рассеивающую среду фотолюминесценция с временным стробированием в ИК-области спектра идеально подходит из-за большого времени жизни фотолюминесценции (более 5 мс) НАФ.

2. При увеличении толщины слоя воды происходит сильное поглощение излучения на длине волны 1530 нм. Поэтому визуализацию можно проводить через среду с высоким содержанием воды на длине волны менее 1200 нм [123]. НАФ \square - $\text{NaYbF}_4:\text{Er}_{0,02}\text{Ce}_{0,02}\text{Zn}_{0,1}$ могут быть использованы в качестве фотолюминесцентных наномаркеров как в I-ОПБ, так и в III-ОПБ.

Глава 5. Биосовместимые матричные структуры

5.1. Методы изготовления матричных структур

Современные биоматериалы и методы клеточных технологий позволяют создавать тканеинженерные конструкции (ТИК) для успешного замещения дефектов нативных тканей организма человека и животных, а также для направленной регенерации тканей определенных типов [131]. Как правило, такие ТИК создаются на основе трехмерных биосовместимых матриксов, выполняющих роль объемных каркасов определенной формы и структуры, обеспечивающих жизнедеятельность различных клеточных культур [132, 133]. Разработка ТИК и исследование их функциональных свойств *in vivo* является одним из перспективных направлений развития компонентной базы современной регенеративной медицины [134]. Материалы и архитектура таких ТИК должны не только обеспечивать эффективное прикрепление, дифференцировку и пролиферацию определенных клеточных культур, но также визуализацию и мониторинг происходящих с ними процессов в реальном масштабе времени [135, 136]. В идеале эти конструкции должны осуществлять еще и адресную, а также пролонгированную доставку различных биоактивных компонентов (факторы роста, лекарственные препараты и др.) в область их имплантации [137, 138].

Существует много методов изготовления матричных структур - электроспиннинг [139], трехмерная печать [114], сверхкритическая флюидная пластификация, сублимационная сушка [140], выщелачивание солей [141] и др. [142], и у всех есть свои преимущества и недостатки.

5.1.1. Электроспиннинг

Одним из широко распространенных методов изготовления полимерных матричных структур, имитирующих межклеточный матрикс, является электроспиннинг [143]. Во время этого процесса из полимерного раствора или расплава под действием электростатического поля высокого напряжения (10 ÷ 20 кВ) формируются тонкие нити, которые хаотично наносятся на подложку [144]. Полученная нетканая волокнистая структура имеет высокое отношение площади

своей поверхности к объему, которое во многом и определяет ее высокопористую архитектуру, способствующую эффективной адгезии и пролиферации клеток [145]. Однако, специфика самого метода не позволяет изготовить объемные (более 1 см в толщину) матриксы [146, 147].

5.1.2. Трехмерная печать

Трехмерная печать является одним из многообещающих методов для точного воспроизведения структуры матриксов [148]. Среди всех методик трехмерной печати следует отметить экструзионную печать [149]. Матриксы необходимой внешней и внутренней структуры формируются путем последовательного послойного выдавливания полимерного раствора из сопла, движущегося по заданной траектории, построенной с помощью трехмерного компьютерного моделирования, с последующим отверждением на подложке [150]. Все это позволяет создавать сложные конструкции заданной архитектоники [151]. На сегодняшний день большое количество исследований посвящено поиску и разработке низкотемпературных методов изготовления подобных матриксов [152]. Основной задачей методов 3D-печати является обеспечение необходимых условий для процесса отверждения вязких жидкостей на подложке. Это может быть достигнуто иницированием полимеризации фотоотверждаемой композиции (например, метакрилированной гиалуроновой кислоты) лазерным излучением или разделением фаз в системах полимер-растворитель-антирастворитель [114, 153]. Эти процессы могут протекать при температуре, близкой к комнатной, не достигающей температуры разрушения материалов, что гарантирует сохранение их физико-химических и биохимических свойств.

При этом комбинация методов электроспиннинга и 3D печати, в принципе, может дать возможность сформировать матриксы для ТИК, обладающие оптимальными характеристиками для адгезии, пролиферации и дифференциации клеток различных типов [154]. Еще одним преимуществом этих двух методов над другими является возможность использования целого ряда различных полимеров, как синтетических, так и полимеров природного происхождения. Достаточно лишь

подобрать оптимальные параметры для конкретного вещества, и можно получить матриксы, схожие по структуре, но разные по составу.

5.2. Материалы для биосовместимых матричных структур

Наиболее распространенными материалами для формирования матриксов для тканевой инженерии являются биосовместимые синтетические полимеры (алифатические полиэфиры, полиангидриды, полиуретаны и др. [155]), а также полимеры природного происхождения (биополимеры), например, коллаген и гиалуроновая кислота [156], являющиеся основными компонентами межклеточного матрикса.

5.2.1. Полимеры природного происхождения

Коллаген обладает высокой биосовместимостью, биорезорбируемостью и низкой иммуногенностью [157]. Коллаген может использоваться в матриксах как в чистом виде [158], так и в смеси с различными синтетическими полимерами такими, как поликапролактон [159], полилактид [160], полилактогликолид [161], полиэтиленгликоль [162]. Коллагеновые матриксы применяются в тканевой инженерии нервной, костной, хрящевой ткани, а также ткани сухожилий, связок, кровеносных сосудов и кожи [163]. Гиалуроновая кислота используется в тканевой инженерии хрящевых структур, способствуя активной пролиферации и миграции хондроцитов [164].

Особый интерес представляют собой коллагеновые матриксы, изготовленные методом электроспиннинга, имитирующие биохимические и структурные свойства нативного внеклеточного матрикса. При этом важно иметь в виду, что в процессе электроспиннинга практически не образуется внутри- и межмолекулярных связей между волокнами матриксов, что приводит к потере структурной устойчивости матрикса в водном растворе. Для решения этой проблемы сегодня используются различные методы: химические, фотохимические или физические [165, 166]. Химическое сшивание коллагеновых матриксов осуществляется путем добавления сшивающих агентов [167]. Выбор сшивающего агента производится с учетом присутствующей реакционноспособной группы,

обычно боковой цепи аминокислоты, и соответствующих условий окружающей среды (рН, температура, растворители), которые подбираются так, чтобы не оказывать негативного влияния на коллаген.

Для фотохимического сшивания в раствор с коллагеном добавляют фотосенсибилизаторы, например, рибофлавин [166] или бенгальский розовый [168]. При возбуждении лазерным излучением молекула фотосенсибилизатора переходит в возбужденное состояние, в котором она может передавать энергию другим молекулам, а именно кислороду, возбуждая его до синглетного состояния. Синглетный кислород реагирует с окружающими молекулами коллагена, образуя поперечные связи [169]. Матрицы, стабилизированные лазерным излучением, биосовместимы и сохраняют свою волокнистую структуру в течение нескольких недель [170].

Физическое сшивание может происходить разными способами: при нагревании [171], дегидротермической обработке [172] и УФ-облучении [173]. Однако эти методы имеют ограничения из-за термической деградации коллагеновых волокон.

5.2.2. Синтетические полимеры

Среди синтетических биосовместимых полимеров лучше всего изучено семейство полиэфиров. Основными представителями этого семейства являются полимолочная кислота, полигликолевая кислота и их сополимеры – полилактогликолиды (ПЛГ). Одним из достоинств этих сополимеров является возможность варьировать скорость их биodeградации в организме путем изменения соотношения молочной и гликолевой кислот при синтезе ПЛГ [174].

Для эксперимента по деградации полилактидов в биологических средах образцы формировались методом литьевого прессования [175] термопластичных мелкодисперсных частиц (средний размер ~ 100 мкм) D,L-полилактида марки Purasorb PDL 05 (PURAC Biochem bv, Нидерланды). Прессование проводилось при температуре 43°C и давлении 15 Мпа в течение 30 минут. Изучение процессов деградации изготовленных образцов проводили в течение 5 недель в различных водосодержащих средах – культуральных средах, содержащих эмбриональную

телячью сыворотку, мультипотентные стволовые клетки (МСК). Из анализа методом сканирующей электронной микроскопии можно заключить, что прессованные образцы набухают и увеличиваются в размере в ходе деградации, на поверхности и в объеме образцов образуются поры, количество которых увеличивается по мере деградации полимера, а их характерные размеры составляют порядка нескольких микрометров, однако отдельные поры могут достигать размеров до 20 мкм [176].

Одним из недостатков синтетических полимеров в целом и алифатических полиэфиров в частности является их исходно высокая гидрофобность, препятствующая клеточной адгезии к поверхности матриксов, изготовленных из этих полимеров [177].

Проведено исследование влияния биосовместимых гидрофильных соединений на свойства поверхности матриксов на основе полилактогликолида (ПЛГ, PURAC Biochem bv, Нидерланды). В качестве биосовместимых гидрофильных соединений использовались альгинат натрия (АН) (TermoFisher, ФРГ), натриевая соль гиалуроновой кислоты (ГК) (ООО НПП “Тульская индустрия ЛТД”, Россия) и мальтодекстрин (МД) (АО “Доминант”, Россия). Экспериментальные монолитные диски изготавливались методом литьевого прессования при температуре 67 °С и давлении 15 МПа. Первую группу образцов использовали как контроль. Вторую группу подвергали обработке плазмой диэлектрического барьерного разряда в воздушной атмосфере. Третью группу образцов сразу изготавливали из порошка полилактогликолида, обработанного с 1,0% водным раствором гидрофильного вещества (альгината натрия, гиалуроновой кислоты или мальтодекстрина). Сравнительный анализ краевых углов смачивания поверхностей прессованных дисков проводился методом лежащей капли. Эти эксперименты показали, что формирование композитных дисков на основе алифатических полиэфиров с альгинатом натрия (2,0 масс.%) с последующей гидролитической модификацией оказалось в итоге самым эффективным методом повышения гидрофильности их поверхности [178].

На основе ПЛГ можно изготовить биосовместимые матрицы различными методами [142]. Так, например, полилактогликолидные матрицы, изготовленные методом электроспиннинга, могут обладать высокой биосовместимостью и практически оптимальной волокнистой структурой, а также скоростью биodeградации для их применения в тканевой инженерии ткани миокарда [179] и кости [180].

5.3. Формирование полимерных матричных структур, импрегнированных НАФ, и изучение их оптических свойств

Уже существуют работы, в которых НАФ инкапсулируют в полимерные матричные структуры. Например, в матрицы, изготовленные методом электроспиннинга из полиметилметакрилата [181, 182] и поликапролактона с желатином [183].

5.3.1. Материалы и методы

В экспериментах использовались апконвертирующие наночастицы типа ядро/оболочка $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/(\text{NaYF}_4)$ со средним диаметром 21 ± 6 нм, описанные в Главе 2. В качестве исходных соединений для формирования матриц использовали полилактогликолид (ПЛГ) марки Purasorb ПЛГ 7507 (PURAC Biochem bv, Нидерланды), глицедил метакрилата гиалуроновой кислоты (ГМГК, синтезированный во ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН [184]) и коллаген I типа (КОЛ) (ООО «Ниармедик плюс», Россия).

ПЛГ и КОЛ композиции для электроспиннинга готовили методом растворения полимеров в легколетучем 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (ГФИП, ЗАО НПО "ПиМ-Инвест", Россия) в соотношении 9 масс.% и 4 масс.%, соответственно, в ультразвуковой ванне до образования равномерной консистенции. Для химической стабилизации коллагена использовали изопропанол (ХЧ, Экос-1, Россия) и диглицидивый эфир 1,4-бутанодиола (ДГЭБ) (Sigma Aldrich, США) в качестве сшивающего агента.

ПЛГ композицию для антисольвентной 3D-печати готовили методом растворения полимера в тетрагликоле (Sigma Aldrich, США) в соотношении 10

масс.%. Для 3D-печати с последующим фотоотверждением исходная фотополимеризуемая композиция (ФПК) состояла из водного раствора 19,7 масс.% ГМГК, 4,9 масс.% полиэтиленгликоль диакрилата (ПЭГДА, Sigma-Aldrich, США), 0,1 масс.% флавина моноклеотид (Фармстандарт, Россия) и 0,5 масс.% триэтанолamina (Sigma-Aldrich, США).

Формирование тонких полимерных волокон и изготовление из них пористых пленок проводили на разработанной и изготовленной экспериментальной установке для электроспиннинга (ЭС) полимерных растворов (Рисунок 5.1). Раствор полимера в ГФИП подавали с помощью поршневого насоса через полиэтиленовую трубку в иглу (диаметр = 0,36 мм) из нержавеющей стали, соединенную с металлическим электродом, на который подавалось напряжение, варьируемое от 10 до 25 кВ. После испарения растворителя электрически отклоненные полимерные нити напылялись на осадительный электрод (коллектор), представляющий собой пластиковую пластину из полиметилметакрилата (ПММА), покрытую заземленной алюминиевой фольгой. После предварительной оптимизации режимов электроспиннинга процессы формирования ЭС ПГЛ и ЭС КОЛ матриксов происходили при следующих параметрах: разность потенциалов $\Delta V = 20 \text{ кВ}$, скорость подачи раствора $v = 2 \text{ мл/ч}$, расстояние между концом иглы и коллектором $l = 12 \text{ см}$.

Как уже отмечалось выше, для дальнейшего биологического использования коллагеновых матриксов, полученных методом электроспиннинга, необходимо дополнительно стабилизировать их высокопористую волокнистую структуру. Это было реализовано двумя методами. В первом методе к исходному раствору для электроспиннинга с 4 масс.% коллагена в ГФИП при тщательном перемешивании в течение еще 1 часа добавляли сшивающий агент ДГЭБ в концентрации 0,5 масс.%. Затем образцы хранили во флаконах, содержащих по 10 мл изопропанола. Во втором методе к раствору изопропанола, в котором хранился образец для стабилизации, добавляли сшивающий агент. Экспериментально была установлена подходящая концентрация сшивающего агента ДГЭБ – 15 масс.%. В обоих методах образцы хранили при температуре 37°C в шейкере-инкубаторе в течение 6 дней.

После этого все образцы сушили при НУ еще 24 часа, а затем разрезали на кружки (диаметром около 5 мм) для дальнейших исследований. Сначала степень сшивки оценивали следующим образом: образцы помещали на 1 сутки в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и сравнивали морфологию поверхности матриц до и после. С самыми удачными образцами проводили механические испытания на растяжение и уже численно оценивали степень стабилизации.

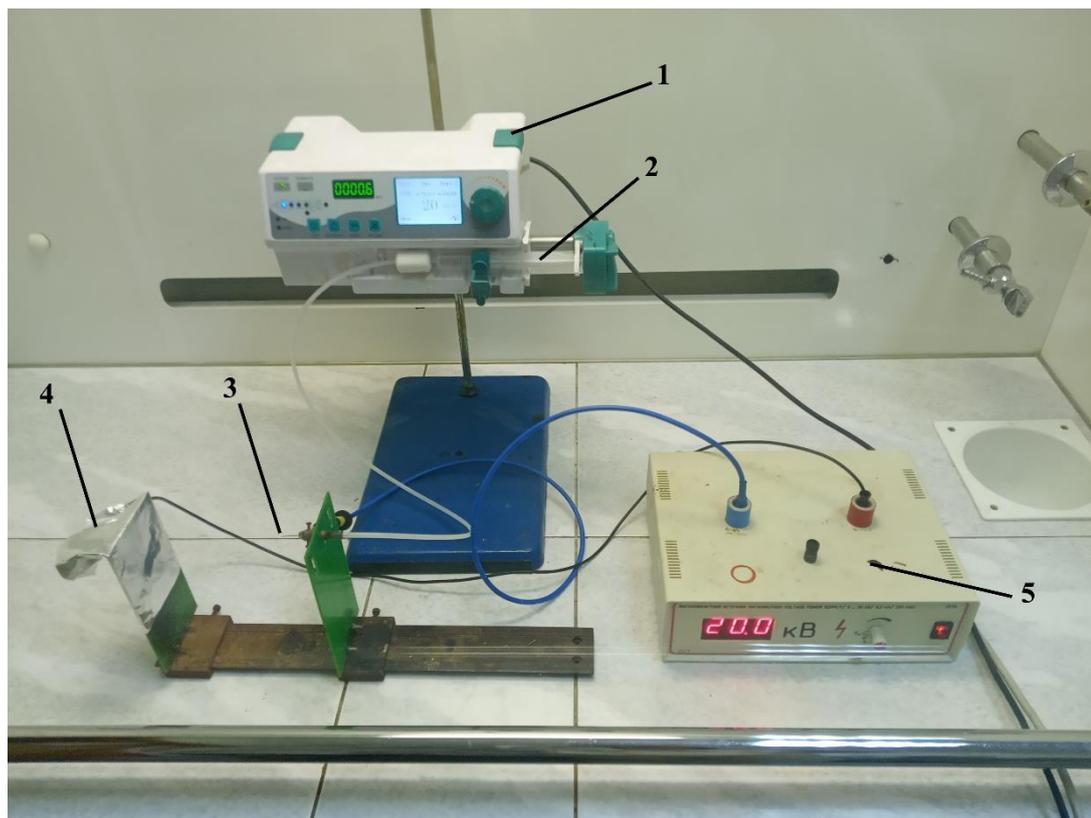


Рисунок 5.1 – Установка для электроспиннинга. 1 – система подачи раствора полимера, 2 – шприц, 3 – игла из нержавеющей стали, 4 – коллектор из алюминиевой фольги, 5 – источник высокого напряжения.

Формирование трехмерных ПЛГ матриц осуществляли методом антисольвентной 3D-печати [114], основанном на послойном, согласно компьютерной модели, нанесении на подложку полимерного раствора с последующим его отверждением методом разделения фаз при контакте с водосодержащей средой. Раствор ПЛГ загружали в экструдер 3D-принтера (Рисунок 5.2) и наносили через иглу с внутренним диаметром 0,2 мм на дно чашки Петри, наполненной дистиллированной водой. Изготовление сетчатых трехмерных

структур производили послойно в соответствии с трехмерной компьютерной моделью: диаметр 7 мм и высота 0,5 мм, плотность заполнения 85% и толщина слоя ~ 180 мкм. Экструзию проводили при средней скорости печати 1 мм/с и скорости потока раствора 0,05 мкл/с. После печати матриксы погружали в дистиллированную воду при 25 °С на 24 часа для обеспечения окончательного отвердевания.

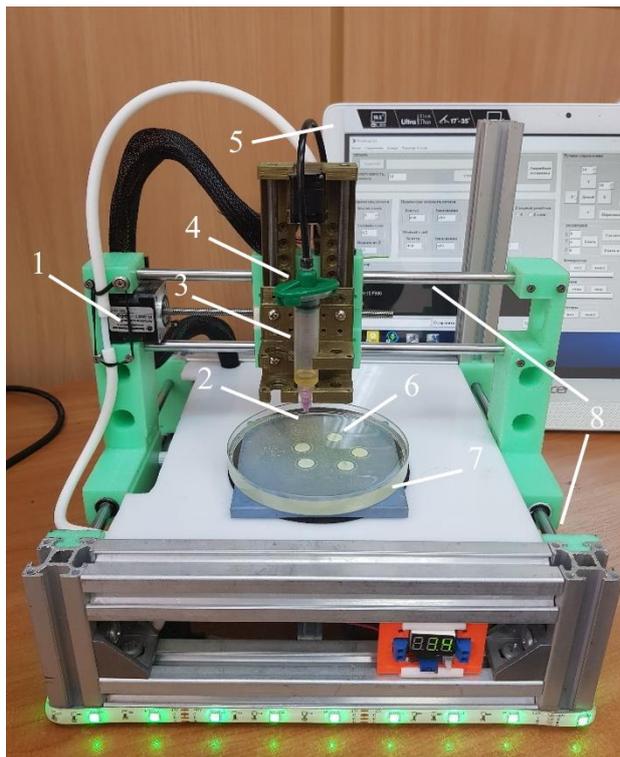


Рисунок 5.2 – 3D-принтер для антисольвентной печати. 1 – шаговый двигатель, 2 – игла, 3 – шприц, 4 – насос, 5 – ПК, 6 – образцы, 7 – чашка Петри, 8 – направляющие для моторов.

Для изготовления матриксов на основе гиалуроновой кислоты (3D ГМГК) использовался оригинальный трехмерный экструзионный принтер собственной разработки (Рисунок 5.3). Принцип его действия основан на послойном нанесении фотополимеризующейся композиции (ФПК) на основе глицидил метакрилата гиалуроновой кислоты по траектории, определяемой трехмерной компьютерной моделью с одновременным фотоотверждением формируемого объекта источниками лазерного излучения.

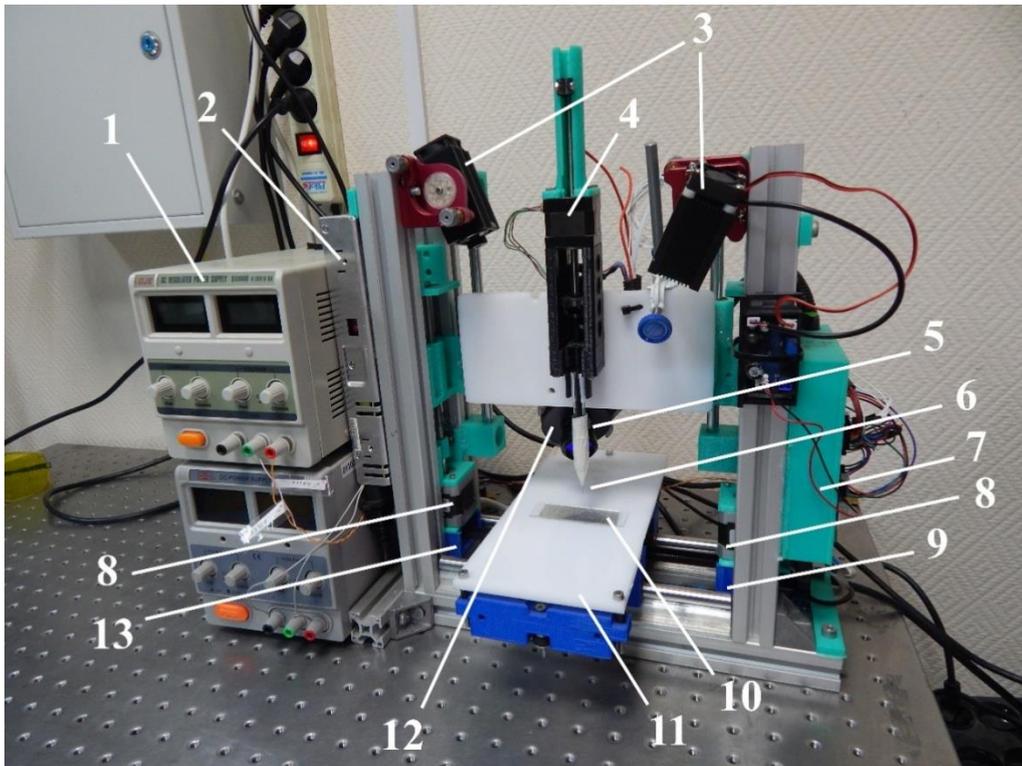


Рисунок 5.3 – Экструзионный 3D принтер с источниками лазерного излучения на длине волны 445 нм. 1 - блок питания лазерных модулей, 2 - блок питания принтера, 3 – полупроводниковые лазеры, 4 - шаговый мотор (для перемещения поршня экструдера), 5 - экструдер, 6 - сопло экструдера, 7 - контроллер Arduino, 8 - шаговый мотор (для перемещения рабочего стола по оси Z), 9 - шаговый мотор (для перемещения экструдера по оси X), 10 - подложка, 11 - рабочий столик, 12 - камера с фильтром, 13 - шаговый мотор (для перемещения рабочего стола по оси Y).

Определение прочности на растяжение КОЛ и ПЛГ матриц проводили на испытательной машине (Shimadzu EZTest, Япония). Для этого из матриц нарезали прямоугольные образцы размером 5x20 мм². Непосредственно перед механическими испытаниями образцы выдерживали 1 сутки в фосфатно-соляном буферном растворе (PBS) (ООО “ПанЭко”, Россия) при температуре 37°C. В ходе измерений исследуемые образцы растягивали вдоль их продольной оси с постоянной скоростью. В процессе растяжения измеряли как нагрузку, выдерживаемую образцом, так и его удлинение, и по полученным данным определяли модуль Юнга. Скорость раздвижения зажимов испытательной машины

задавали равной 1 мм/мин. Нагрузку и удлинение образца измеряли непрерывно вплоть до его разрыва.

Микроструктуру и морфологию поверхности экспериментальных образцов исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа Phenom ProX (Phenom, Нидерланды). Ускоряющее напряжение, используемое для получения изображения, составляло 10 кВ.

Спектры фотолюминесценции образцов при возбуждении непрерывным излучением полупроводникового лазера с длиной волны 976 нм регистрировались с использованием спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция). Для визуализации НАФ использовали имиджинговую систему, описанную в Главе 3 (Рисунок 3.3).

Для измерения коэффициента пропускания полимерных материалов на дно чашки Петри наносили по 10 мкл исходных составов КОЛ и ПЛГ для электроспиннинга и оставляли при нормальных условиях до полного испарения растворителя, получая пленку толщиной 200 мкм. Такое же количество ФПК ГМГК наносили на дно чашки Петри и отверждали лазерным излучением ($\lambda = 445$ нм). Спектры пропускания полученных пленок измеряли на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США).

Для исследования выхода НАФ из матрикса в водную среду образец ЭС КОЛ с НАФ массой 1,7 мг помещали в 0,25 мл PBS и выдерживали в шейкере (орбитальный шейкер-инкубатор ES-20, BioSan, Латвия) при температуре 37°C. Степень выхода НАФ в водную среду измеряли на 1-е, 3-е и 5-е сутки. Спектры НАФ регистрировали в PBS (Эко-сервис, Россия) и дистиллированной воде. НАФ добавляли в концентрации 0,7 мг/мл в обе среды.

Оценка цитотоксичности проходила следующим образом. Матрикс промывали стерильным PBS (pH 7,4) и помещали в культуральную среду DMEM на 24 ч в CO₂-инкубатор (37°C, 5% CO₂). Полученную среду добавляли к фибробластам Vj-5ta, предварительно высаженным в 96-луночные планшеты (5×10³ клеток на лунку), и планшеты переносили в CO₂-инкубатор еще на 24 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-анализа (3 ч инкубации с 0,5

мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида с последующим растворением в 100 мкл ДМСО и измерением оптического поглощения при 565 нм). Жизнеспособность интактных клеток принимали за 100%.

Для культивирования фибробластов на поверхности матриксов образцы стерилизовали в 70% этаноле в течение 30 мин, промывали в PBS (pH 7,4) и выдерживали в полной культуральной среде DMEM в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Затем матриксы помещали на неадгезивную (агарозную) поверхность в 24-луночные планшеты и в каждую лунку добавляли по 5×10⁴ фибробластов в 1 мл полной DMEM. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор, полную замену среды проводили каждые 2-3 дня. Рост клеток на поверхности матриксов оценивали с помощью инвертированного светового микроскопа. Количество клеток определяли методом МТТ на 4-й и 8-й день, как описано выше.

Для исследования матриксов с клетками на конфокальном микроскопе образцы окрашивали Calcein AM (50 мкМ, 15 мин), фиксировали в 4% формальдегиде (НУ, 30 мин) и окрашивали красителем Hoechst 33342 (50 мкМ, 15 мин). Затем окрашенные образцы трижды промывали в PBS (pH 7,4) и исследовали с помощью конфокальной флуоресцентной системы Leica TCS SPE при возбуждении излучением на длинах волн 405 нм и 488 нм.

Оценку тканевой реакции на исследуемые полимерные матриксы проводили с использованием модели их подкожной имплантации самкам мышей линии BALB/c массой 40 г. Лабораторных животных наркотизировали, вводя внутримышечно Золетил (Virbac, Франция) и Ксилазин (Interchemie Werken «de Adelaar» BV, Нидерланды) в дозировке 30 мг/кг и 5 мг/кг, соответственно. Затем шерсть в области спины между лопатками сбрасывали, проводили антисептическую обработку спиртом и выполняли продольный разрез кожи. Тупым способом в подкожно формировали карман глубиной 1 см, куда помещали исследуемые образцы. После этого ушивали кожные покровы и обрабатывали рану гентамициновой мазью.

Анализ параметров фотолюминесценции имплантированных матриксов проводили на описанной в Главе 3 визуализационной установке на первый, 4, 7 и

11 дни эксперимента. Максимальная плотность мощности лазерного излучения в этом эксперименте составляла $1,1 \text{ Вт/см}^2$, что не превышает допустимый предел плотности мощности кратковременного облучения кожи [185]. Для определения отношения интенсивностей R/G перед камерой ставили фильтр КС-10, который пропускает излучение в красной области спектра.

Биоптаты с имплантированными матриксами фиксировали 10% формалином течение 72 часов, заливали в парафиновые блоки, и изготавливали срезы толщиной $5 \div 10 \text{ мкм}$ (HistoCore Arcadia C, Leica, Германия) по стандартной методике [186]. Затем срезы окрашивали гематоксилином и эозином согласно стандартному протоколу. Оценку степени воспаления проводили с помощью подсчета количества лейкоцитов в нескольких полях зрения (не менее 5 для каждого образца).

Все эксперименты соответствовали рекомендациям локального биоэтического комитета, «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказы МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г.), «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г, а также ISO 10993 «Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements» и «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes ETC 123» от 1985.

5.3.2. Химическая стабилизация коллагена

Метод электроспиннинга позволяет создавать высокопористые нетканые структуры, имитирующие межклеточный матрикс. Этого можно достичь за счет хаотического отклонения струй полимерного раствора в электрическом поле. Конус Тейлора формировался на конце иглы при приложении электрического поля к раствору полимера в легколетучем полярном растворителе. Из этого конуса может формироваться как струя (при малой вязкости раствора), так и спрей. Изменяя напряжение между иглой и коллектором и вязкость раствора, можно добиться определенной степени пористости матрикса и толщины волокна, а также избежать образования капель [187]. Перед формированием матриксов, подходящих для механических испытаний, было проведено несколько экспериментов по

выбору подходящих параметров электроспиннинга для получения нановолокон без веретенообразных утолщений.

В настоящее время коллаген активно используется в тканевой инженерии. Методом электроспиннинга можно сформировать структуру, имитирующую межклеточный матрикс. Однако из-за растворения в ГФИП и воздействия электрического поля и, как следствие, недостаточной механической прочности такие нетканые маты теряют структурную устойчивость и разрушаются в водных растворах [188]. Чтобы предотвратить такие морфологические изменения, коллагеновые образцы необходимо стабилизировать различными сшивающими агентами. В качестве сшивающего агента выбран диглицидиловый эфир 1,4-бутанодиола (ДГЭБ). Он является высокорекреационноспособным нетоксичным биосовместимым сшивающим агентом. Он может работать при различных рН, как при кислотных, так и при щелочных, реагируя с аминогруппой и карбоксильной группой лизина [189, 190].

Использованы два метода стабилизации. В первом методе сшивающий агент добавляли непосредственно в исходную композицию для электроспиннинга. Этот метод, предположительно, мог способствовать сшиванию за счет тесного контакта с коллагеном. Изготовлены образцы с 0,5 масс.% ДГЭБ в исходном растворе. Однако образцы не сохраняли свою структуру после 1 суток пребывания в PBS. Такую невоспроизводимость результатов можно объяснить следующим. Когда образец помещали в избыток изопропанола, скорость диффузии превышала скорость реакции сшивания коллагена, и сшивающий агент высвобождался из образца в раствор. В растворе концентрация сшивающего агента была очень низкой (около 0,4%).

Во втором методе сшивающий агент добавляли только к раствору изопропанола, в котором хранился образец для стабилизации. С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что образцы, стабилизированные вторым методом в 15 масс.% растворе ДГЭБ в изопропанола, сохранили свою структуру (Рисунок 5.4.).

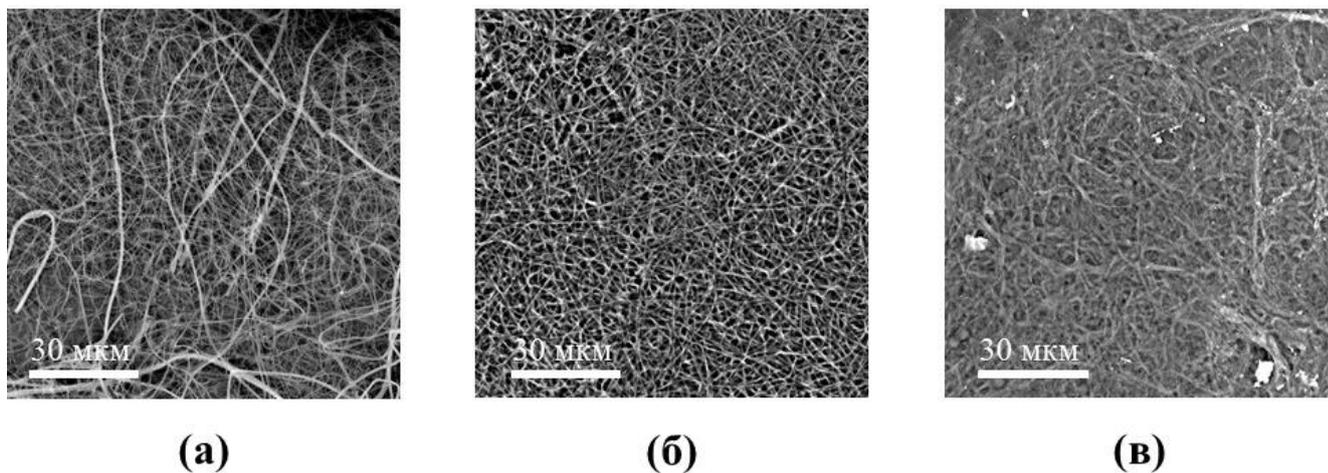


Рисунок 5.4 – Микрофотографии поверхности образцов ЭС КОЛ исходные (а), после 6 суток в изопропанолe с 15 масс.% ДГЭБ (б) и после 1 суток в PBS (в).

Сочетание этих двух методов оказалось наиболее эффективным. После добавления 0,5 масс.% ДГЭБ в исходную композицию и выдержки в растворе изопропанола с 15 масс.% ДГЭБ в течение 6 суток все образцы сохраняли свою структуру даже после выдержки в PBS в течение 1 суток.

Для повышения эффективности процесса химического сшивания структуры ЭС КОЛ матриксов в исходную композицию коллагена в ГФИП добавляли 0,5, 1 и 3 масс.% ДГЭБ. После электроспиннинга сформированные коллагеновые матриксы также выдерживали в изопропанолe с 15 масс.% ДГЭБ в течение 6 суток. Для определения механических свойств исходных матриксов были проведены механические испытания матриксов без НАФ. Одна партия образцов была погружена в PBS на 1 сутки сразу после сшивания. Вторая – сначала полностью высушена при нормальных условиях в течение суток для полного удаления изопропанола. На Рисунке 5.5 приведены результаты механических испытаний первой партии коллагеновых матриксов с различным содержанием ДГЭБ в исходной композиции.

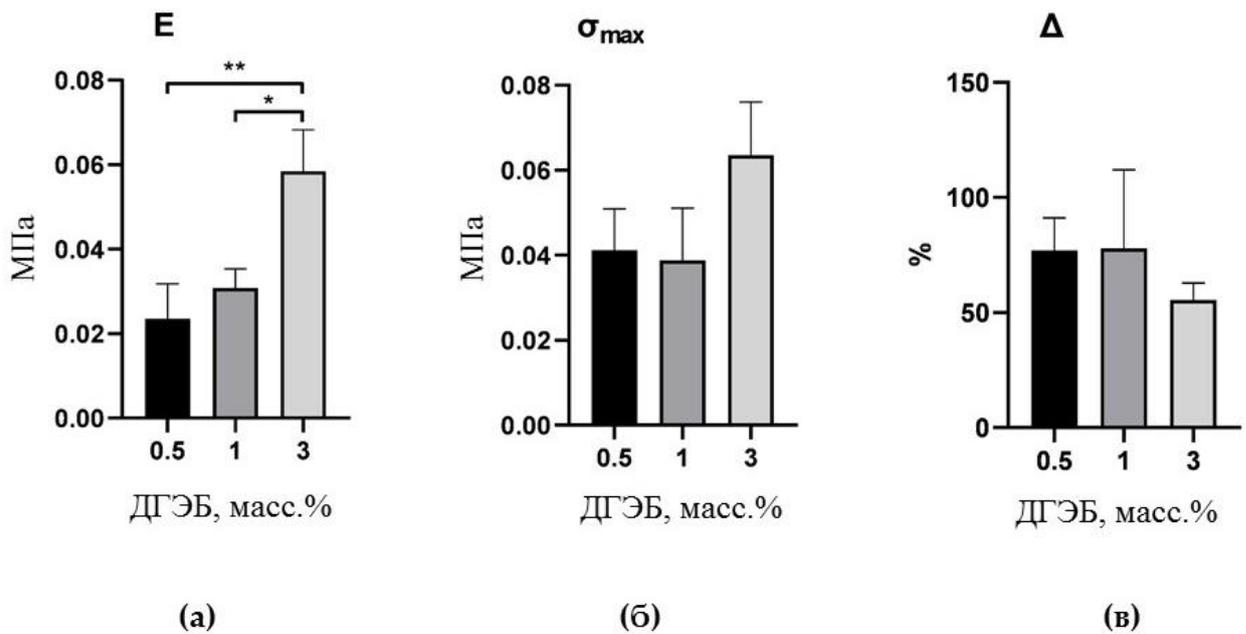


Рисунок 5.5 – Результаты механических испытаний на растяжение образцов ЭС КОЛ, погруженных в изопропанол с 15 масс.% ДГЭБ на 6 суток и в ФБС на 1 сутки: модуль Юнга (а), предел прочности при растяжении (б), максимальное удлинение (в). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Стьюдента; данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение по крайней мере для 3 повторов.

Видно, что образцы с содержанием ДГЭБ 0.5 и 1 масс.% обладают схожими (в пределах погрешности измерений) механическими характеристиками. Наибольшей прочностью на разрыв обладают образцы с самым высоким содержанием ДГЭБ – 3 масс.%. При этом они обладают наименьшей величиной максимального удлинения, однако статистически значимыми были только различия в модуле Юнга.

Для второй партии предварительно высушенных ЭС КОЛ образцов (Рисунок 5.6) наблюдается аналогичная картина: с повышением концентрации ДГЭБ в исходном растворе модуль упругости постепенно возрастает, что говорит об увеличении прочности, а величина максимального удлинения постепенно уменьшается. Прочность предварительно высушенных образцов на порядок больше, а величина максимального удлинения в несколько раз меньше.

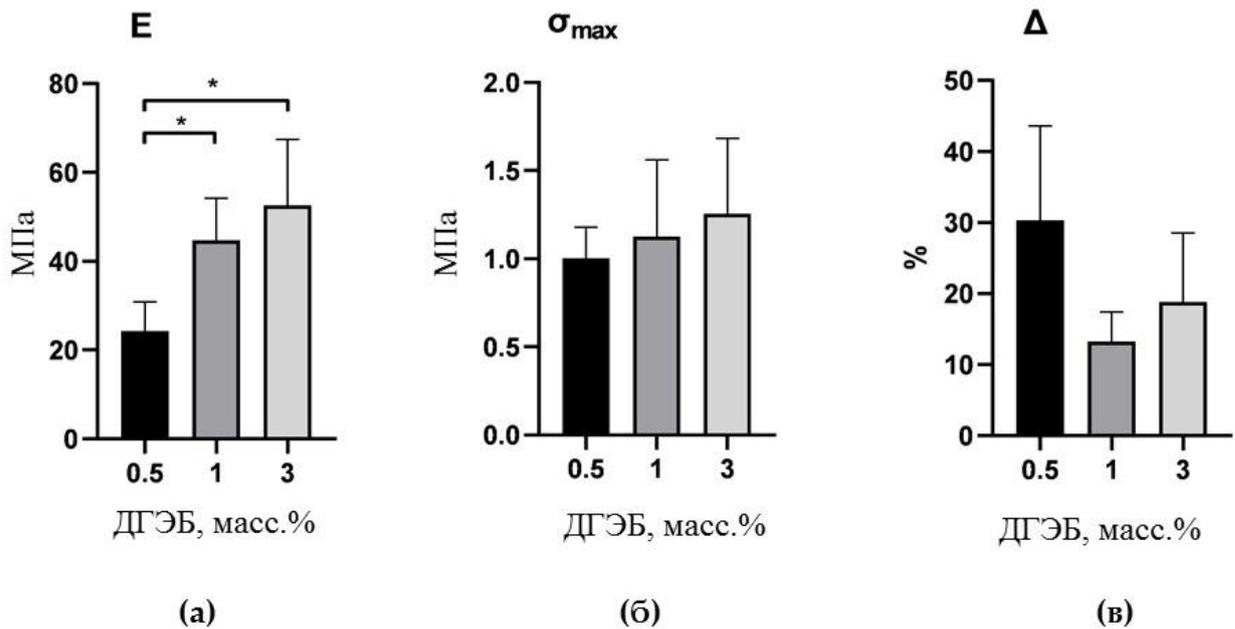


Рисунок 5.6 – Результаты механических испытаний ЭС КОЛ образцов, выдержанных 6 дней в изопропанолe с 15% ДГЭБ, высушенных и погруженных в PBS на 1 сутки: модуль Юнга (а), предел прочности при растяжении (б), максимальное удлинение (в). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Стьюдента; данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение для 3 повторов.

Благодаря выбранному методу сшивки образцы сохраняют свою волокнистую структуру в течение нескольких суток в водных растворах и обеспечивают адгезию клеток [26]. Оптимизированный процесс химической стабилизации позволил увеличить механическую прочность коллагеновых матриц. При увеличении концентрации ДГЭБ в исходном растворе выше 0,5 масс.% увеличивается модуль упругости полученного материала в 2 раза. Важно отметить, что предел прочности предварительно высушенных образцов был на порядок выше по сравнению с невысушенными, а максимальное удлинение было в несколько раз меньше. Этот простой шаг может существенно изменить механические свойства матриц и стать инструментом для создания структур с желаемой механикой. Варьируя концентрацию сшивающего агента, можно контролировать не только механические свойства полученных матриц, но и скорость их биodeградации *in vitro* и *in vivo*. Для дальнейших экспериментов были выбраны предварительно высушенные образцы ЭС КОЛ с 1 масс.% ДГЭБ.

5.3.3. Механические испытания ЭС ПЛГ

ЭС ПЛГ матриксы после электроспиннинга использованы без изменений. Результаты испытаний на растяжение образцов ЭС ПЛГ представлены на Рисунке 5.7. Образцы ЭС ПЛГ, выдержанные в PBS одни сутки, сжимаются примерно на 20% и становятся более плотными по сравнению с исходными. Кроме того, выдержанные в PBS образцы имеют меньше дефектов (не расслаиваются при испытании на растяжение) и являются более прочными. Удлинение при разрыве у обоих типов образцов примерно одинаковое, однако при испытании было видно, что удлинение при пределе прочности (без частичных разрывов из-за расслоения) у исходных образцов намного ниже – 5% против 128% у выдержанных.

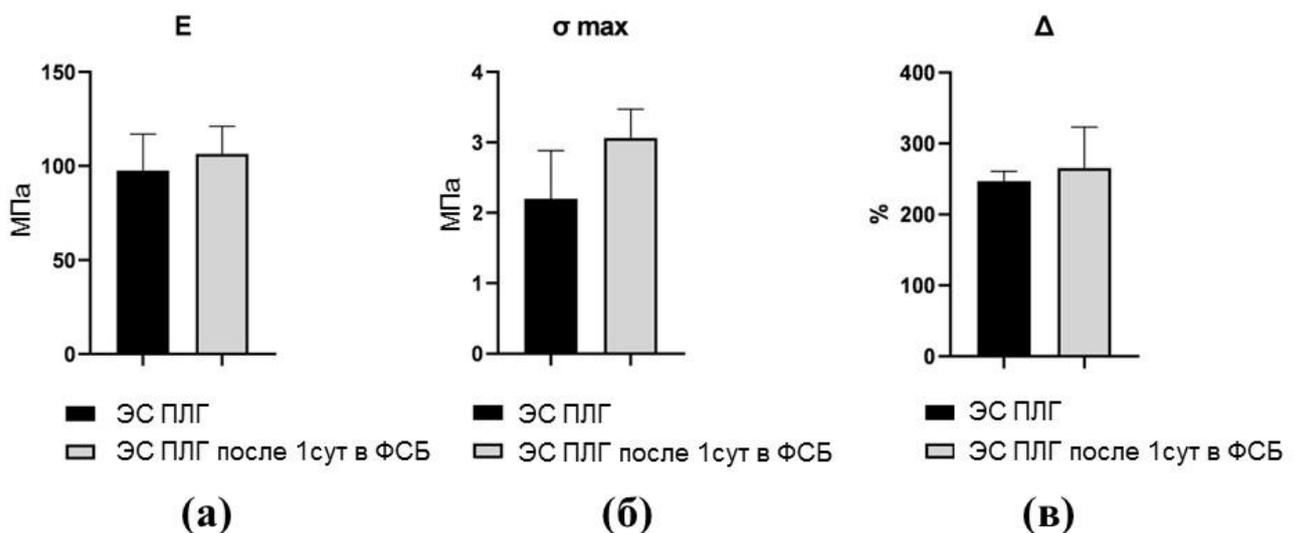


Рисунок 5.7 – Результаты испытаний на растяжение ЭС ПЛГ образцов, погруженных в PBS на 1 сутки: модуль Юнга (а), предел прочности (б), максимальное удлинение (в); данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для 3 повторов.

5.3.4. Изготовление полимерных матриксов, импрегнированных НАФ, и их характеристика

Изготовлено 8 типов матриксов, импрегнированных НАФ: ЭС КОЛ, ЭС ПЛГ, 3D ПЛГ и 3D ГМГК матриксы с концентрациями 0,1 мг и 1 мг НАФ на 100 мг полимера. На этапе изготовления исходной композиции в раствор полимера (1 мл)

добавляли НАФ в соответствующих концентрациях. Для равномерного распределения наночастиц в растворе и, как следствие, в матриксе все исходные растворы перемешивали в ультразвуковой ванне в течение 60 минут. Более того, сама технология этого метода обеспечивала дополнительную равномерность распределения наночастиц, так как все волокна располагались на коллекторе случайным образом.

3D-печать — один из способов быстрого формирования матриксов строго заданной формы с маленьким расходом материала. После выбора параметров печати (вязкость раствора, скорость подачи раствора и скорость печатающей головки) можно получить сложную структуру с требуемой пористостью и разрешением. Разрешение печати является одним из важных параметров этого метода. Поскольку для печати требуется достаточно жидкие растворы, необходима дополнительная стабилизация для формирования образца с подходящим для выбранной цели разрешением печати.

Такой подход экструзионной 3D-печати с одновременным фотоотверждением позволяет точно контролировать свойства производных ГК в зависимости от конечной цели их использования [184]. Процесс фотоинициируемого сшивания был реализован с использованием комплекса мононуклеотид/триэтаноламин, характеризующегося полосой поглощения в спектральной области около ~ 450 нм с образованием свободных радикалов [191]. 3D ГМГК матриксы дополнительно выдерживали под излучением на длине волны 450 нм в течение 30 минут. 3D ПЛГ погружали в дистиллированную воду при 25°C на 24 часа для полного удаления тетрагликоля и обеспечения окончательного отверждения. В выбранных методах антисольвентной и экструзионной печати не используются токсичные растворители и высокие температуры, что позволяет применять их в различных областях тканевой инженерии. ЭС ПЛГ матриксы использовали без дополнительной обработки.

Эти два принципиально разных метода – электроспиннинг и трехмерная печать – имеют свои преимущества и недостатки и могут быть использованы для решения различных задач тканевой инженерии [192]. Мягкая структура с большой

площадью поверхности может быть использована в таргетной терапии и локализованной доставке лекарств [193], тогда как жесткий матрикс с четко определенной формой больше подходит для замещения дефектов репарации, например, в хрящевой и костной ткани [194]. На Рисунке 5.8 представлены схематические изображения экспериментальных установок для формирования матриксов и изображения самих матриксов.

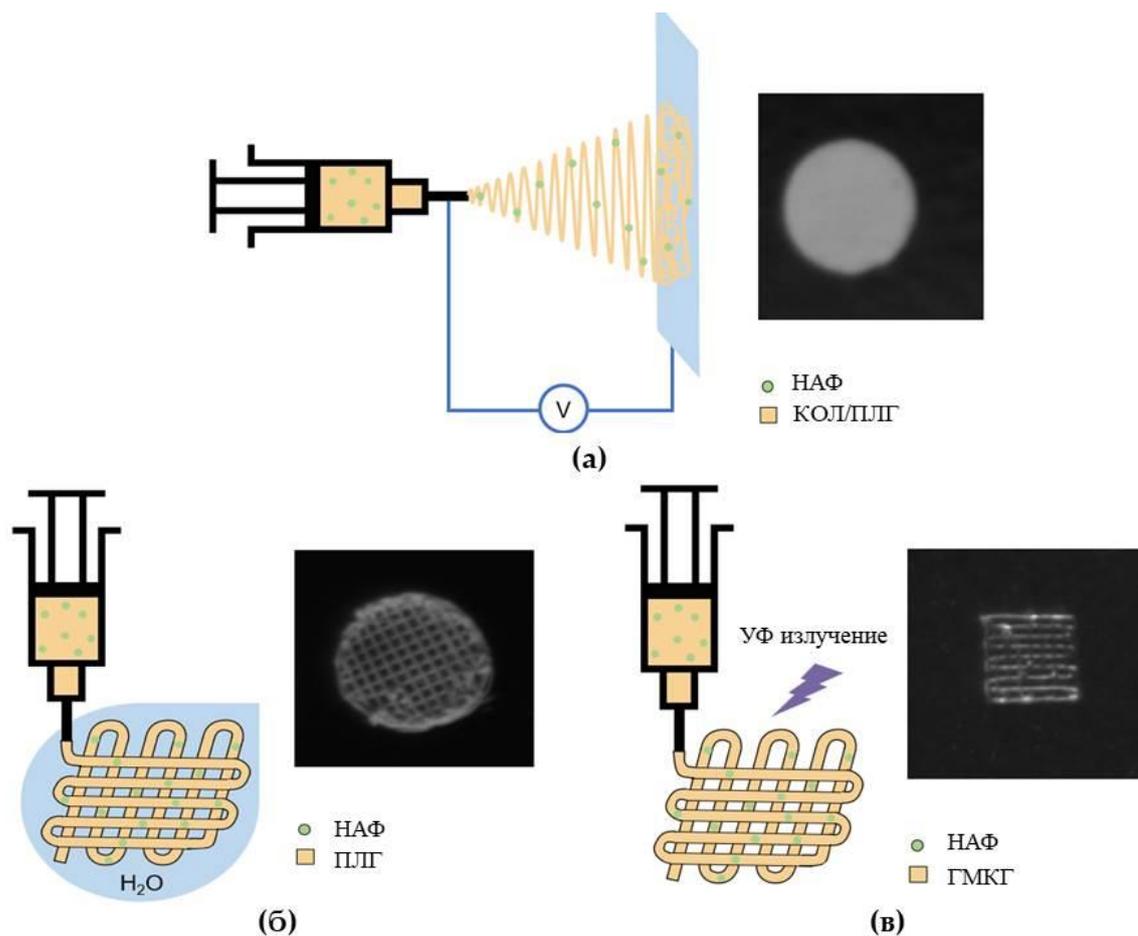


Рисунок 5.8 – Схематические изображения экспериментальных установок для электроспиннинга (а); экструзионной антисольвентной 3D-печати (б); экструзионной 3D-печати с фотоотверждением (в) и соответствующим изображением матриксов.

Исследование микроструктуры и морфологии поверхностей матриксов при помощи сканирующей электронной микроскопии не выявило значимых отличий матриксов с разной концентрацией НАФ (Рисунки 5.9(а), 5.10(а), 5.11(а) и 5.12(а)).

На рисунках 5.9(б), 5.10(б), 5.11(б) и 5.12(б) показаны характерные нормированные спектры фотолюминесценции НАФ и матриксов, импрегнированных НАФ. Отношение интенсивностей красного пика на длине волны 658 нм к зеленому пику на длине волны 544 нм было выше для 3D-матриксов ГМГК, чем для остальных, что указывает на более интенсивную безызлучательную релаксацию возбужденных ${}^2\text{H}_{11/2}/{}^4\text{S}_{3/2}$ состояний в ${}^4\text{F}_{9/2}$.

На рисунках 5.9(в), 5.10(в), 5.11(в) и 5.12(в) показаны фотографии образцов, импрегнированных НАФ, полученные с помощью системы визуализации, в которой для накачки образцов используется сканирующий лазерный луч с длиной волны 976 нм. Все изученные образцы хорошо видны и хорошо различимы. На рисунках 5.9(г), 5.10(г), 5.11(г) и 5.12(г) показаны отношения интенсивности красного пика на длине волны 658 нм к интенсивности зеленого пика на длине волны 544 нм НАФ и матриксов.

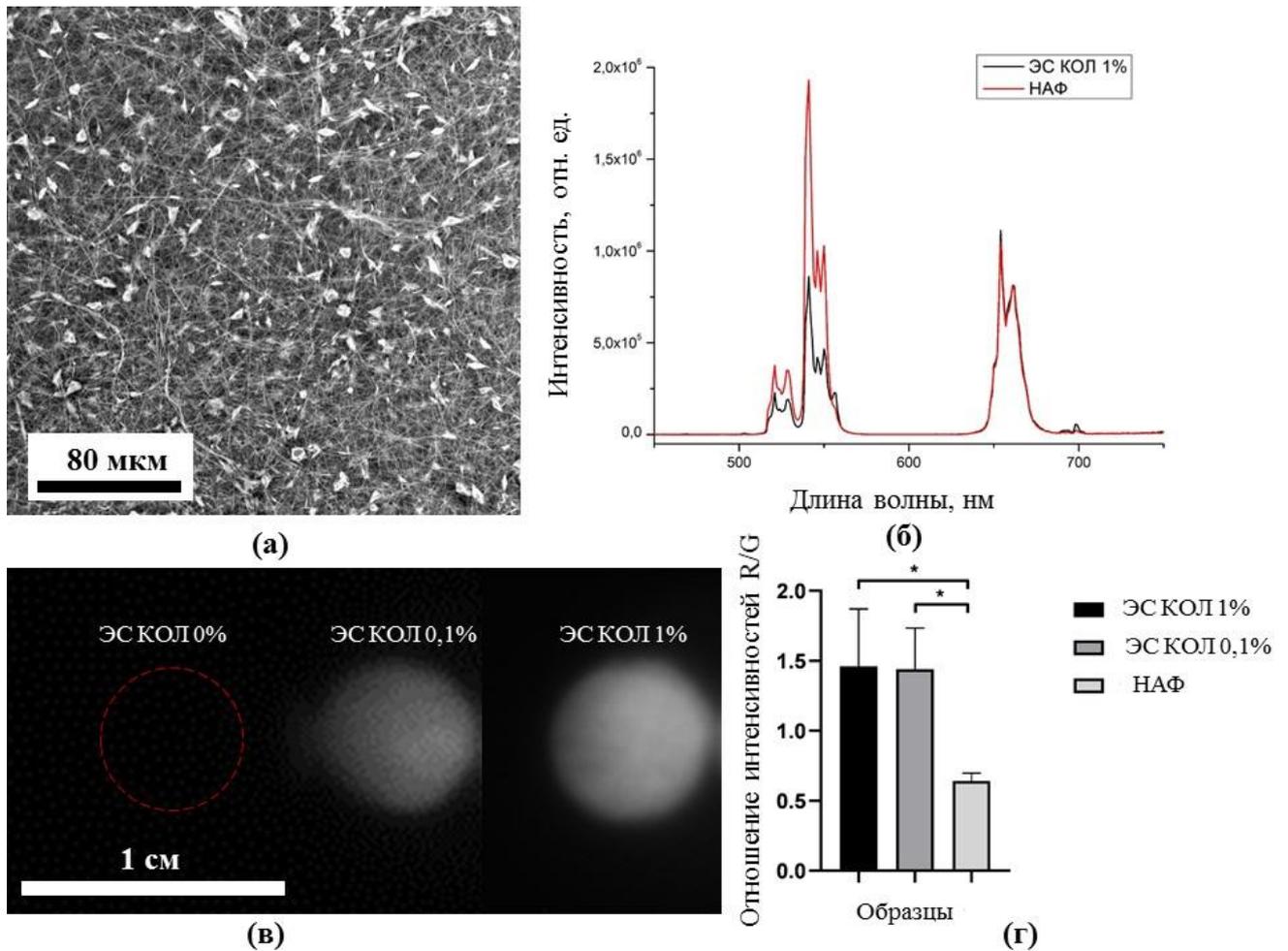


Рисунок 5.9 – Характеризация ЭС коллагеновых матриц: СЭМ-изображение (а); нормированные спектры флуоресценции НАФ и НАФ, включенных в матрицы ЭС КОЛ (б); фотографии матриц ЭС КОЛ с 0 (контроль), 0,1 и 1 мг НАФ на 100 мг полимера при облучении возбуждающим излучением 976 нм (в). Отношение интенсивности красного пика на длине волны 658 нм к интенсивности зеленого пика на длине волны 544 нм НАФ и матриц ЭС КОЛ (0,1 и 1% НАФ) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Стьюдента (г).

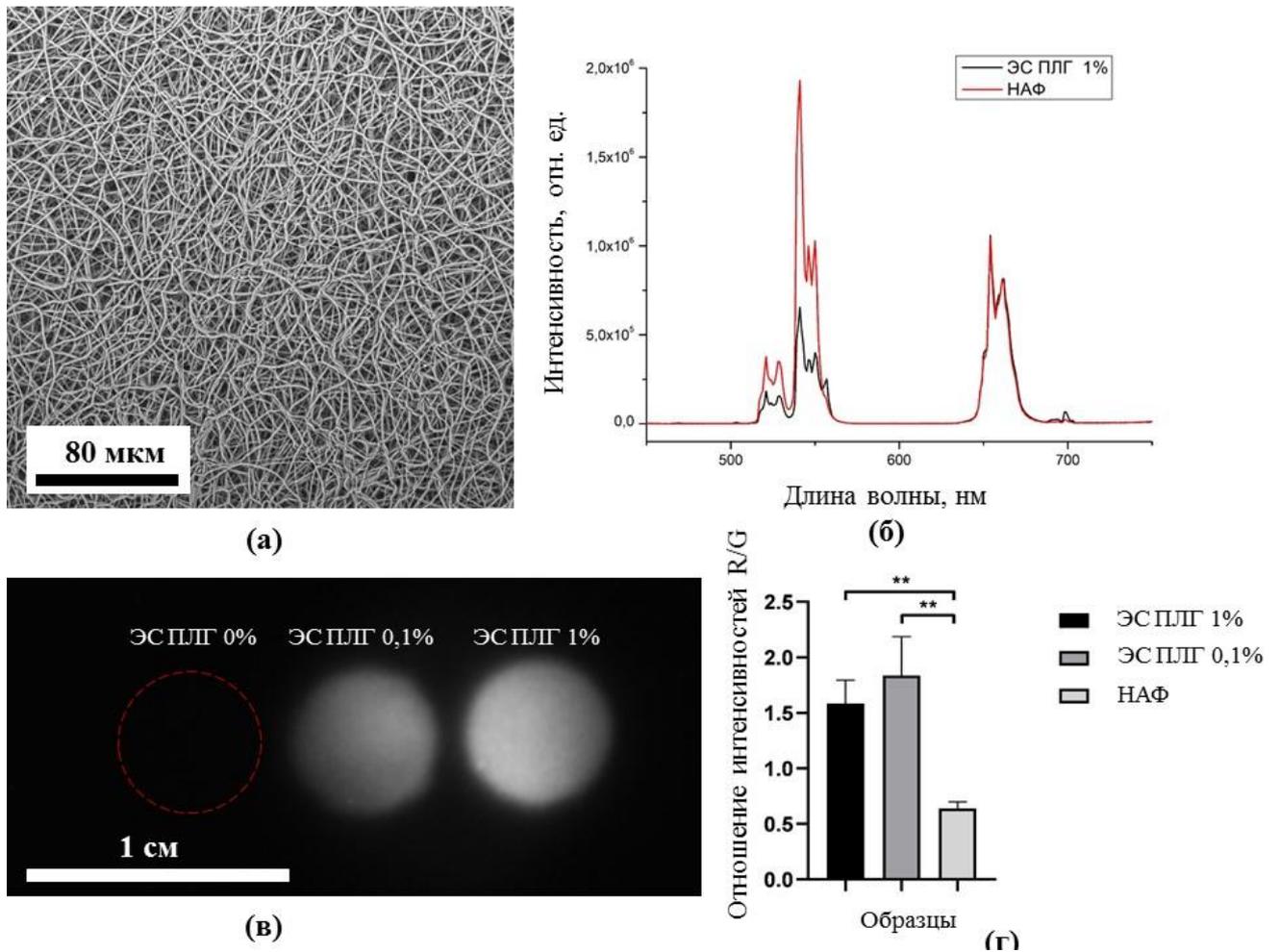


Рисунок 5.10 – Характеризация ЭС полилактогликолидных матриксов: СЭМ-изображение (а); нормированные спектры фотолуминесценции НАФ и НАФ, включенных в матриксы ЭС ПЛГ (б); фотографии матриксов ЭС ПЛГ с 0 (контроль), 0,1 и 1 мг НАФ на 100 мг полимера при облучении возбуждающим излучением 976 нм (в). Отношение интенсивности красного пика на длине волны 658 нм к интенсивности зеленого пика на длине волны 544 нм НАФ и матриксов ЭС ПЛГ (0,1 и 1% НАФ) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Стьюдента (г).

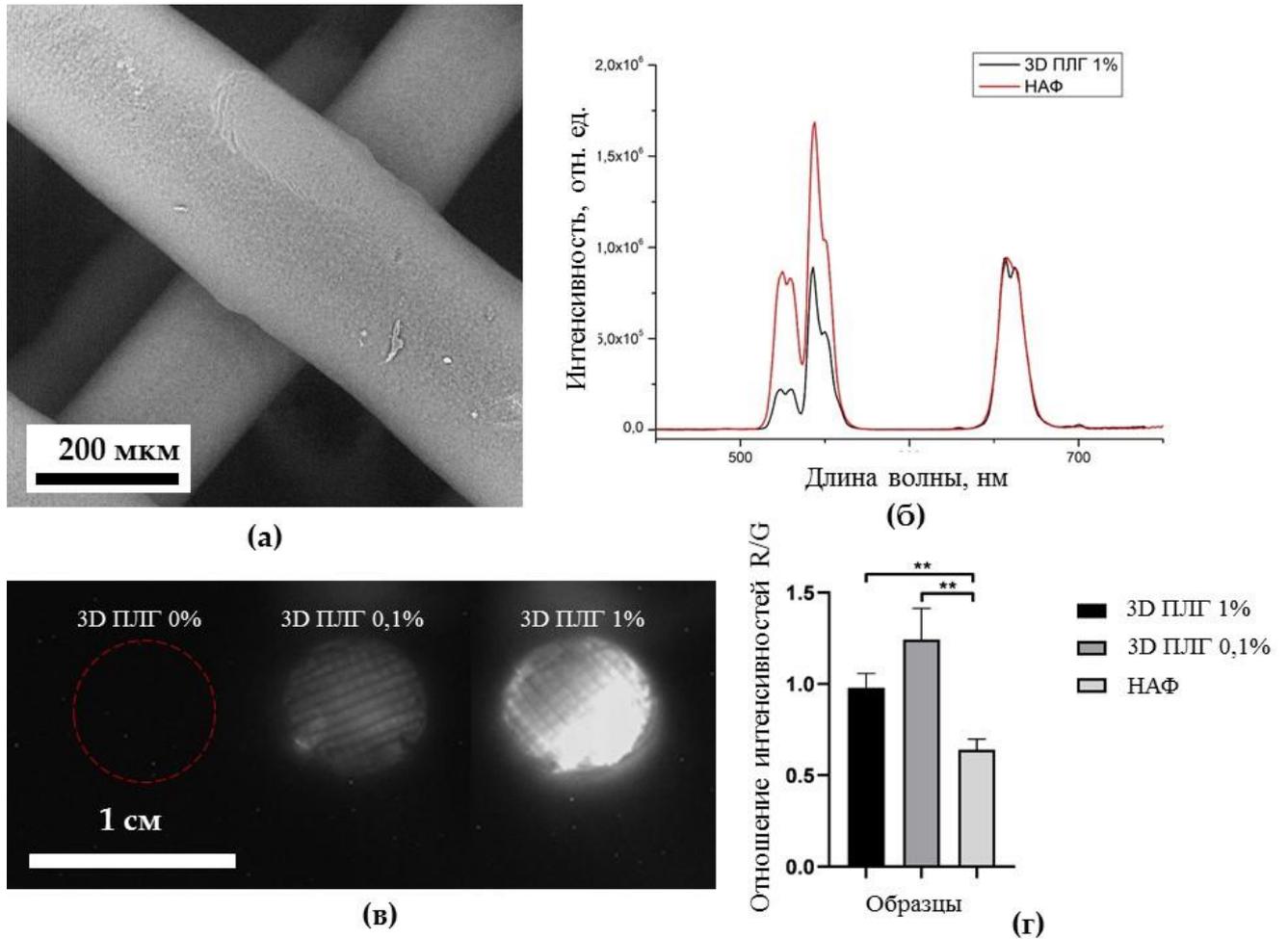


Рисунок 5.11 – Характеризация 3D полилактогликолидных матриц: СЭМ-изображение (а); нормированные спектры фотолуминесценции НАФ и НАФ, включенных в матрицы 3D ПЛГ (б); фотографии матриц 3D ПЛГ с 0 (контроль), 0,1 и 1 мг НАФ на 100 мг полимера при облучении возбуждающим излучением 976 нм (в). Отношение интенсивности красного пика на длине волны 658 нм к интенсивности зеленого пика на длине волны 544 нм НАФ и матриц 3D ПЛГ (0,1 и 1% НАФ) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Стьюдента (г).

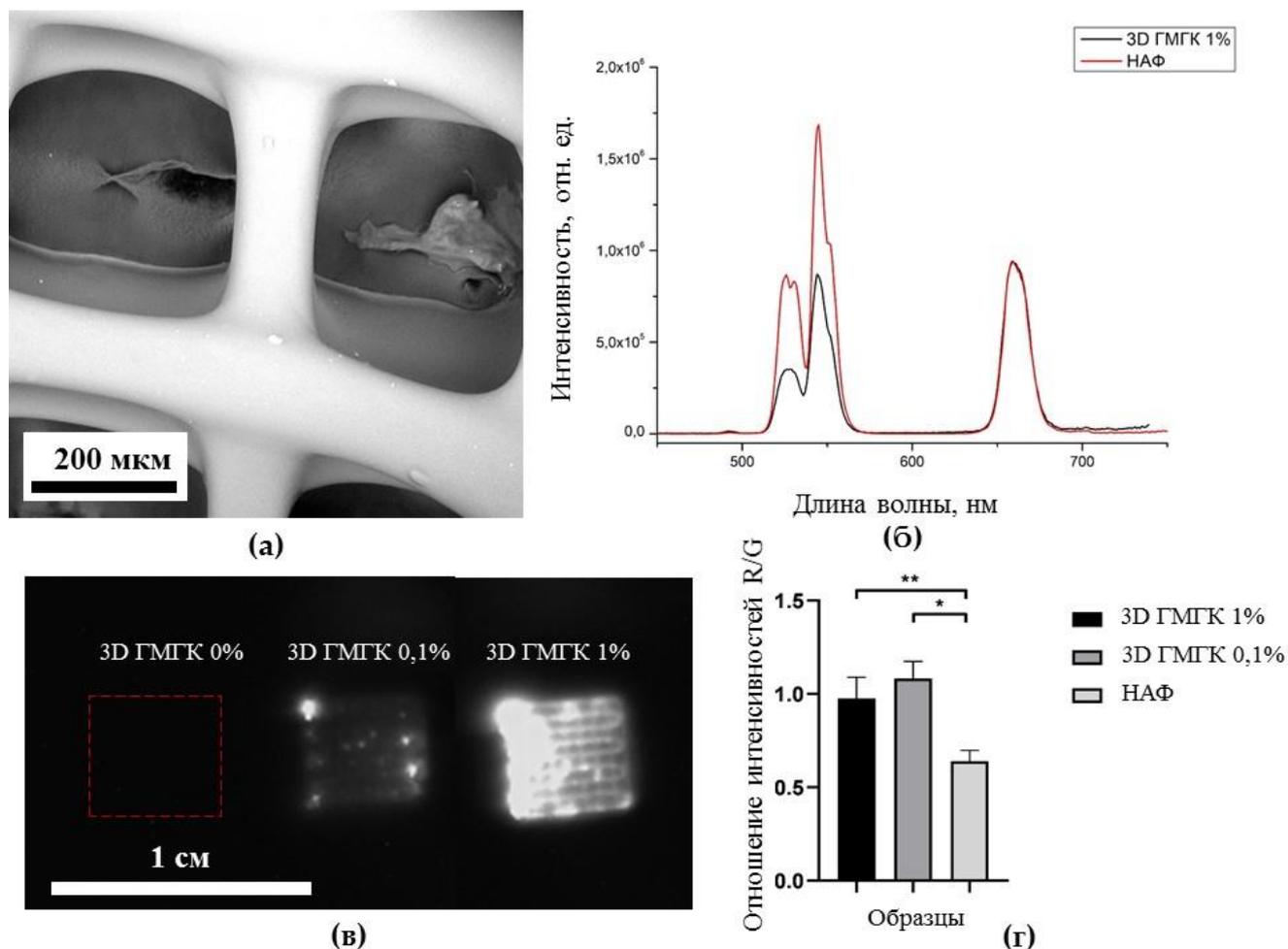


Рисунок 5.12 – Характеризация 3D ГМГК матриц: СЭМ-изображение (а); нормированные спектры фотолуминесценции НАФ и НАФ, включенных в матрицы 3D ГМГК (б); фотографии матриц 3D ГМГК с 0 (контроль), 0,1 и 1 мг НАФ на 100 мг полимера при облучении возбуждающим излучением 976 нм (в). Отношение интенсивности красного пика на длине волны 658 нм к интенсивности зеленого пика на длине волны 544 нм НАФ и матриц 3D ГМГК (0,1 и 1% НАФ) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Стьюдента (г).

Различия в спектрах можно объяснить взаимодействием молекул полимера матрикса с НАФ и оптическими свойствами матрикса, поскольку полимеры по-разному рассеивают и пропускают свет. Пленка ГМГК была менее проницаемой в зеленом диапазоне, чем в красном и ИК диапазонах (Рисунок 5.13), поэтому пики смещены в более длинноволновую область (от 409 до 414 нм, от 544 до 549 нм). Полученная зависимость коэффициента пропускания также объясняет низкую

интенсивность излучения наночастиц внутри матриц ГМГК. Для всех типов матриц выявлена статистически значимая разница в соотношении R/G между свободными НАФ и НАФ, импрегнированными в матрицы. Кроме того, снижение концентрации НАФ (от 1 до 0,1%) не приводило к статистически значимым изменениям отношения R/G, что свидетельствовало о чувствительности метода.

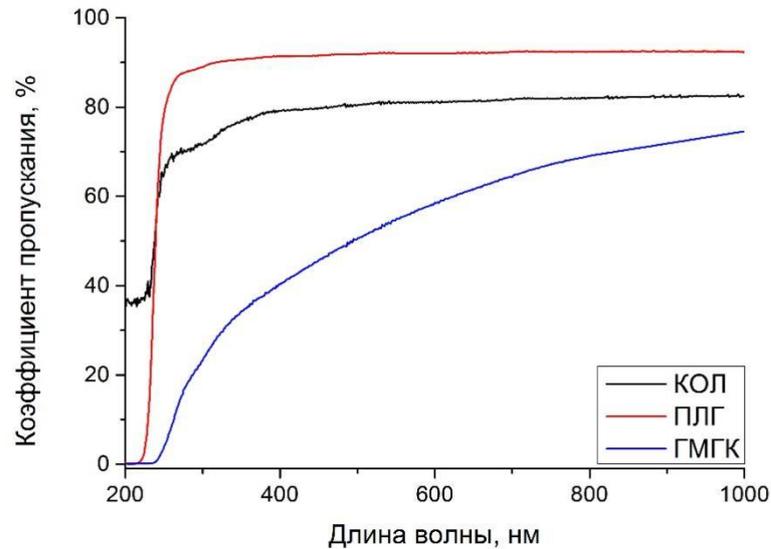


Рисунок 5.13 – Зависимость коэффициента пропускания полимерных пленок от длины волны излучения.

На Рисунке 5.14 показаны СЭМ-изображения поверхности матриц при различном увеличении. НАФ располагались в основном внутри волокон – на сколах, срезах или в порах – а не на поверхности.

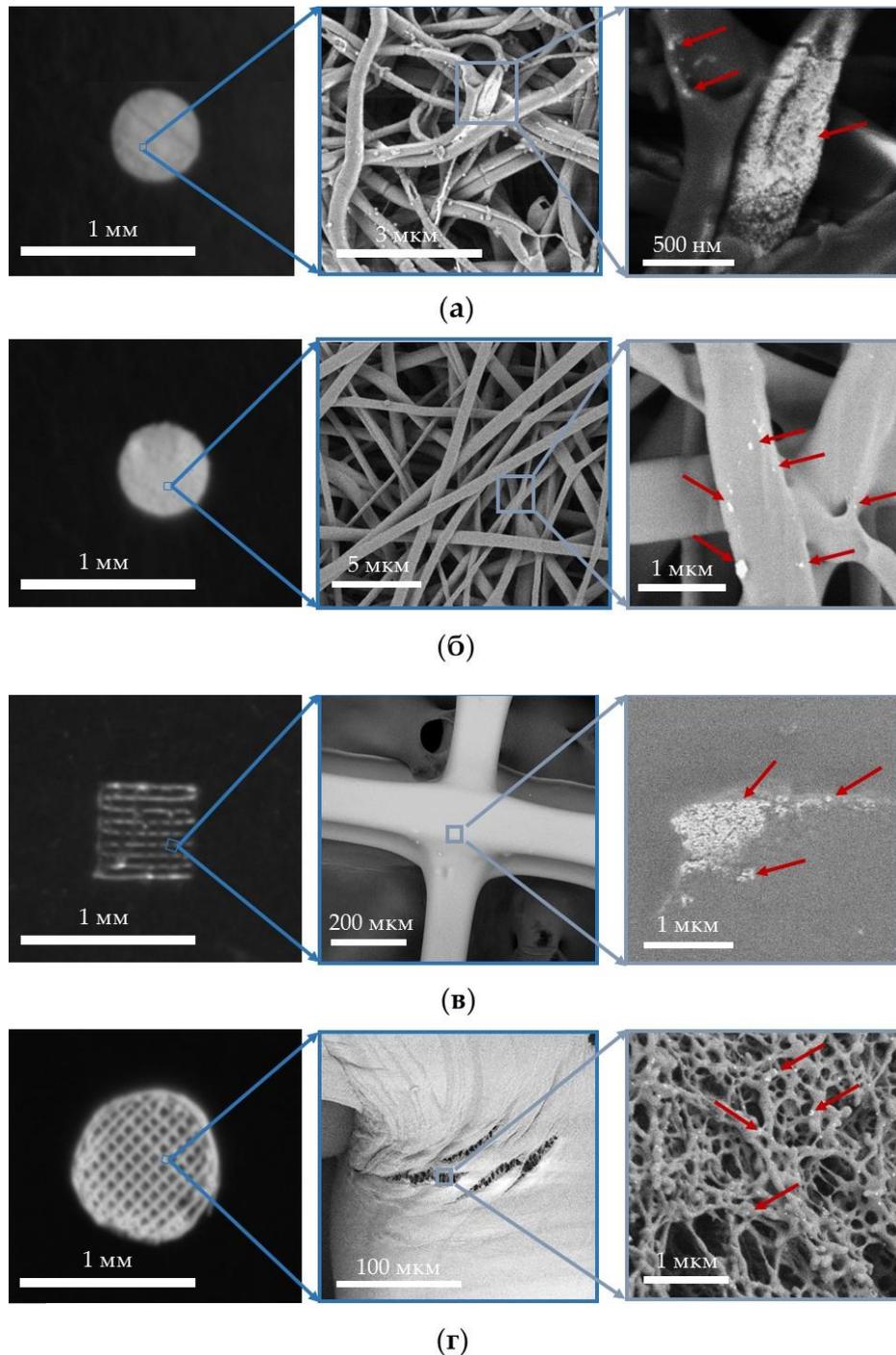


Рисунок 5.14 – СЭМ-изображение поверхности матриц при различном увеличении: ЭС КОЛ 1% (а); ЭС ПЛГ 1% (б); 3D ГМГК 1% (в); 3D ПЛГ 1% (г).

СЭМ-исследование поперечных срезов матриц (Рисунок 5.15) подтвердило, что НАФ были распределены равномерно и изолированы от внешней среды материалом полимера. Следовательно, инкапсулированные в матрикс наночастицы большей частью изолированы от внешней среды. Это подтвердили и результаты высвобождения НАФ из матрикса в водную среду.

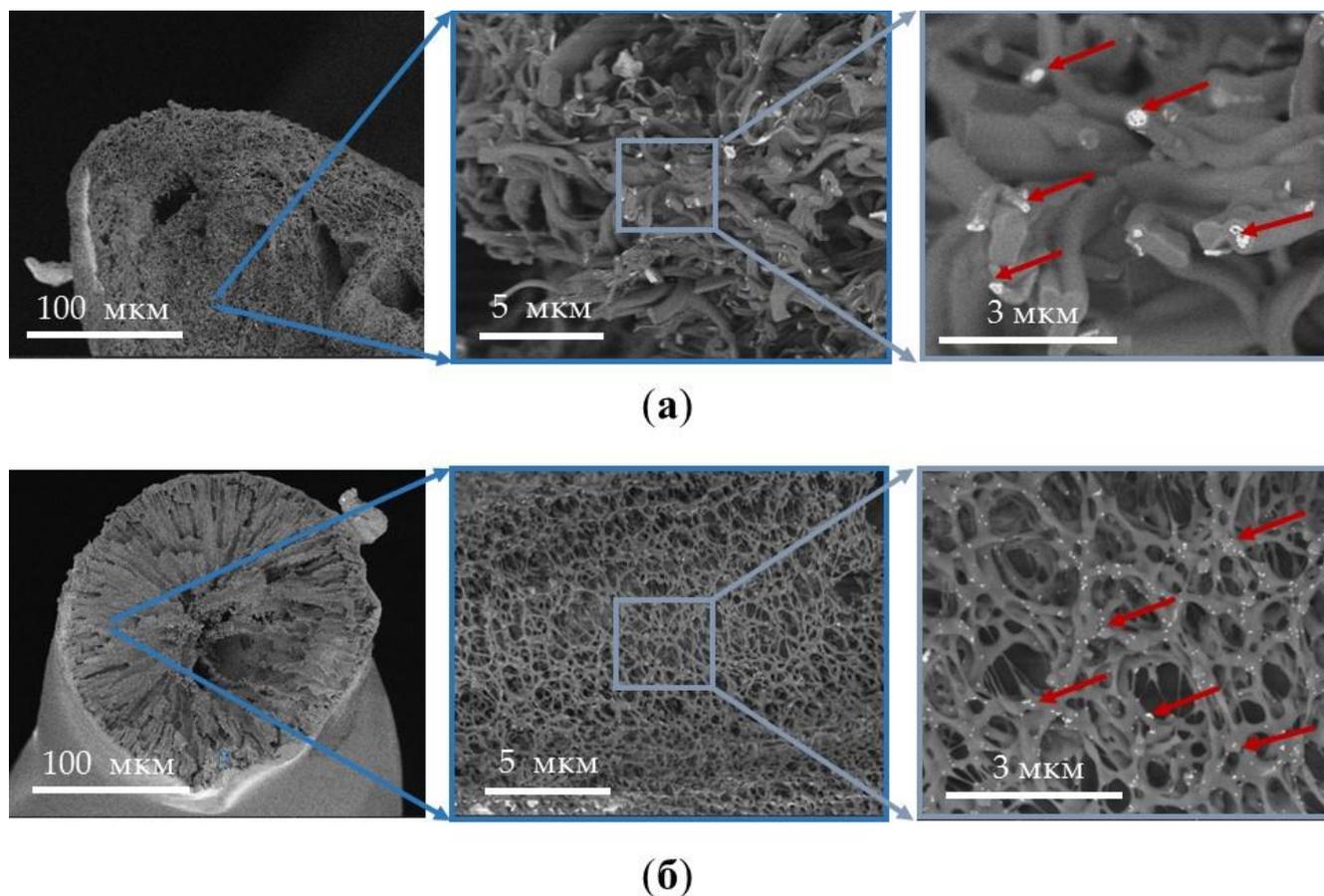


Рисунок 5.15 – СЭМ-изображение поперечных срезов матриц ЭС КОЛ 1% (а) и 3D ПЛГ 1% (б) при различном увеличении.

Дополнительно были проведены эксперименты с большей концентрацией НАФ. Для этого в исходный раствор для электроспиннинга коллагеновых матриц добавили 10% НАФ от массы полимера. В результате была обнаружена особенность: при увеличении концентрации НАФ в исходном растворе для электроспиннинга, можно получить полые волокна, устланные изнутри наночастицами (Рисунок 5.16). Это можно объяснить следующим образом. При испарении растворитель выходит из волокна через его стенки. Так как НАФ покрыты гидрофобной оболочкой из олеиновой кислоты, наночастицы стремятся прекратить контакт с полярным ГФИП, в результате чего тяготеют к центру волокна. Это явление в перспективе можно применять в создании концентрических волокон из двух различных полимеров без использования коаксиальных игл, в квантовой электронике и оптической технике.

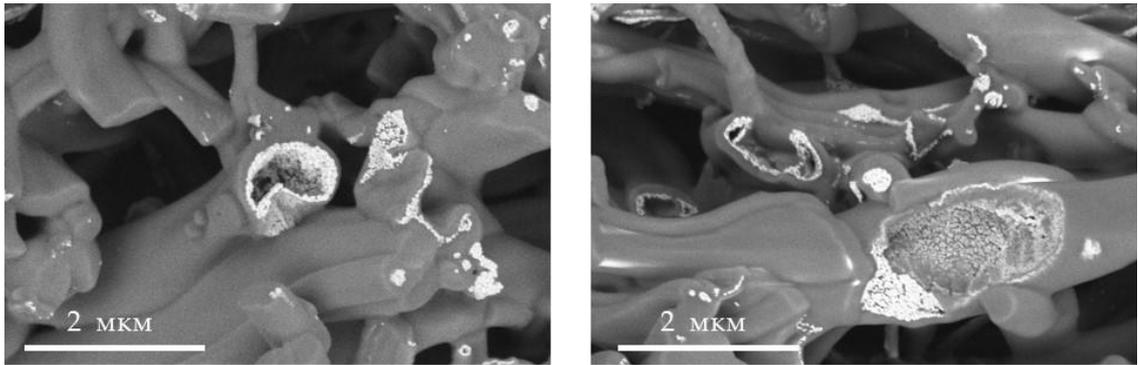


Рисунок 5.16 – СЭМ-изображения разных участков поперечного среза матрикса ЭС КОЛ 10%.

В Таблице 5.1 представлены значения времени жизни фотолюминесценции на разных длинах волн наночастиц и в матриксах. Время жизни фотолюминесценции наночастиц в коллагеновых матриксах меньше, чем у свободных наночастиц. НАФ в матриксах из коллагена и полилактогликолида имеют одинаковое время жизни фотолюминесценции. Однако наночастицы в образцах ГМГК имеют самое короткое время жизни.

Таблица 5.1. Время жизни фотолюминесценции наночастиц

Время жизни фотолюминесценции, мс						
Длина волны, нм	НАФ	НАФ в воде	НАФ в SP КОЛ	НАФ в SP ПЛГ	НАФ в 3D ПЛГ	НАФ в 3D ГМГК
409	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,13 ± 0,01
525	0,32 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,01
544	0,38 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,25 ± 0,02
658	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,25 ± 0,02

Для имитации процесса биodeградации матриксов, импрегнированных НАФ, *in vivo* проведен анализ их выхода из полимерных структур в водную среду. Показано, что спектр фотолюминесценции высвобожденных НАФ (экстракт ЭС КОЛ 1%) имеет более высокое соотношение R/G по сравнению со спектром фотолюминесценции НАФ внутри матрикса ЭС КОЛ 1% и аналогичен соотношению для НАФ в PBS (Рисунок 5.17). Увеличение отношения можно

объяснить взаимодействием НАФ с молекулами воды [195]. Взаимодействие ионов Er^{3+} с молекулами H_2O приводит не только к тушению фотолюминесценции, но и стимулирует безызлучательный переход ${}^4\text{I}_{13/2} \rightarrow {}^4\text{F}_{9/2}$, вызывающий усиление красного пика при 658 нм. Высвобожденные НАФ имели такое же соотношение R/G, как и свободные НАФ в воде, что позволяет отслеживать высвобождение *in vitro*. Изменение соотношения можно использовать для определения степени деградации матрикса внутри тела, чтобы указать на высвобождение НАФ из матрикса.

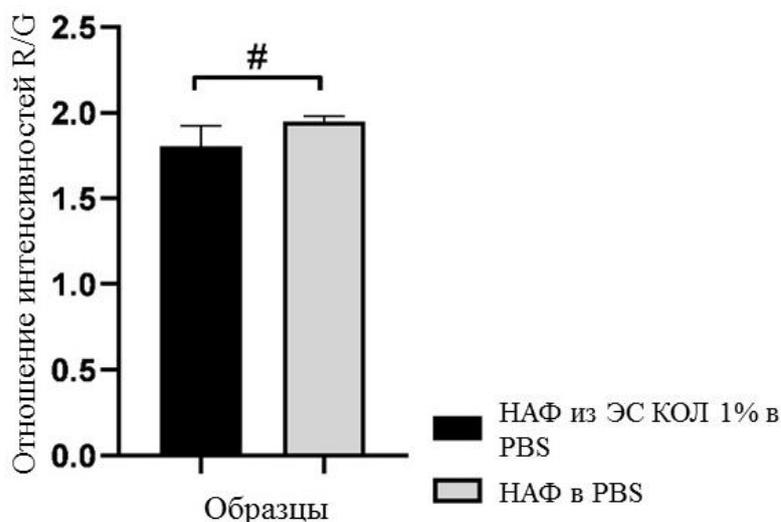


Рисунок 5.17 – Характеризация наночастиц ядро/оболочка $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ (NaYF_4) в водной среде: Отношение интенсивности «красного» пика на 658 нм к интенсивности «зеленого» пика на длине волны 544 нм свободных НАФ в PBS и НАФ, высвобожденных из матриксов ЭС КОЛ в PBS, # $p>0.05$ по критерию Стьюдента.

5.3.5. Клеточные испытания

Проведена оценка цитотоксичности полученных матриксов *in vitro* с использованием фибробластов Vj-5ta в экстракционном и контактном МТТ-тесте. Для анализа экстракта измерили цитотоксичность среды после 24-часового кондиционирования в присутствии матриксов, импрегнированных НАФ. Не обнаружено какой-либо значительной цитотоксичности матриксов, импрегнированных НАФ, в анализе экстракта по сравнению с чистым полимером

как для концентрации 0,1%, так и для 1% НАФ (Рисунок 5.18). Во втором эксперименте оценили количество клеток на 4-й и 8-й дни с помощью анализа МТТ, чтобы продемонстрировать рост клеток на поверхности матриксов. Выявлено, что количество клеток достоверно ($p < 0,05$ в U-критерии Манна-Уитни) увеличивалось при культивировании независимо от используемого материала и содержания НАФ (Рисунок 5.19). Импрегнированные НАФ не влияли на рост клеток, что подтверждало их биосовместимость *in vitro*.

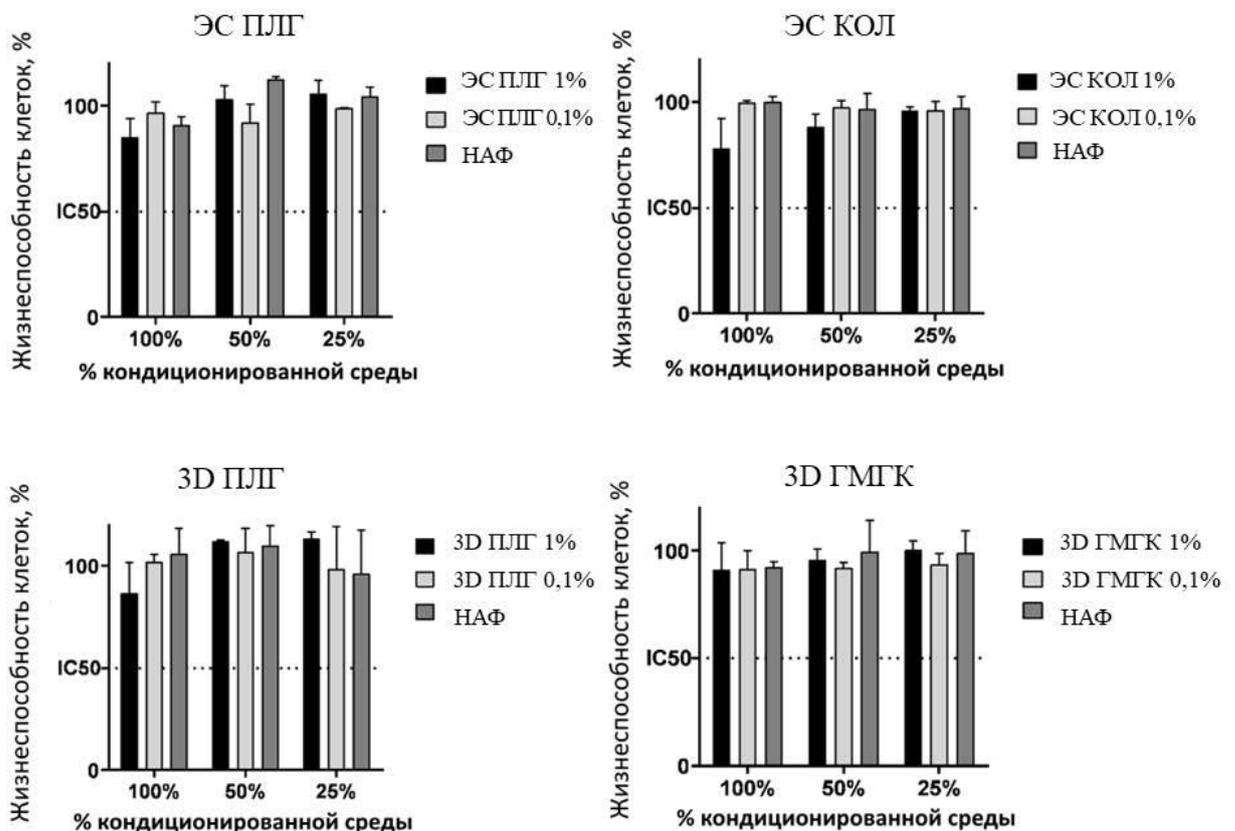


Рисунок 5.18 – Жизнеспособность фибробластов Vj-5ta в экстракте, инкубация 24 ч. Данные представляют собой среднее \pm стандартное отклонение, жизнеспособность необработанных (неповрежденных) клеток принимали за 100%.

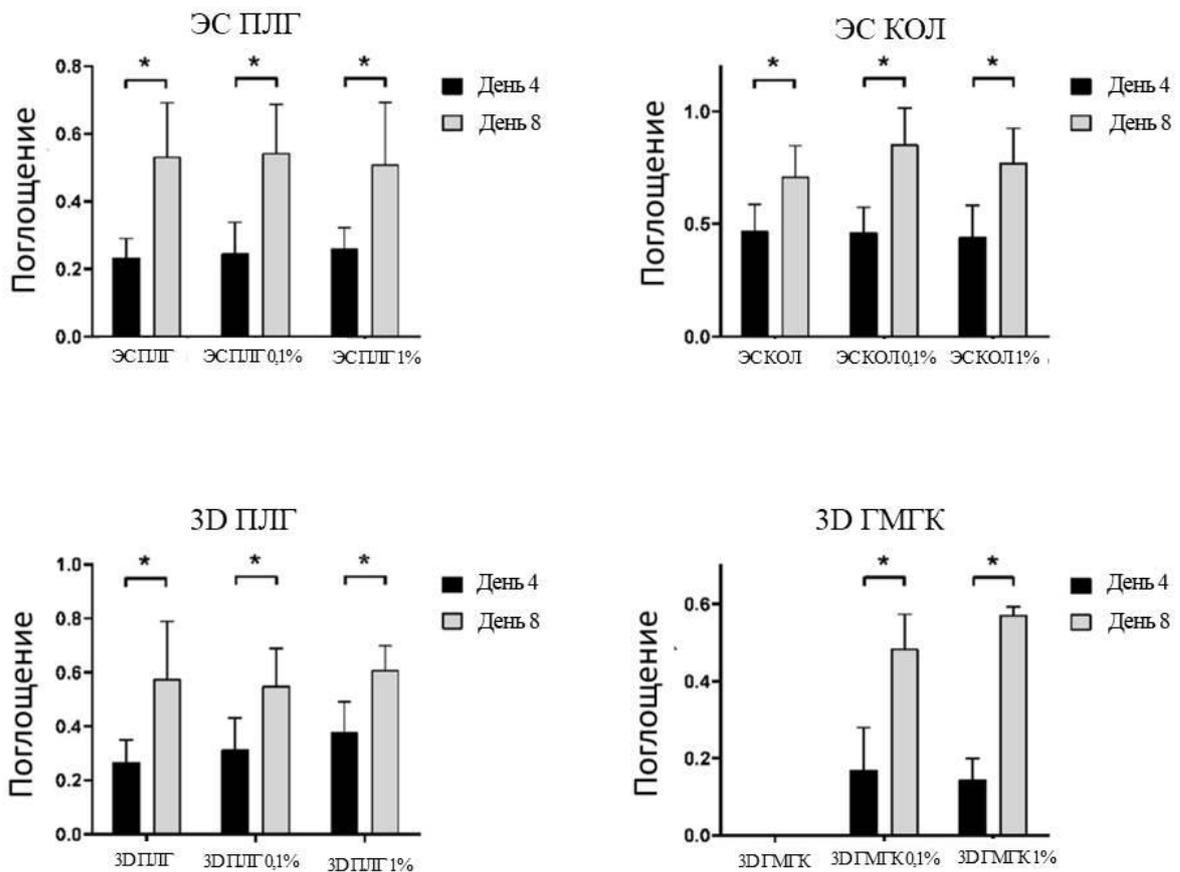


Рисунок 5.19 – Рост фибробластов Vj-5ta на матриксах, импрегнированных НАФ, 4 и 8 дней инкубации. Данные представляют собой среднее значение \pm среднеквадратичное отклонение, * $p < 0,05$ в U-критерии Манна-Уитни.

Колонизация поверхности матриц фибробластами в течение 8 дней инкубации была продемонстрирована с помощью конфокальной микроскопии (Рисунок 5.20). Яркое окрашивание Calcein AM подтвердило высокую жизнеспособность клеток; характер колонизации различался в зависимости от материала, использованного для создания матриц. Таким образом, обнаружено гомогенное распределение клеток для матриц на основе коллагена и ПЛГ, в то время как клеточные агрегаты были типичными для матриц 3D ГМГК. Существенных различий в распределении клеток для чистых полимеров и матриц, импрегнированных НАФ, не обнаружено [26].

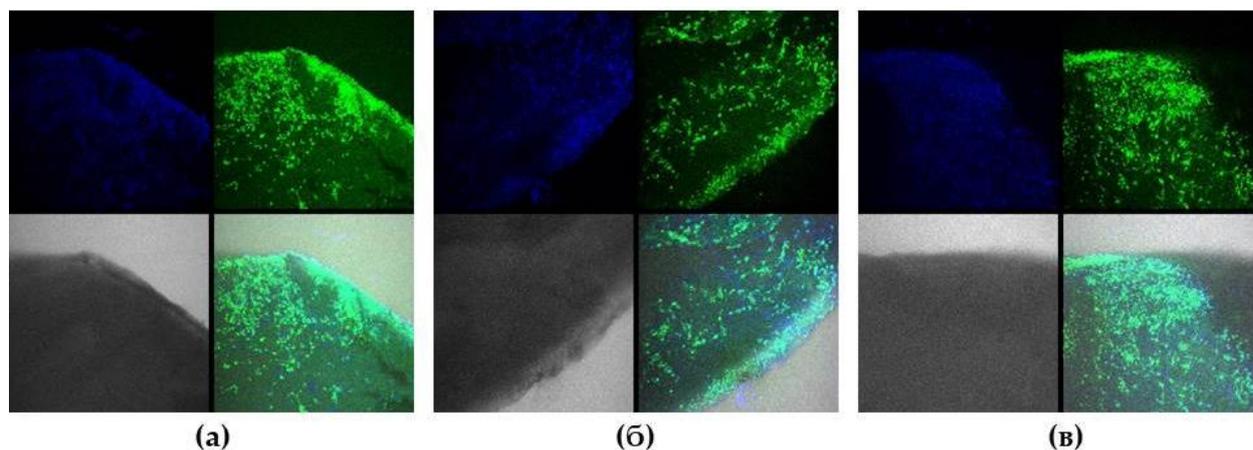


Рисунок 5.20 – Конфокальные изображения матрицков ЭС КОЛ (а), ЭС КОЛ 0,1% (б) и ЭС КОЛ 1% (в), культивированных с фибробластами Vj-5ta, инкубация 8 дней. Зеленый - для окрашивания Calcein AM (живые клетки), синий - для окрашивания Hoechst 33342 (клеточные ядра).

5.3.6. Исследования *in vivo*

Для исследований *in vivo* были выбраны матриксы с содержанием 1% НАФ, так как в предыдущих испытания они показали лучшие результаты в сравнение с матриксами, содержащими 0,1% НАФ. Фотолюминесцентный сигнал от полимерных матрицков измеряли в течение 14 дней после их подкожной имплантации самкам мышей BALB/c (Рисунок 5.21). Было обнаружено, что интенсивность фотолюминесценции всех образцов монотонно снижалась на протяжении всего эксперимента *in vivo* (Рисунок 5.22). Это снижение было наиболее заметно с первого по седьмой день эксперимента, что свидетельствует о постепенной деградации матрицков в тканях животных. На четвертые сутки эксперимента выявлена эрозия зоны фотолюминесценции, свидетельствующая о биодеградации матрикса, сопровождающейся выходом НАФ в окружающие ткани [196].

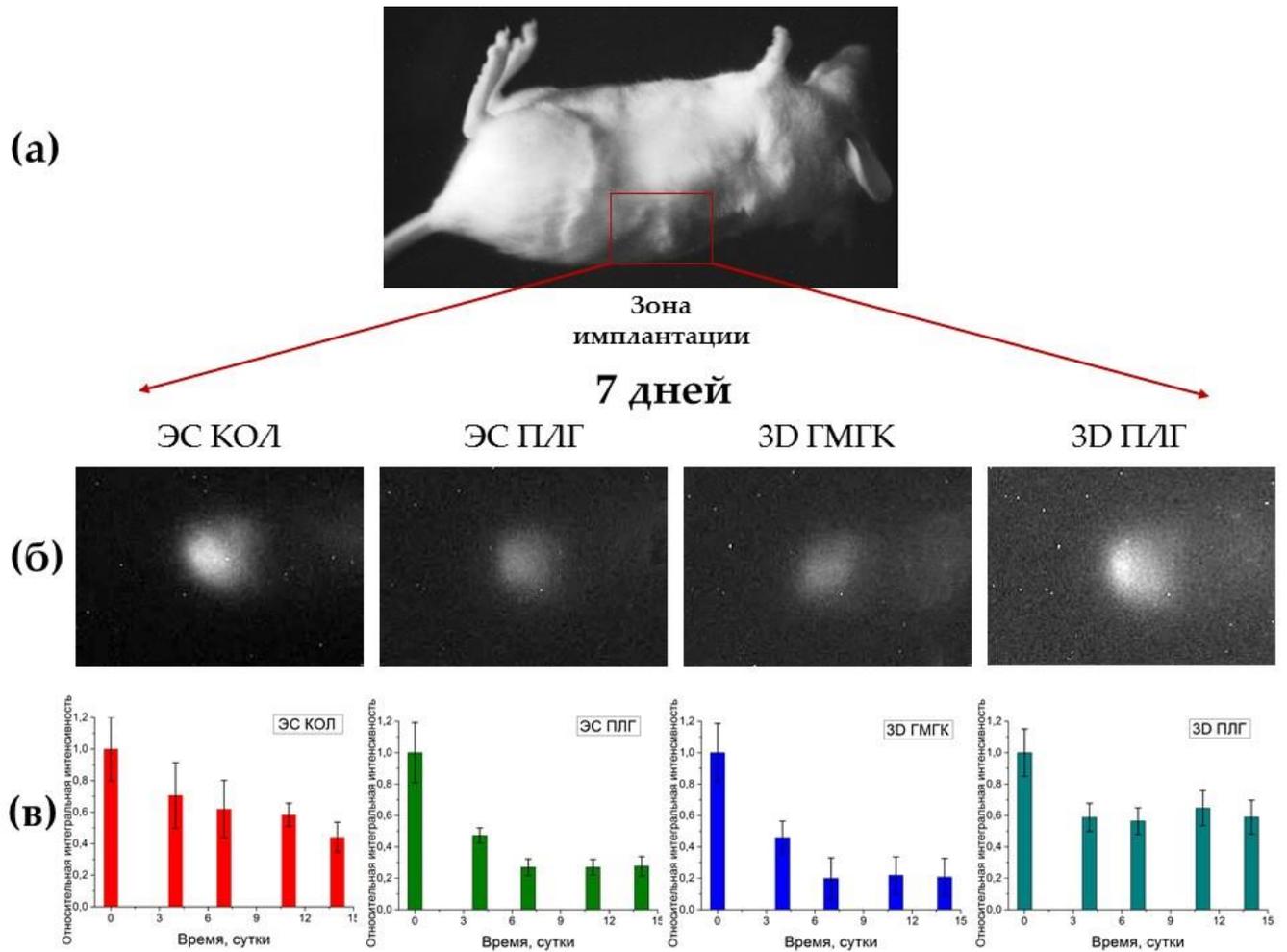


Рисунок 5.21 – Визуализация матриц: фотография животного, с демонстрацией зоны имплантации (а); фотолуминесцентные изображения подкожно имплантированных матриц при возбуждении лазером с длиной волны 975 нм (7-й день после имплантации) (б); гистограммы, показывающие уменьшение фотолуминесцентного сигнала во время эксперимента *in vivo* (в).

Вклад красной полосы фотолуминесценции на длине волны 658 нм в интегральную интенсивность НАФ определяли с помощью системы оптических фильтров. Интенсивность составила 85% от общего значения, и не было никаких существенных различий между матриксами.

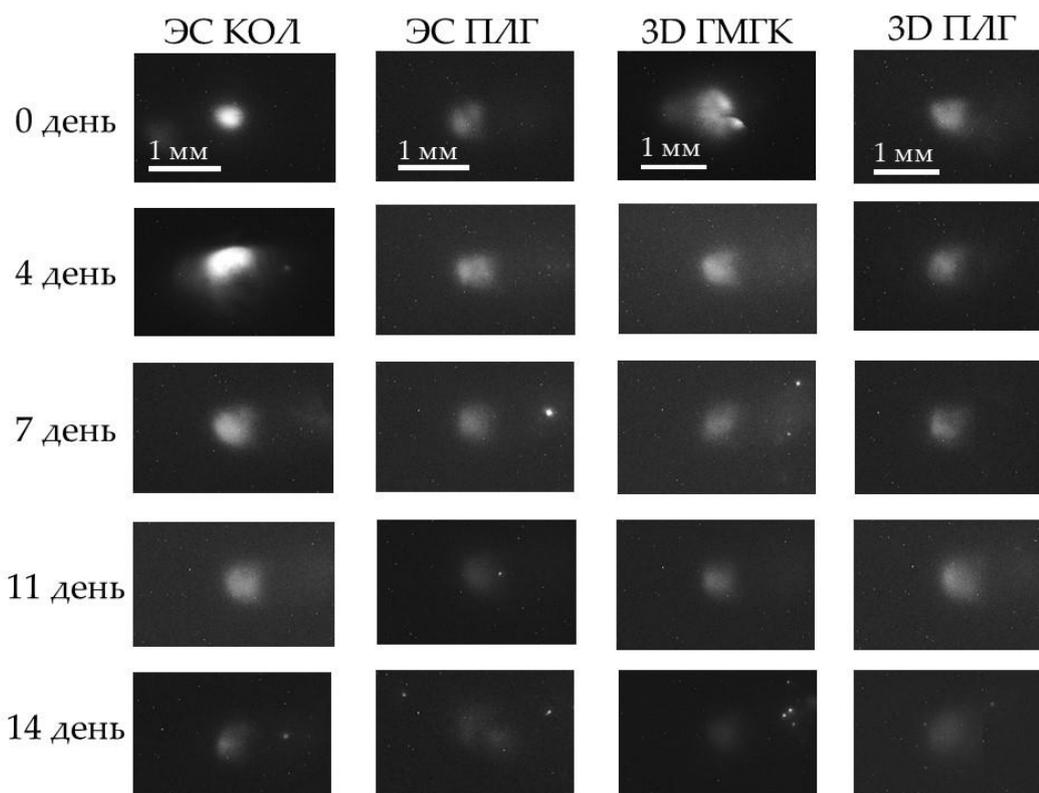


Рисунок 5.22 – Визуализация матриц. фотолюминесцентные изображения подкожно имплантированных матриц при возбуждении лазером с длиной волны 975 нм на первый, 4, 7, 11 и 14-й день эксперимента.

В целом интенсивность фотолюминесценции НАФ, инкапсулированных в имплантированные матрицы, со временем снижалась. В то же время матрицы ЭС КОЛ и 3D ПЛГ оказались наиболее стабильными, так как интенсивность фотолюминесценции инкапсулированных наночастиц снижалась медленнее, чем в других образцах. Образцы ЭС ПЛГ и 3D ГМГК оказались наименее стабильными, так как интенсивность фотолюминесценции резко снижается после первой недели эксперимента.

5.3.7. Гистологическое исследование

Через 14 дней после имплантации матрикса мышей выводили из эксперимента для гистологического анализа (Рисунок 5.23). Материал матрикса обнаружили на каждом окрашенном срезе и исследовали ткань в непосредственной близости от имплантата. Группы характеризовались наличием молодой

грануляционной ткани с полноценными кровеносными сосудами и воспалительными клетками в зоне имплантации.

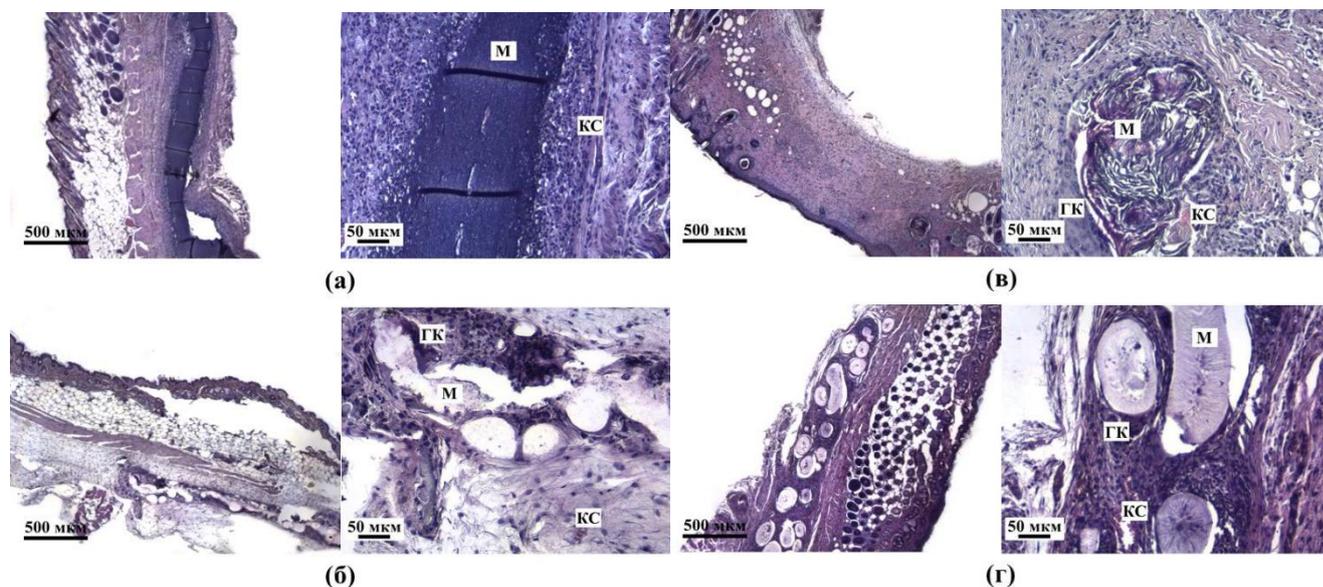


Рисунок 5.23 – Гистологический срез фрагментов тканей с матриксами ЭС КОЛ 1% (а); ЭС ПЛГ 1% (б); 3D ГМГК 1% (в); 3D ПЛГ 1% (г).

Коллагеновые матрицы вызывали умеренную воспалительную реакцию, характеризующуюся наличием большого количества сегментоядерных лейкоцитов в окружающих тканях. Это может быть вызвано остаточным сшивающим агентом в образцах коллагена. Кровеносные сосуды концентрировались на периферии матрикса ЭС КОЛ, способствуя усилению лейкоцитарной инфильтрации, что, в свою очередь, тормозило процессы резорбции материала и могло вызывать снижение интенсивности фотолуминесценции интеркалированных изначально внедренных НАФ. При исследовании фрагментов тканей с имплантированными матриксами из ПЛГ (как ЭС, так и 3D) наблюдалось двукратное снижение количества воспалительных клеток по сравнению с ЭС КОЛ, что свидетельствует о том, что методы изготовления матриц из ПЛГ обеспечивают биосовместимость имплантатов *in vivo*. Матрицы ЭС ПЛГ были окружены гигантскими клетками инородных тел (4-кратное увеличение по сравнению с ЭС КОЛ) и подверглись интенсивному процессу биоразложения (Рисунок 5.23б). Не было статистически значимых различий в иммунном ответе между матриксами 3D

и ЭС ПЛГ. Это можно объяснить их идентичным химическим составом, однако различие в форме этих двух типов матриксов сказалось еще на одном параметре. Пористые матриксы из ПЛГ, напечатанные на 3D-принтере, способствовали ангиогенезу и способствовали более эффективной инвазии сосудов в толщу соединительной ткани в отличие от ЭС ПЛГ (7-кратное увеличение по сравнению с ЭС ПЛГ, Рисунок 5.24в). Кроме того, наблюдалась активная клеточная инфильтрация микропор 3D-печатного волокна, что свидетельствует о его исключительной биосовместимости. Исследование биоптатов также выявило уменьшение диаметра матриксов ЭС ПЛГ и ЭС КОЛ с 4 до 2 мм. Диаметр матриксов 3D ПЛГ уменьшился с 6 мм до 3 мм. Матриксы на основе ГМГК практически полностью деградировали на 14-й день после имплантации и, по-видимому, не оказывали токсического действия (менее 200 клеток на 1 мм² ткани) на ткань, так как она характеризовалась незначительным количеством воспалительных клеток (Рисунок 5.24б) [196].

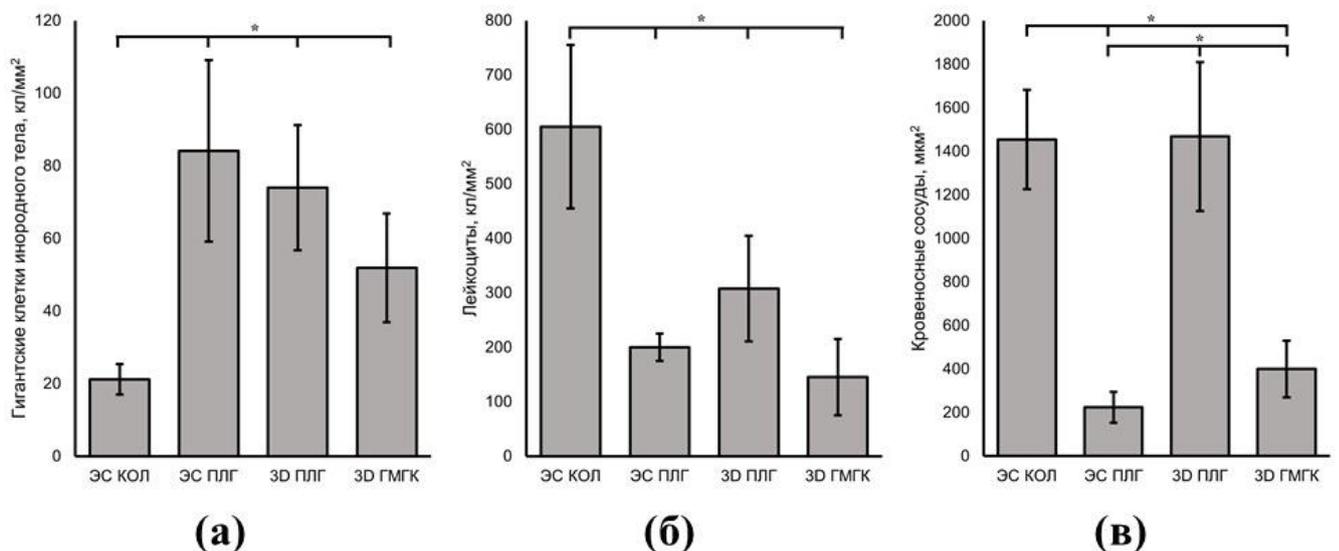


Рисунок 5.24 – Биосовместимость матриксов *in vivo*: (а) — гигантские клетки инородного тела на 1 мм²; (б) – воспалительных клеток на 1 мм²; (в) — зона васкуляризации, * $p < 0,05$.

Результаты, представленные на рисунках 5.21, 5.22, 5.23 и 5.24, показывают корреляцию между фотолюминесцентным и гистологическими анализами.

Матриксy ЭС КОЛ и 3D ПЛГ сохранили свою структуру (Рисунок 5.24а, с), что подтверждается 50% снижением интенсивности фотолюминесценции на 14-й день эксперимента. При гистологическом анализе были обнаружены только фрагменты матриксов ЭС ПЛГ и 3D ГМГК. Интенсивность их фотолюминесценции была примерно на 50% ниже, чем у образцов ЭС КОЛ и 3D ПЛГ в последний день эксперимента.

Выводы к главе 5

1. Сформированы матриксy из синтетических (ПЛГ) и природных (КОЛ и ГМГК) полимеров, импрегнированные НАФ, с использованием ряда методов изготовления. Разработан процесс химической стабилизации структуры и механических характеристик коллагеновых матриксов.

2. Проанализированы оптические фотолюминесцентные свойства матриксов, импрегнированных НАФ. Эти матриксy визуализировались с высоким оптическим контрастом при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 976 нм.

3. Обнаружено, что спектр НАФ, импрегнированных в матриксy, отличался от спектра интактных наночастиц, однако это не мешало их визуализации. Также спектры наночастиц чувствительны к их микроокружению, в основном в зависимости от типа используемого полимера.

4. Высвобождение НАФ из матрикса в окружающую среду вызывает изменения соотношения интенсивностей «красного» на длине волны 658 нм и «зеленого» на длине волны 544 нм пиков фотолюминесценции, что позволяет отслеживать деградацию матрикса в режиме реального времени.

5. Разработанные матриксy, импрегнированные НАФ, не цитотоксичны и обеспечивали поверхность для прикрепления, пролиферации и колонизации клеток, необходимых для восстановления тканей.

6. На модели подкожной имплантации самкам мышей линии BALB/c проведен анализ биосовместимости полимерных матриксов, а также изменений их спектров фотолюминесценции *in vivo* на протяжении 14 дней. Результаты этих

экспериментов продемонстрировали наличие умеренной воспалительной реакции, окружающих имплантированные образцы тканей, а также монотонное снижение интегральной интенсивности фотолюминесценции матриц, свидетельствующее об их постепенной биодеградации.

7. Таким образом, продемонстрирована жизнеспособность разработанного подхода к изготовлению «умных матриц» на основе биорезорбируемых полимерных структур, импрегнированных НАФ, обеспечивающих необходимые фотолюминесцентные, биохимические и механические свойства для прижизненной визуализации и мониторинга их поведения.

Заключение

Одной из критически важных задач современного биоимиджинга является поиск и разработка нетоксичных наночастиц, обладающих достаточно высокими коэффициентами конверсии возбуждающего их излучения в фотолюминесценцию в требуемые спектральные диапазоны, а также временами жизни этой фотолюминесценции. Это необходимо для успешного развития передовых подходов и методологии неинвазивной прижизненной визуализации биологических объектов внутри организма человека и животных. Такие наночастицы, с одной стороны, могут легко проникать в живые клетки и ткани, а с другой – обеспечивать высококонтрастное изображение содержащих их структур различными методами фотолюминесцентной визуализации.

В настоящей работе изучены оптические характеристики фантомов, имитирующих свойства биологических тканей, с использованием как рассеивающей, так и поглощающей модельных сред. Исследован процесс преобразования спектра фотолюминесценции апконвертирующих наночастиц при прохождении их излучения через эти фантомы.

Разработанные и исследованные биосовместимые структуры на основе полимеров природного и синтетического происхождения, по сути, представляют собой компоненты элементной базы для создания так называемых “умных матриц” (smart scaffolds), обеспечивающие требуемые фотолюминесцентные, биохимические и механические свойства для прижизненной визуализации и мониторинга взаимодействия имплантированных ТИК с живыми тканями в реальном масштабе времени. Экспериментально показано наличие лишь умеренной воспалительной реакции тканей, окружающих фотолюминесцентные матрицы, импрегнированные НАФ, при их имплантации, а также монотонное снижение интегральной интенсивности фотолюминесценции самих матриц со временем, отражающее процессы их биodeградации и постепенного высвобождения из них инкапсулированных наночастиц.

Показано, что исследованные апконвертирующие нанофосфоры, обладающие уникальными оптическими свойствами, могут быть использованы в

качестве мультимодальных фотолюминесцентных наномаркеров в видимом и ближнем ИК диапазонах спектра. Наночастицы, имеющие интенсивные линии фотолюминесценции в разных областях спектра, дают возможность использования различных методов оптической диагностики, оптимизируя их для решения конкретных исследовательских задач.

Полученные данные и экспериментальные результаты могут быть использованы в дальнейшем как для разработки новых подходов к визуализации и диагностике разнообразных тканеинженерных конструкций, так и для мониторинга происходящих с ними процессов *in vivo* в реальном масштабе времени.

Перечень условных обозначений и сокращений

3D – трехмерная

ГК – гиалуроновая кислота

ГМГК – глицидил метакрилата гиалуроновой кислоты

ГФИП – 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол

ДГЭБ – диглицидивый эфир 1,4-бутанодиола

ДМСО – диметилсульфоксид

ИК – инфракрасный

КК – коэффициент конверсии

КОЛ – коллаген

КС – красное стекло

КТ – квантовые точки

МСК – мультипотентные стволовые клетки

МТТ-тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

НАФ – наноразмерные апконвертирующие фосфоры

НУ – нормальные условия

ОПБ – окно прозрачности биотканей

ПЛГ – полилактогликолид

ПММА – полиметилметакрилат

ПЭГДА – полиэтиленгликоль диакрилата

ПЭМ – просвечивающий электронный микроскоп

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

ТИК – тканеинженерная конструкция

УФ – ультрафиолетовый

ФД – фотодиод

ФПК – фотополимеризуемая композиция

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

ХЧ – химически чистый

ЭС – электроспиннинг

DMEM – базальная среда для поддержания роста клеток (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

R/G – отношение интенсивностей «красного» пика фотолюминесценции на длине волны 658 нм (R) к «зеленому» на длине волны 544 нм (G)

SWIR – коротковолновый инфракрасный диапазон

PBS – фосфатно-соляной буферный раствор

Благодарности

Автор выражает большую благодарность своему научному руководителю Попову В.К. за постановку задачи, организацию работы, активную помощь в проведении научных экспериментов, продуктивное обсуждение результатов и координацию научной деятельности.

Автор также благодарен Кошелеву А.В., Каримову Д.Н. и Николаевой М.Е., за предоставление апконвертирующих нанофосфоров, Хайдукову Е.В., Крылову И.В., Хворостиной М.А., Мариянац А.О., Сочилиной А.В., Акасову Р.А., Свиридову А.П., Бабаевой Г., Атановой А.В. и другим сотрудникам ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН за помощь в работе и обсуждении полученных результатов.

Диссертационная работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-32-90218, «Аспиранты»).

Список литературы:

1. Sochilina A. V. Nanohybrid scaffolds with luminescent remote control / Sochilina A. V., Savelyev A.G., Sholina N. V., Karimov D.N., Nechaev A. V., Khaydukov E. V., Generalova A.N. // EPJ Web of Conferences – 2018. – Т. 190 – C.04022.
2. Zhou J. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging / Zhou J., Liu Z., Li F. // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Т. 41 – № 3 – C.1323–1349.
3. Park Y. II Nonblinking and nonbleaching upconverting nanoparticles as an optical imaging nanoprobe and T1 magnetic resonance imaging contrast agent / Park Y. II, Kim J.H., Lee K.T., Jeon K.S., Na H. Bin, Yu J.H., Kim H.M., Lee N., Choi S.H., Baik S. II, Kim H., Park S.P., Park B.J., Kim Y.W., Lee S.H., Yoon S.Y., Song I.C., Moon W.K., Suh Y.D., Hyeon T. // Advanced Materials – 2009. – Т. 21 – № 44 – C.4467–4471.
4. Park Y. II Upconverting nanoparticles: a versatile platform for wide-field two-photon microscopy and multi-modal in vivo imaging / Park Y. II, Lee K.T., Suh Y.D., Hyeon T. // Chemical Society Reviews – 2015. – Т. 44 – № 6 – C.1302–1317.
5. Hemmer E. Upconverting and NIR emitting rare earth based nanostructures for NIR-bioimaging / Hemmer E., Venkatachalam N., Hyodo H., Hattori A., Ebina Y., Kishimoto H., Soga K. // Nanoscale – 2013. – Т. 5 – № 23 – C.11339.
6. Zhong Y. A mini-review on rare-earth down-conversion nanoparticles for NIR-II imaging of biological systems / Zhong Y., Dai H. // Nano Research – 2020. – Т. 13 – № 5 – C.1281–1294.
7. Nam S.Y. Imaging strategies for tissue engineering applications / Nam S.Y., Ricles L.M., Suggs L.J., Emelianov S.Y. // Tissue Engineering - Part B: Reviews – 2015. – Т. 21 – № 1 – C.88–102.
8. Shi X. Optical visualization and imaging of nanomaterials / Shi X., Zhao S., Wang F., Jiang Q., Zhan C., Li R., Zhang R. // Nanoscale Advances – 2021. – Т. 3 – № 4 – C.889–903.

9. In vivo optical imaging of brain function // под ред. R.D. Frostig. – – Boca Raton, Fl: CRC Press, 2019. Вып. 2nd– 428с.
10. Wang Y.W. Multiplexed optical imaging of tumor-directed nanoparticles: a review of imaging systems and approaches / Wang Y.W., Reder N.P., Kang S., Glaser A.K., Liu J.T.C. // *Nanotheranostics* – 2017. – Т. 1 – № 4 – С.369–388.
11. Moroni L. Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds / Moroni L., Wijn J.R. de, Blitterswijk C.A. van // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* – 2008. – Т. 19 – № 5 – С.543–572.
12. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage / Hutmacher D.W. // *Biomaterials* – 2000. – Т. 21 – № 24 – С.2529–2543.
13. Ahadian S. Smart scaffolds in tissue regeneration / Ahadian S., Khademhosseini A. // *Regenerative Biomaterials* – 2018. – Т. 5 – № 3 – С.125–128.
14. Sochilina A.V. Controlled modification of hyaluronic acid for photoinduced reactions in tissue engineering. / Sochilina A.V., Savelyev A.G., Demina P.A., Ierusalimsky N.V., Khochenkov D.A., Akasov R.A., Sholina N.V., Khaydukov E.V., Generalova A.N. // *Journal of Physics: Conference Series* – 2018. – Т. 1124 – № 3 – С.031014.
15. Feng G. Multifunctional conjugated polymer nanoparticles for image-guided photodynamic and photothermal therapy / Feng G., Fang Y., Liu J., Geng J., Ding D., Liu B. // *Small* – 2017. – Т. 13 – № 3 – С.1602807.
16. Khademi S. Folic acid-cysteamine modified gold nanoparticle as a nanoprobe for targeted computed tomography imaging of cancer cells / Khademi S., Sarkar S., Shakeri-Zadeh A., Attaran N., Kharrazi S., Ay M.R., Ghadiri H. // *Materials Science and Engineering: C* – 2018. – Т. 89 – № August 2017 – С.182–193.
17. Zhou Z. Structure-relaxivity relationships of magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging / Zhou Z., Yang L., Gao J., Chen X. // *Advanced Materials* – 2019. – Т. 31 – № 8 – С.1804567.

18. Nurrohman D.T. A review of graphene-based surface plasmon resonance and surface-enhanced raman scattering biosensors: current status and future prospects / Nurrohman D.T., Chiu N.-F. // *Nanomaterials* – 2021. – T. 11 – № 1 – C.216.

19. Ma J. Precision improvement in dark-field microscopy imaging by using gold nanoparticles as an internal reference: a combined theoretical and experimental study / Ma J., Liu Y., Gao P.F., Zou H.Y., Huang C.Z. // *Nanoscale* – 2016. – T. 8 – № 16 – C.8729–8736.

20. Liu Q. Strong two-photon-induced fluorescence from photostable, biocompatible nitrogen-doped graphene quantum dots for cellular and deep-tissue imaging / Liu Q., Guo B., Rao Z., Zhang B., Gong J.R. // *Nano Letters* – 2013. – T. 13 – № 6 – C.2436–2441.

21. Li W. Gold nanoparticles for photoacoustic imaging / Li W., Chen X. // *Nanomedicine* – 2015. – T. 10 – № 2 – C.299–320.

22. Kim H. A rhodamine scaffold immobilized onto mesoporous silica as a fluorescent probe for the detection of Fe (III) and applications in bio-imaging and microfluidic chips / Kim H., Rao B.A., Jeong J., Angupillai S., Choi J.S., Nam J.-O., Lee C.-S., Son Y.-A. // *Sensors and Actuators B: Chemical* – 2016. – T. 224 – № Iii – C.404-412.

23. Tian R. Development of chromenoquinoline-fused coumarin dyes and their application in bioimaging / Tian R., Ren X., Niu P., Yang L., Sun A., Li Y., Liu X., Wei L. // *Dyes and Pigments* – 2022. – T. 205 – № June – C.110530.

24. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors / Hardman R. // *Environmental Health Perspectives* – 2006. – T. 114 – № 2 – C.165–172.

25. Generalova A.N. PEG-modified upconversion nanoparticles for in vivo optical imaging of tumors / Generalova A.N., Rocheva V. V., Nechaev A. V., Khochenkov D.A., Sholina N. V., Semchishen V.A., Zubov V.P., Koroleva A. V., Chichkov B.N.,

Khaydukov E. V. // RSC Advances – 2016. – T. 6 – № 36 – C.30089–30097.

26. Trifanova E.M. Natural and synthetic polymer scaffolds comprising upconversion nanoparticles as a bioimaging platform for tissue engineering / Trifanova E.M., Khvorostina M.A., Mariyanats A.O., Sochilina A. V, Nikolaeva M.E., Khaydukov E. V, Akasov R.A., Popov V.K. // *Molecules* – 2022. – T. 27 – № 19 – C.6547.

27. Yang Y. Optically active nanomaterials for bioimaging and targeted therapy / Yang Y., Wang L., Wan B., Gu Y., Li X. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* – 2019. – T. 7.

28. Peng H.-S. Soft fluorescent nanomaterials for biological and biomedical imaging / Peng H.-S., Chiu D.T. // *Chemical Society Reviews* – 2015. – T. 44 – № 14 – C.4699–4722.

29. Liang R. Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics / Liang R., Wei M., Evans D.G., Duan X. // *Chemical Communications* – 2014. – T. 50 – № 91 – C.14071–14081.

30. Gopika G.S. Chemistry of cyanine dyes-A review / Gopika G.S., Prasad P.M.H., Lekshmi A.G., Lekshmypriya S., Sreesaila S., Arunima C., Kumar M.S., Anil A., Sreekumar A., Pillai Z.S. // *Materials Today: Proceedings* – 2021. – T. 46 – C.3102–3108.

31. Gorka A.P. Harnessing cyanine reactivity for optical imaging and drug delivery / Gorka A.P., Nani R.R., Schnermann M.J. // *Accounts of Chemical Research* – 2018. – T. 51 – № 12 – C.3226–3235.

32. Bandi V.G. Targeted multicolor in vivo imaging over 1,000 nm enabled by nonamethine cyanines / Bandi V.G., Luciano M.P., Saccomano M., Patel N.L., Bischof T.S., Lingg J.G.P., Tsrunchev P.T., Nix M.N., Ruehle B., Sanders C., Riffle L., Robinson C.M., Difilippantonio S., Kalen J.D., Resch-Genger U., Ivanic J., Bruns O.T., Schnermann M.J. // *Nature Methods* – 2022. – T. 19 – № 3 – C.353–358.

33. Pan G.-Y. Dual channel activatable cyanine dye for mitochondrial imaging and

mitochondria-targeted cancer theranostics / Pan G.-Y., Jia H.-R., Zhu Y.-X., Wang R.-H., Wu F.-G., Chen Z. // ACS Biomaterials Science & Engineering – 2017. – T. 3 – № 12 – C.3596–3606.

34. Srikar R. Polymeric nanoparticles for molecular imaging / Srikar R., Upendran A., Kannan R. // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology – 2014. – T. 6 – № 3 – C.245–267.

35. Yang K. In vitro and in vivo near-infrared photothermal therapy of cancer using polypyrrole organic nanoparticles / Yang K., Xu H., Cheng L., Sun C., Wang J., Liu Z. // Advanced Materials – 2012. – T. 24 – № 41 – C.5586–5592.

36. Zielińska A. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology / Zielińska A., Carreiró F., Oliveira A.M., Neves A., Pires B., Venkatesh D.N., Durazzo A., Lucarini M., Eder P., Silva A.M., Santini A., Souto E.B. // Molecules – 2020. – T. 25 – № 16 – C.3731.

37. Elahi N. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review / Elahi N., Kamali M., Baghersad M.H. // Talanta – 2018. – T. 184 – C.537–556.

38. Wu Y. Gold nanoparticles in biological optical imaging / Wu Y., Ali M.R.K., Chen K., Fang N., El-Sayed M.A. // Nano Today – 2019. – T. 24 – C.120–140.

39. Singh P. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer / Singh P., Pandit S., Mokkapati V.R.S.S., Garg A., Ravikumar V., Mijakovic I. // International Journal of Molecular Sciences – 2018. – T. 19 – № 7.

40. Sulaiman G.M. Hesperidin loaded on gold nanoparticles as a drug delivery system for a successful biocompatible, anti-cancer, anti-inflammatory and phagocytosis inducer model / Sulaiman G.M., Waheeb H.M., Jabir M.S., Khazaal S.H., Dewir Y.H., Naidoo Y. // Scientific Reports – 2020. – T. 10 – № 1 – C.9362.

41. Schwartzberg A.M. Unique gold nanoparticle aggregates as a highly active surface-enhanced raman scattering substrate / Schwartzberg A.M., Grant C.D., Wolcott A., Talley C.E., Huser T.R., Bogomolni R., Zhang J.Z. // The Journal of Physical

Chemistry B – 2004. – T. 108 – № 50 – C.19191–19197.

42. Sehit E. Ultrasensitive nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on gold nanoparticles and molecularly imprinted polymers / Sehit E., Drzazgowska J., Buchenau D., Yesildag C., Lensen M., Altintas Z. // *Biosensors and Bioelectronics* – 2020. – T. 165 – C.112432.

43. Boisselier E. How to very efficiently functionalize gold nanoparticles by “click” chemistry / Boisselier E., Salmon L., Ruiz J., Astruc D. // *Chemical Communications* – 2008. – № 44 – C.5788.

44. Debouttière P.-J. Design of gold nanoparticles for magnetic resonance imaging / Debouttière P.-J., Roux S., Vocanson F., Billotey C., Beuf O., Favre-Réguillon A., Lin Y., Pellet-Rostaing S., Lamartine R., Perriat P., Tillement O. // *Advanced Functional Materials* – 2006. – T. 16 – № 18 – C.2330–2339.

45. Sani A. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review / Sani A., Cao C., Cui D. // *Biochemistry and Biophysics Reports* – 2021. – T. 26 – C.100991.

46. Lin J. Graphene-based nanomaterials for bioimaging / Lin J., Chen X., Huang P. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2016. – T. 105 – C.242–254.

47. Yoo J.M. Graphene-based nanomaterials for versatile imaging studies / Yoo J.M., Kang J.H., Hong B.H. // *Chemical Society Reviews* – 2015. – T. 44 – № 14 – C.4835–4852.

48. Alegret N. Recent advances of graphene-based hybrids with magnetic nanoparticles for biomedical applications / Alegret N., Criado A., Prato M. // *Current Medicinal Chemistry* – 2017. – T. 24 – № 5 – C.529–536.

49. Li Z. Graphene oxide/Ag nanoparticles cooperated with simvastatin as a high sensitive x-ray computed tomography imaging agent for diagnosis of renal dysfunctions / Li Z., Tian L., Liu J., Qi W., Wu Q., Wang H., Ali M.C., Wu W., Qiu H. // *Advanced Healthcare Materials* – 2017. – T. 6 – № 18 – C.1700413.

50. Tsoi K.M. Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies / Tsoi K.M., Dai Q., Alman B.A., Chan W.C.W. // *Accounts of Chemical Research* – 2013. – T. 46 – № 3 – C.662–671.

51. Bilan R. Quantum Dot Surface Chemistry and Functionalization for Cell Targeting and Imaging / Bilan R., Fleury F., Nabiev I., Sukhanova A. // *Bioconjugate Chemistry* – 2015. – T. 26 – № 4 – C.609–624.

52. Osipovich V.S. Photostability of CdSe-based nanocrystalline structures used to visualize biological tissues / V. S. Osipovich, K. D. Yashin, T. I. Terpinskaya, G. K. Zhavnerko, E. B. Chubenko, V. S. Petrovich, E. A. Petrova – , 2013.

53. Pacheco-Liñán P.J. Functionalized CdSe/ZnS quantum dots for intracellular pH measurements by fluorescence lifetime imaging microscopy / Pacheco-Liñán P.J., Bravo I., Nueda M.L., Albaladejo J., Garzón-Ruiz A. // *ACS Sensors* – 2020. – T. 5 – № 7 – C.2106–2117.

54. Lei G. In situ preparation of amphibious ZnO quantum dots with blue fluorescence based on hyperbranched polymers and their application in bio-imaging / Lei G., Yang S., Cao R., Zhou P., Peng H., Peng R., Zhang X., Yang Y., Li Y., Wang M., He Y., Zhou L., Du J., Du W., Shi Y., Wu H. // *Polymers* – 2020. – T. 12 – № 1 – C.144.

55. Dolai S. Mechanistic study of the formation of bright white light-emitting ultrasmall CdSe nanocrystals: role of phosphine free selenium precursors / Dolai S., Dutta P., Muhoberac B.B., Irving C.D., Sardar R. // *Chemistry of Materials* – 2015. – T. 27 – № 3 – C.1057–1070.

56. Reshma V.G. Quantum dots: Applications and safety consequences / Reshma V.G., Mohanan P. V. // *Journal of Luminescence* – 2019. – T. 205 – C.287–298.

57. Xu S. Upconversion nanophosphores for bioimaging / Xu S., Huang S., He Q., Wang L. // *TrAC Trends in Analytical Chemistry* – 2015. – T. 66 – C.72–79.

58. Li Z. Upconverting NIR photons for bioimaging / Li Z., Zhang Y., La H., Zhu R., El-Banna G., Wei Y., Han G. // *Nanomaterials* – 2015. – T. 5 – № 4 – C.2148–2168.

59. Bastos V. Stability, dissolution, and cytotoxicity of NaYF₄-upconversion nanoparticles with different coatings / Bastos V., Oskoei P., Andresen E., Saleh M.I., Rühle B., Resch-Genger U., Oliveira H. // *Scientific Reports* – 2022. – T. 12 – № 1 – C.3770.

60. Guryev E.L. Preclinical study of biofunctional polymer-coated upconversion nanoparticles / Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I. V., Vodeneev V.A., Kutova O.M., Lyubeshkin A. V., Yakubovskaya R.I., Pankratov A.A., Ingel F.I., Novik T.S., Deyev S.M., Ermilov S.A., Zvyagin A. V. // *Toxicological Sciences* – 2019. – T. 170 – № 1 – C.123–132.

61. Lingeshwar Reddy K. Lanthanide doped near infrared active upconversion nanophosphors: fundamental concepts, synthesis strategies, and technological applications / Lingeshwar Reddy K., Balaji R., Kumar A., Krishnan V. // *Small* – 2018. – T. 14 – № 37 – C.1801304.

62. Nadort A. Lanthanide upconversion luminescence at the nanoscale: fundamentals and optical properties / Nadort A., Zhao J., Goldys E.M. // *Nanoscale* – 2016. – T. 8 – № 27 – C.13099–13130.

63. Quintanilla M. Cubic *versus* hexagonal – phase, size and morphology effects on the photoluminescence quantum yield of NaGdF₄:Er³⁺/Yb³⁺ upconverting nanoparticles / Quintanilla M., Hemmer E., Marques-Hueso J., Rohani S., Lucchini G., Wang M., Zamani R.R., Roddatis V., Speghini A., Richards B.S., Vetrone F. // *Nanoscale* – 2022. – T. 14 – № 4 – C.1492–1504.

64. Wang F. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals / Wang F., Liu X. // *Chemical Society Reviews* – 2009. – T. 38 – № 4 – C.976.

65. Gai S. Recent progress in rare earth micro/nanocrystals: Soft chemical synthesis, luminescent properties, and biomedical applications / Gai S., Li C., Yang P., Lin J. // *Chemical Reviews* – 2014. – T. 114 – № 4 – C.2343–2389.

66. Yang D. Ultra-small BaGdF₅-based upconversion nanoparticles as drug carriers and multimodal imaging probes / Yang D., Dai Y., Liu J., Zhou Y., Chen Y., Li C., Ma P., Lin J. // *Biomaterials* – 2014. – T. 35 – № 6 – C.2011–2023.

67. Haase M. Upconverting nanoparticles / Haase M., Schäfer H. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2011. – T. 50 – № 26 – C.5808–5829.

68. Sun Y. Upconversion nanophosphors NaLuF₄:Yb,Tm for lymphatic imaging in vivo by real-time upconversion luminescence imaging under ambient light and high-resolution x-ray CT / Sun Y., Peng J., Feng W., Li F. // *Theranostics* – 2013. – T. 3 – № 5 – C.346–353.

69. Li X. Lab on upconversion nanoparticles: optical properties and applications engineering via designed nanostructure / Li X., Zhang F., Zhao D. // *Chemical Society Reviews* – 2015. – T. 44 – № 6 – C.1346–1378.

70. Piguet C. Extricating erbium / Piguet C. // *Nature Chemistry* – 2014. – T. 6 – № 4 – C.370–370.

71. Wang L. Fluorescence resonant energy transfer biosensor based on upconversion-luminescent nanoparticles / Wang L., Yan R., Huo Z., Wang L., Zeng J., Bao J., Wang X., Peng Q., Li Y. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2005. – T. 44 – № 37 – C.6054–6057.

72. Zhu X. Temperature-feedback upconversion nanocomposite for accurate photothermal therapy at facile temperature / Zhu X., Feng W., Chang J., Tan Y.-W., Li J., Chen M., Sun Y., Li F. // *Nature Communications* – 2016. – T. 7 – № 1 – C.10437.

73. Zhuohong F. NIR optical temperature sensing with efficiently relative sensitivity based on β -NaYF₄: Er³⁺ nanoparticles / Zhuohong F., Lin L., Zhezhe W., Zhiqiang Z. // *Journal of Luminescence* – 2020. – T. 221 – № December 2019 – C.117005.

74. Han S. Upconversion nanoparticles/hyaluronate-rose bengal conjugate complex for noninvasive photochemical tissue bonding / Han S., Hwang B.W., Jeon E.Y.,

Jung D., Lee G.H., Keum D.H., Kim K.S., Yun S.H., Cha H.J., Hahn S.K. // ACS Nano – 2017. – T. 11 – № 10 – C.9979–9988.

75. Khaydukov E. V. Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment / Khaydukov E. V., Mironova K.E., Semchishen V.A., Generalova A.N., Nechaev A. V., Khochenkov D.A., Stepanova E. V., Lebedev O.I., Zvyagin A. V., Deyev S.M., Panchenko V.Y. // Scientific Reports – 2016. – T. 6 – № 1 – C.35103.

76. Boyer J.-C. Surface modification of upconverting NaYF₄ nanoparticles with PEG-phosphate ligands for NIR (800 nm) biolabeling within the biological window / Boyer J.-C., Manseau M.-P., Murray J.I., Veggel F.C.J.M. van // Langmuir – 2010. – T. 26 – № 2 – C.1157–1164.

77. Skripka A. Double rare-earth nanothermometer in aqueous media: Opening the third optical transparency window to temperature sensing / Skripka A., Benayas A., Marin R., Canton P., Hemmer E., Vetrone F. // Nanoscale – 2017. – T. 9 – № 9 – C.3079–3085.

78. Zhao J. Single-nanocrystal sensitivity achieved by enhanced upconversion luminescence / Zhao J., Jin D., Schartner E.P., Lu Y., Liu Y., Zvyagin A. V., Zhang L., Dawes J.M., Xi P., Piper J.A., Goldys E.M., Monroe T.M. // Nature Nanotechnology – 2013. – T. 8 – № 10 – C.729–734.

79. Yuan D. Comprehensive study on the size effects of the optical properties of NaYF₄:Yb,Er nanocrystals / Yuan D., Tan M.C., Riman R.E., Chow G.M. // The Journal of Physical Chemistry C – 2013. – T. 117 – № 25 – C.13297–13304.

80. Zhao J. Upconversion luminescence with tunable lifetime in NaYF₄:Yb,Er nanocrystals: role of nanocrystal size / Zhao J., Lu Z., Yin Y., McRae C., Piper J.A., Dawes J.M., Jin D., Goldys E.M. // Nanoscale – 2013. – T. 5 – № 3 – C.944–952.

81. Su Q. The effect of surface coating on energy migration-mediated upconversion / Su Q., Han S., Xie X., Zhu H., Chen H., Chen C.-K., Liu R.-S., Chen X., Wang F., Liu X. // Journal of the American Chemical Society – 2012. – T. 134 – № 51 – C.20849–20857.

82. Vetrone F. The active-core/active-shell approach: a strategy to enhance the upconversion luminescence in lanthanide-doped nanoparticles / Vetrone F., Naccache R., Mahalingam V., Morgan C.G., Capobianco J.A. // *Advanced Functional Materials* – 2009. – Т. 19 – № 18 – С.2924–2929.

83. Wang F. Tuning upconversion through energy migration in core-shell nanoparticles / Wang F., Deng R., Wang J., Wang Q., Han Y., Zhu H., Chen X., Liu X. // *Nature Materials* – 2011. – Т. 10 – № 12 – С.968–973.

84. Chen X. Photon upconversion in core-shell nanoparticles / Chen X., Peng D., Ju Q., Wang F. // *Chemical Society Reviews* – 2015. – Т. 44 – № 6 – С.1318–1330.

85. Karimov D.N. Upconversion nanoparticles: synthesis, photoluminescence properties, and applications / Karimov D.N., Demina P.A., Koshelev A. V., Rocheva V. V., Sokovikov A. V., Generalova A.N., Zubov V.P., Khaydukov E. V., Koval'chuk M. V., Panchenko V.Y. // *Nanotechnologies in Russia* – 2020. – Т. 15 – № 11–12 – С.655–678.

86. Трифанова Е.М. Синтез и характеристика наноразмерных апконвертирующих фосфоров $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ / Трифанова Е.М., Николаева М.Е., Попов В.К. // *Перспективные материалы* – 2021. – № 12 – С.40–50.

87. Schneider C.A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. // *Nature Methods* – 2012. – Т. 9 – № 7 – С.671–675.

88. Bogdan N. Synthesis of ligand-free colloiddally stable water dispersible brightly luminescent lanthanide-doped upconverting nanoparticles / Bogdan N., Vetrone F., Ozin G.A., Capobianco J.A. // *Nano Letters* – 2011. – Т. 11 – № 2 – С.835–840.

89. Villanueva-Delgado P. Simulating energy transfer and upconversion in $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ / Villanueva-Delgado P., Krämer K.W., Valiente R. // *The Journal of Physical Chemistry C* – 2015. – Т. 119 – № 41 – С.23648–23657.

90. Würth C. Excitation power dependent population pathways and absolute quantum yields of upconversion nanoparticles in different solvents / Würth C., Kaiser M.,

Wilhelm S., Grauel B., Hirsch T., Resch-Genger U. // *Nanoscale* – 2017. – T. 9 – № 12 – C.4283–4294.

91. Lualdi M. Development of simulated pigmented lesions in an optical skin-tissue phantom: Experimental measurements in the visible and near infrared / Lualdi M., Colombo A., Mari A., Tomatis S., Marchesini R. // *Journal of Laser Applications* – 2002. – T. 14 – № 2 – C.122–127.

92. Ianniello C. Synthesized tissue-equivalent dielectric phantoms using salt and polyvinylpyrrolidone solutions / Ianniello C., Zwart J.A. de, Duan Q., Deniz C.M., Alon L., Lee J.S., Lattanzi R., Brown R. // *Magnetic Resonance in Medicine* – 2018. – T. 80 – № 1 – C.413–419.

93. Oliveira B.L. Microwave breast imaging: Experimental tumour phantoms for the evaluation of new breast cancer diagnosis systems / Oliveira B.L., O’Loughlin D., O’Halloran M., Porter E., Glavin M., Jones E. // *Biomedical Physics and Engineering Express* – 2018. – T. 4 – № 2.

94. Zell K. Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging / Zell K., Sperl J.I., Vogel M.W., Niessner R., Haisch C. // *Physics in Medicine and Biology* – 2007. – T. 52 – № 20 – C.N475–N484.

95. Kondyurin A. V Equivalent of a cartilage tissue for simulations of laser-induced temperature fields / Kondyurin A. V, Sviridov A.P. // *Quantum Electronics* – 2008. – T. 38 – № 7 – C.641–646.

96. Pogue B.W. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry / Pogue B.W., Patterson M.S. // *Journal of Biomedical Optics* – 2006. – T. 11 – № 4 – C.041102.

97. Amidi E. Low-cost ultrasound and optical gelatin-based phantoms / под ред. A.A. Oraevsky, L. V. Wang. SPIE, 2019. – 157с.

98. Maneas E. Gel wax-based tissue-mimicking phantoms for multispectral photoacoustic imaging / Maneas E., Xia W., Ogunlade O., Fonseca M., Nikitichev D.I.,

David A.L., West S.J., Ourselin S., Hebden J.C., Vercauteren T., Desjardins A.E. // *Biomedical Optics Express* – 2018. – T. 9 – № 3 – C.1151.

99. Mosca S. Optical characterization of porcine tissues from various organs in the 650–1100 nm range using time-domain diffuse spectroscopy / Mosca S., Lanka P., Stone N., Konugolu Venkata Sekar S., Matousek P., Valentini G., Pifferi A. // *Biomedical Optics Express* – 2020. – T. 11 – № 3 – C.1697.

100. Vardaki M.Z. Tissue phantoms for biomedical applications in raman spectroscopy: a review / Vardaki M.Z., Kourkouvelis N. // *Biomedical Engineering and Computational Biology* – 2020. – T. 11 – C.117959722094810.

101. Moffitt T. Preparation and characterization of polyurethane optical phantoms / Moffitt T., Chen Y.-C., Prah S.A. // *Journal of Biomedical Optics* – 2006. – T. 11 – № 4 – C.041103.

102. Sekar S.K.V. Solid phantom recipe for diffuse optics in biophotonics applications: a step towards anatomically correct 3D tissue phantoms / Sekar S.K.V., Pacheco A., Martella P., Li H., Lanka P., Pifferi A., Andersson-Engels S. // *Biomedical Optics Express* – 2019. – T. 10 – № 4 – C.2090.

103. Sanathana K.V.S. A solid phantom recipe for biophotonics applications: a step towards anatomically correct 3D tissue phantoms / под ред. H. Dehghani, H. Wabnitz. SPIE, 2019. – 2090–2100c.

104. Dong E. Three-dimensional fuse deposition modeling of tissue-simulating phantom for biomedical optical imaging / Dong E., Zhao Z., Wang M., Xie Y., Li S., Shao P., Cheng L., Xu R.X. // *Journal of Biomedical Optics* – 2015. – T. 20 – № 12 – C.121311.

105. Mustari A. Agarose-based tissue mimicking optical phantoms for diffuse reflectance spectroscopy / Mustari A., Nishidate I., Wares M.A., Maeda T., Kawauchi S., Sato S., Sato M., Aizu Y. // *Journal of Visualized Experiments* – 2018. – T. 2018 – № 138.

106. Lai P. Dependence of optical scattering from Intralipid in gelatin-gel based

tissue-mimicking phantoms on mixing temperature and time / Lai P., Xu X., Wang L. V. // *Journal of Biomedical Optics* – 2014. – T. 19 – № 3 – C.035002.

107. Loginova D.A. Liquid optical phantoms mimicking spectral characteristics of laboratory mouse biotissues / Loginova D.A., Sergeeva E.A., Krainov A.D., Agrba P.D., Kirillin M.Y. // *Quantum Electronics* – 2016. – T. 46 – № 6 – C.528–533.

108. Spirou G.M. Optical and acoustic properties at 1064 nm of polyvinyl chloride-plastisol for use as a tissue phantom in biomedical optoacoustics / Spirou G.M., Oraevsky A.A., Vitkin I.A., Whelan W.M. // *Physics in Medicine and Biology* – 2005. – T. 50 – № 14 – C.N141–N153.

109. Sun J. Near-infrared quantum dot contrast agents for fluorescence tissue imaging: a phantom study / Sun J., Fu K., Zhu M.-Q., Bickford L., Post E., Drezek R. // *Current Nanoscience* – 2009. – T. 5 – № 2 – C.160–166.

110. Cook J.R. Tissue-mimicking phantoms for photoacoustic and ultrasonic imaging / Cook J.R., Bouchard R.R., Emelianov S.Y. // *Biomedical Optics Express* – 2011. – T. 2 – № 11 – C.3193.

111. Fajardo C. Optical properties of a simple model of soft biological tissue / Fajardo C., Solarte E. // *Journal of Physics: Conference Series* – 2020. – T. 1547 – № 1 – C.012026.

112. Zonios G. Skin melanin, hemoglobin, and light scattering properties can be quantitatively assessed in vivo using diffuse reflectance spectroscopy / Zonios G., Bykowski J., Kollias N. // *Journal of Investigative Dermatology* – 2001. – T. 117 – № 6 – C.1452–1457.

113. Ninni P. Di The use of India ink in tissue-simulating phantoms / Ninni P. Di, Martelli F., Zaccanti G. // *Optics Express* – 2010. – T. 18 – № 26 – C.26854.

114. Mironov A.V. 3D printing of polylactic-co-glycolic acid fiber scaffolds using an antisolvent phase separation process / Mironov A.V., Mironova O.A., Syachina M.A., Popov V.K. // *Polymer* – 2019. – T. 182 – № July – C.121845.

115. Свиридов А.П. Оптические поля в пористых матрицах из полилактида / Свиридов А.П., Жигарьков В.С., Шубный А.Г., Юсупов В.И. // Квантовая электроника – 2020. – Т. 50 – № 1 – С.81–86.

116. Generalova A.N. Submicron polyacrolein particles in situ embedded with upconversion nanoparticles for bioassay / Generalova A.N., Kochneva I.K., Khaydukov E. V., Semchishen V.A., Guller A.E., Nechaev A. V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A. V., Deyev S.M. // *Nanoscale* – 2015. – Т. 7 – № 5 – С.1709–1717.

117. Трифанова Е.М. Трансформации спектров фотолюминесценции наноразмерных апконвертирующих фосфоров фантомами биологических тканей / Трифанова Е.М., Николаева М.Е., Свиридов А.П., Попов В.К. // Оптика и спектроскопия – 2023. – Т. 131 – № 6 – С.787–796.

118. Seinfeld J.H. Interaction of aerosols with radiation New Jersey: John Wiley and Sons Inc, 2006. Вып. 2nd – 696–698с.

119. Тучин В.В. Глава 7. Методы и алгоритмы для измерения оптических параметров биологических тканей / под ред. В.В. Тучин. Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2012. – 812с.

120. Rosal B. del Upconversion nanoparticles for in vivo applications: limitations and future perspectives / Rosal B. del, Jaque D. // *Methods and Applications in Fluorescence* – 2019. – Т. 7 – № 2 – С.022001.

121. Hemmer E. Exploiting the biological windows: Current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm // *Nanoscale Horizons*. – 2016. – Т. 1. – № 3. – 168–184с.

122. Bachmann L. Fluorescence spectroscopy of biological tissues—a review / Bachmann L., Zezell D.M., Ribeiro A. da C., Gomes L., Ito A.S. // *Applied Spectroscopy Reviews* – 2006. – Т. 41 – № 6 – С.575–590.

123. The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range / под ред. A. Roggan, G. Muller. Bellingham, Washington: SPIE Press, 1995. –

10–44c.

124. Beć K.B. Breakthrough potential in near-infrared spectroscopy: spectra simulation. a review of recent developments / Beć K.B., Huck C.W. // *Frontiers in Chemistry* – 2019. – T. 7 – № FEB – C.1–22.

125. Yang D. Multimodal cancer imaging using lanthanide-based upconversion nanoparticles / Yang D., Li C., Lin J. // *Nanomedicine* – 2015. – T. 10 – № 16 – C.2573–2591.

126. Zhong Y. Boosting the down-shifting luminescence of rare-earth nanocrystals for biological imaging beyond 1500 nm / Zhong Y., Ma Z., Zhu S., Yue J., Zhang M., Antaris A.L., Yuan J., Cui R., Wan H., Zhou Y., Wang W., Huang N.F., Luo J., Hu Z., Dai H. // *Nature Communications* – 2017. – T. 8 – № 1 – C.737.

127. Trifanova E.M. Photoluminescent α -NaYbF₄:Er_{0.02}Ce_{0.02}Zn_{0.1} nanoparticles for bioimaging in visible and infrared ranges / Trifanova E.M., Koshelev A. V., Khaydukov K. V., Krylov I. V., Popov V.K. // *St. Petersburg Polytechnic University Journal: Physics and Mathematics* – 2022. – T. 15 – № 3.2 – C.306–310.

128. Koshelev A. V Enhancement of luminescent efficiency of α -NaREF₄:Er³⁺ (RE= Y, Yb, Lu) nanocrystals through multi-doping strategy Saint-Petersburg: HSE University - St. Petersburg, 2022. – 303–304c.

129. Khaydukov E. V. Deferred registration of nanophosphor photoluminescence as a platform for optical bioimaging / Khaydukov E. V., Boldyrev K.N., Khaydukov K. V., Krylov I. V., Asharchuk I.M., Savelyev A.G., Rocheva V. V., Karimov D.N., Nechaev A. V., Zvyagin A. V. // *Optics and Spectroscopy* – 2019. – T. 126 – № 1 – C.95–101.

130. Kuang Y. Synthesis and luminescence properties of NaGdF₄: Yb³⁺, Ce³⁺, and Ho³⁺ upconversion nanoparticles doped with Zn²⁺ / Kuang Y., Xu J., Wang C., Wang C., Shao H., Yang D., Gai S., He F., Yang P. // *CrystEngComm* – 2018. – T. 20 – № 19 – C.2663–2668.

131. Hutmacher D.W. Scaffold design and fabrication / под ред. 2023; pp. 355–

385. 1. Hutmacher, D.W.; Tandon, B.; Dalton, P.D. Scaffold Design and Fabrication. In *Tissue Engineering*; Elsevier. Elsevier, 2023. – 355–385c.

132. Ambekar R.S. Progress in the advancement of porous biopolymer scaffold: tissue engineering application / Ambekar R.S., Kandasubramanian B. // *Industrial & Engineering Chemistry Research* – 2019. – T. 58 – № 16 – C.6163–6194.

133. Roacho-Pérez J.A. Artificial scaffolds in cardiac tissue engineering / Roacho-Pérez J.A., Garza-Treviño E.N., Moncada-Saucedo N.K., Carriquiry-Chequer P.A., Valencia-Gómez L.E., Matthews E.R., Gómez-Flores V., Simental-Mendía M., Delgado-Gonzalez P., Delgado-Gallegos J.L., Padilla-Rivas G.R., Islas J.F. // *Life* – 2022. – T. 12 – № 8 – C.1117.

134. Sengupta P. Development of a smart scaffold for sequential cancer chemotherapy and tissue engineering / Sengupta P., Agrawal V., Prasad B.L.V. // *ACS Omega* – 2020. – T. 5 – № 33 – C.20724–20733.

135. O'Donnell N. Cellulose-based scaffolds for fluorescence lifetime imaging-assisted tissue engineering / O'Donnell N., Okkelman I.A., Timashev P., Gromovykh T.I., Papkovsky D.B., Dmitriev R.I. // *Acta Biomaterialia* – 2018. – T. 80 – C.85–96.

136. Costa A.C. Interactions between dental mscs and biomimetic composite scaffold during bone remodeling followed by in vivo real-time bioimaging / Costa A.C., Alves P.M., Monteiro F.J., Salgado C. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2023. – T. 24 – № 3 – C.1827.

137. Calori I.R. Polymer scaffolds as drug delivery systems / Calori I.R., Braga G., Jesus P. da C.C. de, Bi H., Tedesco A.C. // *European Polymer Journal* – 2020. – T. 129 – № March – C.109621.

138. Zhao J. Functional electrospun fibers for local therapy of cancer / Zhao J., Cui W. // *Advanced Fiber Materials* – 2020. – T. 2 – № 5 – C.229–245.

139. Bazgir M. Degradation and characterisation of electrospun polycaprolactone

(PCL) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) scaffolds for vascular tissue engineering / Bazgir M., Zhang W., Zhang X., Elies J., Saeinasab M., Coates P., Youseffi M., Sefat F. // *Materials* – 2021. – T. 14 – № 17 – C.4773.

140. Zamanian A. Morphological comparison of PLGA/gelatin scaffolds produced by freeze casting and freeze drying methods / Zamanian A., Ghorbani F., Nojehdehian H. // *Applied Mechanics and Materials* – 2013. – T. 467 – C.108–111.

141. JINYOON J. Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method / JINYOON J. // *Biomaterials* – 2004. – T. 25 – № 25 – C.5613–5620.

142. Jin S. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration / Jin S., Xia X., Huang J., Yuan C., Zuo Y., Li Y., Li J. // *Acta Biomaterialia* – 2021. – T. 127 – № xxxx – C.56–79.

143. Wu T. Resorbable polymer electrospun nanofibers: History, shapes and application for tissue engineering / Wu T., Ding M., Shi C., Qiao Y., Wang P., Qiao R., Wang X., Zhong J. // *Chinese Chemical Letters* – 2020. – T. 31 – № 3 – C.617–625.

144. Braghirolli D.I. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics / Braghirolli D.I., Steffens D., Pranke P. // *Drug Discovery Today* – 2014. – T. 19 – № 6 – C.743–753.

145. Gesù R. Di Electrospun scaffolds in tendons regeneration: a review / Gesù R. Di, Amato G., Gottardi R. // *Muscle Ligaments and Tendons Journal* – 2019. – T. 09 – № 04 – C.478.

146. Vrieze S. De The effect of temperature and humidity on electrospinning / Vrieze S. De, Camp T. Van, Nelvig A., Hagström B., Westbroek P., Clerck K. De // *Journal of Materials Science* – 2009. – T. 44 – № 5 – C.1357–1362.

147. Eap S. Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone / Eap S., Morand D., Clauss F., Huck O., Stoltz J.-F., Lutz J.-C., Gottenberg J.-E., Benkirane-Jessel N., Keller L., Fioretti F. // *Bio-Medical Materials and Engineering* – 2015. – T. 25 –

№ s1 – C.79–85.

148. Varma M.V. 3D printed scaffolds for biomedical applications / Varma M.V., Kandasubramanian B., Ibrahim S.M. // *Materials Chemistry and Physics* – 2020. – T. 255 – C.123642.

149. Jammalamadaka U. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering / Jammalamadaka U., Tappa K. // *Journal of Functional Biomaterials* – 2018. – T. 9 – № 1 – C.22.

150. Jang T.-S. 3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering / Jang T.-S., Jung H.-D., Pan H.M., Han W.T., Chen S., Song J. // *International Journal of Bioprinting* – 2018. – T. 4 – № 1 – C.1–28.

151. Ouyang L. 3D printing of shear-thinning hyaluronic acid hydrogels with secondary cross-linking / Ouyang L., Highley C.B., Rodell C.B., Sun W., Burdick J.A. // *ACS Biomaterials Science & Engineering* – 2016. – T. 2 – № 10 – C.1743–1751.

152. Hutmacher D.W. Scaffold-based tissue engineering: Rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems / Hutmacher D.W., Sittinger M., Risbud M. V. // *Trends in Biotechnology* – 2004. – T. 22 – № 7 – C.354–362.

153. Mishchenko T.A. Features of primary hippocampal cultures formation on scaffolds based on hyaluronic acid glycidyl methacrylate / Mishchenko T.A., Researcher S., Researcher S., Scientific C., Researcher S., Researcher S., Scientific C., Kuznetsova A.I., Shirokova O.M., Researcher J., Scientific C., Khaydukov E. V, Savelyev A.G., Researcher J., Researcher J., Popov V.K., Zvyagin A. V, Researcher L., Group S., Vedunova M. V, Researcher L., Novgorod N., Square P., Novgorod N., Road B. // *BIOPHOTONICS IN REGENERATIVE MEDICINE* – 2018. – T. 10 – № 1 – C.103–110.

154. Moroni L. 3D fiber-deposited electrospun integrated scaffolds enhance cartilage tissue formation / Moroni L., Schotel R., Hamann D., Wijn J.R. De, Blitterswijk C.A. Van // *Advanced Functional Materials* – 2008. – T. 18 – № 1 – C.53–60.

155. Guo B. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: A brief review / Guo B., Ma P.X. // *Science China Chemistry* – 2014. – T. 57 – № 4 – C.490–500.

156. Fischer R.L. Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes / Fischer R.L., McCoy M.G., Grant S.A. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* – 2012. – T. 23 – № 7 – C.1645–1654.

157. Pina S. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review / Pina S., Oliveira J.M., Reis R.L. // *Advanced Materials* – 2015. – T. 27 – № 7 – C.1143–1169.

158. Matthews J.A. Electrospinning of collagen nanofibers / Matthews J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L. // *Biomacromolecules* – 2002. – T. 3 – № 2 – C.232–238.

159. Ahn H. Engineered small diameter vascular grafts by combining cell sheet engineering and electrospinning technology / Ahn H., Ju Y.M., Takahashi H., Williams D.F., Yoo J.J., Lee S.J., Okano T., Atala A. // *Acta Biomaterialia* – 2015. – T. 16 – № 1 – C.14–22.

160. Haaparanta A.-M. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering / Haaparanta A.-M., Järvinen E., Cengiz I.F., Ellä V., Kokkonen H.T., Kiviranta I., Kellomäki M. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* – 2014. – T. 25 – № 4 – C.1129–1136.

161. Shim J.-H. Effect of solid freeform fabrication-based polycaprolactone/poly(lactic-co-glycolic acid)/collagen scaffolds on cellular activities of human adipose-derived stem cells and rat primary hepatocytes / Shim J.-H., Kim A.J., Park J.Y., Yi N., Kang I., Park J., Rhie J.-W., Cho D.-W. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* – 2013. – T. 24 – № 4 – C.1053–1065.

162. Hardy J.G. Biodegradable hydrogels composed of oxime crosslinked

poly(ethylene glycol), hyaluronic acid and collagen: a tunable platform for soft tissue engineering / Hardy J.G., Lin P., Schmidt C.E. // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* – 2015. – T. 26 – № 3 – C.143–161.

163. Dong C. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives / Dong C., Lv Y. // *Polymers* – 2016. – T. 8 – № 2 – C.42.

164. Lin H. Optimization of photocrosslinked gelatin/hyaluronic acid hybrid scaffold for the repair of cartilage defect / Lin H., Beck A.M., Shimomura K., Sohn J., Fritch M.R., Deng Y., Kilroy E.J., Tang Y., Alexander P.G., Tuan R.S. // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* – 2019. – T. 13 – № 8 – C.1418–1429.

165. Barnes C.P. Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol / Barnes C.P., Pemble C.W., Brand D.D., Simpson D.G., Bowlin G.L. // *Tissue Engineering* – 2007. – T. 13 – № 7 – C.1593–1605.

166. Heo J. Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering / Heo J., Koh R.H., Shim W., Kim H.D., Yim H.-G., Hwang N.S. // *Drug Delivery and Translational Research* – 2016. – T. 6 – № 2 – C.148–158.

167. Telemeco T.A. Regulation of cellular infiltration into tissue engineering scaffolds composed of submicron diameter fibrils produced by electrospinning / Telemeco T.A., Ayres C., Bowlin G.L., Wnek G.E., Boland E.D., Cohen N., Baumgarten C.M., Mathews J., Simpson D.G. // *Acta Biomaterialia* – 2005. – T. 1 – № 4 – C.377–385.

168. Chan B.P. Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds / Chan B.P., So K.-F. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A* – 2005. – T. 75A – № 3 – C.689–701.

169. Webster A. A dye-photosensitized reaction that generates stable protein-protein crosslinks / Webster A., Britton D., Apap-Bologna A., Kemp G. // *Analytical Biochemistry* – 1989. – T. 179 – № 1 – C.154–157.

170. Liu T. Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: Synthesis, characterization and neural stem cell interactions / Liu T., Teng W.K., Chan B.P., Chew S.Y. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A* – 2010. – Т. 95A – № 1 – С.276–282.

171. Ma X.H. Thermal cross-linking for biologically degradable materials / Ma X.H., Noishiki Y., Yamane Y., Iwai Y., Marato D., Matsumoto A. // *ASAIO JOURNAL* – 1996. – Т. 42 – № 5 – С.М866-870.

172. Haugh M.G. The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds / Haugh M.G., Jaasma M.J., O'Brien F.J. // *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* – 2009. – Т. 89 – № 2 – С.363–369.

173. Weadock K.S. Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment / Weadock K.S., Miller E.J., Bellincampi L.D., Zawadsky J.P., Dunn M.G. // *Journal of Biomedical Materials Research* – 1995. – Т. 29 – № 11 – С.1373–1379.

174. Ma P.X. Scaffolds for tissue fabrication / Ma P.X. // *Materials Today* – 2004. – Т. 7 – № 5 – С.30–40.

175. Borovikov P.I. Model of aliphatic polyesters hydrolysis comprising water and oligomers diffusion / Borovikov P.I., Sviridov A.P., Antonov E.N., Dunaev A.G., Krotova L.I., Fatkhudinov T.K., Popov V.K. // *Polymer Degradation and Stability* – 2019. – Т. 159 – С.70–78.

176. Арутюнян И.В. Деградация D,L-полилактидов в биологических средах: эксперимент и модель / Арутюнян И.В., Боровиков П.И., Дунаев А.Г., Кротова Л.И., Свиридов А.П., Трифанова Е.М., Фатхудинов Т.Х., Сухих Г.Т., Попов В.К. // *Перспективные материалы* – 2020. – № 7 – С.40–51.

177. Oh S.H. Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility / Oh S.H., Lee J.H. // *Biomedical Materials* – 2013. –

Т. 8 – № 1 – С.014101.

178. Дунаев А.Г. Физико-химические методы повышения гидрофильности поверхности алифатических полиэфиров для тканеинженерных конструкций / Дунаев А.Г., Мариянац А.О., Сячина М.А., Трифанова Е.М., Попов В.К. // Физика и химия обработки материалов – 2019. – № 6 – С.72–78.

179. Zong X. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs / Zong X., Bien H., Chung C., Yin L., Fang D., Hsiao B., Chu B., Entcheva E. // Biomaterials – 2005. – Т. 26 – № 26 – С.5330–5338.

180. Meng Z.X. Fabrication of mineralized electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibers and their potential in bone tissue engineering / Meng Z.X., Li H.F., Sun Z.Z., Zheng W., Zheng Y.F. // Materials Science and Engineering: C – 2013. – Т. 33 – № 2 – С.699–706.

181. Zhang W. Facile fabrication of transparent and upconversion photoluminescent nanofiber mats with tunable optical properties / Zhang W., Jia H., Ye H., Dai T., Yin X., He J., Chen R., Wang Y., Pang X. // ACS Omega – 2018. – Т. 3 – № 7 – С.8220–8225.

182. Bao Y. Upconversion polymeric nanofibers containing lanthanide-doped nanoparticles via electrospinning / Bao Y., Luu Q.A.N., Zhao Y., Fong H., May P.S., Jiang C. // Nanoscale – 2012. – Т. 4 – № 23 – С.7369.

183. Chen Y. Multifunctional electrospinning composite fibers for orthotopic cancer treatment in vivo / Chen Y., Liu S., Hou Z., Ma P., Yang D., Li C., Lin J. // Nano Research – 2015. – Т. 8 – № 6 – С.1917–1931.

184. Sochilina A. V. Preparing modified hyaluronic acid with tunable content of vinyl groups for use in fabrication of scaffolds by photoinduced crosslinking / Sochilina A. V., Savelyev A.G., Akasov R.A., Zubov V.P., Khaydukov E. V., Generalova A.N. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry – 2021. – Т. 47 – № 4 – С.828–836.

185. Liu H. Electronic Supplementary Information (ESI) for: Deep tissue optical

imaging of upconverting nanoparticles enabled by exploiting higher intrinsic quantum yield through using millisecond single pulse excitation with high peak power / H. Liu, C. T. Xu, G. Dumlupinar, O. B. Jensen, P. E. Andersen, S. Andersson-Engels – , 2013.

186. Aescht E. Romeis mikroskopische technik / E. Aescht, S. Büchl-Zimmermann, A. Burmester, S. Dänhardt-Pfeiffer, C. Desel, C. Hamers, G. Jach, M. Kässens, J. Makovitzky, M. Mulisch, B. Nixdorf-Bergweiler, D. Pütz, B. Riedelsheimer, F. van den Boom, R. Wegerhoff, U. Welsch / под ред. M. Mulisch, U. Welsch. – Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010.

187. Lee H. Electrospinning/electrospray of ferrocene containing copolymers to fabricate ros-responsive particles and fibers / Lee H., Woo J., Son D., Kim M., Choi W. Il, Sung D. // *Polymers* – 2020. – Т. 12 – № 11 – C.2520.

188. Zeugolis D.I. Electro-spinning of pure collagen nano-fibres – Just an expensive way to make gelatin? / Zeugolis D.I., Khew S.T., Yew E.S.Y., Ekaputra A.K., Tong Y.W., Yung L.-Y.L., Hutmacher D.W., Sheppard C., Raghunath M. // *Biomaterials* – 2008. – Т. 29 – № 15 – C.2293–2305.

189. Koens M.J.W. Improving mechanical properties by the use of a chemical agent in small diameter blood vessel tissue equivalents / Koens M.J.W. – 2003. – № December.

190. Zeeman R. Crosslinking and modification of dermal sheep collagen using 1,4-butanediol diglycidyl ether / Zeeman R., Dijkstra P.J., Wachem P.B. van, Luyn M.J.A. van, Hendriks M., Cahalan P.T., Feijen J. // *Journal of Biomedical Materials Research* – 1999. – Т. 46 – № 3 – C.424–433.

191. Savelyev A.G. Facile cell-friendly hollow-core fiber diffusion-limited photofabrication / Savelyev A.G., Sochilina A. V., Akasov R.A., Mironov A. V., Kapitannikova A.Y., Borodina T.N., Sholina N. V., Khaydukov K. V., Zvyagin A. V., Generalova A.N., Khaydukov E. V. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* – 2021. – Т. 9.

192. Mori A. De 3D printing and electrospinning of composite hydrogels for cartilage and bone tissue engineering / Mori A. De, Peña Fernández M., Blunn G., Tozzi G., Roldo M. // *Polymers* – 2018. – T. 10 – № 3 – C.285.

193. Luraghi A. Electrospinning for drug delivery applications: A review / Luraghi A., Peri F., Moroni L. // *Journal of Controlled Release* – 2021. – T. 334 – C.463–484.

194. Khalaf A.T. Bone tissue engineering through 3D bioprinting of bioceramic scaffolds: a review and update / Khalaf A.T., Wei Y., Wan J., Zhu J., Peng Y., Abdul Kadir S.Y., Zainol J., Oglah Z., Cheng L., Shi Z. // *Life* – 2022. – T. 12 – № 6 – C.903.

195. Arppe R. Quenching of the upconversion luminescence of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ and $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ nanophosphors by water: the role of the sensitizer Yb^{3+} in non-radiative relaxation / Arppe R., Hyppänen I., Perälä N., Peltomaa R., Kaiser M., Würth C., Christ S., Resch-Genger U., Schäferling M., Soukka T. // *Nanoscale* – 2015. – T. 7 – № 27 – C.11746–11757.

196. Trifanova E.M. Photoluminescent scaffolds based on natural and synthetic biodegradable polymers for bioimaging and tissue engineering / Trifanova E.M., Babayeva G., Khvorostina M.A., Atanova A. V, Nikolaeva M.E., Sochilina A. V, Khaydukov E. V, Popov V.K. // *Life* – 2023. – T. 13 – № 4 – C.870.