

На правах рукописи

Звягин Андрей Васильевич

**ПРИМЕНЕНИЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ
НАНОМАТЕРИАЛОВ И
ЛАЗЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОПТИЧЕСКОЙ
ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

Специальность 03.01.02 —Биофизика

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
доктора физико-математических наук

Саратов — 2015

Работа выполнена

Работа выполнена в ФГАОУ ВО "Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского" и ФГБУН "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН"

Научные консультанты:

- Доктор физико-математических наук, профессор, академик РАН
Панченко Владислав Яковлевич.
- Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН
Деев Сергей Михайлович

Официальные оппоненты:

- Доктор физико-математических наук, профессор,
Сергеев Александр Михайлович,
директор ФГБУН "Институт прикладной физики РАН"
- Доктор физико-математических наук,
Хлебцов Борис Николаевич,
ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФГБУН "Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН"
- Доктор химических наук, профессор
Горин Дмитрий Александрович,
зам. директора Института наноструктур и биосистем ФГБОУ ВПО "Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского"

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"

Защита состоится 05.11.2015 в _____ на заседании Диссертационного совета Д 212.243.05 на базе ФГБОУ ВПО "Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского" по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского", и на сайте: <http://www.sgu.ru/sites/default/files/dissertation/2015/06/17/dissertaciyaZvyagin5iyun2015.pdf>

Автореферат разослан _____ 2015 года.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 212.243.05

доктор физико-математических наук, профессор



В. Л. Дербов

Общая характеристика работы

Актуальность темы.

Супрамолекулярные комплексы живой природы сложны и многофункциональны. Их составной органический материал, включающий в себя аминокислоты и нуклеиновые кислоты, позволяет создавать уникальное многообразие форм жизни. Вместе с тем, возможности органической природы ограничены. Например, трудно представить биомолекулы, клетки, живые организмы устойчивыми к агрессивным химическим средам, механическим стрессам и интенсивному электромагнитному облучению. Пополнение арсенала органической мастерской неорганическими наноматериалами позволяет создавать гибридные комплексы нового поколения. Исследование различных типов наночастиц (НЧ) для применений по всему спектру наук о жизни от фундаментальных биологических исследований до клинической терапии является одним из основных направлений новейшей нанотехнологии.

Одним из примеров такого развития является разработка биосовместимых фотолуминесцентных (ФЛ) наноматериалов с их уникальными физико-химическими и оптическими свойствами, которые позволяют существенно расширить возможности традиционных методов биомедицинского оптического имиджинга, основанных на использовании органических красителей и флуоресцентных белков [20] (называемых флуоресцентными зондами) в качестве маркеров для визуализации биологических структур и процессов в клетках и тканях, что является очевидным способом улучшения локализации исследуемых клеток или диагностируемой ткани. Например, спектрально-селективная регистрация позволяет уменьшить фоновую аутофлуоресценцию ткани и улучшить локализацию маркированного очага. Важно отметить возможность специфической регистрации патологических очагов, если флуоресцентная молекула спаяна (биоконъюгирована) с направляющей молекулой, такой как антитело, пептид или метаболит. В идеальном сценарии адресной доставки флуоресцентные маркеры накапливаются исключительно в целевых клетках и патологических очагах, тем самым делая их контрастными, а значит, регистрируемыми оптическими методами. Однако существует несколько серьёзных недостатков данной методологии.

1. Подавляющее большинство флуоресцентных маркеров возбуждается светом ультрафиолетового (УФ) или видимого диапазона, переизлучая сигнал флуоресценции в видимом спектральном диапазоне. Именно в этом спектральном диапазоне происходит сильное поглощение и рассеяние возбуждающего оптического излучения биологической тканью и клетками.
2. При облучении (живой) биологической ткани возбуждается сигнал аутофлуоресценции, обусловленный флуоресцентными свойствами ткани, определяемыми такими биомолекулами как никотинамидадениндинуклеотид (НАДФ или NADH),

флавинаденидинуклеотид (ФАД или FAD), кератины, порфирины и др. Хотя разделение сигналов аутофлуоресценции биологической ткани и флуоресцентного зонда осуществляется спектральными методами, эффективность этих методов ограничена.

3. Многократное рассеяние света накачки в толще сильно рассеивающей биоткани приводит к возвращению части света в фотоприёмник, в то время как спектральные светофильтры самого высокого качества способны подавить эту интенсивную засветку только тысячекратно [28]. Таким образом, чувствительность метода оптического зондирования с использованием флуоресцентных зондов оказывается существенно ограничена фоновыми засветками исследуемой живой (или иными словами, *in vivo*) биологической ткани, оставляя возможности сверхчувствительной оптической регистрации (вплоть до регистрации отдельных фотонов!) не востребуемыми.
4. Кроме того, флуоресцентные зонды являются "малогабаритными транспортными средствами" для адресной доставки. Один или в редких случаях несколько терминалов позволяют конъюгацию одного, или в редких случаях, нескольких направляющих агентов. Создание многофункциональных комплексов, включающих в себя направляющие средства адресной доставки, терапевтические средства, средства защиты от ферментной деградаци и т.д., является очень серьёзным вызовом технологии флуоресцентных зондов.

ФЛ наноматериалы позволяют преодолеть ограничения оптического имиджинга, связанные со свойствами органических флуорофоров. Множество неорганических ФЛ НЧ отличаются исключительной фотостабильностью, "настраиваемыми" узкими спектрами фотолуминесценции и высокой устойчивостью к условиям окружающей среды, в том числе рН и температуры, что вытекает из их неорганической природы. Эти свойства оказались востребованными для визуализации молекулярного трафика в клетках [33]. Важным примером является оптический имиджинг в режиме непрерывного слежения (трекинг) активации рецепторов клеток лигандами и дальнейшая эволюция связки рецептор-лиганд в цитоплазме клетки. Несмотря на то, что возможности трекинга рецепторов были продемонстрированы посредством использования квантовых точек (КТ), такие ограничения КТ, как прерывистая ФЛ и цитотоксичность, требуют использования ФЛ НЧ нового поколения. В более широкой перспективе неинвазивная визуализация редких биологических событий на самом чувствительном уровне отдельных биомолекул в течение биологически значимого интервала времени представляется грандиозной задачей, которая может быть выполнена посредством применения биогибридных фотолуминесцентных нанотехнологий, основанных на соединении неорганического наноматериала (наночастиц) с молекулами биополимеров.

Наиболее перспективной платформой для создания соединений для диагностики представляются наночастицы различной природы, обладающие уникальным набором свойств, привлекательным для получения биогибридных ФЛ наносборок с желаемой избирательностью действия. Это составляет основу конструирования биогибридных ФЛ наноконструкций для применений в диагностике и терапии живых организмов, в своей совокупности получившей название тераностика.

Интенсивные и всесторонние разработки в области нанотехнологий не могли пройти мимо публичного внимания, озабоченного возможными рисками для здоровья, связанными с проникновением наноматериалов в организм человека – предмет исследований недавно появившейся дисциплины Нанотоксикологии. Токсикологические последствия применений косметических и фармацевтических продуктов на основе наноматериалов на коже человека находятся в зоне пристального внимания данной дисциплины. Современное состояние исследований не даёт однозначного ответа на вопрос о цитотоксичности таких наноматериалов, как оксид цинка (ZnO) и диоксид титана (TiO₂), которые составляют неорганическую основу современных солнцезащитных кремов [36]. При этом научное токсикологическое сообщество придерживается той точки зрения, что лучшей стратегией предотвращения рисков, связанных с использованием нанотехнологических продуктов на коже, является предотвращение проникновения НЧ в слой живых клеток кожи (эпидермис) через тонкий роговой слой эпидермиса (*stratum corneum*, SC). Детальные исследования в этой области не смогли дать убедительного заключения в отношении проницаемости человеческой кожи для различного типа и размеров наночастиц. Одной из причин является отсутствие метода прижизненной оптической визуализации НЧ. Применение нелинейной оптической томографии для прижизненной визуализации НЧ ZnO на поверхности человеческой кожи и в свежих биопсийных образцах позволило решить эту проблему. Нелинейный оптический имиджинг также позволил расширить возможности диагностики и классификации биологических тканей.

Целью данной работы является разработка основных концепций, методов и экспериментальная реализация функционального биомедицинского оптического имиджинга на основе фотолюминесцентных нанотехнологий.

Из широкого спектра ФЛ наноматериалов, составляющих основу молекулярных зондов, в настоящем труде представлены такие перспективные наночастицы, как флуоресцентные наноалмазы (ФНА), нанорубины, наноразмерные антистоксовы флюоресцентные фосфоры (НАФ) и наночастицы оксида цинка. В работе были также исследованы получившие широкое распространение квантовые точки (КТ). На реализацию полномасштабной сборки и применение многоцелевых биогибридных наноконструкций на основе этих НЧ в области биомедицинского оптического имиджинга и зондирования и направлена настоящая работа.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разработать методы и подходы для получения и характеристики фотолюминесцентных наночастиц с заданными оптическими свойствами, а также оптимизации их физических и химических свойств. В число исследованных в работе частиц входят флуоресцентные наноалмазы, нанорубины, антистоксовые нанофосфóры и наночастицы оксида цинка.
2. Детальное изучение физико-химических и оптических свойств НЧ оксида цинка с целью изучения их возможностей для биомедицинских применений.
3. Адаптировать подходы модульной сборки биоконъюгатов наночастиц и функциональных биомолекул, где ключевой методикой является использование высокоаффинного молекулярного линкера. Отработать процедуру модульной сборки с использованием флуоресцентных наноалмазов, нанорубинов, антистоксовых нанофосфóров и таких функциональных биомолекул, как мини-антитело (фрагмент антитела), лиганды – пептиды соматостатин, энкефалин и его синтетический аналог DAMGO.
4. Продемонстрировать и исследовать особенности адресной доставки биоконъюгатов наночастиц с нацеливающими биомолекулами к целевым клеткам.
5. Создание и оптимизация систем оптического фотолюминесцентного имиджинга для получения изображений фотолюминесцентных наночастиц: эпилюминесцентного микроскопа, обеспечивающего регистрацию с предельной чувствительностью, т.е. регистрацию одиночных наночастиц в клетках и тонких тканевых срезах; а также оптической имиджинговой системы, позволяющей зондирование локализованных участков ткани, маркированных фотолюминесцентными наноконструкциями.
6. Разработать методы нелинейного оптического имиджинга, дающие количественные оценки архитектуры структур биоткани и распределения фотолюминесцентных наночастиц. Исследовать проницаемость человеческой кожи для наночастиц на примере наночастиц оксида цинка (ZnO), входящих в состав косметических и фармакологических препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны инновационные методы производства фотолюминесцентных (ФЛ) наночастиц (НЧ).
 - (a) Получены стабильные водные коллоиды наноалмазов путём кислотного и термо-кислородного травления агрегатов. Контроль размера, состава поверхностных групп и окружающей среды позволяют задавать флуоресцентные свойства азотно-вакансионного центра окраски (NV) наноалмаза. Высокий коэффициент преломления нанокристалла алмаза $n_{ND} = 2,4$ в видимом спектральном диапазоне, а также высокие значения сечения поглощения

$\sigma_a^{(NV)} = 3 \times 10^{-17} \text{ см}^2$ и квантового выхода $\eta_{NV} \approx 0,8$ обеспечивают хороший оптический контраст нанодiamondов в клетках.

- (b) Отработана технология воспроизводимого получения наноразмерных частиц рубина с высокой фотостабильностью, высоким квантовым выходом и узкой спектральной линией излучения. Амфотерный характер кристаллической матрицы нанорубина (Al_2O_3) и ионный состав буферного раствора определяют содержание ионных групп на поверхности, который остаётся нескомпенсированным, поддерживая диспергированное состояние наночастиц за счёт электростатического отталкивания.
- (c) Продемонстрирован успешный метод синтеза перспективного класса НЧ, наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ), обеспечивающий получение монодисперсного коллоида в размерном диапазоне от 15 до 100 нм. Абсолютный коэффициент конверсии НАФ (КК или η_{UC}), характеризующий преобразование мощности возбуждающего инфракрасного (ИК) излучения в мощность ФЛ видимого и ближнего ИК спектрального диапазона оказался сравнимым с лучшими мировыми показателями ($\eta_{UC} \leq 2\%$). Изменение легирующего соотношения активных излучающих ионов НАФ привело к беспрецедентно высокому увеличению КК НАФ до 8%. Покрытие поверхности НАФ амфифильным полимером, а также обработка поверхности тетраметил-аммонием гидроксидом представляет собой надёжный метод гидрофилизации наночастиц, обеспечивая при этом наличие на поверхности карбоксильных групп, облегчающих дальнейшую процедуру биоконъюгации.
- (d) Наночастицы (НЧ) оксида цинка со средним размером около 25 нм демонстрируют высокий оптический контраст на фоне аутофлуоресценции биологической ткани (кожи). Контрастная визуализация НЧ ZnO в живой коже и биопсийных образцах с помощью нелинейной оптической томографической системы обуславливается высокими значениями нелинейной восприимчивости 2-го и 3-го порядка (соответственно, $\chi_{ZnO}^{(2)}$ и $\chi_{ZnO}^{(3)}$), а также спектральным положением основной полосы излучения ZnO в стороне от интенсивного сигнала аутофлуоресценции. Так, $\chi_{ZnO}^{(3)}$ было пересчитано в двухфотонное сечение поглощения НЧ ZnO диаметром 18 нм, $\sigma_{ZnO}^{2ph} = 0,26 \text{ GM}$, которые превышало аналогичные показатели эндогенных флуорофоров, определяющих сигнал аутофлуоресценции биологической ткани. Это позволило получить численные оценки концентрации и распределения НЧ ZnO в коже человека с помощью нелинейной оптической томографии.
2. Разработана универсальная платформа биоконъюгации, в основе которой лежит модульная самосборка биогибридных ФЛ наноконструкций. Одним из модульных компонентов выступает поверхностно-модифицированная НЧ, другим – нацеливающая биомолекула, характеризующаяся высокой аффинностью к

целевым клеткам. Комплементарным модульным компонентом может быть терапевтический агент, например, фототоксичный флуоресцентный белок Killer Red. Самосборка модуля осуществлялась посредством молекулярных адапторов – молекулярных пар стрептавидин:биотин и барназа:барстар.

3. Адресная доставка биогибридного ФЛ наноконплекса в целевые клетки обеспечивается выбором нацеливающих биомолекул - пептид соматостатин (SST) - лиганд соматостатиновых рецепторов (e.g. sst_{2A}) клеток эндокринной системы, нейронов, а также раковых клеток; пептид энкефалин или его синтетический аналог DAMGO - лиганды к опиоидному рецептору; фрагмент антитела 4D5scFv, аффинный к рецептору семейства эпидермального фактора роста HER2/neu.
4. Некоторые типы наночастиц предоставляют возможности оптического имиджинга, неосуществимые с помощью традиционных флуорофоров, включая значительное увеличение чувствительности регистрации/контрастности изображения в биоткани вследствие длительного времени жизни ФЛ в сравнении с временем жизни аутофлуоресценции биоткани, и/или "антистоксового" характера фотолюминесценции, где возбуждение происходит при более низкой энергии фотона, нежели энергия фотона фотолюминесценции. Был разработан метод отложенной оптической регистрации, позволивший получить бесфоновые изображения наночастиц рубина в клетках и НАФ в биоткани, полностью подавив сигналы возбуждающего лазерного излучения и аутофлуоресценции клеток.
5. Были разработаны, построены и опробованы уникальные системы оптической микроскопии для сверхчувствительной визуализации наночастиц: (а) дискретных одиночных наночастиц алмаза, используя высокий показатель преломления алмаза и захват изображения камерой с электронным умножением (EMCCD), работающей в режиме счёта одиночных фотонов; (б) дискретных флуоресцентных наноалмазов и нанорубинов с использованием лабораторной системы лазерно-сканирующего конфокального микроскопа; (в) одиночных антистоксовых нанофосфоров с помощью эпилюминесцентного микроскопа, позволяющего регистрацию с предельной чувствительностью в клетках и тонких тканевых срезах. Также созданы системы оптического фотолюминесцентного имиджинга, позволяющие зондирование локализованных участков ткани, маркированных биогибридными ФЛ наноконплексами. Были продемонстрированы сверхчувствительные сенсоры одиночных ФЛ частиц НАФ на основе микроструктурированного оптоволокна. Было продемонстрировано использование метода FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) для определения локального коэффициента диффузии в биологических тканях.

Научная новизна:

1. Разработаны новые методы получения наночастиц для биомедицинского имиджинга. Монодисперсные коллоиды наноалмазов получены оригинальным

методом кислотной очистки. Доказано существование азотно-вакансионных центров окраски в наноалмазах детонационного происхождения, размером около 5 нм. Также продемонстрирован метод термокислородного травления частиц алмазов, позволяющий производить наноалмазы с контролируемыми размерами. Показано, что окислирование поверхности увеличивает квантовый выход NV-центров, в то время как гидрогенизация – подавляет.

Предложены два оригинальных подхода к получению наноразмерных частиц рубина: метод лазерной абляции и метод шаровой мельницы высокой энергии. Впервые использованы нанорубины в качестве ФЛ частиц, позволяющих добиться предельно возможного оптического контраста на фоне, создаваемом аутофлуоресценцией клеток и светорассеиванием возбуждающего лазерного излучения. Ионизация поверхностных групп кристаллической матрицы нанорубина Al_2O_3 в воде создаёт поверхностный заряд, стабилизирующий нанорубины; а хемосорбция ионов буферного раствора перезаряжает нанокристалл Al_2O_3 , оставляя поверхностный заряд нескомпенсированным, тем самым стабилизируя нанорубины в буферах и биологических жидкостях.

Впервые было получено самое высокое на сегодняшний день значение коэффициента конверсии $\eta_{UC} \leq 8\%$ наноразмерных антистоксовых нанофосфоров за счёт увеличения концентрации легирования ионов активаторов (тулия, Tm) и увеличения интенсивности возбуждающего излучения.

2. Впервые было продемонстрировано, что, несмотря на низкий квантовый выход, наночастицы оксида цинка производят оптически-контрастные изображения на фоне паразитного оптического фона от биологической ткани при нелинейном оптическом возбуждении ультракороткими (~ 100 фемтосекунд) импульсами. Посредством прижизненной визуализации показано, что НЧ ZnO остаются на поверхности нормальной человеческой кожи, не проникая в эпидермальный слой живых клеток. Развита метод нелинейной оптической томографии для оценки распределения в биологических тканях наночастиц ZnO, антистоксовых нанофосфоров, квантовых точек и эндогенных меланосом. Численные оценки концентрации и распределения НЧ ZnO в коже человека с помощью нелинейной оптической томографии были также получены впервые.
3. Демонстрировано применение технологии модульной самосборки для создания фотолуминесцентных наноконплексов на основе наноалмазов и антистоксовых нанофосфоров (НАФ). К поверхности НЧ, покрытой амфифильным полимером, был пришит белковый адаптор барстар, связывающийся с высокой аффинностью с комплементарным белком барстар, входящим в комплекс рекомбинантной сборки барназа-(красный флуоресцентный белок), барназа-(фрагмент антитела 4D5scFv). Демонстрировано присоединение терапевтического агента, фототоксичного флуоресцентного белка Killer Red к НАФ. Впервые было про-

ведено сравнительное исследование иммунохимических свойств молекулярных адапторов стрептавидин:биотин и барназа:барстар, где был выявлен нежелательный фон в случае использования стрептавидин:биотин из-за неспецифического связывания с подложкой и эндогенным биотином, и его подавление в случае использования адапторов барназа:барстар.

4. Впервые был продемонстрирован метод измерения диаметра диэлектрических наночастиц на базе оптической микроскопии одиночных наноалмазов. Была создана оригинальная гибридная атомно-силовая/конфокальная система, позволяющая осуществлять визуализацию, спектрально-оптические и квантовые измерения одиночных наноалмазов и нанорубинов, одиночных центров окраски наноалмазов. С помощью эпиллюминесцентного микроскопа была впервые продемонстрирована предельная чувствительность регистрации одиночного антистоксового нанофосфора, изображение которого было получено через 250 мкм крови, что позволило оценить возможность прижизненного имиджинга одиночных ФЛ НЧ в клетках и тонких тканевых срезах. Впервые была показана возможность оптического зондирования рака молочной железы на глубине 5 мм, маркированного биоконъюгатами НАФ. Был впервые продемонстрирован метод отложенной оптической регистрации, инкорпорированный в конфигурации как лазерно-сканирующего конфокального, так и эпиллюминесцентного микроскопов. При получении изображения нанорубина с временем жизни ФЛ $\tau_{NR} = 3,3$ мс был полностью подавлен фон возбуждающего лазерного излучения и аутофлуоресценции, показав улучшение соотношения сигнал-шум, как минимум, в 100 раз.

Научная и практическая значимость Научная значимость работы имеет несколько важных аспектов.

1. Были раздвинуты границы понимания фотофизики наноматериалов на примере изучения свойств азотно-вакансионных центров в наноалмазах, Cr^{3+} излучателей в нанорубинах и комбинации сенсibilизаторов (Yb^{3+})⁺ активаторов (Er^{3+} или Tm^{3+}) в антистоксовых нанофосфорах;
2. была разработана методология полномасштабной сборки биогридных ФЛ наноконплексов, начиная с производства/синтеза НЧ до сборки и тестирования функциональных модулей;
3. были исследованы механизмы рецептор-зависимого эндоцитоза наночастиц;
4. были введены в практику методики неинвазивного оптического имиджинга НЧ для исследования проницаемости кожи, классификации физиологического состояния биоткани на основе анализа её коллагенового матрикса.

Практическая значимость данных разработок заключается в их использовании в медицинской диагностике, а также в новой научной дисциплине, называемой тераностикой, объединяющей в единое процедурное целое диагностику и терапию.

Возможность адресной доставки биогибридного наночастичного комплекса к патологически изменённым клеткам, дающая возможность визуализации патологии, а также терапевтического воздействия на неё, является новым, перспективным направлением в наномедицине. Практическая значимость представленной работы также заключается в новых методиках, позволяющих систематически исследовать проницаемость человеческой кожи для наночастиц, приводящих к созданию нетоксичных косметических и фармакологических препаратов, таких как солнцезащитных кремов на основе наночастиц оксида цинка, а также дермальных и трансдермальных средств доставки терапевтических препаратов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается следующими показателями:

- Строгостью применяемых экспериментальных методик и анализов полученных данных. Результаты получены на современном сертифицированном оборудовании.
- Все заявленные результаты опубликованы в солидных научных журналах, пройдя строгую критическую оценку рецензентов.
- Результаты находятся в соответствии с результатами, полученными другими авторами.

Апробация работы Основные результаты работы докладывались на:

1. Серии семинаров в научно-исследовательских учреждениях, в которых выполнялась работа:
 - Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, в рамках семинаров Лаборатории Оптической Тераностики;
 - Университет Маккуори (Сидней, Австралия), в частности на семинарах MQ Biofocus Research Centre;
 - Институт проблем лазерных и информационных технологий российской академии наук (ИПЛИТ);
 - Институт биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова Российской академии наук (ИБХ).
2. Приглашённых докладах в рамках международных конференций: 1. The 4th International Conference on Science and Applied Research, Post-Genome Methods of Analysis in Biology and Laboratory and Clinical Medicine, 29.10 – 1.11.2014, Kazan; 2. XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), 13.07 – 18.07.2014, Moscow; 3. Science for Future, 17.09 – 20.09.2014, St. Petersburg; 4. International Symposium Topical Problems of Biophotonics (TPB), July 2013, Nizhniy Novgorod; 5. Optics in Life Sciences, OSA Topical meeting, Monterey, April 2011, CA, USA; 6. Laser Applications in Life Sciences (LALS) 2010, Oulu, Finland; 7. III Nanotechnology International Forum (Rusnano), 2010, Moscow; 8. Laser Applications in Life Sciences (LALS) 2008, Taiwan; 9. Australian Institute of Physics Forum, December 2008, Adelaide; 10. International Conference on Coherent and

Nonlinear Optics/International Conference on Lasers, Applications, and Technologies, ICONO/LAT 2007, Minsk, Belarus, 28.05 – 1.06.2007; Advanced Optical Imaging Workshop, Melbourne, 20.11 - 21.11.2006; 11. 5th International Symposium “Laser Technologies and Lasers”, Smolyan, Bulgaria, 4.10 - 7.10.2006.

3. Международных конференциях с полномасштабным рецензированием трудов конференции: 1. NanoScience + Engineering, SPIE Optics+Photonics, 19.08 – 21.08.2014, San-Diego, USA; 2. Conference on Novel Biophotonic Techniques and Applications II (NBTA), Munich, Germany, 12.05 - 14.05.2013 (Novel Biophotonic Techniques and Applications II Book Series: Proceedings of SPIE vol. 8801, 88010C, 2013); 3. Novel Biophotonic Techniques and Applications II, Munich, Germany, 12.05.2013; 4. Novel Biophotonics Techniques and Applications, 22.05 - 24.05.2011, Munich, Germany (Proc. SPIE, vol. 8090, 80900V, 2011); 5. Photonics 2010, Tenth International Conference on Fiber Optics and Photonics (Proceedings of SPIE Vol. 8173, 2011); 6. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering, vol. 7715 (2010); 7. SPIE Photonics Europe 2010. Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care, 12.04 - 16.04.2010, Brussels, Belgium; 8. Optical methods and Optical Coherence Tomography in Biomedicine IX Conference, 23.01 - 26.01.2005, San Jose, CA, USA; 9. Optical methods and Optical Coherence Tomography in Biomedicine IX Conference, 27.01 - 30.01.2004, San Jose, CA, USA
4. В общей сложности, по результатам представленной работы сделано более 80 докладов различных форматов.

Диссертационная работа была выполнена при поддержке следующих грантов под руководством соискателя:

1. Российский фонд фундаментальных исследований (РФФИ):
 - Инициативные проекты: 11-02-01542-А (2011-2012); 12-04-01258-А (2012-2013); 13-02-01371-А (2013-2015);
 - Ориентированные фундаментальные исследования по актуальным междисциплинарным темам: 11-04-12113-ОФИ-М-2011 (2011-2012);
 - Фундаментальные ориентированные исследования молекулярной и клеточной организации биологических структур и процессов: 13-04-40227-Н КОМФИ (2013-2015).
2. Министерство образования и науки РФ:
 - Федеральные целевые программы: Научные и научно-педагогические кадры инновационной России, мероприятие 1.9, 2012-1.9-519-001 (2012-2013); Прикладные научные исследования в рамках деятельности технологических платформ по приоритетному направлению «Науки о жизни» в рамках мероприятия 1.3, 14.578.21.0030 (RFMEFI57814X0030) (2013-2015);
 - Грант Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в

российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях, подведомственных Федеральному агентству научных организаций, и государственных научных центрах Российской Федерации (Мегагрант), 14.Z50.31.0022 (2013-2015).

Личный вклад. Автор принимал активное участие в получении всех перечисленных выше результатов. Были подготовлены и опубликованы следующие монографии: [73–75, 79, 80]. Бóльшая часть экспериментальных результатов была получена сотрудниками группы, возглавляемой соискателем. Вклад соискателя в этом случае являлся концептуализацией основной идеи публикации, руководящее участие в текущих работах и значительное участие в написании статей. В частности, были опубликованы следующие работы в составе следующих лабораторий:

1. Optical Biomedical Imaging and Sensing, Университет Маккуори (Macquarie University, Sydney, Australia): [4, 14, 17, 23, 24, 34, 42, 45, 54–56, 58, 59]
2. Biomedical Imaging and Sensing, Университет Квинсленда (The University of Queensland, Brisbane, Australia): [2, 7, 8, 8, 12, 46–48, 52, 63, 67–69, 81]
3. Лаборатория Оптической Терапии (Нижегородский Государственный Университет им. Н.И. Лобачевского): [16, 18]
4. Институт Биоорганической Химии им. Шемякина и Овчинникова Российской Академии Наук (ИБХ): [22, 49, 57].

В рамках проектов, которые возглавлял соискатель в Институте проблем лазерных и информационных технологий Российской академии наук (ИПЛИТ) были опубликованы следующие работы: [1, 25–27], а также совместно с Университетом Маккуори [17, 34].

Результаты, опубликованные в статьях [9, 10, 21, 38, 43, 57, 64], были получены в рамках сотрудничества с другими исследовательскими группами. Роль соискателя в получении, интерпретации полученных результатов была существенной, что проявляется в расположении авторских имён в публикациях. Например, соискатель является автором-корреспондентом в следующих статьях: [9, 10, 21, 57].

В серии ранних статей автор выполнял основную экспериментальную работу, анализ результатов и готовил статьи к публикации [3, 11, 50, 70–72, 76–78].

Результаты, опубликованные в статьях [5, 13, 22, 29, 30, 40, 41, 44, 49, 51, 53, 61, 62, 66], были получены в рамках сотрудничества с другими исследовательскими группами. Также вместе с коллегами были опубликованы следующие обзоры по относящейся к данной работе тематике: [29, 39, 60].

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 69 печатных изданиях [1–5, 7–14, 16–18, 21–27, 29, 30, 34, 38–64, 66, 67, 69–81], 12 – приглашённых докладах на конференциях; 13 – в тезисах докладов международных конференций с полномасштабным рецензированием трудов конференции.

Объём и структура работы Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения и одного приложения. Полный объём диссертации составляет 209 страниц с 60 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 231 наименование.

Благодарности

Настоящий труд является, по-настоящему, коллективным, и был бы невозможен без участия многочисленных коллег и единомышленников. Прежде всего хочу поблагодарить своих научных консультантов, В. Я. Панченко (действительного члена РАН) и С. М. Деева (члена-корреспондента РАН). Знакомство с Владиславом Яковлевичем Панченко и обсуждение тематик, относящихся к настоящему труду проектов (при активном участии А. С. Ахманова, которому также выражаю признательность), заложили основу настоящей работы. Многолетнее сотрудничество с Сергеем Михайловичем Деевым, его постоянное дружеское участие в моей работе со дня её начала до самых последних дней её завершения, сделало эту работу выполнимой, полезной и необыкновенно интересной. Широкий кругозор, компетентность Сергея Михайловича в таких дисциплинах, как химия, биохимия, биология и др., позволили в большой степени собрать воедино многочисленные компоненты этого мультидисциплинарного проекта.

Основы представленной в настоящей работе технологии фотолюминесцентных наноматериалов закладывались ещё в Университете Квинсленда (Австралия) с 2004 г., где в сотрудничестве с Т. Плахотником были проведены первые эксперименты по визуализации наноалмазов в клетках. Его я и хочу поблагодарить за глубокие обсуждения фотофизики наноматериалов и партнёрскую поддержку. Продолжение этой работы в Университете Маккуори (Австралия) нашло поддержку моих новых коллег, прежде всего, проф. Евы Голдис, чья энергия, энтузиазм и всесторонняя поддержка заслуживают самых тёплых слов моей признательности. Партнёрское сотрудничество с Дж. Рабо, Д. Джином и др. коллегами университета заслуживают упоминания в этом разделе. Как это часто случается, огромный вклад в представленную программу исследований внесли руководимые мною аспиранты, К. Сит, Б. Смит, Дж. Такер, С. Жао, В. Сринивасан, Дж. Сонг, А.-М. Надорт и Е. Ивукина (в замужестве, Гребеник) – их участие неоценимо!

Активное сотрудничество с российскими научными группами началось с совместной деятельности в лаборатории ИПЛИТ РАН (директор, В. Я. Панченко) под руководством В. И. Соколова, с которым мне посчастливилось инициировать новое направление фотолюминесцентных наноматериалов и лазерных технологий для применений в биомедицине. Активное, практически ежедневное, взаимодействие с сотрудниками этой динамичной лаборатории, включая В. А. Семчишена, Е. В. Хайдукова и покойного В. Н. Семиногова, заслуживает самых тёплых слов. Глубокие исследования фотофизики новых наноматериалов, оптических имиджинговых технологий получили своё активное развитие в этом коллективе.

Оформление начатых научных исследований в новое мультидисциплинарное направление оказалось возможным только после вовлечения в сферу совместной деятельности таких экспертов мирового уровня, энтузиастов своего дела, как А. В. Нечаев (Московский государственный университет тонких химических технологий), заложивший основы неорганического синтеза антистоксовых нанофосфоров, А. Н. Генералова (ИБХ РАН), решившая сложнейшие проблемы поверхностной модификации наночастиц, А. Б. Шехтер и А. Е. Гуллер (Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова), обеспечившие идущим исследованиям столь востребованное биомедицинское наполнение. Спасибо огромное этой бесценной команде!

Невозможно не отметить огромную поддержку моих новых коллег из Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского, в котором я возглавляю лабораторию. Моя глубокая благодарность В. А. Воденееву за незыблемую научную и организационную поддержку лаборатории и работы над настоящей диссертацией, в эти первые турбулентные месяцы создания лаборатории, а также за тщательное прочтение и предложения по улучшению ключевых частей диссертации. Хочу поблагодарить И. В. Балалаеву, Л. Г. Клапшину, а также замечательный коллектив молодых сотрудников и аспирантов за деятельный настрой и заряженность на получение научных результатов.

Сердечно благодарю Н. Ю. Дееву за её тщательнейшую редакторскую правку настоящей работы, исправления многочисленных ”англицизмов”, приобретённых за многие годы работы за рубежом.

Чувствую совершенно необходимым поблагодарить своё семейство за долгие годы терпения моих поздних возвращений и длительных командировок.

Содержание работы

В первой главе введения обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, приводится обзор научной литературы по гибридным биомолекулярным фотолюминесцентным наноконструкциям. Отмечается, что оптический имиджинг с применением молекулярно-специфичных маркеров на основе фотолюминесцентных наночастиц представляет собой важное применение наноматериалов. Так, становится возможной визуализация сложных биологических систем и процессов на внутриклеточном и тканевом уровнях в наиболее полном контексте, позволяя довести чувствительность до предельного уровня, т.е. уровня регистрации одной биомолекулы. Эти исследования требуют использования фотолюминесцентных зондов с особыми характеристиками, такими как фотостабильность, которыми не обладают существующие флуоресцентные красители. Фотообесцвечивание, т.е. переход одиночных излучателей в тёмные состояния, особенно нежелательно в исследованиях одиночных молекул, а также в микроскопии сверхвысокого разрешения, например, отмеченной Нобелевской премией по химии в 2014 г. микроскопии на основе подавления спонтанного испускания [65], требующей высокой интенсивности возбуждающего излучения.

Благодаря контролируемым химическим свойствам поверхности НЧ также широко используются в приложениях, например, адресной доставке [37]. Это реализуется путём конструирования и сборки гибридного биомолекулярного наноконструкта со структурой, схематично представленной на Рисунке 1. Биоконструкция включает в себя твёрдое, предпочтительно, физически стабильное и химически инертное ядро – наночастицу, поверхность которой модифицирована (процесс также известный как поверхностная функционализация) связанными с поверхностью молекулами, посредством покрытия полимерами или заключением НЧ в оболочку (на Рисунке 1, coating – **coat**). Это приводит к созданию на поверхности НЧ биосовместимых функциональных групп, служащими анкерами для биомолекул, выполняющих конкретные функции, включающих нацеливание на (targeting – **tar**) конкретные клеточные рецепторы. Другим классом присоединяемых молекул являются терапевтические агенты, например, лекарственные препараты (therapeutic – **ther**). Часто желательно делать комплексы НЧ контрастными на фоне аутофлуоресценции клеток/ткани, делая возможной визуализацию НЧ, их траектории и функциональные состояния. Это реализуется посредством контрастных агентов (**CA**), которые либо присоединяются к поверхности НЧ, либо – что более практично и получает всё более распространение – само ядро НЧ обладает свойствами контрастного агента.

Диагностика и терапия новообразований остаётся самой актуальной задачей медицины, ставящей серьёзные задачи перед дисциплинами живых систем. В последнее десятилетие в рамках персонализированного подхода медицины ключевую

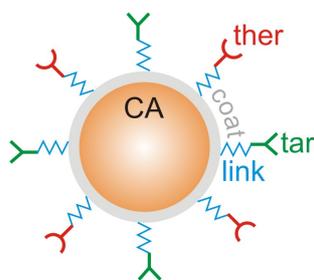


Рис. 1: Схема биогбридных фотолуминесцентных нанокмплесков, включающих следующие ключевые компоненты: **CA**, контрастный агент; **ther**, терапевтический агент; **tar**, нацеливающий агент; **link**, молекулярный адаптор; **coat**, функционализированное поверхностное покрытие.

роль всё больше играет "тераностика" – новое направление, подразумевающее создание мультифункциональных агентов, сочетающих в себе диагностические и терапевтические свойства [19]. Использование таких агентов обеспечивает возможность одновременной молекулярной диагностики патологии и специфическое направленное воздействие на опухолевые клетки, а также визуализацию распределения терапевтического агента в организме и мониторинг терапевтического эффекта. Наиболее перспективной платформой для создания соединений для тераностики представляются фотолуминесцентные наночастицы (ФЛ НЧ), которые имеют целый ряд преимуществ в сравнении с традиционными флуоресцентными материалами. В идеальном сценарии адресной доставки, включающем в себя оптимальный дизайн направляющей молекулы, биоконъюгат накапливается исключительно в патологическом очаге, тем самым делая его контрастным, а значит, различимым оптическими методами. Однако, как это было описано во введоном разделе, существует несколько серьёзных проблем на пути продвижения данной методики к биомедицинским применениям, что ограничивает чувствительность метода оптического имиджинга с использованием флуоресцентных контрастных агентов исследуемой (живой или *in vivo*) биологической ткани. Создание многофункциональных комплексов, включающих в себя направляющие и терапевтические модули, а также средства защиты от ферментной деградаци, представляют серьёзную проблему, решение которой возможно с использованием ФЛ НЧ. Наиболее перспективной платформой для создания соединений для диагностики представляются наночастицы различной природы, обладающие уникальным набором свойств, привлекательных для получения биогбридных ФЛ нанокмплесков с желаемой избирательностью действия. К таким свойствам НЧ относятся:

1. программируемость физических и химических характеристик в зависимости от размеров, состава и способов получения;
2. наличие химически активных функциональных групп на поверхности, позволяющие легко модифицировать частицы, оптимизируя их для конкретной задачи;

3. большая эффективная площадь поверхности, представляющая собой стыковочную платформу для прочного крепления значительного количества биологических молекул различной функциональности, в том числе направляющих/нацеливающих, терапевтических, визуализирующих;
4. оптимальный размер, определяющий преимущественное накопление наночастиц в опухолевой ткани за счёт её морфологических особенностей – эффект увеличенной проницаемости и удержания (EPR) [32].

Центральными характеристиками гибридных биомолекулярных ФЛ наноконструкций являются стабильная ФЛ яркость (определяемая как произведение квантового выхода η на сечение поглощения возбуждающего излучения σ_a), уникальные спектральные свойства, и не встречающаяся в живых системах фотодинамика [продолжительное время жизни ФЛ (τ_{PL}), предпочтительно, измеряемое в миллисекундах]. Все эти характеристики необходимы для реализации прижизненной визуализации биогибридных сборок в клетках-мишенях вплоть до одиночных НЧ, что труднодостижимо на современном уровне развития нанотехнологии и биофотоники.

В настоящей работе представлены исследование несколько типов ФЛ наночастиц в контексте оптического имиджинга клеток/ткани: полупроводниковые квантовые точки (КТ), коммерчески доступный ФЛ нанотехнологический материал, который может служить эталоном для сравнения фотофизических свойств с другими представляемыми НЧ; флуоресцентные нанодиамамы (ФНА); нанорубины; и наноразмерные антистоксовыми фосфоры (НАФ). Обоснованием выбора этих ФЛ НЧ нового поколения является разнообразие свойств свечения этих важных классов нано-излучателей.

Во второй главе введения приводится обзор научной литературы по нанотоксикологии и трансдермальной кинетике оксида цинка, который также является фотолюминесцентным наноматериалом. Широкое использование наноматериалов поставила вопрос о безопасности их применений в промышленности, медицине и повседневной практике. В частности, такие наноматериалы, как диоксид титана (TiO_2) и оксид цинка (ZnO), находящие широкое применение в сфере косметики, и, в частности, в качестве фильтров УФ излучения в солнцезащитных кремах, вызывают озабоченность в связи с возможностью их проникновения в организм через кожу. В связи с этим требуется систематическое изучение распределения наночастиц в коже и путей их проникновения, что можно использовать для предотвращения нанointоксикации организма частицами, а также для трансдермальной доставки лекарственных препаратов. Принято считать, что наночастицы (НЧ) не проникают через роговой слой необработанной здоровой кожи человека в силу барьерных свойств этого слоя. Однако, как один из возможных сценариев, НЧ ZnO могут растворяться в коже, с последующим трансдермальным транспортом ионов Zn^{2+} . В этой главе излагаются ключевые положения нанотоксикологии, описывается прогресс в исследованиях тран-

сдермального транспорта ZnO с особым ударением на инновационных методах прижизненного оптического имиджинга, позволяющих получить важную информацию о распределении ФЛ НЧ в биоткани, а также оценить морфологию самой биоткани.

Третья глава посвящена описанию результатов соискателя по исследованию наноалмазов (НА), в частности, флуоресцентных наноалмазов (ФНА), как наночастичной основы фотолюминесцентных биогибридных структур. ФНА представляет собой контрастный агент нанокомплекса (см. Рисунок 1). Высокие значения квантового выхода, сечения поглощения, практически неограниченная фотостабильность, а также уникальные спин-селективные оптические свойства привлекают внимание исследователей, делая NV^- часто встречающимся в высокорейтинговой литературе. Такие качества НА, как изобилие биосовместимых функциональных групп и их нетоксичность для живых систем, сделали их привлекательным объектом биологически-ориентированных исследований.

Рекордно высокий показатель преломления алмаза ($n_{ND} \approx 2,4$ в видимом оптическом диапазоне) выделяет его на фоне других светорассеивающих структур клетки. Рисунок 2 показывает наночастицы алмаза, интернализированные в клетках с помощью технологии мицелл [52]. С другой стороны, этот эксперимент показывает, что оптический контраст за счёт эффективного светорассеяния недостаточен для эффективного подавления оптических сигналов от клеточных структур. Альтернативным механизмом оптического контраста оказывается флуоресценция (фотолюминесценция), требующая замены НА на флуоресцентные наноалмазы.

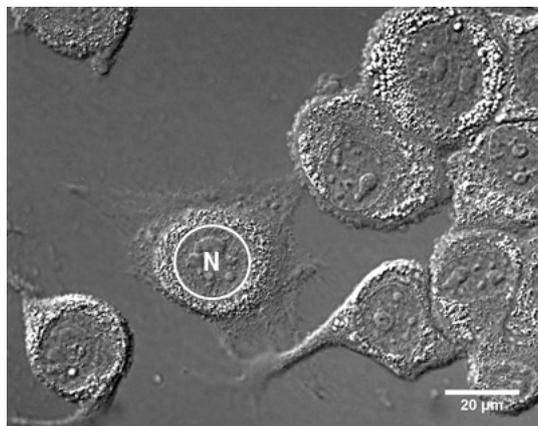


Рис. 2: Изображение частиц наноалмазов, интернализированных в клетки 3Т3, полученное с помощью дифференциальной интерференционной микроскопии. Высокий оптический контраст наноалмазов на фоне собственного светорассеяния клетки проявляется как яркое окружение вокруг сравнительно тусклых овалов ядер клетки (контур одного ядра обозначен сплошной белой линией с литерой "N" в центре), непроницаемых для НА. Воспроизведено со ссылки [52].

ФНА позволяют частично подавить световой фон из-за лазерного возбуждения и аутофлуоресценции клеток/ткани посредством спектральной фильтрации. На Рисунке 3(а) показано изображение клетки, инкубированной с биогибридными

сборками ФНА [56]. Хорошо заметно (яркое красное пятно) изображение одиночного ФНА, хороший контраст которого обуславливается спектральной фильтрацией сигнала ФНА в красной-инфракрасной спектральных областях и подавлением засветок от возбуждающего лазерного излучения и аутофлуоресценции клетки.

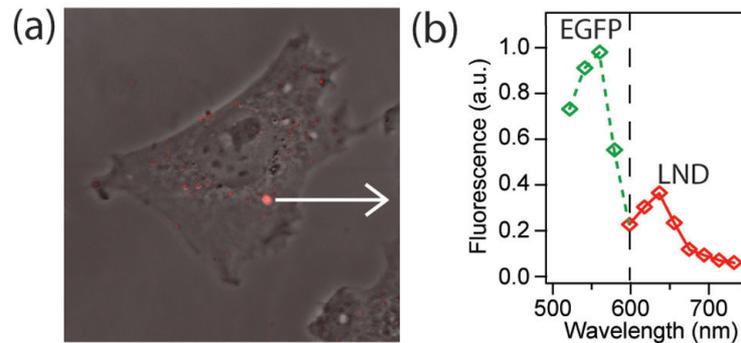


Рис. 3: Визуализация одиночного флуоресцентного наноалмаза биоконъюгированного с зелёными флуоресцентными белками в клетке яичника китайского хомяка (CHO) . (a) Изображение полученное посредством лазерно-сканирующего флуоресцентного микроскопа; стрелка указывает на изображение одиночного ~ 100 -нм ФНА (красное пятно). (b) Флуоресцентные спектры ФНА (LND) и зелёных флуоресцентных белков (EGFP), пришитых к поверхности наноалмаза. Воспроизведено со ссылки [56].

Поскольку размеры биомолекул варьируются от долей нанометра (пептиды) до десятков нанометров (антитела), желательно использовать наночастичные зонды с размерами, сравнимыми с размерами белков, чему удовлетворяют сверхмалые (или ультрадисперсионные алмазы с размерами < 5 нм, УДА). Вместе с тем, само существование флуоресцентных УДА за счёт активных NV^- центров долгое время ставилось под сомнение [6]. Группе коллег из Университета Квинсленда и соискателю удалось показать существование пика электронного парамагнитного резонанса, характерного для NV^- центра в УДА [51]. Другим подходом к уменьшению фона ФЛ sp^2 углерода является имиджинг одиночной гранулы НА [9]. Наноалмазы сверхмалых размеров на плоской поверхности подложки регистрировались с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) с одновременной регистрацией флуоресцентным конфокальным микроскопом. Как видно на Рисунке 4, субпопуляция различимых на АСМ изображениях НА излучает флуоресцентный сигнал, идентичной с NV^- спектральной природы и фотостабильности. Испускание одиночного фотона одиночным NV^- центром было также продемонстрировано с использованием коррелятора интенсивности флуоресценции Хэнбери Брауна-Твисса. Впервые, был зарегистрирован эффект мерцания в одиночных НА, проявляющийся как прерывистая флуоресценция при непрерывном возбуждении, т.е. переключение эмиссии из состояния “ВКЛ” в состояние “ВЫКЛ”. Явление “мерцания” проявляется практически во всех типах одиночных квантовых излучателей, включая флуоресцентные молекулы, атомы и квантовые точки (КТ), а его интерпретация признаются одним из

серьёзнейших вызовов современной физики [15]. Одиночный NV^- в одиночном наноалмазе оказался востребованной “мерцающей” квантовой системой, позволяющей записывать и анализировать продолжительные временные траектории ФЛ.

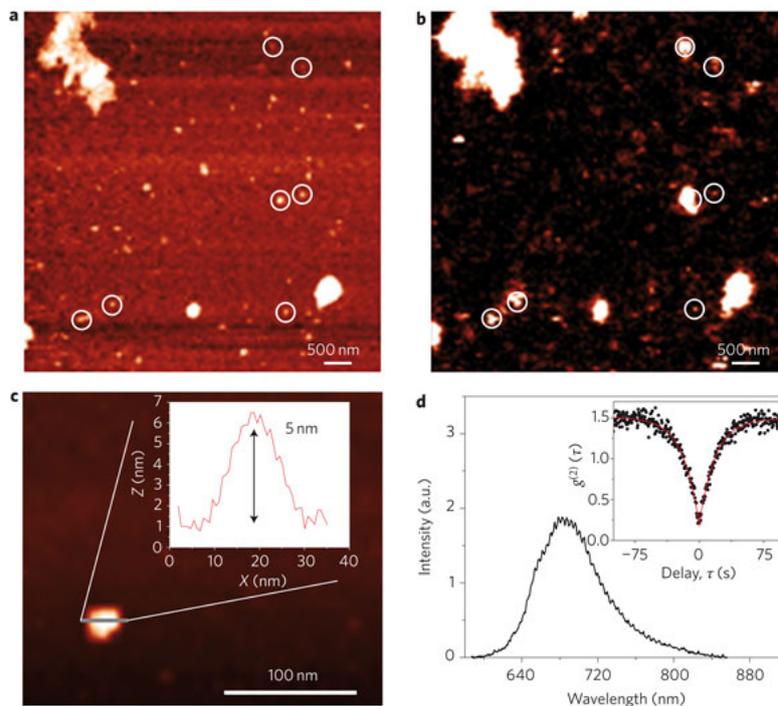


Рис. 4: Соответствие атомно-силового (a) и флуоресцентного конфокального(b) изображений наноалмазов. Яркие пятна – NV^- эмиттеры. (c) Увеличенное АСМ изображение и соответствующий профиль поверхности (вставка) одного из дискретных нанокристаллов алмаза высотой 5 нм. (d) Спектр испускания NV^- центра и соответствующая запись корреляционной функции 2-го порядка $g^{(2)}$ (вставка). Воспроизведено со ссылки [9].

Прогресс в синтезе наноалмазов, модификации их поверхности, демонстрация пренебрежимо малой цитотоксичности НА, а также исследования флуоресцентных свойств ФНА создали солидный задел для их применений в оптическом биологическом имиджинге. И теперь для создания интерфейса между наночастицей неорганической природы и органическим миром живых систем требуются функциональные биомолекулы, крепко связанные (биоконъюгированные) с поверхностью НА. Поверхность НА после кислотной и/или кислородно-термической очистки заселена биосовместимыми кислородосодержащими группами, в частности, $COOH$ -группами, которые универсально используются в живых системах для сборки белковых полимеров путём связывания вместе COO -терминала (C-терминал) одного белка с амино (NH_2)-терминалом (N-терминал) другого белка, образуя сильную ковалентную амидную связь. Соискателем была продемонстрирована универсальная платформа биоконъюгации, в основе которой лежит модульная сборка фотолуминесцентных биогибридных комплексов [56], первоначально разработана проф. Деевым и коллегами [35]. Этот подход основан на высокоаффинных белковых

адапторах, барназа:барстар (Бн:Бс), и реализовывался следующим образом (см. Рисунок 5). Ковалентно связанный субмодуль ФНА-Бс крепко и высокоспецифично связывается с заранее подготовленным субмодулем Бн-Х простым смешиванием двух растворов этих реагентов. “Х” обозначает функциональную биомолекулу или наночастицу. Эта биомолекула может быть нацеливающей молекулой, как например, антитело, фрагмент антитела или пептид, или терапевтическим агентом.

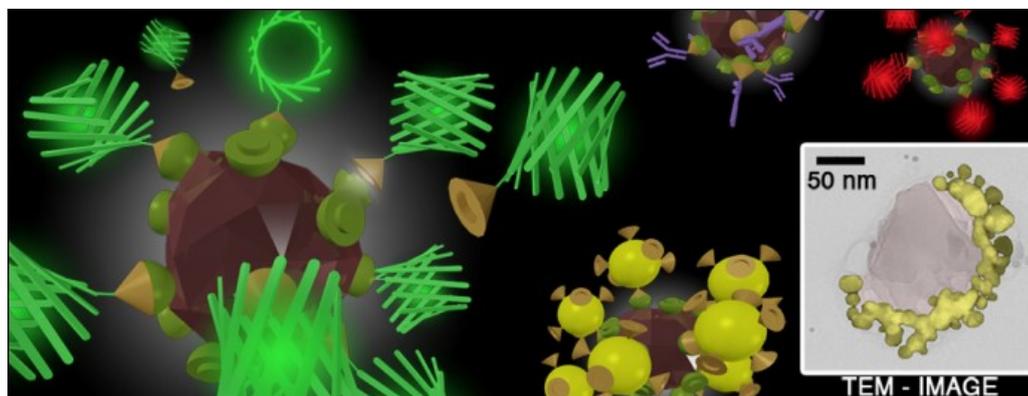


Рис. 5: Универсальная платформа для биоконъюгации макромолекул и наночастиц к поверхности нано-носителя, в данном примере, наноалмаза. Ковалентно связанные с поверхностью алмаза молекулы барстар (зелёные полусферы) способны селективно и крепко связываться с молекулами барназы (коричневые конусы), которые в свою очередь подготовлены соединёнными с нужными макромолекулами, например, зелёный флуоресцентный белок (**фрагмент слева**), антитела (**фрагмент вверху**), или наночастицами, например, нанозолотом (**фрагмент внизу**). ТЭМ изображение показывает такое соединение наноалмаза-нанозолото. Воспроизведено со ссылки [56].

Как стало очевидно на примере квантовых точек и флуоресцентных наноалмазов, применение методов спектральной фильтрации оказывается зачастую недостаточным, чтобы подавить световой фон из-за аутофлуоресценции клеток/биоткани и светорассеяния возбуждающего излучения. В четвертой главе представлены предварительные результаты производства, характеристики и первые демонстрации применения нанорубинов в молекулярной и внутриклеточной визуализации. В начале раздела описывается метод фемтосекундной лазерной абляции для получения нанорубинов с использованием установки, схематическая диаграмма которой показана на Рисунке 6. Метод выбран в силу его простоты и универсальности, имея очевидным недостатком дороговизну установки [14]. Для того чтобы довести наработку коллоидных нанорубинов до количества, измеряемого в граммах, был разработан метод, основанный на размалывании порошка рубина в шаровой мельнице высокой энергии [42].

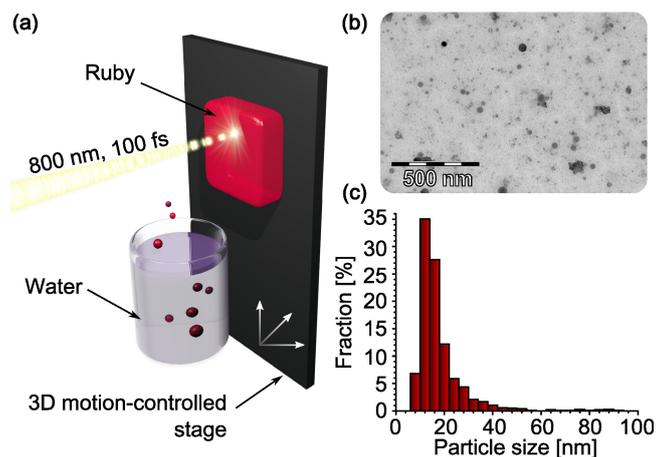


Рис. 6: **(a)** Схематическая диаграмма установки для фемтосекундной лазерной абляции рубина. На рисунке **(b)** показана электронная микрофотография полученных наночастиц; а их размерный диапазон графически представлен на рисунке **(c)**. Воспроизведено со ссылки [14].

Фотолюминесцентные свойства нанорубинов изучались с помощью гибридного атомно-силового (АСМ) и флуоресцентного конфокального микроскопов, подобных описанным в главе 3 [14]. Основные результаты оптического имиджинга образца представлены на Рисунке 7.

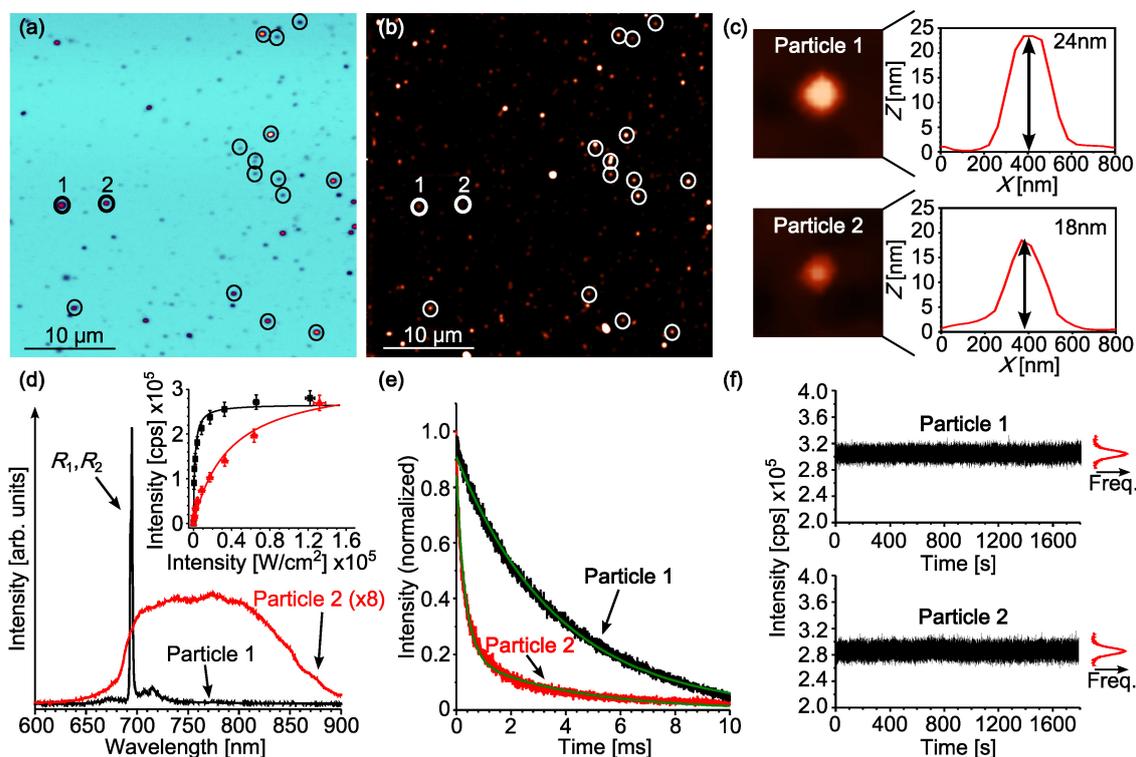


Рис. 7: **(a)** Изображение, полученное с помощью флуоресцентного лазерно-сканирующего микроскопа с возбуждением от лазера на 532 нм и **(b)** соответствующее АСМ изображение. На **(c)** фрагмент АСМ изображения увеличен. ФЛ спектры частиц 1 и 2 показаны на **(d)**, их кривые насыщения представлены на вставке. График ФЛ от времени представлен на **(e)**. Яркость ФЛ частиц в продолжении времени наблюдения при непрерывном возбуждении представлена на **(f)**. Воспроизведено по ссылке [14].

Отличительной характеристикой стабильных коллоидов является большая величина дзета-потенциала $|\zeta| > 20$ мВ, которая составляла 39 мВ в случае водного коллоида нанорубинов, что и объясняло наблюдаемую стабильность коллоида в течение одного месяца и более, и объясняется сильным электростатическим отталкиванием НЧ. Измерения ζ -потенциала показали замечательную стабильность нанорубинов в широком спектре значений рН в различных анионных буферах. Наблюдаемая стабильность проистекает из амфотерной природы нанокристаллического матрикса нанорубина Al_2O_3 , и объясняется поверхностным зарядом Al_2O_3 , образуемым за счёт реакции ионного комплексообразования.

Применение коллоидных нанорубинов и нанокорундов в науках о жизни требует химически доступных функциональных групп на их поверхности для конъюгации биомолекул. С этой целью была продемонстрирована модификация поверхности нанокорундов силаном с использованием широко используемого реагента аминопропил-триметокси-силана (APTES). Первоначально насыщенная ОН-группами поверхность нанокорунда, используемая для демонстрации метода, оказалось покрытой амино-группам (NH_2), что позволило крепко связывать биомолекулы и лекарственные препараты с поверхностью за счёт формирования прочной ковалентной связи [42].

Для демонстрации ключевых преимуществ нанорубинов в оптическом имиджинге в схему экспериментальной установки (Рисунок 7) был встроен модуль отложенной регистрации. Основная концепция метода заключается в задержке фоторегистрации после прерывания возбуждения ФЛ образца, длительность которой выбирается с расчётом полного затухания лазерного светорассеяния и короткоживущей аутофлуоресценции биологической системы, так что регистрируются только фотоны фотолюминесценции образца. В проведённом эксперименте лазер непрерывного действия был заменён пикосекундным диодным лазером, а фотоприёмник, лавинный фотодиод, запускался с временной задержкой около 10 мкс. Анализ изображений демонстрирует значительное увеличение контраста изображения нанорубинов (75 раз), покрытых слоем флуоресцентного красителя Родамина 6Ж, в случае использования метода отложенной регистрации. Изучение контраста нанорубинов в клетках, маркированных КТ, представляло серьёзный тест разработанного метода из-за совпадения спектра излучения КТ и нанорубинов. Рисунок 8 показывает, что спектральная фильтрация существенно подавляет сигналы аутофлуоресценции клеток и КТ, в то время как отложенная регистрация подавляет их полностью.

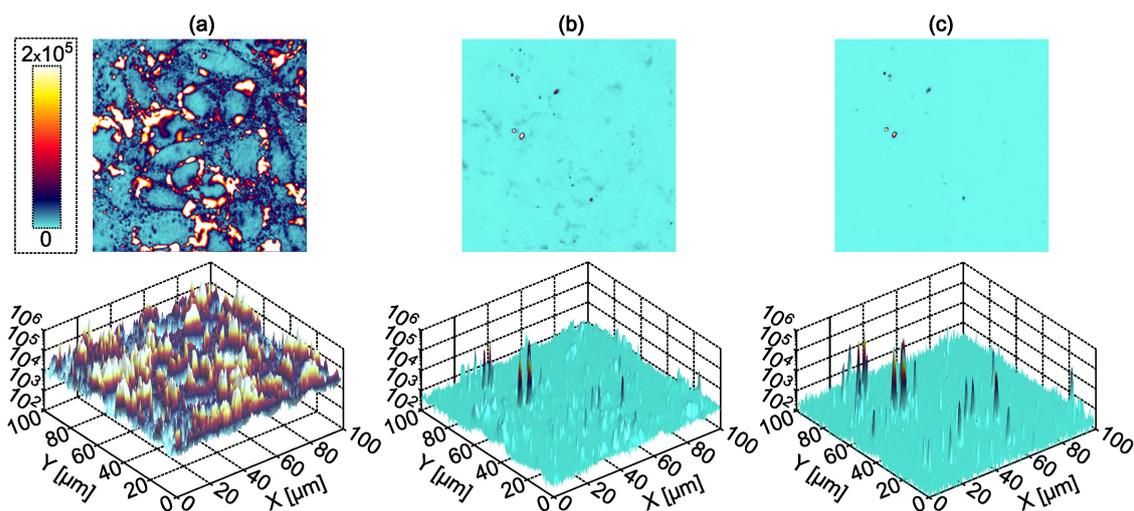


Рис. 8: Изображения

клеток СНО-К1, инкубированных с квантовыми точками и нанорубинами, полученные с помощью: **(a)** флуоресцентного конфокального микроскопа; **(b)** с оптимизированной для регистрации нанорубинов фильтрацией; **(c)** с включённым модулем отложенной регистрации. Воспроизведено по ссылке [14].

Одним из целевых применений фотолуминесцентных наноматериалов является отслеживание молекулярного трафика в клетках, где фотостабильность ФЛ НЧ даёт ключевое преимущество в сравнении, например, с органическими флуоресцентными красителями. Молекулярный трафик, запущенный сигнальными коммуникационными процессами в клетке, как, например, μ -опиоидными рецепторами в нейронах, представляет особый интерес, а исследование транспортных путей и рециркуляции рецепторов является одной из ключевых проблем клеточной биологии. На Рисунке 9(a) представлен флуоресцентный сигнал, записанный сразу после добавления аффинных к μ -опиоидным рецепторам лигандов DAMGO в питательную среду клеток. Видно быстрое падение сигнала из-за изменения поляризации мембраны в ответ на активацию μ -опиоидных рецепторов. Разработанная соискателем и коллегами методика оптического имиджинга и трекинга дискретных лиганд-рецепторных комплексов, в настоящем случае, маркированных нанорубинами, с использованием метода отложенной регистрации представляет большой интерес для биомедицины. На Рисунке 9(c) показан первый кадр видеоклипа, представляющего живую клетку, в которой отчётливо регистрируется неспецифическая интернализация нанорубинов, добавленных в питательную среду. В полномасштабном видеоклипе можно видеть кинетику перемещений нанорубинов в клетке.

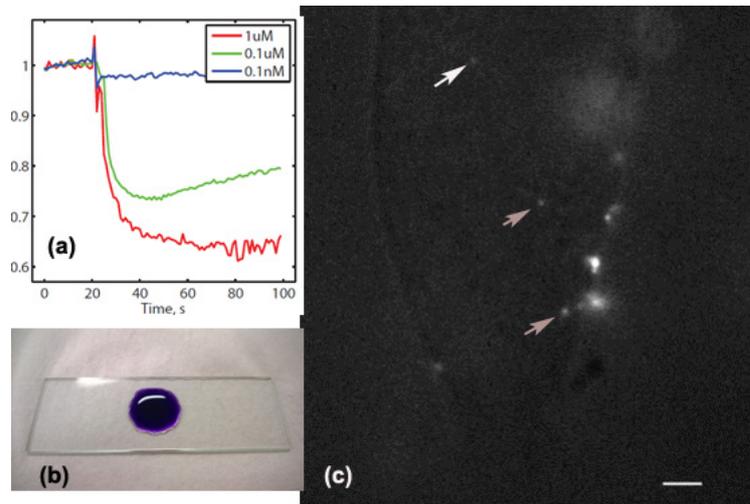


Рис. 9: Динамический имиджинг нанорубинов в клетке. **(a)** Временная траектория потенциал-зависимого флуоресцентного красителя FLIPR после добавления препарата DAMGO, показывающая начало сигнального цикла клетки. **(b)** Фотография сильно-светопоглощающего флуоресцентного красителя FLIPR на предметном стекле, дающая представление о трудностях сверхчувствительного оптического имиджинга. **(c)** Первый кадр видеоклипа, демонстрирующего запись нескольких НЧ рубина, движущихся в клетке (показаны стрелками). Заметны нанорубины или кластеры, иммобилизованные на поверхности клетки. Масштабный отрезок, 1 мкм.

Следует отметить некоторые недостатки нанорубинов для применений в биофотонике.

1. Эффективность фотоконверсии нанорубинов уступает как ФНА, так и КТ. Действительно, $\Sigma_{nanoruby} \approx 10^{-17} \text{ см}^2$ в пересчёте на сферический нанокристалл диаметром 30 нм с 1% молярным соотношением Cr. В то же время $\Sigma_{FNA} \approx 10^{-15} \text{ см}^2$ в случае 100-нм кристалла ФНА, содержащего 30 NV⁻ центров. Эффективность КТ с размером до 20 нм очень высока: $\Sigma_{QD} \approx 10^{-15} \text{ см}^2$.
2. Обе полосы возбуждения рубина находятся в области максимального поглощения гемоглобина крови. Это является фундаментальным ограничением предлагаемого молекулярного зонда и требует соответствующего выбора приложений, например, высокочувствительные иммунохимические тесты биологических жидкостей, внутриклеточный оптический имиджинг и др.

В **пятой главе** описывается создание и систематическое исследование недавно появившихся фотолюминесцентных наноматериалов, антистоксовых нанофосфоров, с целью их использования для молекулярно-специфического зондирования биологических процессов в клетках, а также направленных на практические применения в медицинской диагностике и терапии. Наноразмерные антистоксовые нанофосфоры (НАФ), известные в англоязычной литературе как upconversion nanoparticles (UCNP), привлекли внимание исследователей благодаря целому комплексу полезных свойств. Центральными характеристиками НАФ явля-

ются адекватный для биоприменений коэффициент фотоконверсии η_{UC} ¹ и сечение поглощения возбуждающего излучения, уникальные спектральные свойства, а также не встречающаяся в живых системах фотодинамика (продолжительное время жизни фотолуминесценции (τ_{UC}), измеряемое в суб-миллисекундах). Важной отличительной чертой НАФ является возможность возбуждения и регистрации ФЛ в окне прозрачности биологической ткани, что обеспечивает проникновение оптического излучения в биосистем на глубину до 1 см. Все эти характеристики позволяют реализовать прижизненную визуализацию ФЛ биогибридных наночастиц в клетках-мишенях и биотканях вплоть до одиночных НЧ, что было труднодостижимо на современном уровне развития нанотехнологии и биофотоники.

Был освоен и оптимизирован синтез двух типов частиц НАФ: $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ и $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}$ с солегирующими элементами Er и Tm. В основе методики синтеза лежит координатная стабилизация солей прекурсоров металлов натрия, иттрия, иттербия и тулия, проходящая с нагревом в бескислородной среде. Получившийся порошок нанокристаллов с кубической кристаллической решёткой, т.н. α -фаза, требует дополнительной обработки в узком диапазоне температур около 330 °С, где скорости нагрева и остывания имеют критическое значение. В результате, нанокристаллы переводятся в гексагональную кристаллическую конфигурацию (β -фаза) с увеличением коэффициента конверсии в десять раз и более. Для улучшения ФЛ НАФ в водных биосовместимых средах требуется дополнительный этап синтеза – покрытие наночастицы оболочкой толщиной примерно 2–5 нм, что приводит к увеличению эффективности фотоконверсии Σ_{UC} , примерно, в 10 раз. Это осуществлялось методом эпитаксиального выращивания с затравкой из синтезированных НАФ. Полученные образцы варьируются в размерах от <10 нм до >100 нм, в зависимости от этого варьируются и оптические свойства НАФ. На Рисунке 10(а) представлены изображения наночастиц β -фазы со средним диаметром 32 нм и размерной дисперсностью около 6%. На Рисунке 10(б) представлены наночастицы α -фазы суб-10 нм размера с дисперсностью >10%.

Оптимальными молярными легирующими соотношениями являются 20% Yb (измеряемого по отношению к Y) и 2% Er. Оптимальные легирующие соотношения Yb, Tm, соответственно, 20% и 0,4–0,6%, были изучены при очень высоких значениях интенсивности возбуждения (I_{ex}). Оказалось, что η_{UC} резко возрастает при I_{ex} от 1 – 4 МВт/см², достигая ~8% в случае увеличения легирующей пропорции Tm с 0,4–0,6% до 2 – 8% [66].

Для применения в биомедицинских исследованиях поверхность антистоксовых нанофосфоров должна быть модифицирована химическими методами, которые можно разделить на 3 типа. Синтезированные НАФ, покрытые олеиновыми груп-

¹ Коэффициент конверсии используется в описании нелинейного оптического процесса, в то время как квантовый выход использовался для описания линейных оптических процессов.

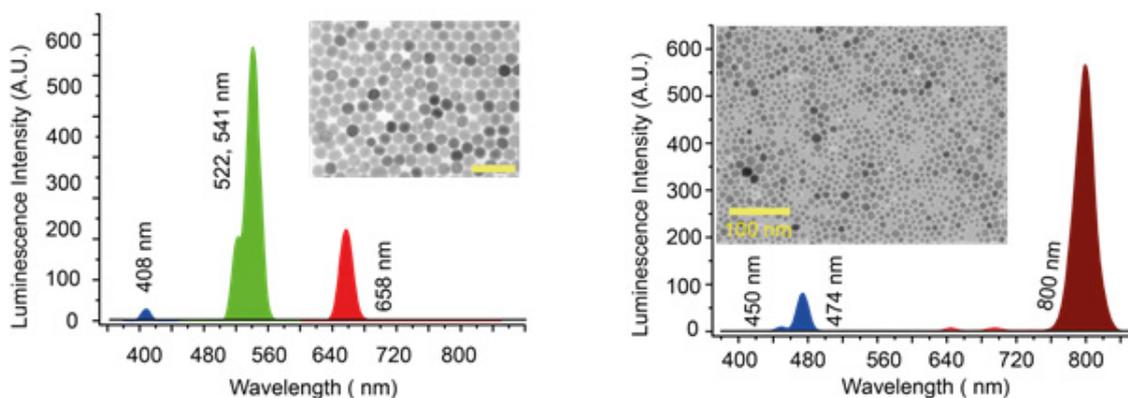


Рис. 10: Спектры фотолуминесценции (**Левая панель**) $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ и (**Правая панель**) $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Tm}$ наноматериалов, и их соответствующие изображения, полученные с помощью ТЭМ (масштабные отрезки 100 нм). На спектре $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ видны две дублетные полосы в зелёной и одна полоса в красной области. На спектре $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Tm}$ видны полосы в синей и инфракрасной области.

нами, подвергались обработке тетра-метил-аммонием гидроксида (ТМАГ), что позволяет без дополнительного покрытия создать ТМАГ-НАФ с улучшенными кристаллическими свойствами и с поверхностью, содержащей множество гидроксильных групп [16]. Также проводилась поверхностная модификация НАФ амфифильными полимерами, такими как полималеиновый ангидрид и октадецен (ПМАО), полилактид, полилактид гликолит, или положительно-заряженный полиэтиленимин. В последнем случае можно создать дополнительный слой отрицательно-заряженного сульфата декстрана (DSS), что приводит к двухслойному и даже многослойному покрытию НАФ. Все полученные образцы НАФ были коллоидно устойчивы в буферных растворах, сохраняли высокую эффективность ФЛ и содержали функциональные группы, необходимые для присоединения биомолекул.

Были проведены эксперименты по изучению цитотоксичности НАФ, а также по оценке уровня неспецифического поглощения клетками материала НАФ. Было показано, что выживаемость фибробластов при воздействии НАФ с различными покрытиями, статистически не отличается от контроля. Кератиноциты HaCaT оказались более чувствительным биоиндикатором, что позволило определить способы модификации НАФ, обеспечивающие наилучшую выживаемость клеток. Согласно данным из проведённых тестов, самые высокие показатели биосовместимости были достигнуты при использовании покрытия НАФ полимолочной кислотой, а также при инкапсулировании НАФ в полимерные гранулы [18].

Была успешно продемонстрирована сборка биогибридных нанокомплексов на основе антистоксовых нанофосфоров. Для реакции биоконъюгации использовались частицы НАФ, покрытые амфифильным полимером ПМАО. Ключевой процедурой сборки была универсальная реакция биоконъюгации НАФ с биомолекулярным модулем с использованием высокоаффинной молекулярной пары барназа:барстар. В частности, была продемонстрирована сборка биогибридного

наноконструкта, состоящего из ФЛ ядра НАФ и фрагментов раковых антител (scFv4D5). Эффективность и специфичность данного наноконструкта была продемонстрирована посредством его адресной доставки в раковые клетки молочной железы SK-BR-3, как это показано на Рисунке 11.

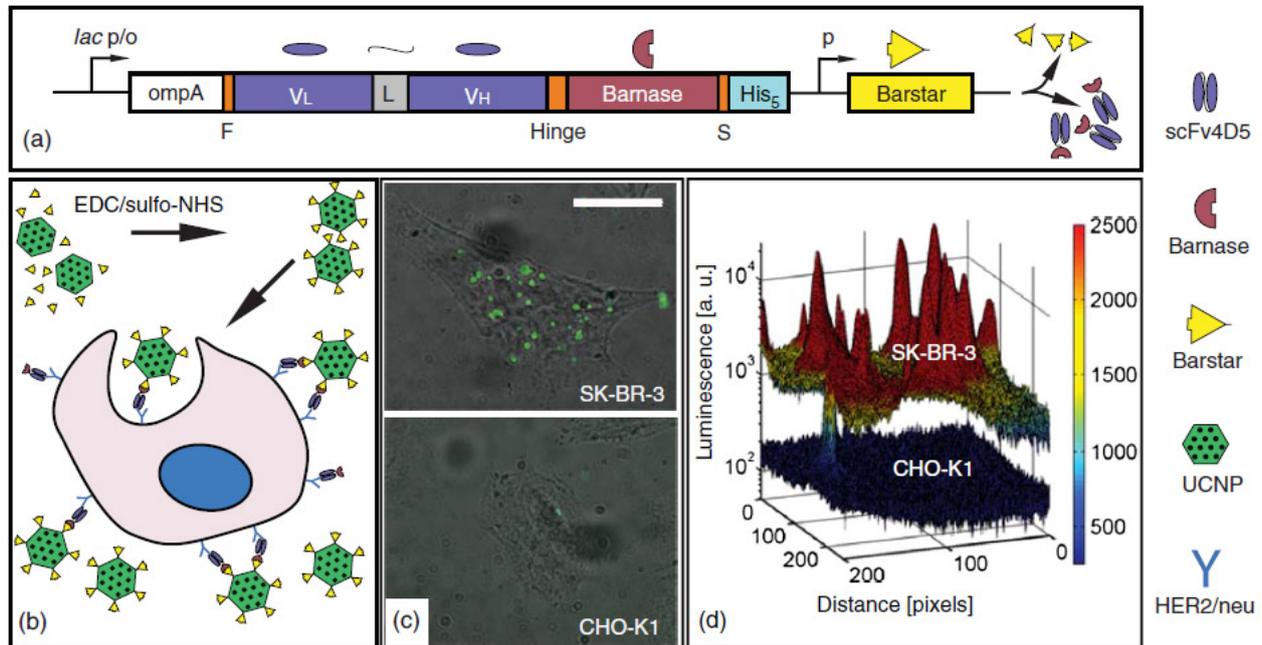


Рис. 11: Маркирование клеток с помощью НАФ-Бс:Бн-scFv4D5 биогридных наноконструктов. (а). Генная конструкция нацеливающего агента Бн-scFv4D5. (б) Концепция маркирования клеток с помощью биогридной самосборки НАФ-Бс:Бн-scFv4D5. (с) Изображение клеток SK-BR-3, гиперэкспрессирующих рецепторы HER2/neu, маркированных НАФ-Бс:Бн-scFv4D5, полученное с помощью эпифлуоресцентного микроскопа. Масштабный отрезок, 20 мкм. (d) Трёхмерный график фотолуминесцентного сигнала CHO-K1 и SK-BR-3 клеток, инкубированных с НАФ-Бс:Бн-scFv4D5. Хорошо заметен высокий уровень ФЛ сигнала в случае SK-BR-3 клеток, на который накладываются отдельные пики за счёт кластеров НАФ. Воспроизведено со ссылки [17]

Соискатель и коллеги провели экспериментальные исследования чувствительности оптической регистрации антистоксовых нанофосфоров, помещённых вглубь биологической ткани. Одиночная частица НАФ была зарегистрирована через слой гемолизованной крови толщиной 250 мкм. Эта частица идентифицирована, как одиночная, посредством сравнения эпифлуоресцентного и ТЭМ изображений. На основе экспериментальных данных и теоретических расчётов, оказалось, что одиночная частица антистоксового нанофосфора диаметром 70 нм (коэффициент конверсии $\eta_{UC} = 0,02$) может быть надёжно зарегистрирована в живой биоткани оптическими методами на глубине 400 мкм. Также была сделана оценка чувствительности оптического имиджинга кластера компактных раковых клеток, соответствующих начальной стадии рака [17]. Оказалось, что маркированная НАФ опухоль может регистрироваться на глубине до 4 мм глубины в ткани молочной железы.

Практически полное подавление фона из-за возбуждения аутофлуоресценции и обратного светорассеяния в биологических тканях делает применение антистоксовых нанодиффракционных структур обещающим для изучения трансдермального транспорта НЧ, что является предметом изучения нанотоксикологии. В данном разделе представлены предварительные результаты оптического имиджинга НАФ в человеческой коже [54]. Было обнаружено, что 8-нм и 32-нм НАФ частицы остаются в верхнем слое неповреждённой кожи (*stratum corneum*), не проникая в слой живых клеток эпидермиса. В случае кожи обработанной микроиглами, было найдено, что 32-нм наночастицы остались в окрестности лунок от микроиглы в дерме, крайне медленно диффундируя в ткани ($D_{np} = 3-7 \times 10^{-12} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$).

Следует отметить, что нелинейный характер возбуждения антистоксовых нанодиффракционных структур существенно ограничивают возможности возбуждения НАФ в глубине биоткани (до 1 см), делая перспективными нишами применений НАФ сверхчувствительный оптический имиджинг (зондирование) биологических жидкостей, толстых срезов ткани, имиджинг малых животных, а также интраоперационная оптическая диагностика тканей.

В **шестой главе** представлены результаты работ соискателя по исследованию взаимодействия НЧ оксида цинка с верхними слоями кожи: эпидермисом, в которой особо выделяется роговой слой (SC), и дермисом. Начало исследований было положено открывшейся возможностью оптической визуализации НЧ оксида цинка с помощью нелинейной оптической микроскопии, опубликованной соискателем в работе, процитированной на сегодняшний день более 75 раз [81], основным результатом которой представлен на Рисунке 12. Высокий оптический контраст НЧ ZnO в прижизненных изображениях, полученных с помощью нелинейной микроскопии, явился неожиданностью, и обуславливался, во-первых, нелинейная восприимчивость третьего порядка НЧ ZnO ($\chi_{ZnO}^{(3)}$) увеличенной в 500 раз в сравнении с $\chi_{ZnO}^{(3)}$ объёмного ZnO. Во-вторых, спектр ФЛ НЧ ZnO попадал в "тихую" спектральную область аутофлуоресценции живой кожи, определяемой коэнзимами NAD[P]H и FAD. Также оказалось, что оптический контраст НЧ ZnO достигается за счёт использования разницы времён жизни ФЛ ZnO (τ_{ZnO}) и аутофлуоресценции биоткани (τ_{af}) [43].

Выгодное сочетание широкой применимости оксида цинка в фармакологии и косметологии и хорошего оптического контраста позволило в первый раз продемонстрировать его отсутствие в эпидермисе в случае нанесения солнцезащитного крема на живую кожу человека. Эта работа положила начало исследованиям по изучению трансдермального транспорта НЧ *in vivo*, в том числе количественной оценке поглощения НЧ кожей [55]. Исследования трансдермального транспорта другого типа наночастиц, а именно, квантовых точек, подтвердили эти выводы [40]. В случае удаления рогового слоя человеческой кожи посредством стрипирования все типы исследованных НЧ проникают в слой эпидермиса, а частицы, модифицированные

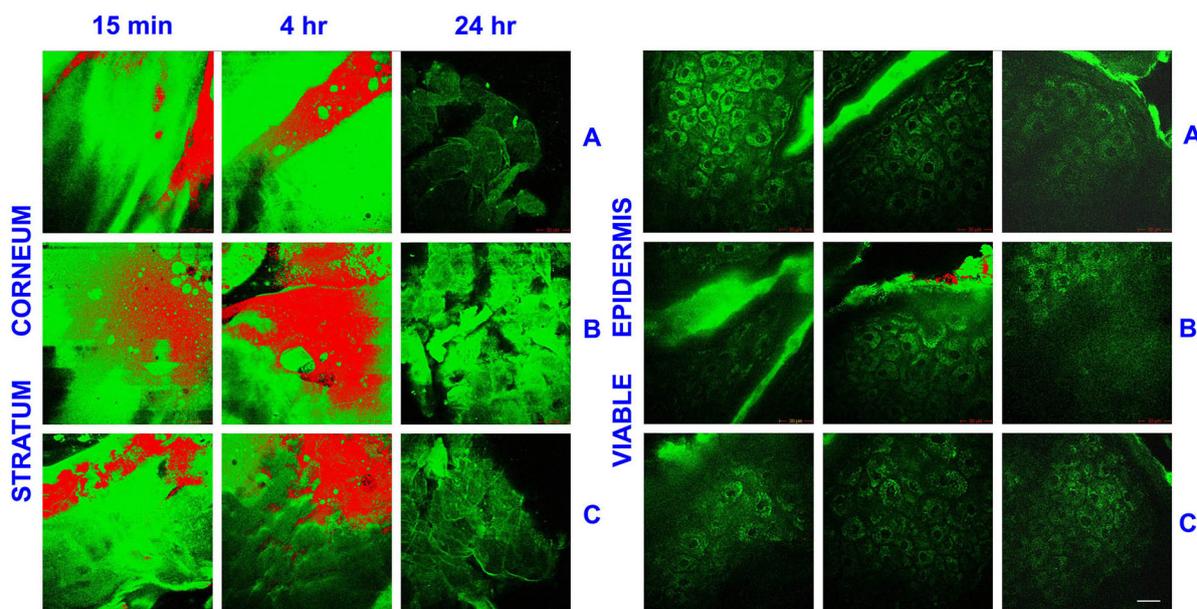


Рис. 12: Наложенные *in vivo* изображения распределения НЧ ZnO (красным цветом) в коже человека (зелёным цветом). Оптические секции рогового слоя (SC) и живого эпидермиса сгруппированы в двух блоках, соответственно, левом и правом. В строке помещены изображения кожи трёх добровольцев. Каждый столбец отображает последовательность изображений во времени: 15 мин, 4 ч, 24 ч, с момента наложения препарата с НЧ ZnO. Масштабный отрезок, 20 мкм. Воспроизведено со ссылки [81].

ПЭГ- COO^- и ПЭГ- NH_2^+ проникают даже в слой дермы, что наглядно демонстрирует роль верхнего слоя кожи (SC) для защиты от неконтролируемого попадания внешних материалов в организм. Гетерогенные свойства SC, такие как вязкость среды, имеющие важное значение для изучения транспорта НЧ в коже, были измерены с помощью разработанного метода на основе восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). В частности, был измерен коэффициент диффузии (D_{RhB}) органического флуоресцентного красителя Родамина В в липидной фазе SC [4], который оказался равным $D_{RhB} = (3,5 \pm 1,0) \times 10^{-9} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$, что существенно меньше D_{RhB} в однородной среде, и резонно объясняется компартментализацией гетерогенного слоя SC.

Вместе с тем обнаружился ряд особенностей трансдермального транспорта, вызывающий озабоченность возможными токсикологическими последствиями применения таких НЧ, как ZnO. Оказалось, что НЧ ZnO способны растворяться в водных растворах, образуя ионы цинка. Вероятность растворения возрастает в случае трансэпидермального пути транспортировки НЧ в кожу. Экспериментальные исследования *in vitro* продемонстрировали проникновение продукта растворения НЧ ZnO, Zn^{2+} через эпидермальную мембрану человеческой кожи. Предварительное теоретическое моделирование показало, что если проникновение Zn^{2+} происходит через шахту волосяной фолликулы, это может создавать токсикологически опасные концентрации Zn^{2+} в окрестности фолликулы.

В седьмой главе собраны результаты маркирования и оптический имиджинг клеточных структур и процессов с использованием разработанных фотолюминесцентных наночастиц. Процесс взаимодействия НЧ и клеток могут классифицироваться как специфический или неспецифический, где последний по сути является случайным процессом, который желателно минимизировать. Были систематически исследованы параметры НЧ, влияющие на уровень неспецифической интернализации в клеточных культурах, такие как размер НЧ, поверхностный заряд и поверхностные функциональные группы, как показано на Рисунке 13.

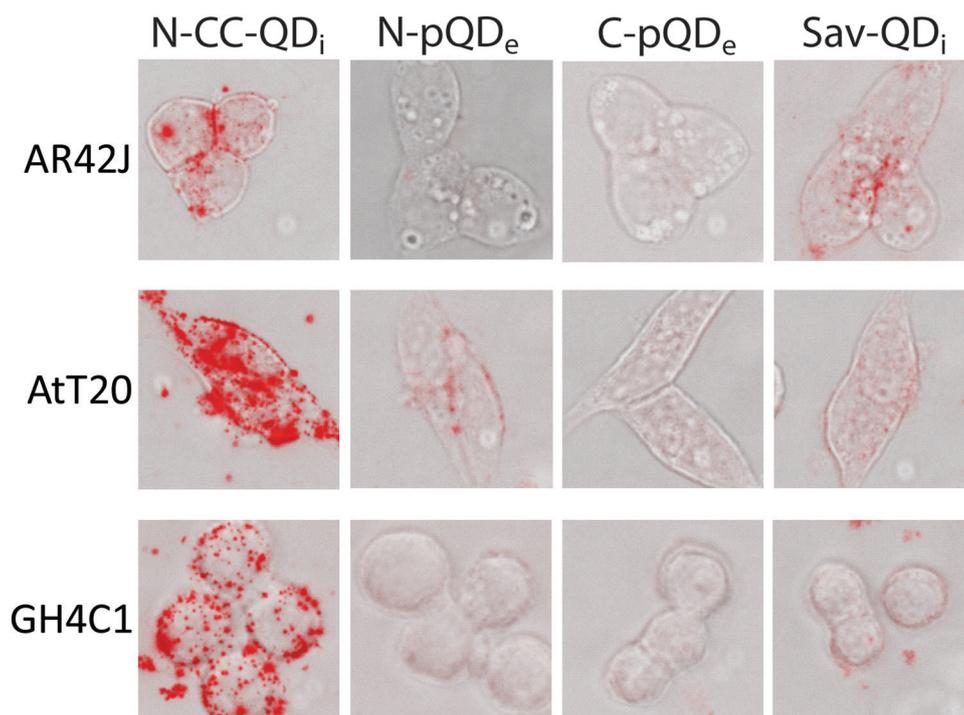


Рис. 13: Изображения, показывающие уровень поглощения

квантовых точек (КТ) в трёх клеточных культурах в зависимости от функциональных групп на поверхности. Литеры N и C использованы для обозначения карбоксильных и амино-концевых функциональных групп на поверхности КТ (QD); p обозначает поверхностное покрытие ПЭГ; индексы i, e указывают на коммерческих производителей КТ, соответственно, Invitrogen, Bioscience. Прямая конъюгация КТ с аминокгруппами (крайний левый столбец, N-CC-QDi) показывает высокий уровень интернализации, в то время как покрытие КТ PEG-ами [амино- (N-pQDe) и карбоксильные (C-pQDe) концевые группы] сильно подавляет интернализацию НЧ. Воспроизведён со ссылки [24].

Чтобы исследовать молекулярный трафик с помощью биогбридных наносборок, биомолекулярный фрагмент сборки должен активировать биологический процесс. Таким фрагментом может быть лиганд, пришитый к НЧ, который активирует рецепторы клеток. В результате, частица перемещается в цитоплазму клетки. В качестве примера лиганда рассматривается пептид соматостатин (ССТ), чьи свойства, включая способности активировать сигнальные процессы в клетках, были изучены с помощью спродуцированного рекомбинантного флуоресцентного аналога

ССТ, генетически спаянного с мономерным красным флуоресцентным белком (mRFP), выполняющим роль флуоресцентного маркера [59]. Гибридная сборка соматостатина с ФЛ НЧ была разработана и исследована [58]. Завершающая часть сборки осуществлялась путём конъюгации биотинилированного аналога ССТ с КТ, покрытого стрептавидином (стрептавидин-КТ), образуя ССТ-2Б:стрептавидин-КТ комплекс. Была предложена и продемонстрирована двухступенчатая стратегия сопряжения на целевых клетках (*in situ*).

Была продемонстрирована адресная доставка нанорубинов в целевые клетки SK-BR-3, гиперэкспрессирующие рецепторы фактора роста HER2/neu. Для этого использовались поверхностно-модифицированные нанорубины с пришитыми нацеливающими векторами, DARPin (сконструированный белок с анкириновым повтором), обладающий высокой специфичностью и аффинностью к целевым белкам.

С развитием клеточных технологий стали очевидны их недостатки, вытекающие из отсутствия физиологического контекста биологической ткани, органа и целого организма. Например, тестирование фармакологических препаратов на клеточных моделях требует продолжения апробации препаратов на животных моделях, в которых изучаются побочные эффекты воздействия препарата на другие типы клеток, взаимодействие препарата с иммунной системой, время циркуляции в кровеносной системе и время выведения из организма, а также особенности взаимодействия с целевыми клетками, не проявляющиеся в клеточных культурах. Эмбрион цыплёнка представляет собой привлекательную животную модель, воссоздающую множество физиологических особенностей живого организма, и в то же время существенно упрощающую процедуры содержания и обращения. В лаборатории Университета Маккуори под руководством соискателя была собрана оптическая имиджинговая система на основе вертикального стереомикроскопа (Olympus MVX10) с объективом с большим рабочим расстоянием (Olympus PLAPO, 0,63×, NA 0,15), позволяющая возбуждение образца лазером на длине волны 975 нм. На хорионаллантоисной мембране зародыша прививались опухоли до степени их неоваскуляризации с последующим оптическим имиджингом с помощью созданного стереомикроскопа. На Рисунке 14 представлены результаты оптического имиджинга опухоли рака молочной железы человека MDA-MB-231, привитой с использованием методики на основе Matrigel. Хорошо заметны важные морфологические особенности новообразования: увеличенный объём биоткани и развитая сосудистая сеть, скоординированная вокруг привитой опухоли. Маркирование опухоли осуществлялось посредством введения ФЛ НЧ, а именно, антистоксовых нанофосфоров, в кровеносную систему животной модели с последующим накоплением в опухоли за счёт эффекта увеличенной проницаемости и удержание наночастиц (EPR).

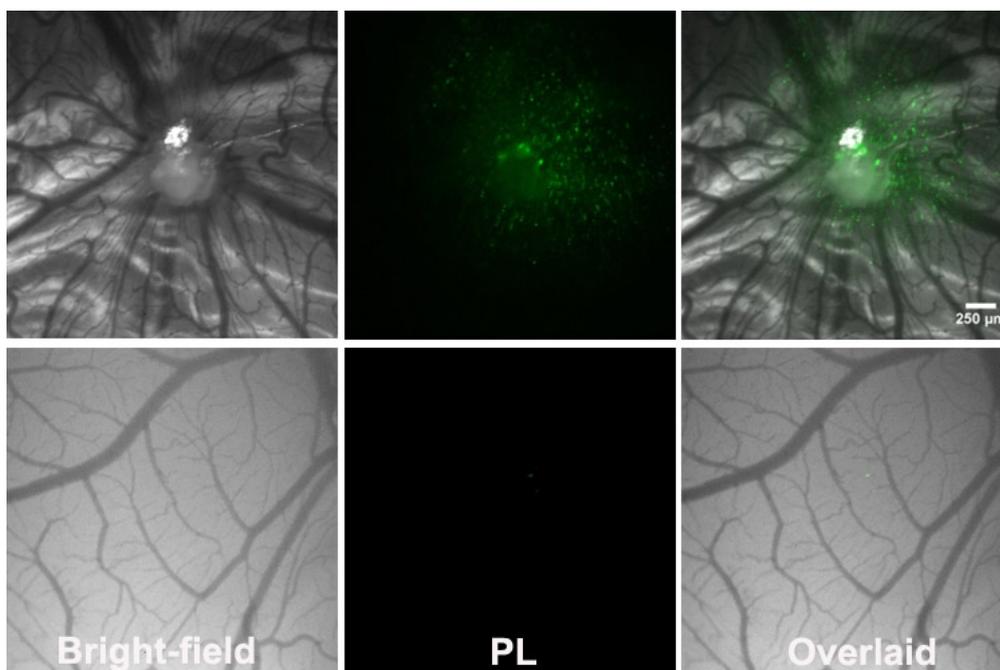


Рис. 14: Результаты оптического имиджинга раковой опухоли, привитой на хорионаллантоисной мембране куриного эмбриона. Верхний и нижний ряды представляют изображения, соответственно, раковой опухоли и нормальной ткани мембраны. Левый, средний и правые столбцы представляют, соответственно, светлопольные, фотолюминесцентные и наложенные изображения.

Совсем недавно соискателем и коллегами были проведены эксперименты прижизненной визуализации распределения гибридных сборок НАФ в лабораторной мышце с привитой раковой опухолью, в которой наблюдалось накопление НАФ за счёт эффекта EPR [31].

В **заключении** приведены основные результаты работы, которые заключаются в следующем:

1. Были получены новые фотолюминесцентные (ФЛ) наноматериалы, обладающие свойствами, востребованными для применений в Биомедицине. В настоящей работе особое внимание было уделено производству и исследованию физических, фотофизических и поверхностно-химических свойств трёх типов ФЛ наноматериалов: флуоресцентных наноалмазов, нанорубинов и антистоксовых нанофосфоров. В этой части исследований следует отметить следующие достижения:
 - (а) Кислотное и термокислородное травление субмикронных и наноразмерных кристаллов алмазов оказалось эффективным методом, с помощью которого оказалось возможным задавать размеры производимых НЧ от 100 нм до их полного исчезновения; а также получение таких полезных свойств, как заселение поверхности НЧ биосовместимыми группами, включая карбоксильные и гидроксильные группы; а также реализацию гидрофилизации нанокристаллов алмазов с получением их стабильных водных коллоидов.

- (b) Было доказано существование азотно-вакансионных центров окраски (NV) в синтетических и ультрадисперсных (5 нм) детонационных наноалмазах. Контроль размера, состава поверхностных групп и окружающей среды позволило задавать флуоресцентные свойства NV-наноалмазов. Высокий коэффициент преломления нанокристалла алмаза (2,4) в видимом спектральном диапазоне, а также высокие значения сечения поглощения $\sigma_a^{(NV)} = 3 \times 10^{-17} \text{ см}^2$ и квантового выхода $\eta_{NV} \approx 0,8$ обеспечило оптический контраст наноалмазов в клетках.
- (c) Разработка и применение технологий фемтосекундной лазерной абляции и шарового помола высокой энергии позволило получить нанокристаллы рубинов со средними диаметрами, соответственно, 12 нм и 26 нм, с квантовым выходом фотолюминесценции $\eta > 0,25$. Было показано, что η очень незначительно варьируется в зависимости от окружающей среды, что делает НЧ рубина одинаково яркими в различных средах, позволяя ценные количественные оценки концентрации и размеров НЧ по ФЛ сигналу.
- (d) Метод синтеза наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ) типа "ядро/оболочка" обеспечил получение монодисперсного коллоида в размерном диапазоне от 15 до 100 нм. Абсолютный коэффициент конверсии НАФ (КК), характеризующий преобразование мощности возбуждающего ИК излучения в мощность ФЛ видимого и ближнего ИК спектрального диапазона оказался сравнимым с лучшими мировыми показателями ($\eta_{UC} \leq 2\%$). Изменение легирующего соотношения активных излучающих ионов НАФ (Тм) привело к беспрецедентно высокому увеличению КК НАФ до 8%, что явилось лучшим показателем КК.
- (e) Покрытие поверхности НАФ амфифильным полимером, а также обработка поверхности тетраметиламмонием гидроксидом представляет собой надёжный метод гидрофиллизации наночастиц, и обеспечивает их коллоидную стабильность в водных и солесодержащих растворах. Также разработанные технологии поверхностной функционализации приводят к заселению поверхности карбоксильными группами, облегчающими дальнейшую процедуру биоконъюгации.
2. Были исследованы механизмы высокого контраста НЧ оксида цинка со средним размером около 25 нм на фоне аутофлуоресценции биологической ткани (кожи) в случае использования нелинейной оптической томографии, что позволило прижизненный оптический имиджинг распределения НЧ ZnO в человеческой коже, покрытой солнцезащитным кремом на основе НЧ ZnO.
- (a) Высокий контраст сигналов от НЧ ZnO в коже обуславливался, прежде всего, оптической нелинейной восприимчивостью $\xi_{ZnO}^{(3)}$, которая в 500 раз превосходила соответствующие значения $\xi_{ZnO}^{(3)}$ в объёмном материале ZnO. Соответствующее значение двухфотонного сечения поглощения НЧ ZnO,

умноженное на квантовый выход, $\sigma^{(2ph)} = 0,26 \text{ GM}$, существенно превышало соответствующие значения эндогенных флуорофоров, таких как NADH, дающих основной вклад в интенсивную аутофлуоресценцию биологической ткани, являющуюся ключевым препятствием контрастного биомедицинского оптического имиджинга.

- (b) Характерная спектральная полоса фотолюминесценции НЧ ZnO на длине волны 380 нм, определяемая шириной запрещенной зоны этого полупроводникового материала, оказалась оптимальной для получения контрастных изображений, т.к. располагалась за пределами широкой полосы аутофлуоресценции, возбуждаемой фемтосекундным лазером.
 - (c) Короткое время жизни ФЛ НЧ ZnO ($\tau_{ZnO} \leq 200 \text{ пс}$) также оказалось выгодным параметром, позволяющим выделить полезный сигнал фотолюминесцентных наночастиц от фонового сигнала аутофлуоресценции с характерным $\tau_{af} \approx 1,5 \text{ нс}$. Метод был реализован посредством системы FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy).
3. Разработаны методы нелинейного оптического имиджинга, дающие количественные оценки архитектоники структур биоткани и распределения фотолюминесцентных наночастиц в биоткани (коже).
- (a) Была разработана методология нелинейного оптического имиджинга *in vivo*, в которой использовался обнаруженный ранее высокий оптический контраст НЧ ZnO в биологической ткани. Были исследованы возможности проникновения НЧ ZnO в кожу человека, изначально нанесенные на кожу добровольцев в виде косметических и фармакологических препаратов. Применение этой методологии позволило получать контрастные изображения как НЧ ZnO, так и морфологии ткани кожи человека на глубине до 200 мкм, что позволяло делать биологически значимые выводы о распределении НЧ в таких слоях кожи, как роговой слой, эпидермис и дерма. [81].
 - (b) Были разработаны методы нелинейного оптического имиджинга, позволяющие получать количественные оценки накопления НЧ ZnO в биологической ткани. Так, концентрация НЧ ZnO в роговом слое и складках кожи не превышала 800 НЧ на мкм^3 в случае наложения солнцезащитного крема на основе НЧ оксида цинка [55]. Было обнаружено и смоделировано, что возможным токсикологическим сценарием является растворение НЧ ZnO в воде или физиологических жидкостях с образованием ионов цинка Zn^{2+} , особенно в случае $\text{pH} < 5$ (150 мг/мл при растворении 1 г/мл НЧ ZnO за 60 мин), которые способны проникать в слой эпидермиса и дермы, и в предположении транс-пендального проникновения, могут накапливаться в опасных концентрациях $> 40 \text{ мкг/мл}$ в окрестности волосяных фолликул.

- (с) Методология нелинейной оптической микроскопии оказалась эффективной для получения контрастных и высококонтрастных изображений, соответственно, квантовых точек и наноразмерных антистоксовых фосфоров в коже человека *in vitro*. Интенсивности возбуждения многофотонных переходов существенно различались в этих двух случаях, составляя $I_{ex} \sim 10^6$ Вт/см² в первом, и $I_{ex} \sim 10^3$ Вт/см² – во втором случаях. Были подтверждены сделанные ранее выводы: исследованные НЧ не проникают в живой слой эпидермиса, задерживаясь в SC неповреждённой кожи в пределах 40 мкм. Были сделаны оценки скорости распространения гидрофобных НАФ, внедрённых в слой дермы микроиглами. Коэффициент диффузии 32-нм гранул НАФ из внедрённого в дерму кластера был оценен как $D_{UC} = (3-7) \times 10^{-12}$ см²с⁻¹.
- (d) Была продемонстрирована возможность картирования вязкости и диффузии гидрофобных низкомолекулярных соединений в оптически-доступных слоях человеческой кожи с использованием метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). Так, коэффициент диффузии Родамина В в липидном роговом слое человеческой кожи был оценен как $D_{RhB} = (3-6) \times 10^{-9}$ см²с⁻¹.
- (e) Была продемонстрирована принципиальная возможность классификации ткани рубцов для диагностических применений на основе автоматического анализа нелинейных оптических изображений архитектоники коллагена биопсийных срезов человеческой кожи. Показано, что степень достоверности классификации рубцов достигает 96 %, что превосходит диагностическую способность специалиста дерматолога [23].
4. Была разработана технология модульной сборки функциональных биомолекул и НЧ, представленных в данном труде, включая флуоресцентные наноалмазы, нанорубины и антистоксовые нанофосфоры. Ключевым структурным звеном разработанной технологии являются высокоаффинные молекулярные адапторы, такие как барназа:барстар (Бн:Бс) и стрептавидин:биотин, позволяющие прочно связывать заранее спродуцированные субмодули биогибридной ФЛ сборки. Прочность связывания субмодулей измеряются константой диссоциации, которая в первом случае оценивается как $k_D = 10^{14}$ М, в во втором – $k_D = 10^{15}$ М, являясь одним из самых высоких показателей в мире биополимеров. Белковая природа Бн:Бс открывает чрезвычайно привлекательные возможности продуцирования рекомбинантных субмодулей. Кроме того, в ходе выполнения работ было выяснено, что покрытие НЧ белком Бс существенно улучшает стабильность субмодуля на основе НЧ в буферных растворах [56]. Также было показано, что применение адапторов Бн:Бс в биоаналитических процедурах на порядок уменьшает фон из-за неспецифического связывания биомолекул с поверхностью анализатора в сравнении с фоном в случае применения широкораспространённых адапторов стрептавидин:биотин

- [57]. Технология модульной сборки биогибридных ФЛ комплексов была продемонстрирована на примере таких практически значимых функциональных биомолекул, как мини-антитело [17], синтетический аналог антитела DARPin, лиганды – пептиды соматостатин [58], энкефалин и его синтетический аналог DAMGO.
5. Было продемонстрировано, что адресная доставка биогибридных ФЛ наноккомплексов в целевые клетки обеспечивается выбором нацеливающих биомолекул.
- (a) Например, продемонстрирована и исследована специфическая интернализация пептида соматостатина (SST) и биогибридных ФЛ наноккомплексов, связанных с SST, являющихся лигандами к рецепторам класса *sst*, в клетки, моделирующие клетки эндокринной системы, нейроны, а также клетки рака эндокринной железы, в силу их экспрессирования соматостатиновых рецепторов, таких как *sst*_{2A}. С помощью количественного анализа, основанного на измерении заряда клеточной мембраны при запуске процесса рецепторно-зависимого эндоцитоза, были измерены пороговые значения концентрации лигандов, при которых начинается эндоцитоз. В случае SST и SST-(мономерный красный флуоресцентный белок), эти концентрации оказались, соответственно, 3×10^{-9} М и 4×10^{-7} М.
- (b) Были изучены клеточные процессы, происходящие в результате взаимодействия клеток, экспрессирующих опиоидные рецепторы, с несколькими типами лигандов к этим рецепторам, в частности изучались особенности интернализации и сопутствующие биомолекулярные клеточные процессы. Примерами таких лигандов являются пептид энкефалин, его синтетический аналог DAMGO, а также связанные с ними биогибридные ФЛ наноккомплексы.
- (c) Была продемонстрирована адресная доставка биогибридных ФЛ наноккомплексов НАФ-(фрагменты антител 4D5scFv) к целевым клеткам аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 с использованием известной аффинности 4D5scFv к рецепторам класса эпидермального фактора роста HER2/neu. Была достигнута специфичность иммобилизации биогибридных ФЛ наноккомплексов около 20 по отношению к моделям нормальных клеток. Среднее число НЧ НАФ на клетке оценивалось как 3000, что, тем не менее, существенно меньше общего числа рецепторов ($\sim 10^6$ на одну клетку SK-BR-3).
6. Некоторые типы ФЛ наночастиц предоставляют возможности, неосуществимые с помощью традиционных флуорофоров. Например, применение ФЛ НЧ позволяет значительно увеличить чувствительность оптической регистрации вплоть до регистрации отдельных НЧ. В случае биологического оптического имиджинга чувствительность ограничивается паразитным фоном из-за возбуждающего лазерного излучения и аутофлуоресценции биологических систем, или, иными словами, контрастность изображений существующих флуорофоров в биоткани ограничена. Использование таких новых свойств ФЛ НЧ, как длительное время

жизни фотолюминесценции, позволяет добиться предельного контраста, где фон определяется исключительно шумами фоторегистрирующих устройств. Кроме того, использование "антистоксовой" природы фотолюминесценции НАФ, когда энергия фотонов излучения превышает энергию фотонов возбуждения, позволяет существенно подавить паразитный фон.

- (a) Была разработана методология отложенной оптической регистрации, позволивший получить бесфоновые изображения НЧ рубина в клетках, полностью подавив сигналы лазерного возбуждающего излучения и аутофлуоресценции клеток. Методология была продемонстрирована как в лазерно-сканирующей имиджинговой модальности [14], так и в случае широкопольного имиджинга. Почти миллион-кратная разница времени жизни фотолюминесценции нанорубинов ($\tau_{NR} = 3,8$ мс) и аутофлуоресценции биологических систем ($\tau_{af} \sim 1,5$ нс) определяет эффективность применения разработанной методологии отложенной регистрации.
- (b) Была продемонстрирована чувствительность регистрации одиночной частицы нанорубина диаметром 18 нм методом лазерно-сканирующей флуоресцентной конфокальной микроскопии, и 35 нм – методом эпилюминесцентной микроскопии. Также было показано, что ни аутофлуоресценция клеток, ни иммуногистохимическое окрашивание клеточных структур яркими флуоресцентными красителями не является препятствием для визуализации дискретных нанорубинов в клетках. Включение отложенной регистрации в систему фотодетектирования позволило визуализировать движение одиночных нанорубинов в клетке.
- (c) Доказано, что возможна оптическая визуализация одиночной частицы антистоксового нанофосфора через слой гемолизованной крови толщиной 250 мкм. Это позволило сделать важные оценки предельной чувствительности прижизненного оптического имиджинга новообразований, маркированных биогибридными сборками НАФ. Оказалось, что возможна регистрация начальной стадии новообразования на глубине около 4 мм в ткани молочной железы [34]. В случае применения НАФ нового поколения, названных коллегами соискателя "Super Dots", характеризующимися беспрецедентно высоким значением коэффициента конверсии ($\eta_{UC} = 8\%$) при интенсивностях возбуждения $I_{ex} \approx 4 \times 10^6$ Вт/см² возможна визуализация отдельной частицы НАФ размером 40 нм невооружённым глазом!

Создана основательная, обширная исследовательская платформа, включающая в себя биогибридные фотолюминесцентные материалы нового типа, средства их интеграции с биомолекулярным содержимым клеток и биотканей, а также новационные оптические методы визуализации биологических процессов с приме-

нением созданных ФЛ наночастичных комплексов. Создание такой платформы даёт принципиально новые возможности для

1. изучения клеточных процессов на уровне отдельных или дискретных биомолекул, маркированных фотолюминесцентными наночастицами;
2. сверхчувствительной, высокоточной, неинвазивной диагностики физиологических процессов в нормальных и патологически изменённых биологических системах.

Таким образом, это представляет собой новое направление в Нанотехнологии и Биофотонике, созданном на стыке последних достижений физики и биомедицины.

Ссылки, включая публикации автора по теме диссертации

1. A. S. Akhmanov, A. V. Zvyagin, A. V. Nechaev, V. Ya. Panchenko, V. N. Seminogov, V. A. Semchishen, V. I. Sokolov, and E. V. Khaydukov. Fibre-optic imaging modality allows high-contrast infrared visualisation of biological structures labelled with upconversion nanoparticles $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}$. *Perspective Materials*, 14, 2013.
2. S. A. Alexandrov, R. Meredith, T. J. McIntyre, and A. V. Zvyagin. Holographic digital Fourier microscopy for selective Imaging of biological tissue. *International Journal of Imaging Systems and Technology*, 14(6):253–258, 2004.
3. S. A. Alexandrov, A. V. Zvyagin, K. K. M. B. D. Silva, and D. D. Sampson. Bifocal-optical coherent refractometry of turbid media. *Optics Letters*, 28(2):117–119, 2003.
4. Y. G. Anissimov, X. Zhao, M. S. Roberts, and A. V. Zvyagin. Fluorescence recovery after photo-bleaching as a method to determine local diffusion coefficient in the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1):93–97, 2012.
5. J. J. Armstrong, M. S. Leigh, I. D. Walton, A. V. Zvyagin, S. A. Alexandrov, S. Schwer, D. D. Sampson, D. R. Hillman, and P. R. Eastwood. In vivo size and shape measurement of the human upper airway using endoscopic long-range optical coherence tomography. *Optics Express*, 11(15):1817–1826, 2003.
6. A. S. Barnard and M. Sternberg. Substitutional nitrogen in nanodiamond and bucky-diamond particles. *Journal Of Physical Chemistry B*, 109(36):17107–17112, 2005.
7. P. Blazkiewicz, K. Blazkiewicz, A. Verhaege, Y. G. Anissimov, M. S. Roberts, and A. V. Zvyagin. Dialysis-assisted fiber optic spectroscopy for in situ biomedical sensing. *Journal of Biomedical Optics*, 11(1), 2006.
8. P. Blazkiewicz, M. Gourlay, J. R. Tucker, A. D. Rakic, and A. V. Zvyagin. Signal-to-noise ratio study of full-field Fourier-domain optical coherence tomography. *Applied Optics*, 44(36):7722–7729, 2005.
9. C. Bradac, T. Gaebel, N. Naidoo, M. J. Sellars, J. Twamley, L. J. Brown, A. S. Barnard, T. Plakhotnik, A. V. Zvyagin, and J. R. Rabeau. Observation and control of blinking nitrogen-vacancy centres in discrete nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*, 5(5):345–349, 2010.
10. C. Bradac, T. Gaebel, C. I. Pakes, J. M. Say, A. V. Zvyagin, and J. R. Rabeau. Effect of the Nanodiamond Host on a Nitrogen-Vacancy Color-Centre Emission State. *Small*, 9(1):132–139, 2013.
11. J. C. Clements, A. V. Zvyagin, K. K. M. B. D. Silva, T. Wanner, D. D. Sampson, and W. A. Cowling. Optical coherence tomography as a novel tool for non-destructive measurement of the hull thickness of lupin seeds. *Plant Breeding*, 123(3):266–270, 2004.
12. Y. Colpin, A. Swan, A. V. Zvyagin, and T. Plakhotnik. Imaging and sizing of diamond nanoparticles. *Optics Letters*, 31(5):625–627, 2006.
13. Y. Dancik, A. Favre, C. J. Loy, A. V. Zvyagin, and M. S. Roberts. Use of multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging to investigate skin pigmentation in vivo. *Journal of Biomedical Optics*, 18(2), 2013.
14. A. M. Edmonds, M. A. Sobhan, V. K. A. Sreenivasan, E. A. Grebenik, J. R. Rabeau, E. M. Goldys, and A. V. Zvyagin. Nano-Ruby: A Promising Fluorescent Probe for Background-Free Cellular Imaging. *Particle & Particle Systems Characterization*, 30(6):506–513, 2013.
15. P. Frantsuzov, M. Kuno, B. Janko, and R. A. Marcus. Universal emission intermittency in quantum dots, nanorods and nanowires. *Nature Physics*, 4(7):519–522, 2008.
16. A. N. Generalova, I. K. Kochneva, E. V. Khaydukov, V. A. Semchishen, A. E. Guller, A. V. Nechaev, A. B. Shekhter, V. P. Zubov, S. M. Deyev, and A. V. Zvyagin. Submicron polyacrolein particles in situ embedded with upconversion nanoparticles for bioassay. *Nanoscale*, in press, 2014.

17. E. A. Grebenik, A. Nadort, A. N. Generalova, A. V. Nechaev, V. K. A. Sreenivasan, E. V. Khaydukov, V. A. Semchishen, A. P. Popov, V. I. Sokolov, A. S. Akhmanov, V. P. Zubov, D. V. Klinov, V. Y. Panchenko, S. M. Deyev, and A. V. Zvyagin. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes. *Journal of Biomedical Optics*, 18(7), 2013.
18. A. E. Guller, A. N. Generalova, E. V. Petersen, A. V. Nechaev, I. A. Trusova, N. N. Landyshev, A. Nadort, E. A. Grebenik, S. M. Deyev, A. B. Shekhter, and A. V. Zvyagin. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells. *Nano Research*, in press, 2014.
19. K. B. Hartman, L. J. Wilson, and M. G. Rosenblum. Detecting and treating cancer with nanotechnology. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 12(1):1–14, 2008.
20. R. Heim, A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. Improved Green Fluorescence. *Nature*, 373(6516):663–664, 1995.
21. N. Yu. Ignatieva, A. E. Guller, O. L. Zakharkina, B. Sandnes, A. B. Shekhter, V. A. Kamensky, and A. V. Zvyagin. Laser-induced modification of the patellar ligament tissue: comparative study of structural and optical changes. *Lasers in Medical Science*, 26(3):401–413, 2011.
22. E. A. Ivukina, V. K. A. Sreenivasan, O. A. Stremovskiy, B. V. Veryugin, S. V. Lukash, A. V. Zvyagin, S. M. Deyev, and R. V. Petrov. Fluorescent Nanodiamond Bioconjugates on the Base of Barnase: Barstar Module. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 440(1):231–233, 2011.
23. T. A. Kelf, M. Gosnell, B. Sandnes, A. E. Guller, A. B. Shekhter, and A. V. Zvyagin. Scar tissue classification using nonlinear optical microscopy and discriminant analysis. *Journal of Biophotonics*, 5(2):159–167, 2012.
24. T. A. Kelf, V. K. A. Sreenivasan, J. Sun, E. J. Kim, E. M. Goldys, and A. V. Zvyagin. Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology*, 21(28), 2010.
25. E. V. Khaydukov, V. V. Rocheva, V. A. Semchishen, A. V. Nechaev, A. N. Generalova, V. N. Seminogov, A. B. Shekhter, V. I. Sokolov, A. V. Zvyagin, A. S. Akhmanov, and V. Ya. Panchenko. Applications of Upconversion Nanoparticles in Optical Bioimaging of the Tumor Tissue. *Journal RFBR*, 3:32 – 41, 2014.
26. E. V. Khaydukov, V. A. Semchishen, V. N. Seminogov, A. V. Nechaev, A. V. Zvyagin, V. I. Sokolov, A. S. Akhmanov, and V. Ya Panchenko. Visualization of upconverting nanoparticles in strongly scattering media. *Biomedical Optics Express*, 5(6):1952–1964, 2014.
27. E. V. Khaydukov, V. A. Semchishen, V. N. Seminogov, V. I. Sokolov, A. P. Popov, A. V. Bykov, A. V. Nechaev, A. S. Akhmanov, V. Ya Panchenko, and A. V. Zvyagin. Enhanced spatial resolution in optical imaging of biotissues labelled with upconversion nanoparticles using a fibre-optic probe scanning technique. *Laser Physics Letters*, 11(9), 2014.
28. F. Leblond, S. C. Davis, P. A. Valdes, and B. W. Pogue. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology*, 98(1):77–94, 2010.
29. X. W. Liang, Z. P.g Xu, J. Grice, A. V. Zvyagin, M. S. Roberts, and X. Liu. Penetration of Nanoparticles into Human Skin. *Current Pharmaceutical Design*, 19(35):6353–6366, 2013.
30. L. L. Lin, J. E. Grice, M. K. Butler, A. V. Zvyagin, W. Becker, T.s A. Robertson, H. P. Soyer, M. S. Roberts, and T. W. Prow. Time-Correlated Single Photon Counting For Simultaneous Monitoring Of Zinc Oxide Nanoparticles And NAD(P)H In Intact And Barrier-Disrupted Volunteer Skin. *Pharmaceutical Research*, 28(11):2920–2930, 2011.
31. H. Maeda. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: Background and Future Prospects. *Bioconjugate Chemistry*, 21(5):797–802, 2010.
32. H. Maeda, G. Y. Bharate, and J. Daruwalla. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3):409–419, 2009.
33. W. E. Moerner. New directions in single-molecule imaging and analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences OF the United States of America*, 104(31):12596–12602, 2007.

34. A. Nadort, V. K. A. Sreenivasan, Z. Song, E. A. Grebenik, A. V. Nechaev, V. A. Semchishen, V. Y. Panchenko, and A. V. Zvyagin. Quantitative Imaging of Single Upconversion Nanoparticles in Biological Tissue. *PLOS ONE*, 8(5), 2013.
35. M. P. Nikitin, T. A. Zdobnova, S. V. Lukash, O. A. Stremovskiy, and S. M. Deyev. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13):5827–5832, 2010.
36. G. J. Nohynek, J. Lademann, C. Ribaud, and M. S. Roberts. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(3):251–277, 2007.
37. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12):751–760, 2007.
38. T. Plakhotnik, A. Chennu, and A. V. Zvyagin. Statistics of single-electron signals in electron-multiplying charge-coupled devices. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 53(4):618–622, 2006.
39. A. P. Popov, A. V. Zvyagin, J. Lademann, M. S. Roberts, W. Sanchez, A. V. Priezzhev, and R. Myllyla. Designing Inorganic Light-Protective Skin Nanotechnology Products. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6(5, SI):432–451, 2010.
40. T. W. Prow, N. A. Monteiro-Riviere, A. O. Inman, J. E. Grice, X. Chen, X. Zhao, W. H. Sanchez, A. Gierden, M. A. F. Kendall, A. V. Zvyagin, D. Erdmann, J. E. Riviere, and M. S. Roberts. Quantum dot penetration into viable human skin. *Nanotoxicology*, 6(2):173–185, 2012.
41. A. P. Raphael, T. A. Kelf, E. M. T. Wurm, A. V. Zvyagin, H. P. Soyer, and T. W. Prow. Computational characterization of reflectance confocal microscopy features reveals potential for automated photoageing assessment. *Experimental Dermatology*, 22(7):458–463, 2013.
42. W. A. W. Razali, V. K. A. Sreenivasan, E. M. Goldys, and A. V. Zvyagin. Large-Scale Production and Characterization of Biocompatible Colloidal Nanoalumina. *Langmuir*, 30(50):15091–15101, 2014.
43. M. S. Roberts, M. J. Roberts, T. A. Robertson, W. Sanchez, C. Thoerling, Y. Zou, X. Zhao, W. Becker, and A. V. Zvyagin. In vitro and in vivo imaging of xenobiotic transport in human skin and in the rat liver. *Journal of Biophotonics*, 1(6):478–493, 2008.
44. J. A. Ross, A. V. Zvyagin, N. R. Heckenberg, J. Upcroft, P. Upcroft, and H. Rubinsztein-Dunlop. Measurement of action spectra of light-activated processes. *Journal of Biomedical Optics*, 11(1), 2006.
45. B. Sandnes, T. A. Kelf, H. Liu, and A. V. Zvyagin. Retroemission by a glass bead monolayer for high-sensitivity, long-range imaging of upconverting phosphors. *Optics Letters*, 36(15):3009–3011, 2011.
46. K. Y. T. Seet, P. Blazkiewicz, P. Meredith, and A. V. Zvyagin. Optical scatter imaging using digital Fourier microscopy. *Journal of Physics D - Applied Physics*, 38(19):3590–3598, 2005.
47. K. Y. T. Seet, T. A. Nieminen, and A. V. Zvyagin. Refractometry of melanocyte cell nuclei using optical scatter images recorded by digital Fourier microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 14(4), 2009.
48. K. Y. T. Seet, R. Vogel, T. A. Nieminen, G. Knoner, H. Rubinsztein-Dunlop, M. Trau, and A. V. Zvyagin. Refractometry of organosilica microspheres. *Applied Optics*, 46(9):1554–1561, 2007.
49. T.-J. S. Shi, Q. g Xiang, M.-D. Zhang, S. Barde, Y. Kai-Larsen, K. Fried, A. Josephson, L. Glueck, S. M. Deyev, A. V. Zvyagin, S. Schulz, and T. Hokfelt. Somatostatin and its 2A receptor in dorsal root ganglia and dorsal horn of mouse and human: expression, trafficking and possible role in pain. *Molecular Pain*, 10, 2014.
50. K. K. M. B. D. Silva, A. V. Zvyagin, and D. D. Sampson. Extended range, rapid scanning optical delay line for biomedical interferometric imaging. *Electronics Letters*, 35(17):1404–1406, 1999.
51. B. R. Smith, D. W. Inglis, B. Sandnes, J. R. Rabeau, A. V. Zvyagin, D. Gruber, C. J. Noble, R. Vogel,

- E. Osawa, and T. Plakhotnik. Five-nanometer diamond with luminescent nitrogen-vacancy defect centers. *Small*, 5(14):1649–1653, 2009.
52. B. R. Smith, M. Niebert, T. Plakhotnik, and A. V. Zvyagin. Transfection and imaging of diamond nanocrystals as scattering optical labels. *Journal of Luminescence*, 127(1):260–263, 2007. 9th International Meeting on Hole Burning, Single Molecule, and Related Spectroscopies, Aussois, FRANCE, JUN 24-29, 2006.
53. E. D. J. Smith, A. V. Zvyagin, and D. D. Sampson. Real-time dispersion compensation in scanning interferometry. *Optics Letters*, 27(22):1998–2000, 2002.
54. Z. Song, Y. G. Anissimov, J. Zhao, A. V. Nechaev, A. Nadort, D. Jin, T. W. Prow, M. S. Roberts, and A. V. Zvyagin. Background free imaging of upconversion nanoparticle distribution in human skin. *Journal of Biomedical Optics*, 18(6), 2013.
55. Z. Song, T. A. Kelf, W. H. Sanchez, M. S. Roberts, J. Ricka, M. Frenz, and A. V. Zvyagin. Characterization of optical properties of ZnO nanoparticles for quantitative imaging of transdermal transport. *Biomedical Optics Express*, 2(12):3321–3333, 2011.
56. V. K. A. Sreenivasan, E. A. Ivukina, W. Deng, T. A. Kelf, T. A. Zdobnova, S. V. Lukash, B. V. Veryugin, O. A. Stremovskiy, A. V. Zvyagin, and S. M. Deyev. Barstar:barnase - a versatile platform for colloidal diamond bioconjugation. *Journal of Materials Chemistry*, 21(1):65–68, 2011.
57. V. K. A. Sreenivasan, T. A. Kelf, E. A. Grebenik, O. A. Stremovskiy, J. M. Say, J. R. Rabeau, A. V. Zvyagin, and S. M. Deyev. A modular design of low-background bioassays based on a high-affinity molecular pair barstar:barnase. *Proteomics*, 13(9):1437–1443, 2013.
58. V. K. A. Sreenivasan, E. J. Kim, A. K. Goodchild, M. Connor, and A. V. Zvyagin. Targeting somatostatin receptors using in situ-bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Nanomedicine*, 7(10):1551–1560, 2012.
59. V. K. A. Sreenivasan, O. A. Stremovskiy, T. A. Kelf, M. Heblinski, A. K. Goodchild, M. Connor, S. M. Deyev, and A. V. Zvyagin. Pharmacological Characterization of a Recombinant, Fluorescent Somatostatin Receptor Agonist. *Bioconjugate Chemistry*, 22(9):1768–1775, 2011.
60. V. K. A. Sreenivasan, A. V. Zvyagin, and E. M. Goldys. Luminescent nanoparticles and their applications in the life sciences. *Journal of Physics - Condensed Matter*, 25(19), 2013.
61. I. Staude, V. K. A. Sreenivasan, I. Shishkin, K. Samusev, M. Decker, D. N. Neshev, A. V. Zvyagin, and Y. S. Kivshar. Selective placement of quantum dots on nanoscale areas of metal-free substrates. *Physica Status Solidi-Rapid Research Letters*, 8(8):710–713, 2014.
62. C. A. Thorling, Y. Dancik, C. W. Hupple, G. Medley, X. Liu, A. V. Zvyagin, T. A. Robertson, F. J. Burczynski, and M. S. Roberts. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging provide a novel method in studying drug distribution and metabolism in the rat liver in vivo. *Journal of Biomedical Optics*, 16(8), 2011.
63. M. L. Tran, A. V. Zvyagin, and T. Plakhotnik. Synthesis and spectroscopic observation of dendrimer-encapsulated gold nanoclusters. *Chemical Communications*, (22):2400–2401, 2006.
64. J. R. Tucker, A. D. Rakic, C. J. O'Brien, and A. V. Zvyagin. Effect of multiple transverse modes in self-mixing sensors based on vertical-cavity surface-emitting lasers. *Applied Optics*, 46(4):611–619, 2007.
65. V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, and S. W. Hell. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 320(5873):246–249, 2008.
66. J. Zhao, D. Jin, E. P. Schartner, Y. Lu, Y. Liu, A. V. Zvyagin, L. Zhang, J. M. Dawes, P. Xi, J. A. Piper, E. M. Goldys, and T. M. Monro. Single-nanocrystal sensitivity achieved by enhanced upconversion luminescence. *Nature Nanotechnology*, 8:729–734, 2013.
67. A. V. Zvyagin. Fourier-Domain Optical Coherence Tomography: Optimization of Signal-to-Noise Ratio in Full

- Space. *Optics Communications*, 242(1-3):97–108, 2004.
68. A. V. Zvyagin, P. Blazkiewicz, and J. Vintrou. Image reconstruction in full-field Fourier-domain optical coherence tomography. *Journal of Optics A-Pure and Applied Optics*, 7(7):350–356, 2005.
 69. A. V. Zvyagin, P. Blazkiewicz, and J. Vintrou. Image reconstruction in full-field Fourier-domain optical coherence tomography. *Journal of Optics A-Pure and Applied Optics*, 7(7):350–356, 2005.
 70. A. V. Zvyagin, I. Eix, and D. D. Sampson. High-speed, high-sensitivity, gated surface profiling with closed-loop optical coherence topography. *Applied Optics*, 41(11):2179–2184, 2002.
 71. A. V. Zvyagin, J. B. FitzGerald, K. K. M. B. D. Silva, and D. D. Sampson. Real-time detection technique for Doppler optical coherence tomography. *Optics Letters*, 25(22):1645–1647, 2000.
 72. A. V. Zvyagin, M. G. Garcia-Webb, and D. D. Sampson. Semiconductor line source for low-coherence interferometry. *Applied Optics*, 40(6):913–915, 2001.
 73. A. V. Zvyagin and N. B. Manson. *Optical and spin properties of nitrogen-vacancy colour-centres in diamond crystals, nanodiamonds and proximity to surfaces*. Elsevier, 2 edition, 2012.
 74. A. V. Zvyagin and T. Plakhotnik. *Optical scatter imaging: Detection limits*. TPDSci Inc, 2007.
 75. A. V. Zvyagin and T. Plakhotnik. *Video-enhanced contrast optical microscopy*. TPDSci Inc, 2007.
 76. A. V. Zvyagin and D. D. Sampson. Achromatic optical phase shifter-modulator. *Optics Letters*, 26(4):187–189, 2001.
 77. A. V. Zvyagin, K. K. M. B. D. Silva, S. A. Alexandrov, T. R. Hillman, J. J. Armstrong, T. Tsuzuki, and D. D. Sampson. Refractive index tomography of turbid media by bifocal optical coherence refractometry. *Optics Express*, 11(25):3503–3517, 2003.
 78. A. V. Zvyagin, E. D. J. Smith, and D. D. Sampson. Delay and dispersion characteristics of a frequency-domain optical delay line for scanning interferometry. *Journal Of the Optical Society of America A - Optics Image Science and Vision*, 20(2):333–341, 2003.
 79. A. V. Zvyagin, Z. Song, A. Nadort, V. K. A. Sreenivasan, and S. M. Deyev. *Luminescent nanomaterials for molecular-specific cellular imaging*, page 563. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2013.
 80. A. V. Zvyagin, V. K. A. Sreenivasan, E. M. Goldys, V. Ya. Panchenko, and S. M. Deyev. *Nanoparticle Biocomplexes for Luminescence Imaging and Sensing in-vivo and in vitro*. RSC, 2014.
 81. A. V. Zvyagin, X. Zhao, A. Gierden, W. Sanchez, J. A. Ross, and M. S. Roberts. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Optics*, 13(6), 2008.