

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.836>

<https://orcid.org/0000-0001-7570-3278>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Marijus Plečkaitis

Dvigubo vaizdinimo nanomedžiagos

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
biofizika (N 011)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2019–2024 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute.

Eksperimentiniai darbai atlikti Nacionaliniame vėžio institute, Biomedicininės fizikos laboratorijoje.

Mokslinis vadovas – prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Vitalijus Karabanovas (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Aidas Alaburda (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Nariai:

Dr. Renata Karpič (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, fizika – N 002),

Prof. dr. Vilma Kisnierienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011),

Doc. dr. Lina Mikoliūnaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003),

Doc. dr. Mindaugas Tamošiūnas (Latvijos universitetas, Latvija, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. spalio mėn. 24 d. 15 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio alėja 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva), tel. +37052234420; el. paštas: info@gmc.vu.lt. Disertacija bus ginama lietuvių kalba.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.836>
<https://orcid.org/0000-0001-7570-3278>

VILNIUS UNIVERSITY

Marijus Plečkaitis

Nanomaterials for Bimodal Imaging

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biophysics (N 011)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2019 and 2024 at Vilnius University Life Sciences Center Institute of Biosciences.

Experimental work was carried out at the National Cancer Institute, Biomedical Physics Laboratory.

Academic supervisor – Prof. Habil. Dr. Ričardas Rotomskis (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

Academic consultant – Prof. Dr. Vitalijus Karabanovas (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – prof. dr. Aidas Alaburda (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

Members:

Dr. Renata Karpicz (Center for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Physics – N 002),

Prof. dr. Vilma Kisnierienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011),

Doc. dr. Lina Mikoliūnaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry – N 003),

Doc. dr. Mindaugas Tamošiūnas (University of Latvia, Latvia, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 15:00 on 24 October 2025 in the meeting room R-401 of Vilnius University Life Sciences Centre.

Address: Sauletekio ave. 7, LT-10527, Vilnius, Lithuania

Tel. +37052234420; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

*As-SPION – arsenu pažymėtos superparamagnetinės geležies oksido nanodalelės;
*As-SPION@PEG – arsenu pažymėtos superparamagnetinės geležies oksido nanodalelės, padengtos polietilenglikoliu;
 $^1\text{O}_2$ – singuletinis deguonis;
AJM – atomo jėgos mikroskopas;
AK – apkonversija;
AKL – apkonversijos liuminescencija;
AKND – apkonvertuojančios nanodalelės;
AKND@ γ -Fe $_2$ O $_3$ – apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos maghemito nanokristalais;
AuNK – aukso nanoklasteriai;
BFO HND – bismuto ferito harmoninės nanodalelės;
CCD – krūvio sąsajos kamera (*angl. charge-coupled device*);
Ce6 – chlorinas e6;
Cys – cisteinas;
CR – kryžminė relaksacija (*angl. cross-relaxation*);
cRGD – ciklinis arginino-glicino-aspartato junginys;
CSU – kooperacinio sužadavimo apkonversija (*angl. cooperative sensitization upconversion*);
deH $_2$ O – dejonizuotas vanduo;
DIC – diferencinio interferencijos kontrasto mikroskopija;
DLS – dinaminė šviesos sklaida (*angl. dynamic light scattering*);
DMEM – *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė;
DMEM+FBS – *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė, papildyta fetaliniu jaučio serumu;
DPA-AuNK – D-penicilaminu modifikuoti aukso nanoklasteriai;
dpf – dienos po apvaisinimo;
DP-RCM – diferencialinės poliarizacijos pakartotinio skenavimo konfokalinis mikroskopas;
ELR – aidą limituojantis režimas (*angl. echolimiting regime*);
ESA – sužadintos būsenos sugertis (*angl. excited-state absorption*);
ESION – itin mažo diametro geležies oksido nanodalelės;
ETU – energijos pernašos apkonversija (*angl. energy transfer upconversion*);
FA – fotoakustinis vaizdinimas;
FA-PEG – folio rūgštimi modifikuotas polietilenglikolis;
FBS – fetalinis jaučio serumas;
Fc – fosfatidilcholinai;

FC – lauko aušinimas (*angl. field cooling*);
 FDL – fluorescencija detektuotas linijinis dichroizmas;
 FL – fotoluminescencija;
 FLIM – fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdinimo mikroskopija;
 FND – ferito nanodalelės;
 FNT – fotosensibilizuota navikų terapija;
 FR – folio receptoriai;
 Gd-AuNK – aukso nanoklasteriai, modifikuoti gadoliniumu;
 GdIO ND – gadoliniumu legiruotos geležies oksido nanodalelės;
 GJE – gigantiškas „jūros eži“ primenantis;
 GMND – gadoliniumu pažymėtos magnetito nanodalelės;
 GSA – pagrindinės būsenos sugertis (*angl. ground state absorption*);
 GSH – glutationas;
 GSH-AuNK – glutationu stabilizuoti aukso nanoklasteriai;
 ICG – indocianino žaliasis;
 ION – geležies oksido nanodalelės;
 IR – inversijos atkūrimo seka (*angl. inversion recovery*);
 IRF – prietaiso atsako funkcija (*angl. instrument response function*);
 IT – laisvas jodiksanolio ir mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfino mišinys;
 JSA – jaučio serumo albuminas;
 KN – kvantinis našumas;
 k.t. – kūno temperatūra;
 KT – kompiuterinė tomografija;
 Ln – lantanoidai;
 LT – nanoliposomose įkapsuliuotas mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfinas;
 LIT – nanoliposomose įkapsuliuoti jodiksanolis ir mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfinas;
 MAR – judėjimo vidurkio režimas (*angl. motional averaging regime*);
 MDV – magnetinių dalelių vaizdinimas;
 Met – metioninas;
 MFND – mangano ferito nanodalelės;
 MN – magnetinė nanodalelė;
 MN-AuNK – magnetinės nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais;
 MOK – metalinis-organinis karkasas;
 MR – magnetinis rezonansas;
 MRT – magnetinio rezonanso tomografija;
 MSA – merkaptogintaro rūgštis;
 MSA-AuNK – merkaptogintaro rūgštimi modifikuoti aukso nanoklasteriai;
 ND – nanodalelės;
 NIR – artimoji infraraudonoji spinduliuotė;

PBS – fosfato buferinis druskų tirpalas;
 PEG – polietilenglikolis;
 PEI-b-PCL-b-PEG – polietilenimino, polikaprolaktono ir polietilenglikolio polimerinės micelės;
 PET – pozitronų emisijos tomografija;
 PMT – fotodaugintuvo vamzdelis (*angl. photomultiplier tube*);
 R6G – rodaminas 6G;
 RB – radijo bangų dažnis;
 RCM – pakartotinio skenavimo konfokalinis mikroskopas;
 RD – perdirbimo delsa (*angl. recycling delay*);
 ROI – pažymėtos dominančios zonos (*angl. region of interest*);
 SA – skaitinė apertūra;
 SD – standartinis nuokrypis;
 SDR – statinis išsifazavimo režimas (*angl. static dephasing regime*);
 SEM – skenuojanti elektroninė mikroskopija;
 SHG – antrosios harmonikos generacija;
 SOSG – singuletinio deguonies indikatorius (*angl. Singlet Oxygen Sensor Green*);
 SPECT – pavienių fotonų emisijos kompiuterinė tomografija (*angl. single-photon emission computed tomography*);
 SPIO – superparamagnetinis geležies oksidas;
 SPION – superparamagnetinės geležies oksido nanodalelės (*angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles*);
 T – inkubacija su laisvu mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfinu;
 T1 – išilginės relaksacijos trukmė;
 T2 – skersinės relaksacijos trukmė;
 TE – atsako laikas MRT tyrimuose (*angl. time to echo*);
 TEM – peršviečiamoji elektroninė mikroskopija;
 TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas;
 THG – trečiosios harmonikos generacija;
 TI – inversijos laikas MRT tyrimuose (*angl. time of inversion*);
 TIR – terminė infraraudonoji spinduliuotė;
 TPPS₄ – mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfinas;
 UG – ultragarsinis vaizdinimas;
 UMP – apkonvertuojančios magnetinės nanodalelės;
 UMP-FA – apkonvertuojančios magnetinės nanodalelės, padengtos folio rūgštimi;
 ZFC – nulinio lauko aušinimas (*angl. zero-field cooling*).

TURINYS

ĮVADAS.....	12
MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ	15
GINAMIEJI TEIGINIAI	18
AUTORIAUS INDĖLIS	19
1. LITERATŪROS APŽVALGA	21
1.1. Diagnostiniai metodai.....	21
1.2. Magnetinės nanodalelės ir jų savybės	22
1.3. MN, kaip MRT kontrastinės medžiagos.....	25
1.3.1. Dydžio įtaka magnetinių nanodalelių savybėms	27
1.3.2. Sudėties įtaka magnetinių nanodalelių savybėms	28
1.3.3. Paviršiaus charakteristikų poveikis magnetinių nanodalelių savybėms	30
1.3.4. Savaiminio rinkimosi įtaka magnetinių nanodalelių savybėms ..	30
1.3.5. Formos įtaka magnetinių nanodalelių savybėms.....	32
1.4. Magnetinių dalelių vaizdinimas	33
1.5. Multimodalinis vaizdinimas su MN	34
1.5.1. T1-T2 dvigubo režimo MRT kontrastiniai žymenys.....	34
1.5.2. KT/MRT dvigubo kontrasto medžiagos.....	37
1.5.3. MRT-PET/SPECT dvigubo kontrasto medžiagos.....	37
1.6. Optinis vaizdinimas su aukso nanoklasteriais	39
1.7. Fluorescencinio vaizdinimo galimybės	40
1.8. Multimodalinis vaizdinimas su AuNK.....	43
1.9. Apkonvertuojančios nanomedžiagos.....	45
1.10. Lantanoidai.....	46
1.11. Lantanoidais legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės	47
1.12. Pagrindiniai apkonvertuojančių nanodalelių komponentai	47
1.13. Apkonversijos mechanizmai	48
1.13.1. Pagrindinės ir sužadintos būsenų sugertis (GSA/ESA).....	49

1.13.2. Energijos pernašos apkonversija (ETU)	50
1.13.3. Kooperacinio sužadavimo apkonversija (CSU)	51
1.13.4. Kryžminė relaksacija (CR).....	52
1.14. Apkonvertuojančios nanodalelės bimodaliniame biovaizdinyje	52
1.15. Multimodalinis vaizdinimas su AKND	54
1.16. Harmoninės nanomedžiagos.....	56
1.16.1. Mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfinas kaip potencialus harmonoforas.....	59
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	62
2.1. Medžiagos	62
2.2. Nanodalelių sintezės	63
2.2.1. Magnetito nanodalelių sintezė.....	63
2.2.2. Magnetinių nanodalelių konjugacija su aukso nanoklasteriais...	63
2.2.3. Apkonvertuojančių nanodalelių sintezė ir padengimas γ - Fe_2O_3 nanokristalais	63
2.3. TPPS ₄ agregatų bandinio paruošimas	64
2.4. Nanomedžiagų erdvinį ir struktūrinių savybių charakterizavimas	65
2.4.1. Hidrodinaminio dydžio ir zeta potencialo nustatymas	65
2.4.2. Atomo jėgos mikroskopijos matavimai.....	66
2.4.3. Skenuojančios elektroninės mikroskopijos matavimai	67
2.4.4. Peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos matavimai	67
2.5. Spektroskopiniai matavimai	67
2.5.1. Nuostoviosios sugerties ir fotoluminescencijos matavimai	67
2.5.2. Kinetinės spektroskopijos matavimai.....	68
2.5.3. MN-AuNK fotostabilumo įvertinimas	68
2.5.4. Fotoluminescencijos kvantinio našumo nustatymas	69
2.6. Singuletinio deguonies generacijos registravimas.....	69
2.7. Magnetinių savybių charakterizavimas	70
2.7.1. MN-AuNK magnetinės savybės.....	70
2.7.2. AKND@ γ - Fe_2O_3 magnetometrijos matavimai.....	71

2.7.3. AKND@ γ -Fe ₂ O ₃ magnetinė relaksometrija.....	71
2.8. Šviesaus lauko ir spektrinės konfokalinės mikroskopijos tyrimai...	72
2.9. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopijos matavimai.....	72
2.10. Fluorescencija detektuoto linijinio dichroizmo analizė.....	73
2.11. Multimodalinės antrosios ir trečiosios harmonikų generacijos mikroskopijos matavimai	73
2.12. Ląstelių kultivavimas ir inkubavimas nanodalelėmis.....	74
2.13. Ląstelių vaizdinimas fluorescenciniu konfokaliniu mikroskopu.....	75
2.14. Magnetinių γ -Fe ₂ O ₃ nanodalelių vizualizavimas ląstelėse	75
2.15. Ląstelių gyvybingumo tyrimas	76
2.16. Fotosensibilizacinio poveikio įvertinimas	77
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	79
3.1. Magnetinės nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais.....	79
3.1.1. MN-AuNK erdviųjų savybių charakterizavimas.....	80
3.1.2. MN-AuNK optinės savybės	80
3.1.3. Singuletinio deguonies generavimo apšvietus MN-AuNK regimąją šviesą tyrimas	84
3.1.4. MN-AuNK fotostabilumas	85
3.1.5. MN-AuNK fotoluminescencijos kvantinio našumo nustatymas.....	86
3.1.6. MN-AuNK magnetinės savybės.....	86
3.1.7. MN-AuNK biosuderinamumas <i>in vitro</i>	88
3.1.8. MN-AuNK fotosensibilizacinio poveikio tyrimas <i>in vitro</i>	90
3.2. Apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos maghemito (γ -Fe ₂ O ₃) nanokristalais.....	93
3.2.1. AKND@ γ -Fe ₂ O ₃ erdviųjų ir struktūrinių savybių charakterizavimas.....	93
3.2.2. AKND@ γ -Fe ₂ O ₃ optinės savybės	95
3.2.3. AKND@ γ -Fe ₂ O ₃ magnetinės savybės.....	97
3.2.4. AKND@ γ -Fe ₂ O ₃ biosuderinamumas <i>in vitro</i>	100
3.3. TPPS ₄ molekuliniai agregatai – potencialūs harmonoforai	102

3.3.1. GJE TPPS ₄ agregatų struktūros ir spektrinių savybių tyrimas .	104
3.3.2. TPPS ₄ agregatų fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdinimo tyrimas.....	105
3.3.3. Koreliacija tarp SEM ir FDL D mikroskopijos duomenų	107
3.3.4. GJE TPPS ₄ agregatų erdvinių savybių įvertinimas atomo jėgos mikroskopu.....	108
3.3.5. GJE TPPS ₄ agregatų antrosios ir trečiosios harmonikų generacijos signalo generavimo tyrimas	109
4. APIBENDRINIMAS	111
IŠVADOS.....	114
SUMMARY	115
LITERATŪROS SĄRAŠAS / REFERENCES.....	152
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	182
REZULTATŲ VIEŠINIMAS	183
GYVENIMO APRAŠYMAS.....	185
PADĖKA.....	187

IVADAS

Vėžiniai susirgimai vis dar išlieka viena iš daugiausiai gyvybių nusinešančių ligų pasaulyje. Prognostiniais skaičiavimais 2025 metais vien Europos Sąjungoje onkologiniai susirgimai gali pareikalauti apie 1 280 000 mirčių (Santucci et al., 2025). Kuo ankstyvesnė diagnostika ir intervencija yra vienos svarbiausių priemonių pagerinant gydymo rezultatus ir išgyvenamumą. Visgi net ir anksti aptikus naviką, jo pašalinimas gali kelti nemažai iššūkių dėl agresyvaus vėžinių ląstelių pobūdžio, spartaus augimo, didelio heterogeniškumo ir neatskiriamų ribų tarp naviko ir sveikų audinių (H. Xu et al., 2017). Šie iššūkiai pabrėžia poreikį pažangių, realaus laiko diagnostikos ir gydymo metodų, kurie galėtų tiksliai apibrėžti naviko ribas chirurginiam gydymui ir aptikti visas likusias naviko ląsteles (Junn et al., 2021; X. Xu et al., 2019).

Medicininio vaizdinimo sritis bėgant metams nenutrūkstamai patiria reikšmingų pokyčių. Į diagnostinių įrankių kraitį patenka įvairūs metodai – nuo rentgeno ir kompiuterinės tomografijos (KT) iki pozitronų emisijos tomografijos (PET), pavienių fotonų emisijos kompiuterinės tomografijos (SPECT), diagnostinės sonografijos, magnetinio rezonanso tomografijos (MRT) (Faragallah et al., 2021; Hussain et al., 2022) ar optinio vaizdinimo diagnostikos (Y. W. Wang et al., 2017). Kiekvienas metodas pasižymi ne tik unikaliais privalumais, bet ir savais apribojimais, kurie apsunkina ankstyvą ir tikslią vėžio diagnostiką. Siekiant pagerinti išgaunamų vaizdų tikslumą ir paryškinti minėtųjų metodų vaizdinimo kontrastą, įprastai naudojami įvairūs kontrastiniai žymenys (Najjar, 2024). Pastaraisiais dešimtmečiais intensyvėjantys moksliniai tyrimai ir siekis integruoti nanotechnologijas į medicininės diagnostikos metodus labai patobulėjo bei atvėrė duris naujos kartos kontrastinėms nanomedžiagoms (Chaugule et al., 2022; B. Wang et al., 2024). Tokie žymenys galėtų padėti aptikti vėžinius darinius ankstyvose stadijose, kartu didindami ir pacientų išgyvenamumo tikimybę. Pavyzdžiui, MRT tyrimus pagerintų magnetinės nanodalelės (Farzin et al., 2020), optinę diagnostiką – fotoluminescuojančios (FL) nanomedžiagos, kaipantai baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai (S. Chen et al., 2023), retųjų žemių metalais legiruotos apkonvertuojančios (Y. Li & Chen, 2022) ar harmoninės nanodalelės (Gheata, 2024).

Visgi net ir pasitelkiant pažangius kontrastinius žymenis, pavieniai vaizdinimo metodai dažnai nėra pakankamai efektyvūs tiksliai ir aiškiai nustatyti užsimezgančius onkologinių ligų židinius. Pavyzdžiui, rentgeno tyrimams trūksta specifiškumo, optinę diagnostiką riboja šviesos prasiskverbimo gylis į gilesnius audinius, o MRT, savo ruožtu, stinga geresnės

skiriamosios gebos ląsteliniu lygmeniu. Klinikoje naudojant įprastus diagnostinius metodus susiduriama su dar keliomis problemomis. Dažniausiai skirtingiems metodams naudojami kontrastiniai žymenys yra tinkami tik būtent tam specifiniam metodui, tad norint taikyti bent porą tyrimų, reikėtų pacientui suleisti atskirus kontrastą pagerinančius preparatus (Najjar, 2024). Tai lemia, kad pacientui atliekama daugiau intervencinių procedūrų, kyla komplikacijų rizika (pvz., infekcijų). Taip pat skirtingos kontrastinės medžiagos gali trukdyti viena kitos veiksmingumui, tektų laukti, kol pirmasis kontrastas pasišalintų iš organizmo prieš suleidžiant kitą ir t. t. Negana to, dažniausiai įvairūs kontrastiniai žymenys yra mažai specifiški bei toksiški, tai reiškia, kad jie kaupiasi ne vien vėžiniuose dariniuose, bet ir sveikuose audiniuose, taip nuodydami organizmą ir keldami riziką paciento sveikatai (Andreucci et al., 2014).

Atsižvelgdami į minėtasias problemas mokslininkai ėmė siūlyti naujas hibridines nanomedžiagų formuluotes, kurios apimtų dvigubo ar multimodalinio vaizdinimo galimybes (Y. Wang et al., 2022). Tokiu būdu minimizuojamas skirtingų tradicinių kontrastinių preparatų poreikis, pacientui mažinama intervencinių procedūrų našta. Skirtingų vaizdinimo metodų kombinavimas vienoje nanoplatformoje yra ypač vertinga priemonė ankstyvai įvairių ligų diagnostikai, gydymo stebėjimui ir prognozei. Tai leidžia kompensuoti vienų diagnostinių priemonių trūkumus kitų privalumais bei išgauti detalesnę informaciją apie tiriamus vėžinius darinius. Svarbu ir tai, kad nanodaleles (ND) pagal poreikį galima modifikuoti ir funkcionalizuoti, suteikiant joms daug geresnį specifinį kaupimąsi navikuose, sąlygojantį mažesnės dozės poreikį – tuo pačiu mažėja ir sisteminis toksiškumas. Dar pažangesnėse teranostinėse nanosistemose su keliomis diagnostinėmis galimybėmis kartu derinamos ir terapinės savybės (L. Sun et al., 2023).

Kurdami ir tirdami dvigubo vaizdinimo nanomedžiagas mokslininkai jau yra pakloję ganėtinai tvirtus pamatus. Išbandomi įvairūs vaizdinimo technikų deriniai (Y. Wang et al., 2022), tokie kaip: SPECT/MRT (Karageorgou et al., 2022) panaudojant magnetines nanodaleles su prijungtu radionuklidu, FL/SPECT – kartu integruojant fotoluminescuojančius aukso nanoklasterius ir radioaktyvų technecį (Jarockyte, Stasys, et al., 2022), ar FL/MRT – derinys gaunamas, pavyzdžiui, į apkonvertuojančias nanodaleles įterpiant magnetinio rezonanso (MR) kontrastą suteikiantį gadolinį (Ezerskyte et al., 2024).

In vitro ir *in vivo* vaizdinimo tikslams pasiekti daug dėmesio susilaukė yra tiek minėtieji aukso nanoklasteriai (Du et al., 2018; J. X. Xu et al., 2019), tiek magnetinės nanodalelės (Farzin et al., 2020). Jų apjungimas į bendrą hibridinę nanomedžiagą lemtų abiejų medžiagų savybių privalumus vienoje sistemoje – fotoluminescencija iš aukso nanoklasterių ir MR kontrastas iš

magnetinių nanodalelių (Haghighi et al., 2019; C. Wang et al., 2015). Panašias multimodališkumo galimybes įžvelgti galima magnetines nanodaleles padengiant aukso sluoksniu arba kombinuojant jas su aukso nanodalelėmis (Cândido et al., 2023; Lau et al., 2023; Silva et al., 2016). Kita vertus, pirmoji nanoplatforma, dėl sintezės metu naudojamų baltymų aukso nanoklasteriams stabilizuoti, pasižymi geru biosuderinamumu, o ankstesni tyrimai yra parodę, kad aukso nanoklasteriai be diagnostinių savybių taip pat geba šviesos poveikyje generuoti aktyviasias deguonies formas, kurias galima panaudoti terapiniams vėžio gydymo tikslams (Poderys et al., 2020).

Kitas ypač daug dėmesio sulaukianti dvigubo vaizdinimo nanomedžiagų tipas – retųjų žemių metalais legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės, sujungtos su magnetinėmis nanodalelėmis. Apkonvertuojančios nanodalelės geba į audinius skvarbesnę infraraudonąją spinduliuotę paversti regimosios šviesos emisija, o magnetinės nanodalelės suteikia magnetinio rezonanso kontrastą. Tokiu būdu gaunama daugiafunkcė sistema, tinkama skirtingų diagnostinių metodų kombinuotam taikymui (Materia et al., 2017; Sikora-Dobrowolska et al., 2024). Be to, naudojant retųjų žemių metalų nanodaleles, galima sukurti specifinę sistemą, kurioje viena nuo kitos atskiriamos diagnostinės ir terapinės funkcijos, valdomos skirtingais bangos ilgiais (Skripka et al., 2019).

Be šių hibridinių dvigubo vaizdinimo nanodalelių sistemų galimi ir molekuliniai sprendimai. Vienas jų – mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfinas (TPPS₄). Jis ir kiti porfirinų dariniai – gerai žinomi fotosensibilizatoriai, galintys generuoti aktyviasias deguonies formas ir prisidėti prie onkologinių ligų gydymo fotosensibilizuotos navikų terapijos būdu (Kou et al., 2017). TPPS₄ taip pat geba saviorganizacijos metu formuoti molekulinis agregatus (Short et al., 2013; Takayoshi Kobayashi, 2011). Nėgana to, ankstesniuose moksliniuose darbuose buvo pademonstruota, kad porfirinų tipo molekulėse, įskaitant ir TPPS₄, bei jų agregatuose fiksuojama ir fluorescencija, ir netiesinis optinis antrosios ir/ar trečiosios harmonikų generacijos signalas (Di Carlo et al., 2020; Fujiwara et al., 2004; Alizadeh et al., 2023; Tessore et al., 2018). Dėl šių savybių TPPS₄ molekuliniai agregatai gali pasitarnauti ne tik, kaip modelinė saviorganizacijos tyrimų sistema, bet būti kontrastine medžiaga bimodaliniam vaizdinimui, jungiančiam fluorescencinę ir netiesinę mikroskopijas.

Visgi studijos apie dvigubo vaizdinimo nanomedžiagas tebėra nauja, tebevystoma sritis, kuriai trūksta išsamesnių ir detalesnių duomenų tiek apie pačias nanomedžiagas, tiek apie jų biosuderinamumą ir biomedicininį pritaikomumą. Tad atsižvelgiant į tai, šiame disertaciniame darbe buvo išsikelti toliau išvardinti tikslas bei uždaviniai jam pasiekti:

Darbo tikslas: ištirti įvairių dvigubo vaizdinimo nanomedžiagų potencialą vėžio diagnostikai.

Darbo uždaviniai:

1. Charakterizuoti magnetinių geležies oksido nanodalelių, dekoruotų baltymais stabilizuotais aukso nanoklasteriais, erdvines, optines ir magnetines savybes bei įvertinti jų biosuderinamumą *in vitro*.
2. Nustatyti aukso nanoklasteriais dekoruotų magnetinių nanodalelių diagnostines dvigubo vaizdinimo (FL ir MRT) galimybes *in vitro*.
3. Ištirti magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, gebėjimą generuoti singuletinį deguonį bei įvertinti jų fotosensibilizacinę poveikį skirtingo piktybiškumo vėžinėms ląstelėms MCF-7 ir MDA-MB-231.
4. Charakterizuoti retųjų žemių metalais legiruotų apkonvertuojančių nanodalelių, padengtų maghemito nanokristalais, erdvines, optines ir magnetines savybes bei įvertinti jų biosuderinamumą *in vitro*.
5. Nustatyti maghemito nanokristalais padengtų apkonvertuojančių nanodalelių diagnostines dvigubo vaizdinimo (emisijos ir MRT) galimybes *in vitro*.
6. Ištirti TPPS₄ molekulinį agregatų erdvines ir optines savybes bei įvertinti jų potencialą fluorescencinės ir netiesinės mikroskopijų bimodaliniame vaizdinime.

MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Mokslininkų bendruomenė jau yra sukūrusi pačių įvairiausių dvigubo vaizdinimo nanomedžiagų, apjungiamos skirtingos diagnostinės priemonės. Baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai (AuNK) pasižymi puikiu biosuderinamumu, fotoluminescuoja artimojoje infraraudonosios spinduliuotės (NIR) srityje, patenkančioje į optinį audinių skaidrumo langą, todėl galėtų būti vaizdinami gilesniuose audiniuose, taip pat yra lengvai modifikuojami. Papildomai AuNK pasižymi ir kitomis unikaliomis savybėmis, pavyzdžiui, grįžtamuoju fotoblyškimu (Hemmateenejad et al., 2016) ir gebėjimu šviesos poveikyje generuoti aktyviasias deguonies formas, kurių generacijos efektyvumas yra pakankamas sukelti fotosensibilizuotą poveikį norint nužudyti vėžines ląsteles (Poderys et al., 2020).

Mūsų tirti AuNK šių savybių neprarado net ir sujungti su magnetinėmis nanodalelėmis. Tyrimų apie magnetines nanodaleles, padengtas aukso sluoksniu/kiutu, arba sujungtas su aukso nanodalelėmis, galima rasti ganėtinai nemažai (Cândido et al., 2023; Lau et al., 2023; Silva et al., 2016). Tačiau mokslinių publikacijų, kuriose magnetinės geležies oksido arba kobalto ferito nanodalelės būtų tiesiogiai, be papildomų, sudėtingų

komponentų dekoruojamos su fotoluminescuojančiais aukso nanoklasteriais (MN-AuNK), beveik išvis nėra, o mūsų publikacijose tai ir buvo padaryta (Mikalauskaite et al., 2022; Pleckaitis et al., 2023). MN-AuNK pasižymėjo tiek optinį, tiek magnetinį kontrastą pagerinančiomis savybėmis, sujungtomis į vieną nanostruktūrą. Svarbu ir tai, jog MN-AuNK pačios iš savęs, be jokių papildomų modifikacijų, demonstravo fotosensibilizacines savybes. Tai lemia, kad mūsų tirtos MN-AuNK apjungia diagnostines ir terapines savybes vienoje nanoplatformoje bei rodo potencialą tapti inovatyvia teranostine nanomedžiaga. Į jų tyrimus šiuo metu bene labiausiai ir krypta mokslininkų akys.

Kita mūsų tirta dvigubo vaizdinimo nanomedžiagų grupė – retųjų žemių metalais legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos maghemito nanokristalais (AKND@ γ -Fe₂O₃). Jos taip pat skirtos bimodaliniam optinės biopsijos ir magnetinio rezonanso derinimui. Šių nanokompozitų pranašumas – žadinimas NIR spinduliuote. Dėl geresnės NIR skvarbos į audinius, tai leistų apkonvertuojančias nanodaleles sužadinti gilesniuose audinių sluoksniuose esančiuose navikuose nei tradicines fluorescuojančias nanodaleles, žadinamas regimąja šviesa. Įprastai, apkonvertuojančios nanodalelės sintetamos terminės dekompozicijos, hidroterminės sintezės ar koprecipitacijos metodais (Mehrdel et al., 2021). Savo darbe pademonstravome, kad AKND@ γ -Fe₂O₃ galima gauti poliolių sintezės metodu (Parviziaan et al., 2024). Tai retokai tokio tipo nanodalelėms sintetinti naudojamas metodas. Greitas ir paprastas šio metodo pobūdis yra pagrindinis privalumas, kuris leistų sėkmingai padidinti nanodalelių sintezės našumą ir išgaunamus kiekius, reikalingus potencialiam AKND@ γ -Fe₂O₃ panaudojimui klinikinėje praktikoje ar pramonėje.

Galiausiai buvo tyrinėjami mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfino (TPPS₄) molekuliniai agregatai. TPPS₄ – daug metų analizuotas fotosensibilizatorius, žinomas ne vien dėl savo sensibilizacinių savybių, bet ir gebėjimo rūgštinėje aplinkoje agreguoti į tvarkias, saviorganizuotas struktūras – nanovamzdelių formos agregatus (Short et al., 2013; Takayoshi Kobayashi, 2011). Taip pat galimos ir netvarkios granuliuotos ar plokščios agregavusios struktūros (Rotomskis et al., 2004). Savo darbe analizavome niekur anksčiau nepademonstruotą unikalią, kompleksiską struktūrą, primenančią jūros ežį. Nors šio agregato dydis daug didesnis (mikrometrų ir net milimetrų eilės) nei standartinių nanomedžiagų, bet eksperimentų metu parodėme, kad per ilgą laikotarpį agregatas susiformavo iš įprastų pavienių nanovamzdelių ir nanogranulių, kurios, besijungdamos tarpusavyje, sudarė sudėtingą hierarchinę struktūrą. Tokių, savaime besiformuojančių struktūrų analizavimas gali padėti geriau suprasti abiogeneizės procesą ir savaiminės molekulių organizacijos vyksmus. Taip pat parodėme, kad šis agregatas be įprastinės fluorescencijos signalo gali generuoti antrąją ir trečiąją harmonikas

netiesinės mikroskopijos vaizdinimo metu. Tai išplečia jo potencialias panaudojimo galimybes ne vien molekulinės saviorganizacijos tyrimuose, bet ir kontrastinio žymens vaidmeniu bimodaliniame vaizdinime.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Magnetinės geležies oksido nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais, bei apkonvertuojančios retųjų žemių metalais legiruotos nanodalelės, padengtos maghemito nanokristalais, pasižymi tiek optinėmis, tiek magnetinėmis savybėmis, apjungtomis atitinkamose bendrose nanoplatformose.
2. Magnetinės geležies oksido nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais, ir apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos maghemito nanokristalais, kaupiasi vėžinėse ląstelėse ir tamsoje nesukelia citotoksinio poveikio.
3. Magnetinės geležies oksido nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais, veikiamos regimąja šviesa, geba generuoti aktyviasias deguonies formas (pavyzdžiui, singuletinį deguonį), kurios savo ruožtu sukelia vėžinių ląstelių žūtį.
4. TPPS₄ molekuliniai agregatai pasižymi fluorescencinėmis savybėmis bei generuoja antrosios ir trečiosios harmonikos signalus netiesinėje mikroskopijoje.

AUTORIAUS INDĖLIS

Disertacijos autorius yra vienas iš pagrindinių eksperimentų įgyvendintojų tyrimuose su skirtingomis nanomedžiagomis. Darbe su magnetinėmis geležies oksido nanodalelėmis, dekoruotomis su fotoluminescuojančiais aukso nanoklasteriais, autorius pats atliko visus nanodalelių erdviųjų ir optinių savybių charakterizavimus, besikonsultuodamas planavo bei atliko ląstelinius biosuderinamumo tyrimus bei vertino fotosensibilizacinę nanodalelių poveikį ląstelių monosluoksniams. Kitame darbe su magnetinėmis kobalto ferito nanodalelėmis, dekoruotomis aukso nanoklasteriais, autorius atliko fotoluminescencijos gyvavimo trukmių matavimus.

Tyrimuose su retųjų žemių metalais legiruotomis apkonvertuojančiomis nanodalelėmis, padengtomis maghemito nanokristalais, autorius atliko optinių savybių vertinimą bei ląstelinius biosuderinamumo tyrimus *in vitro*. Analizuodamas molekulinius TPPS₄ agregatus autorius atliko konfokalinės mikroskopijos vaizdinimą (šviesaus lauko, DIC, fluorescencinės, FLIM mikroskopijos analizę), AJM matavimus bei agregatų modelių atvaizdavimą.

Autorius rinko, apdorojo, analizavo ir interpretavo visus savo tyrimuose gautus rezultatus, juos pristatinėjo mokslinėse konferencijose bei rezultatų pagrindu su bendraautoriais parengė mokslines publikacijas. Jis yra keturių publikacijų, parašytų disertacijos tema, bendraautorius (pirmasis autorius dviejose publikacijose). Pagal šias doktorantūros metu paruoštas publikacijas bei jų rezultatus autorius parengė disertaciją.

Darbo vadovas prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis prisidėjo formuluodamas eksperimentinių tyrimų kryptis, konsultavo interpretuojant gautus rezultatus bei rengiant mokslines publikacijas ar medžiagą konferencijoms.

Konsultantas prof. dr. Vitalijus Karabanovas aktyviai konsultavo planuojant ir vykdant eksperimentinius tyrimus, analizuojant gautus rezultatus, dalyvavo ruošiant mokslines publikacijas ir medžiagą konferencijoms.

MN-AuNK sintezę atliko dr. Giedrė Grincienė ir dr. Agnė Mikalauskaitė iš Fizinių ir technologijos mokslų centro, Nanostruktūrų laboratorijos, vadovaujamos dr. Arūno Jagmino. Magnetines MN-AuNK savybes vertino dr. Jonas Venius ir Marius Burkanas.

AKND@ γ -Fe₂O₃ sintezę atliko dr. Mahsa Parvizian ir dr. Walid Mnasri iš Paris Cité universiteto ITODYS laboratorijos, vadovaujamos prof. dr. Souad Ammar. Taip pat jie su kolegomis mokslininkais iš Tuniso ir Saudo

Arabijos atliko AKND@ γ -Fe₂O₃ erdvinių ir magnetinių savybių charakterizavimą.

GJE TPPS₄ molekulinis agregatus paruošė prof. dr. Saulius Bagdonas iš Fizikos fakulteto Vilniaus universitete. Dalį tyrimų (SEM, FDLT) atliko mokslininkai iš Biologinių tyrimų centro, Eötvös Loránd tyrimų tinklo Vengrijoje. Netiesinės mikroskopijos matavimus atliko dr. Lukas Kontenis iš „Šviesos konversijos“ (Lietuva). Visai tyrėjų grupei vadovavo prof. dr. Virginijus Barzda iš Cheminių ir fizinių mokslų departamento Toronto Mississauga universitete (Kanada).

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Diagnostiniai metodai

Medicininis vaizdinimas dažnai naudojamas tirti biologinius reiškinius, aptikti patologijas ir stebėti ligų eigą (Massoud & Gambhir, 2003; Hsu et al., 2013). Siekiant pagerinti medicininių vaizdų skiriamąją gebą, nuolat tobulinami ir naudojami naujausi vaizdinimo metodai. Šie metodai apima magnetinio rezonanso tomografiją (MRT), pozitronų emisijos tomografiją (PET), kompiuterinę tomografiją (KT), pavienių fotonų emisijos kompiuterinę tomografiją (SPECT), optinį fluorescencinį vaizdinimą, ultragarsinį (UG) ir fotoakustinį (FA) vaizdinimą (European Society of Radiology, 2011).

MRT konkrečių organų ar audinių vaizdų gavimui pasitelkia stiprius magnetinius laukus ir radijo bangas (RB) (Cruz et al., 2016). Dažnai MRT yra geriausias pasirinkimas dėl savo tikslumo, galimybės rekonstruoti 3D vaizdus, geros erdvinės skiriamosios gebos, užtikrinančios ryškų kontrastą su minkštaisiais audiniais, puikų signalo ir triukšmo santykį bei MRT matavimuose nenaudojamos kenksmingos spinduliuotės. Tačiau jis turi tam tikrų trūkumų, pavyzdžiui, ilgas apdorojimo laikas, paciento patiriamas triukšmas ir dideli generuojamų duomenų kiekiai (Antoch & Bockisch, 2009).

KT yra rentgeno spinduliais pagrįsta technika, skirta sukurti išsamius vidaus organų, kaulų, minkštųjų audinių ir kraujagyslių vaizdus (Anderla et al., 2013). Jonizuojančios spinduliuotės (rentgeno spinduliai) naudojimas yra vienas iš pagrindinių KT metodo trūkumų (Stephen P Power & Connor, 2016).

Atliekant PET skenavimą, vaizdams registruoti naudojama branduolinė technika. Šis metodas suteikia įžvalgų apie cheminių medžiagų judėjimą ir absorbciją konkrečiuose audiniuose bei leidžia tokiu būdu diagnozuoti ligas (Milne & King, 2014). PET pagrįsta pozitronus spinduliuojančio radionuklido, esančio biologiškai aktyvioje molekulėje, skleidžiamų gama spindulių aptikimu. Pagrindiniu šio metodo trūkumu laikomas jonizuojančiosios spinduliuotės (gama ir beta spindulių) naudojimas. Nepaisant trūkumų, PET skenavimas yra pranašus dėl savo gebėjimo aptikti vėžinius ir nevėžinius audinius ankstyvose vystymosi stadijose, mažesnę tikimybę pacientui užsikrėsti dėl medicininių intervencijų ir veiksmingesnės ankstyvų kai kurių neurologinių ligų stadijų diagnostikos, pvz., Alzheimerio ligos (Ono et al., 2003).

SPECT yra branduolinės medicinos tomografijos metodas, taip pat naudojantis gama spindulius (Spanoudaki & Ziegler, 2008). Šis metodas yra toks pat, kaip įprastinė kompiuterinė tomografija, išskyrus tai, kad SPECT

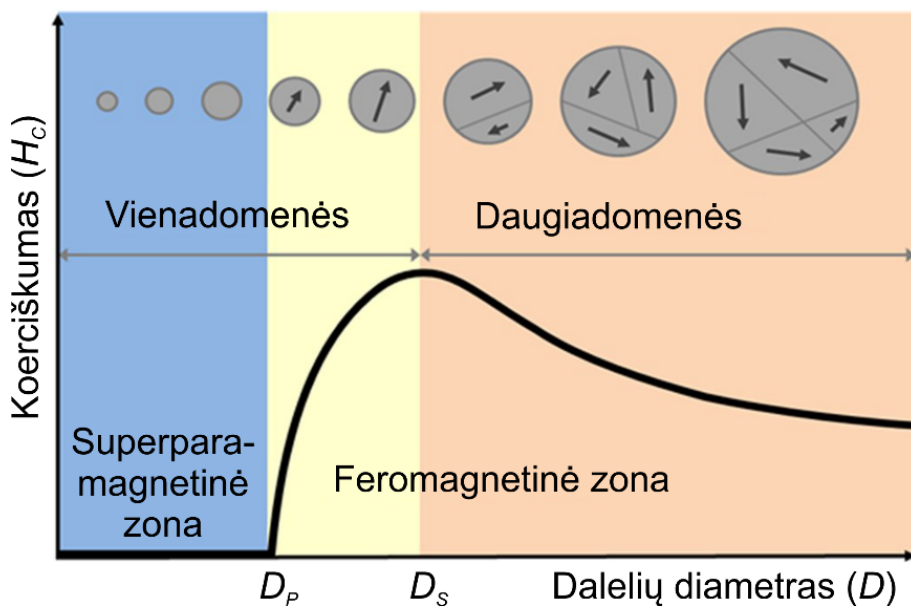
radioaktyvios spinduliuotės aptikimui naudojama gama kamera. Šiam tikslui į kraują suleidžiama gama spinduliuotę skleidžianti radioizotopinė medžiaga (pvz., galio (III) izotopas). Dažniausiai radioaktyvūs izotopai yra prijungiami prie konkretaus ligando, kad būtų sukurtas radioligandas, o pastarasis jungiasi su audiniais, į kuriuos norima taikytis. Šis kombinuojantis sujungimas leidžia ligando ir radiofarmacinio preparato derinį tiekti ir sukaupti norimoje kūno vietoje, kur susikaupęs preparatas būtų matomas gama kamera. Kaip ir kompiuterinės tomografijos bei PET metodų atvejais, taip ir SPECT susiduria su jonizuojančios spinduliuotės (rentgeno ir gama spinduliuotės) žalingo poveikio problema (Bateman, 2012).

Didelio kontrasto smulkių biologinių audinių vaizdai kompleksinėje aplinkoje yra svarbi ligų diagnostikos priemonė. Norint išgauti tokius vaizdus, net ir šiomis dienomis toliau tobulinami metodai ir vienas iš patraukliausių metodų yra daugimodalinis vaizdinimas, kuris padeda kompensuoti pavienių metodų trūkumus kitų metodų privalumais. Vaizdinimui papildomai pasitelkiant kontrastines medžiagas, tokias kaip magnetinės nanodalelės, įveikiami tipiški instrumentų ir prietaisų apribojimai bei išgaunami reikalavimus atitinkantys, didesnio kontrasto vaizdai.

1.2. Magnetinės nanodalelės ir jų savybės

Magnetizmas ar medžiagų magnetinės savybės – tai fundamentalieji reiškiniai, kuriuos sukelia magnetinių medžiagų, magnetinio lauko ir elektros srovės tarpusavio sąveika. Judančios dalelės, turinčios masę ir elektrinį krūvį, kuria magnetinius reiškinius. Šiomis dalelėmis gali būti elektronai, skylės, protonai, neigiami ir teigiami jonai. Tokios judančios ir elektrinį krūvį turinčios dalelės sukuria magnetinius dipolius. Jie gali jungtis į grupes, sudarydami magnetinius domenų, o pastarieji atitinkamai orientotis. Feromagnetinių medžiagų magnetiniuose domenuose dipoliai išsidėsto vienodomis kryptimis. Mažinant medžiagos dydį pasiekama kritinė vertė, tada medžiaga iš daugiadomenės tampa vienadomene – susiformuoja magnetinė (nano)dalelė. Priklausomai nuo medžiagos dydžio stipriai keičiasi ir jos koerciskumas (1 pav.). Koercija – tai magnetinės medžiagos, veikiamos įmagnetinančiam, priešingos krypties magnetiniam laukui, savybė priešintis visiškam išsimagnetinimui.

Magnetinės nanodalelės (MN) yra nanometrų skalės medžiagų klasė, savo sudėtyje turinti skirtingų metalų (pvz.: geležies, nikelio, kobalto ir t. t.) ir pasižyminti magnetinėmis savybėmis. Vienos iš dažniausiai sutinkamų MN yra geležies oksido atmainos: γ -Fe₂O₃ (maghemitas), Fe₃O₄ (magnetitas) ar α -Fe₂O₃ (hematitas). Nanodalelių (šerdies skersmuo įprastai gali būti nuo 1 nm



1 pav. Koerciškumo priklausomybės nuo nanodalelių dydžio grafikas bei magnetinių domenų pokytis keičiantis dalelės dydžiui. Adaptuota pagal (Sung Lee et al., 2015).

iki 100 nm, o tai yra pakankamai mažas dydis, kad jose galėtų pasireikšti superparamagnetinis elgesys, pvz.: superparamagnetinėse geležies oksido nanodalelėse (SPION) (*angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles*). Dėl pakankamai mažo dydžio, jų įmagnetėjimas, veikiant temperatūrai, gali atsitiktinai pakeisti kryptį. Laikotarpis tarp dviejų tokių atsitiktinių pasisukimų žinomas kaip *Néel* relaksacija. Jeigu ND įmagnetėjimo matavimo laikas neveikiant išoriniu magnetiniu lauku yra daug ilgesnis nei *Néel* relaksacijos laikas, laikoma, kad vidutinis įmagnetėjimas tampa artimas nuliui, o nanodalelės yra superparamagnetinėje būsenoje (Enriquez-Navas & Garcia-Martin, 2012).

Superparamagnetizmas – tai magnetizmo rūšis, asocijuojama su fero- arba ferimagnetinėmis nanodalelėmis. Veikiant išoriniu magnetiniu lauku, nanodalelės įmagnetėja, bet šio įmagnetėjimo neišlaiko pašalinus veikiantį lauką. Kitaip tariant, superparamagnetinės nanodalelės neturi liktinio įmagnetėjimo ir išsimagnetina, o tai lemia, jog SPION nesukimba tarpusavyje į didesnius aglomeratus (Wahajuddin & Arora, 2012). Frenkel ir Doefman pirmieji pasiūlė superparamagnetizmo idėją magnetinėms nanodydžio medžiagoms dar 1930 m. (Frenkel & Doefman, 1930). Jie spėjo, jog pakankamai mažos ir iš magnetinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų pagamintos nanodalelės demonstruos superparamagnetizmo charakteristikas.

Su metais MN panaudojimas išaugo daugelyje medicinos sričių, kurios apima hiperterminį vėžio gydymą (Kallumadil et al., 2009), kontroliuojamą vaistų išleidimą (Pankhurst et al., 2003; Dobson, 2006), magnetinio rezonanso tomografiją (N. Lee & Hyeon, 2012) ar biologinius jutiklius (G. Li et al., 2006; H. Lee et al., 2009). Pagrindinis MN pranašumas yra jų gebėjimas būti magnetiškai manipuliuojamomis išoriniu magnetiniu lauku. MN cheminė sudėtis, dydis, forma, morfologija ir atsakas į magnetinį lauką yra svarbiausi kriterijai nustatant jų pritaikymą biomedicinoje (Tran & Webster, 2010). Be to, magnetines savybes ir MN efektyvumą *in vivo* galima valdyti naudojant saugų ir biologiškai suderinamą apvalkalą, kuris padidintų magnetinių nanodalelių specifiškumą konkrečiam taikiniui žmogaus kūne (Gupta & Gupta, 2005). Šis apvalkalas įgalina norimą paviršiaus chemiją, padedančią integruoti funkcinis ligandus (Frullano & Meade, 2007). Pakeitus paviršiaus chemiją, MN gali tapti daugiafunkčėmis nanodalelėmis, t. y., cheminis modifikavimas suteikia multipleksinį funkcionalumą, pvz., kombinuotą hipertermijos ir vaistų pristatymą į norimą vietą (Balasubramanian et al., 2014) ir multimodalinį vaizdinimą (Frullano & Meade, 2007).

Pagrindinis šiomis dienomis taikomos vėžio chemoterapijos trūkumas yra tai, kad, suleidus ją sistemiskai į kraujotaką, chemoterapiniai vaistai nesugeba atskirti vėžinių ir sveikų ląstelių, todėl dažnai veikiamos ir kartu žudomos abiejų tipų ląstelės. Norint išspręsti šią problemą atliekama daug mokslinių tyrimų, kurie leistų nustatyti optimaliausias strategijas, kaip vaistus tiekti tik vėžinėms ląstelėms ir kartu išlaikyti aplinkinių sveikų ląstelių gyvybingumą (Kantoff et al., 2010; D. W. Lee et al., 2012). MN suteikia optimizmo, kaip galimas šio didelio iššūkio sprendimas, nes jos gali pakeisti vaistų farmakokinetiką, o tai lemtų sumažėjusį citotoksiškumą ir pailgėjusį vaistų atpalaidavimo laiką bei cirkuliacijos laiką (J.-E. Kim et al., 2012). Papildomai atsiranda galimybė MN lokalizuoti vėžiniuose dariniuose naudojant magnetinį lauką (Neuberger et al., 2005), nes magnetinės nanodalelės gali būti funkcionalizuojamos didelio afiniteto ligandais (pvz., biologinėmis molekulėmis, tokiomis kaip peptidai ir antikūnai, kurie gali aptikti vėžines ląsteles) siekiant dar labiau pagerinti jų selektyvumą (Veishe et al., 2005).

Kitas svarbus MN pritaikymas – pagerintas tikslinių audinių vaizdinimo kontrastas magnetinio rezonanso tomografijoje. MN galima lokalizuoti norimose audinių vietose ir taip jose padidinti protonų relaksaciją bei pagerinti jų matomumą (C. Sun et al., 2008). MN laikomos naujos kartos kontrastine medžiaga MRT. Vaizdinimui naudojamos MN susideda iš nanokristalinių dalelių, kurios gali būti toliau funkcionalizuojamos su biologiškai suderinamomis dangomis ir ligandais.

1.3. MN, kaip MRT kontrastinės medžiagos

MRT yra patrauklus vaizdų gavimo metodas ir galingas vėžio diagnostikos įrankis, pasižymintis puikiomis savybėmis, pvz., dideliu minkštųjų audinių kontrastingumu, didele erdvine skiriamąja geba (Kircher & Willmann, 2012) ir mažesne radiacijos apšvita, palyginus su KT ar PET (Schenkman, 2011). MRT ir branduolinio magnetinio rezonanso principai yra vienodi. Taikant šią techniką, pacientas arba mėginys veikiami stipriu magnetiniu lauku ten, kur vandenilio branduolių sukiniai yra tokios pačios arba priešingos orientacijos išoriniam magnetiniam laukui, kad būtų galima pasiekti atitinkamai mažesnės arba didesnės energijos būsenas. Paveikiami rezonansiniu radijo dažniu, branduoliai sugeria energiją ir padaugėja didesnės energijos sukinų skaičius (priešingos krypties, palyginti su taikomu išoriniu magnetiniu lauku), o tai lemia nepusiausvyros būsenos atsiradimą. Siekdami sugrįžti į pusiausvyrą ar relaksacijos būseną, sužadinti branduoliai išspinduliuoja dalį savo energijos skleisdami silpną, bet aptinkamą radijo dažnį. Magnetinio rezonanso signalui užregistruoti gali būti naudojami keli skirtingi atomai, tačiau registruoti skerspjūvio vaizdams dažniausiai identifikuojami norimoje vietoje esantys vandenilio branduoliai. Magnetinio lauko stiprumo padidėjimas gali pagerinti magnetinio rezonanso vaizdų kontrastą, jautrumą ir skiriamąją gebą. Tačiau padidinus magnetinio lauko stiprumą, padidėja radijo dažnio galia. Dėl radijo dažnio energijos, kurią absorbuoja paciento kūnas, radijo dažnio spinduliavimas gali sukelti kūno temperatūros padidėjimą, todėl biomedicinoje, pasitelkiant MRT metodą, labiausiai paplitęs magnetinio lauko stiprumas svyruoja nuo 1,5 T iki 3 T.

^1H , ^{11}B , ^{19}F , ^{13}C ir ^{31}P atomų protonai, vyraujantys audinius sudarančiose molekulėse, gali būti naudojami kaip MRT signalo šaltinis. Iš paminėtų protonų vandenilis (^1H) yra naudojamas kaip pagrindinis MRT signalo šaltinis dėl didelio prieinamumo audiniuose (Mehrmohammadi et al., 2013). MRT vyksta du pagrindiniai relaksacijos procesai: išilginė, dar vadinama sukinio-gardelės relaksacija, ir skersinė arba sukinio-sukinio relaksacija (Issa et al., 2019). Pašalinus veikiantį išorinį magnetinį lauką (B_0), sužadinti protonai stengiasi grįžti į žemesnės energijos (pusiausvyros arba relaksacinę) būseną. Išilginis protonų įmagnetėjimas atsistato lėtai (išilginė relaksacija). T1 yra relaksacijos trukmė, per kurią pasiekiamas 63% lygis nuo pradinio įmagnetėjimo atsistatant po išilginio įmagnetėjimo (Plewes & Kucharczyk, 2012). Protonas tuo pačiu metu ir nepriklausomai sukasi Larmoro dažniu $\omega_0 = \gamma B_0$ (kur γ yra giromagnetinė konstanta). Po radijo bangų impulso ω_0 panaudojimo protonų sukinio kryptis tampa priešinga B_0 kryptčiai, o sumažinus išilginį įmagnetėjimą, susidaro skersinis įmagnetėjimas. Pašalinus

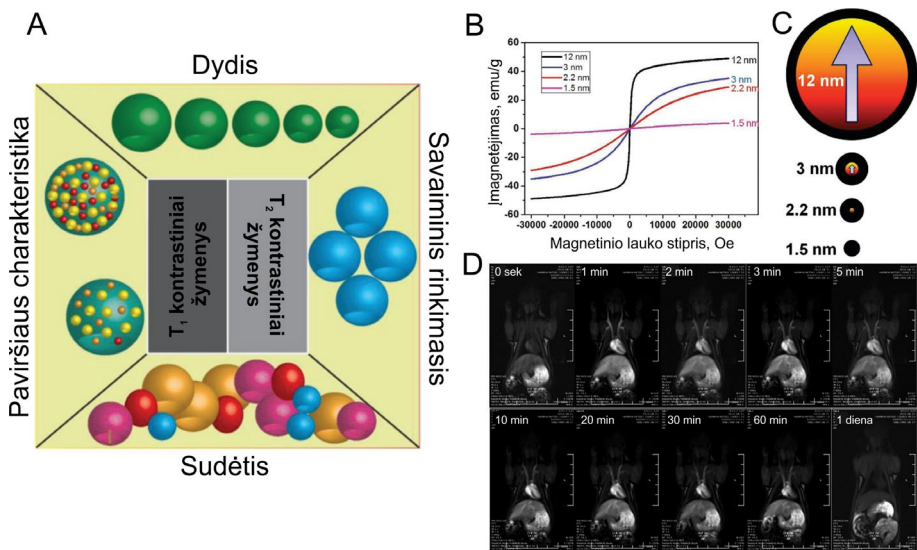
radijo bangų impulsą, sužadinti vandens protonai grįžta į relaksacijos būseną (lygiagrečiai B_0 kryptčiai). Šio proceso metu protonai skleidžia stebimą energiją, gautą iš RB impulso. Laikas, reikalingas įmagnetėjimui sumažinti nuo didžiausios vertės iki 37 % ($1/e$) jo sužadintos būsenos, vadinamas T2 trukme (skersinė relaksacija). T2 rodo skersinių įmagnetėjimo komponentų gesimą arba išsifazavimą (Plewes & Kucharczyk, 2012).

MRT vaizdinime naudojamų kontrastinių medžiagų principai grindžiami T1 (išilginė relaksacija) ir T2 (skersinė relaksacija) trukmėmis. Įprastai šiuos relaksacijos procesus galima įrašyti ir modifikuoti pilkų spalvų skalės vaizduose. MR kontrastinės medžiagos pagerina kontrastą sumažindamos MR relaksacijos laiką ir gali paveikti T1 ir T2 trukmes dėl dipolio-dipolio sąveikos (Tu et al., 2011). Išilginio įmagnetėjimo atkūrimo ir skersinio įmagnetėjimo nykimo greitį galima įvertinti atvirkščiai proporcingais dydžiais r_1 ($1/T1$) ir r_2 ($1/T2$). T1 trukme pagrįsto režimo vaizduose T1 atsipalaidavimo laikas yra trumpas, o išilginis įmagnetėjimas greitai atsistato. Esant šioms sąlygoms audiniai vaizduose atrodo šviesūs. Priešingu atveju, nuo T2 trukmių priklausomo režimo vaizduose tiksliniai audiniai greitai praranda skersinį įmagnetėjimą ir magnetinio rezonanso vaizduose yra atvaizduojami tamsūs. MR signalas, visų pirma, priklauso nuo lokalių protonų relaksacijos laikų kitimo, kuriam didelę įtaką daro vandens kiekis audiniuose ir vandenilio molekulių gebėjimas juose judėti. Įvairiuose audiniuose yra skirtingas vandens protonų tankis. Ši priežastis sąlygoja vandens protonų relaksacijos greičius ir to pasekmė, kad skirtinguose biologiniuose audiniuose generuojamas skirtingas MRT kontrastas (Mikawa et al., 2001).

Klinikinėje praktikoje aukščiausios skiriamosios gebos vaizdai sukuriami naudojant T1 trukmes, nes ji sukuria šviesų ir ryškų signalą. Tamsūs signalai, kuriuos sukuria T2 trukmės, gali būti supainioti su organizmo vidinėmis sąlygomis, tokiomis kaip: oras, kraujavimas ar kraujo krešuliai (Ahmed et al., 2009). Paramagnetiniai jonai šalia protonų gali paveikti T1 kontrastines medžiagas. Pavyzdžiui, gadolinio jonas Gd^{3+} su septyniais nesuporuotais elektronais pademonstruotų geriausią efektą. Gd-dietileno triaminopentaacto rūgšties ir tetraazaciklododekantetraacto rūgšties junginiams teikiama pirmenybė klinikiniuose tyrimuose, kadangi laisvas Gd^{3+} pasižymi toksišku poveikiu (Caravan, 2006). Taip pat Gd^{3+} sukelia kitus šalutinius efektus, pavyzdžiui, nefrogeninę sisteminę fibrozę (Penfield & Reilly, 2007). Dėl šios priežasties buvo kurti Mn^{2+} junginiai (Na et al., 2007; Taylor et al., 2008; Mertzman et al., 2009), tačiau jų biologinis suderinamumas nėra iki galo įvertintas, tad ir mangano junginiai gali sukelti šalutinį poveikį, pavyzdžiui, neurotoksiškumą (Karki et al., 2013). MRT kontrastinių žymenų srityje SPION yra patraukli priemonė, pagerinanti vaizdų

kontrastą ir aiškumą. Šios nanomedžiagos parodė gerą biologinį suderinamumą ir mažesnę atmetimo tikimybę (Markides et al., 2012).

Gebėjimas pagreitinoti relaksacijos greitį apibūdinamas relaksuojamumo koeficientais (r_2 arba r_1 ($\text{mM}^{-1} \text{S}^{-1}$)). Norint pasiekti optimalų T2 MR vaizdo kontrastą, pirmenybė teikiama didelėms r_2 reikšmėms (siekiama didelio r_2/r_1 santykio). Kitaip nei su T2 vaizdais, T1 MR vaizdų kontrastas turėtų pasižymėti didele r_1 reikšme (siekiama išgauti mažas r_2/r_1 reikšmes). Tinkamų MN parinkimas gali paveikti T1 ir T2 MRT kontrastines savybes ir optimizuoti r_2/r_1 reikšmę. MN dydis, sudėtis, paviršiaus būseną ir forma laikomi svarbiais parametrais reguliuojant r_2/r_1 santykį (2 pav. A) bei bus aptariami kituose poskyriuose.



2 pav. (A) Įvairios MN savybės, darančios įtaką r_2/r_1 santykiui ir atitinkamai MR vaizdo kontrastui. Adaptuota pagal (Farzin et al., 2020). (B) Skirtingo diametro (1,5 nm, 2,2 nm, 3 nm ir 12 nm) magnetinių geležies oksido nanodalelių (ION) įmagnetėjimo kreivės. (C) Įvairių dydžių ION sukinių polinkio (*angl. spin canting*) efekto schema. Raudona spalva atitinka magnetinę šerdį, o juoda spalva – defektų turintį apvalkalą. (D) Žiurkės MR vaizdai įvairiais laikotarpiais po ION injekcijos. (B–D) Adaptuota pagal (B. H. Kim et al., 2011).

1.3.1. Dydžio įtaka magnetinių nanodalelių savybėms

Magnetinių nanodalelių paviršiuje esančių atomų elektrinės savybės visiškai skiriasi nuo tų, kurie yra vidiniuose sluoksniuose. Tad bendras MN magnetinis momentas yra integruota magnetinių sukinių, esančių MN pakraštyje ir centre, suma (Z. Zhou et al., 2019). Keli tyrimai parodė, kad prisotintas įmagnetėjimas (M_s) ir skersmuo (d) turi įtakos T2 relaksacijos padidėjimui (Z. Zhao et al., 2013).

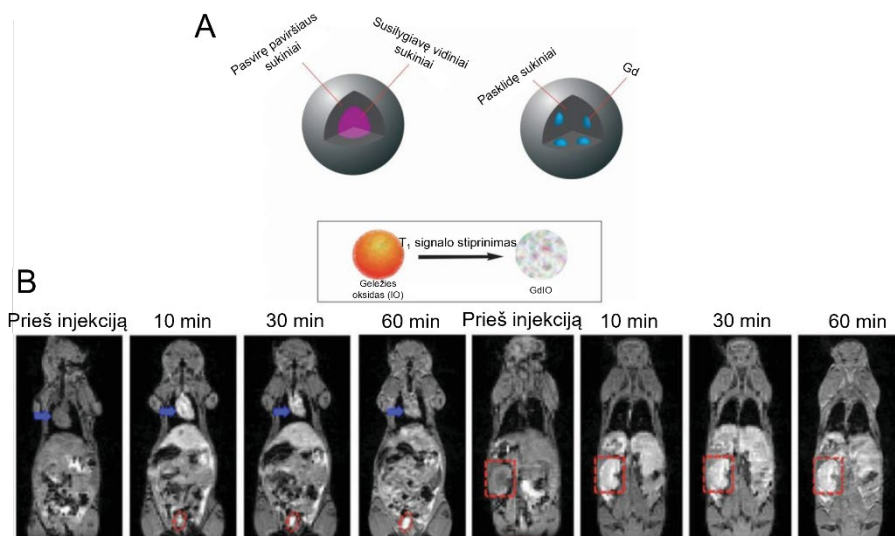
Didesnio skersmens MN turi didesnes M_s vertes (Jun et al., 2005). Jun et al. 4, 6, 9 ir 12 nm skersmens geležies oksido nanodalelėse (ION) stebėjo atitinkamai 25, 43, 80 ir 102 emu/g geležies M_s reikšmes (Jun et al., 2005). Mažesnio dydžio MN paviršiuje eksponuojamas didesnis metalo atomų skaičius, padidinantis santykį su vandens protonais ir įgalinantis efektyvesnius cheminius mainus nanodalelių paviršiuje (Z. Zhou et al., 2019). Lu et al. parodė, kad mažo dydžio ION yra veiksmingos T1 kontrastinės medžiagos, leidžiančios išgauti didelės skiriamosios gebos MR angiografijos vaizdus tyrimuose su biglių veislės šunimis (Y. Lu et al., 2017).

Kim et al. parodė, kad dalelių dydis turi reikšmingą įtaką MN magnetinėms savybėms (B. H. Kim et al., 2011). Jie susintetino homogeniškas, itin mažas, skirtingo diametro geležies oksido nanodaleles (ESION) (1,5, 2,2, 3 ir 12 nm). Mažinant nanodalelių dydį mažėjo ir susintetintų ESION įmagnetėjimas (2 pav. B). Sukinių nuokrypio efektas teigia, kad paviršiaus atomų sukiniai niekada nėra visiškai suderinti. Jei daroma prielaida, kad sukinų nuokrypį turintis geležies oksido dalelių sluoksnis yra 0,8 nm, 93,6 % sukinų 3 nm dydžio nanodalelėje bus pasvirę. ION, kurių skersmuo yra 12 nm ir 2,2 nm, atitinkamai 38,6 % ir 99,4 % sukinų yra pasvirę (2 pav. C). Vienos dalelės magnetinis momentas smarkiai sumažėja, kai mažėja dalelės dydis. Kaip matyti iš 2 pav. D dalies, žiurkei per uodegos veną suleidus 12 nm dydžio ESION, kraujagyslės išryškėja T1 trukmių sąlygotame MRT signale, o tai rodo, kad ESION gali pagerinti T1 relaksaciją kraujotakos sistemoje.

1.3.2. Sudėties įtaka magnetinių nanodalelių savybėms

ND sudėtis daro įtaką suminiam jų magnetizmui, taigi ir jų vaidmeniui MRT kontrastinėse medžiagose (Shah et al., 2015). ND magnetiniam stiprumui įtakos turi metalo jonų įvedimas (legiravimas) ir pasiskirstymas nanodalelės struktūroje. Geležies jonų padėtis oktaedrinėse arba tetraedrinėse struktūrose veikia jų magnetinį stiprumą (O'Handley, 1999). Geležies jonai oktaedrinėse magnetito struktūros vietose sukelia feromagnetines savybes, o magnetiniai jonai tetraedrinėse vietose yra antiiferomagnetinėje padėtyje. Kadangi magnetito struktūrose oktaedrinėse ir tetraedrinėse padėtyse yra vienodas geležies jonų kiekis, jų magnetiniai sukiniai neutralizuoja vienas kitą. Vienas iš būdų pagerinti MN magnetinį stiprumą yra legiruojant pakeisti geležies jonus kitais pereinamųjų metalų jonais, tokiais kaip: Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ir Ni^{2+} , ir tokiu būdu sukurti magnetizuotas geležies oksido nanodaleles (MFe_2O_4 , kur M = Ni, Co, Zn ir Mn) (J.-H. Lee et al., 2007; Joshi et al., 2009).

Zhou et al. parodė, kad T1 kontrasto poveikis pagerėja, kai ION yra legiruojamas retųjų žemių elementais (pvz., gadoliniu) (Z. Zhou et al., 2013). Tyrėjų komanda susintetino gadoliniu legiruotas geležies oksido (GdIO) ND ir įvertino legiravimo poveikį T1 MRT kontrastui. Jie parodė, kad įterpus į ION gadolinio, vidiniai ND sukinių yra išsklaidomi ir padidėja pasvirusių sukinių sluoksnio storis. Šis elgesys gali stipriai paveikti T1 MR vaizdo kontrastą ir pagerinti vaizdo ryškumą (3 pav. A). Jie taip pat ištyrė MRT T1 kontrastą *in vivo* tyrimuose su pelėmis, kurioms įvairiems laikotarpiais (0, 10, 30 ir 60 min.) buvo sušvirkščijama 4,8 nm dydžio GdIO 2,0 mg/kg dozė (3 pav. B). Iš vaizdų matyti, jog GdIO ND suleidimas padidina širdies, inkstų ir šlapimo pūslės vaizdų kontrastą praėjus 10 minučių po injekcijos. Laikui bėgant širdyje gali būti matomas mažėjantis signalas, o inkstuose ir šlapimo pūsleje – didėjantis.



3 pav. (A) Schema, reprezentuojanti sukinių pasvirimo fenomeną mažo dydžio GdIO ir geležies oksido nanodalelėse. Gd įterpimas į ION padidina sukinių sluoksnio storį ir pagerina T1 MRT vaizdo kontrastą ir ryškumą. (B) T1 trukmės perteikiantys MRT vaizdai, demonstruojantys pelės po injekcijos su GdIO ND (2,0 mg GdIO ND dozė vienam kg pelės masės) skirtingais laiko momentais. Mėlynos rodyklės žymi širdį, raudonas apskritimas – šlapimo pūslę, o raudoni brūkšniniai kvadratai – inkstus. Adaptuota pagal (Z. Zhou et al., 2013).

Itin mažų ferito nanodalelių (FND) pagrindu pagamintos T1 kontrastinės medžiagos pastaraisiais metais buvo plačiai naudojamos aukštos skiriamosios gebos MRT vaizdinimui (Y. Lu et al., 2017; Wei et al., 2017). Palyginti su Gd pagrindu pagamintais T1 kontrastiniais žymenimis, mažesnės nei 5 nm FND pasižymėjo stipresniu T1 MR signalu (Z. Li et al., 2013) ir mažesniu toksiškumu (R. Chen et al., 2015). Tiriant įvairias FND buvo parodyta, kad

ypač mažų mangano ferito nanodalelių (MFND) r_1 relaksuojamumo vertė, palyginus su tokio paties dydžio maghemito ND, buvo iki 1,7 karto didesnė (L. Yang et al., 2017). MFND (cheminė formulė $Mn_xFe_{3-x}O_4$) T1 relaksuojamumo vertė būna didžiausia, kai $x = 0,75$, ir mažiausia, kai $x = 1,57$ (Miao et al., 2019). Visgi pernelyg didelis mangano kiekis (padidėjimas iki $x > 1$) daro didelį neigiamą poveikį biologiniam suderinamumui. Didelis Mn^{2+} jonų išsiskyrimas gali sukelti citotoksiškumą, tad mangano kiekį derėtų optimizuoti. Naujausi tyrimai parodė, kad $Mn_xFe_{3-x}O_4$ ($x = 0,75-1$) ND suteikia optimaliausią T1 MR kontrastą ir biologinį suderinamumą (L. Yang et al., 2017).

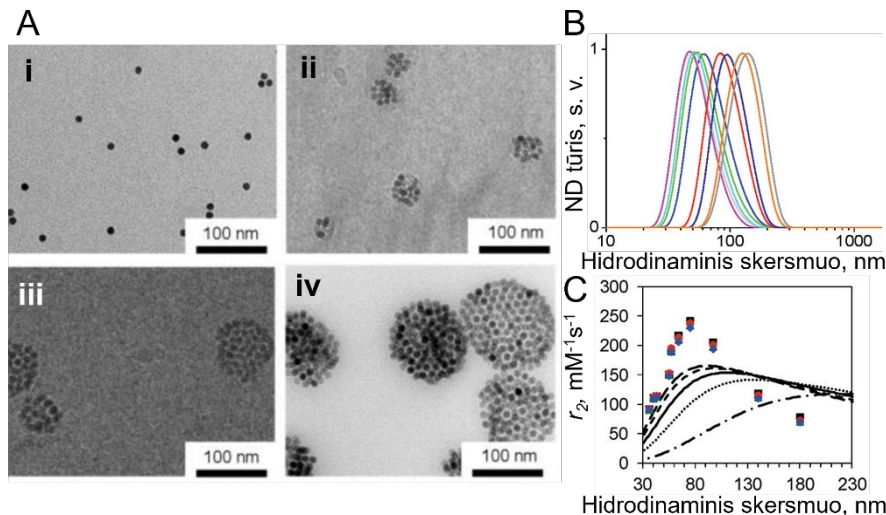
1.3.3. Paviršiaus charakteristikų poveikis magnetinių nanodalelių savybėms

Yra žinoma, kad tinkamo storio dangalas aplink MN gali užtikrinti geresnį biologinį suderinamumą, sumažinti toksiškumą, pailginti cirkuliacijos laiką, sumažinti aglomeraciją ir įgalinti kontroliuojamo vaistų išleidimo taikinyje galimybes (Q. Wang et al., 2015). Tačiau tokio tipo danga taip pat gali daryti įtaką r_2/r_1 vertei. Tromsdorf et al. susintetino polietilenglikoliu (PEG) dengtas ION, skirtas naudoti kaip kontrastines medžiagas T1 MRT vaizdinime (Tromsdorf et al., 2009). Jie parodė, kad r_1 reikšmė nepriklauso nuo PEG grandinės ilgio, tačiau r_2 vertė nuo to priklauso labai stipriai. Schwaminger kartu su bendraautorais patvirtino, kad oksidacijos sluoksnis sumažina įmagnetėjimą ir stipriai veikia ION krūvį, cheminį aktyvumą, biologinį suderinamumą ir katalizines savybes (Schwaminger et al., 2017).

1.3.4. Savaiminio rinkimosi įtaka magnetinių nanodalelių savybėms

Superparamagnetinių ND rinkimasis stipriai veikia T2 kontrastą MR vaizduose (J. Guo et al., 2013). ND, ypač magnetinės, yra linkusios aglomeruoti ir klasterizuotis. Kiekvieną klasterį sudaro kelios MN, kurios laikomos viena didele įmagnetinta sfera, o klasterio bendras magnetinis momentas yra tiesiogiai susijęs su jo dydžiu (ND skaičiumi klasterio viduje). Pösel et al. geležies oksido nanodalelių pagrindu susintetino PEG padengtus kontrastinius žymenis T2 MR vaizdams gauti (Pösel et al., 2012). Jų susintetintų ND klasterių hidrodinaminis skersmuo buvo 51, 70, 79 ir 141 nm (4 pav. A). Hidrodinaminio dydžio matavimams jie taikė dinaminės šviesos sklaidos (DLS) techniką (4 pav. B). Skersinis relaksuojamumas r_2 yra jautrus vandens molekulių difuzijos procesui į daleles. ND klasterių skersinis relaksuojamumas pasižymėjo trimis skirtingais režimais, priklausančiais nuo

klasterio dydžio: judėjimo vidurkio režimu (MAR, *angl. motional averaging regime*), statiniu išsifazavimo režimu (SDR, *angl. static dephasing regime*) ir aidą limituojančiu režimu (ELR, *angl. echolimiting regime*). MAR regione r_2 reikšmė padidėjo, SDR srityje išliko pastovi, o ELR srityje sumažėjo (4 pav. C). Geriausia r_2 vertė buvo gauta SDR srityje, kurioje ION klasterių dydis siekė apie 100 nm. Tad norint pasiekti maksimalų r_2 relaksuojamumą buvo svarbu kontroliuoti ND aglomeraciją (Yoon et al., 2011).



4 pav. (A) TEM vaizdai iš pavienių ir sugrupuotų SPION atskleidžia, kad dinaminis skersmuo yra i) 51 nm, ii) 70 nm, iii) 79 nm ir iv) 141 nm. (B) PEI-b-PCL-b-PEG micelių su 9,8 nm superparamagnetinio geležies oksido (SPIO) kristalais DLS tūrio pasiskirstymai. Skirtingo dydžio micelių, su įkapsuliuotais 9,8 nm SPION, tūrio skirstiniai rodo, kad skirtingų micelių vidutinis hidrodinaminis dydis yra nuo 51 iki 141 nm. (C) Pavienių ir susiklasterizavusių ION r_2 relaksuojamumo priklausomybė nuo hidrodinaminio skersmens. SPIO nanokristalų organinio sluoksnio storis buvo 0,25 nm (---), 0,5 nm (- - -), 1 nm (—), 2 nm (···) ir 5 nm (-·-·-). Adaptuota pagal (Pösel et al., 2012).

Nors dauguma MN yra linkusios pasyviai lokalizuotis ir kauptis ligos apimtuose audiniuose, konjugacija su afinityvumą pagerinančiais ligandais, tokiais kaip: antikūnai, peptidai ir aptamerai, yra labai svarbi diagnostiniams aspektams. MN, padengtos ligandais, kaupiasi vėžio ląstelėse ir generuoja žymiai stipresnį MR signalą nei ligandų neturinčios magnetinės nanodalelės (Abakumov et al., 2015). Iš mokslinių tyrimų žinoma, kad MN T2 relaksuojamumo reikšmės labai priklauso nuo ligandų, prijungtų prie MN paviršiaus (Abakumov et al., 2015). Covarrubias et al. dekoravo ION dviejų tipų ligandais, nukreiptais į du skirtingus, labiau ekspresuojamus endotelio naviko biožymenis (Covarrubias et al., 2018). Tai P-selektinas ir fibronektinas, kurie padeda fokusuoti ir vaizdinti krūties vėžį pelių modeliuose. Jie parodė, kad prie vieno ligando nanograndinės prijungtos ION

turi 2,5 karto didesnę susitelkimą navike nei grynos, nedengtos ION. Taip buvo pademonstruota, kad ION, padengtų vėžiui specifiniais ligandais, generuojami MR signalai yra lengviau registruojami.

1.3.5. Formos įtaka magnetinių nanodalelių savybėms

Stiprios ir atskiros MN dalys yra magnetiniai momentai, kurių savybės reikšmingai paveikia koloidinių ND forma (Jeong et al., 2016). Tradicinė elektrodinamikos teorija patvirtino, kad tik elipsės formos dalelės turi homogeninį įmagnetėjimą ir bet koks formos iškraipymas ar pakitimai veda link nehomogeninio įmagnetėjimo (Z. Zhou et al., 2019). MN forma stipriai veikia jų įmagnetėjimą. Pavyzdžiui, kubinėse MN sukiniai koncentruojasi kubinės struktūros kampuose (Z. Zhou et al., 2019). Tai lemtų vandens molekulių asociaciją ir relaksaciją aplink kubines daleles ir dėl šios priežasties r_2 reikšmių padidėjimas yra stipriai indukuojamas lyginant su sferinėmis MN. Lee su kolegomis (N. Lee et al., 2012) paruošė kubines ION, turinčias kritinį 22 nm kraštinės ilgį ir akivaizdžiai didesnę r_2 vertę, lygią $761 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Fosfolipidais ir polietilenglikoliais padengtos kubinės ION gali būti naudojamos didelio jautrumo kasos salelių kontrastavimui MRT (N. Lee et al., 2011).

Aštuonkojės ION taip pat pasižymėjo ypač didele r_2 verte $679,3 \pm 30 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Z. Zhao et al., 2013), todėl jas buvo galima naudoti kaip MRT kontrastinę medžiagą pelių kepenų navikams vaizdinti. Kiti tyrimai parodė, kad tuščiaavidurės mangano oksido ND pasižymi didesniu T1 ir T2 relaksuojamumu nei vandenyje tirpios mangano oksido ND, todėl ir jas būtų galima naudoti kaip MRT kontrastinę medžiagą (J. Shin et al., 2009). Šie rezultatai tik dar kartą patvirtina, kad MN formos modifikavimas yra vienas geriausių būdų jas paruošti MRT kontrasto gerinimui.

Apibendrinant galima teigti, kad MRT jautrumą ir kontrastą galima pagerinti papildomai naudojant kontrastines medžiagas – magnetines nanodaleles. Nors MRT kontrasto gerinimui naudojama daug įvairių izotopų (pvz., ^7Li , ^{13}C , ^{83}Kr ir kt.), dominuojantis metodas MRT yra pagrįstas žmogaus organizme, vandenyje esančiu vandenilio kiekiu (Davies et al., 2013). Taikant elektrovaros jėgą, vandenilio branduolių magnetiniai momentai priverčiami išsirikiuoti pagal magnetinio lauko orientaciją ir sugeneruojamas radijo dažnis. Pašalinus radijo dažnio perturbacijas, vandenilio branduoliai relaksuodami stengiasi grįžti į pradinę, originalią pusiausvyros būseną (Stephen et al., 2011). Atsipalaidavimo greitį lemia išilginės (T1) ir skersinės relaksacijos (T2) trukmės. Norint pagerinti MRT vaizdų kokybę, reikia paspartinti relaksacijos procesą. Paskutiniu metu sintetami Gd chelatai ir

ION gali pasitarnauti kaip klinikinės kontrastinės medžiagos atitinkamai T1 ir T2 trukmių vaizdinime. Kelios mokslinių tyrimų grupės pagerino kontrastines medžiagas, suteikdamos joms didesnę kontrasto potencialą. Svarbiausios MN savybės, turinčios įtakos jų magnetizmui ir kontrasto efektui, yra jų dydis, sudėtis ir susirinkimas. Nustatyta, kad magnetizmo stiprumas pagerinamas mažinant ND dydį. Metalinių priedų (pvz., Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ir Ni^{2+}) įvedimas ir paskirstymas nanodalelės struktūroje taip pat gali daryti įtaką jų magnetinėms savybėms. T1 ir T2 kontrastinės medžiagos gali generuoti šviesų arba tamsų signalą. Registruojant tik T1 arba T2 trukmių sąlygotus MR vaizdus, prarandama dalis ligos pažeisto audinio detalių. Kitame skyriuje bus aptariamos T1-T2 dvigubo vaizdinimo MRT kontrastinės medžiagos, kurios pateikia vertingos informacijos iš ligos apimtų audinių, ypatingą dėmesį skiriant vėžiniams audiniams.

1.4. Magnetinių dalelių vaizdinimas

Magnetinių dalelių vaizdinimas (MDV) yra besivystanti nauja tomografijos technika, leidžianti gauti didelės skiriamosios gebos, puikaus jautrumo tikslinių audinių vaizdus realiuoju laiku bei atlikti diagnostinį vaizdinimą ir gydymo eigos stebėjimą (Goodwill et al., 2012). Šis metodas naudoja netiesinį MN žymeklio įmagnetėjimą, sukurdamas žymeklio pasiskirstymo žemėlapius (Rahmer et al., 2013). Per pastarąjį dešimtmetį MDV buvo pritaikytas ląstelių sekimui, vėžinių audinių vaizdinimui ir angiografijai (Y.-X. J. Wang, 2011). Nors MDV skaitytuvai tebėra klinikinių tyrimų stadijoje, pastangos kuriant MDV žymeklius žmogaus organizmo vaizdinimui tebevyksta. Kadangi MDV labai priklauso nuo žymeklių kokybės, jo sėkmė ateityje priklauso būtent nuo magnetinių nanodalelių plėtros. Atsižvelgiant į tai, kad MDV nesusiduria su foniniu signalu audiniuose ir naudoja žemo dažnio magnetinį lauką, jis pasižymi puikiu vaizdinimo kontrastu ir nėra ribojamas prasiskverbimo į gilesnius audinius.

MDV kontrastinis vaizdinimas yra stipriai priklausomas nuo geležies pagrindu pagamintų žymenų charakteristikų. Superparamagnetiniai geležies oksidai (SPIO) pirmiausia buvo sukurti kaip MRT kontrastinės medžiagos. Palaipsniui SPIO pradėta naudoti MDV, kadangi jie yra saugūs ir biodegraduojantys (Panagiotopoulos et al., 2015). SPIO žmogaus organizme gali išlikti nuo kelių valandų iki dienų. PET ir SPECT metodų metu naudojami klinikiniai žymenys organizme užsilaiko ganėtinai trumpai, todėl atsiranda poreikis didelės energijos zondams (Bauer et al., 2015). Iki šios dienos jau sukurta nemažai MDV kontrastinių medžiagų, kurios patvirtintos Maisto ir vaistų administracijos (JAV) arba yra klinikinių tyrimų stadijose (Reimer &

Balzer, 2003). Dauguma patvirtintų MRT kontrastinių medžiagų gali būti naudojami ir kaip MDV žymenys. Ferukarbotranas (*Resovist*) ir ferumoksitolis istoriškai naudojamos kaip kliniškai patvirtintos kontrastinės medžiagos kepenų/blužnies MRT (Ferguson et al., 2009, 2011). Visgi pastaraisiais metais būtent MDV žymenų sintezė, kūrimas ir optimizavimas sulaukia vis didesnio mokslininkų susidomėjimo.

Vaizdų, užregistruotų per MDV, skiriamąją gebą stipriai veikia dalelių šerdies dydis ir naudojamų žymenų dydžio pasiskirstymas. Tyrimuose pateikiami rezultatai leidžia daryti išvadą, kad geriausia MDV kokybė ir skiriamoji geba fiksuojama, kai SPIO skersmuo siekia apie 25–30 nm (L. C. Wu et al., 2019). Svarbu pažymėti, kad kuriant MDV žymenis taip pat svarbu atsižvelgti į cirkuliacijos laiką, žymenų ląstelėse įsisavinimą, pasiskirstymą, biologinį suderinamumą (Song et al., 2018), kristalų struktūrą (Starmans et al., 2015) ir paviršiaus kokybę (Fass, 2008).

1.5. Multimodalinis vaizdinimas su MN

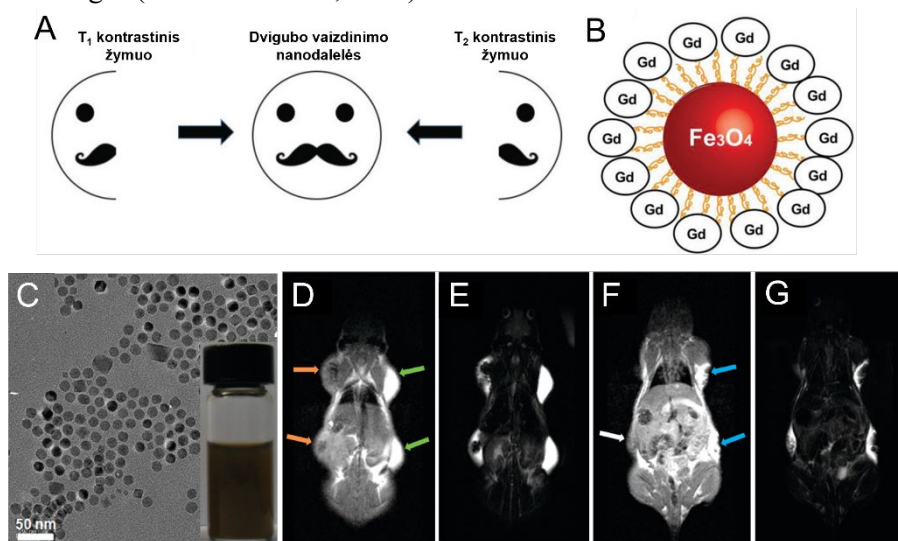
Pavienės vaizdinimo technikos įprastai turi savų trūkumų ir negali pateikti detalių rezultatų apie audinį. Kombinuoti KT-MRT vaizdai naudojami surinkti išsamią informaciją apie konkrečius audinius (Kircher & Willmann, 2012). Tikslus ir jautrius vaizdus galima išgauti derinant įvairius medicininio vaizdinimo metodus, pavyzdžiui, MRT, KT, PET ar optinę biopsiją (Cho et al., 2010). Norint išgauti dar išsamesnę informaciją, skirtingų vaizdinimo technikų metu papildomai galima naudoti daugiafunkces ND (Jun et al., 2008). Tolimesniuose skyriuose paaiškinami multimodalinio vaizdinimo technikų, pvz., T1-T2 MRT, KT-MRT ir MRT-PET/SPECT, naudojimo privalumai.

1.5.1. T1-T2 dvigubo režimo MRT kontrastiniai žymenys

T1 ir T2 kontrastinės medžiagos gali generuoti šviesius ir tamsius signalus. Tačiau yra keletas endogeninių artefaktų, kurie gali stipriai iškraipyti MRT vaizdų jautrumą ir tikslumą. Tai riebalai, hemoragijos, kraujo krešuliai ir oras (Bulte & Kraitchman, 2004). Aukštos kokybės MR vaizdus būtų galima gauti sumažinus šių endogeninių artefaktų poveikį.

Vienas kitą papildantys, T1 ir T2 trukmių sąlygoti MR vaizdai gali būti naudojami eliminuojant neaiškumus iš pažeistų audinių. Tačiau tam reikia naudoti tiek T1, tiek T2 trukmių signalą generuojančius kontrastinius MRT žymenis (5 pav. A). T1 MRT (teigiamas) ir T2 MRT (neigiamas) signalai vienu metu gali būti pasiekti naudojant dvigubo režimo ND kontrastinius

žymenis. Yra įvairių būdų, kaip sukurti tokio tipo medžiagas. Pvz., T2 kontrastą suteikiančių nanodalelių paviršių galima padengti T1 signalą generuojančiomis medžiagomis arba įterpti T1 kontrastines medžiagas į MN ir tokiu būdu sukombinuoti magnetiškai atsietas T1 ir T2 kontrastines medžiagas (T.-H. Shin et al., 2014).

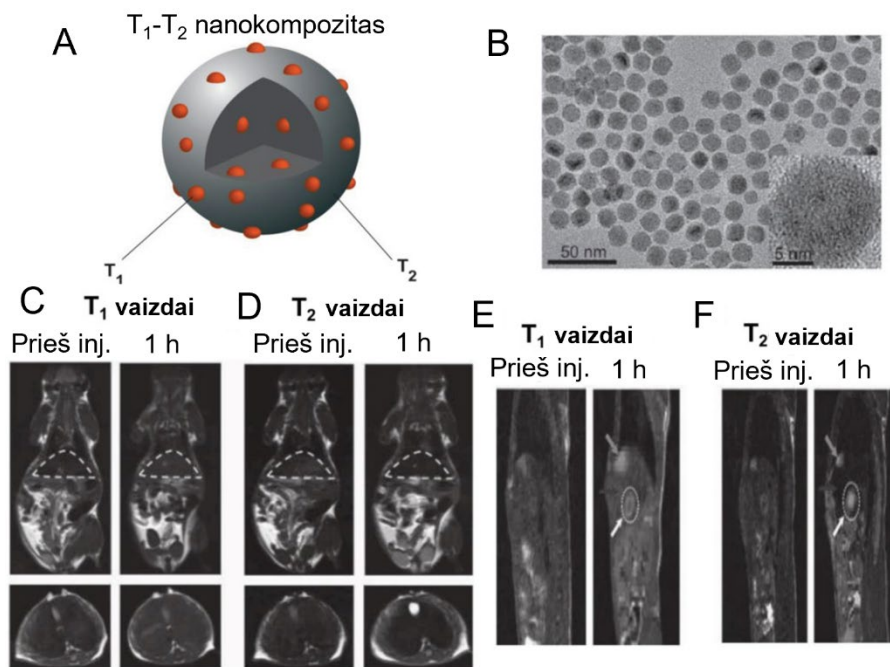


5 pav. (A) T1 ir T2 svertinių MRT kontrastinių medžiagų veikimo schema. (B) Gadoliniu pažymėtų magnetinių nanodalelių schema. (A ir B) Adaptuota pagal (Farzin et al., 2020). (C) Po sintezės gautas gadoliniu pažymėtų MN TEM vaizdas. (D) T1 svertiniai ir (E) T2 svertiniai MR vaizdai, užfiksuoti suleidus *Feridex* (oranžinės rodyklės) ir *Magnevist* (žalios rodyklės). (F) Pelės T1 ir (G) T2 trukmių svertiniai MRT vaizdai po injekcijos su GMND (injekcijos vieta pažymėta mėlynomis rodyklėmis). (C–G) Adaptuota pagal (Bae et al., 2010).

Siekiant padidinti vaizdų kontrastą ir aiškumą, tiesioginis ir vienas iš paprasčiausių būdų yra T1 MRT kontrastinių medžiagų konjugavimas ant T2 MRT medžiagų paviršiaus. Taip sukuriamas dvigubo vaizdinimo MRT T1-T2 kontrastinis žymuo. Bae et al. sukūrė gadoliniu pažymėtas magnetito nanodaleles (GMND) ir panaudojo jas T1-T2 dviejų režimų MRT vaizdinime (5 pav. B) (Bae et al., 2010). Susintetintoje GMND struktūroje gadolinis veikia kaip T1 svertinis, o magnetitas – kaip T2 svertinis MRT kontrastinis žymuo. TEM vaizduose matyti, jog susintetintos GMND pasižymėjo sferine morfologija ir buvo gerai dispergavusios dejonizuotame vandenyje (5 pav. C). MN magnetinės savybės ir kristalinė struktūra po konjugavimo su gadoliniu iš esmės nepasikeičia. *In vivo* MRT eksperimentai buvo atlikti norint patvirtinti, kad susintetinta nanosistema yra tinkama naudoti kaip T1-T2 dviejų režimų MRT kontrastinis žymuo. Į beplaukių pelių nugarinius šonus buvo suleista trijų tipų MN: 1) *Magnevist* (komerciškai prieinamas T1 trukmių MRT kontrastinis žymuo, savo sudėtyje turintis gadolinio oksido), 2) *Feridex*

(komerciškai prieinama T2 svertinė MRT kontrastinė medžiaga, kurioje yra geležies oksido) ir 3) GMND (turi ir Gd, ir geležies oksido) – T1-T2 dvigubo vaizdinimo MRT kontrastinio žymens atitikmuo. Kaip matyti 5 paveikslu D dalyje, *Magnevist* injekcija padidina šviesų plotą T1 svertiniuose MR vaizduose. Tamsūs T2 svertinių MR vaizdų signalai sustiprinami suleidus Feridex (5 pav. E). Papildomai (5 pav. F, G) galima pastebėti, kad pelei suleidus GMND T1 šviesus signalas didėja, o T2 signalas injekcijos vietoje stipriai nukrinta. Nustatyta, kad susintetintų GMND r_1 yra $11,17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, o tai yra žymiai didesnio relaksuojamumo reikšmė nei *Magnevist* r_1 reikšmė ($5,39 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Tai leidžia daryti išvadą, kad susintetintos ND galėtų būti panaudojamos kaip dvigubo režimo (T1 ir T2) kontrastiniai žymenys MRT.

Kitas T1-T2 dvigubo vaizdinimo MRT kontrastinių žymenų gamybos būdas yra T1 paramagnetinių medžiagų įterpimas į T2 MN (6 pav. A). Įterpiančios T1 kontrastinę medžiagą į T2 kontrastinę medžiagą, tiek T1, tiek T2 medžiagų magnetinis stiprumas padidėja tuo pačiu metu. Zhou et al. įterpė Gd_2O_3 (kaip T1 kontrastinę medžiagą) į ION vidų ir taip sukūrė T1-T2 dviejų



6 pav. (A) T2 kontrastą generuojančių ND viduje įterptų T1 MRT kontrastinių medžiagų schema. (B) Susintetintų Gd_2O_3 (kaip T1 kontrastinės medžiagos) dalelių, įterptų į ION vidų, TEM vaizdas. (C) T1 svertiniai ir (D) T2 svertiniai *in vivo* MRT vaizdai prieš ir po GdIO nanodalelių injekcijos BALB/c pelėms (viršuje: vainikinė plokštuma, apačioje: skersinė plokštuma). (E) T1 svertiniai ir (F) T2 svertiniai *in vivo* MRT vaizdai, suleidus susintetintas GdIO ND beplaukėms pelėms. Pilkos rodyklės rodo tulžies pūslę, tamsiai pilkos rodyklės – kepenis, balti taškuoti apskritimai ir baltos rodyklės – kepenų naviką. Adaptuota pagal (Z. Zhou et al., 2012).

režimų MRT kontrastinį agentą (Z. Zhou et al., 2012). Susintetintų GdIO dalelių TEM analizė parodė monodispersišką 14 nm dydžio pasiskirstymą (6 pav. B). Tyrėjų grupės rezultatai taip pat atskleidė, kad susintetintų GdIO ND magnetinis stiprumas yra daug silpnesnis nei panašaus dydžio MN. *In vivo* eksperimentai buvo atlikti su BALB/c pelėmis, joms į veną suleidžiant susintetintų GdIO ND (2 mg/kg Fe/pelės svorio) bei ištiriant T1-T2 dvigubo režimo MRT kontrastinių medžiagų veikimą. Šie kontrastiniai žymenys generavo reikšmingai šviesesnį signalą T1 svertiniuose vaizduose bei tamsesnius signalus T2 svertiniuose pelės kepenų MRT vaizduose (6 pav. C, D). Toliau *in vivo* eksperimentuose sekė injekcija beplaukėms pelėms, kurioms buvo suleidžiama GdIO ND. Tada HepG2 kepenų vėžio ląstelės (su 2 mg Fe/kg pelės svorio) buvo inokuliuojamos ortotopiškai (6 pav. E, F). Pastebėta, kad naviko-kepenų kontrasto santykis stipriai padidėjo: iki $\approx 83\%$ T1 svertiniuose ir iki 137% T2 svertiniuose MRT vaizduose.

1.5.2. KT/MRT dvigubo kontrasto medžiagos

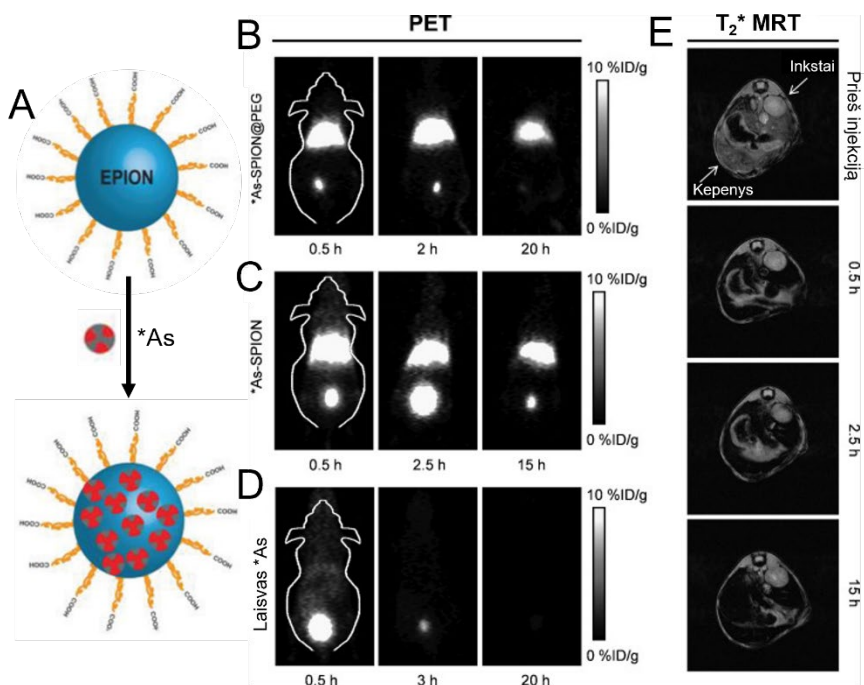
MRT yra vienas iš geriausių vaizdų gavimo metodų, pasižymintis unikaliomis galimybėmis pateikti didelės raiškos vaizdus, ypač iš minkštųjų audinių (Haffner-Luntzer et al., 2017). KT tyrimai suteikia geometriškai tikslūs ir aukštos kokybės vaizdus iš kietųjų audinių, pvz., kaulų, bet mažiau detalios informacijos apie minkštuosius audinius, nei tai daro MRT. Nors MRT suteikia vertingos informacijos apie įvairius kūno pažeidimus ir jų poveikį gretimoms struktūroms, abu metodai gali būti naudojami kartu norint nustatyti geriausią vietą biopsijai atlikti. Taip pat tiek MRT, tiek KT padeda gauti išsamios informacijos apie skirtingus navikus, pavyzdžiui, hipofizės ar smegenų navikus (Prabhakar et al., 2007; Taku et al., 2017). KT tyrimuose kontrasto gavimas pagrįstas tuo, jog skirtingo tipo audiniai susilpnina rentgeno spindulius skirtingai. Norint pagerinti kontrastą, pirmenybė teikiama elementams, turintiems didelį atominį skaičių, pvz., auksas, jodas, tantalas ir lantanoidai (Lusic & Grinstaff, 2013). Kadangi išgaunami MRT vaizdai įprastai jautriau reaguoja į kontrastinių medžiagų savybes nei KT vaizdai, tad galutiniame KT/MRT kontrastinių žymenų junginyje bendras KT kontrastinių medžiagų kiekis ir koncentracija turėtų būti didesnė nei MRT kontrastinių žymenų (Hagit et al., 2010).

1.5.3. MRT-PET/SPECT dvigubo kontrasto medžiagos

Diagnostikai skirti branduolinio vaizdinimo metodai veikia dėl generuojamų gama spindulių, kuriuos skleidžia yrantys radioizotopai: ^{68}Ga ,

^{124}I , ^{64}Cu ir ^{18}F pozitronų emisijos tomografijoje, ir ^{111}In bei ^{131}I pavienių fotonų emisijos kompiuterinėje tomografijoje. Nepaisant šių metodų gebėjimo užtikrinti didelį vaizdo jautrumą, juos riboja santykinai prasta erdvinė skiriamoji geba (D.-E. Lee et al., 2012). MRT ir PET arba SPECT metodų derinys leistų gauti labai jautrią, aukštos kokybės ir tikslią informaciją apie konkretų audinį (Choi et al., 2008).

Arsenas (As) yra vienas patraukliausių PET naudojamų radioizotopinių elementų, nes jame yra keturi pozitronus skleidžiantys ($^{70/71/72/74}\text{As}$) ir trys elektronus spinduliuojantys ($^{74/76/77}\text{As}$) komponentai, turintys tinkamą pusėjimo trukmę (nuo 52,6 min. iki 17,8 d.). Chen et al. pažymėjo superparamagnetines geležies oksido nanodaleles (MRT kontrastinė medžiaga) su As (PET kontrastinė medžiaga) (*As-SPION), maišydami vandenyje disperguotus SPION su $^{*}\text{As}^{\text{III}}$ arba $^{*}\text{As}^{\text{V}}$ tirpalais (7 pav. A) (F. Chen et al., 2013). *In vivo* eksperimentai buvo atliekami sušvirkščiant kontrolinius bei du skirtingų ND tirpalus BALB/c pelėms: $^{*}\text{As}$ nanodalelės, kontrolinis mėginys ir modifikuotos, PEG padengtos SPION ($^{*}\text{As-SPION@PEG}$) nanodalelės. PET vaizduose galima matyti greitą nanodalelių pašalinimą iš inkstų ir beveik jokie $^{*}\text{As}$ susikaupimo kepenyse (7 pav. B).



7 pav. (A) Schema, vaizduojanti $^{*}\text{As-SPION}$, kaip dvigubų MRT/PET kontrastinių žymenų, sintezę. *In vivo* BALB/c pelių PET vaizdai po (B) laisvo $^{*}\text{As}$, (C) $^{*}\text{As-SPION@PEG}$ ir (D) $^{*}\text{As-SPION}$ injekcijos. (E) *In vivo* T_2^* svertiniai MRT vaizdai iš pelių prieš ir po radioaktyviai pažymėto $^{*}\text{As-SPION}$ injekcijos. Adaptuota pagal (F. Chen et al., 2013).

Kita vertus, *As-SPION@PEG (arba *As-SPION) atveju matomas stiprus radioaktyvus signalas iš kepenų (7 pav. C, D). MRT vaizduose taip pat buvo galima įžvelgti tamsesnį signalą kepenyse ir reikšmingą signalo pokytį iš inkstų (ar šlapimo pūslės) po susintetintų nanodalelių injekcijos (7 pav. E).

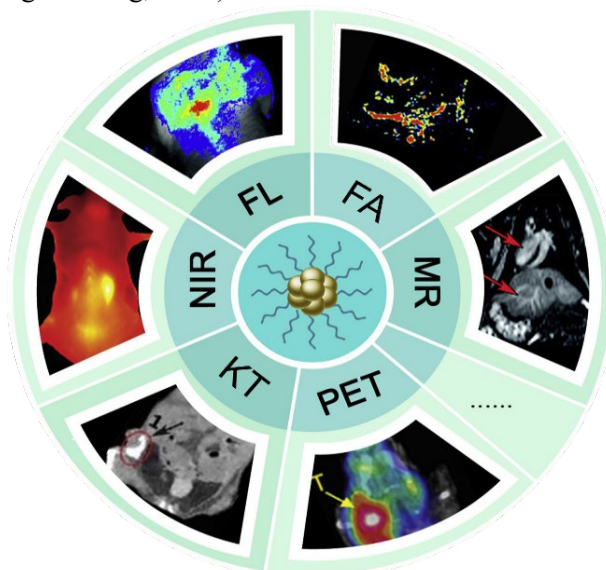
1.6. Optinis vaizdinimas su aukso nanoklasteriais

Optiniai biologinių objektų vaizdinimo metodai, pavyzdžiui, regimosios šviesos fluorescencija, artimosios infraraudonosios spinduliuotės fluorescencija ir dvifotonė artimųjų infraraudonųjų spindulių fluorescencija yra nepakeičiami biologiniuose tyrimuose ir medicininėje diagnostikoje. Jie atlieka svarbų vaidmenį siekiant suprasti biologinių audinių struktūrą ir išsiaiškinti įvairias fiziologines organizmų funkcijas. Optinių technologijų pažanga, ypač skaitmeninių vaizdų gavimo ir kompiuterinio matymo metodų įdiegimas, daugimodalinių kontrastinių medžiagų įvairiems vaizdinimo būdams kūrimas ir skirtingų vaizdinimo technikų derinimas pagerino medicininės diagnostikos efektyvumą ir tikslumą.

1969 m. pirmą kartą buvo aptikta aukso fotoluminescencija, sukeliamą elektronų tarpjuostinės rekombinacijos (Mooradian, 1969). Po šio atradimo sekė kitų, aukso pagrindu pagamintų medžiagų, fotoluminescencijos tyrimai. Tačiau silpnas FL signalas buvo praktiškai neaptinkamas plika akimi, o mažas šių medžiagų kvantinis našumas riboja tolesnį pritaikymą biomedicinos srityse. Tik 1994 m. Brust et al. pasiūlė cheminės redukcijos sintezės metode naudoti alkanotiolius, kaip paviršiaus ligandus, ir tokiu būdu sėkmingai susintetino aukso nanoklasterius (AuNK) (Brust et al., 1994).

Aukso nanoklasteriai yra savotiška jungtis tarp aukso atomų ir aukso nanodalelių. Tai itin mažos nanomedžiagos (įprastai, mažesnės nei 3 nm skersmens), sudarytos iš įvairiais ligandais stabilizuotų aukso atomų (Goswami et al., 2016). Dėl mažo dydžio, artimo elektronų Fermi bangos ilgiui ($\approx 0,5$ nm), AuNK ima demonstruoti molekulėms būdingas savybes: intensyvią fotoluminescenciją, molekulinį chiralumą, magnetizmą ir katalizinį aktyvumą (Maity et al., 2019; J. X. Xu et al., 2019). AuNK taip pat pasižymi unikaliomis optinėmis bei elektrinėmis savybėmis, pavyzdžiui, turi diskrečius elektroninius šuolius ar didžiausios užimtos molekulinės orbitalės ir žemiausio neužimtos molekulinės orbitalės energijos lygmenų šuolius (Chan & Nie, 1998; S. Guo & Wang, 2011). Aukso šerdies nanoklasterio dydis, paviršiaus ligandų tipas bei supanti aplinka – tai faktoriai, galintys daryti įtaką AuNK fotoluminescencinėms savybėms (J. Zheng et al., 2004; S. Zhu et al., 2020). Nuolat tobulinant ir diegiant naujus AuNK sintezės metodus ir ligandų modifikatorius, AuNK savybės dar labiau patobulėjo, pavyzdžiui,

kai kurių AuNK kvantinis našumas pasiekė net 70 % (W. I. Lee et al., 2004; G. Wang et al., 2005). Paskatinti sėkmingų atradimų mokslininkai ėmė sintetinti pačius įvairiausių aukso nanoklasterius, apsaugotus skirtingais ligandais, bei išsamiau tirti AuNK struktūrą, savybes bei galimas pritaikymo sritis. Dėl puikios fotostabilumo ir biologinio suderinamumo AuNK galima panaudoti biomediciniame vaizdinime (Du et al., 2018; J. X. Xu et al., 2019). 8 paveiksle pavaizduoti aukso nanoklasterių panaudojimo būdai biovaizdinimo srityje, pavyzdžiui, FL, magnetinio rezonanso tomografijoje, rentgeno kompiuterinėje tomografijoje, pozitronų emisijos tomografijoje ir fotoakustiniame vaizdinime (Bai et al., 2020; Fu et al., 2019; Werner et al., 2008; L. Zhang & Wang, 2014).



8 pav. Aukso nanoklasterių pritaikymas biovaizdinime. Trumpiniai paveikslėlyje: FL – fotoluminescencija, NIR – artimosios infraraudonosios spinduliuotės diagnostika, CT – kompiuterinė tomografija, PET – pozitronų emisijos kompiuterinė tomografija, MR – magnetinis rezonansas, FA – fotoakustinis vaizdinimas. Adaptuota pagal (C. Zhang et al., 2022).

1.7. Fluorescencinio vaizdinimo galimybės

Vaizdinimo technologijų plėtra atlieka kartinį vaidmenį ligų diagnostikoje. Dėl pranašesnių fotofizikinių savybių, kartu su puikiu biologiniu suderinamumu ir farmakokinetika, AuNK yra idealūs kontrastinių medžiagų biologiniam vaizdinimui kandidatai.

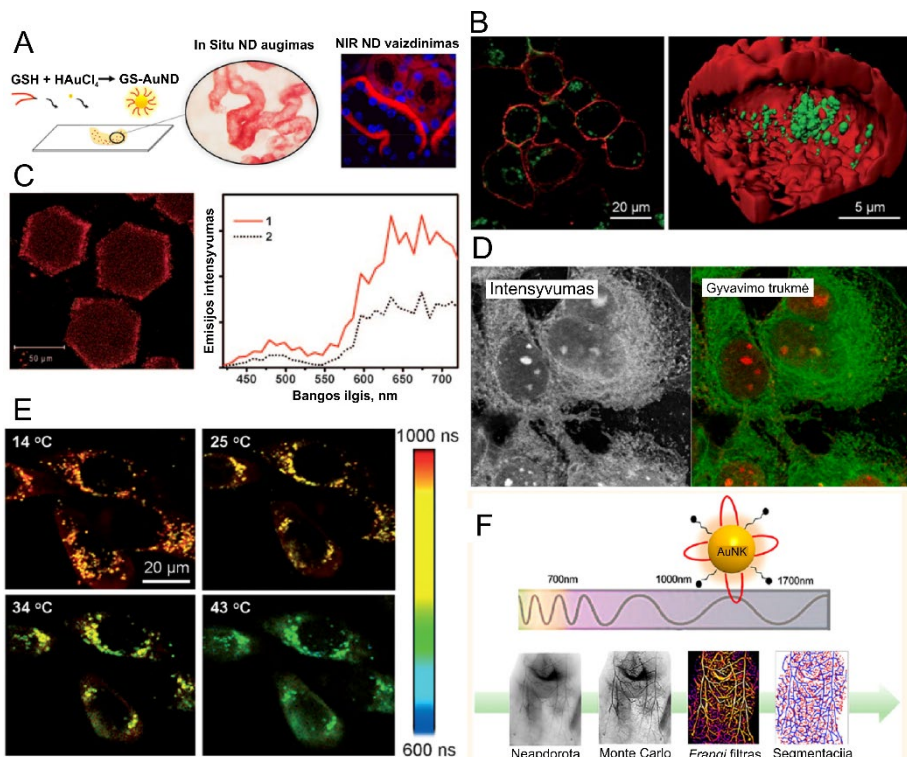
Fluorescencinis vaizdinimas plačiai naudojamas biomedicinoje kaip galingas diagnostikos ir ligų gydymo kontrolės įrankis. Dėl puikių fotoluminescencinių savybių AuNK pritraukė daug mokslininkų dėmesio

būtent fluorescencinio biovaizdinimo srityje (9 pav.). Didelėje aukso nanoklasterių įvairovėje dėl unikalių savo savybių daugiausiai vilties fluorescencinėje diagnostikoje teikia ir plačiausiai naudojami yra peptidais arba baltymais stabilizuoti AuNK (Y. Zheng et al., 2017). Pavyzdžiui, Wu su kolegomis savo tyrimuose pademonstravo naviko vaizdinimo galimybes naudojant artimosios infraraudonosios spinduliuotės diapazone šviečiančius, jaučio serumo albuminu stabilizuotus AuNK (X. Wu et al., 2010). *Ex vivo* ir *in vivo* tyrimai parodė, jog AuNK dėl padidinto pralaidumo ir sulaikymo efekto (*angl. enhanced permeability and retention*) kaupėsi HeLa ir MDA-MB-45 ląstelių linijų navikuose, įskiepytuose pelėse (X. Wu et al., 2010). Wang et al. siekdami galvaniniu pakeitimo metodu paruošti intensyviai fotoluminescuojančius AuNK, kaip šablonus naudojo glutationu (GSH) padengtus Ag nanoklasterius. Tai, jog susintetinti GSH-AuNK gali tarnauti kaip kontrastiniai žymenys fluorescenciniam vaizdinimui, jie pademonstravo naudodami CAL-27 vėžinių ląstelių liniją (C. Wang et al., 2013). Galima dar labiau išplėsti aukso nanoklasterių biologinio vaizdinimo galimybes juos sintetinant *in situ* biologinėse medžiagose (9 pav. A) (Peng et al., 2020; L. Li et al., 2015) arba koreguojant AuNK paviršiaus chemiją (Y. Chen et al., 2019; Gong et al., 2019).

Norint pagerinti ląstelių vaizdinimą, AuNK paviršius gali būti funkcionalizuojamas įvairiomis specifinį susikaupimą gerinančiomis medžiagomis, pavyzdžiui, folio rūgštimi, taikininiais peptidais ar antikūnais (D. Chen et al., 2016; J. Qiao et al., 2013; Vankayala et al., 2015; Xia et al., 2018). Dėl vėžinėse ląstelėse padidėjusios folio rūgšties receptorių ekspresijos būtent folio rūgštimi modifikuoti ir jaučio serumo albuminu (JSA) stabilizuoti AuNK demonstravo gausesnį susikaupimą ir geresnį vaizdinimą taikininėse vėžinėse ląstelėse nei paprasti JSA-AuNK (H. Chen et al., 2012). Kartu folio rūgštimi dengti GSH-AuNK parodė pranašesnes naviko vaizdinimo galimybes (C. Zhang et al., 2015). Vankayala su kolegomis sukūrė novatoriškus, branduolyje besikaupiančius AuNK, sujungdama juos su ŽIV-1-transaktyvuojančiu transkriptoriaus peptidu ir atlikdama naviko vaizdinimą (Vankayala et al., 2015). Tokie aukso nanoklasteriai gali pastebimai kaupis ląstelių branduoliuose, o po to būti išvaizdinti.

Sujungus AuNK su cikliniu arginino-glicino-aspartato junginiu (cRGD) ir AS1411 aptameru buvo sukurta naujos kartos nanoplatforma, pasižyminti dvigubo tikslinio taikymosi galimybėmis tiek į ekstraląstelinius, tiek į viduląstelinius receptorius, kurie yra specifiški vėžinėms ląstelėms (D. Chen et al., 2016). cRGD yra specifiškas integrinui $\alpha_v\beta_3$, padidintai ekspresuojamam vėžinių ląstelių paviršiuje, o AS1411 turi stiprų afiniškumą nukleolinui, intensyviau ekspresuojamam navikinių ląstelių citoplazmoje ir

branduoliuose. Tolimesniuose etapuose ši nanoplatforma buvo dar labiau tobulinama prijungiant fluorescencinius dažus bei dėl pademonstruoto sėkmingo navikų žymėjimo atskleidė savo potencialą klinikiniais naviko vaizdinimo tyrimams (D. Chen et al., 2016).



9 pav. (A) *In situ* ligandais kontroliuojamo AuNK augimo biologiniuose audiniuose schema. Adaptuota pagal (Peng et al., 2020). (B) HeLa ląstelių konfokalinės mikroskopijos vaizdai po 2 h inkubacijos su D-penicilamino AuNK (DPA-AuNK) ir 3D rekonstrukcinis skerspjūvis, parodantis internalizuotus DPA-AuNK. Membranos buvo nudažytos raudonu dažu DiD. Vaizdai registruoti žadinant dvifotoniškai su 810 nm bangos ilgio lazeriu. Adaptuota pagal (Shang, Dörlich, et al., 2011). (C) Su insulinu sujungtų AuNK kristalų dvifotonės fluorescencijos vaizdai ir skirtingame gylyje lokalizuotų kristalų FL spektrai: 1) paviršiuje ir 2) 5 nm gylyje nuo paviršiaus. Adaptuota pagal (C.-L. Liu et al., 2011). (D) HeLa ląstelių, prikaupusių MSA-AuNK ir tioprino-AuNK, fotoluminescencijos intensyvumo ir gyvavimo trukmių mikroskopijos vaizdai. Adaptuota pagal (J. Zhang et al., 2012). (E) HeLa ląstelių, internalizavusių AuNK, FLIM vaizdai, gauti esant keturioms skirtingoms temperatūroms. Adaptuota pagal (Shang et al., 2013). (F) Terminius (TIR) ir trumpabangius infraraudonuosius spindulius emituojančių AuNK ir TIR vaizdai, užregistruoti iš Bmp9-KO pelės po Monte Carlo modeliavimo, Frangi filtro ir segmentacijos. Adaptuota pagal (Yu et al., 2020).

Tarp visų fluorescencinių vaizdų gavimo technologijų fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopija (FLIM) yra ypač patraukli, nes ląstelinis gyvavimo trukmių vaizdinimas gali žymiai sumažinti signalo

trukdžius, kylančius dėl autofluorescencinio fono ląstelėse ar audiniuose ir dėl sužadavimo šviesos šaltinio galios vizualizuojant ląstelinius vyksmus. Palyginus su organiniais fluorescenciniais dažais, fotoluminescenciniai tauriųjų metalų nanoklasteriai įprastai turi ilgesnę FL gyvavimo trukmę ir yra tinkamos FLIM kontrastinės medžiagos. Zhang kartu su kolegomis, siekdami susintetinti fotoluminescuojančius AuNK, kaip ligandus naudojo tioproniną ir merkaptogintaro rūgštį (MSA) bei tyrė HeLa ląsteles FL intensyvumo vaizdinimo ir FLIM metodais (J. Zhang et al., 2012). AuNK FL gyvavimo trukmė yra daug ilgesnė nei organinio dažo *Alexa FluorTM 488* ar ląstelių autofluorescencijos, todėl juos galima atskirti FLIM metu. Žvelgiant į 9 paveikslą D, jame matomi konfokalinės mikroskopijos metu užfiksuoti laikinės skyros intensyvumo ir gyvavimo trukmių vaizdai, kuriuose AuNK spinduliuotę galima lengvai atskirti nuo autofluorescencijos dėl intensyvesnės ir ilgesnės gyvavimo trukmės pasižyminčios AuNK fotoluminescencijos (9 pav. D). Analogiškos vaizdinimo galimybės buvo parodytos HeLa ląstelėse, kaip žymenis naudojant dihidrolipoinę rūgštyje sintetintus AuNK (Shang et al., 2011). Kitame tyrime Shang et al. pristatė lipoinę rūgštį padengtą AuNK naudojimą nanotermometrijoje – jų fluorescencijos intensyvumas ir gyvavimo trukmė pasižymėjo jautrumu temperatūriniais pokyčiams, kadangi stipriai kito fiziologiniame temperatūros diapazone (15–45°C) (Shang et al., 2013). Didėjant temperatūrai, fluorescencijos gyvavimo trukmė žymiai sumažėja (9 pav. E). Šie tyrimai patvirtino, kad itin maži fotoluminescuojantys AuNK turi didelį potencialą būti naudojami kaip gyvavimo trukmių vaizdinimo žymenis biomedicinoje.

1.8. Multimodalinis vaizdinimas su AuNK

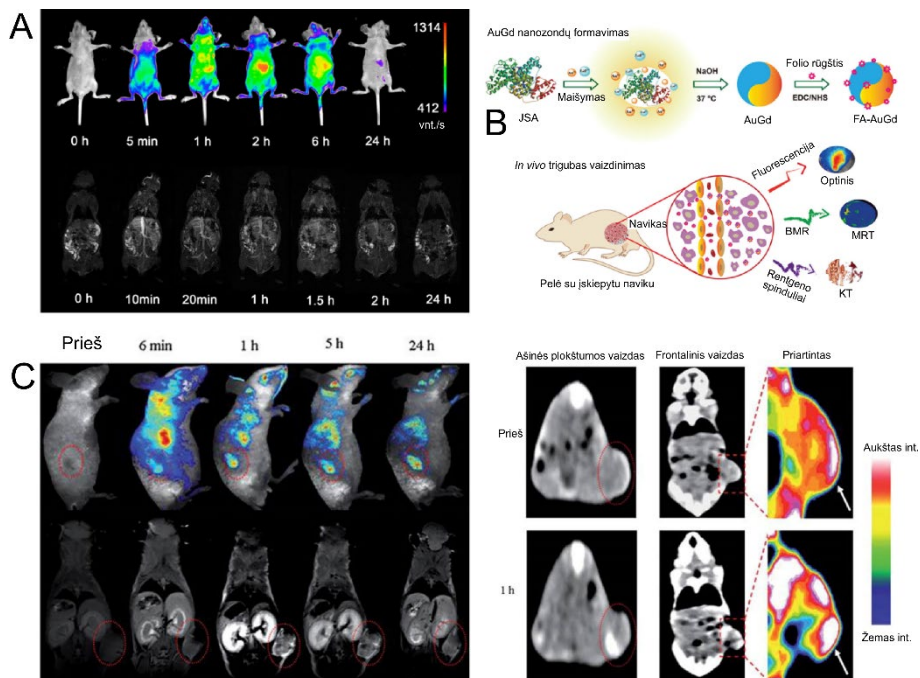
Šiuo metu plačiai naudojamos medicininės diagnostikos technologijos daugiausia apima optinį, KT, PET vaizdinimus, MR tomografiją ir fotoakustinį vaizdinimą. Visgi dėl savo apribojimų pavieniai metodai dažniausiai nėra pakankamai tikslūs ankstyvai ligų diagnostikai. Pavyzdžiui, fluorescencinis vaizdinimas, dar vadinamas optine biopsija, pasižymi pranašumais dėl išskirtinio jautrumo ir vaizdinimo realiuoju laiku, tačiau šį metodą ir jo klinikinį pritaikymą riboja mažas šviesos prasiskverbimo gylis į audinius ir prasta trimatė skiriamoji geba (M. Wu et al., 2019). Kompiuterinė tomografija suteikia didelę 3D skiriamąją gebą analizuojant anatomines detales, tačiau ji netinka kontrastuoti tam tikroms vėžio rūšims ar minkštiesiems audiniams (A. Zhang et al., 2012). MR tomografija užtikrina puikų išskverbimą į audinius, tačiau yra mažo jautrumo (H. Li, Li, et al., 2020). Tad kelių diagnostinių metodų integravimas leistų sukurti

nanoplatformą, galinčią itin jautriai, realiu laiku ir anatomiškai tiksliai diagnozuoti ankstyvus vėžinius susirgimus bei įgalintų tolimesnės gydymo eigos stebėseną.

Atsižvelgdami į FL aukso nanoklasterių itin mažą dydį, ilgą cirkuliaciją, puikų fotostabilumą ir mažą nefrotoksiškumą, mokslininkai panaudojo įvairias AuNK pagrindu pagamintas nanokonstruktines medžiagas multimodaliniam vaizdinimui (Hou et al., 2017; Pretze et al., 2018; S.-K. Sun et al., 2013; C. Zhang et al., 2013). Zhang et al. bandė panaudoti JSA-AuNK kaip kontrastinius agentus pelių biovaizdinimui, o rezultatai parodė, kad AuNK buvo galima vaizdinti ne tik optiškai, bet ir kompiuterinės tomografijos būdu. Taip pademonstruota dvigubo vaizdinimo galimybė (A. Zhang et al., 2012). Naudojant su folio rūgštimi konjuguotus GSH-AuNK, buvo sukurta nanoplatforma, turinti tikslinio nukreipimo į skrandžio vėžio naviką bei fluorescencinio ir KT vaizdinimo galimybę (C. Zhang et al., 2013). Be fluorescencinio/KT vaizdinimo AuNK taip pat gali būti naudojami fluorescenciniam ir MR dvimodaliniam vaizdinimui, susiejant AuNK su (super)paramagnetinėmis struktūromis. Sujungus ciklodekapeptido pagrindu susintetintus AuNK su gadoliniu (Gd^{3+}), buvo sukurtas biologiškai suderinamas zondas (Gd-AuNK) bimodaliniam (fluorescencijos/MR) vaizdinimui (G. Liang et al., 2013). Gd-AuNK turi ilgesnį cirkuliacijos pusperiodį ir gali laisvai cirkuliuoti kraujotakoje dėl optimalaus dydžio bei susikaupti navike, kurį vėliau būtų galima vaizdinti dvigubos diagnostikos metodais. Kaip alternatyvą Yan mokslinė grupė pagamino daugiafunkčę hibridinę Gd_2O_3 -AuNK nanoplatformą, skirtą NIR ir MR dvigubam vaizdinimui (S.-K. Sun et al., 2013). Paruošta nanoplatforma pasižymėjo stipria NIR fluorescencija ir puikiomis MR vaizdinimo galimybėmis, o jos multimodalinio vaizdinimo potencialas buvo parodytas išgaunant stiprų fluorescencijos ir magnetinio rezonanso signalą vaizdinant kraujotaką (10 pav. A). Dar keliuose tyrimuose buvo pademonstruotos galimybės AuNK fotoluminescenciją kombinuoti su fotoakustiniu arba PET vaizdinimu diagnozuojant piktybinius navikus (H. Cui et al., 2017; Pretze et al., 2018).

Pastaraisiais metais buvo pereita prie dar pažangesnių trigubo vaizdinimo nanoplatformų, skirtų, pavyzdžiui, fluorescenciniam vaizdinimui, kompiuterinei tomografijai ir magnetinio rezonanso tomografijai. Baltymais stabilizuotų AuNK hibridiniai trigubo vaizdinimo nanozondai buvo pasiūlyti ir Xu su kolegomis. Jie sukūrė folio rūgštimi funkcionalizuotus JSA-AuNK, kombinuotus su Gd (AuGd). Su šiais trigubo vaizdinimo agentais Xu et al. sukūrė FL/KT/MRT vaizdinimo KB navikų ksenograftų *in vivo* modelį (10 pav. B) (C. Xu et al., 2017). Panašiu principu biologiškai suderinami albuminu stabilizuoti hibridiniai Au-Gd nanoklasteriai taip pat naudojami

kaip trigubo vaizdinimo kontrastiniai žymenys (Hu et al., 2013). Kombinuojant šių vaizdinimo modų kuriamą kontrastą galima išgauti daug ryškesnes anatomines tiriamojo objekto detales (10 pav. C).



10 pav. (A) NIR fluorescencijos (viršutinė eilė) ir magnetinio rezonanso (apatinė eilė) *in vivo* vaizdinimas pelėms suleidus Gd_2O_3 -AuNK hibridinės nanoplatforomos. Adaptuota pagal (S.-K. Sun et al., 2013). (B) Schematinis AuGd klasterių paruošimo atvaizdavimas ir jų pritaikymas trigubam vaizdinimui (fluorescencija/MRT/KT) *in vivo* vėžio diagnostikoje. Adaptuota pagal (C. Xu et al., 2017). (C) MCF-7 ląstelių linijos naviko, įskiepyto pelėms, *in vivo* vaizdinimas (fluorescencija/MRT/KT) po injekcijos su hibridiniais aukso nanoklasteriais. Adaptuota pagal (Hu et al., 2013).

1.9. Apkonvertuojančios nanomedžiagos

Retųjų žemių metalais (lantanoidais) legiruotų nanostruktūrų emisijos apkonversija (AK) yra unikali savybė, kuomet sugerti mažesnę energiją turintys infraraudonosios spinduliuotės fotonai paverčiami į didesnę energiją turinčius fotonus (pvz., ultravioletinę, regimąją arba artimą infraraudonąją spinduliuotę). Šis netiesinės optikos fenomenas dar vadinamas anti-Stokso emisija (Atabaev & Molkenova, 2019; Auzel, 2004). Pagrindinis lantanoidais legiruotų nanodalelių pranašumas yra jų išskirtinis signalo ir triukšmo santykis, kuris pagerina detekcijos jautrumą dėl mažesnės autofluorescencijos NIR diagnostiniame optinio skaidrumo lange ties 700–1100 nm. Kitos skiriamosios savybės yra siauros emisijos smailės, geras cheminis ir

fotostabilumas bei didelis anti-Stokso poslinkis (Z. Zhang et al., 2019). Dėl šių savybių retųjų žemių metalais legiruotos nanodalelės sulaukė didelio susidomėjimo. Pavyzdžiui, fotovoltiniai prietaisai, pagrįsti lantanoidais legiruotomis nanostruktūromis, gali sumažinti nesugeriamos šviesos energijos nuostolius, paversdami NIR spinduliuotę didesnės energijos fotonais (Atabaev & Molkenova, 2019; Fischer et al., 2014; Goldschmidt & Fischer, 2015; J. Li et al., 2017; Ma & Ni, 2013; Schulze & Schmidt, 2014). Per pastarąjį dešimtmetį buvo naudojami keli metodai AK efektyvumui sustiprinti, įskaitant plačiajuostę sugertį (W. Zou et al., 2012), intensyvią sužadinimo apšvitą (J. Zhao et al., 2013), tripleto-tripleto anihiliaciją (Simon & Weder, 2012) ar fononinį sustiprinimą (J. Zhou et al., 2018). Visgi daugiausiai dėmesio sulaukė apkonvertuojančios medžiagos padėties integravimas su metalo nanodalelių elektromagnetiniu lauku, nes tai leido sustiprinti AK procesą kelis tūkstančius kartų (W. Xu et al., 2017; Zhan et al., 2015). Daugybė tyrimų apžvelgia fotonų konversijos koncepcijas ir mechanizmus apkonvertuojančiose nanodalelėse (AKND) bei nurodo, kad reikia iš esmės suprasti liuminescencijos stiprinimą (Qin et al., 2021). Tad tolimesniuose literatūros apžvalgos skyriuose bus pateikiama informacija būtent apie retųjų žemių metalus, jais legiruotas nanostruktūras, apkonversijos mechanizmus bei vaizdinimo galimybes naudojant AKND.

1.10. Lantanoidai

Lantanoidai (Ln) pirmą kartą buvo aptikti 1787 m. kaime Švedijoje. Lantanoidus sudaro 15 elementų, kurių atominis skaičius yra nuo 57 iki 71, įskaitant La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb ir Lu. Šie elementai kartu su itriu (Y) ir skandžiu (Sc) priskiriami retųjų žemių elementų kategorijai. Lantanoidų elementų pagrindinės oksidacinės formos yra +2, +4 ir +3, kuri įprastai dominuoja, pavyzdžiui, Sc^{3+} , Y^{3+} , La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+} . Lantanoidai turi užpildytas 4f orbitales.

Lantanoidai tarpusavyje turi keletą panašių savybių. Pavyzdžiui, kai jie atsiduria junginiuose, jie teikia pirmenybę prisijungimui prie neigiamų elementų, tokių kaip F^- ir O^- . Ln^{3+} elektroninė konfigūracija pateikiama kaip $[\text{Xe}] 4f^x 5d^y 6s^2$, kur x svyruoja nuo 0 iki 14, o y svyruoja nuo 0 iki 1 (Q. Liu, 2020). Be to, išoriniai 5s arba 5p orbitalių elektronai elgiasi tarytum skydas, leidžiantis iš dalies užpildytos 4f orbitalės elektronams prasiskverbti į $[\text{Xe}]$ šerdį ir atitolti nuo cheminio ryšio sudarymo. Dėl to Ln yra gana stabilūs ir mažai sąveikauja su aplinkos kristalų laukais (Rivera et al., 2012). Atitinkamai apkonversijos emisijos spektrai, atsirandantys dėl 4f orbitalių elektronų,

pasižymi siauromis, intensyviomis ir fotoblukimui atspariomis juostomis. Tai įgalina jų panaudojimą informacinėse technologijose ar biovaizdinime.

1.11. Lantanoidais legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės

AKND yra tipiškai sudarytos iš lantanoidais legiruotų dielektrinių nanomedžiagų, kurių jonai paskleidžiami tinkamoje, iki 100 nm dydžio neorganinės matricos gardelėje. Lantanoidais legiruotos nanomedžiagos yra optiškai aktyvios ir jų tarpiniuose energijos lygmenyse vykstanti energijos pernaša užtikrina šviesos apkonversiją net ir su mažo galios tankio ($\sim 10^{-1} \text{ W cm}^{-2}$) sužadinimu, kurį galima išgauti iš nebrangių diodinių lazerių. Tai stipriai kontrastuoja su didelio galios tankio sužadinimo ($>10^6 \text{ W cm}^{-2}$) reikalaujančiomis antros harmonikos generacija ar netiesine multifotonine sugertimi. Be to, banginės funkcijos, susijusios su jų $4f$ – $4f$ elektroniniais perėjimais, yra stipriai apribotos viename jone.

Tai lemia, kad AKND nepasižymi išskirtinėmis savybėmis, tokiomis kaip kvantinis apribojimas puslaidininkinėse medžiagose, bet geba išlaikyti santykinai stabilią emisiją keičiant terpę ir efektyviai atsilaiko nuo fotoblukimo ar fotocheminio irimo. Selektviai pasirinkus vieno ar kelių lantanoidų legiravimą galima išgauti emisiją, turinčią selektyvius bangos ilgus, pvz.: 409 nm, 450 nm, 525/540 nm, 654 nm ar daugiaspalvę emisiją (H. Li, Tan, et al., 2020).

1.12. Pagrindiniai apkonvertuojančių nanodalelių komponentai

Siekiant susintetinti tinkamas AKND tenka įgyvendinti nemažai reikalavimų. Sintetinant aukštos kokybės AKND su pageidaujamomis optinėmis savybėmis (kontroliuojamais emisijos spektrais) ir dideliu kvantiniu našumu, būtina laikytis tam tikrų pagrindinių taisyklių. Neorganines AKND sudaro trys atitinkami komponentai: neorganinė matrica, kuri suteikia struktūrinį aktyvatoriaus ir sensibilizatoriaus pagrindą, aktyvatorius (įterptos į matricą trivalenčių lantanoidų priemaišos) ir sensibilizatorius, leidžiantis perduoti elektronus. Pasirenkant tinkamą matricos medžiagą, kad pasiektume didelio efektyvumo AK liuminescenciją, reikia atsižvelgti į tikslinio spektrinio diapazono optinį skaidrumą, cheminį stabilumą, kristalinę struktūrą ir matricos medžiagų fononų dinamiką. Labai svarbu matricai pasirinkti medžiagas, turinčias mažą ribinę fononų energiją. Tai leidžia sumažinti nepageidaujamus nespindulinius energijos nuostolius vykstant procesams, būdingiems apkonversijai. Atsižvelgiant į šiuos reikalavimus, fluoridai (NaYF_4 gardelės fononų energija $\approx 350 \text{ cm}^{-1}$) laikomi tinkamais kandidatais

matricai, tad buvo daug tyrinėjami (G. Chen et al., 2014; W. Kong et al., 2010; Naccache et al., 2015). Pastarųjų metų tyrimuose buvo pasirenkamos įvairių gardelių matricos stengiantis išgauti kuo didesnio efektyvumo AK signalą, pvz., šešiakampės fazės NaLuF_4 , tetragoninės fazės LiLuF_4 , CsPbCl_3 perovskito nanokristalai ir monoklininės ZrO_2 nanodalelės (P. Huang et al., 2014; Pan et al., 2017; Patra et al., 2003; Shamsi et al., 2019; Shi et al., 2011).

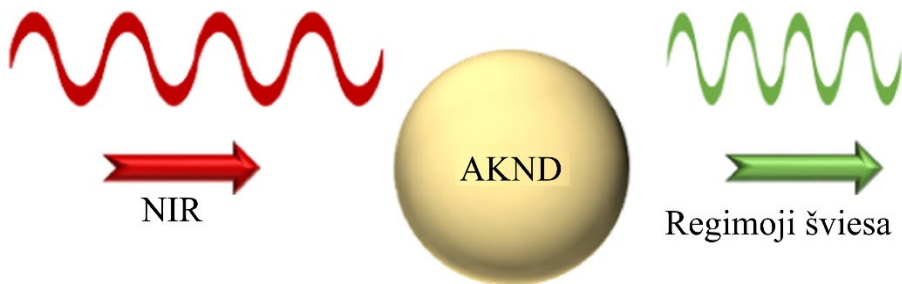
Lantanoidų liuminescenciniai jonai turi mažą sugerties pagavos skerspjūvį NIR zonoje, o tai lemia mažą AK efektyvumą legiruotoje nanodalelėje. Šios problemos sprendimo būdas yra sensibilizatoriaus įterpimas į nanodalelės matricą ir derinimas su aktyvatoriumi, taip pagerinant nanodalelių AK kvantinį našumą bei padidinant sugerties pagavos skerspjūvį NIR srityje. Sensibilizatorius gali veiksmingai kaupti žadinančią šviesos šaltinio energiją, o tada perduoti šią energiją į aktyvatorių, kuriame vyktų spindulinė emisija. Tinkamiems sensibilizatoriaus jonams keliami šie reikalavimai: platus sugerties pagavos skerspjūvis, nesudėtinga energijos lygmenų struktūra ir ilga sužadinta būseną. Pavyzdžiui, Yb^{3+} yra laikomas tinkamu sensibilizatoriumi naudoti bendrose sistemose su Er^{3+} , Tm^{3+} ir Ho^{3+} jonais (H. Lu et al., 2017; L. Wang & Li, 2006), kadangi iterbis pasižymi plačiu sugerties pagavos skerspjūviu esant 980 nm bangos ilgiui. Dar vienas itin svarbus sensibilizatorius yra Nd^{3+} , nes pasižymi efektyvia sugertimi ties 800 nm bangos ilgiu. Nd^{3+} , kaip sensibilizatorius, gali vykdyti apkonversiją esant biologiškai suderinamo bangos ilgio srities sužadinimui ir žymiai sumažinti perkaitimo pavojų. Ši Nd^{3+} jonais legiruotoms ND būdinga savybė leidžia AKND modeliuoti biologinio pritaikomumo tikslams (X. Ding et al., 2017; X. Xie et al., 2017).

Aktyvatorių atveju lantanoidų jonai turėtų pasižymėti ilgai gyvuojančia liuminescencija bei tinkama AK liuminescencinių būsenų energijos lygmenų konfigūracija. Paprastai lantanoido aktyvatorius NIR srityje sensibilizatoriaus jonų sugertą spinduliuotę konvertuoja į regimosios ir UV spinduliuotės šviesą. Er^{3+} arba Tm^{3+} yra laikomi vienais geriausių aktyvatorių dėl ilgalaikių tarpinių energijos būsenų ir lengvumo juos perkelti iš tarpinės būsenos sužadinimo į aukštesnę būseną (Mehrdel et al., 2021).

1.13. Apkonversijos mechanizmai

Ne kartą buvo pademonstruota, jog apkonversijos liuminescencijos (AKL) procesas yra sėkmingas būdas generuoti šviesą regimosios ir NIR spinduliuotės srityse. Apkonversija laikoma netiesiniu optiniu procesu (Safdar et al., 2020), kurio metu mažos energijos bangos ilgių spinduliuotė NIR srityje geba generuoti didesnės energijos trumpesnių bangos ilgių spinduliuotę

(regimosios ir UV spinduliuotės diapazone). Tad šis procesas dar gali būti laikomas anti-Stokso emisijos mechanizmu (11 pav.). Du ar daugiau fotonų turi būti sugerti, kad būtų sukaupta pakankamai energijos atitinkamo bangos ilgio AKL vykti.

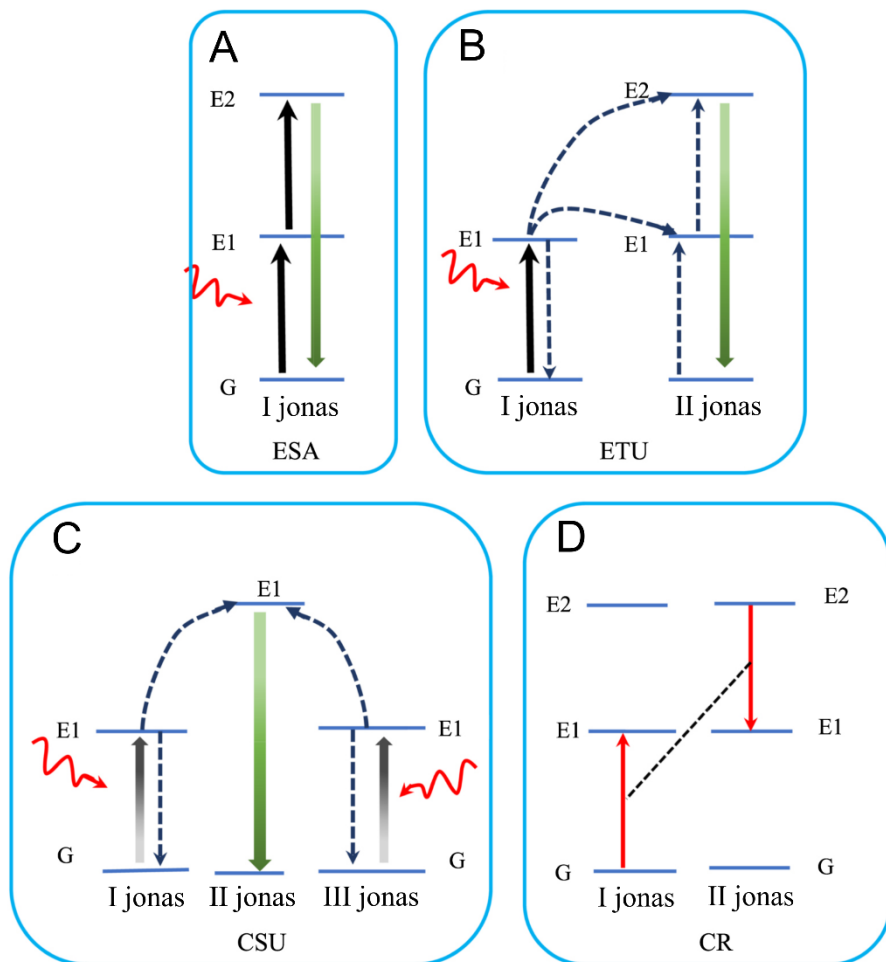


11 pav. Anti-Stokso mechanizmas apkonvertuojančiose nanodalelėse. Adaptuota pagal (Mehrdel et al., 2021).

Apkonversijos liuminescencijos procesams paaiškinti taikomi skirtingi mechanizmai. Kelios pagrindinių mechanizmų schemas pateikiamos žemiau: sužadintos būsenos sugertis (ESA, *angl. excited-state absorption*), energijos pernašos apkonversija (ETU, *angl. energy transfer upconversion*), kooperacinio sužadinimo apkonversija (CSU, *angl. cooperative sensitization upconversion*) ir kryžminė relaksacija (CR, *angl. cross-relaxation*) (12 pav.).

1.13.1. Pagrindinės ir sužadintos būsenų sugertis (GSA/ESA)

Sužadintos būsenos sugertis yra labiausiai pripažįstamas apkonversijos liuminescencijos modelis ir jį 1959 m. sukūrė ir išvystė Bloembergen (Bloembergen, 1959; M. Wang et al., 2011). Pagrindinės būsenos sugertis (GSA) apibūdina procesą, kurio metu pavieniame jone (I jonas), esant pakankamai ilgai sąveikai ir sugėrus fotoną, elektronai iš pagrindinės būsenos persoka į sužadintą būseną (12 pav. A). Sužadintoje metastabilioje būsenoje esantys elektronai reaguoja su kitais žadinančiais fotonais ir tada abu persoka į aukštesnę sužadintą būseną – procesas, žinomas kaip ESA mechanizmas. Šie jonai yra palaipsniui sužadinami per eilę žingsnių, kol galiausiai pasiekama apkonversijos liuminescencinė būseną. Praėjus atitinkamam relaksacijos laikui elektronai iš AK būsenos spinduliniu keliu grįžta atgal į pagrindinę, nesužadintą būseną bei yra išspinduliuojamas apkonversijos fotonas. Derėtų pabrėžti, kad norint pasiekti aukštą GSA/ESA apkonversijos efektyvumą, aktyvatoriaus energijos lygmenų struktūra turėtų būti panaši į kopėčių ar laiptų sistemą su beveik vienodais tarpais išsidėsčiusių Ln^{3+} jonų energijos lygmenimis. Visgi tik mažas kiekis lantanoidų (Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} ir Nd^{3+}) geba



12 pav. Schemas, vaizduojančios Ln legiruočių nanokristalų apkonversijos mechanizmus: (A) sužadintos būsenos sugertis (ESA), (B) energijos pernašos apkonversija (ETU), (C) kooperacinio sužadavimo apkonversija (CSU) ir (D) kryžminė relaksacija (CR). Adaptuota pagal (Mehrdel et al., 2021).

sužadinti tokios struktūros energijos lygmenis, kurie tiktų GSA/ESA procesui ir gebėtų pasiekti AK liuminescenciją (K. Zheng et al., 2019). GSA/ESA mechanizmui reikia tik vieno tipo legiruojančio jono ir aktyvatoriaus, kurie nėra priklausomi nuo jono-jono atstumo. Tačiau net ir tokioje situacijoje gali būti pasiekiamas tik žemas apkonversijos efektyvumas, kadangi minėtieji lantanoidų jonai turi mažą sugerties pagavos skerspjūvį (Q. Liu, 2020).

1.13.2. Energijos pernašos apkonversija (ETU)

Energijos pernaša tarp sužadintų jonų apkonversijoje detaliam ištyrinėta buvo dar 7-ajame dešimtmetyje (M. Wang et al., 2011). ETU nuo ESA mechanizmo ganėtinai skiriasi, kadangi ESA procesui vykti užtenka vieno

tipo lantanoido jonų, o ETU mechanizmui reikalingi gretimai esantys dviejų tipų jonai, pavyzdžiui, sensibilizatorius (I jonas), turintis didelį sugerties pagavos skerspjūvį, ir aktyvatorius (II jonas) AK liuminescencijai įvairiose srityse. ETU procese sensibilizatorius (I jonas), sugerdamas žadinančios spinduliuotės kvantus, visų pirma, iš pagrindinės būsenos yra sužadinas į metastabilų lygmenį. Po šio žingsnio seka elektronų relaksacija iš metastabilaus lygmens atgal į pagrindinį lygmenį ir tuo pačiu metu vykti galinti energijos pernaša į gretimais esantį joną (aktyvatorių (II jonas)) ir iš to kylantis sužadinimas į aukštesnius jono emisijos lygmenis (12 pav. B). Apkonversijos liuminescencijos efektyvumas ETU mechanizmo metu jautriai reaguoja į vidutinį atstumą tarp matricoje išsidėsčiusių sensibilizatoriaus ir aktyvatoriaus jonų, o atstumą lemia legiruojančių jonų koncentracija. Priešingai nei ETU procese, ESA efektyvumas nuo legiruojančių jonų koncentracijos nepriklauso, nes jis gali vyksti pavieniuose jonuose (G. Chen et al., 2014). Be to, ETU įvardijamas, kaip efektyviausias lantanoidų apkonversijos procesas (Auzel, 2004; J. Kong et al., 2020). Dažniausiai naudojamos sensibilizatoriaus-aktyvatoriaus kombinacijos, pasižyminčios ryškiausia liuminescencija, yra Yb^{3+} su Er^{3+} , Ho^{3+} ir/arba Tm^{3+} , kai žadinančios spinduliuotės bangos ilgis yra apie 980 nm, bei Nd^{3+} ir Yb^{3+} su Er^{3+} , Ho^{3+} ir/arba Tm^{3+} , leidžiančiu žadinti dviem bangos ilgiais ties ≈ 980 nm ir ≈ 808 nm.

1.13.3. Kooperacinio sužadinimo apkonversija (CSU)

Šis mechanizmas apima trijų jonų centrų sąveiką su I jonu ir III jonu, kurie paprastai yra tos pačios rūšies (12 pav. C). Du jonai atskirai sugeria du sužadinimo fotonus (I ir II jonai), kad pasiektų savo sužadintas būsenas, ir tada perduoda energiją III jonui, kuris iš pradžių yra sužadinamas, o po to relaksuoja arba spinduliniu keliu grįžta į nesužadintą būseną taip emituodamas apkonversijos fotoną. Tiek I, tiek III jonai gali būti stimuliuojami į sužadintą būseną sugerdami fotonus. Po to, tuo pačiu metu vyksta I ir III jonų sąveika su II jonu, o to rezultatas – kooperaciniu būdu perduodama sukaupta energija ir į aukštesnį lygmenį sužadinamas II jonas. Aukštesnė būsena iš pradžių pasiekama dėl žadinančios energijos, o vėliau relaksuojama į II jono nesužadintą būseną nespinduliniu keliu arba išspinduliuojant AK fotoną. Šis procesas pasižymi būdingu 10^{-6} santykinio efektyvumu (Auzel, 2004). $\text{Yb}^{3+}/\text{Eu}^{3+}$ (Dwivedi et al., 2007), $\text{Yb}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ (H. Liang et al., 2009) ir $\text{Yb}^{3+}/\text{Pr}^{3+}$ (Pushkar' et al., 2011) jonų poros gali vykdyti apkonversiją CSU mechanizmu.

1.13.4. Kryžminė relaksacija (CR)

CR yra energijos perdavimo procesas, vykstantis tarp panašių (I ir II jonų) arba skirtingų (II jonas) aktyvatorių, turinčių sutampančius optinius perėjimus (12 pav. D) (G. Chen et al., 2014). Tiek sensibilizatoriaus, tiek aktyvatoriaus jonai CR gali absorbuoti sužadinto fotonus pagrindinėje nesužadintoje būsenoje, kad įgalintų perėjimą į sužadintą tarpinę būseną. Po to energija perduodama tarp sensibilizatoriaus ir aktyvatoriaus perkeliama į metastabilią sužadintą būseną. Sensibilizatorius tolesniame žingsnyje relaksuoja atgal į pagrindinę būseną, o aktyvatorius išspinduliuoja apkonvertuotą fotoną ir analogišku principu grįžta į nebesužadintą pagrindinę būseną. CR taip pat gali atsirasti kaip savaiminio gesinimo mechanizmas, apimantis energijos mainus tarp sužadintos būsenos jono ir kito jono, esančio pagrindinėje būsenoje, tai lemia jo perėjimą į tarpinę sužadintą būseną. Tokiais atvejais tarpinė sužadinta būsena turi būti viduryje tarp aukštesnės sužadintos ir pagrindinės būsenų.

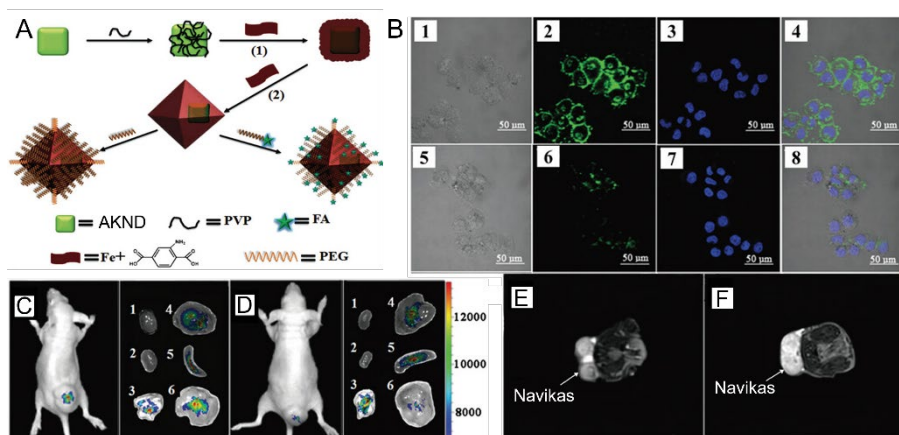
1.14. Apkonvertuojančios nanodalelės bimodaliniame biovaizdinime

Biologinis vaizdinimas yra esminė priemonė tiriant biologinius procesus ir ląstelių metabolizmą, diagnozuojant ligas ir stebint terapijos eigą (Chung et al., 2021; J. Huang et al., 2019). Biovaizdinimas, pagrįstas lantanoidais legiruotais nanodariniiais, taip pat apima viduląstelinio susikaupimo stebėjimą ir sekimą, nanodarinių tiesioginį nukreipimą į naviką, limfinės sistemos, kraujagyslių vaizdinimą, naviko angiogenezės analizę, ląstelių sekimą, bakterijų vaizdinimą ir t. t. (Y. Lu et al., 2014). Visgi tiesioginis taikymasis į tokius darinius, kaip, pvz., intrakranijinė glioblastoma, kuriems pasiekti tektų kirsti hematoencefalinį barjerą (vieną atrankiausių biologinių barjerų), ir daugiaspalvis bei daugiafunkcis jų vaizdinimas (Ni et al., 2014) vis dar tebėra sudėtingi. Palyginti su vienmodaliniu vaizdinimu, multimodalinis biovaizdinimas gali suteikti išsamesnę informaciją apie ligas kombinuodamas skirtingus signalus, taip išvengiant netikslių vaizdo rezultatų, atsirandančių dėl vienmodalinio vaizdinimo apribojimų. AKND pripažįstamos perspektyvomis kontrastinėmis medžiagomis biologiniam vaizdinimui, nes turi santykinai didelę NIR srities šviesos, leidžiančios giliau įsiskverbti į audinius, sugertį bei nesukelia reikšmingų fotopazaidimų (Sedlmeier & Gorris, 2015).

Dvigubo vaizdinimo srityje nemažai dėmesio skiriama apkonversijos liuminescencijos ir tradicinės fotoluminescencijos derinimui (An et al., 2013; X. Li et al., 2013). Grupė, vadovaujama Zhang ir Zhao (X. Li et al., 2013),

paruošė sudėtingą, kelių sluoksnių struktūrą, sudarytą iš šerdies ir trijų apvalkalų, $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}/\text{NaYF}_4/\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$. Šiuos nanokristalus, skirtus dviejų režimų AKL ir FL vaizdinimui žadinant 800 nm spinduliuote, jie panaudojo *in vivo* tyrimuose, išgaudami didelio kontrasto vaizdus plikose pelėse.

Kitame tyrime Y. Li et al. sukūrė oktaedrinės šerdies-apvalkalo AKND, sujungtas su metaliniu-organiniu karkasu (MOK) ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ AKND@Fe-MIL-101- NH_2 (UMP)), ir panaudojo jas dvigubam navikų vaizdinimui (13 pav. A) (Y. Li et al., 2015). AKND gali būti naudojamos optiniam vaizdinimui dėl apkonversijos liuminescencijos po NIR sužadavimo, o MOK gali būti naudojami T2-svertiniam magnetinio rezonanso vaizdinimui (MRT). Integruojant juos į vieną heterostruktūrą, nanohibridai pasižymėjo AK/T2-MR dviejų režimų vaizdinimo savybėmis. UMP buvo toliau tobulinami padengiant juos folio rūgštimi modifikuotu PEG (FA-PEG), taip siekiant pagerinti UMP-FA biostabilumą ir tikslinį kaupimąsi navike. Žadinant 980 nm lazerio spinduliuote žmogaus epidermoidinės karcinomos ląsteles (KB ląstelės, stipriai ekspresuoja folio receptorių (FR)) po 2 valandų poveikio UMP-FA nanodalelėmis buvo stebima ryški žalia AKL. Kita vertus, žmogaus krūties vėžio MCF-7 ląstelių linija, neturinti FR, prastai kaupė UMP-FA ir todėl jose buvo stebima daug silpnesnė AK liuminescencija. Tokie skirtumai parodo, kad UMP-FA buvo selektyviai nukreiptos ir specifiskai

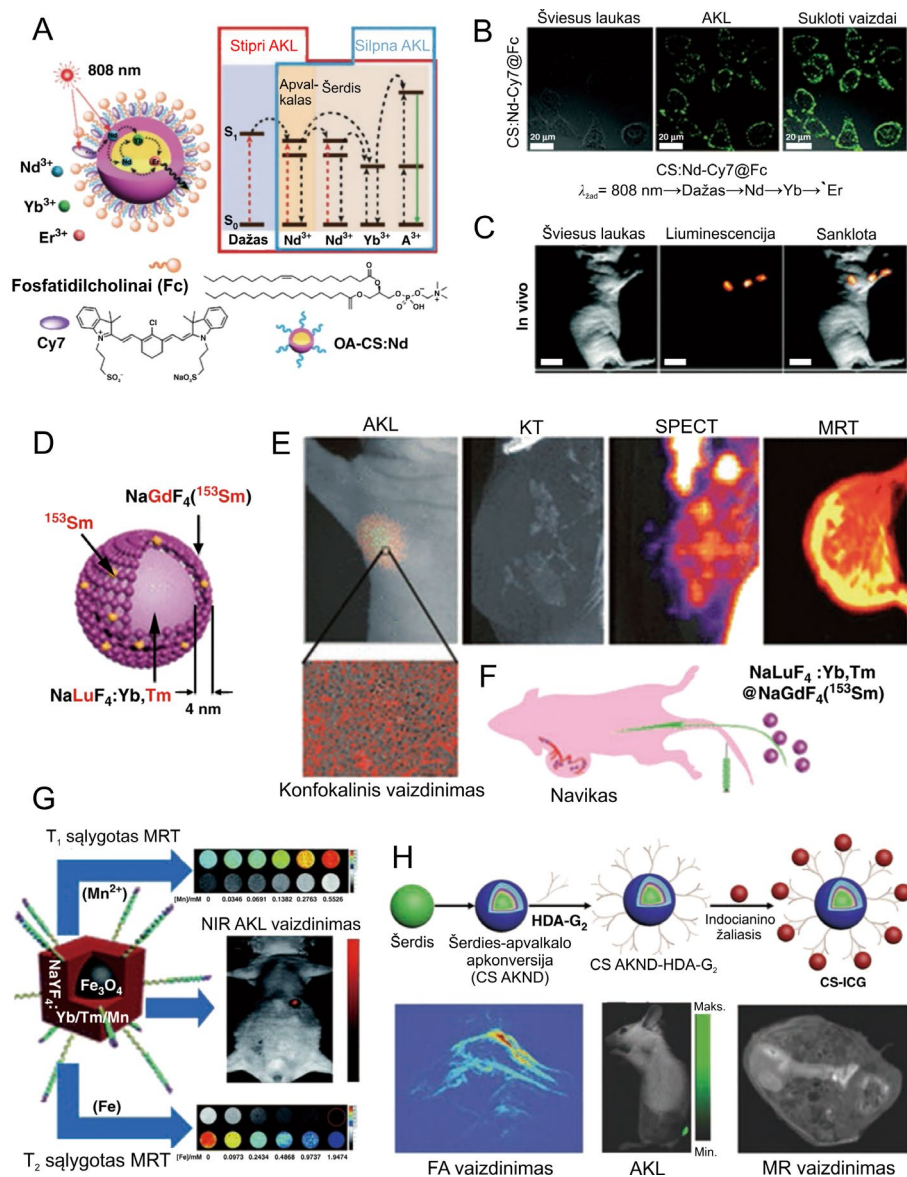


13 pav. (A) Schema, iliustruojanti šerdies-apvalkalo AKND@Fe-MIL-101- NH_2 nanostruktūrų sintezę. (B) Skirtingų ląstelių linijų, inkubuotų su UMP-FA nanodalelėmis, konfokalinės mikroskopijos vaizdai: 1–4 – KB ląstelių linija, 5–8 – MCF-7 ląstelių linija; po intraveninės injekcijos su (C) UMP-FA ir (D) UMP nanodalelėmis AKL vaizdinimo metu užregistruoti pelių, turinčių į poodį įskiepytus KB navikus, vaizdai bei disekuoti įvairūs organai: 1) širdis, 2) plaučiai, 3) kepenys, 4) blužnis, 6) KB navikas. Po intraveninės injekcijos su (E) UMP-FA ir (F) UMP nanodalelėmis iš pelių išpreparuotų KB navikų T_2 -MRT vaizdai. Adaptuota pagal (Y. Li et al., 2015).

kaupėsi KB ląstelėse (13 pav. B). T2 svertiniai MRT signalai taip pat rodė didesnę UMP-FA įsisavinimą KB ląstelėse. Tyrimai *in vivo* atskleidė, kad pelėse, turinčiose įskiepytą KB naviką, intraveniškai suleidus UMP-FA, po 24 h naviko srityje buvo stebimas intensyvus apkonversijos signalas. Tuo metu, pelėse, kurioms suleista nemodifikuotų UMP, buvo stebėtas daug silpnesnis signalas (13 pav. C, D). Be to, pelėse, veiktose UMP-FA, naviko T2 svertinis MRT signalas sumažėjo 35 %, palyginti su signalu, kuris užregistruotas suleidus UMP (13 pav. E, F). Visi šie rezultatai patvirtino heterostruktūrų tinkamumą dviejų režimų AKL/MRT vaizdinimui.

1.15. Multimodalinis vaizdinimas su AKND

Vis labiau tobulėjant nanomedžiagų sintezės metodams pastebėta, kad pačios apkonvertuojančios nanostruktūros galėtų išgauti įvairias vaizdinimo technikas moduluojant jų struktūrą bei legiravimą skirtingais lantanoidų elementais. Tokiose struktūrose nebūtina apsistoti ties dvigubo vaizdinimo galimybėmis. Jas galima išplėsti iki trigubo ar net keturgubo kombinuoto vaizdinimo. Li vadovaujama grupė (X. Zou et al., 2016) sukūrė fosfatidilcholinu (Fc) modifikuotą ir dažais-sensibilizuojamą AKND nanokompozitą, skirtą biologiniam AKL vaizdinimui. Specialus dažų derinys (Cy7) buvo pritvirtintas prie $\text{NaYF}_4:\text{Yb}_{30\%}, \text{Nd}_{1\%}, \text{Er}_{0,5\%} @ \text{NaYF}_4:\text{Nd}_{20\%} (\text{CS:Nd})$ ir naudojamas kaip dažas-antena, kuri galėtų plačiai surinkti NIR energiją ir sustiprinti AK liuminescencijos signalą (14 pav. A). Intensyvus AKL signalas gali būti registruojamas HeLa ląstelėse, inkubuotose su $\text{CS:Nd-Cy7}@ \text{Fc}$ nanokompozitu (14 pav. B). Be to, $\text{CS:Nd-Cy7}@ \text{Fc}$ buvo sėkmingai pritaikytas limfotakos vaizdinimui (14 pav. C), o tai rodo, kad šis dažu sensibilizuojamas apkonversijos nanokompozitas yra tinkamas biologiniam vaizdinimui. Tačiau vien tik optinis, net ir skirtingų technikų taikymas yra reikšmingai apribotas išgaunamos skiriamosios gebos ir prastų 3D rekonstrukcijos galimybių. Tad svarbu kartu priderinti ir kitas medicinos srityje naudojamas vaizdinimo galimybes, kaip, pavyzdžiui, MRT, KT, SPECT ar FA. Y. Sun et al. sukūrė $\text{NaLuF}_4:\text{Yb}, \text{Tm} @ \text{NaGdF}_4: ^{153}\text{Sm}$ – optimizuotą multimodalinį vaizdinimo zondą, kuriame Lu naudotas KT, Tm – AKL vaizdinimui, Gd – MRT, o radioizotopas ^{153}Sm – SPECT metu registruojamų vaizdų kontrastui gerinti (14 pav. D–F) (Y. Sun et al., 2013). Verta paminėti, kad norimą jautrumą ir skiriamąją gebą *in vivo* būtų galima gerokai pagerinti derinant vien MRT ir AKL vaizdinimą. AKND pagrindu pagaminti nanokompozitai AKL/MR dviejų režimų vaizdinimui buvo gerai ištirti (B. Ding et al., 2019; X. Li, Liu, et al., 2020; Luo et al., 2017; Mukherjee et al., 2020; H. Qiao et al., 2017).



14 pav. (A) Fc modifikuotų ir dažu sensibilizuojamų AKND nanokompozitų schema ir jų energijos lygmenų diagrama, reprezentuojanti fotonų apkonversiją po 808 nm spinduliuotės sužadinimo. (B) HeLa ląstelių, inkubuotų su CS:Nd-Cy7@Fc nanokompozitais AKL vaizdai. (C) Limfinės sistemos AKL vaizdinimas 30 min po injekcijos su CS:Nd-Cy7@Fc žadinant 808 nm šviesa. Adaptuota pagal (X. Zou et al., 2016). (D) NaLuF₄:Yb,Tm@NaGdF₄(¹⁵³Sm) nanostruktūros kompozicija. (E) Naviką turinčios beplaukės pelės keturių režimų (AKL, KT, SPECT ir MRT) vaizdinimas praėjus 1 h po intraveninės injekcijos su LuF₄:Yb,Tm@NaGdF₄(¹⁵³Sm). (F) Naviko angionezės vaizdinimo naudojant NaLuF₄:Yb,Tm@NaGdF₄(¹⁵³Sm) schema (Y. Sun et al., 2013). (G) Fe₃O₄@NaYF₄:Yb/Tm/Mn nanoplatformos T1/T2 trukmių sąlygoti MR ir NIR AKL vaizdai. Adaptuota pagal (Luo et al., 2017). (H) AKND, modifikuotų ICG (CS-ICG), sintezės schema ir jų pritaikymas fotoakustinio, AK liuminescencijos bei MRT vaizdinimuose *in vivo*. Adaptuota pagal (Y. Liu et al., 2016).

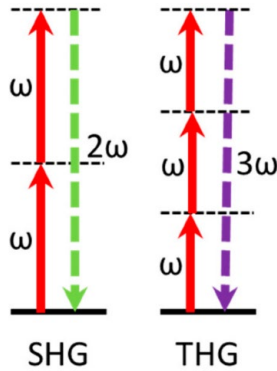
Luo et al. susintetino inovatyvią $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Mn}^{2+}$ legiruotą $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Tm}$ nanoplatformą, kuri gali ne tik pasiūlyti kontrastinį signalą atliekant T1/T2 svertinį MRT dėl Fe_3O_4 ir Mn^{2+} koegzistavimo, bet ir pasižymi ryškia AKL ($\text{Yb}^{3+}-\text{Tm}^{3+}$) *in vivo* optiniame vaizdinime (Luo et al., 2017) (14 pav. G).

Yra žinoma, kad MRT labiau tinka minkštųjų audinių tyrimui, o KT pasižymi pranašumais tiriant kaulų, plaučių ir krūtinės ląstos pokyčius, taip pat aptinkant vėžinius darinius. Tad kombinuotas MRT, KT ir AKL vaizdų registravimas neabejotinai gali suteikti išsamesnės informacijos apie audinius (Yamini et al., 2020; X. Zhu et al., 2012). Li grupė sukūrė multimodalinio vaizdinimo (MRT, KT ir AKL) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NaLuF}_4:\text{Yb},\text{Er}/\text{Tm}$ nanokompozitus, kurie galėtų suteikti išsamią informaciją tiriant peles, turinčias suformuotus navikus (X. Zhu et al., 2012). FA vaizdinimas, pasižymintis neinvaziškumo, greitumo ir tikslaus kiekybinio įvertinimo savybėmis, sulaukė didžiulio dėmesio, ypač diagnozuojant naviko patofiziologinę būklę. Indocianino žaliasis (ICG) turi stiprų FA vaizdinimo signalą esant net ir mažai jo koncentracijai, nes stipriai absorbuoja šviesą 740–800 nm diapazone (Y. Liu et al., 2016; Lv et al., 2017). Liu et al. susintetino didelio efektyvumo AKND, sužadinamas 800 nm bangos ilgio spinduliuote, o tada prijungė prie jų ICG, taip padidindami bendrą NIR absorbciją, AK liuminescencijos stiprumą bei įgalindami FA, AKL bei MRT vaizdinimą (14 pav. H) (Y. Liu et al., 2016).

1.16. Harmoninės nanomedžiagos

Netiesiniai optiniai vaizdinimo zondai, generuojantys antrąją ir/ar trečiąją harmonikas (SHG ir THG), vadinami harmoninėmis nanodalelėmis arba harmonoforais. Tai daug žadančios klinikinės kontrastinės medžiagos, pasižyminčios neprilygstamu ilgalaikiu fotostabilumu bei vaizdinant sukuriama minimaliu foninio triukšmo signalu. Harmonoforų pavyzdžiais gali būti įvardijami KNbO_3 , BiFeO_3 , LiNbO_3 , BaTiO_3 , $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$, $\text{Ba}(\text{BO}_2)_2$, KTiOPO_4 , ZnO ar įvairūs necentrosimetrinės struktūros agregatai, molekulės ir pan. (Rogov et al., 2015).

SHG yra antros eilės netiesinis optinis procesas, kurio metu du fotonai, turintys ω dažnį, sąveikaujantys su necentrosimetrine terpe (t. y. medžiaga, neturinčia apibendrintos veidrodinės simetrijos), susijungia ir sudaro naują fotoną, kurio energija yra dvigubai didesnė, tad ir dvigubai didesnis dažnis (2ω) bei perpus mažesnis nei pradinių fotonų bangos ilgis (Boyd, 2003; Sutherland, 2003). Analogiškai vyksta ir THG, tik pastarosios atveju dalyvauja trys tokio paties dažnio ω fotonai, sukuriantys 3ω dažnio fotoną. 15 paveiksle pavaizduotos abiejų netiesinių optinių procesų energijos lygmenų diagramos.

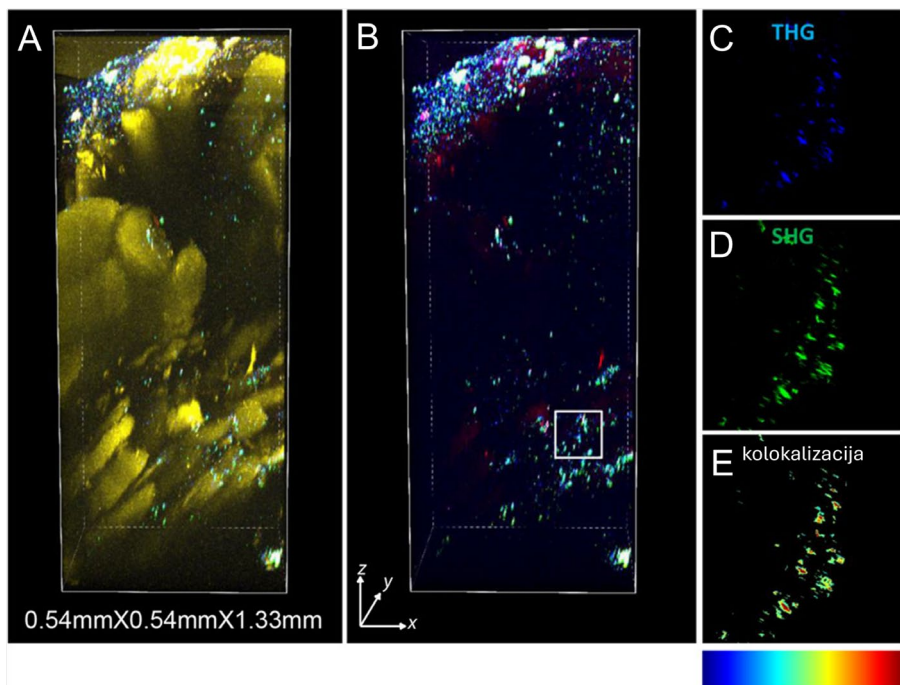


15 pav. Antrosios (SHG) ir trečiosios (THG) harmonikų generacijos energijos lygmenų diagramos. Pagal (Z. Xie et al., 2024).

Atsižvelgiant į tai, kad SHG mikroskopijoje kontrastui generuoti naudojama artimoji infraraudonoji spinduliuotė, SHG harmonoforai gali būti naudojami giliųjų audinių vaizdinimui (Dubreil et al., 2017; Extermann et al., 2009). Skirtingai nuo dažniausiai naudojamų fluorescencinių kontrastinių medžiagų, SHG nanozondai neblunka ir nemirksi, o jų signalas neprisotinamas didėjant apšvietimo intensyvumui, kai siekiama užtikrinti aukštą zondo jautrumą (Dempsey et al., 2012). Kadangi jų signalo profilis yra labai siauras, jie gali būti vaizdinami išgaunant didelį signalo-triukšmo santykį, neįtraukiant plataus tipinio autofluorescencinio fono spinduliavimo (Magouroux et al., 2012; Pantazis et al., 2010). Patogus funkcionalizavimas leidžia nukreipti harmonoforus į įvairias dominančias ląsteles ir baltymus (Čulić-Viskota et al., 2012), todėl šie vaizdinimo zondai yra daug žadantys diagnostiniai įrankiai tiek klinikiniuose, tiek ikiklinikiniuose tyrimuose (Sugiyama et al., 2018). Antrosios ir trečiosios harmonikų generacijos kontrastinius žymenis derinant kartu su fluorescenciniais žymekliais galima pasiekti dvigubo vaizdinimo galimybes (Pantazis et al., 2010).

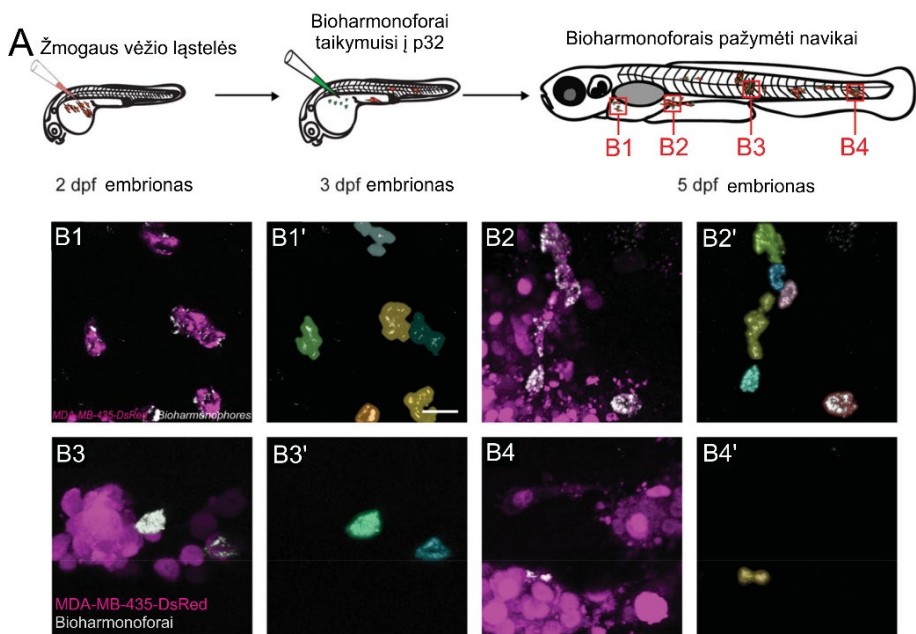
Dubreil et al. savo tyrimuose naudojo bismuto ferito harmonines nanodaleles (BFO HND), kurios buvo taikomos *in vitro* išplėstoms žmogaus skeleto raumenų kamieninėms ląstelėms – patraukliai gydymo priemonei pacientams, kenčiantiems nuo Diušeno raumenų distrofijos (Dubreil et al., 2017). Tyrime pademonstruota galimybė su harmoninėmis nanodalelėmis, kurios tuo pačiu metu gali generuoti tiek antrosios, tiek trečiosios harmonikos generacijų signalus, pažymėti ir audiniuose sekti skeleto raumenų kamienines ląsteles. Dėl žadinimo NIR srityje, BFO HND signalą galima daug lengviau atskirti nuo audinių fono, todėl padidėja vaizdo selektyvumas (16 pav.).

Siekdami sukurti pagrindą saugiam harmoninių SHG nanodarinių klinikiniam vaizdinimui, Sonay et al. nusprendė sukurti nanozondą, sudarytą iš biodegraduojančių medžiagų ir galintį generuoti pakankamą SHG signalą,



16 pav. Raumenų audinio, sužadinto ties 1300 nm (THG ir SHG signalai) ir 1040 nm (autofluorescencija) Z ašies projekcija. (A) Visų kanalų persiklojimo vaizdas; (B) Kartu suklotas SHG ir THG kanalų vaizdas; (C, D) Didžiausio intensyvumo THG ir SHG signalų y ašyje projekcija iš trimatės, (B) paveiksle stačiakampiu pažymėtos zonos (ROI) ($0,14 \text{ mm} \times 0,54 \text{ mm} \times 0,14 \text{ mm}^3$), esančios 0,9 mm atstumu nuo audinio paviršiaus. (E) Dviejų spalvų ROI kolokalizacijos vaizdas pagal signalą iš THG ir SHG panelių. Karštos (raudonos) spalvos rodo teigiamą koreliaciją. Teigiamai koreliuojančių pikselių dalis atitinka $I_{\text{corr}} = 0,834$ (Jaskolski et al., 2005). Adaptuota pagal (Dubreil et al., 2017).

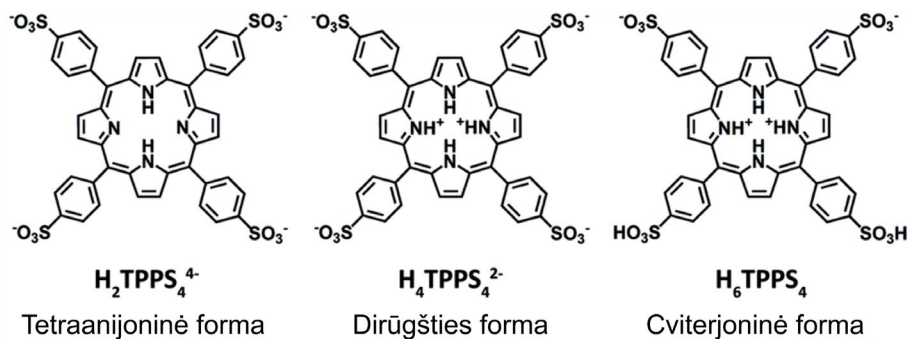
kurį būtų nesudėtinga registruoti audinių autofluorescencijos fone (Sonay et al., 2021). Jie pastebėjo, kad tam tikri, kintamą aminorūgščių skaičių turintys peptidai gali savarankiškai susitelkti į dideles, kietas, skirtingos morfologijos ir simetrijos nanostruktūras (Lakshmanan et al., 2012). Anksčiau buvo įrodyta, kad tokios struktūros gali būti feroelektrinės bei suteikti netiesinį optinį kontrastą, pvz., SHG (Handelman et al., 2012; Kholkin et al., 2010). Norėdami pademonstruoti optines bioharmonoforų savybes, skirtas tikslingai kauptis navikuose ir juos vaizdinti, Sonay et al. panaudojo ksenografinius zebražuvų vėžio modelius. Į zebražuves mokslininkai suleido DsRed ekspresuojančias ir metastazuojančias žmogaus melanomos ląsteles (MDA-MB-435-DsRed), kad suformuotų navikus, o kitą dieną suleido biodegraduojančių harmonoforų, kurie specifiskai susikaupė vėžinėse ląstelėse ir leido jas vaizdinti SHG mikroskopijos metu (17 pav.).



17 pav. Bioharmonoforai gali būti specifiskai nukreipti į atskiras vėžio ląsteles *in vivo*. (A) Schema, rodanti 2 dienų po apvaisinimo (dpf) zebražuvų embrionams suleidžiamas žmogaus vėžio ląsteles (MDA-MB-435-DsRed), 3 dpf – suleidžiama bioharmonoforų injekcija ir, galiausiai, 5 dpf registruojama fluorescencija ir SHG signalas. Raudoni stačiakampiai, pažymėti (B1–4), žymi dominančias sritis ir yra pateikiami žemiau. (B1–4) panelės demonstruoja susiformavusius navikus (rožinė spalva), pažymėtus bioharmonoforais (balta spalva), besikaupusius net ir pavienėse vėžinėse ląstelėse. (B1'–4') Tikslinių vėžio ląstelių ribų rekonstrukcija naudojant bioharmonoforo SHG signalą. Skalė – 15 μm . Adaptuota pagal (Sonay et al., 2021).

1.16.1. Mezo-tetra(4–sulfonatofenil) porfinas kaip potencialus harmonoforas

Tetrafenilporfiriną vienas pirmųjų dar 1935 m. susintetino Paul Rothmund (Rothmund, 1936). Nuo to laiko sintezės būdai nuolat tobulėjo, buvo kuriami įvairūs tetrafenilporfirino šeimos junginiai, kol 1962 m. Winkelman susintetino mezo-tetra(4–sulfonatofenil) porfiną (TPPS₄) (J. Winkelman, 1962). TPPS₄ molekulė bei jos skirtingos, nuo pH priklausomos formos, pavaizduotos 18 paveiksle. Kitaip nei tetrafenilporfirinas, TPPS₄ pasižymi puikiu tirpumu vandenyje. Taip pat jis išlaiko puikias singuletinio deguonies generacijos savybes (Wilkinson et al., 1993) ir anksčiau buvo matomas kaip daug žadantis fotosensibilizatorius fotosensibilizuotoje navikų terapijoje (Berg et al., 1993; Kessel et al., 1987). TPPS₄ gali prasiskverbti pro ląstelių membranas, įprastai lokalizuojasi lizosomose bei kaupiasi navikiniuose dariniuose, o terapinis poveikis buvo pademonstruotas tiek *in*



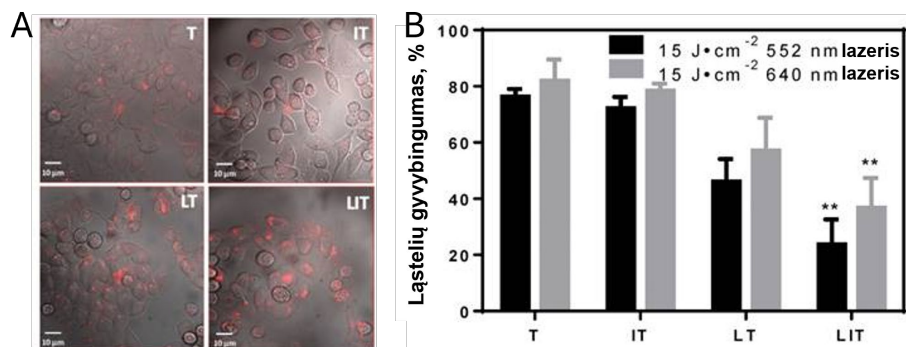
18 pav. Mezo-tetra(4–sulfonatofenil) porfino molekulinė struktūra esant skirtingam terpės pH. Adaptuota pagal (T. Kim et al., 2018).

vitro, tiek *in vivo* tyrimuose. Deja, bet klinikinės ambicijos buvo sugniuždytos po to, kai eksperimentuose su pelėmis, naudojant dideles TPPS₄ koncentracijas, buvo pastebėtas atsirandantis neurotoksiškumas (Sima et al., 1981; J. W. Winkelman & Collins, 1987). Vėlesniais metais pagerinti sintezės metodai padėjo išgauti labiau išgrynintą TPPS₄ formą, kuri eliminavo neurotoksiškumą, bet galėjo potencialiai sukelti nefrotoksiškumą dėl padidėjusio susikaupimo inkstuose, nors autoriai 21 dienos laikotarpiu pelėse reikšmingų pokyčių ir nestebėjo (Zima et al., 1997).

Kita vertus, šis porfirininis darinys ilgus metus yra plačiai studijuojamas dar ir dėl savo gebėjimo formuoti nekovalentines struktūras (Maiti et al., 1998; Ohno et al., 1993), kurios geriau žinomos, kaip tvarkūs cilindriniai J tipo agregatai (Short et al., 2013; Takayoshi Kobayashi, 2011) arba netvarkūs H tipo agregatai, formuojantys plokščias ar flokuliutas struktūras (Rotomskis et al., 2004). TPPS₄ molekulių saviorganizacija stipriai priklauso nuo terpės, kurioje yra ištirpinamos, sudėties bei įvairių išorinių veiksnių. Vienas iš labiausiai įtaką agregavimui darančių veiksnių yra terpės pH, nes būtent rūgštinėje terpėje (ties pH 4) ima formuotis minėtieji agregatai. Agregatų struktūrai įtaką daro ir į TPPS₄ molekulę įterpiami metalų jonai (Aggarwal & Borissevitch, 2006; Romeo et al., 2017). Lyginant monomerinę ir suagregavusią TPPS₄ molekulių formas, keičiasi ir jų fizikocheminės bei spektrinės savybės, pavyzdžiui, matomi sugerties ir fluorescencijos spektrų pokyčiai (Baliulyte et al., 2023; Parra et al., 2021).

Nepaisant anksti identifikuotų kliūčių, susijusių su tolesniu TPPS₄ panaudojimu klinikoje, mokslininkai tęsia biomedicininis tyrimus ieškodami naujų pritaikymo būdų. Pavyzdžiui, Xu et al. nanoliposomose įkapsuliuodami apjungę KT kontrastinę medžiagą jodiksanolį ir TPPS₄ (H. Xu et al., 2019).

Tokią sistemą jie pritaikė tiek *in vitro* tyrimuose su HeLa ląstelėmis, tiek *in vivo* tyrimuose su pelėmis, kurioms buvo įskiepyti navikai. Rezultatai parodė, kad pripildytos nanoliposomos suteikdavo tiek fluorescencijos signalą (19 pav. A), tiek kontrastą kompiuterinės tomografijos vaizdinimo metu. Taip pat TPPS₄ galėdavo vykdyti fotosensibilizuotą terapiją, kurios metu ląstelės būdavo apšvitindamos 552 nm arba 640 nm bangos ilgio lazeriu ir žudomos (19 pav. B).



19 pav. (A) HeLa ląstelių vaizdai paveikus jas laisvu TPPS₄ (T), laisvu jodiksanioliu ir TPPS₄ (IT), TPPS₄, įkapsuliuotu nanoliposomose (LT) ir nanoliposomomis, kuriose kartu įkapsuliuoti jodiksaniolis ir TPPS₄ (LIT). TPPS₄ internalizacija ląstelėse stebėta po 18 val. inkubacijos su T, IT, LT arba LIT. TPPS₄ fluorescencija (raudona pseudospalva) buvo registruota žadinant 543 nm lazeriu. (B) HeLa ląstelių išgyvenamumas vieną dieną po fotosensibilizuotos navikų terapijos. Tamsios juostos rodo 552 nm lazerio spinduliuotę, o šviesios – 640 nm lazerio spinduliuotę naudojant tokią pačią apšvitinimo dozę (15 J/cm²). (**p < 0,01, palyginti su T, IT ir LT esant tokiai pačiai apšvitinimo dozei). Adaptuota pagal (H. Xu et al., 2019).

Negana to, ankstesniuose moksliniuose darbuose buvo pademonstruota, kad porfirinų tipo molekulėse bei agregatuose fiksuojama ne tik fluorescencija, bet ir netiesinis optinis antrosios ir/ar trečiosios harmonikų generacijos signalas (Di Carlo et al., 2020; Fujiwara et al., 2004; Tessore et al., 2018). Skirtingi porfirinų pagrindu susintetinti dažai (Khadria et al., 2018) ir porfirinų molekulių agregatai, įterpti į lipidinį dvisluoksnį (L. Cui et al., 2015) suteikdavo geresnį kontrastą vaizdinant ląsteles netiesinės mikroskopijos metu. SHG signalą, specifiskai TPPS₄ molekulinuose agregatuose, fiksavo Alizadeh et al. bei parodė, kad šie agregatai gali pasitarnauti kaip modelinės sistemos molekulinės saviorganizacijos tyrimuose ar potencialūs harmonoforai netiesinėje poliarimetrinėje mikroskopijoje (Alizadeh et al., 2023).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Magnetinės nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais (MN-AuNK), buvo susintetintos ir gautos iš Fizinių ir technologijos mokslų centro Nanostruktūrų laboratorijos. Pradinio gauto nanodalelių tirpalo koncentracija buvo 25,5 mg/mL.

Apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos magnetiniais nanokristalais (AKND@ γ -Fe₂O₃), buvo susintetintos ir gautos iš Paris Cité universiteto, ITODYS laboratorijos. Nanodalelės gautos išdžiovintų miltelių pavidalu. Optinių savybių ir biosuderinamumo tyrimai atlikti Nacionalinio vėžio instituto Biomedicininės fizikos laboratorijoje.

Pastaba: su skirtingomis nanomedžiagomis atlikti tyrimai buvo vykdomi nepriklausomai, atskirų eksperimentų metu. Tam tikri tyrimai buvo atliekami pagal tokius pačius metodų protokolus. Siekiant, jog ši informacija nesikartotų „Medžiagų ir metodų“ skyriuje, ji vietomis yra apibendrinta ir pateikiama kartu. Esant metodų pakitimams, jie konkrečioms nanomedžiagoms yra detalizuojami.

2.1. Medžiagos

Magnetito (Fe₃O₄) nanodalelių sintezei ir jų konjugacijai su aukso nanoklasteriais buvo naudojami šie reagentai: FeSO₄ · 7H₂O, Fe₂(SO₄) · 5H₂O, FeCl₃, fosfato buferinis druskų tirpalas (PBS), aminorūgštys (D,L-cisteinas (C₃H₇NO₂S, Cys) ir D,L-metioninas (Met), jaučio serumo albuminas (96%) (JSA) ir HAuCl₄. Visi atitinkami reagentai buvo įsigyti iš *Sigma-Aldrich*. NaOH buvo gautas iš *Posh SA* (Lenkija) ir išgrynintas įsotinant jo vandeninį tirpalą. Dializės vamzdeliai *SnakeSkinTM* buvo įsigyti iš *Thermo Fisher Scientific* (MWCO, 10 kDa, Rokfordas, IL, JAV). Visuose sintezės etapuose buvo naudojamas dejonizuotas vanduo.

AKND@ γ -Fe₂O₃ sintezėse naudota itrio (III) acetato (99,9%, *Sigma-Aldrich*), iterbio (III) ir erbio (III) acetato druskos (99,9%, *Sigma-Aldrich*), etileno glikolio-dietilenglikolio mišinys (≥ 99 %, *Sigma-Aldrich*), oleino rūgštis (*Fisher science*, 70%), amonio fluoridas (98%, *Sigma-Aldrich*) ir NaOH (98%, *Sigma-Aldrich*). γ -Fe₂O₃ sintezei naudoti dietilenglikolis (99%, *Across Organics*), papildytas geležies acetatu (95%, *Sigma-Aldrich*).

Mezo-tetrakis (4-sulfonatofenil) porfinas (TPPS₄) buvo įsigytas iš *Sigma Aldrich* (St. Louis, Misūris, JAV) ir naudojamas be tolesnio gryninimo. Mėginio imobilizavimui gigantiški jūros ežį primenantys (GJE) TPPS₄ agregatai buvo užfiksuojami poliakrilamido gelyje (Osváth et al., 1994). Akrilamidas (98+%), N,N'-metilenbisakrilamidas (97%), amonio

peroksidisulfatas (98,0% min.) ir N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas (TEMED), 99%, buvo įsigyti iš *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Masačusetsas, JAV).

2.2. Nanodalelių sintezės

2.2.1. Magnetito nanodalelių sintezė

Magnetito (Fe_3O_4) nanodalelės buvo susintetintos iš šarminio FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ tirpalo ir 0,2 mol/L aminorūgščių tirpalo, kaip chelatacijos kompleksodario, esant pH 12,1. Sinteza buvo vykdoma 70 °C temperatūroje 3 valandas N_2 atmosferoje ir švelniai maišant terpę. Susintetintos nanodalelės buvo surinktos centrifuguojant, nuplaunamos ir išdžiovinamos 60 °C temperatūroje.

2.2.2. Magnetinių nanodalelių konjugacija su aukso nanoklasteriais

Raudonai fotoluminescuojantys aukso nanoklasteriai kartu su magnetinėmis (Fe_3O_4) nanodalelėmis buvo susintetinti mikrobangų reaktoriuje *Monowave 300* (*Anton Paar*, JAV), naudojant 160 W spinduliuotę 60 min. Pradžioje paruošiami ir sumaišomi du vandeniniai tirpalai, sudaryti iš Fe_3O_4 ND, disperguotų PBS buferyje, ir JSA, ištirpinto 10 mmol/L HAuCl_4 kartu su Met. Tada mišinio pH vertė, lašinant NaOH tirpalą, buvo padidinama iki 12,4 ir mišinys perkeltas į mikrobangų reaktorių. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}@ \text{JSA}$ ND (MN-AuNK) sintezė buvo vykdoma naudojant 160 W spinduliuotę 60 °C ir 45 °C temperatūroje 60 min. Gautas produktas buvo surenkamas centrifuguojant ir nuplaunant vandeniu. Dializė buvo atlikta įdedant nanodalelių tirpalą į *SnakeSkinTM* dializės maišelį 24 valandoms.

2.2.3. Apkonvertuojančių nanodalelių sintezė ir padengimas γ - Fe_2O_3 nanokristalais

Vandenyje tirpių apkonvertuojančių $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokompozitų sintezė apėmė trijų etapų procesą. Pirmasis žingsnis – tai $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ sėklų generavimas poliolio tirpale. Antrojo etapo metu aplink šias sėklas šviežioje poliolio terpėje buvo auginami $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokristalai. Galiausiai, norint disperguoti nanokompozitus vandenyje, šie buvo funkcionalizuojami hidrofiliniais citrato ligandais.

Visų pirma, buvo paimta 25,0 arba 28,9 M itrio (III) acetato (99,9%, *Sigma-Aldrich*) ir atitinkamas kiekis iterbio (III) ir erbio (III) acetato druskų (99,9%, *Sigma-Aldrich*) ir jos ištirpintos 125,0 mL etileno glikolio-

dietilenglikolio mišinys (20:80 v/v) ($\geq 99\%$, *Sigma-Aldrich*) bei 62,5 mL oleino rūgšties (*Fisher science*, 70%). Amonio fluoridas (98%, *Sigma-Aldrich*) ir natrio hidroksidas (98%, *Sigma-Aldrich*) buvo pridėti siekiant išlaikyti Y:F:Na arba (Y+Ln):F:Na atominį santykį 1:32:2,5. Tada mišinys 30 minučių kaitinamas papildomai naudojant grįžtamąjį kondensatorių (6 °C/min). Po kaitinimo mišinys buvo atvėsintas iki kambario temperatūros, o susidariusios nuosėdos surenkamos, per kelis centrifugavimo ciklus pridėdant etanolio perteklių ir plaunant distiliuotu vandeniu. Tuo pačiu protokolu buvo remiamasi siekiant paruošti $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,2}]\text{F}_4$ ir $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Er}_{0,2}]\text{F}_4$ nanodaleles, naudojamas kontrolei.

300 mg džiovintų sėklų buvo disperguotos 31 mL dietilenglikolio (99%, *Across Organics*), papildyto 3 mmol geležies acetato (95%, *Sigma-Aldrich*) ir 0,125 mL dejonizuoto vandens. Tada gautas mišinys kaitinamas grįžtamajame kondensatoriuje 3 valandas. Gautos nuosėdos buvo atskirtos nuo supernatanto kambario temperatūroje centrifuguojant ir plaunant etanoliu ir vandeniu, o galiausiai išdžiovinamos ore.

Laisvai disperguotos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodalelės taip pat buvo paruoštos tomis pačiomis darbo sąlygomis, pašalinant $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ sėklas iš pradinio reakcijos tirpalo.

Galviausiai nanodalelės buvo padengiamos citratu naudojant paprastą ligandų mainų metodą, pakeičiant organines liekanas fluorido ir/arba oksido dalelių paviršiuje naujai įvestomis daugiavalenčių citratų rūšimis. Įprastai, 1 g $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Ln}_{0,2}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (kur Ln = Yb, Er arba Yb-Er) nanodalelių buvo disperguotos 200 mL vandeninio trinatricio citrato (50 mM) tirpalo. Gauta suspensija mechaniškai maišoma ir kaitinama iki 100 °C 30 min. Susidariusios nuosėdos surinktos naudojant stiprų magnetą, po to plaunamos etanolio pertekliumi, kad būtų pašalintos neskiepytos organinės rūšys, ir galiausiai džiovinamos ore 60 °C temperatūroje. Tas pats protokolas buvo taikomas ir norint išgauti pavienes sėklas bei depozitus.

2.3. TPPS₄ agregatų bandinio paruošimas

Pradinis 10^{-3} M TPPS₄ tirpalas buvo paruoštas ištirpinant porfirino miltelius distiliuotame vandenyje. Makroskopinės supramolekulinės struktūros savaime susiformavo tirpale, paruoštame atskiedžiant pradinį tirpalą iki $2 \cdot 10^5$ M su 0,1 M vandeniniu HCl tirpalu. Į 1 mL pradinio tirpalo įpilama į 49 mL 0,1 M vandeninio HCl tirpalo ir atsitiktinai sumaišoma. 50 mL tūrio tirpalai buvo brandinami sandariai uždarytuose stikliniuose induose tamsoje kambario temperatūroje ilgiau nei metus. Vaizdinimui mikroskopu „šlapieji“ GJE supramolekuliniai TPPS₄ agregatų bandiniai buvo

ruošiami originalioje agregavimo terpėje arba sumaišyti su poliakrilamido gelio komponentais, kurie buvo išliejami ant objektinio stikliuko ir uždenkti dengiamuoju stikliuku. Poliakrilamido gelis buvo pagamintas iš 5% akrilamido:bis-akrilamido (30:1), polimerizuoto 0,5% amonio persulfatu ir 0,5% TEMED (Osváth et al., 1994). „Sausieji“ GJE mėginiai buvo paruošti oru džiovinant vandeninius agregatus, nusodintus su agregavimo terpe ant dengiamojo stiklelio.

2.4. Nanomedžiagų erdvinių ir struktūrinių savybių charakterizavimas

2.4.1. Hidrodinaminio dydžio ir zeta potencialo nustatymas

Su ZetaPals dalelių dydžio matuokliu (*Brookhaven Inc.*, JAV) buvo išmatuotas magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, hidrodinaminis dydis, o AKND@ γ -Fe₂O₃ – su *Zetasizer NanoZS (MALVERN PANALYTICAL*, Vusteršyras, JK). Matavimo metodas paremtas kvazitampriosios šviesos sklaida arba dar kitaip vadinamas fotonų koreliacijos spektroskopija. Atliekant hidrodinaminės šviesos sklaidos matavimus, detektorius registruoja išsklaidytą šviesą kaip intensyvumo fluktuacijas labai mažame tirpalo domene laiko atžvilgiu. Kadangi dalelių judėjimas tirpale aprašomas Brauno judėjimu, fluktuacijų slopimas laike siejamas su difuzijos koeficientu. Difuzijos koeficientas D yra pagrindinis kvazitampriosios šviesos sklaidos metodo fizikinis dydis, kuris atvirkščiai proporcingas dalelių skersmeniui d (1 formulė). Apskaičiavus difuzijos koeficiento vertę, galima suskaičiuoti ir dalelių dydį.

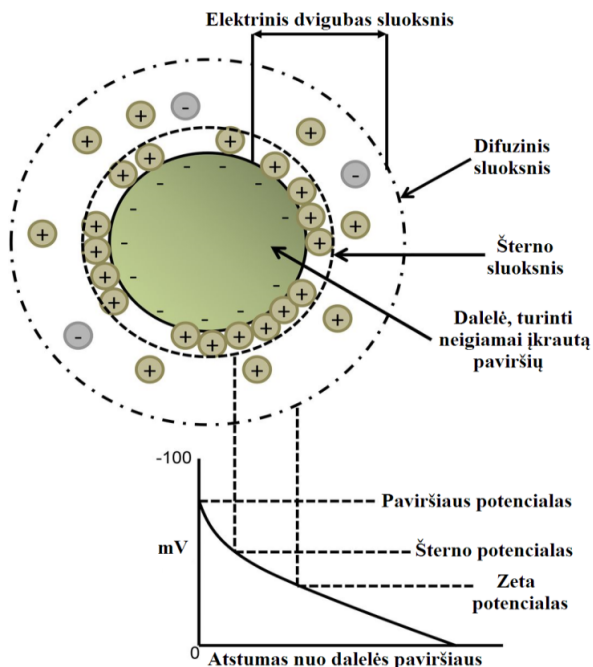
$$D = \frac{k_B T}{3\pi \cdot \eta(t) \cdot d} \quad (1)$$

čia k_B – Bolcmano konstanta, T – absoliutinė temperatūra, $\eta(t)$ yra tirpiklio, kuriame plaukioja dalelės, klampa, d – dalelių skersmuo.

Šiame skyriuje apibrėžtu hidrodinaminės šviesos sklaidos metodu išmatuojamas hidrodinaminis dalelių dydis, kitaip gali būti vadinamas hidrodinaminiu vienetu. Hidrodinaminį vienetą sudaro ne tik dalelė, bet ir ant jos paviršiaus adsorbuoję jonių bei priešingo nei dalelės krūvio jonių su jais stipriai prisikabinusiomis molekulėmis (Prokes, 1996).

Magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, zeta potencialas nustatytas su *ZetaPals* potencialo analizatoriumi (*Brookhaven Inc.*, JAV). Zeta potencialas nustatytas iškart po mėginio pagaminimo. Vandenyje disperguotų ir citratu padengtų AKND@ γ -Fe₂O₃ zeta potencialas buvo išmatuotas prietaisu *Zetasizer NanoZS (MALVERN PANALYTICAL*, Vusteršyras, JK). Pats zeta potencialas nustatomas panaudojant fazės analizės

šviesos sklaidą, kuri reikalinga nustatyti turinčios krūvį koloidinės suspensijos elektroforezės mobilumui (20 pav.).



20 pav. Joninės koncentracijos ir potencialų skirtumo, kaip atstumo nuo įkrautos ir suspenduotos dispersinėje terpėje dalelės paviršiaus, funkcijos diagrama. Adaptuota iš (Yingchoncharoen et al., 2016).

2.4.2. Atomo jėgos mikroskopijos matavimai

Atomo jėgos mikroskopas (AJM) *VEECO diInnova®* (*Bruker Corporation*, Billerica, Masačusetsas, JAV), turintis SPMLab programinę įrangą (versija 7.11), buvo naudojamas MN-AuNK, išdžiovintų ant žėručio substrato, dydžio nustatymui. Bandinių paruošimas matavimams vyko naudojant besisukančio padengimo (*angl. spin coating*) metodą. Ant šviežiai nuskelto žėručio plokštelės, besisukančios apie plokštei statmeną ašį 1000 aps./min greičiu, buvo užlašinami 40 μL tiriamojo koloidinio tirpalo, kuris tolygiai pasklisdavo žėručio plokštelės paviršiuje. Taip pat atomo jėgos mikroskopu buvo vaizdinti ir TPPS₄ agregatai, kurie pradžioje buvo išdžiovinami ant dengiamojo stikliuko paviršiaus. Visi mėginiai nuskaityti virpamojo zondo režimu su specialiu zondų, kurio spindulys yra < 15 nm (modelis: *TESPA*) (*Bruker Corporation*), o virpesių dažnis 230–410 kHz. 5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ (TPPS₄ agregatams), 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ir 1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ (MN-AuNK) topografiniai vaizdai buvo registruojami 2 Hz nuskaitymo dažniu ir visais atvejais juos sudarė 512 pikselių $\times$ 512 pikselių.

2.4.3. Skenuojančios elektroninės mikroskopijos matavimai

AKND@ γ -Fe₂O₃ skenuojančios elektroninės mikroskopijos (SEM) vaizdai registruoti su *Supra40 ZEISS FEG* mikroskopu esant 5,0 kV elektronų greitinimo įtampai. Šis mikroskopas turėjo didelio efektyvumo imersinio objektyvo detektorių bei antrinį *Everhart-Thornley* elektronų detektorių.

Mėginio lašas su TPPS₄ agregatais buvo išdžiovintas ant 5×5 mm stiklinio dengiamojo stiklelio. Pastarasis buvo uždėtas ant specialaus SEM bandinių laikiklio bei padengtas 5 nm storio aukso sluoksniu, naudojant *Quorum Q150T ES* (*Quorum Technologies Ltd.*, JK) purkštuvą. Paruošus bandinį, jis buvo vaizdinamas *JEOL JSM-7100F/LV* skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (*JEOL Ltd.*, Tokijas, Japonija). Antriniai elektronai buvo detektuojami esant 3 kV greitinimo įtampai.

2.4.4. Peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos matavimai

AKND@ γ -Fe₂O₃ peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos (TEM) vaizdai gauti naudojant *JEM 2010 UHR* mikroskopą (*JEOL Ltd.*, Japonija), veikiantį esant 200 kV, o mikrofotografijos užfiksuotos naudojant 4008 × 2672 pikselių krūvio sąsajos (CCD) kamerą *Gatan Orius SC1000* (*AMETEK*, Bervinas, JAV). Dydžių skirstiniai buvo sudaromi analizuojant vaizdus su *ImageJ* (versija 1.46) programine įranga.

2.5. Spektroskopiniai matavimai

2.5.1. Nuostoviosios sugerties ir fotoluminescencijos matavimai

Magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, sugerties spektrai matuoti bangos ilgių diapazone nuo 360 nm iki 850 nm. Sugerties matavimai atlikti naudojantis UV/regimosios šviesos spektrinio diapazono spektrofotometru *Varian Cary 50* (*Varian Inc.*, Australija). Taip pat išmatuoti magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, fotoluminescencijos spektrai, registruoti naudojantis spektrofotometru *Edinburgh Instruments FLS920* (*Edinburgh Instruments*, JK). Matuojant magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, FL spektrus buvo žadinama 488 nm bangos ilgio spinduliuote. Fotoluminescencija matuota nuo 510 nm iki 900 nm. Koloidinio stabilumo tyrime buvo registruojami FL spektrai ir stebimas jų intensyvumo pokytis dviejų savaitių laikotarpiu. Naudotas žadinimo bangos ilgis 488 nm.

Susintetintų ir vandenyje disperguotų apkonvertuojančių nanodalelių, sujungtų su magnetiniais nanokristalais, emisijos spektrai buvo registruojami

kambario temperatūroje spektrofotometru *Edinburgh Instruments FLS920* (*Edinburgh Instruments*, JK). Spektrofotometras turi dvigubos emisijos monochromatorių, aušinamą ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pavienių fotonų skaičiavimo fotodaugintuvą (*Hamamatsu R928*) ir 720 mW nuolatinės veikos 980 nm bangos ilgio diodinį lazerį, kuris buvo naudojamas bandinių sužadinimui.

Visi spektriniai matavimai atlikti 1 cm optinio kelio polistireninėse kiuvetėse. FL spektrai buvo koreguojami pagal korekcijos failą, gautą iš volframo kaitrinės lempos, sertifikuotos Nacionalinės fizikos laboratorijos, JK.

2.5.2. Kinetinės spektroskopijos matavimai

Aukso nanoklasterių fotoluminescencijos gesimo kinetikos taip pat matuotos spektrofotometru *Edinburgh Instruments FLS920* pritaikant laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo metodiką. Šių matavimų metu naudotas pavienių fotonų fotodaugintuvas (S900-R) (*Hamamatsu*, Japonija) ir impulsinis diodinis lazeris ($\lambda_{\text{zad}} = 405\text{ nm}$, impulsų trukmė – $<200\text{ ps}$, impulsų dažnis – 100 kHz).

Matavimai atlikti trijose skirtingose terpėse: dejonizuotame vandenyje (deH_2O), fosfato buferiniame druskos tirpale (PBS) (*Gibco*, JAV) bei *Dulbecco* modifikuotoje *Eagle* terpėje (DMEM) (*Gibco*, JAV), papildytoje 10 % (v/v) fetaliniu jaučio serumu (FBS) (*Gibco*, JAV), bei 1 % (10000 U/mL/ 10000 $\mu\text{g/mL}$) penicilino/streptomicino (*Biochrom*, Vokietija). FL gesimo kinetikos registruotos ties 685 nm juosta. Matavimai atlikti iškart po tirpalų pagaminimo, praėjus 1 savaitei ir 2 savaitėms. FL gesimo kinetikų metu nustatomos FL gyvavimo trukmės τ . Tai yra laikas, per kurį fluorescencijos intensyvumas nuo maksimalios vertės sumažėja dydžiu e. Kinetikų analizė atlikta su *FAST* programine įranga (*Edinburgh Instruments*, JK). Vidutinė bandinių sužadintos būsenos gyvavimo trukmė apskaičiuota pagal 2 formulę (Lakowicz, 2006):

$$\langle \tau_{\text{vid}} \rangle = \frac{\sum_i B_i \tau_i^2}{\sum_i B_i \tau_i} \quad (2)$$

čia τ_i – vidutinė gyvavimo trukmė kiekvienai iš komponentių, B_i – komponentių amplitudė pradinio laiko momentu ($t = 0$), i – komponentės numeris.

2.5.3. MN-AuNK fotostabilumo įvertinimas

MN-AuNK fotostabilumas buvo matuojamas švitinant 2 mL tirpalo plastikinėse kiuvetėse (apšviečiamas plotas – 1 cm^2) ksenono šviesos šaltiniu

Max-302 (Asahi Spectra Co., Ltd, Japonija). Švitinimui buvo naudojami 402 nm, 470 nm ir 630 nm bangos ilgiai. Bendra 40 J/cm² apšvitos dozė buvo pasiekta per penkis švitinimo kartus, atitinkamai surenkant 1 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm², 10 J/cm² ir 20 J/cm² švitinimo dozes. Švitinimo laikas buvo skaičiuojamas pagal šviesos šaltinio galią. Surinkus 40 J/cm², mėginiai buvo perkelti į nuo šviesos apsaugotą, tamsią dėžutę ir laikomi 24 valandas. Rezultatai pateikiami kaip MN-AuNK fotoluminescencijos spektro maksimumo intensyvumo kitimas ($\lambda_{\text{zad}} = 488 \text{ nm}$).

2.5.4. Fotoluminescencijos kvantinio našumo nustatymas

FL kvantinis našumas (KN) buvo nustatomas palyginamuoju metodu, pasitelkiant literatūroje aprašytą fluoroforą rodaminą 6G (R6G) (*Merck Group, Vokietija*), kurio kvantinis našumas gerai žinomas ir siekia 95 % (Lakowicz, 2006). Pirmajame šio metodo žingsnyje išmatuojami paruoštų R6G ir MN-AuNK tirpalų sugerties spektrai. Randamas taškas (bangos ilgis), kuriame susikerta sugerties spektrai. Pasirinktas tolimesniems tyrimams bangos ilgis buvo 513 nm. Toliau naudojant šio bangos ilgio žadinančią spinduliuotę, užregistruojami FL spektrai. Jie suintegruojami, taip apskaičiuojamas jų intensyvumas (spektro plotas), kuris vėliau panaudojamas kvantiniam našumui apskaičiuoti pagal 3 formulę:

$$\varphi = \varphi_f \frac{I}{I_f} \cdot \frac{A_f}{A} \cdot \frac{n^2}{n_f^2} \quad (3)$$

čia φ – kvantinis našumas, I – integruotas FL intensyvumas, A – optinis tankis, n – tirpiklio lūžio rodiklis ir f – žinomo kvantinio našumo fluoroforo žymėjimas.

Kadangi tiek R6G, tiek MN-AuNK mėginių tirpiklis buvo distiliuotas vanduo ir pasirenkamas bangos ilgis, kuriame optinis tankis vienodas, 3 formulės išraiška suprastinama iki 4 formulės, pagal kurią ir yra apskaičiuojamas aukso nanoklasterių fotoluminescencijos kvantinis našumas:

$$\varphi = \varphi_f \frac{I}{I_f} \quad (4)$$

2.6. Singuletinio deguonies generacijos registravimas

Šiuo metu vienas iš dažniausiai naudojamų metodų registruoti singuletinio deguonies (¹O₂) generaciją yra pagrįstas ¹O₂ cheminiu poveikiu kitoms molekulėms. Šiame metode naudojamos medžiagos, kurios reakcijų su

$^1\text{O}_2$ metu formuoja produktus. Pastarieji skiriasi savo savybėmis nuo pradinių $^1\text{O}_2$ indikacijai naudojamų medžiagų savybių.

Singuletinio deguonies generacijos registravimui buvo naudojamas fluorescencinis $^1\text{O}_2$ indikatorius, vadinamas SOSG (*angl. Singlet Oxygen Sensor Green*) (*ThermoFisher*, JAV). Tai singuletinio deguonies žymeklis, sudarytas iš dviejų tarpusavyje sujungtų dalių, iš kurių viena gali reaguoti su $^1\text{O}_2$, o kita – fluorescuojantis chromoforas. Prieš reaguojant su $^1\text{O}_2$, chromoforo fluorescencija molekulėje yra gesinama elektronų pernašos iš $^1\text{O}_2$ pagaunančios dalies į fluorescuojančią dalį. Kuomet molekulė sureaguoja su $^1\text{O}_2$, susidaro produktas, kuris nulemia, kad elektrono pernaša virsta energetiškai nebenaudingu procesu, todėl chromoforas ima laisvai fluorescuoti – stebimas SOSG fluorescencijos intensyvumo padidėjimas.

$^1\text{O}_2$ registravimo eksperimentų metu buvo parengiami bandiniai, į kuriuos visus papildomai buvo įdedama 1 μM paruošto SOSG tirpalo. Pastarasis ruošiamas ištirpinant SOSG metanolyje (33 μL), o po to praskiedžiant dejonizuotu vandeniu, kad būtų paruoštas pradinis tirpalas (50 μM). Bandinyje su nanodalelėmis buvo 2,55 mg/mL MN-AuNK. Taip pat paruošti 1 μM chlorino e6 (Ce6) mėginiai, norint palyginti $^1\text{O}_2$ generaciją nanodalelių tirpale ir generaciją su žinomu fotosensibilizatoriumi. Pagaminti du Ce6 mėginiai – vienas buvo švitinamas 402 nm spinduliuote 10 min, kol surenkama 40 J/cm² apšvitos dozė, kitas laikomas tamsoje. Vienas nanodalelių tirpalų bandinys taip pat laikomas tamsoje, kiti švitinami 402 nm, 470 nm arba 630 nm bangos ilgio šviesa iš MAX-302 ksenono lempos (*Asahi Spectra Co., Ltd*, Japonija). Bendra 40 J/cm² švitinimo dozė buvo pasiekta per penkis švitinimo seansus, atitinkamai surenkant 1 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm², 10 J/cm² ir 20 J/cm² švitinimo dozes. Švitinimo laikas buvo skaičiuojamas pagal šviesos šaltinio galią atitinkamam bangos ilgiui.

Tiek po bandinių pagaminimo, tiek tarp švitinimo intervalų buvo registruojami SOSG fluorescencijos spektrai su spektrofotometru *Edinburgh Instruments FLS920*, žadinant 485 nm spinduliuote. Analizuojant rezultatus vertinamas santykinis SOSG fluorescencijos intensyvumo ties spektro maksimumu ($\lambda_{\text{fluor}} = 525 \text{ nm}$) pokytis nuo pradinio intensyvumo ir jis vėliau atvaizduojamas grafiškai.

2.7. Magnetinių savybių charakterizavimas

2.7.1. MN-AuNK magnetinės savybės

MRT vaizdinimas ir MN-AuNK magnetinių savybių charakterizavimas buvo atliktas naudojant klinikinį 1,5 T magnetinio rezonanso tomografą

(*Philips Achieva*). 2 mL plastikiniai *Eppendorf* mėgintuvėliai buvo užpildyti skirtingomis nanodalelėmis ir fiksuoti stabiliaame laikiklyje, nesuteikiančiame MRT kontrasto. Paruoštų mėginių koncentracija su magnetinėmis Fe_3O_4 nanodalelėmis koncentracija buvo 0,2 mg/mL. Kontroliniam palyginimui vaizdinimo lauke buvo pridėtas mėgintuvėlis su žinomos koncentracijos (0,12 mg/mL Gd) klinikinio MRT kontrasto *Magnegita* tirpalu. Siekiant užtikrinti vienodą magnetinio lauko pasiskirstymą, mėgintuvėliai buvo panardinti į vandenį. MRT vaizdams gauti buvo naudojama turbo sukinių aidų inversijos atkūrimo seka, pagal kurią įvertinome išilginės relaksacijos trukmę T1. Savo ruožtu, skersinės relaksacijos trukmė T2 buvo apskaičiuota naudojant turbo sukinių aidų seka, atskiriančią specifiskai T2 trukmes.

2.7.2. AKND@ γ - Fe_2O_3 magnetometrijos matavimai

Įmagnetėjimo M kitimas, kaip temperatūros T ir magnetinio lauko H funkcija, buvo išmatuotas kietoje būsenoje, naudojant *MPMS-5S SQUID* magnetometrą (*Quantum Design*, San Diegas, JAV). 20 mg džiovintų miltelių buvo šiek tiek suspausti plastikiniame mėgintuvėlyje, kad matavimų metu jie nejudėtų. Nuolatinės srovės įmagnetėjimas buvo užfiksuotas atsižvelgiant į temperatūrą $M(T)$, esant 500 Oe nuolatinės srovės magnetiniam laukui, veikiant ZFC (*angl. zero-field cooling*) ir FC (*angl. field cooling*) sąlygomis, nuo 5 K iki 330 K. Įmagnetėjimas taip pat buvo užregistruotas ir pagal magnetinio lauko stiprumo kitimą $M(H)$ esant 310 K (37 °C) temperatūrai ir keičiant magnetinio lauko stiprį nuo -70 iki 70 kOe.

2.7.3. AKND@ γ - Fe_2O_3 magnetinė relaksometrija

Relaksometrija buvo atlikta su šviežiai paruoštais ir dejonizuotame vandenyje disperguotais bandiniais, kurių [Fe] ir/arba [Er] koncentracija svyruoja nuo 25 μM iki 2,5 mM. Bandinius sudarė 2 mL tirpalo su $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{@}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (5,6 mg/mL) arba $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]$ (5,2 mg/mL) nanodalelėmis, padengtomis citratu. Į branduolinio magnetinio rezonanso vamzdelį (7,5 mm išorinis skersmuo) buvo įpilama 350 μL kiekvieno tirpalo (pradinio ir atskiesto). Tada vamzdeliai buvo įdedami į *Minispec mq60* relaksometrą (*Bruker*, Rheinstetten, Vokietija), turintį 60 MHz/1,41 T magnetą. T1 ir T2 relaksacijos laikai buvo užfiksuoti kaip bendros metalo koncentracijos [Er] + [Fe] funkcija, esant 310 K temperatūrai. T2 relaksacijos laikas buvo matuojamas pagal Carr-Purcell-Meiboom-Gill seką, naudojant atsako laiką (TE, *angl. time to echo*) nuo 0,04 ms iki 0,5 ms (paprastai T2/50) ir įvertinamas pagal monoeksponentinę 1500 arba 3000

duomenų taškų gesimo aproksimaciją. Perdirbimo delsa (RD, *angl. recycling delay*) buvo tikslinama pagal 5 kartus didesnę už pradinę T1 vertę, išmatuotą inversijos atkūrimo (IR) seka, kurios relaksacija buvo apskaičiuota iš monoeksponentinės 15 duomenų taškų aproksimacijos. Pirmasis atsako laikas (TE) buvo maždaug 100 kartų mažesnis už T1, o galutinė trukmė – bent apie 3 kartus T1 vertės. Šie parametrai (TE, RD ir stiprintuvo stiprinimas) buvo koreguojami tol, kol T2 ir T1 vertės buvo išmatuotos su mažu neapibrėžtumu, paprastai 0,1 %, kiekvienai geležies koncentracijai (iš viso keturios vertės).

2.8. Šviesaus lauko ir spektrinės konfokalinės mikroskopijos tyrimai

TPPS₄ agregatų morfologinėms charakteristikoms vizualizuoti buvo naudojama šviesaus lauko ir diferencinio interferencijos kontrasto (DIC) mikroskopija. Vaizdai buvo registruojami naudojant 20x/SA 0,5 arba 40x/SA 0,95 objektyvus (*Plan Fluor, Nikon*, Japonija) ir CCD kamerą (*Nikon DS-Fi2*). GJE agregatų pavyzdžiai buvo analizuojami konfokaliniu lazeriniu skenuojančiu mikroskopu (*Nikon Eclipse TE2000-U, CI plus, Nikon*, Japonija), turinčiu integruotą spektrofotometrą (*QE65000 Ocean Optics, Inc.*, JK). Pralaidumo ir konfokalinės fluorescencijos vaizdai fiksuoti naudojant 404 nm diodinį arba 488 nm argono jonų lazerį. Fluorescencijai detektuoti buvo pasirinktas 688/134 nm juostos pralaidumo filtras (*Semrock Inc.*, JAV). Vaizdų gavimas buvo kontroliuojamas su *Nikon EZ-CI* programine įranga. Vaizdai buvo toliau apdoroti naudojant *EZ-CI v3.91 (Nikon, Japonija)* ir *ImageJ v1.53a* programinę įrangą (*NIH, JAV*) (Schneider et al., 2012).

2.9. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopijos matavimai

Fluorescencijos gyvavimo trukmės mikroskopijos (FLIM) vaizdai buvo gauti naudojant gyvavimo trukmės ir fluorescencijos koreliacijos spektroskopijos priedą (įrangą), skirtą *Nikon CIsi (PicoQuant GmbH, Berlynas, Vokietija)* konfokaliam mikroskopui. Sužadinimui pasirinktas *Fianium WhiteLase Micro* superkontinuumo lazeris (*NKT Photonics, Birkerød, Danija*), kurio impulsų pasikartojimo dažnis – 30 MHz. Spektriniai diapazonai buvo parinkti iš superkontinuumo, naudojant 420/10 nm ir 490/10 nm juostos pralaidumo filtras (*Thorlabs Inc.*, Niutonas, Naujasis Džersis, JAV) atitinkamai sužadinti TPPS₄ H ir J agregatus. Fluorescencijos fotonai, praėję per 620 nm ilgo pralaidumo filtrą (*Thorlabs Inc.*), buvo registruojami naudojant pavienių fotonų skaičiavimo griūties fotodiodą (*angl. single-photon counting avalanche photodiode*) (*Micro Photon Devices, Bolzanas, Italija*) ir suskaičiuoti su laike koreliuotu pavienių fotonų

detektoriumi *PicoHarp 300* (*PicoQuant GmbH*). Registruojant kiekvieną gyvavimo trukmės mikroskopijos vaizdą buvo surenkama vidutiniškai 500 įvykių per pikselį, o vaizdo dydis buvo fiksuotas ties 512×512 pikselių. FLIM vaizdai buvo atkuriami ir redaguojami su *SymPhoTime 64* programine įranga (*PicoQuant GmbH*). Šios programinės įrangos pagalba kiekviename pikselyje galima nustatyti TPPS₄ agregatų vidutinę fluorescencijos gyvavimo trukmę. Fluorescencijos gyvavimo trukmės grafikai buvo nubraižyti naudojant *SymPhoTime 64* v.2.4.4874 programinę įrangą (*PicoQuant GmbH*).

2.10. Fluorescencija detektuoto linijinio dichroizmo analizė

Fluorescencija detektuoto linijinio dichroizmo (FDLD) vaizdinimas buvo atliekamas naudojant DP-RCM (Steinbach et al., 2019). Pakartotinio skenavimo konfokalinis mikroskopas (Luca et al., 2013) (RCM, *Confocal.nl*, Nyderlandai) buvo prijungtas prie invertuoto *Nikon Eclipse Ti* fluorescencinio mikroskopo (*Nikon Instruments Inc.*, Japonija). Žadinimo lazerio (Cobolt 30 mW 488 nm diodinis lazeris, 0488-06-03-0030-200, *Cobolt AG*, Švedija) spinduliuotė buvo moduluojama skystųjų kristalų (LCC1115-A, *Thorlabs*, Vokietija), kad būtų galima generuoti vertikaliai ir horizontaliai poliarizuotą šviesą vėlesniems vaizdams. Vaizdinimo metu buvo naudojamas 40x/SA 0,60 oro objektyvas. Fluorescencija buvo parinkta keturių juostų dichroiniu ir emisijos filtrais (atitinkamai ZT405/488/561/640rpc ir ZET405/488/561/640m; *Chroma Technology Corp.*, JAV). Vaizdai registruoti sCMOS kamera (*Andor Zyla 4.2 PLUS*, *Oxford Instruments*, JK) naudojant *NIS-Elements BR* programinę įrangą (versija: 4.60.00, *Nikon Instruments Inc.*, Japonija) ir apdoroti pagal specialią *Matlab* programą (Steinbach et al., 2019).

2.11. Multimodalinės antrosios ir trečiosios harmonikų generacijos mikroskopijos matavimai

Antrosios ir trečiosios harmonikų generacijos vaizdai gauti su sukonstruotu lazeriniu skenuojančiu mikroskopu, sujungtu su kietojo kūno femtosekundiniu osciliatoriumi (*Light Conversion FLINT*, *Light Conversion*, Vilnius, Lietuva), 76 MHz dažniu skleidžiančiu sub-100 fs impulsus su 1030 nm centriniu bangos ilgiu. Sužadinimo spindulys ties sužadinimo objektyvo įėjimu (*Nikon CFI Plan Apo Lambda 20x/SA 0,75*) buvo tiesiškai poliarizuotas 45° kampu horizontalios vaizdų ašies atžvilgiu. Harmonikų signalas buvo surinktas naudojant plokščiai išgaubtą viengubą lęšį, kurio efektyvioji skaitinė apertūra (SA) yra 0,5. SHG ir THG signalai buvo atskirti

dichroiniu veidrodžiu (DMLP505R, *Thorlabs*) ir prieš pasiekiant fotonų skaičiavimo PMT detektorių (*Hamamatsu* H10682-210682) buvo filtruojami su FBH520/40, FGB39 ir FGUV11 (visi iš *Thorlabs*) filtrų deriniu. Mėginys buvo perkeltas apie ašį Z kryptimi, naudojant nuolatinės srovės (DC-servo) staliuką (ASI LS-50). Lazerinis skenavimas, mėginio žingsniavimas ašine kryptimi ir duomenų rinkimas buvo atliktas *LabView* (*National Instruments Corporation*, Ostinas, Teksasas, JAV). Vaizdai, kurių lauko dydis yra 780 μm , buvo nuskaityti 1 μm pikselių skiriamąja geba esant 20 μs trukmei, Z ašies rekonstrukciniai kadrai buvo užregistruoti 5 μm žingsniu 210 μm diapazone. Duomenų analizė ir 3D atvaizdavimas buvo atliktas naudojant *Python* ir *Fiji* (Schindelin et al., 2012).

2.12. Ląstelių kultivavimas ir inkubavimas nanodalelėmis

Tiriamų nanodalelių biosuderinamumo ląstelėse tyrimams naudotos trijų tipų ląstelės: žmogaus krūties adenokarcinomos ląstelių linijos MCF-7 ir MDA-MB-231 ir imortalizuotos pelių embrioninių fibroblastų ląstelių linija NIH-3T3. *In vitro* eksperimentams visos ląstelių linijos buvo kultivuojamos flakonėliuose, pripildytuose DMEM ląstelių mitybinės terpės, papildytos 10 % (v/v) FBS, 1 % (10000 U/mL / 10000 $\mu\text{g/mL}$) penicilino/streptomicino. Ląstelės auginamos inkubatorijoje, kuriame palaikoma 37 °C temperatūra, esant 5 % CO_2 prisotinimui (v/v).

MN-AuNK kaupimosi ląstelėse vaizdinimo mikroskopu eksperimentams visų linijų ląstelės buvo pasėtos į 8-ių šulinėlių mikroskopavimo plokštelę (po 30 000 ląst./šul.) ir paaugintos įprastomis kultivavimo sąlygomis. Tuomet į jų augimo terpę papildomai įdedama 2,55 mg/mL MN-AuNK ir inkubuojama 24 h. Po inkubacijos terpė su nanodalelėmis buvo nusiurbama ir pakeičiama 10 $\mu\text{g/mL}$ branduolių dažo *Hoechst* 33258 tirpalu. Po 15–20 min tirpalas nusiurbiamas ir pakeičiamas nauja terpe, kad ląstelės lazeriniu skenuojančiu mikroskopu galėtų būti vaizdinamos gyvos.

AKND@ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ atveju eksperimentai buvo atliekami pagal analogišką protokolą, bet dirbama tik su MDA-MB-231 ir NIH-3T3 ląstelių linijomis. Į ląstelių augimo terpę buvo pridedama 0,1 mg/mL $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ @ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodalelių. Prieš ląstelių vaizdinimą lazeriniu konfokalinio mikroskopu ląstelių branduoliai buvo dažomi branduolių dažu *Hoechst* 33258, o aktino gijos – su 165 nM *Alexa Fluor*TM 488 *Phalloidin* dažu (*ThermoFisher Scientific*, JAV). Galiausiai, ląstelės užfiksuojamos su 4 % paraformaldehido tirpalu (*Sigma-Aldrich*, JAV).

2.13. Ląstelių vaizdinimas fluorescenciniu konfokaliniu mikroskopu

Siekiant pamatyti magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, arba apkonvertuojančių nanodalelių susikaupimą ląstelėse jos buvo vaizdinamos *Nikon TE-2000U* mikroskopu (*Nikon*, Japonija) su C1si lazerine skenuojančia konfokaline sistema. Vaizdinimui naudotas imersinis (alyvos) x60 didinimo ir 1,4 skaitinės apertūros objektyvas Plan Apo VC (*Nikon*, Japonija). MN-AuNK fotoluminescencija buvo žadinama 488 nm bangos ilgio argono jonų lazeriu, o AKND@ γ -Fe₂O₃ emisija – diodiniu 980 nm bangos ilgio lazeriu (*Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd.*, Kinija). *Hoechst 33258* branduolių dažo FL žadinama 404 nm diodiniu lazeriu (*Roithner*, Austrija), o *Alexa Fluor™ 488 Phalloidin* dažas citoskeletui – 488 nm bangos ilgio lazeriu. Fotoluminescencijai registruoti naudotas trijų kanalų RGB detektorius su 450/17 nm, 545/45 nm ir 688/67 nm juostiniais filtrais atitinkamai mėlynam, žaliai ir raudonam kanalams.

Branduolių dažo fluorescencija buvo registruota mėlyname 450/17 nm kanale, citoskeleto aktino gijų dažo – žaliame 545/45 nm kanale, o magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais – raudoname 688/67 nm kanale. Atskiro skenavimo metu apkonvertuojančių nanodalelių emisija buvo irgi užregistruota žaliame (545/45 nm) kanale. Siekiant lengviau atskirti vaizdus ir išvengti persidengimo su *Alexa Fluor™ 488 Phalloidin* fluorescencija, AKND@ γ -Fe₂O₃ emisijai atvaizduoti panaudota raudona pseudo spalva.

Tam, jog būtų išvengta signalų patekimo į gretimus detektorius, buvo naudojama *Frame Lambda* funkcija, kuri reikalinga, kad vienu metu būtų įjungtas tik vienas pasirinktas lazeris ir vienas norimas detektorius. Kiti lazeriai ir detektoriai matavimo metu yra išjungti, tad pašaliniai fluoroforai nesužadinami arba į kanalus nukreipta pašalinė emisija nėra registruojama. Vaizdų apdorojimui naudota *Nikon EZ-C1* programinė įranga.

Papildomai konfokalinės mikroskopijos metu vaizdinti trimačiai MN-AuNK susikaupimo ląstelėse vaizdai (*angl. Z-stack*). 3D vaizdas išgaunamas registruojant bandinio vaizdus skirtingose z ašies plokštumose. Surenkama daug bandinio z ašies pjūvių ir tuomet programiškai padaromas rekonstrukcinis ląstelių, inkubuotų su nanodalelėmis, 3D vaizdas.

2.14. Magnetinių γ -Fe₂O₃ nanodalelių vizualizavimas ląstelėse

Geležies vizualizacijai buvo naudojamas *Prūsijos mėlio* ląstelių dažymo reagentų paketas (*Sigma-Aldrich*). Jį sudaro du reagentai: druskos rūgštis ir kalio ferocianidas. Vienodi kiekiai abiejų reagentų buvo sumaišyti ir įpilami į kiekvieną šulinėlį su ląstelėmis. Fiksuotos ląstelės buvo apdorotos darbinio

tirpalu 15 min. Reakcijos metu bet kuris ląstelėse esantis geležies jonas susijungia su ferocianidu ir susidaro ryškiai mėlynas pigmentas, vadinamas *Prūsijos mėliu* arba geležies ferocianidu. Tada darbinis tirpalas buvo išsiurbtas ir fiksuotos ląstelės plaunamos PBS. Nanodalelių kaupimasis ląstelėse buvo stebimas naudojant *Nikon Eclipse TE2000-U* (*Nikon*, Tokijas, Japonija) šviesaus lauko mikroskopą su skaitmenine spalvota kamera *Leica DFC290*. Norėdami geriau suprasti ląstelių struktūrą, taip pat naudojome DIC mikroskopiją.

2.15. Ląstelių gyvybingumo tyrimas

XTT ląstelių gyvybingumo testas yra netiesioginis būdas ląstelių gyvybingumui nustatyti. Tai kolorimetrinis metodas, kurio metu yra išmatuojamas ląstelių mitochondrijų aktyvumas. Gyvybingų ląstelių mitochondrijos sintetina fermentus, vadinamus mitochondrinėmis dehidrogenazėmis. XTT rinkinio sudėtyje esanti tetrazolio druska yra bespalvis vandenyje tirpus junginys, kuris redukuotas mitochondrinės dehidrogenazės tampa ryškiai oranžiniu formazanu. Formazanas yra tirpus vandenyje, todėl išmatavę ląstelių mitybinės terpės optinį tankį galime nustatyti, kur yra daugiau gyvų ląstelių, o kur mažiau.

Atliekant XTT ląstelių gyvybingumo testą, MCF-7 ir MDA-MB-231 krūties adenokarcinomos ląstelės bei embrioniniai pelių fibroblastai NIH-3T3 buvo sėjami į 96 šulinėlių plokštelę (*BD Falcon*, JAV) po 15 000–20 000 ląstelių viename šulinėlyje. Ląstelės buvo suspenduotos 150 μ L mitybinės terpės. Į vieną iš šulinėlių buvo įpilta tik mitybinės terpės, be ląstelių, tam, kad vėliau būtų galima pamatuoti terpės optinį tankį. Po 24 h nuo ląstelių buvo nusiurbta mitybinė terpė ir užpilta 150 μ L naujos mitybinės terpės su skirtinga nanodalelių koncentracija. XTT gyvybingumo testai su skirtingo tipo nanodalelėmis buvo atliekami nepriklausomai, tad juos reikėtų traktuoti kaip atskirus tyrimus.

Eksperimentuose su magnetinėmis nanodalelėmis, dekoruotomis aukso nanoklasteriais, pradinis tirpalas (25,5 mg/mL) buvo skiedžiamas 10, 20, 50 ir 100 kartų. Gyvybingumo tyrimuose su apkonvertuojančiomis nanodalelėmis pakeičiamoje ląstelių mitybinėje terpėje nanodalelių koncentracija buvo 0,05 mg/mL arba 0,1 mg/mL (pagaminta iš 1 mg/mL pradinio tirpalo, praskiesto atitinkamai 10 ir 20 kartų).

Į kontrolinius šulinėlius įpilta tik po 150 μ L mitybinės terpės, neturinčios nanodalelių. Ląstelės buvo inkubuojamos 24 h. Po inkubacijos terpė su nanodalelėmis buvo nusiurbta. Terpės likučiai pašalinti ląsteles plaunant su DPBS. Po to į kiekvieną šulinėlį buvo įpilta po 100 μ L naujos mitybinės terpės

ir po 50 µL XTT reakcijos tirpalo. Tam, kad būtų paruošta pakankamai XTT reakcijos tirpalo visai plokštei (96 šulinėliams), XTT reagentas (*Biological Industries*, Izraelis) ir aktyvacijos reagentas (*Biological Industries*, Izraelis) buvo sumaišyti santykiu 50:1. Ląstelės su užpildytu XTT reakcijos tirpalu 4 h buvo laikomos inkubatoriuje. Vėliau buvo matuojamas terpės, esančios šulinėliuose, optinis tankis ties 490 nm. Matavimai buvo atlikti su mikroplokštelių skaitytuvu (*BioTek*, JAV). Suskaičiuotas kiekvienos šulinėlių grupės optinio tankio vidurkis, kuris vėliau perskaičiuotas į procentus pagal 5 formulę:

$$\text{ląstelių gyvybingumas} = \frac{\text{tiriamos šulinėlių grupės optinio tankio vidurkis}}{\text{kontrolinių šulinėlių optinio tankio vidurkis}} \cdot 100 \% \quad (5)$$

Gyvybingumo rezultatų vidurkis buvo skaičiuojamas iš 6 eksperimentų. Duomenys išreiškiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis (SD). Skirtumų tarp tiriamų grupių statistinis reikšmingumas buvo įvertintas naudojant porinį nepriklausomą Stjudento t-testą 95 % pasikliovimo lygiu. Statistinio reikšmingumo lygis buvo išreikštas p-reikšmėmis $< 0,05$.

2.16. Fotosensibilizacinio poveikio įvertinimas

Fotosensibilizuotos navikų terapijos (FNT) efektyvumas naudojant magnetines nanodaleles, dekoruotas aukso nanoklasteriais, tirtas ląstelių monosluoksniuose. Siekiant ištirti FNT efektyvumą ląstelių monosluoksniuose, MDA-MB-231 ir MCF-7 linijų ląstelės buvo užsėjamos į 8 šulinėlių plokšteles, turinčias borosilikatinio stiklo dugną (*Lab-Tek*, JAV). Į vieną šulinėlį buvo užsėjama po 30 000 ląstelių. Praėjus 24 h nuo ląstelių buvo nusiurbiamą mitybinę terpę ir pakeičiama nauja mitybine terpe, papildyta su 2,55 mg/mL MN-AuNK arba 1 µM fotosensibilizatoriaus chlorino e6. Į kontrolinius šulinėlius nieko papildomai nededama, bet atliekamos tos pačios manipuliacijos kaip ir su tiriamaisiais bandiniais. Ląstelės laikomos inkubatoriuje 24 h. Kitą dieną ląstelės buvo švitinamos 402 nm bangos ilgio spinduliuote arba paliekamos nešvitintos (nešvitinti šulinėliai kiekvienam iš atvejų – kontrolė, ląstelės su ND ir ląstelės su Ce6). Naudotam bangos ilgiui buvo išmatuojamas spinduliuotės galios tankis ir šulinėliai švitinami, kol sukaupiama 80 J/cm² dozė. Po švitinimo plokštelės su ląstelėmis dedamos atgal į inkubatorių ir ten laikomos per naktį. Kitą dieną ląstelės nudažomos gyvybingumo dažais, kurių komercinis pavadinimas – „LIVE/DEAD“ (*ThermoFisher*, JAV). Rinkinį sudaro du dažai: kalceinas-AM, dažantis tik gyvas ląsteles, ir etidžio homodimeras-1, kuris dažo negyvas ląsteles. Nudažytos ląstelės buvo vaizdinamos *Nikon Eclipse* konfokaliniu mikroskopu. Naudotas 20x/0,5 SA sausas objektyvas (*Nikon*, Japonija),

kalceinas žadintas 488 nm lazerio spinduliuote ir jo fluorescencija registruota žaliame kanale, etidžio homodimeras-1 žadintas 543 nm lazerio spinduliuote ir fluorescencija registruota raudoname kanale.

3. REZULTATAI IR JŲ APITARIMAS

Šioje disertacijos dalyje bus pateikiami ir aptariami rezultatai apie skirtingas dvigubo vaizdinimo nanomedžiagas: magnetines nanodaleles, dekoruotas fotoluminescuojančiais aukso nanoklasteriais, ir apkonvertuojančias nanodaleles, padengtas maghemito ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanokristalais. Šios nanodalelės buvo tiriamos dėl jų potencialaus pritaikymo optinės diagnostikos ir magnetinio rezonanso vaizdinime. Trečioji grupė medžiagų – mezo-tetra(4–sulfonatofenil) porfino (TPPS₄) agregatai. Tai modelinė harmonforų sistema, kuri buvo tirama dėl savo unikalaus agregavimo ir potencialo tapti kontrastine medžiaga fluorescencinės diagnostikos bei antrosios ir/arba trečiosios harmonikų generacijos mikroskopijoje. Skirtingų medžiagų rezultatai pateikiami atskiruose poskyriuose.

3.1. Magnetinės nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais

Visų pirma, bus aptariami rezultatai iš tyrimų su magnetinėmis nanodalelėmis, dekoruotomis fotoluminescuojančiais aukso nanoklasteriais (MN-AuNK). Pirmuosius baltymais stabilizuotus aukso nanoklasterius dar 2009 metais su kolegomis susintetino J. Xie (J. Xie et al., 2009). Nors su įvairiais aukso nanoklasteriais atlikta daugybė tyrimų, jų apjungimas su magnetinėmis nanodalelėmis ilgą laiką išliko problematiškas, kadangi magnetinės dalelės yra linkusios gesinti prijungtų medžiagų fluorescenciją (Q. Zhang et al., 2016). Visgi dr. A. Jagmino vadovaujamai mokslininkų grupei iš Nanostruktūrų laboratorijos (FTMC) vienai pirmųjų pasaulyje pavyko susintetinti įvairių magnetinių nanodalelių (CoFe_2O_4 , Fe_3O_4) junginius su aukso nanoklasteriais, neprarandant nei magnetinių, nei fotoluminescencinių tokios nanoplatformos savybių (Mikalauskaite et al., 2022; Pleckaitis et al., 2023). Atliktų tyrimų su šiomis nanodalelėmis rezultatai buvo apibendrinti dvejose publikacijose:

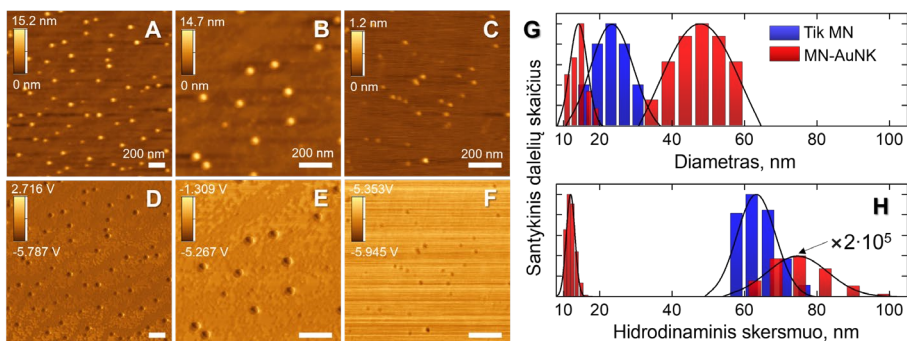
1. Mikalauskaite, A.; **Pleckaitis, M.**; Grinciene, G.; Karabanovas, V.; Jagminas, A. Designing Red-Fluorescent Superparamagnetic Nanoparticles by Conjugation with Gold Clusters. *RSC Advances*, 2022, 12 (54), 35300–35308. <https://doi.org/10.1039/D2RA07242D>

2. **Pleckaitis, M.**; Karabanovas, V.; Butkiene, G.; Venius, J.; Burkanas, M.; Grinciene, G.; Jagminas, A.; Rotomskis, R. Magnetic Nanoparticles Decorated with Gold Nanoclusters–Applications in Cancer Theranostics. *Advanced Materials Interfaces*, 2023, 10 (35), 2300462. <https://doi.org/10.1002/admi.202300462>

Kadangi disertantas atliko didžiąją dalį tyrimų su MN-AuNK, turinčių geležies oksido šerdį, žemiau pateikiami ir apibendrinami eksperimentiniai rezultatai iš 2-osios publikacijos.

3.1.1. MN-AuNK erdvinių savybių charakterizavimas

MN-AuNK erdvinės savybės buvo įvertintos įvairiais metodais. Atomo jėgos mikroskopijos vaizduose (21 pav. A-F) matomos sferinės nanodalelės, kurių dydis siekė apie 50 nm (MN-AuNK), o pavienių magnetinių nanodalelių be aukso nanoklasterių – apie 25 nm (21 pav. G). Rezultatai parodė, kad MN-AuNK tirpalą sudarė dvi skirtingo dydžio nanodalelių populiacijos: mažesnės ir didesnės (21 pav. B, E, G). Mažesniųjų nanodalelių skersmuo buvo apie 10–20 nm, o didesniųjų – apie 35–60 nm (21 pav. G). Panašūs rezultatai gauti ir atliekant dinaminės šviesos sklaidos matavimus. Mažesnių nanodalelių skersmuo buvo 10–15 nm, o didesnių – apie 60–100 nm (21 pav. H). Atskirai išmatuotų magnetinių nanodalelių skersmuo buvo apie 70 nm. Dviejų populiacijų atsiradimą taip pat patvirtina ir polidispersiškumo indeksas, kuris vidutiniškai buvo 0,312. Zeta potencialo matavimų metu nustatyta, kad MN-AuNK yra stabilios, o jų vidutinis paviršiaus krūvis yra $-25 \pm 0,5$ mV.

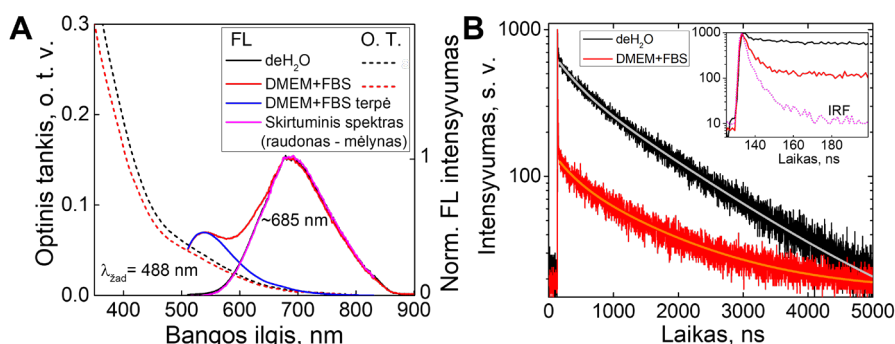


21 pav. MN-AuNK erdvinių savybių charakterizavimas. (A–F) Atomo jėgos mikroskopijos vaizdai, demonstruojantys ant žėručio paviršiaus išdžiovintas magnetines nanodaleles, dekoruotas aukso nanoklasteriais (A, B, D ir E), ir pavienes magnetines nanodaleles (C ir F). Pateikiami aukščio (A–C) ir fazės (D–F) vaizdai. Skalės visiems vaizdams – 200 nm. (G) Nanodalelių dydžio pasiskirstymas, išmatuotas iš AJM vaizdų. (H) Nanodalelių hidrodinaminio skersmens pasiskirstymas, gautas iš dinaminės šviesos sklaidos matavimų. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

3.1.2. MN-AuNK optinės savybės

Magnetinės nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais, pasižymi optinėmis savybėmis. Sugerties spektrai neturėjo išraiškingų smailių matomoje spektro srityje, o MN-AuNK optinis tankis didėjo į trumpabangę

pusę (22 pav. A). Nei dejonizuotame vandenyje, nei biologinę aplinką imituojančioje ląstelių mitybinėje terpėje, praturtintoje fetaliniu jaučio serumu (DMEM+FBS), spektriniai nanodalelių pokyčiai nebuvo stebėti. Žadinant 488 nm bangos ilgiu MN-AuNK dejonizuoto vandens tirpale 500–900 nm srityje pasižymi plačia fotoluminescencijos juosta, kurios maksimumas maždaug ties 685 nm. Mėginiai, paruošti DMEM terpėje, papildytoje FBS, ir žadinti 488 nm bangos ilgiu, turėjo papildomą FL juostą ties 540 nm. Tai galima priskirti DMEM+FBS komponentams, nes pats tirpiklis turėjo fluorescencijos smailę toje pačioje spektro srityje (mėlynas spektras 22 pav. A). Atėmus DMEM+FBS tirpalo FL spektrą iš spektro su nanodalelėmis, paaiškėjo, kad tirpiklis neturėjo įtakos MN-AuNK fotoluminescencijos juostos formai (rožinis spektras 22 pav. A).

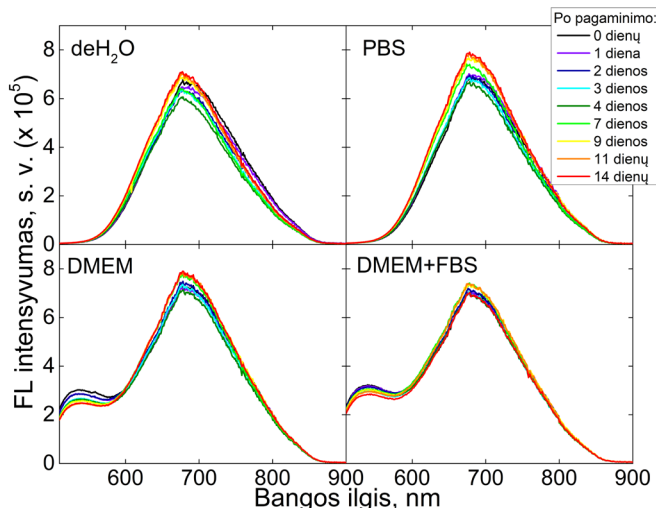


22 pav. Magnetinių nanodalelių, dekoruotų aukso nanoklasteriais, optinės savybės. (A) MN-AuNK būdingi optiniai spektrai dviejuose skirtinguose tirpaluose (dejonizuotas vanduo (deH_2O) – juoda spalva, *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė, papildyta fetaliniu jaučio serumu (DMEM+FBS) – raudona spalva). Punktyrinės linijos žymi optinio tankio spektrus, ištisinės linijos – MN-AuNK fotoluminescenciją. Papildomai mėlyna spalva pateiktas tik DMEM+FBS tirpiklio FL spektras. FL spektrai buvo užregistruoti žadinant 488 nm bangos ilgio šviesa. (B) MN-AuNK fluorescencijos gesimo kreivės po paruošimo deH_2O (juoda kinetika) ir DMEM+FBS (raudona kinetika) ir jų atitinkamos dvieksponentės aproksimacijos (šviesiai pilkos ir oranžinės linijos). Intarpas rodo priartintą sritį nuo 120 ns iki 200 ns. Šviesiai rožinė kinetika reprezentuoja prietaiso atsako funkciją (IRF). Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

Nanodalelių optinį stabilumą stebėjome dvi savaites registruodami jų fotoluminescenciją (deH_2O , PBS, DMEM ir DMEM+FBS terpėse). Reikšmingų pokyčių nei FL signalo intensyvume, nei FL juostų pusplotyje ar pikų pozicijose nepastebėta (23 pav.). Be to, ankstesniame tyrime parodėme, kad magnetinių nanodalelių pridėjimas prie AuNK reikšmingai nepaveikia jų fotoluminescencinių savybių, o tik sumažina jos intensyvumą (Mikalauskaite et al., 2022).

Norint naudoti MN-AuNK biomedicinos srityje, jie turi pasižymėti geru koloidiniu stabilumu, kuris neturėtų keistis eksperimentų metu. Būtent tai ir

parodėme, kad MN-AuNK yra labai tirpūs ir stabilūs. Nors ląstelių auginimo terpės komponentai galėtų turėti įtakos MN-AuNK stabilumui, mūsų rezultatai parodė, kad nei koloidinėse, nei optinėse savybėse reikšmingų pokyčių nebuvo.

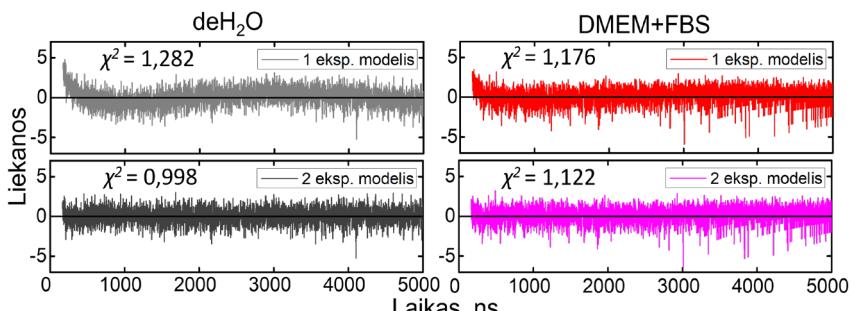


23 pav. MN-AuNK fotoluminescencijos spektrai užregistruoti deH₂O, PBS, DMEM ar DMEM+FBS vandeniniuose tirpaluose 2 savaitių laikotarpiu ($\lambda_{\text{žad}} = 488 \text{ nm}$). Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

Kinetinės spektroskopijos matavimai buvo atlikti naudojant 405 nm impulsinį diodinį lazerį ir jų rezultatai pateikiami 22 paveiksle B. Fotoluminescencijos gesimas buvo registruojamas ties 685 nm bangos ilgio juosta ir apskaičiuojamas taikant dviekspontinį kinetikos uodegos aproksimacijos (*angl. tail-fitting*) modelį. Abiejuose mėginiuose, paruoštuose deH₂O ir DMEM+FBS, buvo identifikuoti du pagrindiniai eksponentiniai komponentai. Greitojo eksponentinio komponento (τ_1) gyvavimo trukmė buvo $\approx 330 \text{ ns}$ ($\approx 300 \text{ ns}$ mėginiui DMEM+FBS tirpiklyje), o ilgojo eksponentinio komponento (τ_2) gyvavimo trukmė buvo $\approx 1450 \text{ ns}$ ($\approx 1405 \text{ ns}$ mėginiui DMEM+FBS tirpiklyje). Pagal juos apskaičiuota vidutinė FL gyvavimo trukmė τ_{vid} buvo $\approx 1355 \text{ ns}$ ($\approx 1324 \text{ ns}$ mėginiui DMEM+FBS terpėje). Gautos ilgai gyvuojančios MN-AuNK sužadintos FL būsenos trukmės sukuria palankias sąlygas laisvųjų radikalų generavimui, pvz., aktyviųjų deguonies formų arba singuletinio deguonies. Aproksimacijų kokybė pavaizduota liekanomis ir χ^2 , kurie dviekspontinės aproksimacijos atveju buvo atitinkamai 0,998 ir 1,122 mėginiams, pagamintiems deH₂O ir DMEM+FBS terpėse (1 lentelė ir 24 pav.).

Abiejų mėginių monoeksponentiniai uodegos aproksimacijos modeliai buvo netikslūs, o triekspontinis MN-AuNK gesimo modelis DMEM+FBS

terpėje rodo, kad reikšmingai geresnio atitikimo nepasiekama (24 pav.), todėl pakanka aproksimacijos dviem eksponentėmis.



24 pav. MN-AuNK, paruoštų dejonizuotame vandenyje (pilki grafikai) ir DMEM+FBS terpėje (raudoni grafikai) fotoluminescencijos gesimo kreivių eksponentinių aproksimacijų liekanos. Liekamosios vertės buvo nubraižytos mono- ir bi eksponentiniams uodegų aproksimacijos modeliams. χ^2 vertės rodo eksponentinių modelių atitikimą. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

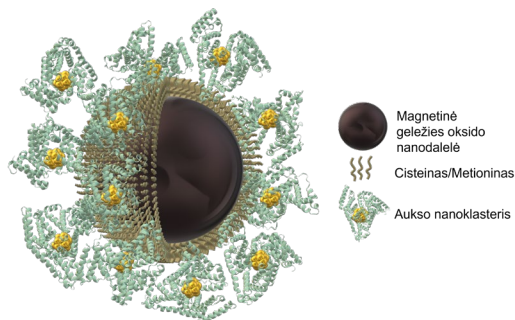
1 lentelė: MN-AuNK fotoluminescencijos gesimo kinetikų eksponentinių aproksimacijų rezultatai.

Tirpiklis	τ_1 , ns	τ_2 , ns	A_1 (sant., %)	A_2 (sant., %)	τ_{vid} , ns	χ^2
deH ₂ O	1174	--	514,41 (100)	--	1174	1,282
	333	1450	169,86 (8,52)	418,51 (91,48)	1355	0,998
DMEM+FBS	1171	--	95,16 (100)	--	1171	1,176
	299	1406	30,07 (7,44)	79,46 (92,56)	1324	1,122

τ_1 , τ_2 yra atitinkamos gyvavimo trukmių komponentės dviejų eksponenčių aproksimacijos modelyje fotoluminescencijos gesimo kinetikoms; A_1 , A_2 yra amplitudės; τ_{vid} yra intensyvumo sąlygota vidutinė gyvavimo trukmė; χ^2 reprezentuoja aproksimacijos parametrų atitikimą.

Yang et al. pademonstravo, kad tauriųjų metalų nanoklasteriai pasižymi su metaline dalimi arba ligandais asocijuojama emisija, kurią galima priskirti atitinkamai trumpesnei FL gyvavimo trukmei nanosekundžių diapazone ir ilgesnei gyvavimo trukmei mikrosekundžių diapazone (T. Yang et al., 2019).

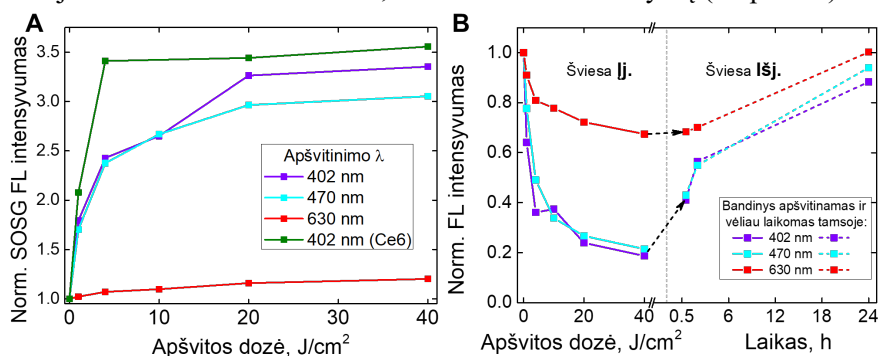
Erdvinių nanodalelių savybių charakterizavimas parodė, kad MN-AuNK skersmuo buvo didesnis nei vien tik magnetinių nanodalelių. Naujausi tyrimai pabrėžia hibridinių magnetinių nanodalelių, padengtų aukso sluoksniu, pažangą (Cândido et al., 2023; Elmi et al., 2022; Tarkistani et al., 2021). Tačiau mūsų atveju magnetinės nanodalelės neturėjo aukso sluoksnio, nes neturėjo plazmonų rezonanso sugerties juostos, būdingos aukso nanodalelėms ar aukso sluoksniams (Amendola et al., 2017). Vietoj to, MN-AuNK skleidė raudoną fotoluminescenciją, o tai leidžia daryti išvadą, kad magnetinės geležies oksido nanodalelės buvo dekoruotos fotoluminescuojančiais aukso nanoklasteriais. Atsižvelgiant į tai pateikiamas MN-AuNK modelis (25 pav.):



25 pav. Pasiūlytas MN-AuNK modelis. Magnetinės geležies oksido nanodalelės yra padengtos aminorūgštimis (cisteinu ir (arba) metioninu) ir dekoruotos aukso nanoklasteriais. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

3.1.3. Singuletinio deguonies generavimo apšvietus MN-AuNK regimąja šviesa tyrimas

Mokslinėje literatūroje teigiama, kad FNT terapinis poveikis labiausiai priklauso nuo aktyviųjų deguonies formų susidarymo (Castano et al., 2006). Ankstesniuose mūsų laboratorijos darbuose parodėme, kad fotoluminescenciniai aukso nanoklasteriai gali generuoti singuletinį deguonį ir kitas aktyviasias deguonies formas, pavyzdžiui, peroksidus (Jarockyte, Poderys, et al., 2022; Poderys et al., 2020). Šiame tyrime buvo vertinta, ar magnetinės nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais, taip pat gali generuoti $^1\text{O}_2$. Singuletinio deguonies susidarymas apšvitinant nanodaleles šviesa buvo įvertintas fluorescenciniu $^1\text{O}_2$ indikatoriumi SOSG (S. Kim et al., 2013). Visuose mėginiuose SOSG fluorescencijos intensyvumas didėjo didėjant surinktos šviesos dozei, o tai rodo $^1\text{O}_2$ susidarymą (26 pav. A).



26 pav. (A) Singuletinio deguonies susidarymo aptikimas naudojant SOSG indikatorius. Mėginiai apšvitinti 402 nm (violetinė ir žalia spalva (chlorinui e6)), 470 nm (žydra) ir 630 nm (raudona) bangos ilgiais surenkant iki 40 J/cm² apšvitinimo dozę. (B) Grįžtamasis MN-AuNK fotoblukimo efektas apšvitinant tais pačiais bangos ilgiais. Bendra sukaupta apšvitos dozė 40 J/cm². Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

Nors apšvitinimas šviesa lėmė singuletinio deguonies formavimąsi, švitinant 630 nm bangos ilgio šviesa, $^1\text{O}_2$ generacijos efektyvumas buvo minimalus. Visgi tai galima paaiškinti tuo, jog MN-AuNK optinis tankis ties šiuo bangos ilgiu taip pat yra reikšmingai mažesnis.

3.1.4. MN-AuNK fotostabilumas

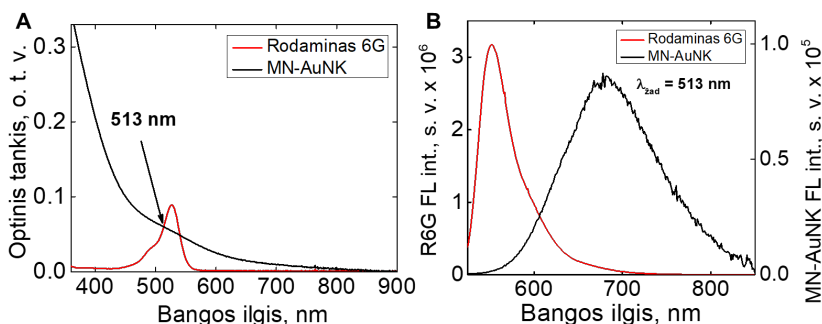
Fotosensibilizuotoje navikų terapijoje šviesos naudojimas yra esminis, todėl būtina ištirti MN-AuNK fotostabilumą. Jis buvo įvertintas apšvitinant įvairius mėginius skirtingais bangos ilgiais (26 pav. B). Norint visiems bangos ilgiams gauti tą pačią suminę apšvitos dozę (40 J/cm^2), apšvitinimo trukmė buvo koreguojama pagal kiekvieno bangos ilgio fluorescencinės lempos galią. Rezultatai rodo, kad MN-AuNK FL intensyvumas sumažėjo daugiau nei perpus po apšvitinimo 405 nm (violetinis grafikas) ir 470 nm (žydras grafikas). Kita vertus, 630 nm šviesa (raudonas grafikas) nesukėlė tokio stipraus fotoblukimo. Įdomu tai, jog po apšvitinimo, laikant tamsoje, MN-AuNK FL signalo intensyvumas visiškai atsistatydavo per maždaug 24 h, o tai rodo, kad MN-AuNK galėtų būti pakartotinai naudojami kaip fotoluminescenciniai žymekliai optinėje biopsijoje.

Šį efektą jau anksčiau pastebėjo su jaučio serumo albuminu stabilizuotais aukso nanoklasteriais dirbusi komanda. Jie efektą pavadino grįžtamuoju fotoblukimu (Hemmateenejad et al., 2016). Savo tyrime autoriai teigė, kad fotoblukimą sukėlė šviesos inicijuojami dviejų skirtingų oksidacinių būsenų Au^0 ir Au^+ santykio pokyčiai. Jie taip pat iškėlė hipotezę, kad fotoblukimas arba spektriniai pokyčiai atsirado dėl su deguonimi susijusių fotoproduktų susidarymo (Hemmateenejad et al., 2016), bet tam patvirtinti reikalingi tolimesni tyrimai.

Remiantis mūsų pastebėjimais, MN-AuNK pasižymi panašiomis savybėmis kaip ir Hemmateenejad et al. naudotos nanodalelės. MN-AuNK demonstruoja ilgai gyvuojančią sužadintą fotoluminescencijos būseną (22 pav. B), kuri sudaro palankias sąlygas aktyviųjų deguonies formų susidarymui. Singuletinis deguonis yra būtinas fotodinaminėje terapijoje (Castano et al., 2006). Ankstesniuose tyrimuose kolegės atskleidė, kad baltymų stabilizuoti aukso nanoklasteriai, apšvitinti regimąja šviesa, gali generuoti singuletinį deguonį ir kitas aktyviasias deguonies formas, tokias kaip peroksidas ir peroksinitritai (Jarockyte, Poderys, et al., 2022; Poderys et al., 2020). MN-AuNK taip pat generuoja singuletinį deguonį, kai yra veikiami regimosios šviesos, ir tai parodėme naudodami SOSG indikatorius (26 pav. A). Todėl mūsų susintetintos magnetinės nanodalelės, dekoruotos aukso nanoklasteriais, galėtų būti naudojamos fotosensibilizuotoje navikų terapijoje.

3.1.5. MN-AuNK fotoluminescencijos kvantinio našumo nustatymas

Optinei diagnostikai dažniausiai naudojami fluorescenciniai žymekliai, pasižymintys dideliu kvantiniu našumu. Dėl šios priežasties naujos kontrastinės medžiagos taip pat turėtų pasižymėti kuo didesniu KN. MN-AuNK fotoluminescencinės dalies santykinis kvantinis našumas buvo įvertintas ir nustatytas lyginamuoju metodu naudojant rodaminą 6G, kurio KN yra apie 95 % (Lakowicz, 2006). KN buvo matuojamas žadinant 513 nm bangos ilgio šviesa, nes esant šiam bangos ilgiui R6G ir MN-AuNK garantuotą tą patį absorbuotų fotonų skaičių (27 pav. A). Pagal metodų dalyje pateikiamą kvantinio našumo formulę apskaičiuotas aukso nanoklasterių FL kvantinis našumas buvo 6,11 %.



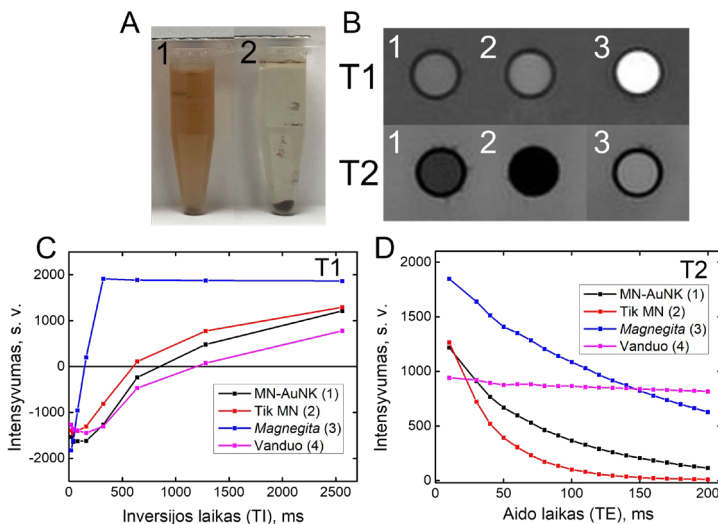
27 pav. MN-AuNK fotoluminescencijos kvantinio našumo įvertinimas naudojant rodaminą 6G. (A) R6G ir MN-AuNK vandeninių tirpalų sugerties spektrai ir susikirtimo taškas ties 513 nm. (B) Rodamino 6G ir MN-AuNK fotoluminescencijos spektrai užregistruoti žadinant 513 nm bangos ilgio šviesa. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

3.1.6. MN-AuNK magnetinės savybės

MN-AuNK pasižymi ne tik optinėmis bet ir magnetinėmis savybėmis. Ištyrėme, ar MN-AuNK efektyviai veikia kaip MRT kontrastinė medžiaga. Susintetintos MN-AuNK buvo pažymėtos Nr. 1, Nr. 2 yra grynos Fe_3O_4 nanodalelės, o Nr. 3 – komerciškai prieinamas gadopenteto rūgšties *Magnegita* kontrastas. MRT magnetinė charakteristika pateikta 28 paveiksle.

Siekiant vizualiai parodyti MN-AuNK kontrasto galimybes, 28 paveiksle B pateikti skirtingų mėginių T1 ir T2 svertiniai MR vaizdai. Kaip atskaitos taškai buvo naudojamos grynos Fe_3O_4 nanodalelės (tik MN) ir *Magnegita* komercinis preparatas. Mėgintuvėliai su bandiniais buvo panardinti į vandenį ir tada matuojamos vandens MR intensyvumo aplink mėgintuvėlius vertės.

Kaip matyti iš T2 svertinių vaizdų (28 pav. B), MN-AuNK (1) ir tik MN (2) duoda didžiausią T2 kontrastą. Magnetinių nanodalelių ir MN-AuNK kontrastas T2 svertiniuose vaizduose yra didesnis nei *Magnegita* tirpalo.



28 pav. (A) MN-AuNK (1) ir Fe₃O₄ (tik MN) (2) vandeninių tirpalų vaizdai. (B) MN-AuNK (1), tik MN (2) ir *Magnegita* (3) T1 ir T2 svertiniai MR vaizdai. T1 vaizdas gautas esant 500 ms TI vertei, o T2 vaizdas gautas esant 120 ms TE vertei. (C) T1 svertinių vaizdų intensyvumas esant įvairiems TI ir (D) T2 svertinių vaizdų intensyvumas esant įvairiems TE. Bandinius supanti terpė yra vanduo. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

Toks rezultatas tikėtinas, nes ir literatūroje pateikiami rezultatai rodo, kad Fe₃O₄ pagrindu pagamintos nanodalelės turi trumpesnę T2 relaksacijos laiką ir yra plačiai naudojamos kaip neigiamo kontrasto žymenys MRT. Kita vertus, Gd pagrindu pagamintos kontrastinės medžiagos (pvz., *Magnegita*) taip pat gali būti naudojamos kaip T2 kontrastinės medžiagos, tačiau esant žymiai trumpesnėms TE vertėms. 28 paveiksle B pateiktas T1 svertinis vaizdas aiškiai rodo, kad tik *Magnegita* turi reikšmingai išsiskiriantį T1 kontrastinės medžiagos intensyvumą, o Fe₃O₄ pagrindo nanodalelės nerodė akivaizdaus intensyvumų skirtumo. Todėl galima daryti išvadą, kad MN-AuNK (1) tirpalas pasižymi MRT kontrastinėmis savybėmis ir gali būti toliau analizuojamas kaip potenciali T2 svertinė vaizdinimo kontrastinė medžiaga.

Grafikuose pateikiami T1 (28 pav. C) ir T2 svertinių (28 pav. D) vaizdų intensyvumai, priklausomai nuo skirtingų TI ir TE laikų po radiodažnio sužadavimo. Esant labai trumpoms TE trukmėms, Gd pagrindu pagamintas tirpalas rodo didžiausius intensyvumo skirtumus nuo vandens (28 pav. D). Esant ilgesnėms TE, intensyvumas sumažėja ir tampa panašus į vandens intensyvumą. Tačiau MN-AuNK arba pavienių MN tirpalų intensyvumai, esant ilgesnėms TE, turi reikšmingą signalo intensyvumo skirtumą ir demonstruoja aiškų potencialą tapti MRT kontrastinėmis medžiagomis. Analizuojant 28 paveikslą C dalį matyti, kad tik Gd pagrindu pagamintas tirpalas turi akivaizdų T1 intensyvumo skirtumą nuo vandens, o Fe₃O₄

pagrindu pagamintos ND, kaip ir tikėtasi, neturi reikšmingo intensyvumo skirtumo nuo vandens. Visų analizuotų medžiagų T1 ir T2 vertės pateiktos 2 lentelėje:

2 lentelė. T1 ir T2 trukmių vertės skirtingiems bandiniams.

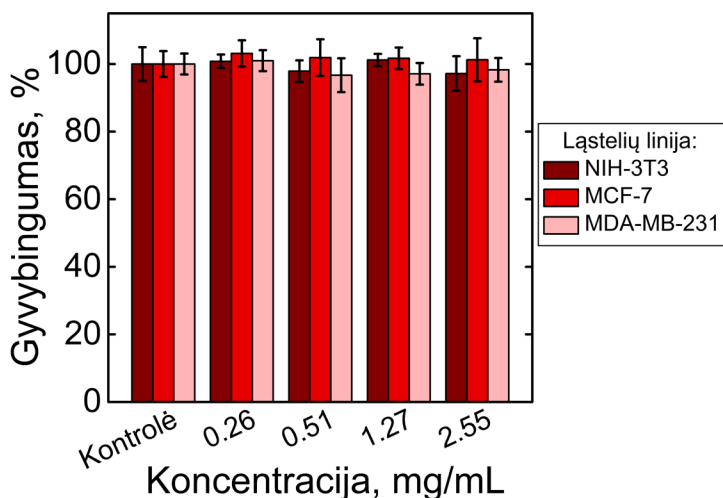
	MN-AuNK	Tik MN	<i>Magnetita</i>	Vanduo
T2, ms	82	35	175	1400
T1, ms	1200	900	160	3000

Svarbu, kad MN-AuNK pasižymi magnetinėmis savybėmis iš magnetinės šerdies ir raudona fotoluminescencija iš aukso nanoklasterių. Tai suteikia potencialą MN-AuNK būti naudojamoms kaip magnetinė kontrastinė medžiaga MRT ir fluorescencinis zondas optinei biopsijai. Įvairių vaizdinimo būdų derinimas turi pranašumą prieš individualius diagnostinius metodus (C. Wang et al., 2019; G. Wang et al., 2015). Nanodalelių fotoluminescencinių ir magnetinių savybių apjungimas stipriai padidina jų panaudojimo galimybes biomedicinos srityje (Hao et al., 2010; Yao et al., 2014).

Pridėjus Au nanoklasterių ir JSA prie Fe_3O_4 nanodalelių, padidėja ND skersmuo ir atstumas tarp Fe jonų ir vandens protonų. Dėl to Fe ir vandens protonų sąveika tampa silpnesnė, tai rodo šiek tiek ilgesnės MN-AuNK T2 vertės, palyginti su vien tik MN. Tai galima patvirtinti ir mažiau intensyviuose MN-AuNK MR vaizduose. Visgi MN-AuNK vis tiek pasižymi pakankamai dideliu kontrastu nuo vandens ir turi potencialą būti naudojami kaip multimodalinės kontrastinės medžiagos arba daugiaviečių nanodalelės.

3.1.7. MN-AuNK biosuderinamumas *in vitro*

Visos aukščiau išvardytos charakteristikos daro MN-AuNK perspektyviomis teranostinėmis nanodalelėmis, kurios pasižymi bimodalinėmis diagnostinėmis ir terapinėmis FNT savybėmis, tačiau jų potencialas turėjo būti įrodytas atliekant biologinio suderinamumo tyrimus su ląstelėmis ir nuodugniai įvertintos jų pasekmės ląstelių gyvybingumui bei funkcionalumui. Įvertinome MN-AuNK citotoksiškumą krūties vėžio MCF-7 ir MDA-MB-231 bei fibroblastų NIH-3T3 ląstelių linijoms. Ląstelės buvo inkubuojamos su MN-AuNK 24 valandas, naudojant skirtingas nanodalelių koncentracijas. Palyginimui taip pat buvo tirtas kontrolinės grupės (be MN-AuNK) gyvybingumas. Ląstelių gyvybingumo tyrimas pateiktas 29 paveiksle ir rodo, kad nė viena iš MN-AuNK koncentracijų (0,255, 0,51, 1,27 ir 2,55 mg/mL) neturėjo reikšmingo citotoksinio poveikio visų tirtų ląstelių linijų gyvybingumui (29 pav.).



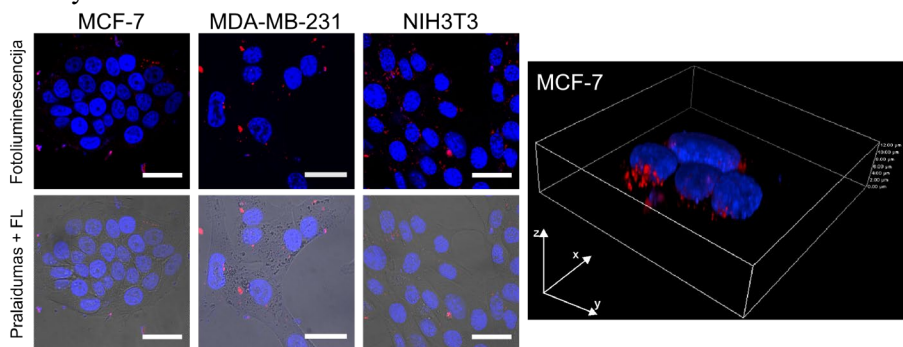
29 pav. Žmogaus krūties vėžio ląstelių linijų MCF-7 ir MDA-MB-231 bei pelės fibroblastų NIH-3T3 gyvybingumo tyrimai po 24 h inkubacijos su magnetinėmis nanodalelėmis, dekoruotomis aukso nanoklasteriais. Duomenys pateikiami suvidurkinus 6 matavimų rezultatus ir apskaičiuojant standartinį nuokrypį. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

Rezultatai parodo, kad mūsų išbandytos MN-AuNK koncentracijos neturėjo tamsinio citotoksiškumo MCF-7, MDA-MB-231 ir NIH3T3 ląstelių linijoms (29 pav.). Šiuos rezultatus taip pat patvirtina ankstesnės publikacijos, kuriuose kraujo plazmoje stabilizuoti aukso nanoklasteriai (Jarockyte, Poderys, et al., 2022) ir techneciu-99m pažymėti bei jaučio serumo albumine stabilizuoti aukso nanoklasteriai (Jarockyte, Stasys, et al., 2022), naudojant beveik 10 ir 6 kartus didesnes koncentracijas, po 24 valandų inkubacijos beveik neturėjo citotoksiškumo (Jarockyte, Poderys, et al., 2022).

Kitame tyrime, kuriame buvo naudojamos magnetinės nanodalelės kartu su aukso nanoklasteriais, naudojant 0,1 mg/mL koncentraciją (kuri yra 25 kartus mažesnė nei mūsų naudota koncentracija), pasireiškė nedidelis citotoksiškumas 293T ląstelėms, tačiau ląstelių gyvybingumas vis tiek išliko didesnis nei 80 % (C. Wang et al., 2015). Panašūs rezultatai gauti ir tiriant HL-60 ir HepG2 vėžio ląstelių linijas, kurios buvo inkubuojamos su aptamero/magnetinių nanodalelių, konjuguotų su fluorescenciniais aukso nanoklasteriais, junginiais, kai buvo naudojamos iki 4 nM siekiančios koncentracijos, nesukėlusios reikšmingų ląstelių gyvybingumo pokyčių (Haghighi et al., 2019).

Norint ištirti MN-AuNK kaupimąsi ląstelėse, nanodaleles inkubavome su žmogaus krūties vėžio ląstelėmis MCF-7 (silpnai agresyvi ir neinvazinė ląstelių linija) (Gest et al., 2013) ir MDA-MB-231 (labai agresyvi ir silpnai diferencijuota, trigubai neigiama vėžio ląstelių linija) (Chavez et al., 2010) bei

imortalizuotais embrioniniais pelių fibroblastais NIH-3T3, kurie reprezentuoja sveiką ląstelių liniją. Ląstelės buvo inkubuojamos su nanodalelėmis 24 val., naudojant 2,55 mg/mL koncentraciją. Gyvos ląstelės vėliau buvo vaizdinamos su lazeriniu skenuojančiuoju konfokaliu mikroskopu. 30 paveiksle matoma raudona MN-AuNK fotoluminescencija po susikaupimo ląstelių viduje. Mėlyna spalva žymi ląstelių branduolius, nudažytus *Hoechst 33258* dažais.



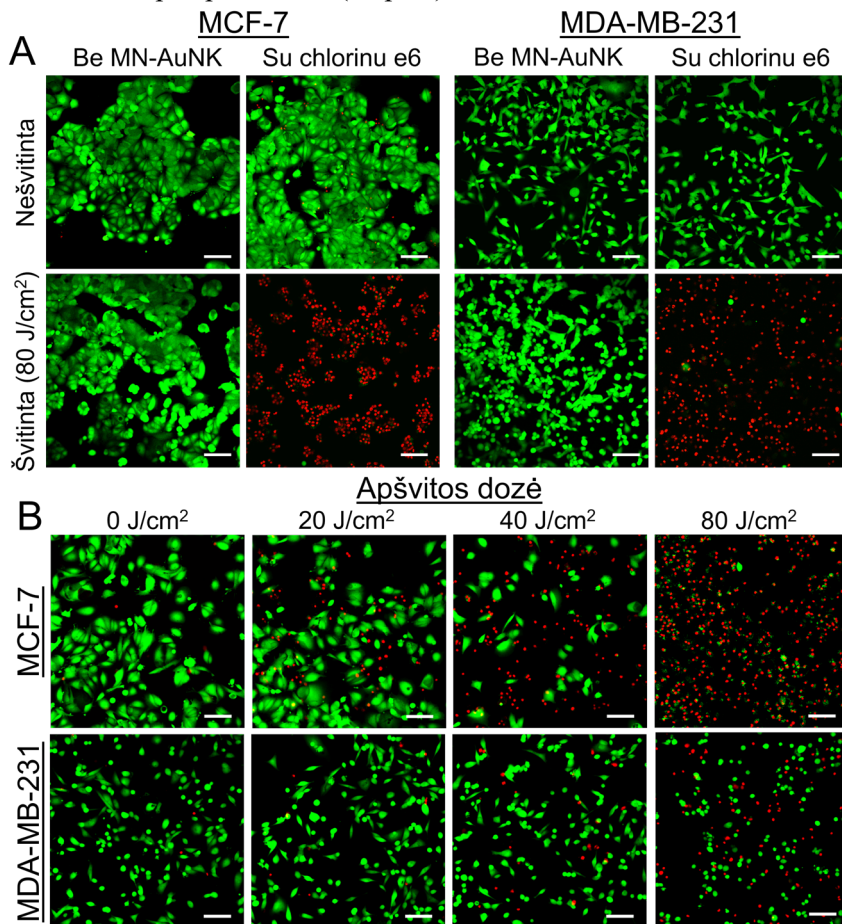
30 pav. Konfokalinės mikroskopijos vaizdai, demonstruojantys MN-AuNK kaupimąsi MCF-7, MDA-MB-231 krūties vėžio ir NIH-3T3 fibroblastų ląstelėse po 24 val. inkubacijos. MN-AuNK fotoluminescencija pavaizduota raudona spalva ($\lambda_{\text{žad}} = 488$ nm). Skalė visiems vaizdams – 30 μm . Mėlyna spalva rodo *Hoechst 33258* dažų pažymėtų ląstelių branduolių fluorescenciją ($\lambda_{\text{žad}} = 405$ nm). Dešinėje pusėje pateiktas rekonstruotas 3D vaizdas su MCF-7 ląstelėmis. Mastelis z ašyje yra 12 μm . Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2023).

Po 24 val. inkubacijos nanodalelės susikaupė visose tirtose ląstelių linijose, nors nanodalelių pasisavinimas nebuvo vienodas. Visos MDA-MB-231 ir NIH-3T3 ląstelės homogeniškai kaupė nanodaleles ir tik kelios MCF-7 ląstelės pasisavino MN-AuNK. Nanodalelių fotoluminescencija sklinda iš viduląstelinės srities, o tai rodo, kad MN-AuNK nebuvo specifinės vėžinėms ar sveikoms ląstelių linijoms. MN-AuNK įsiskverbė į ląsteles, susikaupė citoplazmoje ir lokalizavosi perinuklearinėje srityje (30 pav. dešinėje). Siekdami geriau išsiaiškinti nanodalelių lokalizaciją ląstelių viduje papildomai atlikome su MN-AuNK inkubuotų MCF-7 ląstelių Z-ašies skenavimą ir parodėme, kad nanodalelės lokalizavosi aplink branduolius, bet ne pačiuose branduoliuose (30 pav.).

3.1.8. MN-AuNK fotosensibilizacinio poveikio tyrimas *in vitro*

Kaip anksčiau parodyta 26 paveiksle, vandeniniame tirpale esančios MN-AuNK gali generuoti aktyviasias deguonies formas, todėl buvo išbandytas šių nanodalelių potencialas fotodinaminėje terapijoje. MN-AuNK sukeltas FNT efektas buvo tirtas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių monosluoksniuose,

apšvitinant jas 402 nm šviesa (apšvitos dozė iki 80 J/cm^2), kurią absorbuoja nanodalelės. Fotosensibilizacinis poveikis buvo tirtas fluorescenciniais ląstelių gyvybingumo dažais: kalceinas AM (žalia spalva) nudažo gyvas ląsteles, o propidžio jodidas (raudonas) naudojamas negyvų ląstelių vizualizavimui po apšvitinimo (31 pav.).



31 pav. FNT efektas ląstelių monosluoksniuose naudojant (A) fotosensibilizatorių chloriną e6 ir (B) MN-AuNK. Konfokalinės mikroskopijos vaizdai su krūties vėžio MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijomis. Ląstelės buvo auginamos be nanodalelių arba inkubuojamos su Ce6 ($1 \mu\text{M}$) ar MN-AuNK ($2,55 \text{ mg/mL}$). Po 24 valandų inkubacijos ląstelės buvo paliekamos neapšvitintos arba apšvitinamos 402 nm šviesa (80 J/cm^2 spinduliuotės dozė). Žalia spalva vaizduose žymi gyvas ląsteles, o raudona – negyvas. Visų vaizdų skalės yra $100 \mu\text{m}$.

Kontrolinėje grupėje buvo pademonstruota, kad naudota 80 J/cm^2 apšvitos dozė ląstelių linijų, neinkubuotų su MN-AuNK, gyvybingumui poveikio neturėjo (31 pav. A). Kita vertus, palyginimui su MN-AuNK gautu fotosensibilizaciniu poveikiu naudotas fotosensibilizatorius chlorinas e6 ($1 \mu\text{M}$) po švitinimo nužudė tiek visas MCF-7, tiek MDA-MB-231 ląsteles

(31 pav. A). Tai nėra netikėtas rezultatas, kadangi chlorinas e6 puikiai žinomas dėl savo aktyviųjų deguonies formų generacijos, ypač singuletinio deguonies, bei pritaikymo FNT (Hak et al., 2023). Visgi, taip pat galėjome stebėti sukeltą fotosensibilizacinį poveikį ląstelėms, inkubuotoms su MN-AuNK (31 pav. B). Fotosensibilizuotos terapijos efektas MCF-7 ląstelėms, inkubuotoms su MN-AuNK, tampa akivaizdžiai matomas ląsteles apšvitinus 40 J/cm^2 402 nm šviesos doze, o pasiekus 80 J/cm^2 dozę beveik visos ląstelės buvo žuvusios. Apšvitintos nanodalelės sukėlė ląstelių žūtį (nusidažiusių raudonai, 31 pav. B). Nors tebematoma gyvybingų ląstelių (nusidažiusių žaliai), bet ir jos įgavo apvalią morfologiją, o tokie pokyčiai signalizuoja apie galimus prasidėjusius apoptozės procesus (Stuchinskaya et al., 2011). Palyginimui, mažiau MDA-MB-231 ląstelių buvo paveiktos fotodinaminio poveikio ir išliko gyvybingos (31 pav. B), tačiau taip pat buvo pastebima daugiau suapvalėjusių arba apoptozės formos ląstelių. Tad, nors MDA-MB-231 yra atsparesnės, ląstelės vis tiek buvo pažeidžiamos inkubacijos su MN-AuNK ir apšvitinimo mėlyna šviesa metu (31 pav. B). Be to, MN-AuNK neturėjo tamsaus toksiškumo nė vienai ląstelių linijai (31 pav. B).

Nors MN-AuNK nėra tokie efektyvūs generuojant singuletinį deguonį kaip įprasti fotosensibilizatoriai (Kwiatkowski et al., 2018; Lan et al., 2019; Macdonald & Dougherty, 2001), vis tiek pavyko pademonstruoti terapinį poveikį. Svarbu ir tai, jog MN-AuNK, kaip fotosensibilizatorius, būtų galima naudoti pakartotinai dėl jų gebėjimo atsistatyti po švitinimo. Dar geresniems rezultatams pasiekti MN-AuNK galima derinti su fotoaktyviu vaistu, kuris padidintų singuletinio deguonies generavimą ir vėžinių ląstelių naikinimo efektyvumą (Hone et al., 2002; Stuchinskaya et al., 2011).

Apibendrinus galima teigti, jog atsižvelgiant į tai, kad MN-AuNK turi dvigubo vaizdinimo galimybes ir pasižymi terapinėmis savybėmis, šios charakteristikos daro jas perspektyvia teranostine nanoplatforma, kuri yra įvairių pasaulio mokslininkų, šiuo metu dirbančių su skirtingų tipų teranostinėmis nanodalelėmis, tyrimų objektas (Johnson et al., 2021; Nguyen et al., 2022; Skripka et al., 2019). Naujai vystomos teranostinės nanodalelės, sistemingai ir specialiai susikaupiančios vėžiniame audinyje, galėtų padėti aptikti naviką ankstyvosiose jo formavimosi stadijose neinvaziniais vaizdinimo metodais, tokiais kaip MRT. Derinant anatominius ir kontrastinius vaizdus, būtų galima aptikti vėžio plitimą, kuris kitaip būtų nepastebimas. Be to, su ND susiję terapiniai vaistai suteikia tikslesnę naviko terapiją ir užtikrina, kad vaizdinamos vietos, atpažįstamos kaip piktybinės, taip pat būtų veikiamos ir priešvėžinio gydymo. Visgi informacijos ir tyrimų apie daugiafunkces teranostines nanoplatformas, ypač apie hibridinius magnetinių nanodalelių ir

fotoluminescencinių aukso nanoklasterių nanokompozitus, trūkumas reikalauja papildomų išplėstinių studijų.

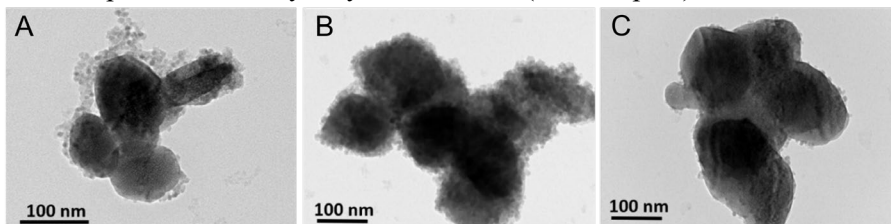
3.2. Apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos maghemito ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanokristalais

Šioje dalyje buvo tiriamos retųjų žemių elementais legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokristalais (toliau bendrai trumpinama AKND@ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Skirtingo legiravimo (vien su erbiu – $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Er}_{0,2}]\text{F}_4$ @ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, vien su iterbiu – $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,2}]\text{F}_4$ @ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ arba su erbiu bei iterbiu – $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ @ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanodalelės buvo gautos iš Paris Cité universiteto ITODYS laboratorijos, vadovaujamos prof. dr. Souad Ammar. Eksperimentų rezultatai su šio tipo nanodalelėmis buvo apibendrinti mokslinėje publikacijoje ir yra pateikiami žemiau:

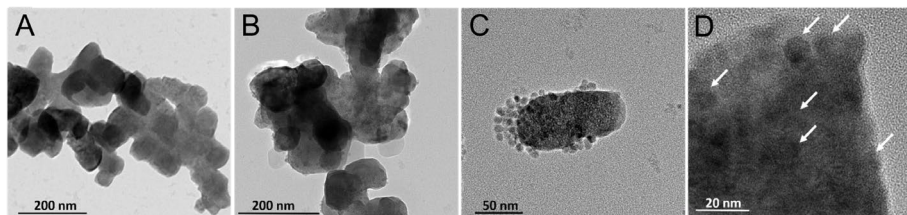
- Parvizian, M.; Mnasri, W.; **Pleckaitis, M.**; Karabanovas, V.; Khan, H.; Nowak, S.; Gam-Derouich, S.; Ben Tahar, L.; Sandre, O.; Rotomskis, R.; Ammar, S. Up-converting $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ Nanoparticles Coated by Superparamagnetic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanosatelites: Elaboration, Characterization and In Vitro Cytotoxicity. *RSC Advances*, 2024, 14 (43), 31486-31497. <https://doi.org/10.1039/D4RA00909F>

3.2.1. AKND@ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ erdvinių ir struktūrinių savybių charakterizavimas

Susintetintos visų tipų apkonvertuojančios nanodalelės buvo tiriamos įvairiais metodais siekiant įvertinti jų dydį. Peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos (TEM) tyrimas patvirtino, kad iš anksto suformuotos lantanoidais legiruotos $\beta\text{-NaYF}_4$ dalelės yra atskirai padengtos itin smulkiais geležies oksido nanokristalais, sudarančiais savotišką „šerdis@palydovų“ objektą, o šių magnetinių nanokristalų kiekis Yb pagrindu sukurtose nanokompozito dalelėse yra žymiai didesnis (32 ir 33 pav.).

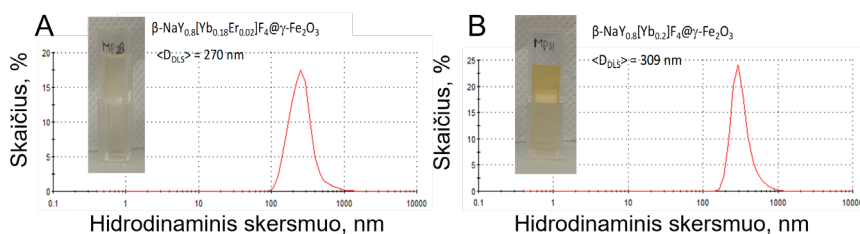


32 pav. TEM nuotraukos, vaizduojančios susiformavusius įvairių, lantanoidais legiruočių nanodalelių tipus: (A) $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Er}_{0,2}]\text{F}_4$ @ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, (B) $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,2}]\text{F}_4$ @ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ir (C) $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ @ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodalelės. Pagal (Parvizian et al., 2024).



33 pav. TEM nuotraukos, vaizduojančios susiformavusias apkonvertuojančias nanodaleles: (A) $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4$, neturinčias magnetinių nanokristalų ir (B) $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – su prijungtais magnetiniais nanokristalais. (C) Padidintas vienos „šerdies@palydovų“ nanodalelės vaizdas ir (D) TEM nuotrauka, kurioje pažymimi $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4$ šerdies paviršiuje susiformavę maghemito nanokristalai (baltos rodyklės). Pagal (Parvizian et al., 2024).

Padengus nanodaleles citrato danga buvo galima jas disperguoti dejonizuotame vandenyje bei parodyti, jog visi susintetinti kompozitiniai milteliai sudaro stabilius koloidinius tirpalus. Išmatuotas trijų citratu padengtų heteronanostruktūrų hidrodinaminis skersmuo svyravo nuo 200 iki 300 nm (34 pav.), o didžiausias hidrodinaminis skersmuo buvo nustatytas gausiausiai geležies oksido nanokristalais padengtų $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.2}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ kompozitų.



34 pav. DLS metodu išmatuotas hidrodinaminis dydžio pasiskirstymas citratu padengtomis (A) $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ir (B) $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.2}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ kompozicinėms dalelėms, disperguotoms dejonizuotame vandenyje. Intarpai rodo vandeninius nanodalelių tirpalus. Adaptuota pagal (Parvizian et al., 2024).

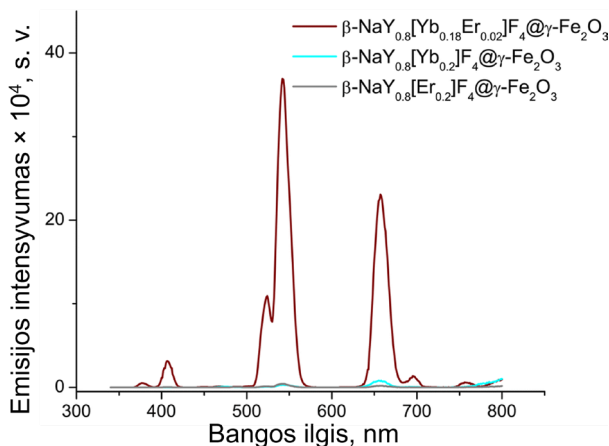
Taip pat buvo ištirtas zeta potencialas, kuris buvo neigiamas, tikėtina, dėl neigiamai įkrautų citrato molekulių nanodalelių paviršiuje. Labiausiai neigiamą zeta potencialo vertę turėjo $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.2}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokompizitų paviršius ir siekė -40 mV. $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ir $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Er}_{0.2}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodalelėms jis buvo mažesnis ir atitinkamai siekė -25 mV ir -27 mV. Išsamesniems cheminės ir struktūrinės analizės tyrimams žiūrėti (Parvizian et al., 2024). Citratų anijonai yra žinomi kaip geri Fe^{3+} ligandai, tad natūralu, jog daugiausiai geležies oksido nanodalelių prisijungę kompozitai taip pat turėjo ir neigiamiausią krūvį. Citratas dažnai naudojamas geležies oksido nanodalelėms padengti, siekiant stabilizuoti jų suspensiją vandenyje. Neigiamai įkrautos citratų karboksilato (ir hidroksilo) grupės yra tvirtai prijungiamos dalelių paviršiuje tiesioginio prijungimo būdu,

suteikdamos skiepytoms dalelėms neigiamą paviršiaus krūvį (Cahyana et al., 2017; Cheraghipour et al., 2012; Ezzaier et al., 2018).

Įprastai manoma, kad toks neigiamas paviršiaus krūvis trukdytų ląstelėms pasisavinti daleles, nes ląstelių membranos taip pat turi neigiamą krūvį, todėl sukuriami elektrostatinė stūmos sąveika (Verma & Stellacci, 2010). Visgi yra neigiamai įkrautų dalelių pasisavinimą patvirtinančių mokslinių publikacijų (Bertorelle et al., 2006; Cho et al., 2009; Wilhelm et al., 2003). Manoma, kad tokių dalelių internalizacija vyksta per nespecifinį dalelių prisijungimą ir kaupimąsi katijoninėse plazminės membranos vietose bei vėlesnę jų endocitozę. Taigi tokiu būdu, nepaisant nepalankios elektrosstatinės sąveikos tarp neigiamai įkrautų dalelių ir neigiamai įkrautos ląstelių membranos, galima AKND@ γ -Fe₂O₃ internalizacija į ląsteles ir drauge jų pritaikymas ląsteliniam vaizdinimui.

3.2.2. AKND@ γ -Fe₂O₃ optinės savybės

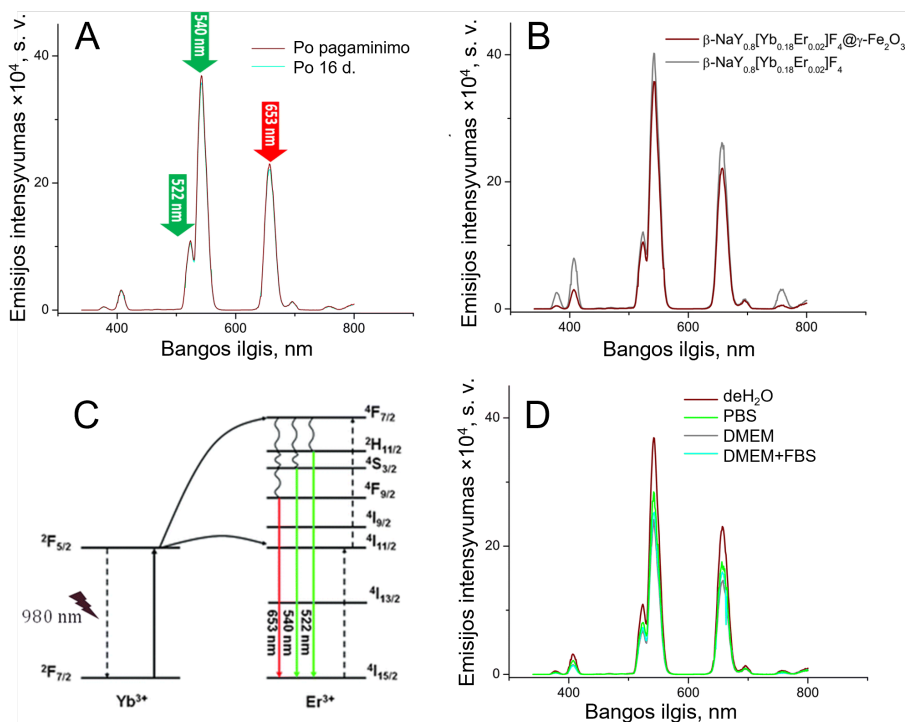
Trijų skirtingų retųjų žemių elementais legiruotų AKND emisijos spektrai buvo išmatuoti žadinant 980 nm bangos ilgio lazerine spinduliuote (35 pav.).



35 pav. Citratu padengtų įvairių AKND@ γ -Fe₂O₃ emisijos spektrai, užregistruoti kambario temperatūroje žadinant 980 nm lazerine spinduliuote. β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ (bordo spalva), β -NaY_{0.8}[Yb_{0.2}]F₄@ γ -Fe₂O₃ (žydra spalva) ir β -NaY_{0.8}[Er_{0.2}]F₄@ γ -Fe₂O₃ (pilka spalva). Nanodalelės buvo disperguotos dejonizuotame vandenyje (1 μ g/mL). Adaptuota pagal (Parvzian et al., 2024).

Jie aiškiai rodo, kad legiravimas su Er ir Yb sustiprina emituojamą šviesą regimojoje srityje. Tiksliau, 980 nm lazerio spinduliuotė sužadina Yb katijoną. Atsiradęs sužadintas elektronas vėliau perkeliamas į Er katijono ⁴F_{7/2} sužadintą lygmenį (36 pav. C). Iš šio lygmens energija nespinduliniu būdu relaksuoja į žemesnius energijos lygmenis, iš kurių išspinduliuojama įvairių

bangos ilgių emisija: juostos matomos ties 406 nm, 522 nm, 540 nm ir 657 nm bangos ilgiais. Šioje konkrečioje AKND sistemoje įterbis atlieka sensibilizatoriaus vaidmenį, o erbis – aktyvatoriaus (Lin et al., 2012), todėl gaunamas didžiausias matomos šviesos fotoluminescencijos intensyvumas ir padengimas maghemito nanokristalais AKND emisijos reikšmingai nepakeičia bei neslopina (36 pav. B). Įdomu tai, kad šių dalelių emisijos spektrai, išmatuoti įvairiose biologinėse terpėse, kaip antai: PBS, DMEM ir DMEM+FBS, kurie dažniausiai naudojami skirtinguose ląstelių kultivavimo etapuose, reikšmingų pokyčių neparodė (36 pav. D). Regimosios šviesos emisijos efektyvumas buvo nuolat stebimas nepriklausomai nuo terpės, kurioje buvo disperguotos citratinės heteronanostruktūros.

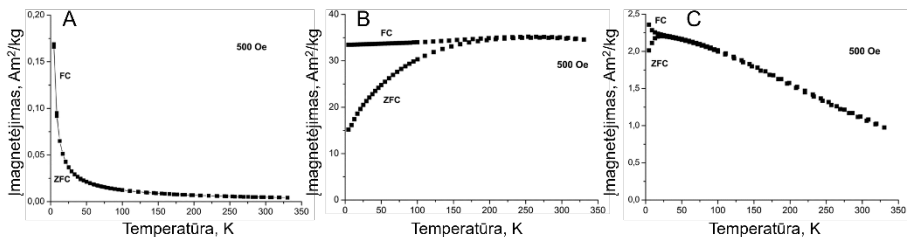


36 pav. (A) Citratu padengtų $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4$ nanodalelių vandeninio tirpalo emisijos spektrai, užregistruoti kambario temperatūroje ($1 \mu\text{g/mL}$) žadinant 980 nm lazerine spinduliuote. Tirpalas buvo matuotas paruošimo dieną (bordo linija) ir po 16 dienų po tirpalo pagaminimo (žydra linija). (B) Citratu padengtų $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4$ nanodalelių apkonversijos emisijos spektro (pilkas spektras) palyginimas su citratu padengtų $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodalelių (bordo spalvos spektras). (C) $4f$ lantanoidų energijos lygmenys, susiję su apkonversijos reiškiniu, sukeliančiu žalią ir raudoną emisiją (adaptuota iš (Wild et al., 2011)). (D) Citratu padengtų $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokompozitų emisijos spektrai, registruoti skirtingose terpėse (paruošimo dieną) kambario temperatūroje ($1 \mu\text{g/mL}$): deH_2O , PBS, DMEM ir DMEM+FBS. Žadinta 980 nm lazerio spinduliuote. Adaptuota pagal (Parvizian et al., 2024).

3.2.3. AKND@ γ -Fe₂O₃ magnetinės savybės

Siekiant patikrinti, ar gautos apkonvertuojančias heteronanostruktūras galima panaudoti kaip bimodalius vaizdinimo zondus, su džiovintomis β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ dalelėmis buvo atlikti nuolatinės srovės magnetinio lauko matavimai jų magnetinėms savybėms įvertinti. Pagal taikomą eksperimentinę metodiką buvo atlikti dviejų tipų matavimai. Pirmieji tyrimai koncentravosi į kūno temperatūroje (k.t.) vykstantį įmagnetėjimo kitimą veikiančio magnetinio lauko atžvilgiu (žymimas $M(H)$), o kitų tyrimų metu buvo nagrinėjamas įmagnetėjimo terminis kitimas, žymimas $M(T)$, esant silpnam 500 Oe magnetiniam laukui ir taikant nulinio lauko aušinimo (*angl. zero-field cooling* – ZFC) arba lauko aušinimo (*angl. field cooling* – FC) sąlygas. Trumpai, ZFC matavimų metu matuojamas medžiagos įmagnetėjimas ją šaldant ir neveikiant išoriniu magnetiniu lauku, o FC metu įmagnetėjimo kreivės matuojamos medžiagą šaldant ir veikiant išoriniu magnetiniu lauku. Pirmasis dydis yra svarbus norint nustatyti bendrą susintetintų dalelių įmagnetėjimą lauke, artimame klinikoje naudojamam MRT, t. y. $\approx 1,5$ T. Šis parametras atlieka svarbų vaidmenį magnetinėje dipolinėje sąveikoje tarp vandens protono branduolio magnetinio momento ir zondo magnetinio momento. Tiksliau tariant, tikimasi, kad MRT kontrastinės medžiagos skersinis relaksuojamumas naudojame lauke kis kaip įmagnetėjimo vertė kvadratu (Vuong et al., 2012). Antrasis dydis yra svarbus norint nustatyti superparamagnetinio elgesio dominavimą visame „šerdis@palydovų“ dalelių magnetiniame atsake.

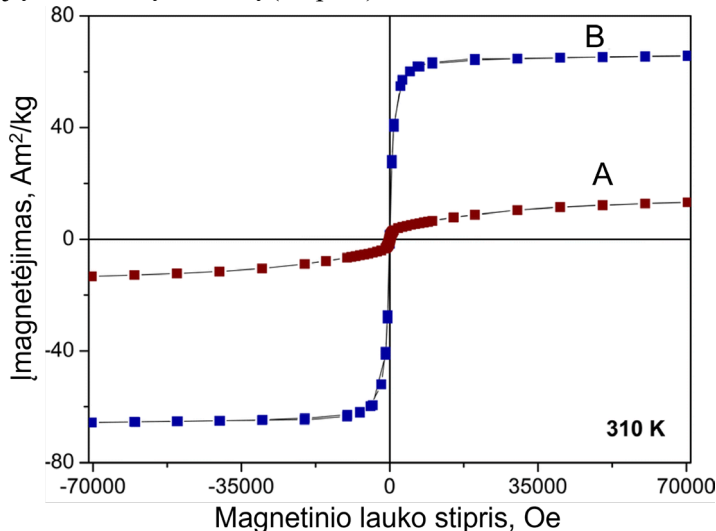
Siekiant kuo išsamesnio tyrimo, visi šie matavimai buvo atlikti lygiagrečiai ne tik su β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ nanokompozitais, bet ir su β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄ šerdimis ir atskirai paruoštais γ -Fe₂O₃ nanokristalais. γ -Fe₂O₃ dalelių $M(T)$ kreivės rodo superparamagnetinį elgesį, stebimą dėl negrįžtamumo tarp ZFC ir FC $M(T)$ šakų, kai vidutinė blokavimo temperatūra $\langle T_B \rangle$ yra 55 K (37 pav. B).



37 pav. Citratu padengtų (A) β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄, (B) γ -Fe₂O₃ ir (C) β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ dalelių įmagnetėjimo kitimas esant pastoviam 500 Oe magnetiniam laukui, po lauko aušinimo (FC) ir nulinio lauko aušinimo (ZFC) sąlygų. Adaptuota pagal (Parvizian et al., 2024).

Tas pats požymis pastebėtas ir $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dalelėms, kurių $\langle T_B \rangle$ buvo 17 K, o $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ dalelės pasižymėjo tik paramagnetinėmis savybėmis. Taip pat buvo pastebėtas dviejų FC ir ZFC $M(T)$ atšakų susilygiavimas ir jų hiperbolinis kilimas mažėjant temperatūrai dėl trijų nesuporuotų Er^{3+} katijono elektronų atsirandančios Zeemano sąveikos natrio itrio fluorido matricoje, kai taikomas išorinis magnetinis laukas. Akivaizdu, kad nubrėžtos $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dalelių $M(T)$ kreivės yra $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokristalų ir $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ dalelių kreivių superpozicija, turinti papildomą poveikį – $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokristalų abipusės dipolinės sąveikos sumažėjimą ant $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ šerdžių.

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokristalų įmagnetėjimo $M(H)$ kreivė atskleidžia išskirtines superparamagnetines savybes, pavyzdžiui, nanokristalų liekamasis įmagnetėjimas ir koerciškumas (prie k.t.) yra lygūs nuliui. Atkreiptinas dėmesys į tai, kad dėl itin mažo dydžio šių dalelių įmagnetėjimas neįsisotina net ir esant stipriam magnetiniam laukui (Respaud et al., 1998). $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ dalelių $M(H)$ kreivės parodo tipinę paramagnetiko elgseną, kuriai būdinga S formos Langevino tipo kreivė. $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dalelių $M(H)$ elgsena atspindi tarpinį variantą tarp dviejų ankstesnių modelių (38 pav.).

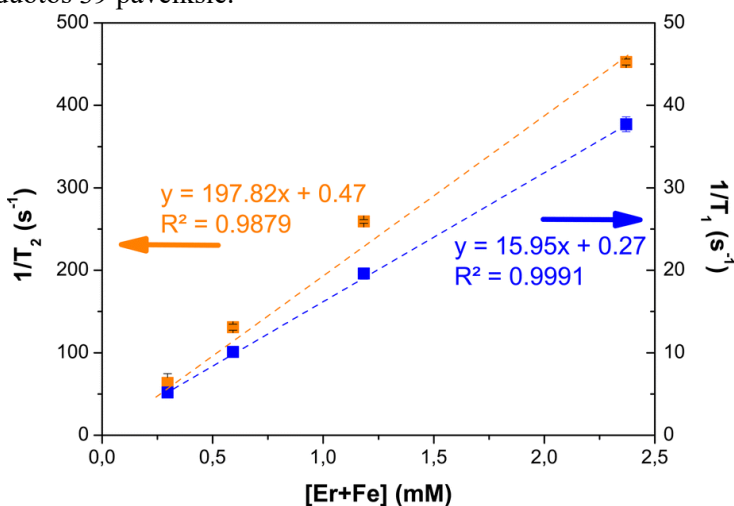


38 pav. Izoterminė įmagnetėjimo kitimo priklausomybė nuo magnetinio lauko stiprio, esant pastoviai 310 K temperatūrai. (A) Citratu padengti $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokompozitai ir (B) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodalelės. Adaptuota pagal (Parvizian et al., 2024).

Žvelgiant į įmagnetėjimą, „šerdies@palydovų“ dalelės natūraliai pasižymi mažesniu įmagnetėjimu lyginant jas su gryniais geležies oksido nanokristalais. Nepaisant to, šis įmagnetėjimas išlieka pakankamai stiprus,

kad AKND@ γ -Fe₂O₃ būtų galima panaudoti kaip teigiamo arba neigiamo kontrasto medžiagas MRT. Įmagnetėjimas išlieka artimas 10 emu g⁻¹ (dalelių gramams) esant 15 kOe magnetinio lauko stipriui, kuris įprastai naudojamas klinikiniuose MR tomografuose.

Relaksometrijos matavimai buvo atlikti β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ vandeninėse suspensijose esant 1,41 T magnetinio lauko stipriui ir k.t. Išilginio ir skersinio relaksuojamumo vertės buvo išvestos iš vandens protonų sukinių ir [Er+Fe] išilginio (bei atitinkamai skersinio) gesimo greičio tiesinės priklausomybės polinkio kampo. Gryno vandens relaksacijos laikai, T₁ = 3740 ± 10 ms ir T₂ = 2126,8 ± 0,6 ms, buvo išmatuoti eksperimentiškai ir naudojami regresijos linijų susikirtimo taškams nustatyti. Gautos kreivės pavaizduotos 39 paveiksle.



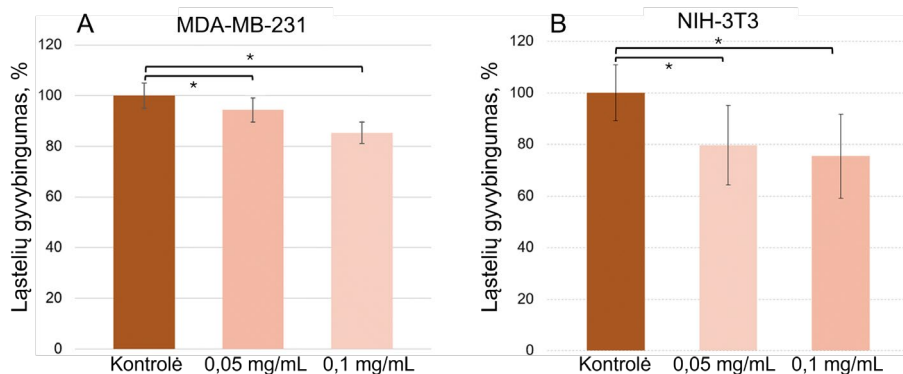
39 pav. Citratu padengtų β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ dalelių išilginio (r_1) ir skersinio (r_2) relaksuojamumo nustatymas dejonizuotame vandenyje, 37 °C temperatūroje, naudojant 1,41 T statinį lauką. T₁ (mėlyni kvadratai) ir T₂ (oranžiniai kvadratai) trukmių relaksacijos greičių (atvirkščiai proporcingų relaksacijos laikams) priklausomybė nuo bendros paramagnetinių katijonų koncentracijos. Pagal (Parvizian et al., 2024).

Pradiniai bandymai parodė vidutinį β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ koloidų poveikį T₁ trukmėms bei stipresnį efektą T₂ trukmėms, susijusį su Er³⁺ jonų paramagnetizmu. Vandens molekulės negali tiesiogiai pasiekti erbio, nes jie yra viduje β -NaYF₄ kristalinės matricos, kurią pačią supa dvigubas surfaktantų sluoksnis (pvz., iš oleino rūgšties (Mnasri et al., 2019)). Kaip kontrolinis atskaitos taškas β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄ šerdims buvo išmatuotas išilginis relaksuojamumas $r_1 = 0,69 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Prie apkonvertuojančios šerdies prijungus maghemito nanokristalus, pasižyminčius superparamagnetinėmis savybėmis, sukuriamas realus MR kontrastas. Išmatuotos išilginio ir skersinio relaksuojamumo vertės,

siekiančios apie 16 ir 198 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, atitinka tipiškas neigiamos kontrastinės medžiagos savybes. Šios vertės yra artimos jau anksčiau išmatuotoms panašaus dydžio (apie 10 nm) poliolyje pagamintoms maghemito dalelėms (Basti et al., 2010; Mnasri et al., 2020). Tai parodo, kad susintetintų „šerdis@palydovų“ dalelių magnetinės relaksuojamumo savybes labiausiai lemia jų maghemito komponentai, tačiau prie įmagnetėjimo šiek tiek prisideda ir šerdyje esantys paramagnetiniai Er^{3+} katijonai.

3.2.4. AKND@ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ biosuderinamumas *in vitro*

Susintetintų nanodalelių citotoksiškumas buvo įvertintas naudojant skirtingas koncentracijas (nuo 0,05 iki 0,1 mg/mL) eksperimentuose su dviejų tipų ląstelių linijomis: sveikais embrioniniais pelių fibroblastais (NIH-3T3) ir žmogaus krūties vėžio ląstelėmis (MDA-MB-231). Ląstelės su minėtomis nanodalelių dozėmis buvo inkubuojamos 24 h valandas, o tuomet tikrinamas jų gyvybingumas. Jis buvo tiriamas taikant XTT gyvybingumo testą, o gauti rezultatai pateikiami 40 paveiksle. Ląstelių, paveiktų 0,1 mg/mL nanodalelių doze, gyvybingumo rodikliai siekė beveik 80 %, o mažesnėms dozėms jis buvo dar didesnis.



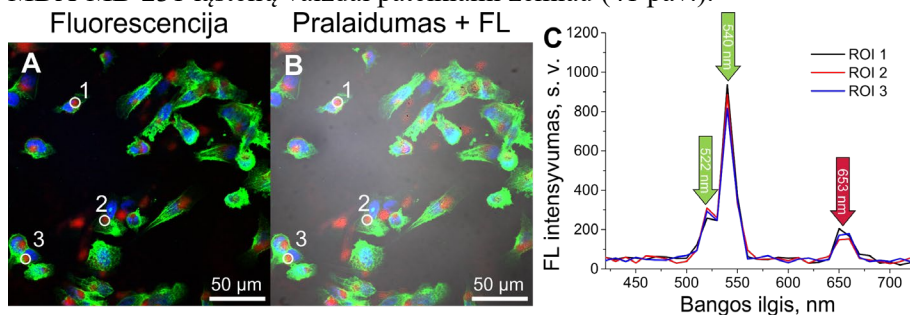
40 pav. Ląstelių gyvybingumas, išmatuotas (A) MDA-MB-231 ir (B) NIH-3T3 ląstelių linijose, inkubuotose 24 val. su citratu padengtomis $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dalelėmis. Naudotos dvi skirtingos koncentracijos – 0,05 mg/mL ir 0,1 mg/mL , kontrolinės grupės su nanodalelėmis nebuvo inkubuotos. Paklaidos atspindi standartinę nuokrypį, o * žymi statistiškai reikšmingus pokyčius, kai $p < 0,05$. Adaptuota pagal (Parvizian et al., 2024).

Nors buvo nustatytas statistiškai reikšmingas poveikis gyvybingumui, bet apie 80 % siekiantis ląstelių gyvybingumo rodiklis tyrimuose su nanodalelėmis paprastai laikomas patenkinamu (Gruber & Nickel, 2023). Maksimali tirta koncentracija gali skleisti stiprią apkonversijos emisiją, tinkamą vaizdinimui, ir kartu nesukelti per didelio toksinio poveikio tirtoms ląstelėms. Tai, kad šios $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dalelės pasižymi

mažu toksiškumu, yra vertingas privalumas. Tad jas būtų galima panaudoti kaip potencialius vaizdinimo zondus biologinėse sistemose.

Ateityje svarbu atlikti išsamesnius citotoksiškumo tyrimus, pvz., įtraukti ilgesnį ląstelių inkubavimo su nanodalelėmis laiką. Naujausi tyrimai rodo, kad β -NaYF₄ matrica tirpaluose gali pamažu tirpti, išskirdama fluorido ir lantanoidų jonus, kurie gali sukelti citotoksiškumą (Bastos et al., 2022). Taip pat būtų svarbu patikrinti, koks yra ilgalaikis suleistų dalelių likimas ir kaip organizmas pritaiko savo metabolizmą jas pašalinti. Tam reiktų ištirti sukurtų dalelių degradavimo kinetiką bent jau biomimetinėse terpėse (Kolosnjaj-Tabi et al., 2015) bei ištestuoti jų biologinį pasiskirstymą eksperimentiniuose gyvūnuose (Y. Li et al., 2015).

Norint įvertinti ląstelių galimybes kaupti AKND@ γ -Fe₂O₃ bei patikrinti optinės diagnostikos potencialą, konfokalinės mikroskopijos metodu buvo ištirtos krūties vėžio ląstelės MDA-MB-231, 24 h inkubuotos su tirtais vaizdinimo zondais β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ (konc. 0,1 mg/mL), kurie buvo žadinami artimąja infraraudonąja spinduliuote. Konfokalinė mikroskopija yra pažangi technika, kuri, lyginant su įprastine mikroskopija, užtikrina geresnę skiriamąją gebą ir kontrastą, pasiektą fiksuojant dvimačius vaizdus. Po inkubacinio periodo ląstelių kultivavimo terpė su nanodalelėmis buvo pakeičiama į švarią ir neturinčią nanodalelių, bet prieš tai buvo atliktas daugkartinis ląstelių plovimas PBS tirpalu, siekiant pašalinti visas daleles, kurios nepateko į ląsteles. Ląstelių branduolių ir citoskeleto dažymas palengvino jų vizualizavimą konfokalinio mikroskopijos metu, o užregistruoti MDA-MB-231 ląstelių vaizdai pateikiami žemiau (41 pav.).

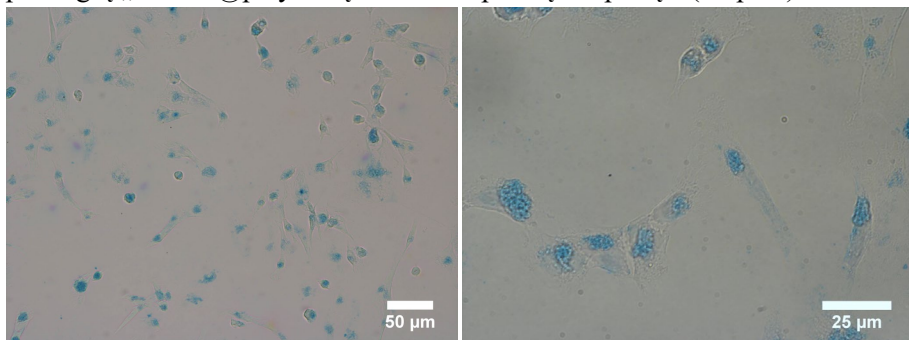


41 pav. (A) MDA-MB-231 ląstelių, inkubuotų 24 val. su citratu padengtomis β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ dalelėmis (0,1 mg/mL), konfokalinės mikroskopijos vaizdai. Raudona spalva reprezentuoja dalelių apkonversijos emisiją, mėlyna – ląstelių branduolių, nudažytų *Hoechst 33258* dažu, fluorescenciją, o žalia – ląstelių citoskeleto, nudažyto *Alexa FluorTM 488 Phalloidin* reagentu, fluorescenciją. (B) Peršviečiamosios mikroskopijos + fotoluminescencijos vaizde su dalelėmis susiję raudoni taškai matomi tik ląstelėse, tad tai patvirtina jų viduląstelinį kaupimąsi. Visos skalės po 50 μ m. (C) 980 nm lazerio spinduliuote sužadinti apkonversijos emisijos spektrai, užfiksuoti sujungtame vaizde pažymėtose 1, 2 ir 3 pozicijose. Adaptuota pagal (Parvizian et al., 2024).

Juose mėlynos spalvos fluorescencija matoma sklindanti iš branduolių, žalios spalvos – iš fluorescenciniais dažais pažymėto ląstelių citoskeleto, o raudona (pseudo spalva) – nanodalelių emisija po sužadavimo 980 nm bangos ilgio lazeriu.

Dėl savo dydžio dalelės negalėjo prasiskverbti į ląstelių branduolius ir daugiausia lokalizavosi ląstelių citoplazmoje. Šias išvadas papildomai patvirtino stebėta žalia (41 pav. reprezentuojama raudona pseudo spalva) emisija, aptikta iš apkonvertuojančių nanodalelių. Taip pat pateiktuose vaizduose iš dominančių sričių, pažymėtų 1, 2 ir 3, žadinant 980 nm lazerine spinduliuote buvo užregistruoti emisijos spektrai. Juose matomos specifinės juostos ties 522 nm, 540 nm ir 653 nm, būdingos tiriamų nanodalelių emisijai tirpaluose (36 ir 41 pav.).

Ląstelinio kaupimosi rezultatus taip pat patvirtino šviesaus lauko mikroskopijos tyrimas, kurio metu su MDA-MB-231 ląstelėmis inkubuotos nanodalelės buvo papildomai nudažytos *Prūsijos mėlio* pigmentu. Dažymas atliktas po 24 val. inkubacijos laikotarpio su dalelėmis, naudojant tą pačią 0,1 mg/mL koncentraciją. Šis reagentas gali aptikti geležies turinčias medžiagas dėl jo specifinės sąveikos su Fe^{3+} jonais. Atsižvelgiant į tai, kad $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokristalai yra prisitvirtinę prie $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4$ nanodalelių paviršiaus, ląstelėse stebima mėlyna spalva, tikėtina, reprezentuoja citratu padengtų „šerdis@palydovų“ nanokompozitų kaupimąsi (42 pav.).



42 pav. Skirtingo didinimo šviesaus lauko mikroskopijos vaizdai, kuriuose matomos krūties vėžio ląstelės MDA-MB-231, inkubuotos 24 val. su citratu padengtomis $\beta\text{-NaY}_{0,8}[\text{Yb}_{0,18}\text{Er}_{0,02}]\text{F}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodalelėmis (0,1 mg/mL). Pastarosios buvo nudažytos specialiu *Prūsijos mėlio* reagentu, siekiant aptikti tiriamųjų ląstelių viduje $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ komponentus, prisijungusius ant AKND. Pagal (Parvizian et al., 2024).

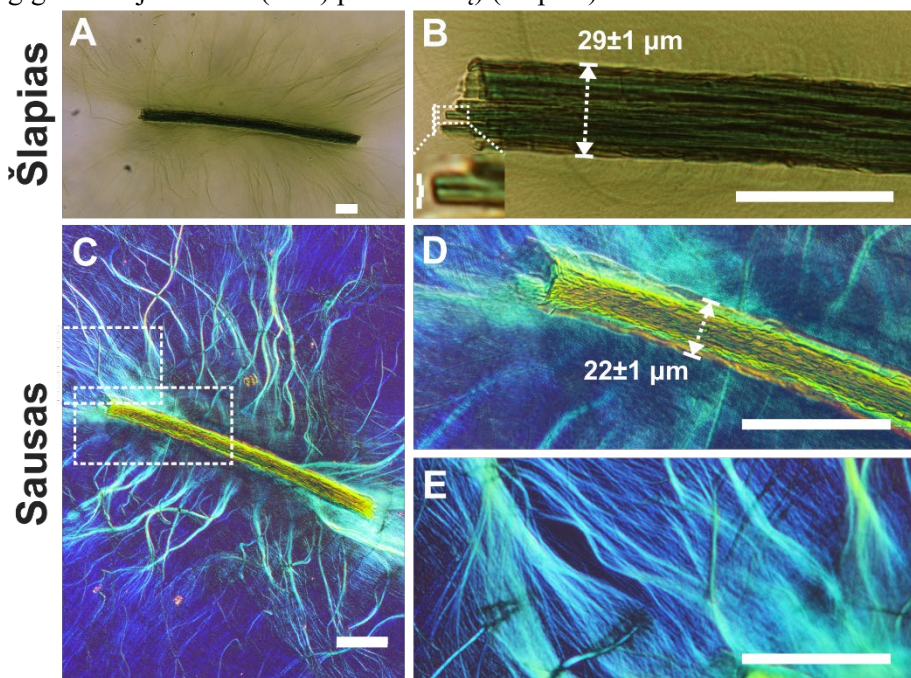
3.3. TPPS₄ molekuliniai agregatai – potencialūs harmonoforai

Mezo-tetra(4-sulfonatofenil) porfinas, trumpinamas TPPS₄, yra jau daug metų tyrinėjamas fotosensibilizatorius. Jis žinomas ne vien dėl savo fotosensibilizacinių savybių, bet taip pat dėl savaiminės molekulinės

saviorganizacijos rūgštinėje terpėje į tvarkios struktūros agregatus. Daugiausiai tyrinėtose TPPS₄ molekulių struktūros yra cilindriniai/spiraliniai J agregatai (Short et al., 2013; Takayoshi Kobayashi, 2011). Be šių agregatų TPPS₄ molekulės gali papildomai suagreguoti į plokščias ar flokuliuotas struktūras (Rotomskis et al., 2004). Visgi ilgalaikė TPPS₄ molekulių agregacija į kompleksiškas, hierarchines struktūras nėra gerai suprasta, todėl ir buvo tiriama bei publikuota straipsnyje:

- **Pleckaitis, M.**; Habach, F.; Kontenis, L.; Steinbach, G.; Jarockyte, G.; Kalnaityte, A.; Domonkos, I.; Akhtar, P.; Alizadeh, M.; Bagdonas, S.; Karabanovas, V.; Garab, G.; Rotomskis, R.; Barzda, V. Structure and Principles of Self-Assembly of Giant “Sea Urchin” Type Sulfonatophenyl Porphine Aggregates. *Nano Research*, 2022, 15 (6), 5527–5537. <https://doi.org/10.1007/s12274-021-4048-x>

Šioje publikacijoje (Pleckaitis et al., 2022) su bendraautoriais pademonstravome unikalią, savaiminės organizacijos metu susiformavusią TPPS₄ agregatų struktūrą, primenančią jūros ežį (toliau trumpinama pagal gigantiško jūros ežio (GJE) pavadinimą) (43 pav.).

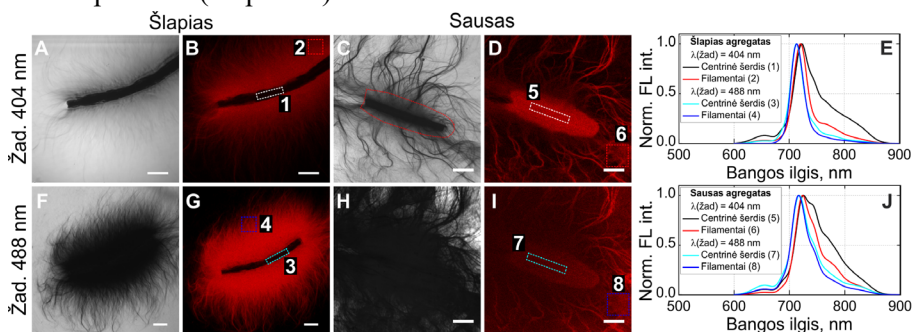


43 pav. TPPS₄ GJE agregatų šviesaus lauko ir DIC mikroskopijos vaizdai (A, B) drėgnomis ir (C–E) sausomis sąlygomis. (A) Viso šlapio GJE agregato ir (B) centrinės šerdies vaizdai. (C) Viso sauso GJE agregato, (D) centrinės šerdies ir (E) filamentų DIC mikroskopijos vaizdai. Visų vaizdų skalės juostos yra 50 μm ((B) įterptinio vaizdo skalė yra 1 μm/brūkšnį). Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2022).

GJE struktūra buvo išanalizuota gausybe skirtingų metodų bei parodyta, kad ji galėtų pasitarnauti kaip potencialus kontrastinis žymuo fluorescencinės mikroskopijos srityje bei harmoniforas netiesinėje mikroskopijoje, kadangi geba generuoti antrąją ir trečiąją harmonikas. Tolesniuose poskyriuose bus pateikiami GJE agregato analizavimo rezultatai.

3.3.1. GJE TPPS₄ agregatų struktūros ir spektrinių savybių tyrimas

Skirtingos TPPS₄ agregatų formos buvo tirtos konfokalinio lazeriniu skenuojančiu mikroskopu (44 pav.). GJE struktūra atskleidė dvi skirtingas agregatų formacijas: (I) centrinę šerdį, kurios skersmuo yra nuo 20 μm iki 30 μm (skirtingiems GJE agregatams) ir šimtus mikrometrų siekiantis ilgis (44 pav. A–D); (II) plaukelius ar blakstienas primenančius filamentus, kurie išsikiša iš centrinio šerdies paviršiaus įvairiais pasvirimo kampais (žr. 44 pav. A, C). Toks pats pasvirimas stebimas ir didelėms filamentų sankaupoms ar sluoksniams, kurie kerta vienas kitą skirtinguose aukščiuose (44 pav. A, C). Kai kurie filamentai taip pat lenkiasi ir susitelkia išilgai centrinio šerdies paviršiaus (44 pav. A). Filamentai nesišakoja, bet kai kurie iš jų sulimpa ir sudaro pluoštus (44 pav. C).



44 pav. Spektrinės konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, užfiksuoti tiriant (A, B, F, G) šlapią ir (C, D, H, I) sausą GJE TPPS₄ agregatą. (A, C, F, H) Pralaidumo ir (B, D, G, I) fluorescenciniai vaizdai, registruoti naudojant (A–D) 404 nm ir (F–I) 488 nm sužadinimą. (E) Drėgno ir (J) sauso GJE agregato normuoti fluorescencijos spektrai, užregistruoti iš sunumeruotų sričių (iš šerdies: 1, 3, 5, 7 ir iš filamentų: 2, 4, 6, 8) paveiksluose. Skalės visiems vaizdams – 50 μm . Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2022).

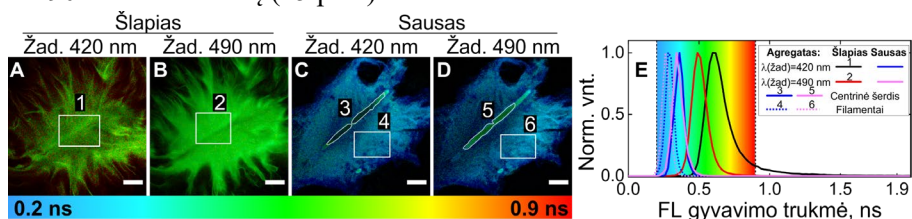
Žadinant 404 nm bangos ilgio lazeriu, GJE agregatų pralaidumo vaizduose matoma stipri sugertis centrinėje šerdyje, bet silpnėsnė filamentuose (44 pav. A, C). Tuo tarpu naudojant 488 nm žadinantį bangos ilgį, filamentuose stebima labai stipri sugertis (44 pav. F, H), kuri net užgožia šerdį. Fluorescenciniai vaizdai atskleidžia šerdies struktūrą GJE agregatuose (44 pav. G, I). Drėgnuose bandiniuose matoma, kad šerdis pasižymi stipriai silpnėsnė fluorescencija nei filamentai (44 pav. B, G).

Priešinga situacija matoma sausuose GJE agregatuose, kuriuose stebėta ryški šerdies fluorescencija (44 pav. D, I). Išdžiūvusi šerdis fluorescencijos vaizduose atrodo platesnė nei pralaidumo vaizduose (palyginti su 44 pav. C, H). Viršutinis šerdies sluoksnis ir aplinkinis iškilusių filamentų, nusileidžiančių žemyn link substrato, sluoksnis suteikia sausų agregatų fluorescencijos vaizduose šerdžiai platesnę išvaizdą (44 pav. D, I).

Spektrinių matavimų duomenys parodė užregistruotų fluorescencijos juostų priklausomybę nuo sužadinimo bangos ilgio (44 pav. E, J). Naudojant 404 nm bangos ilgį sužadinama TPPS₄ molekulių joninė forma ir, galimai, H agregatų juosta. Dominuojančio komponento maksimumo viršūnė registruojama ties 724 nm. Raudonai pasislinkę fluorescenciniai komponentai (743 nm ir 768 nm) taip pat demonstruoja didelį indėlį, skleidami stipresnį signalą iš centrinės šerdies, o fluorescencija ties 711 nm lieka santykinai maža. Tiesioginis J juostos sužadinimas ties 488 nm bangos ilgiu lemia žymiai didesnę fluorescenciją ties 711 nm, o fluorescencijos pikas ties 724 nm, taip pat ties 743 nm ir 768 nm tampa santykinai maži. Stebimi fluorescencijos spektrų pokyčiai rodo, kad GJE struktūra yra heterogeniška ir apjungia J ir H agregatų savybes. Visų fluorescencijos komponentų buvimas skirtinguose sužadinimo bangos ilgiuose rodo šių skirtingų molekulinį struktūrų ryšį. Detalesnę fluorescencijos spektrų ir jų komponentų analizę galima apžvelgti publikacijoje (Pleckaitis et al., 2022).

3.3.2. TPPS₄ agregatų fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdinimo tyrimas

Fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdinimo mikroskopijos matavimai taip pat buvo atliekami su šlapiais ir sausais GJE agregatais, naudojant 420 nm ir 490 nm sužadinimą (45 pav.).



45 pav. Šlapių ir sausų TPPS₄ agregatų fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdai, sužadinti (A, C) 420 nm ir (B, D) 490 nm bangos ilgio lazeriu. Visi vaizdai turi bendrą fluorescencijos gyvavimo trukmės reprezentuojančią spalvinę skalę. (E) Nuo amplitudės priklausomos vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės pasiskirstymas. Grafiko spalvotas fonas turi atitinkamą spalvų diapazoną, sutampantį su (A–D) vaizdais bei atitinkantį fluorescencijos gyvavimo trukmės intervalą 0,2–0,9 ns. Skalės – 100 μm. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2022).

Pateiktuose FLIM vaizduose (45 pav. A–D) buvo fiksuojama vidutinė fluorescencijos gyvavimo trukmė nuo 0,2 ns iki 0,9 ns. Vidutinis gyvavimo trukmių, gautų iš ROI zonų, pasiskirstymas spalvinėje skalėje pateiktas 45 paveiksle E.

Keturių FLIM vaizdų ir vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių pasiskirstymo (45 pav.) palyginimas atskleidžia ilgiausią vidutinį gyvavimo laiką, esantį šlapiuose agregatuose, kai buvo žadinama 420 nm. Šią ilgiausią vidutinę gyvavimo trukmę labiausiai galima priskirti H agregatams ir raudonai pasislinkusiems fluorescuojantiems komponentams. Tiesiogiai sužadinant į J agregatų sugerties juostą ties 490 nm bangos ilgiu, fluorescencijos gesimas pagreitėja. Tokį sutrumpėjimą galima būtų paaiškinti trumpesnėmis J agregatų gyvavimo trukmėmis (Kelbauskas et al., 2003), kurios lemia bendrą sujungtų agregatų fluorescencijos gesimą.

Kai GJE agregatas išdžiovinamas ore, filamentai ant substrato susispaudžia vienas ant kito, o šerdis šiek tiek suplokštėja (žr. SEM vaizdus 46 pav. C, D ir AJM vaizdus 47 pav.). Dėl to vidutinė fluorescencijos gyvavimo trukmė žymiai sutrumpėja, o tai įrodo fluorescencijos gesinimo vyksmus. Spektrinė ir kinetinė fluorescencinė spektroskopija parodo, kad džiūstant GJE agregatui, labiausiai gesinamos J agregatų struktūros.

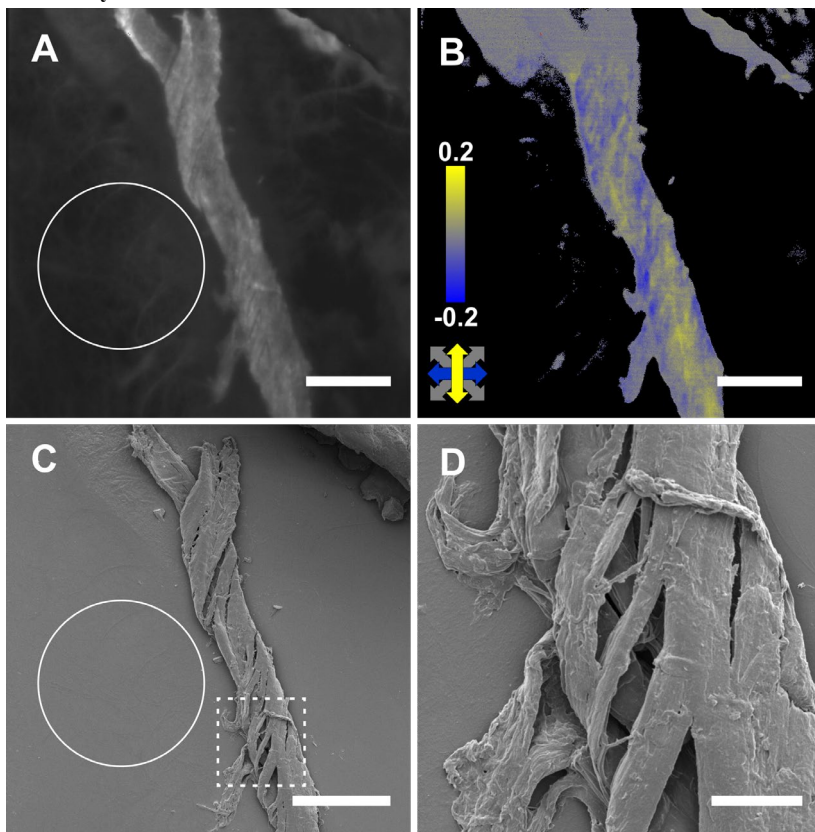
Palyginus fluorescencijos gyvavimo trukmę šerdyje ir filamentuose, matyti, kad trumpiausia fluorescencijos gyvavimo trukmė registruojama sausuose filamentuose. Šerdis gesinimas, palyginti su filamentais, džiūstant yra mažiau ryškus, todėl šlapių GJE agregatų fluorescencijos vaizduose šerdis atrodo tamsi (44 pav. B, G), bet sausame agregate išryškėja kaip fluorescencinė struktūra (44 pav. D, I). FLIM mikroskopija atskleidžia TPPS₄ agregatų tarpusavio ryšį, kuris yra svarbi savybė šviesos surinkimo pritaikyme, kuriant dirbtinės fotosintezės elementus. Eksitonų-eksitonų anihiliacijos tyrimai galėtų suteikti daugiau informacijos apie energijos perdavimo sritis GJE agregatuose (Barzdat et al., 1999).

TPPS₄ agregatai primena bakterijų šviesą surenkančius fotosintetinius pigmentų agregatus, esančius žaliųjų sieros bakterijų chlorosomose (Chappaz-Gillot et al., 2012; Jochum et al., 2008). Stebimi GJE agregatų fluorescencijos spektrų ir gyvavimo trukmės pokyčiai rodo energijos perdavimą tarp J ir H agregatų molekulinį struktūrų ir raudonai pasislinkusių fluorescuojančių komponentų. Filamentai pasižymi intensyvia fluorescencija ir kelių nanosekundžių fluorescencijos gyvavimo trukme, kuri sausuose agregatuose labai sumažėja dėl filamentų susispaudimo ant substrato. Ankštas susispaudimas palengvina energijos perdavimą tarp filamentų, todėl efektyviai gesinama šviesa. Energijos perdavimas filamentų viduje ir jų ryšys gali būti panaudoti efektyviam šviesos surinkimui. Todėl GJE agregatai gali

tapti perspektyviomis struktūromis šviesos surinkimo taikymui dirbtinėje fotosintezėje.

3.3.3. Koreliacija tarp SEM ir FDL D mikroskopijos duomenų

Išdžiovintas GJE agregatas, visų pirma, buvo analizuojamas naudojant FDL D mikroskopiją, o po to padengiamas 5 nm aukso sluoksniu ir vaizdinamas SEM. Struktūriniai vaizdai pateikti 46 paveiksle ir juos galima tiesiogiai palyginti tarp (A) fluorescencijos intensyvumo, (B) FDL D ir (C, D) SEM vaizdų.



46 pav. TPPS₄ GJE agregatų (A) fluorescencijos intensyvumo, (B) FDL D ir (C, D) SEM vaizdų tarpusavio palyginimas. Geltona ir mėlyna rodyklės, atitinkamai vertikaliai ir horizontaliai kryptims, reprezentuoja J agregatų sugerties dipolių orientaciją. Skalės yra 50 μm (A–C vaizdams) bei 10 μm (D vaizdui). (D) Centrinės šerdies vamzdis yra suformuotas iš daugiasluoksnių juostų, kurios spirališkai susisuka aplink šerdies ašį. Smulkūs filamentai matomi substrato paviršiuje apskritimu apibrėžtoje zonoje (A ir C) vaizduose. Pagal (Pleckaitis et al., 2022).

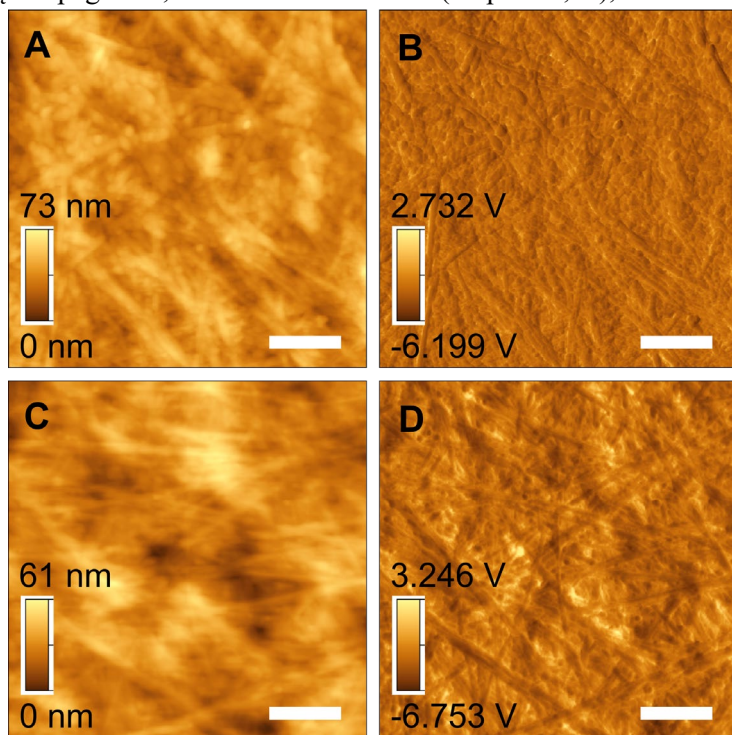
SEM vaizduose matyti vamzdžio formos centrinė šerdis (46 pav. C, D). Įtrūkimai vamzdyje atskleidžia daugiasluoksnių juostų struktūrą, kurioje juostos susisuka aplink vamzdelio ašį į spiralinį darinį. Palyginus dipolines

orientacijos FDL (46 pav. B) vaizduose su SEM (46 pav. C, D) vaizdais, matyti, jog juostų sluoksniai koreliuoja su mėlynomis arba geltonomis sritimis FDL, rodydami skirtingą molekulių orientaciją skirtinguose sluoksniuose. Kai kurios geltonos ir mėlynos sritys FDL žemėlapyje taip pat koreliuoja su įtrūkiais šerdies vamzdelyje, o tai rodo, kad fluorescencija iš vidinių juostelės dalių taip pat kyla iš išsidėsčiusių dipolių.

Prie centrinio vamzdelio prisitvirtinantys siūlai yra labai ploni, tad dėl džiovinimo ir dengimo SEM atlikti, jie atsiskiria ir suplokštėja ant pagrindo (žr. apibrauktą sritį 46 paveiksle A, C). Filamentai susikryžiuoja taip pat, kaip ir kitame skyriuje pateiktuose AJM vaizduose.

3.3.4. GJE TPPS₄ agregatų erdvinių savybių įvertinimas atomo jėgos mikroskopu

Detali GJE agregatų struktūra buvo ištirta didelės skiriamosios gebos atominės jėgos mikroskopu. GJE agregatai buvo išdžiovinami ant stiklo pagrindo ir skenuojami. 47 paveiksle galima matyti AJM užfiksuotus centrinės šerdies paviršiaus struktūros (47 pav. A, B) ir džiovintų filamentų, esančių ant pagrindo, šalia centrinės šerdies (47 pav. C, D), vaizdus.



47 pav. AJM vaizdai, gauti skenuojant GJE (A, B) šerdies paviršių ir (C, D) filamentus, išdžiūvusius ant substrato šalia šerdies. Pateikiami (A, C) aukštį ir (B, D) fazę reprezentuojantys vaizdai. Skalės – 1 μm. Pagal (Pleckaitis et al., 2022).

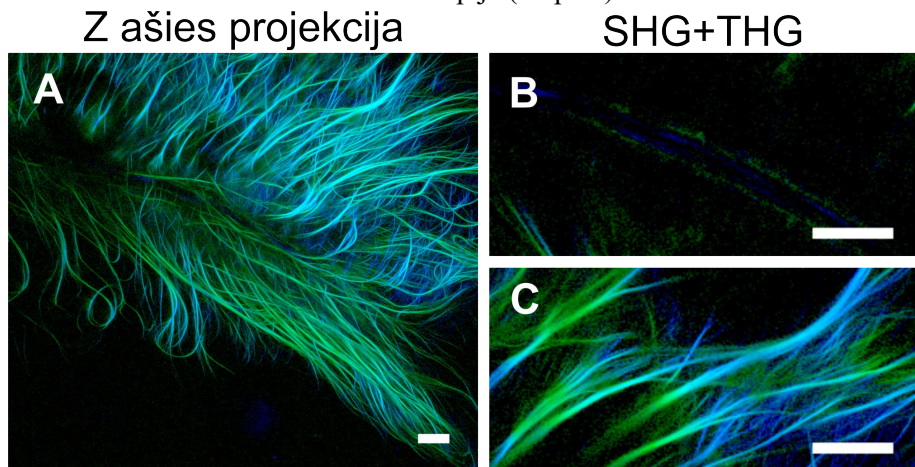
Centrinės šerdies paviršiuje buvo matoma granuliuota jo struktūra su keliais suplokštėjusiais filamentais, kylančiais iš šerdies skirtingomis kryptimis (47 pav. A, B). Filamentai susikryžiuoja vienas virš kito be išsišakojimų. Išmatuotas būdingas nanogranulių dydis buvo apie 120 ± 5 nm, o atskirų filamentų skersmuo – 70 ± 5 nm.

Analizuojant ant stiklo pagrindo išdžiovintus filamentus (47 pav. C, D) buvo pastebėta, kad jie taip pat susikryžiuoja vienas virš kito. Išvaizdinti filamentai (47 pav. C) yra panašaus skersmens kaip ir šerdies paviršiuje (47 pav. A). Analogiškos ir itin panašios susikryžiuojančių gijų struktūros buvo stebėtos kitų autorių publikacijose, kuriuose atomo jėgos mikroskopu skenuotos TPPS₄ J agregatų plėvelės buvo tirtos kaip potencialūs drėgmės jutikliai (Rimeika et al., 2006).

Filamentų srityje matomos tik kelios nanogranulių struktūros. Prie nanovamzdelių pritvirtintos nanogranulės arba flokuliuotos struktūros jau buvo pastebėtos anksčiau, kai TPPS₄ J agregatai buvo džiovinami ant substrato (Rotomskis et al., 2004). Čia aprašomais rezultatais parodoma, kad granuliuotos ir filamentinės nanostruktūros sudaro mikroskopinę šerdį, o vėliau ilgi filamentai prisitvirtina prie branduolio, sudarydami savitas hierarchines GJE agregatų superstruktūras.

3.3.5. GJE TPPS₄ agregatų antrosios ir trečiosios harmonikų generacijos signalo generavimo tyrimas

Šlapio GJE agregato 3D struktūrai išvaizdinti taip pat buvo panaudota multimodalinė SHG ir THG mikroskopija (48 pav.).



48 pav. GJE TPPS₄ agregato 3D struktūros, užfiksuotos poliakrilamido gelyje, vaizdinimas SHG (žalia) ir THG (mėlyna) mikroskopija. (A) Maksimali ašinė projekcija. Atskiros GJE agregato dalys: (B) centrinė šerdis ir (C) filamentai. Skalės juostos – 50 μ m. Adaptuota pagal (Pleckaitis et al., 2022).

SHG rodo, kad filamentai yra necentrosimetriški, o THG atsiranda dėl lūžio rodiklio ir besiskiriančio jautrumo (*angl. susceptibility*) tarp filamentų ir fiksavimo gelio terpės. Paveiksle parodyti susipynę filamentai (48 pav. A, C). Filamentų harmoniniai signalai mažėja link centro dėl pluoštų susikryžavimo fokusuojamame tūryje. Pati šerdis beveik negeneruoja SHG signalo (išskyrus jos paviršių (48 pav. B), o tai rodo beveik centrosimetrišką chromoforų organizaciją). THG signalas iš branduolio vidinio tūrio yra silpnas. Jis išryškina išilgines struktūras, greičiausiai iš šerdies cilindro vidinio paviršiaus, taip pat iš įtrūkimų ir sąsajų tarp vamzdelių sudarančių daugiasluoksnių juostų.

Netiesinis optinis signalas (antrosios ir/ar trečiosios harmonikų generacijos) porfirinų tipo molekulėse bei agregatuose buvo užfiksuotas ir kitų mokslininkų darbuose (Di Carlo et al., 2020; Fujiwara et al., 2004; Tessore et al., 2018). Įvairūs porfirinų pagrindu sukurti dažai (Khadria et al., 2018) ir porfirinų agregatai, įterpti į lipidinį dvisluoksnį (L. Cui et al., 2015), padėjo išvaizdinti ląsteles netiesinės mikroskopijos metu, kadangi jie efektyviai generuodavo SHG ir THG signalus.

Tokie tyrimai patvirtina, jog ir mūsų tirtasis GJE TPPS₄ agregatas ateityje galėtų būti pritaikomas kaip kontrastinis harmonoforas netiesinėje mikroskopijoje. Visgi, visų pirma, reikėtų išspręsti vieną iš problemų. GJE agregatas susiformavo stipriai rūgštinėje terpėje, tad tiesiogiai patekęs į neutralią ar silpnai rūgštinę ląstelinę aplinką, jis tiesiog suirtų ir ištirptų. Siekiant apsaugoti GJE agregatą ar jo dalis, būtų galima jį patalpinti į lipidinius dvisluoksnius (L. Cui et al., 2015) arba liposomines pūsleles, kurių viduje būtų išlaikoma rūgštinė terpė (Cheng et al., 2021). Be to, TPPS₄ yra ir fotosensibilizatorius, kuris iš pradžių galėtų pasitarnauti kaip diagnostinis žymuo, o vėliau, išardžius agregatą iki pavienių molekulių, būtų atliekama fotosensibilizuota terapija, sukelianti vėžinių ląstelių žūtį (Binder et al., 2011; Lapeš et al., 1996).

4. APIBENDRINIMAS

Šioje disertacijoje aprašyti tyrimai su skirtingomis dvigubo vaizdinimo nanomedžiagomis. Buvo tirtos magnetinės geležies oksido nanodalelės, dekoruotos fotoluminescuojančiais aukso nanoklasteriais, bei retųjų žemių metalais legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės, kurios buvo padengtos maghemito nanokristalais (β -NaYF₄ nanodalelės buvo legiruotos vien su erbiu – β -NaY_{0,8}[Er_{0,2}]F₄@ γ -Fe₂O₃, vien su iterbiu – β -NaY_{0,8}[Yb_{0,2}]F₄@ γ -Fe₂O₃ arba su erbiu bei iterbiu – β -NaY_{0,8}[Yb_{0,18}Er_{0,02}]F₄@ γ -Fe₂O₃). Taip pat buvo tiriami molekuliniai TPPS₄ agregatai bei iš jų susidariusiu unikali ir kompleksiška struktūra, primenanti jūros ežį.

Visų pirma, buvo atliekami skirtingų nanodalelių charakterizavimo eksperimentai, nustatomos jų erdvinės, optinės bei magnetinės savybės. Po įvairių charakterizavimų testavome nanodarinių biosuderinamumą, vertinome jų gebėjimą kauptis vėžinių ir sveikų ląstelių monosluoksniuose. Išskirtinai su MN-AuNK papildomai buvo įvertintas jų gebėjimas generuoti aktyvias deguonies formas bei pastarųjų sukeltas fotosensibilizacinis poveikis. Analogiškai buvo vertinami ir molekuliniai TPPS₄ agregatai, tiriant jų struktūrines savybes bei optines charakteristikas, tačiau su jais ląsteliniai tyrimai nebuvo atliekami.

Iš literatūros žinoma, kad magnetinės nanodalelės yra linkusios gesinti prie jų prijungtų medžiagų fluorescenciją (Q. Zhang et al., 2016), bet šiame darbe aprašomos kolegų sintetintos MN-AuNK neprarado nei fotoluminescencinių, nei magnetinių savybių (Mikalauskaite et al., 2022; Pleckaitis et al., 2023). Optinė analizė parodė AuNK skleidžiamą plačią ir stabilią NIR srities fotoluminescenciją, ilgą FL gyvavimo trukmę, sudarančią palankias sąlygas formuotis aktyviosioms deguonies formoms, apšvitinant MN-AuNK regimąją šviesą. Kitų autorių darbuose jau buvo pademonstruota, jog serumo baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai geba generuoti aktyvias deguonies formas, tokias kaip: singuletinis deguonis, peroksidai bei peroksinitritai (Jarockyte, Poderys, et al., 2022; Poderys et al., 2020). Visgi šie tyrimai buvo atliekami su pavieniais AuNK, o savo darbuose parodėme, kad apjungiant AuNK ir magnetines nanodaleles vienoje nanoplatformoje generavimo savybės neprarandamos (Pleckaitis et al., 2023). MRT kontrastinių savybių tyrimai parodė, kad MN-AuNK sukuria kontrastą T2 svertiniuose MR vaizduose, tad šie nanodariniai galėtų pasitarnauti kaip bimodalinės kontrastinės medžiagos FL ir MRT tyrimuose.

In vitro tyrimai patvirtino, kad MN-AuNK yra biosuderinamos bei nesukėlė tamsinio toksiškumo tirtoms ląstelių linijoms (29 pav.), o apšvitinamos ilgesnį laiką regimąją šviesą dėl generuojamų aktyviųjų

deguonies formų inicijuodavo fotosensibilizacinį terapinį efektą (31 pav.). Viena iš problemų išlieka dabartinės MN-AuNK nanoplatformos nespecifiškumas, kadangi ji neselektyviai kaupėsi ir vėžinėse, ir sveikose ląstelių linijose (30 pav.). To sprendimo būdas galėtų būti tolimesnis MN-AuNK paviršiaus funkcionalizavimas vėžinėms ląstelėms specifiskais ligandais (D. Chen et al., 2016; J. Qiao et al., 2013; Vankayala et al., 2015; Xia et al., 2018; C. Zhang et al., 2013). Visgi vienas iš MN-AuNK privalumų tampa ir jų trūkumu, kadangi žadinant fotoluminescenciją drauge inicijuojama ir aktyviųjų deguonies formų generacija. Laimei, šį trūkumą galima apeiti pasirenkant kitas vaizdinimo alternatyvas, pavyzdžiui, KT, rentgeno spindulius, fotoakustinį vaizdinimą ir pan. (C. Xu et al., 2017; C. Zhang et al., 2022). MN-AuNK ateityje galėtų tapti multimodalinio vaizdinimo kontrastiniu žymenimi, o diagnostinių bei terapinių savybių apjungimas leidžia jiems taip pat tapti potencialiu teranostiniu nanodariniu (van de Looij et al., 2022).

AKND@ γ -Fe₂O₃ struktūros buvo sudarytos iš β -NaYF₄ pagrindu sukurtų ir retųjų žemių elementais legiruotų apkonvertuojančių šerdžių, padengtų superparamagnetiniais maghemito nanokristalais. Erbiu ir iterbiu legiruotos nanodalelės pasižymėjo stipriausia regimosios šviesos emisija žadinant 980 nm bangos ilgio lazerine spinduliuote (35 pav.). Kitaip nei su aukso nanoklasteriais, AKND apkonversijos emisija sužadinama NIR spinduliuote, kuri yra skvarbesnė į biologinius audinius. Tad apkonvertuojančios nanodalelės galėtų padėti diagnozuoti giliau esančius navikus (Y. Sun et al., 2013, Luo et al., 2017).

Magnetinių savybių tyrimai patvirtino superparamagnetinį maghemito (γ -Fe₂O₃) nanokristalų elgesį net ir prijungus juos prie AKND (37-39 pav.). Detalesnė relaksometrijos analizė parodė, kad šie nanokompozitai galėtų būti naudojami kaip T2 MRT kontrastinė medžiaga. NaYF₄ matricoje itrio atomus būtų galima pakeisti gadoliniu, kuris suteiktų T1 MRT kontrastą (Ezerskyte et al., 2024), arba pačius maghemito nanokristalus papildomai sujungti su gadoliniu (Bae et al., 2010). Tokia nauja nanosistema pagerintų diagnostikos galimybes dėl skleidžiamos AKL bei drauge leistų atlikti dvigubą (T1-T2) MR vaizdinimą. Nepaisant to dabartiniai AKND@ γ -Fe₂O₃ nanokompozitai irgi yra puikus dvigubo vaizdinimo nanomedžiagų pavyzdys.

Be to, citotoksiškumo tyrimai *in vitro* parodė ganėtinai gerą jų biosuderinamumą su tirtomis sveikomis bei vėžinėmis ląstelių linijomis (40 pav.). Konfokalinės mikroskopijos metu parodėme, kad AKND@ γ -Fe₂O₃ kaupiasi vėžinėse ląstelėse (41 pav.). Nors tirtos dalelės pasižymėjo geru koloidiniu stabilumu, *in vitro* tyrimai prastokai atspindi realias organizmo

sąlygas, tad vertėtų ateityje tolimesnius tyrimus perkelti į 3D modelines sistemas (Butkiene et al., 2024) ar eksperimentinius gyvūnus (Y. Li et al., 2015; Y. Sun et al., 2013). Taip pat pastebėta, kad nanodalelės kraujotakoje yra linkusios aplipti įvairiais baltymais ir suformuoti baltyminių vainikų. Jo poveikis AKND stabilumui jau buvo tirtas mūsų kolegų (Voronovic et al., 2021). Visgi ateityje būtų prasminga panašų vertinimą atlikti ir su disertacijoje aprašomomis AKND@ γ -Fe₂O₃, kad galėtume išsiaiškinti, ar, pavyzdžiui, maghemito nanokristalai išlieka stabiliai padengę AKND paviršių net ir baltymais praturtintoje aplinkoje, ar nesikeičia jų superparamagnetinės savybės ir t. t.

Galiausiai prieiname prie paskutinės tirtos medžiagų grupės – molekulinį TPPS₄ agregatų bei iš jų per ilgą laikotarpį susiformavusio GJE agregato. Jis pasižymėjo unikalia struktūra, kuri anksčiau mokslinėje literatūroje porfirinų tipo agregatams išvis nebuvo aprašyta (žiūrėti 43 pav.). GJE agregatas turėjo centrinę šerdį ir nuo jos besidriekiančius, plaukelius primenančius filamentus. Panaudotos įvairios mikroskopijos rūšys leido dar detaliau išanalizuoti šių agregatų morfologiją, sandarą bei optines savybes.

Fluorescencinės analizės eksperimentai parodė, kad GJE struktūra buvo heterogeniška, ją sudarė skirtingo tipo J ir H agregatai, kurių fluorescencinės savybės aggregate priklausė nuo aplinkos sąlygų (drėgnos arba sausos) bei žadinimo bangos ilgių (44 pav.). Filamentai demonstravo intensyvią fluorescenciją, ypač drėgnomis sąlygomis, o šerdis – atvirkščiai, išryškėjo agregatą išdžiovinus. FLIM analizė atskleidė skirtingas fluorescencijos gyvavimo trukmes, susijusias su J ir H agregatais, bei galimus energijos perdavimo procesus tarp jų (45 pav.). Netiesinė mikroskopija atskleidė, kad GJE agregatų filamentai pasižymėjo necentrosimetrine sandara, o tai leido jiems efektyviai generuoti antrąją ir trečiąją harmonikas (48 pav.). Tai svarbi savybė netiesinėje optikoje, norint GJE agregatus pritaikyti kaip potencialius harmonoforus.

Apibendrinus šiuos rezultatus galima teigti, kad TPPS₄ GJE agregatai galėtų būti potencialiai pritaikomi fluorescencinėje bei netiesinėje mikroskopijoje kaip kontrastiniai žymenys (Khadria et al., 2018) ar teranostiniai agentai, atsižvelgiant į jų fotosensibilizacines savybes (Binder et al., 2011), bei dirbtinėse fotosintetinėse sistemose (Han et al., 2025).

IŠVADOS

1. Magnetinės geležies oksido nanodalelės, dekoruotos baltymais stabilizuotais aukso nanoklasteriais, pasižymėjo geru koloidiniu stabilumu, ilgai gyvuojančia raudonos spalvos fotoluminescencija, galinčia pilnai atsistatyti po fotoblukinimo, bei generavo T2 MR kontrastą veikiant išoriniu magnetiniu lauku. Taip pat MN-AuNK tirtose koncentracijose tamsoje nedarė poveikio nei krūties vėžio (MCF-7, MDA-MB-231), nei fibroblastų (NIH-3T3) ląstelių linijų gyvybingumui.
2. MN-AuNK specifiskumo neturėjo ir pateko tiek į krūties vėžines, tiek į fibroblastų ląsteles bei lokalizavosi viduląstelinėse pūslelėse aplink branduolius. Registruojama ląstelėse susikaupusių nanodalelių fotoluminescencija ir MRT metu fiksuojamos T2 kontrastinės savybės daro MN-AuNK dvigubo vaizdinimo nanoplatforma.
3. MN-AuNK, apšvitintos regimąja šviesa, generuoja singuletinį deguonį ir sukelia fotosensibilizacinį poveikį krūties vėžinėms ląstelėms. Skirtingo piktybiškumo ląstelėms šis poveikis skyrėsi ir panaudojus 80 J/cm^2 apšvitinimo dozę išryškėjo labiausiai – MCF-7 ląstelės buvo paveikiamos ir žudomos labiau nei MDA-MB-231 ląstelės.
4. Retųjų žemių metalais (erbiu ir iterbiu) legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės, padengtos maghemito nanokristalais, pasižymėjo stabilia regimosios šviesos diapazone registruojama apkonversijos emisija, sužadinama 980 nm spinduliuote, bei superparamagnetiniu elgesiu veikiant išoriniu magnetiniu lauku. Be to, AKND@ γ -Fe₂O₃ tirtose koncentracijose tamsoje krūties vėžio (MDA-MB-231) ląstelių linijos gyvybingumą sumažindavo iki 15 proc., o fibroblastų (NIH-3T3) – iki 25 proc.
5. AKND@ γ -Fe₂O₃ pateko į krūties vėžinių MDA-MB-231 ląstelių vidų ir lokalizavosi citoplazmoje. Vaizdinimo metu ląstelėse registruojama nanokompozitų apkonversijos emisija patvirtina optinės diagnostikos galimybes, o magnetinių savybių tyrimų metu atsirandantis superparamagnetinis elgesys bei stipresnis poveikis MR T2 trukmėms – kontrastinio MRT žymens savybės.
6. GJE TPPS₄ agregatai turėjo unikalią saviorganizacijos metu susiformavusią struktūrą – vamzdžio formos daugiasluoksnę centrinę šerdį ir prie jos prisitvirtinusius filamentus. Visas agregatas buvo sudarytas iš tarpusavyje susijungusių nanovamzdelių ir nanogranulių bei nepriklausomai nuo aplinkos sąlygų pasižymėjo fluorescencinėmis savybėmis, o netiesinės mikroskopijos metu generavo antrąją ir trečiąją harmonikas.

SUMMARY

Abbreviations

$^1\text{O}_2$ – singlet oxygen
AFM – atomic force microscopy
AuNCs – gold nanoclusters
BSA – bovine serum albumin
Ce6 – chlorin e6
CT – computed tomography
CW – continuous wave
Cys – cysteine
DC – direct current
deH₂O – deionized water
DIC – differential interference contrast
DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium
DMEM+FBS – Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with fetal bovine serum
DP-RCM – dual-polarization re-scan confocal microscopy
FC – field-cooled
FDLD – fluorescence detected linear dichroism
FL – fluorescence
FLIM – fluorescence lifetime imaging microscopy
GSU – giant sea urchin-like aggregate
Met – methionine
MN – magnetic nanoparticles
MN-AuNCs – magnetic nanoparticles decorated with gold nanoclusters
MR – magnetic resonance
MRI – magnetic resonance imaging
NA – numerical aperture
NIR – near-infrared
NMR – nuclear magnetic resonance
NPs – nanoparticles
PBS – phosphate-buffered saline
PDT – photodynamic therapy
PET – positron emission tomography
PL – photoluminescence
PMTs – photomultiplier tubes
QY – quantum yield
R6G – rhodamine 6G

RCM – re-scan confocal microscopy
 RD – recycling delay
 ROS – reactive oxygen species
 sCMOS – scientific complementary metal-oxide semiconductor
 SD – standard deviation
 SEM – scanning electron microscopy
 SHG – second harmonic generation
 SOSG – singlet oxygen sensor green
 SPECT – single photon emission computed tomography
 TE – time of echo
 TEM – transmission electron microscopy
 TEMED – N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
 THG – third harmonic generation
 TPPS₄ – meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine
 UCNPs – upconverting nanoparticles
 UCNPs@ γ -Fe₂O₃ – upconverting nanoparticles coated with maghemite nanocrystals
 ZFC – zero-field-cooled

INTRODUCTION

Cancer remains one of the world's leading causes of death. The prognostic forecast says that cancer might cause approximately 1,280,000 deaths in the European Union alone in 2025 (Santucci et al. 2025). Early diagnosis and intervention are the key components to improving treatment outcomes and survival rates of cancer patients. However, even with early detection, tumor removal can be challenging due to the aggressive nature of cancer cells, their rapid growth, high heterogeneity, and indistinguishable boundaries between tumor and healthy tissue (Xu et al. 2017b). These challenges highlight the need for advanced, real-time diagnostic and therapeutic approaches that can accurately define tumor margins for surgical resection and detect any remaining tumor cells (Junn et al. 2021; Xu et al. 2019b).

The field of medical imaging has undergone significant changes over the years. The diagnostic tools include a variety of methods, from X-ray and computed tomography (CT) to positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT), diagnostic sonography, magnetic resonance imaging (MRI) (Faragallah et al. 2021; Hussain et al. 2022) and optical imaging diagnostics (Wang et al. 2017). Each method has not only unique advantages but also its own limitations, which complicate early and accurate cancer diagnosis. To improve the accuracy of the obtained images and enhance the imaging contrast for these methods, various contrast agents are usually used (Najjar 2024). In the last few decades, the increasing research and integration of nanotechnology into medical field of diagnostics has led to significant advances, which opened the door to a new generation of nanomaterials as contrast agents (Chaughule et al. 2022; Wang et al. 2024). Such markers could help detect cancer at an early stage while also increasing the chances of patient survival. For example, magnetic nanoparticles could improve MRI (Farzin et al. 2020), while optical diagnostics could benefit from photoluminescent (PL) nanomaterials such as protein-stabilized gold nanoclusters (Chen et al. 2023), rare-earth doped upconverting (Li and Chen 2022), or harmonic nanoparticles (Gheata 2024).

However, even with the use of advanced contrast agents, individual imaging methods are often not effective enough to accurately identify the primary tumors. For example, X-ray examinations lack specificity, optical diagnostics are limited by the depth of light penetration into deeper tissues, and MRI lacks better resolution at the cellular level. In the clinic, several other problems are encountered when using conventional diagnostic methods. Often contrast agents used for different methods are only suitable for that specific

method, so to apply at least a couple of imaging modalities, the patient would have to be injected with separate contrast-enhancing agents (Najjar 2024). This results in the patient undergoing more interventional procedures, there is a risk of complications (e.g., infections). Also, different contrast agents can interfere with each other's effectiveness, it would be necessary to wait for the first contrast to be eliminated from the body before injecting the next one, etc. Moreover, most of the time, various contrast markers are non-specific and toxic, which means that they accumulate not only in cancer tumors but also in healthy tissues, thus poisoning the body and posing a risk to the patient's health (Andreucci et al. 2014).

Considering the above problems, scientists proposed new hybrid nanomaterial formulations that would include dual or multimodal imaging capabilities (Wang et al. 2022). In this way, the need for different traditional contrast agents is minimized, and the burden of interventional procedures is reduced for the patient. Combining different imaging modalities in one nanoplatform is an especially valuable tool for early diagnosis of various diseases, treatment monitoring, and prognosis. This compensates for the shortcomings of some diagnostic tools with the advantages of others while obtaining more detailed information about the studied cancerous structures. More importantly, nanoparticles (NPs) can be modified and functionalized as needed, giving them much better tumor-specific targeting, resulting in lower dose requirements and reduced systemic toxicity. Moreover, advanced theranostic nanosystems combine multiple diagnostic modalities with therapeutic properties (Sun et al. 2023).

Scientists have already laid a solid foundation in the development and study of dual-imaging nanomaterials. Various combinations of imaging techniques are being tested (Wang et al. 2022), such as SPECT/MRI (Karageorgou et al. 2022) using magnetic nanoparticles with a radionuclide attached, FL/SPECT – by integrating fluorescent (FL) gold nanoclusters and radioactive technetium (Jarockyte et al. 2022b), or FL/MRI – a combination obtained, for example, by incorporating gadolinium, a magnetic resonance (MR) contrast agent, into upconverting NPs (UCNPs) (Ezerskyte et al. 2024).

Gold nanoclusters (Du et al., 2018; J. X. Xu et al., 2019) as well as magnetic nanoparticles (Farzin et al., 2020) have received increasing attention due to *in vitro* and *in vivo* imaging possibilities. Combining them into a single hybrid nanomaterial would result in the advantages of the properties of both materials in one system – photoluminescence from gold nanoclusters and MR contrast from magnetic nanoparticles (Haghighi et al., 2019; C. Wang et al., 2015). Similar multimodality possibilities can be achieved by coating magnetic nanoparticles with a gold layer or combining them with gold

nanoparticles (Cândido et al., 2023; Lau et al., 2023; Silva et al., 2016). On the other hand, the former nanopatform, due to the proteins used during synthesis to stabilize the gold nanoclusters, demonstrates good biocompatibility, and previous studies have shown that gold nanoclusters, in addition to diagnostic properties, are also capable of generating reactive oxygen species under light irradiation, which can be applied for therapeutic cancer treatment purposes (Poderys et al., 2020).

Another type of dual-imaging nanomaterial that is receiving a lot of attention is rare-earth-doped upconverting nanoparticles combined with magnetic nanoparticles. Upconverting nanoparticles can convert deeper tissues-penetrating infrared radiation into visible light emission, while magnetic nanoparticles provide magnetic resonance contrast. In this way, a multifunctional system is obtained that is suitable for the combined applications of various diagnostic methods (Materia et al., 2017; Sikora-Dobrowolska et al., 2024). In addition, when using rare-metal nanoparticles, it is possible to create a specific system with separate diagnostic and therapeutic functions controlled by different wavelengths (Skripka et al., 2019).

In addition to these hybrid dual-imaging nanoparticle systems, molecular solutions are also possible. One of them is meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine (TPPS₄). It and other porphyrin derivatives are well-known photosensitizers that can generate reactive oxygen species and facilitate the treatment of oncological diseases by photodynamic therapy (Kou et al., 2017). TPPS₄ molecules are also capable of forming molecular aggregates during self-assembly (Short et al., 2013; Takayoshi Kobayashi, 2011). Moreover, previous scientific works have demonstrated that both fluorescence and nonlinear optical signals of the second and/or third harmonic generation are recorded in porphyrin-type molecules, including TPPS₄, and their aggregates (Di Carlo et al., 2020; Fujiwara et al., 2004; Alizadeh et al., 2023; Tessore et al., 2018). Due to these properties, TPPS₄ molecular aggregates can serve not only as a model system for molecular self-assembly studies but also as a contrast agent for bimodal imaging combining fluorescence and nonlinear microscopy.

However, studies of dual-imaging nanomaterials remain a new, still-developing field, which lacks more comprehensive and detailed data both on the nanomaterials themselves and on their biocompatibility and biomedical applicability. Therefore, the aim of this dissertation, along with the following objectives to achieve it, was established:

The aim: to investigate the potential of various bimodal imaging nanomaterials for cancer diagnostics.

Objectives:

1. To characterize the spatial, optical, and magnetic properties of magnetic iron oxide nanoparticles decorated with protein-stabilized gold nanoclusters and to evaluate their biocompatibility *in vitro*.
2. To determine the diagnostic bimodal imaging (PL and MRI) capabilities of magnetic nanoparticles decorated with gold nanoclusters *in vitro*.
3. To investigate the ability of magnetic nanoparticles decorated with gold nanoclusters to generate singlet oxygen and to evaluate their photosensitizing effect on different tumorigenicity cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231.
4. To characterize the spatial, optical, and magnetic properties of upconverting nanoparticles coated with maghemite nanocrystals and evaluate their biocompatibility *in vitro*.
5. To evaluate the diagnostic bimodal imaging (emission and MRI) capabilities of upconverting nanoparticles coated with maghemite nanocrystals *in vitro*.
6. To investigate the spatial and optical properties of TPPS₄ molecular aggregates and to evaluate their potential in bimodal imaging of fluorescence and nonlinear microscopy.

SCIENTIFIC NOVELTY AND PRACTICAL SIGNIFICANCE

The scientific community has developed a wide range of dual-imaging nanomaterials to date, combining different diagnostic tools. Protein-stabilized gold nanoclusters (AuNCs) have excellent biocompatibility, exhibit photoluminescence in the near-infrared region (NIR), which falls within the biological transparency window, and therefore could be imaged in deeper tissues, and are easily modified. AuNCs also have other unique properties, such as reversible photobleaching (Hemmateenejad et al. 2016) and the ability to generate reactive oxygen species (ROS) under visible light irradiation. The ROS generation efficiency of AuNCs is sufficient to cause a photodynamic effect for killing cancer cells (Poderys et al. 2020).

The AuNCs that we studied did not lose these properties even when combined with magnetic nanoparticles. There are quite a few studies on magnetic nanoparticles coated with a gold layer/shell or combined with gold nanoparticles (Cândido et al. 2023; Lau et al. 2023; Silva et al. 2016). However, there are very few scientific publications in which magnetic iron oxide or cobalt ferrite nanoparticles are directly decorated with photoluminescent gold nanoclusters (MN-AuNCs) without additional, complex components, and we showed this in our publications (Mikalauskaite

et al. 2022; Pleckaitis et al. 2023). MN-AuNCs demonstrated both optical and magnetic contrast-enhancing properties combined into a single nanostructure. Moreover, without any additional modifications, MN-AuNCs exhibited photosensitizing properties. Therefore, our studied MN-AuNCs combine diagnostic and therapeutic properties into a single nanoplatform, which shows the potential of becoming an innovative theranostic nanomaterial – the focus of many researchers globally.

Another group of dual-imaging nanomaterials we studied is rare-earth metal-doped upconverting nanoparticles coated with maghemite nanocrystals (UCNPs@ γ -Fe₂O₃). They are also intended for the bimodal combination of optical biopsy and magnetic resonance. The advantage of these nanocomposites is excitation by NIR radiation. Due to better NIR penetration into tissues, this would allow upconverting nanoparticles to be excited in tumors located in deeper tissue layers than traditional fluorescent nanoparticles, which are excited by visible light. Typically, upconverting nanoparticles are synthesized by thermal decomposition, hydrothermal synthesis, or co-precipitation methods (Mehrdel et al. 2021). In our work, we demonstrated that UCNPs@ γ -Fe₂O₃ can be obtained by the polyol synthesis (Parvzian et al. 2024). This is a rarely used method for the synthesis of such nanoparticles. The rapid and straightforward nature of this synthesis method is the main advantage, which would allow us to successfully increase the efficiency of nanoparticle synthesis and the amounts obtained that would be necessary for the potential application of UCNPs@ γ -Fe₂O₃ in clinical practice or industry.

Finally, molecular aggregates of meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine (TPPS₄) were studied. TPPS₄ is a photosensitizer that has been analyzed for many years, known not only for its sensitizing properties but also for its ability to aggregate into ordered, self-organized structures – nanotube-shaped aggregates in an acidic environment (Short et al. 2013; Takayoshi Kobayashi 2011). Disordered granular or flat aggregated structures are also possible (Rotomskis et al. 2004). In our work, we analyzed a unique, complex structure resembling a sea urchin that we demonstrated for the first time. Although the size of this aggregate is much larger (micrometers and even millimeters in size) than typical nanomaterials, during experiments we showed that over an extended period the aggregate was formed from ordinary individual nanotubes and nanogranules, which connected with each other and formed a complex hierarchical structure. The analysis of such self-forming structures can help to better understand the process of abiogenesis and the processes of molecular self-organization. We also showed that this aggregate, in addition to the conventional fluorescence signal, can generate second and third harmonics

during nonlinear microscopy imaging. This expands its potential applications not only in studies of molecular self-organization but also as a contrast marker in bimodal imaging.

DEFENSIVE STATEMENTS

1. Magnetic iron oxide nanoparticles decorated with gold nanoclusters and upconverting rare earth-doped nanoparticles coated with maghemite nanocrystals each combine optical and magnetic properties within a single nanopatform.
2. Both magnetic iron oxide nanoparticles decorated with gold nanoclusters and upconverting nanoparticles coated with maghemite nanocrystals accumulate in cancer cells and show no cytotoxicity when kept in the dark.
3. When exposed to visible light, magnetic iron oxide nanoparticles decorated with gold nanoclusters produce reactive oxygen species (such as singlet oxygen), which trigger cancer cell death.
4. Molecular TPPS₄ aggregates emit fluorescence and create both second and third harmonic generation signals during nonlinear microscopy imaging.

1. MATERIALS AND METHODS

Magnetic nanoparticles decorated with gold nanoclusters (MN-AuNCs) were synthesized and obtained from the Nanostructure Laboratory of the Center for Physical Sciences and Technology. The initial concentration of the obtained nanoparticle solution was 25.5 mg/mL.

Upconverting nanoparticles coated by superparamagnetic nanocrystals (UCNPs@ γ -Fe₂O₃) were synthesized and obtained from the ITODYS laboratory at the University of Paris Cité. The nanoparticles were obtained in the form of dried powder. Optical properties and biocompatibility studies were performed at the Laboratory of Biomedical Physics of the National Cancer Institute.

Note: studies performed with different nanomaterials were carried out independently, during separate experiments. Certain studies were performed according to the same method protocols. To avoid repetition of this information in the “Materials and Methods” section, it is presented in summarized fashion. If the methods differ, they are provided separately for specific nanomaterials.

1.1. Materials

The following reagents were used for Fe₃O₄ nanoparticle synthesis and gold nanocluster conjugation: FeSO₄·7H₂O, Fe₂(SO₄)₃·5H₂O, phosphate buffered saline (PBS), D,L-cysteine (Cys), D,L-methionine (Met), bovine serum albumin (BSA), NaOH, and HAuCl₄ (all from Sigma-Aldrich). Deionized water was used throughout.

During syntheses of UCNPs@ γ -Fe₂O₃, yttrium(III), ytterbium(III), and erbium(III) acetate salts (99.9%, Sigma-Aldrich), ethylene glycol-diethylene glycol mixture ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), oleic acid (70%, Fisher Science), ammonium fluoride, and NaOH (Sigma-Aldrich) were used. γ -Fe₂O₃ nanocrystals were synthesized using diethylene glycol (Across Organics) and ferric acetate (95%, Sigma-Aldrich).

TPPS₄ (meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine) was obtained from Sigma-Aldrich and used without further purification. For the giant sea urchin-like (GSU) aggregate immobilization, polyacrylamide gel was prepared (Osváth et al., 1994) using acrylamide, 98+%, N,N'-methylenebisacrylamide, 97%, ammonium peroxydisulfate (98.0% min), and N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED, 99%). All purchased from ThermoFisher Scientific.

1.2. Syntheses of nanoparticles

1.2.1. Synthesis of magnetite NPs

Fe₃O₄ nanoparticles were synthesized from an alkaline solution of FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃ and 0.2 mol/L amino acid as a chelating agent at pH 12.1. The synthesis was conducted at 70°C for 3 h in an N₂ atmosphere and mild stirring of the medium. The synthesized NPs were collected by centrifugation, rinsed, and dried at 60°C.

1.2.2. Conjugation of magnetic NPs with gold nanoclusters

Red luminescent Fe₃O₄ NPs were synthesized in a Monowave 300 microwave reactor (160 W, 60 min) (Anton Paar, USA). Two solutions – Fe₃O₄ NPs in PBS and BSA with 10 mmol/L HAuCl₄ and Met – were mixed, adjusted to pH 12.4 with NaOH, and irradiated at 160 W at 60°C and 45°C for 60 min to form Fe₃O₄@Au@BSA NPs (MN-AuNCs). The product was centrifuged, washed, and dialyzed for 24 h using a 10 kDa MWCO SnakeSkin™ bag (Thermo Fisher Scientific, USA).

1.2.3. Synthesis of UCNPs and coating with γ -Fe₂O₃ nanoprobles

The synthesis of water-soluble β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}] $\text{@}\gamma$ -Fe₂O₃ particles involved a three-step process. First, the generation of β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ seeds in a polyol solution. Second, γ -Fe₂O₃ nanocrystals were grown around these seeds in a fresh polyol medium. Third, the resulting nanocomposites were functionalized by hydrophilic citrate ligands, making them water dispersible.

Yttrium(III) acetate (25.0 M or 28.9 M) with appropriate amounts of ytterbium(III) and erbium(III) acetates was dissolved in 125.0 mL of 20:80 v/v ethylene glycol–diethylene glycol and 62.5 mL of oleic acid. Ammonium fluoride and sodium hydroxide were added at a Y:F:Na or (Y+Ln):F:Na ratio of 1:32:2.5. The mixture was refluxed (6°C/min) for 30 min, then cooled, centrifuged, and washed. The same protocol was used to prepare β -NaY_{0.8}[Yb_{0.2}]F₄ and β -NaY_{0.8}[Er_{0.2}]F₄ reference nanoparticles.

During another step, 300 mg of dried seeds were dispersed in 31 mL of diethylene glycol with 3 mmol of iron acetate and 0.125 mL of deionized water, then refluxed for 3 h. The resulting precipitate was centrifuged, washed with ethanol and water, and air-dried. Citrate grafting was achieved via ligand exchange. Typically, 1 g of β -NaY_{0.8}[Ln_{0.2}]F₄ $\text{@}\gamma$ -Fe₂O₃ (Ln = Yb, Er, or Yb–Er) was dispersed in 200 mL of 50 mM trisodium citrate solution, stirred, and heated at 100°C for 30 min. The product was magnetically separated, washed with ethanol, and dried at 60°C.

1.3. Preparation of TPPS₄ aggregates

A 10⁻³ M TPPS₄ stock solution was prepared in distilled water and diluted to 2 × 10⁻⁵ M with 0.1 M HCl to induce self-assembly of supramolecular structures. The 50 mL solutions were aged in sealed glass containers in the dark at room temperature for over a year. For microscopy, “wet” GSU TPPS₄ aggregates were imaged in the original medium or embedded in 5% polyacrylamide gel (acrylamide:bis-acrylamide 30:1), polymerized with 0.5% ammonium persulfate and 0.5% TEMED (Osváth et al., 1994). “Dry” GSU samples were prepared by air-drying aggregates on a cover slip.

1.4. Characterization of spatial properties of nanomaterials

1.4.1. Hydrodynamic size and zeta potential measurements

The hydrodynamic diameter of particles was measured using the dynamic light scattering technique. Hydrodynamic diameter and zeta potential of the

samples were examined using Zeta Plus PALS (Brookhaven Inc., Suffolk County, NY, USA) or Zetasizer NanoZS (MALVERN PANALYTICAL, Worcestershire, UK) for MN-AuNCs and UCNPs@ γ -Fe₂O₃, respectively.

1.4.2. Atomic force microscopy (AFM)

MN-AuNCs on mica and air-dried GSU aggregates on a glass substrate were imaged using an Innova® Veeco AFM (Bruker Corporation, USA) with SPMLab 7.11 software. Scans were performed in tapping mode with a <15 nm radius silicon tip (TESPA, Bruker) at 230–410 kHz. Topographic images (512 × 512 pixels) were captured at a 2 Hz scan rate: 2 × 2 μm and 1 × 1 μm for MN-AuNCs and 5 × 5 μm for GSU aggregates.

1.4.3. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM measurements of UCNPs@ γ -Fe₂O₃ were carried out on a Supra40 ZEISS FEG microscope, operating at 5.0 kV and equipped with an In-lens detector and an Everhart–Thornley secondary electron detector.

A drop with TPPS₄ aggregates was air-dried on a 5 mm × 5 mm glass cover slip, mounted on an SEM stub and covered with 5 nm gold by a Quorum Q150T ES sputter and then observed in a JEOL JSM-7100F/LV SEM (JEOL Ltd., Japan). Specimens were imaged by detecting secondary electrons at 3 kV accelerating voltage.

1.4.4. Transmission electron microscopy (TEM)

TEM measurements of UCNPs@ γ -Fe₂O₃ were conducted using a JEM 2010 UHR microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 200 kV. Micrographs were collected with a Gatan Orius SC1000 (4008 × 2672 pixel) CCD camera (AMETEK, Berwyn, US). Images were analyzed using ImageJ 1.46 software.

1.5. Spectroscopic measurements

1.5.1. Steady-state absorption and fluorescence spectroscopy

Optical densities of MN-AuNCs dispersed in deionized water, PBS, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), and DMEM+FBS were measured from 350 to 800 nm using a Varian Cary 50 UV/Vis spectrophotometer (Varian Inc., Australia). PL spectra were recorded under 488 nm excitation using an Edinburgh Instruments FLS920 spectrometer

(Edinburgh Instruments Ltd., UK). Colloidal stability was assessed by monitoring PL intensity over two weeks.

Emission spectra of UCNPs@ γ -Fe₂O₃ in various aqueous media were measured with the same spectrometer using a 720 mW, 980 nm CW diode laser. All measurements were performed in 1 cm pathlength polystyrene cuvettes.

1.5.2. Time-resolved fluorescence spectroscopy

Fluorescence decay measurements were performed using time-correlated single-photon counting on an FLS920 spectrometer with an S900-R photomultiplier (Hamamatsu, Japan) and a 405 nm diode laser (pulse <200 ps, 100 kHz). Decays were recorded at 685 nm (MN-AuNCs emission peak) by collecting 1000 counts after preparation and at 1 and 2 weeks post-synthesis.

1.5.3. Photostability

Photostability of MN-AuNCs was assessed by irradiating 2 mL samples in plastic cuvettes (1 cm² exposed area) using a Max-302 Xenon light source (Asahi Spectra, Japan) at 402, 470, and 630 nm. A total dose of 40 J/cm² was delivered in five sessions (1, 3, 6, 10, and 20 J/cm²), with irradiation times based on light source power. After irradiation, samples were kept in the dark for 24 h. Photostability was evaluated by changes in PL intensity (at the maximum) of MN-AuNCs under 488 nm excitation.

1.5.4. Evaluation of photoluminescence quantum yield

The photoluminescence quantum yield (QY) of MN-AuNCs was determined using as a reference rhodamine 6G (R6G, QY = 95%, Merck Group, Germany) (Lakowicz, 2006). Absorption spectra of R6G and MN-AuNCs were measured to identify the intersection point ($\lambda_{\text{ex}} = 513$ nm). PL spectra were then registered under this excitation, and QY was calculated by integrating the area under the PL spectrum and applying Equation (1):

$$\varphi = \varphi_f \frac{I}{I_f} \quad (1)$$

where φ – quantum yield, I – integrated PL intensity, and f – a known fluorophore.

1.6. Evaluating generation of singlet oxygen

Singlet oxygen generation was assessed using Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, Invitrogen, USA). SOSG (100 μg) was dissolved in 33 μL methanol and diluted with deionized water to a 50 μM stock solution. Three MN-AuNCs + SOSG samples were prepared and irradiated at 402, 470, and 630 nm using a MAX-302 xenon light source, delivering 40 J/cm^2 total dose as in photostability tests. A 1 μM chlorin e6 solution was used as a reference photosensitizer. SOSG fluorescence ($\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) was measured before and after irradiation, and the change in intensity was plotted.

1.7. Characterization of magnetic properties

1.7.1. Magnetic properties of MN-AuNCs

MRI characterization of MN-AuNCs was conducted using a 1.5T clinical MRI scanner (Philips Achieva). Eppendorf tubes containing 0.2 mg/mL iron oxide NPs were placed in an MRI non-contrasting holder and immersed in water to ensure homogeneous magnetic field distribution. A reference tube containing 0.12 mg/mL Gd-based contrast agent (MagneGita) was included. T1-weighted images were acquired using a turbo spin-echo inversion recovery sequence, and T2 values were obtained from T2-weighted turbo spin-echo images.

1.7.2. Routine magnetometry of UCNPs@ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

The variations of the magnetization M as a function of temperature T and as a function of magnetic field H were measured in solid state, using an MPMS-5S SQUID magnetometer (Quantum Design, San Diego, US). 20 mg of the dried powder were slightly compacted in a plastic tube to avoid movement during measurements. DC magnetization was recorded as a function of temperature $M(T)$, under a DC magnetic field of 500 Oe, operating within ZFC and FC conditions, between 5 K and 330 K. Also, magnetization was recorded as a function of magnetic field $M(H)$ at 310 K (37°C) by cycling the magnetic field between 70 kOe and -70 kOe .

1.7.3. Magnetic relaxometry of UCNPs@ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Relaxometry was performed on freshly vortexed aqueous colloids of $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]\text{@}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (5.6 mg/mL) and $\beta\text{-NaY}_{0.8}[\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02}]$ (5.2 mg/mL), both citrate-coated, with [Fe] and [Er] concentrations from 25 μM to

2.5 mM. Samples (350 μ L) were placed in 7.5 mm NMR tubes and measured at 310 K using a Minispec mq60 relaxometer (Bruker, 60 MHz/1.41 T, Germany). T2 was measured via the Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with inter-echo times (TE) between 0.04 and 0.5 ms, fitting mono-exponential decay of 1500–3000 points. T1 was measured by inversion recovery with 15 data points and fitting mono-exponential decay. Recycling delay (RD), TE, and gain were optimized to ensure measurement uncertainty below 0.1% across iron concentrations.

1.8. Brightfield and spectral confocal fluorescence microscopy

Brightfield and differential interference contrast (DIC) microscopy were used to image TPPS₄ aggregates with 20 $\times$ /NA 0.5 or 40 $\times$ /NA 0.95 objectives (Nikon Plan Fluor, Japan) and a Nikon DS-Fi2 CCD camera. GSU aggregates were also analyzed by confocal laser scanning microscopy (Nikon Eclipse TE2000-S, C1 plus) equipped with a fiber-coupled spectrometer (QE65000, Ocean Optics, UK). Transmittance and fluorescence imaging employed 404 nm diode or 488 nm argon ion lasers, with emission detected through a 688/134 nm band-pass filter (Semrock, USA). Image acquisition and processing were done using Nikon EZ-C1 v3.91 and ImageJ v1.53a (NIH, USA) (Schneider et al., 2012).

1.9. Fluorescence lifetime imaging microscopy

Fluorescence lifetime imaging (FLIM) was performed using a Lifetime and Fluorescence Correlation Spectroscopy upgrade for Nikon C1si confocal microscopes (PicoQuant, Germany). Excitation was from a Fianium WhiteLase Micro supercontinuum laser (30 MHz pulse rate) (NKT Photonics, Denmark), with 420/10 nm and 490/10 nm band-pass filters for TPPS₄ H- and J-aggregates excitation, respectively. Fluorescence was detected after a 620 nm long-pass filter by a single-photon avalanche photodiode and recorded with a PicoHarp 300 time-correlated single-photon counter. Images (512 $\times$ 512 pixels) were acquired with $\sim$ 500 counts per pixel. FLIM data were analyzed with SymPhoTime 64 v.2.4.4874 software, which calculated amplitude-weighted average lifetimes and plotted lifetime distributions.

1.10. Fluorescence-detected linear dichroism microscopy

Fluorescence-detected linear dichroism (FDLD) imaging was performed using a DP-RCM system (Steinbach et al., 2019). A Re-scan Confocal Microscope (Luca et al., 2013) (RCM, Confocal.nl, Netherlands) was attached

to a Nikon Eclipse Ti inverted confocal fluorescence microscope. Excitation was provided by a 30 mW 488 nm diode laser (Cobolt AG, Sweden), with polarization modulated by a liquid crystal retarder (Thorlabs, Germany) to produce vertical and horizontal polarization. A 40 $\times$ /NA 0.60 air objective was used. Fluorescence was selected using quad-band dichroic and emission filters (Chroma Technology). Images were captured by an Andor Zyla 4.2 PLUS sCMOS camera (Oxford Instruments, UK) and acquired with NIS-Elements BR software (v4.60). Data were post-processed using a custom Matlab routine (Steinbach et al., 2019).

1.11. Multimodal second- and third-harmonic generation microscopy

Second (SHG) and third (THG) harmonic generation images were acquired using a home-built laser-scanning microscope with a femtosecond oscillator (Light Conversion FLINT, Lithuania) emitting sub-100 fs pulses at 76 MHz, 1030 nm wavelength. The excitation beam, linearly polarized at 45°, was focused on a Nikon 20 $\times$ /NA 0.75 objective. Harmonic signals were collected by a lens (NA 0.5), separated by a dichroic mirror, filtered, and detected by photon-counting PMTs (Hamamatsu H10682–210). The sample was moved axially using a DC-servo stage. Scanning, axial stepping, and data acquisition were controlled via LabView. Images covered 780 μ m fields at 1 μ m pixel resolution and 20 μ s dwell time, with Z-stacks recorded every 5 μ m over 210 μ m. Data analysis and 3D rendering were performed using Python and Fiji (Schindelin et al., 2012).

1.12. Cell culturing and incubation with nanoparticles

MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines and NIH-3T3 mouse embryonic fibroblasts were used as *in vitro* models (MCF-7 from the European Collection of Cell Cultures; MDA-MB-231 and NIH3T3 from ATCC). Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin at 37°C in 5% CO₂.

For MN-AuNCs uptake studies, cells were seeded (30,000 cells/well) in 8-well microscopy plates, grown under standard conditions, then incubated with 2.55 mg/mL MN-AuNCs for 24 h. Afterward, the medium was replaced with 10 μ g/mL Hoechst 33258 nuclear dye for 15–20 min, then replaced again for live-cell imaging by laser scanning microscopy.

Experiments with UCNPs@ γ -Fe₂O₃ followed the same protocol, but with MDA-MB-231 cells only. A concentration of 0.1 mg/mL β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ nanoparticles was used. Prior to confocal

microscopy imaging, nuclei were stained with Hoechst 33258, actin filaments with 165 nM Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, and cells were fixed with 4% paraformaldehyde.

1.13. Imaging cells with a confocal fluorescence microscope

The accumulation of MN-AuNCs and UCNPs@ γ -Fe₂O₃ in cells was imaged using a Nikon TE-2000U microscope equipped with a C1si laser scanning confocal system and a 60 $\times$ oil immersion Plan Apo VC objective (NA 1.4). Photoluminescence of MN-AuNCs and Alexa Fluor 488 Phalloidin was excited with a 488 nm laser, UCNPs@ γ -Fe₂O₃ emission was excited at 980 nm, and Hoechst 33258 nuclear stain was excited with a 404 nm diode laser. Fluorescence signals were detected using a three-channel RGB detector with bandpass filters at 450/17 nm (blue), 545/45 nm (green), and 688/67 nm (red).

Nuclear dye fluorescence was recorded in the blue channel, actin filament staining and UCNPs@ γ -Fe₂O₃ emission in the green channel (separate scans), and MN-AuNCs PL in the red channel. To avoid spectral overlap with Alexa Fluor 488, UCNPs@ γ -Fe₂O₃ emission was represented with a red pseudo color. Image processing was performed using Nikon EZ-C1 software (v3.80).

Confocal Z-stack imaging was conducted to obtain three-dimensional representations of MN-AuNCs accumulation within cells.

1.14. Visualization of magnetic γ -Fe₂O₃ in cells

For visualization of iron oxide, MDA-MB-231 cells fixed with 4% glutaraldehyde were stained using the Prussian Blue Cell Staining Reagent Pack (Sigma-Aldrich). After 24 hours of particle incubation, the cells were treated for 30 minutes with 2% potassium ferrocyanide (Perl's reagent, Sigma-Aldrich) in 3.7% hydrochloric acid. This reaction forms Prussian blue (ferric ferrocyanide) by binding ferric ions present in the cells to ferrocyanide, producing a bright blue pigment. After staining, the working solution was removed, and cells were washed with PBS. Iron-based particle accumulation was then observed using a Nikon Eclipse TE2000-U bright-field microscope equipped with a Leica DFC290 digital color camera.

1.15. Biocompatibility assay

MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells, along with NIH-3T3 mouse embryonic fibroblasts, were seeded into 96-well plates (BD Falcon, USA) at a density of 20,000 cells per well in 150 μ L of growth

medium. One column of wells was filled with medium only to serve as a blank for optical density measurements.

After 24 hours of incubation, the growth medium was removed and replaced with 150 μ L of fresh medium containing MN-AuNCs at varying dilutions up to 100 times (from a 25.5 mg/mL stock solution). For upconverting nanoparticles, final concentrations of 0.05 mg/mL or 0.1 mg/mL were used. Control wells were treated with medium lacking nanoparticles.

Cells were incubated with nanoparticles for 24 hours. Following incubation, nanoparticle-containing media were removed, and the cells were washed with PBS. Then, 50 μ L of XTT reaction solution (prepared by mixing XTT reagent and activation reagent at a 50:1 ratio; Biological Industries, Israel) and 100 μ L of fresh growth medium were added to each well.

The plates were incubated for 4 hours at 37°C. Absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (BioTek, USA). Cell viability for each treatment group was calculated as the mean optical density from six independent experiments and expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Statistical analysis was performed using a paired independent Student's t-test, with significance defined as p-values < 0.05.

1.16. Photodynamic effect on cells

The photodynamic therapy (PDT) effect of MN-AuNCs was investigated in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell monolayers. Cells were seeded in 8-well glass-bottom plates (Lab-Tek, USA) at a density of 30,000 cells/well. After 24 hours, the medium was replaced with fresh growth medium containing either 2.55 mg/mL MN-AuNCs or 1 μ M of the photosensitizer chlorin e6 (Ce6). Control wells received no treatment but underwent the same manipulations.

Cells were incubated with nanoparticles or Ce6 for 24 hours. The next day, wells were irradiated with 402 nm light to a total dose of 80 J/cm², while control samples (cells with nanoparticles or Ce6) remained unirradiated. Following irradiation, plates were returned to the incubator for overnight incubation.

Cell viability was assessed the following day using LIVE/DEAD staining (Thermo Fisher, USA), which includes Calcein-AM to label live cells (green fluorescence) and Ethidium homodimer-1 to stain dead cells (red fluorescence). Imaging was performed on a Nikon Eclipse confocal microscope equipped with a 20 $\times$ /0.5 NA dry objective. Calcein was excited at 488 nm and detected in the green channel, while Ethidium homodimer-1 was excited at 543 nm and detected in the red channel.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Magnetic nanoparticles decorated with gold nanoclusters

2.1.1. Characterization of spatial properties of MN-AuNCs

Spatial properties of MN-AuNCs were evaluated with various techniques. AFM measurements showed that MN-AuNCs had a spherical shape and a diameter around 50 nm. Magnetic nanoparticles (MN) alone were around 25 nm in size. The MN-AuNCs solution consisted of two different-sized populations of nanoparticles, smaller and bigger ones. Small nanoparticles are $\approx 10\text{--}20$ nm in diameter while large ones $\approx 35\text{--}60$ nm. Dynamic light scattering measurements demonstrated comparable results. Smaller nanoparticles were 10–15 nm in diameter, while bigger ones were $\sim 60\text{--}100$ nm. It is possible that in a solution of MN-AuNCs, we measured different components, the biggest size distribution appearing due to actual MN-AuNCs, while smaller one due to MN. The exhibition of two populations is also reasoned by polydispersity index, which was 0.312 on average. Additionally, zeta potential measurements revealed that MN-AuNCs had an average surface charge of -25 ± 0.5 mV.

2.1.2. Optical properties of MN-AuNCs

Absorption spectra of MN-AuNCs in different aqueous solutions (deionized water (deH₂O) and DMEM+FBS) had no distinct peaks in the visible spectral region, and optical density increased toward the blue wavelengths. MN-AuNCs, under 488 nm excitation, emit a broad photoluminescence band in the region of 500–900 nm, with the intensity maximum at ≈ 685 nm wavelength (Figure 1).

Relative quantum yield (QY) of photoluminescent part of MN-AuNCs was evaluated and determined by comparing nanoparticles with rhodamine 6G. QY was measured under 513 nm wavelength excitation, because at this wavelength rhodamine 6G and MN-AuNCs would guarantee the same number of absorbed photons. The calculated quantum yield of gold nanoclusters' PL was 6.11%, which is comparable to other authors' work (J. Xie et al., 2009).

Furthermore, optical stability of NPs was tracked by registering their PL for two weeks (in deH₂O, PBS, DMEM, and DMEM+FBS). No significant changes were observed, neither in the intensity of the PL signal nor in the peak positions of PL bands or full width at half maximum. Moreover, one of our previous studies showed that the addition of magnetic nanoparticles to AuNCs does not significantly affect their PL properties (Mikalauskaite et al., 2022).

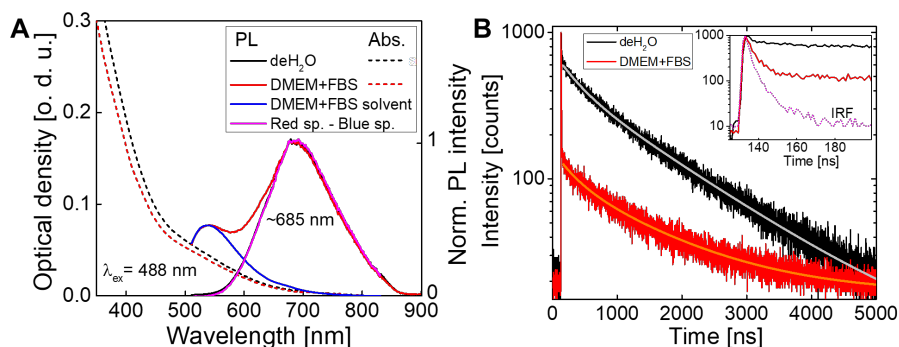


Figure 1. Optical properties of magnetic nanoparticles decorated with gold nanoclusters. (A) Characteristic optical spectra of MN-AuNCs in two different solutions (deionized water (deH₂O) – presented in black, Dulbecco's Modified Eagle medium supplemented with fetal bovine serum (DMEM+FBS) presented in red). Dashed lines represent absorbance spectra, and solid lines – photoluminescence of MN-AuNCs. Additionally, the PL spectrum of only the DMEM+FBS solvent is given in blue color. PL spectra were registered under 488 nm wavelength excitation. (B) Fluorescence decay curves of MN-AuNCs after preparation in deH₂O (black decay) and in DMEM+FBS (red decay) and their respective bi-exponential fits (light grey and orange lines). The inset represents a zoomed region from 120 to 200 ns. Magenta decay shows instrument response function (Pleckaitis et al., 2023).

After time-resolved fluorescence spectroscopy measurements were made, the decays of PL at 685 nm were fitted with a bi-exponential tail-fitting model. The fit showed two exponential components in both samples (deH₂O and DMEM+FBS). A fast exponential component (τ_1) had a lifetime of ≈ 330 ns (≈ 300 ns for the sample in DMEM+FBS) and a long lifetime component (τ_2) was ≈ 1450 ns (≈ 1405 ns for the sample in DMEM+FBS). We calculated an average PL lifetime of ≈ 1355 ns (≈ 1325 ns for sample in DMEM+FBS). The resulting long-lived excited PL states of MN-AuNCs create favorable conditions for the formation of reactive oxygen species or singlet oxygen. Quality of the fits was evaluated with residuals and χ^2 , which for 2-exponential fits of MN-AuNCs PL decays in deH₂O and in DMEM+FBS were 0.998 and 1.122, respectively. Yang et al. demonstrated that noble metal nanoclusters (including Au) exhibit metal-centered emission, which has PL lifetimes ranging in nanoseconds, and ligand-centered emission displaying longer lifetimes in range of microseconds (T. Yang et al., 2019).

2.1.3. Evaluation of singlet oxygen generation by MN-AuNCs

Scientific literature indicates that the therapeutic effect of PDT is mainly caused by the generation of reactive oxygen species (Castano et al., 2006). Therefore, we assessed if magnetic nanoparticles decorated with gold nanoclusters can generate singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) as well. Evaluation was

performed with SOSG reagent and showed that in all samples irradiated with visible light of different wavelengths, MN-AuNCs generated $^1\text{O}_2$. While comparing the $^1\text{O}_2$ generation of MN-AuNCs with the efficiency of the photosensitizer Ce6, the maximum generated amount indicated by SOSG was similar, but Ce6 generated singlet oxygen faster (Figure 2 A).

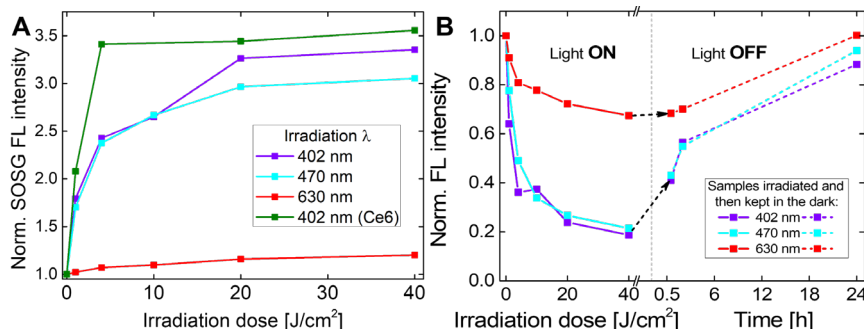


Figure 2. (A) Singlet oxygen generation detected with SOSG. Samples were irradiated with 402 nm (violet and olive for chlorin e6), 470 nm (cyan), and 630 nm (red) wavelengths up to 40 J/cm². (B) Reversible photobleaching effect of MN-AuNCs during the irradiation with the same wavelengths. Total accumulated irradiation dose 40 J/cm². (Pleckaitis et al., 2023).

These results are supported by previous studies, which demonstrated that fluorescent gold nanoclusters alone can generate reactive oxygen species at high efficiency comparable to chlorin e6 (Jarockyte, Poderys, et al., 2022; Poderys et al., 2020).

2.1.4. Photostability of MN-AuNCs

Photostability was evaluated by irradiating various samples, containing MN-AuNCs, with different wavelengths. Aqueous solutions were irradiated until a dose of 40 J/cm² for all wavelengths was collected. The results showed that the PL intensity of MN-AuNCs plunged by more than half after irradiation with 405 nm and 470 nm. On the other hand, 630 nm light did not cause significant photobleaching. However, we noticed that after irradiation, while keeping samples in the dark, the PL signal intensity of MN-AuNCs tends to fully recover (Figure 2 B). This effect is called reversible photobleaching and was previously introduced while studying bovine serum albumin-stabilized AuNCs (Hemmateenejad et al., 2016).

2.1.5. Magnetic properties of MN-AuNCs

Besides optical properties, MN-AuNCs also exhibit magnetic properties, thus, we checked how well MN-AuNCs perform as an MRI contrast agent

compared to pure Fe_3O_4 nanoparticles and commercially available gadopentetic acid “Magneita” contrast (Figure 3 A).

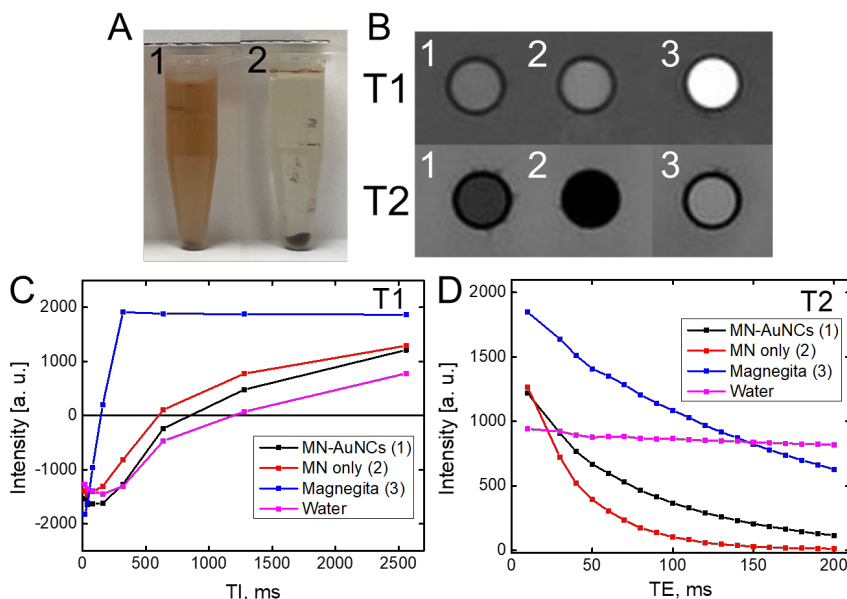


Figure 3. (A) Image of MN-AuNCs (1) and Fe_3O_4 (MN only) (2) aqueous solutions. (B) T1-weighted and T2-weighted MR images of MN-AuNCs (1); MN-only (2), and Magneita (3). A T1 image is obtained at a TI value of 500 ms, and a T2 image is obtained at a TE value of 120 ms. (C) Intensities of T1-weighted images at various TI and (D) intensities of T2-weighted images at various TE. Water is the surrounding medium. (Pleckaitis et al., 2023)

The results showed that MN-AuNCs and MN created T2 contrast, and it was higher than for the Magneita solution (Figure 3 B). Such results were expected, since Fe_3O_4 -based nanoparticles have shorter T2 relaxation times and are widely applied as negative probing agents in MRI. T1-weighted signal showed that only Magneita had significantly different intensity, while MN-AuNCs or pure MN had no difference from the surrounding medium (Figure 3 C). Under very short TE, Gd-based solution showed the highest intensity differences from the water, but at higher TE, the intensity dropped and became similar to the intensity of water (Figure 3 D). However, the intensities of MN-AuNCs or MN only solutions, under longer TE, had significant differences in signal intensity and show a clear potential to serve as MRI contrast agents (Figure 3 C).

It is important that MN-AuNCs exhibit magnetic properties from the iron oxide cores and red photoluminescence from gold nanoclusters, as combined imaging modalities could help improve individual diagnostic methods (C. Wang et al., 2019; G. Wang et al., 2015) and increase the applicability of MN-AuNCs in the biomedical research field (Hao et al., 2010; Yao et al., 2014).

2.1.6. Biocompatibility of MN-AuNCs *in vitro*

The cytotoxicity of MN-AuNCs on cancerous MCF-7, MDA-MB-231, and fibroblast NIH-3T3 cell lines was evaluated via XTT viability assay. After 24 h incubation with nanoparticles, none of the tested groups of different concentrations (0.255, 0.51, 1.27, and 2.55 mg/mL) showed a significant cytotoxic effect on tested cell lines.

These findings are consistent with previous studies. For instance, blood plasma-stabilized gold nanoclusters (Jarockyte, Poderys, et al., 2022) and technetium-99m-labeled bovine serum albumin–gold nanoclusters (Jarockyte, Stasys, et al., 2022), even when tested at concentrations nearly ten and six times higher, respectively, showed minimal cytotoxicity after 24 hours of incubation. In a study with similar magnetic nanoparticles mixed with gold nanoclusters (0.1 mg/mL), a slight decrease in cell viability was observed in 293T cells (C. Wang et al., 2015), however, cell viability remained above 80%. Moreover, no significant decrease in cell viability was observed in HL-60 and HepG2 cancer cells incubated with up to 4 nM of aptamer/magnetic nanoparticle conjugates with fluorescent gold nanoclusters (Haghighi et al., 2019).

To investigate intracellular accumulation, MN-AuNCs were incubated with cancerous human breast cell lines – MCF-7 (a poorly aggressive and non-invasive cell line) (Gest et al., 2013) and MDA-MB-231 (a highly aggressive and poorly differentiated triple-negative cell line) (Chavez et al., 2010) – as well as with NIH-3T3 embryonic mouse fibroblasts, representing a healthy control cell line. Following incubation, red PL from the MN-AuNCs was observed inside the cells, indicating successful accumulation. The blue fluorescence marks the nuclei stained with Hoechst 33258 (Figure 4).

After 24 hours of incubation, MN-AuNCs accumulated in all tested cell lines, though uptake varied. MDA-MB-231 and NIH3T3 cells showed uniform nanoparticle distribution, while only a few MCF-7 cells internalized them. The photoluminescence originated from the cytoplasm, particularly the perinuclear region, indicating no cell-type specificity. Z-scanning of MCF-7 cells confirmed that MN-AuNCs localized around, but not within, the nuclei.

2.1.7. Photodynamic effect of MN-AuNCs *in vitro*

The PDT effect of MN-AuNCs was tested on MCF-7 and MDA-MB-231 cell monolayers using 402 nm light at an 80 J/cm² dose (Figure 5). In MCF-7 cells, irradiation induced cell death and morphological changes suggesting

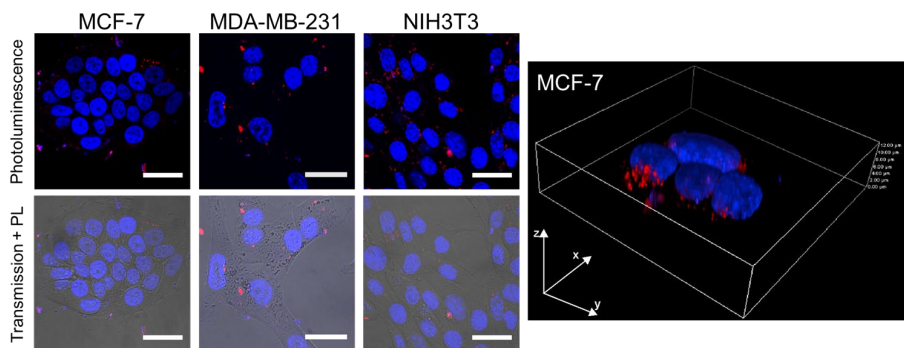


Figure 4. Confocal microscopy images of MN-AuNCs accumulation in MCF-7, MDA-MB-231 cancer, and NIH-3T3 fibroblast cells after 24 h incubation. Photoluminescence of MN-AuNCs is represented in red color ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$). Scale bars for all images are $30 \mu\text{m}$. The blue color represents the fluorescence of cell nuclei stained with Hoechst 33258 ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$). On the right, a reconstructed 3D image with MCF-7 cells. The scale on the z-axis is $12 \mu\text{m}$. (Pleckaitis et al., 2023)

apoptosis, though not all cells were affected. MDA-MB-231 cells were more resistant, but some still showed signs of damage and apoptotic morphology.

Control groups without nanoparticles remained unaffected, even after irradiation. MN-AuNCs also showed no dark toxicity in either cell line. On the other hand, the reference groups incubated with photosensitizer Ce6 were all killed after 80 J/cm^2 dose irradiation with 402 nm light.

Although MN-AuNCs are less efficient at generating singlet oxygen compared to conventional photosensitizers (Kwiatkowski et al., 2018; Lan et al., 2019; Macdonald & Dougherty, 2001), they still demonstrated a

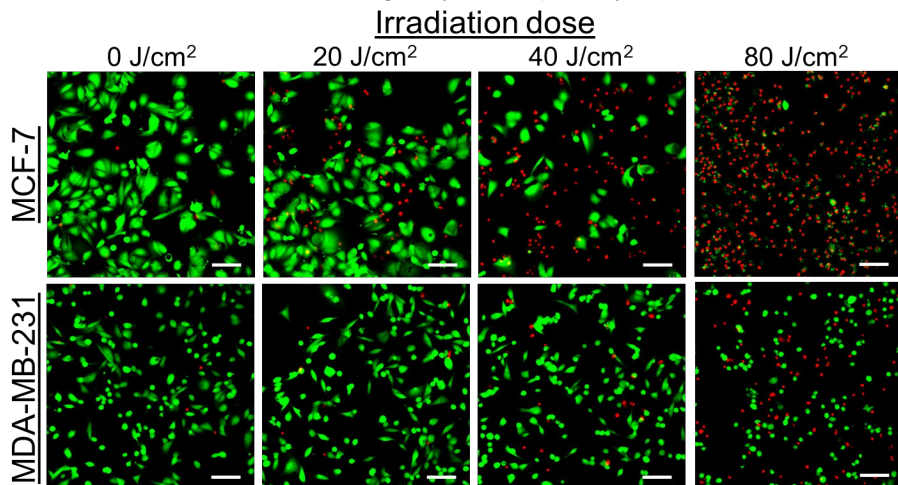


Figure 5. The PDT effect in cell monolayers using MN-AuNCs. Images show breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines incubated with MN-AuNCs (2.55 mg/mL). After 24 hours of incubation, cells were irradiated with 402 nm light (up to 80 J/cm^2 irradiation dose). Green color in the images represents live cells, and red represents dead cells. Scale bars for all images are $100 \mu\text{m}$.

therapeutic effect. To enhance their efficacy, combining MN-AuNCs with a photoactive drug could boost singlet oxygen production and improve cancer cell killing (Hone et al., 2002; Stuchinskaya et al., 2011).

Overall, the dual-imaging and therapeutic features of MN-AuNCs make them a promising theranostic nanoplatform – an area actively explored by researchers worldwide working with various types of theranostic nanoparticles (Johnson et al., 2021; Nguyen et al., 2022; Skripka et al., 2019). When administered systemically, these emerging nanoparticles can selectively accumulate in tumor tissue and enable early-stage cancer detection through noninvasive imaging techniques like MRI. By combining anatomical and contrast imaging, they can reveal cancer spread that might otherwise go unnoticed. Additionally, therapeutic agents attached to the nanoparticles enable targeted treatment, ensuring that the same sites identified as malignant are also treated—unlike using separate agents for diagnosis and therapy, which may not precisely align. Furthermore, such integrated platforms could reduce the need for invasive procedures, such as multiple injections. However, more research is needed, particularly on multifunctional platforms like hybrid nanocomposites of magnetic nanoparticles and fluorescent gold nanoclusters.

2.2. Upconverting nanoparticles, covered with maghemite (γ -Fe₂O₃) nanocrystals

2.2.1. Characterization of spatial and structural properties of UCNPs@ γ -Fe₂O₃

All three types of synthesized UCNPs@ γ -Fe₂O₃ were characterized with various methods to evaluate their size. Transmission electron microscopy revealed that ultrafine iron oxide nanocrystals were individually attached to the surface of preformed lanthanide-doped β -NaYF₄ particles, creating a core@satellite-type structure.

When dispersed in deionized water, all the synthesized citrate-coated composite powders formed stable colloidal solutions due to their citrate surface coating. The hydrodynamic diameters of nanostructures ranged from 200 to 300 nm, with the largest size observed for β -NaY_{0.8}[Yb_{0.2}]F₄@ γ -Fe₂O₃, which had the thickest iron oxide coating.

Zeta potential measurements confirmed that all particles carried a negative surface charge, primarily due to the negatively charged citrate molecules on their surfaces. β -NaY_{0.8}[Yb_{0.2}]F₄@ γ -Fe₂O₃ nanocomposites had a zeta potential value of -40 mV, and β -NaY_{0.8}[Er_{0.2}]F₄@ γ -Fe₂O₃ and β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃, -27 mV and -25 mV, respectively.

Although negatively charged nanoparticles are typically thought to resist cellular uptake due to repulsion from the negatively charged cell membrane (Verma & Stellacci, 2010), studies have shown they can still enter cells via nonspecific binding to positively charged membrane sites followed by endocytosis (Bertorelle et al., 2006; Cho et al., 2009; Wilhelm et al., 2003). Thus, we remain confident in the potential of our particles as intracellular imaging probes.

2.2.2. Optical properties of UCNPs@ γ -Fe₂O₃

Emission spectra of UCNPs@ γ -Fe₂O₃ measured under 980 nm excitation (before maghemite coating) showed that co-doping with Yb and Er significantly enhances upconversion luminescence (Figure 6 A).

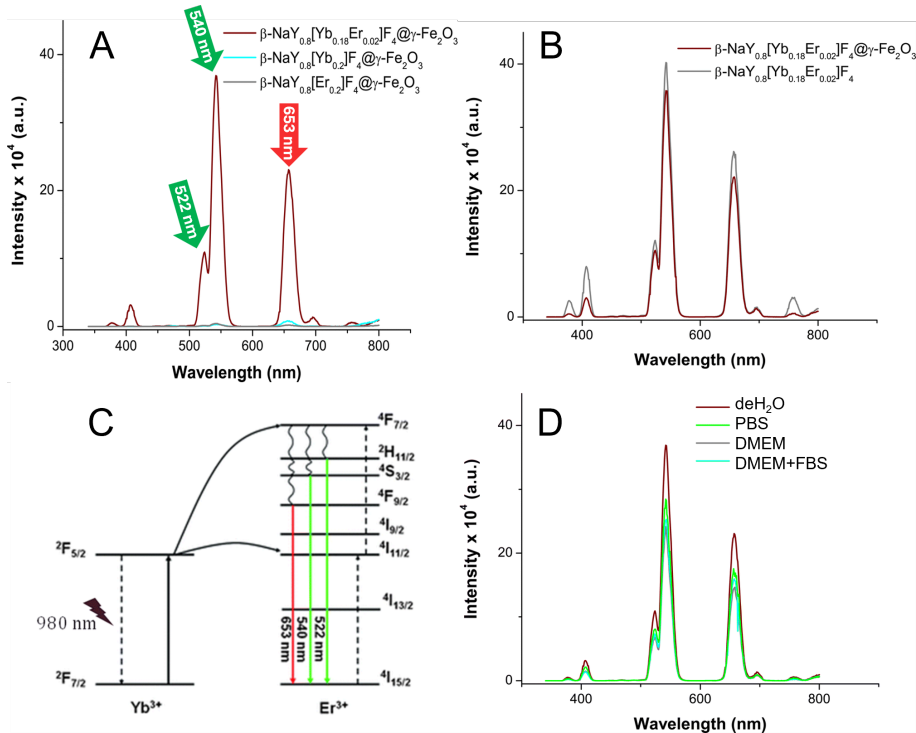


Figure 6. (A) Emission spectra of citrate-coated β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ recorded at r. t. on their aqueous colloidal dispersion in deionized water (1 μ g/mL) under a laser irradiation of 980 nm on the day of preparation (wine line) and 16 days later (cyan line). (B) The comparison of the citrate-coated β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ spectrum (grey line) with that of citrate-coated β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ (wine line). (C) The 4f lanthanide energy levels involved in the up-conversion phenomenon at the origin of the green and red emission (adapted from (Wild et al., 2011)). (D) Emission spectra of citrate-coated β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ recorded (the day of preparation) at r. t. on their colloidal dispersion (1 μ g/mL) in deionized water, PBS, DMEM, and DMEM + FBS, after a laser irradiation of 980 nm. (Parvizian et al., 2024)

In this system Yb acts as a sensitizer, which transfers energy to Er (Figure 6 C). The emission spectrum has peaks at 406, 522, 540, and 657 nm (Figure 6 A, B). This co-doping yields the strongest upconversion emission, making it optimal for bioimaging applications. Interestingly, the intensity of nanocomposites emission remained relatively stable across different biological media (PBS, DMEM, and DMEM + FBS), showcasing a strong visible emission regardless of the medium used (Figure 6 D).

2.2.3. Magnetic properties of UCNPs@ γ -Fe₂O₃

To assess the suitability of β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ hetero-nanostructures as bimodal imaging probes, we performed DC magnetic measurements. Two sets of experiments were conducted: magnetization versus magnetic field ($M(H)$) at body temperature to evaluate performance at clinically relevant MRI fields (1.5 T), and magnetization versus temperature ($M(T)$) under 500 Oe in both zero-field-cooled (ZFC) and field-cooled (FC) modes to assess superparamagnetic behavior.

The $M(T)$ curves showed that composite nanoparticles had superparamagnetic properties, with a blocking temperature $\langle T_B \rangle$ of 17 K, which was lower than the 55 K observed for pure γ -Fe₂O₃. It indicates reduced dipolar interactions between the iron oxide nanocrystals. This reduction is likely due to their spatial separation within the composite, as confirmed by TEM. In contrast, the β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ cores alone showed only paramagnetic behavior. These results confirm that the magnetic properties of the hetero-nanostructures are primarily driven by the γ -Fe₂O₃ component, which is favorable for use in magnetic resonance imaging.

The $M(H)$ curve of γ -Fe₂O₃ nanocrystals showed typical superparamagnetic behavior – zero remanence and coercivity at body temperature – with no saturation at high fields due to their ultrasmall size (Respaud et al., 1998) (Figure 7 A). In contrast, β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ particles exhibited a Langevin-type S-shaped curve characteristic of paramagnetic materials. The $M(H)$ response of the β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ composites stayed between these two profiles. Although their magnetization is lower than that of pure iron oxide nanocrystals, it remains adequate – around 10 emu/g at 15 kOe (Figure 7 A) – for potential use as MRI contrast agents.

Relaxometry measurements at 1.41 T b. t. were performed on aqueous suspensions of β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ in deH₂O (Figure 7 B). Relaxation times for pure water (T₁ = 3740 ms, T₂ = 2127 ms) were used as baselines. The results showed a moderate T₁ effect and a stronger T₂ effect,

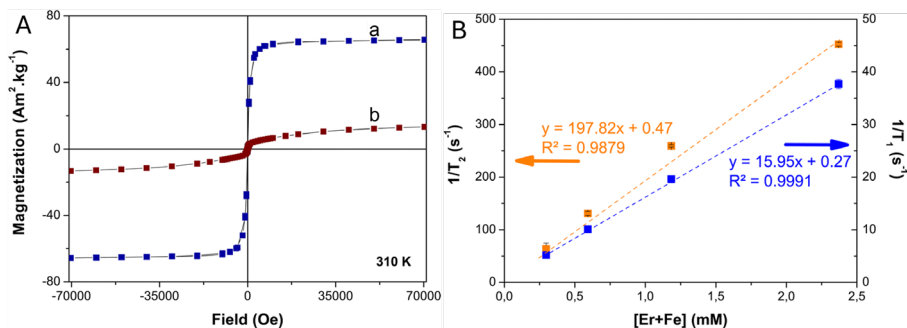


Figure 7. (A) 310 K-isothermal variation of the magnetization as a function of the magnetic field of citrate-coated (a) β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ and (b) γ -Fe₂O₃ particles. (B) Determination of the longitudinal (r_1) and transverse (r_2) relaxivities of citrate-coated β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ particles in deionized water at 37°C for an applied static field of 1.41 T, by plotting the relaxation rates (inverse of the relaxation times) for T_1 (blue squares) and T_2 (orange squares) versus the total paramagnetic cation concentration. (Parvizian et al., 2024)

attributed to the paramagnetism of Er³⁺ ions, which are shielded inside the crystal matrix and by the surfactant bilayer (Mnasri et al., 2019). The β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ cores alone had a longitudinal relaxivity of 0.69 mM⁻¹s⁻¹. Adding maghemite nanocrystals significantly enhanced relaxivity, with longitudinal and transverse values coming around 16 and 198 mM⁻¹s⁻¹ (Figure 7 B), respectively, typical for negative MRI contrast agents. These values are similar and comparable to other polyol-made maghemite nanoparticles (Basti et al., 2010; Mnasri et al., 2020), indicating that the relaxometry properties mainly stem from the maghemite component, with some contribution from the paramagnetic Er³⁺ ions in the core.

2.2.4. Biocompatibility of UCNPs@ γ -Fe₂O₃ *in vitro*

Cytotoxicity was assessed on MDA-MB-231 cancer cells and healthy NIH-3T3 cells using the XTT viability assay. After 24-hour exposure to 0.05–0.1 mg/mL particle concentrations, cell viability remained around 80% (a result considered acceptable (Gruber & Nickel, 2023)) at the highest dose, with higher viability values at lower doses. These results indicated only low cytotoxicity of the tested nanoparticles, supporting their potential for further biomedical imaging applications.

To evaluate cellular uptake and upconversion emission under NIR excitation, human breast cancer cells (MDA-MB-231) were incubated with citrate-coated β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ core@satellite particles at 0.1 mg/mL for 24 hours. After incubation, cells were washed with PBS to remove uninternalized particles and additionally, their nuclei and cytoskeleton

were stained. Confocal microscopy showed that particles accumulated in the cytoplasm but did not penetrate the nucleus (Figure 8 A, B).

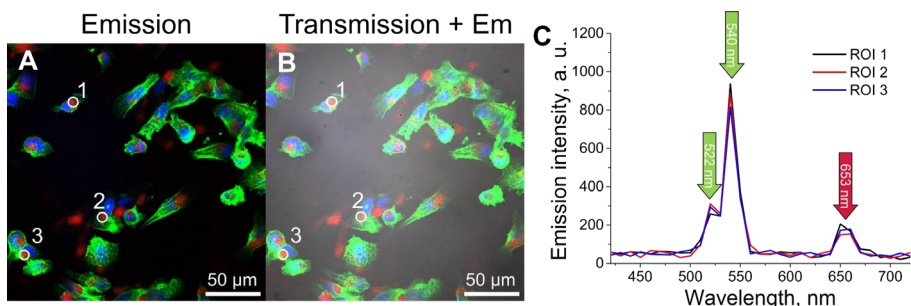


Figure 8. (A, B) Confocal microscopy images of MDA-MB-231 cells incubated for 24 h with citrate-coated β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃ particles (0.1 mg/mL). Red color represents emission of nanoparticles, blue – cell's nuclei, and green – cells' cytoskeleton. (C) The 980 laser-induced emission spectra recorded on positions 1, 2, and 3. Scale bars for all the images are 50 μm. (Parvizian et al., 2024)

Emission spectra under 980 nm excitation were collected from within the cells, which showed distinct peaks at 522, 540, and 653 nm, confirming the particles' upconversion emission (Figure 8 C). An additional Prussian blue staining confirmed cellular uptake as well, because blue color in the cell indicates the presence of iron oxide particles.

Further toxicity studies are needed, especially for longer exposure times. Recent publications suggest that β -NaYF₄ cores may slowly dissolve, releasing potentially toxic fluoride and lanthanide ions (Bastos et al., 2022). It's important to investigate the long-term fate of these particles in the body, including how they are metabolized and eliminated. This calls for the need of monitoring their degradation in biomimetic media (Kolosnjaj-Tabi et al., 2015) and studying their biodistribution in small animal models (Y. Li et al., 2015).

2.3. TPPS₄ molecular aggregates as potential harmonophores

Meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS₄) as a photosensitizer has been studied for many years. It is known not only for its photosensitizing properties but also for its ability to self-assemble into ordered aggregate structures in an acidic environment. The most extensively studied TPPS₄ molecular structures are cylindrical/helical J-aggregates (Short et al., 2013; Takayoshi Kobayashi, 2011). In addition, TPPS₄ molecules can form flat or flocculated structures (Rotomskis et al., 2004). However, the long-term aggregation of TPPS₄ molecules into complex, hierarchical structures is not well understood; thus, it motivated a further study.

In one of our publications (Pleckaitis et al., 2022), together with co-authors, we demonstrated that a unique TPPS₄ aggregate structure formed via self-organization and resembles a giant sea urchin (GSU) (Figure 9).

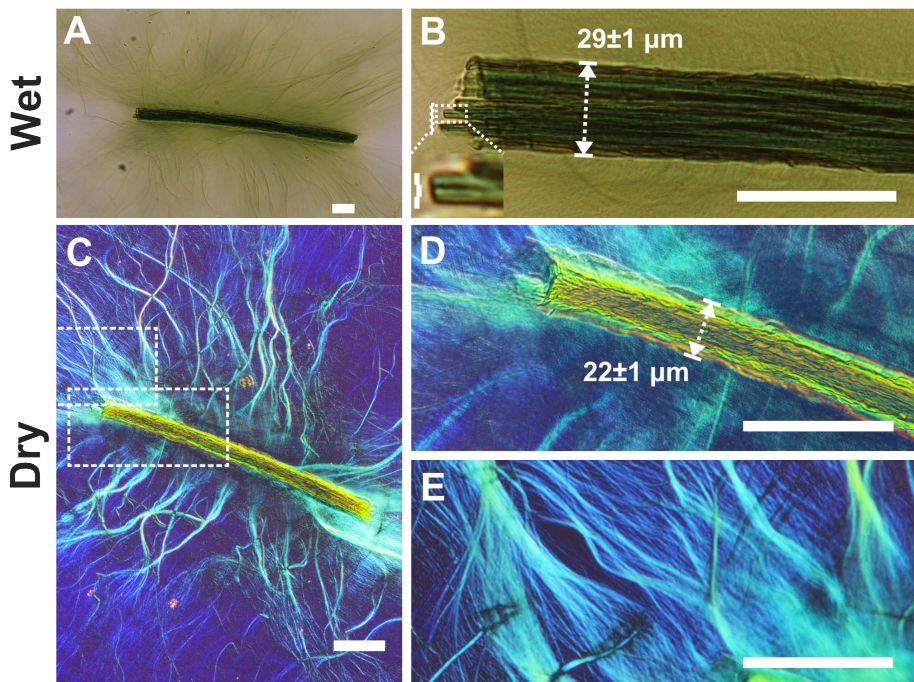


Figure 9. Brightfield and DIC microscopy images of TPPS₄ GSU aggregates in (A, B) wet and (C, D, E) dry conditions. (A) An image of the whole wet GSU aggregate and (B) the central core. DIC microscopy images of (C) the whole dry GSU aggregate, (D) the central core, and (E) the filaments. Scale bars for all images are 50 μm (the inset scale bar in (B) has 1 μm /dash). (Pleckaitis et al., 2022)

The GSU structure was analyzed using a variety of different methods, and the results showed that they have the potential to be used as a contrast agent in fluorescence microscopy and a harmonophore in nonlinear microscopy, as it can generate second and third harmonics.

2.3.1. Analysis of structural and spectral properties of TPPS₄ aggregates

The different TPPS₄ aggregates were studied by confocal laser scanning microscopy (Figure 10). The structure of the GSU revealed two distinct aggregate formations: (I) a central core (20–30 μm wide and several hundred micrometers long); (II) hair-like filaments protruding from the central core. Some filaments also bend and cluster along the central core surface. The filaments do not branch, but some of them stick together to form bundles.

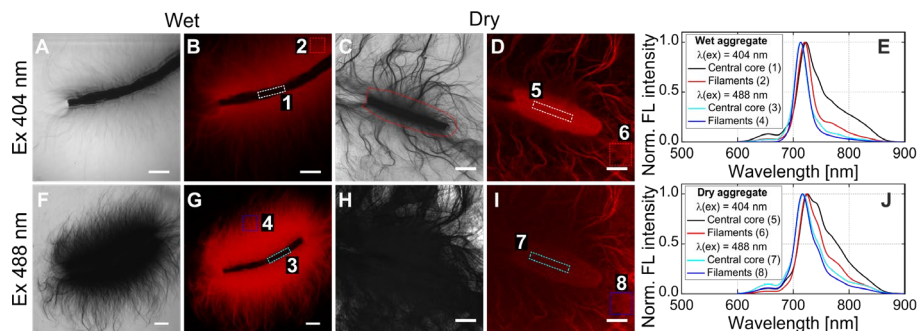


Figure 10. Spectrally resolved confocal fluorescence microscopy of (A, B, F, G) wet and (C, D, H, I) dry GSU TPPS₄ aggregates. (A, C, F, H) The transmission and (B, D, G, I) fluorescence images were obtained at (A-D) 404 nm and (F-I) 488 nm excitation. The normalized fluorescence spectra are shown for (E) wet and (J) dry aggregates obtained from numbered regions (core: 1, 3, 5, 7; filaments: 2, 4, 6, 8) in the images. Scale bars, 50 μ m. (Pleckaitis et al., 2022)

A spectral analysis showed that the core strongly absorbs 404 nm wavelength excitation light, while the filaments are highly fluorescent. At 488 nm excitation, it is quite the opposite: the filaments absorb stronger and are less fluorescent than the core.

Fluorescence spectra also had variations depending on excitation wavelength (Figure 10 E, J). At 404 nm wavelength excitation, the fluorescence spectrum peaked at 724 nm. At 488 nm, the 711 nm peak was dominant and indicated the presence of J-aggregates. These results showed that GSU structures were heterogeneous, containing a mix of J- and H-aggregates, with their optical properties influenced by both structure and hydration state. A more detailed analysis of the fluorescence spectra and their components can be reviewed in (Pleckaitis et al., 2022).

2.3.2. Fluorescence lifetime imaging microscopy of TPPS₄ aggregates

FLIM was applied to wet and dry GSU aggregates using two different excitation wavelengths at 420 nm and 490 nm (Figure 11). The fluorescence lifetimes ranged from 0.2 to 0.9 ns (Figure 11 E). The longest average lifetime was recorded in wet aggregates at 420 nm (Figure 11 A) and was associated with H-aggregates and red-shifted fluorescent components. Meanwhile, direct excitation of J-aggregates at 490 nm led to faster fluorescence quenching (Figure 11 B) due to the shorter lifetimes of J-aggregates (Kelbauskas et al., 2003).

After GSU aggregates were dried, the filaments compressed and the core flattened, resulting in a shorter fluorescence lifetime, which indicated quenching processes, especially in the areas related to J-aggregates. The

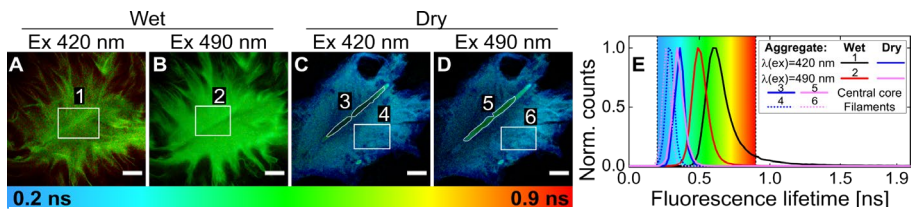


Figure 11. Fluorescence lifetime images of the wet and dry TPPS₄ aggregates under (A, C) 420 nm and (B, D) 490 nm laser excitations. Images in panels (A-D) have a shared fluorescence lifetime color bar. (E) Distributions of the amplitude-weighted average fluorescence lifetimes, with a figure legend showing the wet/dry conditions and excitation wavelength. The color background of the graph (E) has the corresponding range of the colors (A-D) representing fluorescence lifetimes of 0.2-0.9 ns. Scale bars, 100 μ m. (Pleckaitis et al., 2022)

shortest lifetimes were recorded in dry filaments, while the core, in contrast to wet samples, became bright due to lower quenching (Figure 11 C, D). Exciton-exciton annihilation studies could provide more information about the energy transfer regions in GSU assemblies (Barzdat et al., 1999).

These changes indicate energy transfer between fluorescent components of J- and H-aggregates. GSU structures, due to their efficient light harvesting and energy transfer properties, resemble bacterial photosynthetic pigment aggregates (Chappaz-Gillot et al., 2012; Jochum et al., 2008) and may be applicable in artificial photosynthesis.

2.3.3. Correlation between SEM and FDL D microscopy data

The dried GSU TPPS₄ aggregates were first studied with FDL D microscopy and then coated with a 5 nm layer of gold and imaged with SEM (Figure 12).

The SEM images showed a tubular core with cracks revealing a multilayered spiral structure coiled around its central axis. In FDL D microscopy, the orientations of the molecular dipoles correspond to different layers, visible as blue and yellow areas, which often coincide with cracks in the core. This suggests that fluorescence is caused by differently oriented dipoles within the bands.

The thin filaments attached to the core are separated and spread out on the surface due to drying and coating. They cross each other in the same way as in the AFM images.

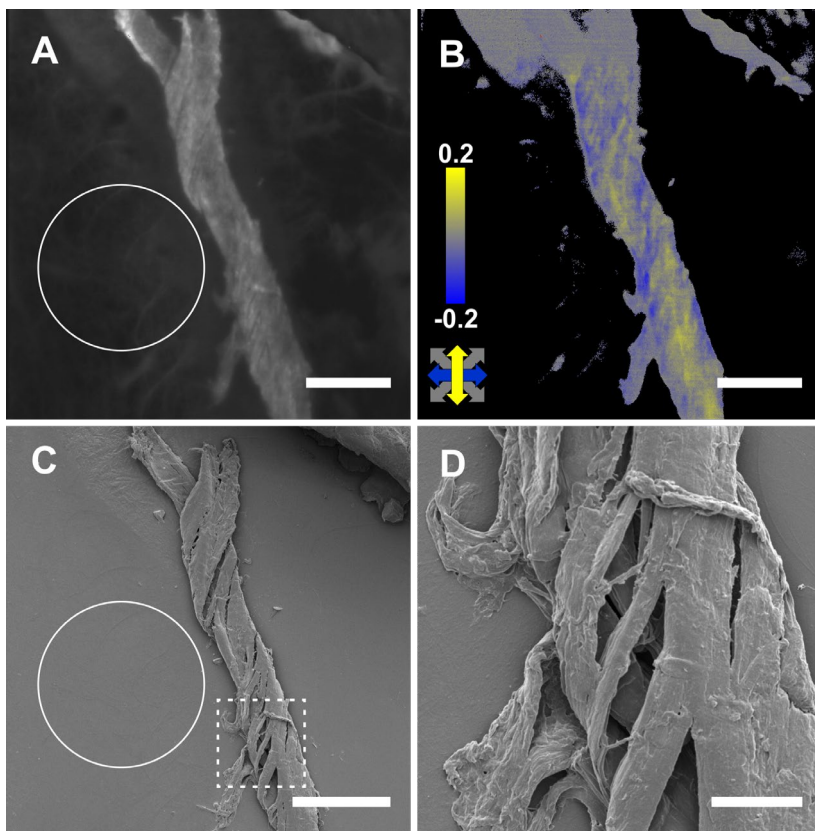


Figure 12. (A) Comparison of fluorescence intensity, (B) FDLD, and (C, D) SEM images of a GSU TPPS₄ aggregate. The yellow and blue arrows in (B) for vertical and horizontal directions, respectively, represent the orientation of absorption dipoles of J-bands. (D) The central core tube is composed of ribbons helically wound around the core axis. The small filaments can be seen at the substrate level within the white circle in (A) and (C). The scale bars are 50 μm in (A-C) and 10 μm in (D). (Pleckaitis et al., 2022)

2.3.4. Evaluation of TPPS₄ aggregates' spatial characteristics using an atomic force microscope

The structure of GSU aggregates was studied using AFM. Dried aggregates on a glass substrate revealed a granular surface of a central core with several flattened filaments extending in different directions. The filaments did not branch but crossed over each other. The size of the granules was found to be around 120 ± 5 nm, and the diameter of the filaments was about 70 ± 5 nm.

The structure of the filaments arranged on the substrate was also similar – they also crossed and had a similar diameter. Such crossed filament structures

were also observed in previous studies when examining TPPS₄ J-aggregate films as potential humidity sensors (Rimeika et al., 2006).

Only single nanogranules were visible in the filament region. Similar patterns of aggregation of granules or their attachment to nanotubes have been previously observed (Rotomskis et al., 2004). These results indicate that GSU aggregates form a hierarchical structure: long filaments grow from a granular core, forming complex superstructures.

2.3.5. Second- and third-harmonic generation microscopy of TPPS₄ aggregates

The 3D structure of the wet GSU aggregate was studied using multimodal SHG and THG microscopy (Figure 13). The SHG signal indicated that the filaments were non-centrosymmetric, while the THG arose from the refractive index difference between the filaments and the gel. Crisscrossed filaments were visible, with the signal weakening towards the center due to the overlap of the fibers at the focus (Figure 13 A, C). The core generated almost no SHG signal except at the surface, indicating a centrosymmetric arrangement of the chromophores (Figure 13 B). The THG signal from the interior of the core was also weak but highlighted the longitudinal structures inside the core and the cracks at the interface or between its layers.

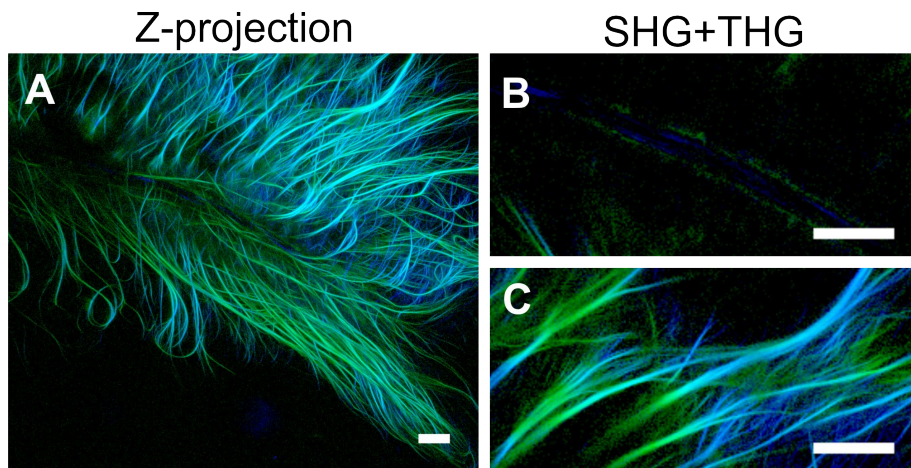


Figure 13. 3D organization of GSU TPPS₄ aggregate in polyacrylamide gel imaged with SHG (green) and THG (blue) microscopy. (A) Maximum axial projection and optical sections of (B) the central core and (C) the filaments. Scale bars, 50 μm .

SYNOPSIS

In this dissertation, studies on different bimodal imaging nanomaterials were described. Magnetic iron oxide nanoparticles decorated with photoluminescent gold nanoclusters and upconverting rare earth-doped nanoparticles coated with maghemite nanocrystals were investigated. The latter included β -NaYF₄ nanoparticles doped with only erbium – β -NaY_{0.8}[Er_{0.2}]F₄@ γ -Fe₂O₃, only ytterbium – β -NaY_{0.8}[Yb_{0.2}]F₄@ γ -Fe₂O₃ or with erbium and ytterbium – β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄@ γ -Fe₂O₃. Additionally, unique and complex structures, resembling a sea urchin, that formed from molecular TPPS₄ aggregates were analyzed.

First, different nanoparticles were characterized, and their spatial, optical, and magnetic properties were determined. Later we tested the biocompatibility of nanostructures and assessed their ability to accumulate in monolayers of cancer and healthy cells. Moreover, the ability of MN-AuNCs to generate reactive oxygen species and to cause photodynamic effect was also evaluated. For molecular TPPS₄ aggregates, we studied their structural properties and optical characteristics, but cellular experiments were not performed.

According to the literature, magnetic nanoparticles tend to quench the fluorescence of the attached materials (Q. Zhang et al., 2016). However, the synthesized MN-AuNCs described in this work kept both photoluminescent and magnetic properties (Mikalauskaite et al., 2022; Pleckaitis et al., 2023). Optical analyses revealed broad and stable photoluminescence in the NIR region emitted by AuNCs, with a long photoluminescence lifetime that creates favorable conditions for ROS generation under visible light irradiation. Previous studies have shown that serum protein-stabilized gold nanoclusters can produce ROS, such as singlet oxygen, peroxides, and peroxyinitrites (Jarockyte, Poderys, et al., 2022; Poderys et al., 2020). However, these studies were performed with AuNCs alone. In our work, we showed that after combining AuNCs and magnetic nanoparticles in one nanopatform, they did not lose the ability to generate ROS (Pleckaitis et al., 2023). Studies on MRI contrasting properties showed that MN-AuNCs create contrast in T2-weighted MR images, thus, these nanostructures could serve as bimodal contrast agents in PL and MRI applications.

In vitro studies confirmed that MN-AuNCs were biocompatible and did not cause dark toxicity to the tested cell lines, and when irradiated for a longer time with a visible light, ROS initiated a photosensitizing therapeutic effect and caused cell death (Figure 5). One of the remaining problems is that the MN-AuNCs nanopatform showed no specificity, since it accumulated non-

selectively in both cancerous and healthy cell lines (Figure 4). A solution to this could be further functionalization of the MN-AuNCs surface with cancer cell-specific ligands (D. Chen et al., 2016; J. Qiao et al., 2013; Vankayala et al., 2015; Xia et al., 2018; C. Zhang et al., 2013). Furthermore, one of the advantages of MN-AuNCs also becomes its disadvantage, since the generation of reactive oxygen species is initiated at the same time when PL is excited. Fortunately, this disadvantage can be circumvented by choosing other imaging alternatives, such as CT, X-rays, photoacoustic imaging, etc. (C. Xu et al., 2017; C. Zhang et al., 2022). MN-AuNCs could become a contrast marker for multimodal imaging in the future, and the combination of their diagnostic and therapeutic properties shows great potential in becoming a promising theranostic nanostructure (van de Looij et al., 2022).

UCNPs@ γ -Fe₂O₃ structures were composed of β -NaYF₄-based and rare-earth-doped upconverting cores coated with superparamagnetic maghemite nanocrystals. Erbium- and ytterbium-doped nanoparticles exhibited the strongest visible light emission when excited by a 980 nm laser (Figure 6 A). Unlike PL of gold nanoclusters, the upconversion emission of UCNPs is excited under NIR irradiation, which can penetrate deeper into biological tissues. Therefore, upconversion nanoparticles could help diagnose deeper tumors (Y. Sun et al., 2013, Luo et al., 2017).

Studies on UCNPs@ γ -Fe₂O₃ magnetic properties confirmed the superparamagnetic behavior of maghemite (γ -Fe₂O₃) nanocrystals even when attached to UCNPs (Figure 7). A detailed relaxometry analysis showed that these nanocomposites could be used as a T2 MRI contrast agent. On the other hand, in the NaYF₄ matrix, yttrium atoms could be replaced by gadolinium, which could provide T1 MRI contrast (Ezerskyte et al., 2024), or the maghemite nanocrystals themselves could be additionally doped with gadolinium (Bae et al., 2010). Such an improved nanosystem could serve as an optical diagnostics tool due to the emitted ACL as well as a dual-contrast (T1-T2) MR imaging agent. Nevertheless, the current UCNPs@ γ -Fe₂O₃ nanocomposites are also an excellent example of dual-imaging nanomaterials.

In addition, *in vitro* cytotoxicity studies showed relatively good biocompatibility with the studied healthy and cancer cell lines. Confocal microscopy revealed that UCNPs@ γ -Fe₂O₃ effectively accumulated in cancer cells (Figure 8 A, B). Although the studied particles were characterized as colloiddally stable, *in vitro* studies poorly reflect real conditions of living organisms. Therefore, it would be worthwhile to transfer further studies to 3D model systems (Butkiene et al., 2024) or experimental animals (Y. Li et al., 2015; Y. Sun et al., 2013). It was previously observed that nanoparticles tend

to adhere to various proteins in the bloodstream, which form a protein crown. Its effect on the stability of UCNPs has already been studied by our colleagues (Voronovic et al., 2021). However, in the future, for better understanding, we should perform a similar assessment with UCNPs@ γ -Fe₂O₃ described in the dissertation to find out whether, for example, maghemite nanocrystals remain stably coated on the UCNPs surface even in a protein-enriched environment, or whether their superparamagnetic properties do not change, etc.

Finally, we come to the last group of materials studied – molecular TPPS₄ aggregates and the GSU aggregate that formed over a long period of time. It had a unique structure that had not been previously described for porphyrin-type aggregates in the scientific literature at all (Figure 9). The GSU aggregate had a central core and hair-like filaments protruding from it. The various types of microscopy studies used allowed us to analyze the morphology, structure, and optical properties of these aggregates in even more detail.

FL analysis showed that the GSU structure was heterogeneous, consisting of different types of J- and H-aggregates. The fluorescent properties of these aggregates depended on the environmental conditions (wet or dry) and the excitation wavelengths (Figure 10). The filaments exhibited intense fluorescence, especially in wet conditions, while the core, on the contrary, became more pronounced after the aggregate was dried. FLIM analysis revealed different fluorescence lifetimes associated with J- and H-aggregates and possible energy transfer processes between them (Figure 11). Nonlinear microscopy revealed that the filaments of the GSU aggregates had a non-centrosymmetric structure, which allowed them to efficiently generate second and third harmonics (Figure 13). This is an important property in nonlinear optics for the application of GSU aggregates as potential harmonophores.

All in all, these results suggest that TPPS₄ GSU aggregates could potentially be applied in fluorescence and nonlinear microscopy as contrast agents (Khadria et al., 2018) or theranostic agents, given their photosensitizing properties (Binder et al., 2011), and in artificial photosynthetic systems (Han et al., 2025).

CONCLUSIONS

1. Magnetic iron oxide nanoparticles decorated with protein-stabilized gold nanoclusters exhibited good colloidal stability, long-lived red photoluminescence, which can fully recover after photobleaching, and generated T2 MR contrast when exposed to an external magnetic field. Moreover, tested concentrations of MN-AuNCs demonstrated no significant dark cytotoxicity to breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231) or fibroblast (NIH-3T3) cell lines.
2. MN-AuNCs had no specificity and accumulated inside both breast cancer and fibroblast cells, localizing in intracellular vesicles around the nuclei. The photoluminescence observed from within the cells and the T2-weighted contrast during MR imaging suggest that MN-AuNCs are a bimodal imaging nanoplatform.
3. Under visible light irradiation, MN-AuNCs generated singlet oxygen and induced a photosensitizing effect on breast cancer cells. The PDT effect varied for different tumorigenicity breast cancer cells and was the most visible after an 80 J/cm² irradiation dose – MCF-7 cells were affected more significantly than MDA-MB-231 cells.
4. Rare-earth-doped upconverting nanoparticles (with erbium and ytterbium), coated with maghemite nanocrystals, exhibited stable upconversion emission in the visible region under 980 nm excitation and showed superparamagnetic properties when exposed to an external magnetic field. Additionally, tested concentrations of UCNPs@ γ -Fe₂O₃ while kept in the dark reduced viability of MDA-MB-231 breast cancer and NIH-3T3 fibroblast cell lines by up to 15% and 25%, respectively.
5. UCNPs@ γ -Fe₂O₃ were internalized by MDA-MB-231 breast cancer cells and localized in the cytoplasm. Upconversion emission registered within the cells during confocal imaging confirms UCNPs@ γ -Fe₂O₃ optical diagnostic capabilities, while their superparamagnetic properties and strong T2 MR contrast show potential for their applicability as MRI contrast agents.
6. GSU TPPS₄ aggregates demonstrated a unique self-assembled structure, consisting of a tube-like, multilayered central core with protruding filaments. The GSU aggregates were composed of nanotubes and nanogranules. Moreover, regardless of environmental conditions, GSU aggregates exhibited fluorescence and generated second and third harmonic signals during nonlinear microscopy.

LITERATŪROS SĄRAŠAS / REFERENCES

1. Abakumov, M. A., Nukolova, N. V., Sokolsky-Papkov, M., Shein, S. A., Sandalova, T. O., Vishwasrao, H. M., Grinenko, N. F., Gubsky, I. L., Abakumov, A. M., Kabanov, A. V., & Chekhonin, V. P. (2015). VEGF-targeted magnetic nanoparticles for MRI visualization of brain tumor. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(4), 825–833.
2. Aggarwal, L. P. F., & Borissevitch, I. E. (2006). On the dynamics of the TPPS₄ aggregation in aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63(1), 227–233.
3. Ahmed, H. U., Kirkham, A., Arya, M., Illing, R., Freeman, A., Allen, C., & Emberton, M. (2009). Is it time to consider a role for MRI before prostate biopsy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(4), 197–206.
4. Alizadeh, M., Habach, F., Maciulis, M., Kontenis, L., Bagdonas, S., Krouglov, S., Baranauskas, V., Bulotiene, D., Karabanovas, V., Rotomskis, R., Akens, M. K., & Barzda, V. (2023). Polarimetric second harmonic generation microscopy of partially oriented fibers II: Imaging study. *Biophysical Journal*, 122(19), 3937–3949.
5. Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M., & Iati, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002.
6. An, M., Cui, J., He, Q., & Wang, L. (2013). Down-/up-conversion luminescence nanocomposites for dual-modal cell imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(9), 1333–1339.
7. Anderla, A., Culibrk, D., Delso, G., & Mirkovic, M. (2013). MR Image Based Approach for Metal Artifact Reduction in X-Ray CT. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 524243.
8. Andreucci, M., Solomon, R., & Tasanarong, A. (2014). Side Effects of Radiographic Contrast Media: Pathogenesis, Risk Factors, and Prevention. *BioMed Research International*, 2014(1), 741018.
9. Antoch, G., & Bockisch, A. (2009). Combined PET/MRI: A new dimension in whole-body oncology imaging? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36(1), 113–120.
10. Atabaev, T. Sh., & Molkenova, A. (2019). Upconversion optical nanomaterials applied for photocatalysis and photovoltaics: Recent advances and perspectives. *Frontiers of Materials Science*, 13(4), 335–341.
11. Auzel, F. (2004). Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. *Chemical Reviews*, 104(1), 139–174.
12. Bae, K. H., Kim, Y. B., Lee, Y., Hwang, J., Park, H., & Park, T. G. (2010). Bioinspired Synthesis and Characterization of Gadolinium-Labeled

Magnetite Nanoparticles for Dual Contrast T1- and T2-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 21(3), 505–512.

13. Bai, Y., Shu, T., Su, L., & Zhang, X. (2020). Fluorescent Gold Nanoclusters for Biosensor and Bioimaging Application. *Crystals*, 10(5), 357.

14. Balasubramanian, S., Girija, A. R., Nagaoka, Y., Iwai, S., Suzuki, M., Kizhikkilott, V., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Nair, S. D. (2014). Curcumin and 5-Fluorouracil-loaded, folate- and transferrin-decorated polymeric magnetic nanoformulation: A synergistic cancer therapeutic approach, accelerated by magnetic hyperthermia. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 437–459.

15. Baliulyte, L., Abramavicius, D., Bagdonas, S., Kalnaityte, A., Poderys, V., Rotomskis, R., & Barzda, V. (2023). Comparative quantum chemical and spectral characterization of meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine forms as seeds for J- and H-aggregates. *AIP Advances*, 13(10), 105011.

16. Barzdat, V., Jennings, R. C., Zucchelli, G., & Garab, G. (1999). Kinetic Analysis of the Light-induced Fluorescence Quenching in Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Pigment-Protein Complex of Photosystem II. *Photochemistry and Photobiology*, 70(5), 751–759.

17. Basti, H., Ben Tahar, L., Smiri, L. S., Herbst, F., Vaulay, M.-J., Chau, F., Ammar, S., & Benderbous, S. (2010). Catechol derivatives-coated Fe₃O₄ and γ-Fe₂O₃ nanoparticles as potential MRI contrast agents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(2), 248–254.

18. Bastos, V., Oskoei, P., Andresen, E., Saleh, M. I., Rühle, B., Resch-Genger, U., & Oliveira, H. (2022). Stability, dissolution, and cytotoxicity of NaYF₄-upconversion nanoparticles with different coatings. *Scientific Reports*, 12(1), 3770.

19. Bateman, T. M. (2012). Advantages and disadvantages of PET and SPECT in a busy clinical practice. *Journal of Nuclear Cardiology*, 19(1), 3–11.

20. Bauer, L. M., Situ, S. F., Griswold, M. A., & Samia, A. C. S. (2015). Magnetic Particle Imaging Tracers: State-of-the-Art and Future Directions. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(13), 2509–2517.

21. Berg, K., Prydz, K., & Moan, J. (1993). Photochemical treatment with the lysosomally localized dye tetra(4-sulfonatophenyl)prophine results in lysosomal release of the dye but not of β-N-acetyl-d-glucosaminidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1158(3), 300–306.

22. Bertorelle, F., Wilhelm, C., Roger, J., Gazeau, F., Ménager, C., & Cabuil, V. (2006). Fluorescence-Modified Superparamagnetic Nanoparticles: Intracellular Uptake and Use in Cellular Imaging. *Langmuir*, 22(12), 5385–5391.

23. Binder, S., Kolarova, H., Tomankova, K., Bajgar, R., Daskova, A., & Mosinger, J. (2011). Phototoxic effect of TPPS₄ and MgTPPS₄ on DNA fragmentation of HeLa cells. *Toxicology in Vitro*, 25(6), 1169–1172.
24. Bloembergen, N. (1959). Solid State Infrared Quantum Counters. *Physical Review Letters*, 2(3), 84–85.
25. Boyd, R. W. (2003). Chapter 1—The Nonlinear Optical Susceptibility. In R. W. Boyd (Ed.), *Nonlinear Optics (Second Edition)* (pp. 1–65). Academic Press.
26. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7, 801–802.
27. Bulte, J. W. M., & Kraitchman, D. L. (2004). Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine*, 17(7), 484–499.
28. Butkiene, G., Daugelaite, A., Poderys, V., Marin, R., Steponkiene, S., Kazlauskas, E., Uzieliene, I., Daunoravicius, D., Jaque, D., Rotomskis, R., Skripka, A., Vetrone, F., & Karabanovas, V. (2024). Synergistic Enhancement of Photodynamic Cancer Therapy with Mesenchymal Stem Cells and Theranostic Nanoparticles. *ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES*, 16(37), 49092–49103.
29. Cahyana, A. H., Pratiwi, D., & Ardiansah, B. (2017). Citrate-capped superparamagnetic iron oxide (Fe₃O₄-CA) nanocatalyst for synthesis of pyrimidine derivative compound as antioxidative agent. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 188(1), 012008.
30. Cândido, M., Vieira, P., Campos, A., Soares, C., & Raniero, L. (2023). Gold-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized to EGF and Ce6 Complexes for Breast Cancer Diagnoses and Therapy. *Pharmaceutics*, 15(1), 100.
31. Caravan, P. (2006). Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 35(6), 512–523.
32. Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M. R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 535–545.
33. Chan, W. C. W., & Nie, S. (1998). Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science*, 281(5385), 2016–2018.
34. Chappaz-Gillot, C., Marek, P. L., Blaive, B. J., Canard, G., Bürck, J., Garab, G., Hahn, H., Jávorfí, T., Kelemen, L., Krupke, R., Mössinger, D., Ormos, P., Reddy, C. M., Roussel, C., Steinbach, G., Szabó, M., Ulrich, A. S., Vanthuyne, N., Vijayaraghavan, A., ... Balaban, T. S. (2012). Anisotropic

Organization and Microscopic Manipulation of Self-Assembling Synthetic Porphyrin Microrods That Mimic Chlorosomes: Bacterial Light-Harvesting Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 944-954.

35. Chaughule, R. S., Patkar, D. P., & Ramanujan, R. V. (Eds.). (2022). *Nanomaterials for Cancer Detection Using Imaging Techniques and Their Clinical Applications*. Springer International Publishing.

36. Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Disease*, 32(1-2), 35-48.

37. Chen, D., Li, B., Cai, S., Wang, P., Peng, S., Sheng, Y., He, Y., Gu, Y., & Chen, H. (2016). Dual targeting luminescent gold nanoclusters for tumor imaging and deep tissue therapy. *Biomaterials*, 100, 1-16.

38. Chen, F., Ellison, P. A., Lewis, C. M., Hong, H., Zhang, Y., Shi, S., Hernandez, R., Meyerand, M. E., Barnhart, T. E., & Cai, W. (2013). Chelator-Free Synthesis of a Dual-Modality PET/MRI Agent. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(50), 13319-13323.

39. Chen, G., Qiu, H., Prasad, P. N., & Chen, X. (2014). Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chemical Reviews*, 114(10), 5161-5214.

40. Chen, H., Li, S., Li, B., Ren, X., Li, S., Mahounga, D. M., Cui, S., Gu, Y., & Achilefu, S. (2012). Folate-modified gold nanoclusters as near-infrared fluorescent probes for tumor imaging and therapy. *Nanoscale*, 4(19), 6050-6064.

41. Chen, R., Ling, D., Zhao, L., Wang, S., Liu, Y., Bai, R., Baik, S., Zhao, Y., Chen, C., & Hyeon, T. (2015). Parallel Comparative Studies on Mouse Toxicity of Oxide Nanoparticle- and Gadolinium-Based T1 MRI Contrast Agents. *ACS Nano*, 9(12), 12425-12435.

42. Chen, S., Li, S., Wang, Y., Chen, Z., Wang, H., & Zhang, X.-D. (2023). Gold Nanoclusters for Tumor Diagnosis and Treatment. *Advanced NanoBiomed Research*, 3(12), 2300082.

43. Chen, Y., Li, L., Gong, L., Zhou, T., & Liu, J. (2019). Surface Regulation Towards Stimuli-Responsive Luminescence of Ultrasmall Thiolated Gold Nanoparticles for Ratiometric Imaging. *Advanced Functional Materials*, 29(10), 1806945.

44. Cheng, X., Gao, J., Ding, Y., Lu, Y., Wei, Q., Cui, D., Fan, J., Li, X., Zhu, E., Lu, Y., Wu, Q., Li, L., & Huang, W. (2021). Multi-Functional Liposome: A Powerful Theranostic Nano-Platform Enhancing Photodynamic Therapy. *Advanced Science*, 8(16), 2100876.

45. Cheraghipour, E., Javadpour, S., & Mehdizadeh, A. R. (2012). Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5(12), 715–719.
46. Cho, E. C., Glaus, C., Chen, J., Welch, M. J., & Xia, Y. (2010). Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging. *Trends in Molecular Medicine*, 16(12), 561–573.
47. Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A., & Xia, Y. (2009). Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Letters*, 9(3), 1080–1084.
48. Choi, J., Park, J. C., Nah, H., Woo, S., Oh, J., Kim, K. M., Cheon, G. J., Chang, Y., Yoo, J., & Cheon, J. (2008). A Hybrid Nanoparticle Probe for Dual-Modality Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(33), 6259–6262.
49. Chung, S., Revia, R. A., & Zhang, M. (2021). Graphene Quantum Dots and Their Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy. *Advanced Materials*, 33(22), 1904362.
50. Covarrubias, G., Cha, A., Rahmy, A., Lorkowski, M., Perera, V., Erokwu, B. O., Flask, C., Peiris, P. M., Schiemann, W. P., & Karathanasis, E. (2018). Imaging breast cancer using a dual-ligand nanochain particle. *PLOS ONE*, 13(10), e0204296.
51. Cruz, L. J., Que, I., Aswendt, M., Chan, A., Hoehn, M., & Löwik, C. (2016). Targeted nanoparticles for the non-invasive detection of traumatic brain injury by optical imaging and fluorine magnetic resonance imaging. *Nano Research*, 9(5), 1276–1289.
52. Cui, H., Hu, D., Zhang, J., Gao, G., Chen, Z., Li, W., Gong, P., Sheng, Z., & Cai, L. (2017). Gold Nanoclusters–Indocyanine Green Nanoprobes for Synchronous Cancer Imaging, Treatment, and Real-Time Monitoring Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(30), 25114–25127.
53. Cui, L., Tokarz, D., Cisek, R., Ng, K. K., Wang, F., Chen, J., Barzda, V., & Zheng, G. (2015). Organized Aggregation of Porphyrins in Lipid Bilayers for Third Harmonic Generation Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(47), 13928–13932.
54. Čulić-Viskota, J., Dempsey, W. P., Fraser, S. E., & Pantazis, P. (2012). Surface functionalization of barium titanate SHG nanoprobes for in vivo imaging in zebrafish. *Nature Protocols*, 7(9), 1618–1633.
55. Davies, G.-L., Kramberger, I., & Davis, J. J. (2013). Environmentally responsive MRI contrast agents. *Chemical Communications*, 49(84), 9704–9721.

56. Dempsey, W. P., Fraser, S. E., & Pantazis, P. (2012). SHG nanoprobe: Advancing harmonic imaging in biology. *BioEssays*, 34(5), 351–360.
57. Di Carlo, G., Pizzotti, M., Righetto, S., Forni, A., & Tessore, F. (2020). Electric-Field-Induced Second Harmonic Generation Nonlinear Optic Response of A4 β -Pyrrolic-Substituted ZnII Porphyrins: When Cubic Contributions Cannot Be Neglected. *Inorganic Chemistry*, 59(11), 7561–7570.
58. Ding, B., Shao, S., Jiang, F., Dang, P., Sun, C., Huang, S., Ma, P., Jin, D., Kheraif, A. A. A., & Lin, J. (2019). MnO₂-Disguised Upconversion Hybrid Nanocomposite: An Ideal Architecture for Tumor Microenvironment-Triggered UCL/MR Bioimaging and Enhanced Chemodynamic Therapy. *Chemistry of Materials*, 31(7), 2651–2660.
59. Ding, X., Liu, J., Liu, D., Li, J., Wang, F., Li, L., Wang, Y., Song, S., & Zhang, H. (2017). Multifunctional core/satellite polydopamine@Nd³⁺-sensitized upconversion nanocomposite: A single 808 nm near-infrared light-triggered theranostic platform for in vivo imaging-guided photothermal therapy. *Nano Research*, 10(10), 3434–3446.
60. Dobson, J. (2006). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Development Research*, 67(1), 55–60.
61. Du, B., Yu, M., & Zheng, J. (2018). Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. *Nature Reviews Materials*, 3(10), 358–374.
62. Dubreil, L., Leroux, I., Ledevin, M., Schleider, C., Lagalice, L., Lovo, C., Fleurisson, R., Passemard, S., Kilin, V., Gerber-Lemaire, S., Colle, M.-A., Bonacina, L., & Rouger, K. (2017). Multi-harmonic Imaging in the Second Near-Infrared Window of Nanoparticle-Labeled Stem Cells as a Monitoring Tool in Tissue Depth. *ACS Nano*, 11(7), 6672–6681.
63. Dwivedi, Y., Thakur, S. N., & Rai, S. B. (2007). Study of frequency upconversion in Yb³⁺/Eu³⁺ by cooperative energy transfer in oxyfluoroborate glass matrix. *Applied Physics B*, 89(1), 45–51.
64. Elmi, G. R., Saleem, K., Baig, M. M. F. A., Aamir, M. N., Wang, M., Gao, X., Abbas, M., & Rehman, M. U. (2022). Recent Advances of Magnetic Gold Hybrids and Nanocomposites, and Their Potential Biological Applications. *Magnetochemistry*, 8(4), 38
65. Enriquez-Navas, P. M., & Garcia-Martin, M. L. (2012). Chapter 9—Application of Inorganic Nanoparticles for Diagnosis Based on MRI. In J. M. de la Fuente & V. Grazu (Eds.), *Frontiers of Nanoscience* (Vol. 4, pp. 233–245). Elsevier.
66. European Society of Radiology. (2011). Medical imaging in personalised medicine: A white paper of the research committee of the European Society of Radiology (ESR). *Insights into Imaging*, 2(6), 621–630.

67. Extermann, J., Bonacina, L., Cuña, E., Kasparian, C., Mugnier, Y., Feurer, T., & Wolf, J.-P. (2009). Nanodoublers as deep imaging markers for multi-photon microscopy. *Optics Express*, 17(17), 15342–15349.
68. Ezerskyte, E., Morkvenas, A., Venius, J., Sakirzanovas, S., Karabanovas, V., Katelnikovas, A., & Klimkevicius, V. (2024). Biocompatible Upconverting Nanoprobes for Dual-Modal Imaging and Temperature Sensing. *ACS Applied Nano Materials*, 7(6), 6185–6195.
69. Ezzaier, H., Marins, J. A., Claudet, C., Hemery, G., Sandre, O., & Kuzhir, P. (2018). Kinetics of Aggregation and Magnetic Separation of Multicore Iron Oxide Nanoparticles: Effect of the Grafted Layer Thickness. *Nanomaterials*, 8(8), 623.
70. Faragallah, O. S., El-Hoseny, H., El-Shafai, W., El-Rahman, W. A., El-Sayed, H. S., El-Rabaie, E.-S. M., El-Samie, F. E. A., & Geweid, G. G. N. (2021). A Comprehensive Survey Analysis for Present Solutions of Medical Image Fusion and Future Directions. *IEEE Access*, 9, 11358–11371.
71. Farzin, A., Etesami, S. A., Quint, J., Memic, A., & Tamayol, A. (2020). Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Healthcare Materials*, 9(9), 1901058.
72. Fass, L. (2008). Imaging and cancer: A review. *Molecular Oncology*, 2(2), 115–152.
73. Ferguson, R. M., Minard, K. R., Khandhar, A. P., & Krishnan, K. M. (2011). Optimizing magnetite nanoparticles for mass sensitivity in magnetic particle imaging. *Medical Physics*, 38(3), 1619–1626.
74. Ferguson, R. M., Minard, K. R., & Krishnan, K. M. (2009). Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321(10), 1548–1551.
75. Fischer, S., Ivaturi, A., Fröhlich, B., Rüdiger, M., Richter, A., Krämer, K. W., Richards, B. S., & Goldschmidt, J. C. (2014). Upconverter Silicon Solar Cell Devices for Efficient Utilization of Sub-Band-Gap Photons Under Concentrated Solar Radiation. *IEEE Journal of Photovoltaics*, 4(1), 183–189.
76. Frenkel, J., & Doefman, J. (1930). Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies. *Nature*, 126(3173), 274.
77. Frullano, L., & Meade, T. J. (2007). Multimodal MRI contrast agents. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(7), 939–949.
78. Fu, Q., Zhu, R., Song, J., Yang, H., & Chen, X. (2019). Photoacoustic Imaging: Contrast Agents and Their Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 31(6), 1805875.
79. Fujiwara, K., Monjushiro, H., & Watarai, H. (2004). Non-linear optical activity of porphyrin aggregate at the liquid/liquid interface. *Chemical Physics Letters*, 394(4), 349–353.

80. Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L.-L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C.-Q., Mirshahi, P., Laurent, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J.-P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R., & Soria, C. (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: Differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, 13, 63.
81. Gheata, A. S. (2024). *Functionalization of harmonic nanoparticles for drug release and multimodal imaging applications* [Disertacija, École Polytechnique Fédérale de Lausanne]. Iš <https://doi.org/10.5075/epfl-thesis-10626>
82. Goldschmidt, J. C., & Fischer, S. (2015). Upconversion for Photovoltaics – a Review of Materials, Devices and Concepts for Performance Enhancement. *Advanced Optical Materials*, 3(4), 510–535.
83. Gong, L., Chen, Y., He, K., & Liu, J. (2019). Surface Coverage-Regulated Cellular Interaction of Ultrasmall Luminescent Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 13(2), 1893–1899.
84. Goodwill, P. W., Konkle, J. J., Zheng, B., Saritas, E. U., & Conolly, S. M. (2012). Projection X-Space Magnetic Particle Imaging. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 31(5), 1076–1085.
85. Goswami, N., Yao, Q., Chen, T., & Xie, J. (2016). Mechanistic exploration and controlled synthesis of precise thiolate-gold nanoclusters. *Coordination Chemistry Reviews*, 329, 1–15.
86. Gruber, S., & Nickel, A. (2023). Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Frontiers in Medical Technology*, 5.
87. Guo, J., Yang, W., & Wang, C. (2013). Magnetic Colloidal Supraparticles: Design, Fabrication and Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 25(37), 5196–5214.
88. Guo, S., & Wang, E. (2011). Noble metal nanomaterials: Controllable synthesis and application in fuel cells and analytical sensors. *Nano Today*, 6(3), 240–264.
89. Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995–4021.
90. Haffner-Luntzer, M., Müller-Graf, F., Matthys, R., Hägele, Y., Fischer, V., Jonas, R., Abaei, A., Gebhard, F., Rasche, V., & Ignatius, A. (2017). Evaluation of high-resolution In Vivo MRI for longitudinal analysis of endochondral fracture healing in mice. *PLOS ONE*, 12(3), e0174283.

91. Haghighi, F. H., Binaymotlagh, R., Mirahmadi-Zare, S. Z., & Hadadzadeh, H. (2019). Aptamer/magnetic nanoparticles decorated with fluorescent gold nanoclusters for selective detection and collection of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells from a mixture. *Nanotechnology*, 31(2), 025605.
92. Hagit, A., Soenke, B., Johannes, B., & Shlomo, M. (2010). Synthesis and Characterization of Dual Modality (CT/MRI) Core–Shell Microparticles for Embolization Purposes. *Biomacromolecules*, 11(6), 1600–1607.
93. Hak, A., Ali, M. S., Sankaranarayanan, S. A., Shinde, V. R., & Rengan, A. K. (2023). Chlorin e6: A Promising Photosensitizer in Photo-Based Cancer Nanomedicine. *ACS Applied Bio Materials*, 6(2), 349–364.
94. Han, Y., Li, Z.-T., & Tian, J. (2025). Integrated Porphyrin-Based Photosynthetic Systems Inspired by Purple Bacteria: From Light Harvesting to Artificial Photosynthesis. *Artificial Photosynthesis*.
95. Handelsman, A., Beker, P., Amdursky, N., & Rosenman, G. (2012). Physics and engineering of peptide supramolecular nanostructures. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(18), 6391–6408.
96. Hao, R., Xing, R., Xu, Z., Hou, Y., Gao, S., & Sun, S. (2010). Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *Advanced Materials*, 22(25), 2729–2742.
97. Hemmateenejad, B., Shahrivar-Kevishahi, A., & Shakerizadeh-Shirazi, F. (2016). Reversible Photobleaching of Gold Nanoclusters: A Mechanistic Investigation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(49), 28215–28223.
98. Hone, D. C., Walker, P. I., Evans-Gowing, R., FitzGerald, S., Beeby, A., Chambrier, I., Cook, M. J., & Russell, D. A. (2002). Generation of Cytotoxic Singlet Oxygen via Phthalocyanine-Stabilized Gold Nanoparticles: A Potential Delivery Vehicle for Photodynamic Therapy. *Langmuir*, 18(8), 2985–2987.
99. Hou, W., Xia, F., Alfranca, G., Yan, H., Zhi, X., Liu, Y., Peng, C., Zhang, C., de la Fuente, J. M., & Cui, D. (2017). Nanoparticles for multi-modality cancer diagnosis: Simple protocol for self-assembly of gold nanoclusters mediated by gadolinium ions. *Biomaterials*, 120, 103–114.
100. Hsu, W., Markey, M. K., & Wang, M. D. (2013). Biomedical imaging informatics in the era of precision medicine: Progress, challenges, and opportunities. *Journal of the American Medical Informatics Association*, 20(6), 1010–1013.
101. Hu, D.-H., Sheng, Z.-H., Zhang, P.-F., Yang, D.-Z., Liu, S.-H., Gong, P., Gao, D.-Y., Fang, S.-T., Ma, Y.-F., & Cai, L.-T. (2013). Hybrid gold–gadolinium nanoclusters for tumor-targeted NIRF/CT/MRI triple-modal imaging in vivo. *Nanoscale*, 5(4), 1624–1628.

- 102.** Huang, J., Li, J., Lyu, Y., Miao, Q., & Pu, K. (2019). Molecular optical imaging probes for early diagnosis of drug-induced acute kidney injury. *Nature Materials*, *18*(10), 1133–1143.
- 103.** Huang, P., Zheng, W., Zhou, S., Tu, D., Chen, Z., Zhu, H., Li, R., Ma, E., Huang, M., & Chen, X. (2014). Lanthanide-Doped LiLuF₄ Upconversion Nanoprobes for the Detection of Disease Biomarkers. *Angewandte Chemie*, *126*(5), 1276–1281.
- 104.** Hussain, S., Mubeen, I., Ullah, N., Shah, S. S. U. D., Khan, B. A., Zahoor, M., Ullah, R., Khan, F. A., & Sultan, M. A. (2022). Modern Diagnostic Imaging Technique Applications and Risk Factors in the Medical Field: A Review. *BioMed Research International*, *2022*(1), 5164970.
- 105.** Issa, B., Obaidat, I. M., Issa, B., & Obaidat, I. M. (2019). Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents. In *Magnetic Resonance Imaging*. IntechOpen.
- 106.** Jarockyte, G., Poderys, V., Barzda, V., Karabanovas, V., & Rotomskis, R. (2022). Blood Plasma Stabilized Gold Nanoclusters for Personalized Tumor Theranostics. *Cancers*, *14*(8), 1887.
- 107.** Jarockyte, G., Stasys, M., Poderys, V., Buivydaite, K., Pleckaitis, M., Bulotiene, D., Matulionyte, M., Karabanovas, V., & Rotomskis, R. (2022). Biodistribution of Multimodal Gold Nanoclusters Designed for Photoluminescence-SPECT/CT Imaging and Diagnostic. *Nanomaterials*, *12*(19), 3259.
- 108.** Jeong, H.-H., Mark, A. G., Alarcón-Correa, M., Kim, I., Oswald, P., Lee, T.-C., & Fischer, P. (2016). Dispersion and shape engineered plasmonic nanosensors. *Nature Communications*, *7*(1), 11331.
- 109.** Jochum, T., Reddy, C. M., Eichhöfer, A., Buth, G., Szmytkowski, J., Kalt, H., Moss, D., & Balaban, T. S. (2008). The supramolecular organization of self-assembling chlorosomal bacteriochlorophyll *c*, *d*, or *e* mimics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(35), 12736–12741.
- 110.** Johnson, K. K., Koshy, P., Yang, J.-L., & Sorrell, C. C. (2021). Preclinical Cancer Theranostics—From Nanomaterials to Clinic: The Missing Link. *Advanced Functional Materials*, *31*(43), 2104199.
- 111.** Joshi, H. M., Lin, Y. P., Aslam, M., Prasad, P. V., Schultz-Sikma, E. A., Edelman, R., Meade, T., & Dravid, V. P. (2009). Effects of Shape and Size of Cobalt Ferrite Nanostructures on Their MRI Contrast and Thermal Activation. *The Journal of Physical Chemistry C*, *113*(41), 17761–17767.
- 112.** Jun, Y., Huh, Y.-M., Choi, J., Lee, J.-H., Song, H.-T., Kim, S., Yoon, S., Kim, K.-S., Shin, J.-S., Suh, J.-S., & Cheon, J. (2005). Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(16), 5732–5733.

- 113.** Jun, Y., Seo, J., & Cheon, J. (2008). Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences. *Accounts of Chemical Research*, 41(2), 179–189.
- 114.** Junn, J. C., Soderlund, K. A., & Glastonbury, C. M. (2021). Imaging of Head and Neck Cancer With CT, MRI, and US. *Seminars in Nuclear Medicine*, 51(1), 3–12.
- 115.** Kallumadil, M., Tada, M., Nakagawa, T., Abe, M., Southern, P., & Pankhurst, Q. A. (2009). Corrigendum to “Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia” [J. Magn. Magn. Mater. 321 (2009) 1509–1513]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321(21), 3650–3651.
- 116.** Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., & Schellhammer, P. F. (2010). Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(5), 411–422.
- 117.** Karageorgou, M.-A., Rapsomanikis, A.-N., Mirković, M., Vranješ-Đurić, S., Stiliaris, E., Bouziotis, P., & Stamopoulos, D. (2022). ^{99m}Tc-Labeled Iron Oxide Nanoparticles as Dual-Modality Contrast Agent: A Preliminary Study from Synthesis to Magnetic Resonance and Gamma-Camera Imaging in Mice Models. *Nanomaterials*, 12(15), 2728.
- 118.** Karki, P., Lee, E., & Aschner, M. (2013). Manganese Neurotoxicity: A Focus on Glutamate Transporters. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 25(1), 4.
- 119.** Kelbaskas, L., Bagdonas, S., Dietel, W., & Rotomskis, R. (2003). Excitation relaxation and structure of TPPS₄ J-aggregates. *Journal of Luminescence*, 101(4), 253–262.
- 120.** Kessel, D., Thompson, P., Saatio, K., & Nantwi, K. D. (1987). Tumor Localization and Photosensitization by Sulfonated Derivatives of Tetraphenylporphine. *Photochemistry and Photobiology*, 45(S1), 787–790.
- 121.** Khadria, A., Fleischhauer, J., Boczarow, I., Wilkinson, J. D., Kohl, M. M., & Anderson, H. L. (2018). Porphyrin Dyes for Nonlinear Optical Imaging of Live Cells. *iScience*, 4, 153–163.
- 122.** Kholkin, A., Amdursky, N., Bdikin, I., Gazit, E., & Rosenman, G. (2010). Strong Piezoelectricity in Bioinspired Peptide Nanotubes. *ACS Nano*, 4(2), 610–614.
- 123.** Kim, B. H., Lee, N., Kim, H., An, K., Park, Y. I., Choi, Y., Shin, K., Lee, Y., Kwon, S. G., Na, H. B., Park, J.-G., Ahn, T.-Y., Kim, Y.-W., Moon, W. K., Choi, S. H., & Hyeon, T. (2011). Large-Scale Synthesis of Uniform and Extremely Small-Sized Iron Oxide Nanoparticles for High-Resolution T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Journal of the American Chemical Society*, 133(32), 12624–12631.

- 124.** Kim, J.-E., Shin, J.-Y., & Cho, M.-H. (2012). Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of Toxicology*, 86(5), 685–700.
- 125.** Kim, S., Fujitsuka, M., & Majima, T. (2013). Photochemistry of Singlet Oxygen Sensor Green. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(45), 13985–13992.
- 126.** Kircher, M. F., & Willmann, J. K. (2012). Molecular Body Imaging: MR Imaging, CT, and US. Part I. Principles. *Radiology*, 263(3), 633–643.
- 127.** Kolosnjaj-Tabi, J., Javed, Y., Lartigue, L., Volatron, J., Elgrabli, D., Marangon, I., Pugliese, G., Caron, B., Figuerola, A., Luciani, N., Pellegrino, T., Alloyeau, D., & Gazeau, F. (2015). The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano*, 9(8), 7925–7939.
- 128.** Kong, J., Shang, X., Zheng, W., Chen, X., Tu, D., Wang, M., Song, J., & Qu, J. (2020). Revisiting the Luminescence Decay Kinetics of Energy Transfer Upconversion. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 11(9), 3672–3680.
- 129.** Kong, W., Shan, J., & Ju, Y. (2010). Flame synthesis and effects of host materials on Yb³⁺/Er³⁺ co-doped upconversion nanophosphors. *Materials Letters*, 64(6), 688–691.
- 130.** Kou, J., Dou, D., & Yang, L. (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*, 8(46), 81591–81603.
- 131.** Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098–1107.
- 132.** Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US.
- 133.** Lakshmanan, A., Zhang, S., & Hauser, C. A. E. (2012). Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices. *Trends in Biotechnology*, 30(3), 155–165.
- 134.** Lan, M., Zhao, S., Liu, W., Lee, C., Zhang, W., & Wang, P. (2019). Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 8(13), 1900132.
- 135.** Lapeš, M., Petera, J., & Jirsa, M. (1996). Photodynamic therapy of cutaneous metastases of breast cancer after local application of meso-tetra-(para-sulphophenyl)-porphin (TPPS₄). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36(2), 205–207.
- 136.** Lau, E. C. H. T., Åhlén, M., Cheung, O., Ganin, A. Y., Smith, D. G. E., & Yiu, H. H. P. (2023). Gold-iron oxide (Au/Fe₃O₄) magnetic

nanoparticles as the nanoplatform for binding of bioactive molecules through self-assembly. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10.

137. Lee, D. W., Barrett, D. M., Mackall, C., Orentas, R., & Grupp, S. A. (2012). The Future Is Now: Chimeric Antigen Receptors as New Targeted Therapies for Childhood Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(10), 2780–2790.

138. Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J. H., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2656–2672.

139. Lee, H., Yoon, T.-J., Figueiredo, J.-L., Swirski, F. K., & Weissleder, R. (2009). Rapid detection and profiling of cancer cells in fine-needle aspirates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), 12459–12464.

140. Lee, J.-H., Huh, Y.-M., Jun, Y., Seo, J., Jang, J., Song, H.-T., Kim, S., Cho, E.-J., Yoon, H.-G., Suh, J.-S., & Cheon, J. (2007). Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nature Medicine*, 13(1), 95–99.

141. Lee, N., Choi, Y., Lee, Y., Park, M., Moon, W. K., Choi, S. H., & Hyeon, T. (2012). Water-Dispersible Ferrimagnetic Iron Oxide Nanocubes with Extremely High r_2 Relaxivity for Highly Sensitive in Vivo MRI of Tumors. *Nano Letters*, 12(6), 3127–3131.

142. Lee, N., & Hyeon, T. (2012). Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2575–2589.

143. Lee, N., Kim, H., Choi, S. H., Park, M., Kim, D., Kim, H.-C., Choi, Y., Lin, S., Kim, B. H., Jung, H. S., Kim, H., Park, K. S., Moon, W. K., & Hyeon, T. (2011). Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2662–2667.

144. Lee, W. I., Bae, Y., & Bard, A. J. (2004). Strong Blue Photoluminescence and ECL from OH-Terminated PAMAM Dendrimers in the Absence of Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(27), 8358–8359.

145. Li, G., Sun, S., Wilson, R. J., White, R. L., Pourmand, N., & Wang, S. X. (2006). Spin valve sensors for ultrasensitive detection of superparamagnetic nanoparticles for biological applications. *Sensors and Actuators A: Physical*, 126(1), 98–106.

146. Li, H., Li, H., & Wan, A. (2020). Luminescent gold nanoclusters for in vivo tumor imaging. *Analyst*, 145(2), 348–363.

147. Li, H., Tan, M., Wang, X., Li, F., Zhang, Y., Zhao, L., Yang, C., & Chen, G. (2020). Temporal Multiplexed *in Vivo* Upconversion Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 142(4), 2023–2030.
148. Li, J., Shen, Y., Liu, Y., Shi, F., Ren, X., Niu, T., Zhao, K., & Liu, S. F. (2017). Stable High-Performance Flexible Photodetector Based on Upconversion Nanoparticles/Perovskite Microarrays Composite. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(22), 19176–19183.
149. Li, L., Liu, X., Fu, C., Tan, L., & Liu, H. (2015). Biosynthesis of fluorescent gold nanoclusters for *in vitro* and *in vivo* tumor imaging. *Optics Communications*, 355, 567–574.
150. Li, X., Liu, L., Fu, Y., Chen, H., Abualrejal, M. M. A., Zhang, H., Wang, Z., & Zhang, H. (2020). Peptide-enhanced tumor accumulation of upconversion nanoparticles for sensitive upconversion luminescence/magnetic resonance dual-mode bioimaging of colorectal tumors. *Acta Biomaterialia*, 104, 167–175.
151. Li, X., Wang, R., Zhang, F., Zhou, L., Shen, D., Yao, C., & Zhao, D. (2013). Nd³⁺ Sensitized Up/Down Converting Dual-Mode Nanomaterials for Efficient In-vitro and In-vivo Bioimaging Excited at 800 nm. *Scientific Reports*, 3(1), 3536.
152. Li, Y., & Chen, G. (2022). Upconversion Nanoparticles for Cancer Therapy. *Advanced NanoBiomed Research*, 2(12), 2200092.
153. Li, Y., Tang, J., He, L., Liu, Y., Liu, Y., Chen, C., & Tang, Z. (2015). Core–Shell Upconversion Nanoparticle@Metal–Organic Framework Nanoprobes for Luminescent/Magnetic Dual-Mode Targeted Imaging. *Advanced Materials*, 27(27), 4075–4080.
154. Li, Z., Wang, S. X., Sun, Q., Zhao, H. L., Lei, H., Lan, M. B., Cheng, Z. X., Wang, X. L., Dou, S. X., & (Max) Lu, G. Q. (2013). Ultrasmall Manganese Ferrite Nanoparticles as Positive Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced Healthcare Materials*, 2(7), 958–964.
155. Liang, G., Ye, D., Zhang, X., Dong, F., Chen, H., Zhang, S., Li, J., Shen, X., & Kong, J. (2013). One-pot synthesis of Gd³⁺-functionalized gold nanoclusters for dual model (fluorescence/magnetic resonance) imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(29), 3545–3552.
156. Liang, H., Chen, G., Li, L., Liu, Y., Qin, F., & Zhang, Z. (2009). Upconversion luminescence in Yb³⁺/Tb³⁺-codoped monodisperse NaYF₄ nanocrystals. *Optics Communications*, 282(14), 3028–3031.
157. Lin, M., Zhao, Y., Wang, S., Liu, M., Duan, Z., Chen, Y., Li, F., Xu, F., & Lu, T. (2012). Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1551–1561.

- 158.** Liu, Q. (2020). Studies of optical properties of lanthanide upconversion nanoparticles for emerging applications. (Disertacija, KTH Royal Institute of Technology). Is <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:kth:diva-273038>
- 159.** Liu, Y., Kang, N., Lv, J., Zhou, Z., Zhao, Q., Ma, L., Chen, Z., Ren, L., & Nie, L. (2016). Deep Photoacoustic/Luminescence/Magnetic Resonance Multimodal Imaging in Living Subjects Using High-Efficiency Upconversion Nanocomposites. *Advanced Materials*, 28(30), 6411–6419.
- 160.** Lu, H., Peng, Y., Ye, H., Cui, X., Hu, J., Gu, H., Khlobystov, A. N., Green, M. A., Blower, P. J., Wyatt, P. B., Gillin, W. P., & Hernández, I. (2017). Sensitization, energy transfer and infra-red emission decay modulation in Yb³⁺-doped NaYF₄ nanoparticles with visible light through a perfluoroanthraquinone chromophore. *Scientific Reports*, 7(1), 5066.
- 161.** Lu, Y., Xu, Y.-J., Zhang, G., Ling, D., Wang, M., Zhou, Y., Wu, Y.-D., Wu, T., Hackett, M. J., Hyo Kim, B., Chang, H., Kim, J., Hu, X.-T., Dong, L., Lee, N., Li, F., He, J.-C., Zhang, L., Wen, H.-Q., ... Zou, D.-H. (2017). Iron oxide nanoclusters for T1 magnetic resonance imaging of non-human primates. *Nature Biomedical Engineering*, 1(8), 637–643.
- 162.** Lu, Y., Zhao, J., Zhang, R., Liu, Y., Liu, D., Goldys, E. M., Yang, X., Xi, P., Sunna, A., Lu, J., Shi, Y., Leif, R. C., Huo, Y., Shen, J., Piper, J. A., Robinson, J. P., & Jin, D. (2014). Tunable lifetime multiplexing using luminescent nanocrystals. *Nature Photonics*, 8(1), 32–36.
- 163.** Luca, G. M. R. D., Breedijk, R. M. P., Brandt, R. A. J., Zeelenberg, C. H. C., Jong, B. E. de, Timmermans, W., Azar, L. N., Hoebe, R. A., Stallinga, S., & Manders, E. M. M. (2013). Re-scan confocal microscopy: Scanning twice for better resolution. *Biomedical Optics Express*, 4(11), 2644–2656.
- 164.** Luo, Y., Du, S., Zhang, W., Liao, Z., Zuo, F., & Yang, S. (2017). Core@shell Fe₃O₄@Mn²⁺-doped NaYF₄:Yb/Tm nanoparticles for triple-modality T1/T2-weighted MRI and NIR-to-NIR upconversion luminescence imaging agents. *RSC Advances*, 7(60), 37929–37937.
- 165.** Lusic, H., & Grinstaff, M. W. (2013). X-ray-Computed Tomography Contrast Agents. *Chemical Reviews*, 113(3), 1641–1666.
- 166.** Lv, R., Wang, D., Xiao, L., Chen, G., Xia, J., & Prasad, P. N. (2017). Stable ICG-loaded upconversion nanoparticles: Silica core/shell theranostic nanoplatfrom for dual-modal upconversion and photoacoustic imaging together with photothermal therapy. *Scientific Reports*, 7(1), 15753.
- 167.** Ma, X., & Ni, X. (2013). Using upconversion nanoparticles to improve photovoltaic properties of poly(3-hexylthiophene)-TiO₂ heterojunction solar cell. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4), 1547.

- 168.** Macdonald, I. J., & Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 05(02), 105–129.
- 169.** Magouroux, T., Extermann, J., Hoffmann, P., Mugnier, Y., Le Dantec, R., Jaconi, M. E., Kasparian, C., Ciepielewski, D., Bonacina, L., & Wolf, J.-P. (2012). High-Speed Tracking of Murine Cardiac Stem Cells by Harmonic Nanodoublers. *Small*, 8(17), 2752–2756.
- 170.** Maiti, N. C., Mazumdar, S., & Periasamy, N. (1998). J- and H-Aggregates of Porphyrin–Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(9),
- 171.** Maity, S., Bain, D., & Patra, A. (2019). An overview on the current understanding of the photophysical properties of metal nanoclusters and their potential applications. *Nanoscale*, 11(47), 22685–22723.
- 172.** Markides, H., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2012). Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *Journal of Nanomaterials*, 2012(1), 614094.
- 173.** Massoud, T. F., & Gambhir, S. S. (2003). Molecular imaging in living subjects: Seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Development*, 17(5), 545–580.
- 174.** Materia, M. E., Pernia Leal, M., Scotto, M., Balakrishnan, P. B., Kumar Avugadda, S., García-Martín, M. L., Cohen, B. E., Chan, E. M., & Pellegrino, T. (2017). Multifunctional Magnetic and Upconverting Nanobeads as Dual Modal Imaging Tools. *Bioconjugate Chemistry*, 28(11), 2707–2714.
- 175.** Mehrdel, B., Nikbakht, A., Aziz, A. A., Jameel, M. S., Dheyab, M. A., & Khaniabadi, P. M. (2021). Upconversion lanthanide nanomaterials: Basics introduction, synthesis approaches, mechanism and application in photodetector and photovoltaic devices. *Nanotechnology*, 33(8), 082001.
- 176.** Mehrmohammadi, M., Shin, T.-H., Qu, M., Kruijinga, P., Truby, R. L., Lee, J.-H., Cheon, J., & Emelianov, S. Y. (2013). In vivo pulsed magnetomotive ultrasound imaging using high-performance magnetoactive contrast nanoagents. *Nanoscale*, 5(22), 11179–11186.
- 177.** Mertzman, J. E., Kar, S., Lofland, S., Fleming, T., Keuren, E. V., Tong, Y. Y., & Stoll, S. L. (2009). Surface attached manganese–oxo clusters as potential contrast agents. *Chemical Communications*, 7, 788–790.
- 178.** Miao, Y., Xie, Q., Zhang, H., Cai, J., Liu, X., Jiao, J., Hu, S., Ghosal, A., Yang, Y., & Fan, H. (2019). Composition-Tunable Ultrasmall Manganese Ferrite Nanoparticles: Insights into their *In Vivo* T1 Contrast Efficacy. *Theranostics*, 9(6), 1764–1776.

- 179.** Mikalauskaite, A., Pleckaitis, M., Grinciene, G., Karabanovas, V., & Jagminas, A. (2022). Designing red-fluorescent superparamagnetic nanoparticles by conjugation with gold clusters. *RSC Advances*, 12(54), 35300–35308.
- 180.** Mikawa, M., Kato, H., Okumura, M., Narazaki, M., Kanazawa, Y., Miwa, N., & Shinohara, H. (2001). Paramagnetic Water-Soluble Metallofullerenes Having the Highest Relaxivity for MRI Contrast Agents. *Bioconjugate Chemistry*, 12(4), 510–514.
- 181.** Milne, S., & King, G. G. (2014). Advanced imaging in COPD: Insights into pulmonary pathophysiology. *Journal of Thoracic Disease*, 6(11), 1570–1585.
- 182.** Mnasri, W., Ben Tahar, L., Beaunier, P., Abi Haidar, D., Boissière, M., Sandre, O., & Ammar, S. (2020). Polyol-Made Luminescent and Superparamagnetic β -NaY_{0.8}Eu_{0.2}F₄@ γ -Fe₂O₃ Core-Satellites Nanoparticles for Dual Magnetic Resonance and Optical Imaging. *Nanomaterials*, 10(2), 393.
- 183.** Mnasri, W., Ben Tahar, L., Boissière, M., Abi Haidar, D., & Ammar, S. (2019). The first one-pot synthesis of undoped and Eu doped β -NaYF₄ nanocrystals and their evaluation as efficient dyes for nanomedicine. *Materials Science and Engineering: C*, 94, 26–34.
- 184.** Mooradian, A. (1969). Photoluminescence of Metals. *Physical Review Letters*, 22(5), 185–187.
- 185.** Mukherjee, P., Kumar, A., Bhamidipati, K., Puvvada, N., & Sahu, S. K. (2020). Facile Strategy to Synthesize Magnetic Upconversion Nanoscale Metal–Organic Framework Composites for Theranostics Application. *ACS Applied Bio Materials*, 3(2), 869–880.
- 186.** Na, H. B., Lee, J. H., An, K., Park, Y. I., Park, M., Lee, I. S., Nam, D.-H., Kim, S. T., Kim, S.-H., Kim, S.-W., Lim, K.-H., Kim, K.-S., Kim, S.-O., & Hyeon, T. (2007). Development of a T1 Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging Using MnO Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(28), 5397–5401.
- 187.** Naccache, R., Yu, Q., & Capobianco, J. A. (2015). The Fluoride Host: Nucleation, Growth, and Upconversion of Lanthanide-Doped Nanoparticles. *Advanced Optical Materials*, 3(4), 482–509.
- 188.** Najjar, R. (2024). Clinical applications, safety profiles, and future developments of contrast agents in modern radiology: A comprehensive review. *iRADIOLOGY*, 2(5), 430–468.
- 189.** Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 483–496.

190. Nguyen, A., Kumar, S., & Kulkarni, A. A. (2022). Nanotheranostic Strategies for Cancer Immunotherapy. *Small Methods*, 6(12), 2200718.
191. Ni, D., Zhang, J., Bu, W., Xing, H., Han, F., Xiao, Q., Yao, Z., Chen, F., He, Q., Liu, J., Zhang, S., Fan, W., Zhou, L., Peng, W., & Shi, J. (2014). Dual-Targeting Upconversion Nanoprobes across the Blood–Brain Barrier for Magnetic Resonance/Fluorescence Imaging of Intracranial Glioblastoma. *ACS Nano*, 8(2), 1231–1242.
192. O’Handley, R. C. (1999). *Modern Magnetic Materials: Principles and Applications*. John Wiley and Sons.
193. Ohno, O., Kaizu, Y., & Kobayashi, H. (1993). J-aggregate formation of a water-soluble porphyrin in acidic aqueous media. *The Journal of Chemical Physics*, 99(5), 4128–4139.
194. Ono, M., Wilson, A., Nobrega, J., Westaway, D., Verhoeff, P., Zhuang, Z.-P., Kung, M.-P., & Kung, H. F. (2003). ¹¹C-labeled stilbene derivatives as A β -aggregate-specific PET imaging agents for Alzheimer’s disease. *Nuclear Medicine and Biology*, 30(6), 565–571.
195. Osváth, Sz., Meszéna, G., Barzda, V., & Garab, G. (1994). Trapping magnetically oriented chloroplast thylakoid membranes in gels for electric measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 26(3), 287–292.
196. Pan, G., Bai, X., Yang, D., Chen, X., Jing, P., Qu, S., Zhang, L., Zhou, D., Zhu, J., Xu, W., Dong, B., & Song, H. (2017). Doping Lanthanide into Perovskite Nanocrystals: Highly Improved and Expanded Optical Properties. *Nano Letters*, 17(12), 8005–8011.
197. Panagiotopoulos, N., Duschka, R. L., Ahlborg, M., Bringout, G., Debbeler, C., Graeser, M., Kaethner, C., Lüdtké-Buzug, K., Medimagh, H., Stelzner, J., Buzug, T. M., Barkhausen, J., Vogt, F. M., & Haegele, J. (2015). Magnetic particle imaging: Current developments and future directions. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3097–3114.
198. Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), R167.
199. Pantazis, P., Maloney, J., Wu, D., & Fraser, S. E. (2010). Second harmonic generating (SHG) nanoprobes for in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14535–14540.
200. Parra, G. G., Correa, D. S., Silveira-Alves, E., Almeida, L. M., Souza, M. A. R., De Boni, L., Misoguti, L., Mendonça, C. R., Zílio, S. C., Barbosa Neto, N. M., Borissevitch, I. E., & Gonçalves, P. J. (2021). Effects of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS₄) aggregation on its spectral and kinetic characteristics and singlet oxygen production. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 261, 120063.

- 201.** Parvizian, M., Mnasri, W., Pleckaitis, M., Karabanovas, V., Khan, H., Nowak, S., Gam-Derouich, S., Ben Tahar, L., Sandre, O., Rotomskis, R., & Ammar, S. (2024). Up-converting β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ nanoparticles coated by superparamagnetic γ -Fe₂O₃ nanosatellites: Elaboration, characterization and in vitro cytotoxicity. *RSC ADVANCES*, 14(43), 31486–31497.
- 202.** Patra, A., Friend, C. S., Kapoor, R., & Prasad, P. N. (2003). Effect of crystal nature on upconversion luminescence in Er³⁺:ZrO₂ nanocrystals. *Applied Physics Letters*, 83(2), 284–286.
- 203.** Penfield, J. G., & Reilly, R. F. (2007). What nephrologists need to know about gadolinium. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 3(12), 654–668.
- 204.** Peng, C., Yu, M., & Zheng, J. (2020). In Situ Ligand-Directed Growth of Gold Nanoparticles in Biological Tissues. *Nano Letters*, 20(2), 1378–1382.
- 205.** Pleckaitis, M., Habach, F., Kontenis, L., Steinbach, G., Jarockyte, G., Kalnaityte, A., Domonkos, I., Akhtar, P., Alizadeh, M., Bagdonas, S., Karabanovas, V., Garab, G., Rotomskis, R., & Barzda, V. (2022). Structure and principles of self-assembly of giant “sea urchin” type sulfonatophenyl porphine aggregates. *NANO RESEARCH*, 15(6), 5527–5537.
- 206.** Pleckaitis, M., Karabanovas, V., Butkiene, G., Venius, J., Burkanas, M., Grinciene, G., Jagminas, A., & Rotomskis, R. (2023). Magnetic Nanoparticles Decorated with Gold Nanoclusters–Applications in Cancer Theranostics. *Advanced Materials Interfaces*, 10(35), 2300462.
- 207.** Plewes, D. B., & Kucharczyk, W. (2012). Physics of MRI: A primer. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 35(5), 1038–1054.
- 208.** Poderys, V., Jarockyte, G., Bagdonas, S., Karabanovas, V., & Rotomskis, R. (2020). Protein-stabilized gold nanoclusters for PDT: ROS and singlet oxygen generation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204, 111802.
- 209.** Pösel, E., Kloust, H., Tromsdorf, U., Janschel, M., Hahn, C., Maßlo, C., & Weller, H. (2012). Relaxivity Optimization of a PEGylated Iron-Oxide-Based Negative Magnetic Resonance Contrast Agent for T2-Weighted Spin–Echo Imaging. *ACS Nano*, 6(2), 1619–1624.
- 210.** Prabhakar, R., Haresh, K. P., Ganesh, T., Joshi, R. C., Julka, P. K., & Rath, G. K. (2007). Comparison of computed tomography and magnetic resonance based target volume in brain tumors. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 3(2), 121.
- 211.** Pretze, M., Hien, A., Rädle, M., Schirmacher, R., Wängler, C., & Wängler, B. (2018). Gastrin-Releasing Peptide Receptor- and Prostate-Specific Membrane Antigen-Specific Ultrasmall Gold Nanoparticles for

Characterization and Diagnosis of Prostate Carcinoma via Fluorescence Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 29(5), 1525–1533.

212. Prokes, S. M. (1996). Surface and optical properties of porous silicon. *Journal of Materials Research*, 11(2), 305–320.

213. Pushkar', A. A., Uvarova, T. V., & Kiiko, V. V. (2011). Up-conversion multiwave (White) luminescence in the visible spectral range under excitation by IR laser diodes in the active $\text{BaY}_2\text{F}_8:\text{Yb}^{3+},\text{Pr}^{3+}$ medium. *Optics and Spectroscopy*, 111(2), 273–276.

214. Qiao, H., Cui, Z., Yang, S., Ji, D., Wang, Y., Yang, Y., Han, X., Fan, Q., Qin, A., Wang, T., He, X.-P., Bu, W., & Tang, T. (2017). Targeting Osteocytes to Attenuate Early Breast Cancer Bone Metastasis by Theranostic Upconversion Nanoparticles with Responsive Plumbagin Release. *ACS Nano*, 11(7), 7259–7273.

215. Qiao, J., Mu, X., Qi, L., Deng, J., & Mao, L. (2013). Folic acid-functionalized fluorescent gold nanoclusters with polymers as linkers for cancer cell imaging. *Chemical Communications*, 49(73), 8030–8032.

216. Qin, X., Carneiro Neto, A. N., Longo, R. L., Wu, Y., Malta, O. L., & Liu, X. (2021). Surface Plasmon–Photon Coupling in Lanthanide-Doped Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 12(5), 1520–1541.

217. Rahmer, J., Antonelli, A., Sfara, C., Tiemann, B., Gleich, B., Magnani, M., Weizenecker, J., & Borgert, J. (2013). Nanoparticle encapsulation in red blood cells enables blood-pool magnetic particle imaging hours after injection. *Physics in Medicine & Biology*, 58(12), 3965.

218. Reimer, P., & Balzer, T. (2003). Ferucarbotran (Resovist): A new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *European Radiology*, 13(6), 1266–1276.

219. Respaud, M., Broto, J. M., Rakoto, H., Fert, A. R., Thomas, L., Barbara, B., Verelst, M., Snoeck, E., Lecante, P., Mosset, A., Osuna, J., Ely, T. O., Amiens, C., & Chaudret, B. (1998). Surface effects on the magnetic properties of ultrafine cobalt particles. *Physical Review B*, 57(5), 2925–2935.

220. Rimeika, R., Rotomskis, R., Poderys, V., Čiplys, D., Sereika, A., Selskis, A., & Shur, M. S. (2006). Surface acoustic wave interaction with humidity-sensitive TPPS₄ nano-strip structure. *Ultragarsas "Ultrasound,"* 58(1).

221. Rivera, V. a. G., Ferri, F. A., Jr, E. M., Rivera, V. a. G., Ferri, F. A., & Jr, E. M. (2012). Localized Surface Plasmon Resonances: Noble Metal Nanoparticle Interaction with Rare-Earth Ions. In *Plasmonics—Principles and Applications*. IntechOpen.

222. Rogov, A., Mugnier, Y., & Bonacina, L. (2015). Harmonic nanoparticles: Noncentrosymmetric metal oxides for nonlinear optics. *Journal of Optics*, 17(3), 033001.
223. Romeo, A., Castriciano, M. A., Zagami, R., Pollicino, G., Sclaro, L. M., & Pasternack, R. F. (2017). Effect of zinc cations on the kinetics of supramolecular assembly and the chirality of porphyrin J-aggregates. *Chemical Science*, 8(2), 961–967.
224. Rothmund, P. (1936). A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin. *Journal of the American Chemical Society*, 58(4), 625–627.
225. Rotomskis, R., Augulis, R., Snitka, V., Valiokas, R., & Liedberg, B. (2004). Hierarchical Structure of TPPS₄ J-Aggregates on Substrate Revealed by Atomic Force Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(9), 2833–2838.
226. Safdar, M., Ghazy, A., Lastusaari, M., & Karppinen, M. (2020). Lanthanide-based inorganic–organic hybrid materials for photon-upconversion. *Journal of Materials Chemistry C*, 8(21), 6946–6965.
227. Santucci, C., Mignozzi, S., Levi, F., Malvezzi, M., Boffetta, P., Negri, E., & Vecchia, C. L. (2025). European cancer mortality predictions for the year 2025 with focus on breast cancer. *Annals of Oncology*, 36(4), 460–468.
228. Schenkman, L. (2011). Second Thoughts About CT Imaging. *Science*, 331(6020), 1002–1004.
229. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
230. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
231. Schulze, T. F., & Schmidt, T. W. (2014). Photochemical upconversion: Present status and prospects for its application to solar energy conversion. *Energy & Environmental Science*, 8(1), 103–125.
232. Schwaminger, S. P., Bauer, D., Fraga-García, P., Wagner, F. E., & Berensmeier, S. (2017). Oxidation of magnetite nanoparticles: Impact on surface and crystal properties. *CrystEngComm*, 19(2), 246–255.
233. Sedlmeier, A., & Gorris, H. H. (2015). Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1526–1560.
234. Shah, R. R., Davis, T. P., Glover, A. L., Nikles, D. E., & Brazel, C. S. (2015). Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle

properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 387, 96–106.

235. Shamsi, J., Urban, A. S., Imran, M., De Trizio, L., & Manna, L. (2019). Metal Halide Perovskite Nanocrystals: Synthesis, Post-Synthesis Modifications, and Their Optical Properties. *Chemical Reviews*, 119(5), 3296–3348.

236. Shang, L., Azadfar, N., Stockmar, F., Send, W., Trouillet, V., Bruns, M., Gerthsen, D., & Nienhaus, G. U. (2011). One-Pot Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Gold Clusters for Cellular Fluorescence Lifetime Imaging. *Small*, 7(18), 2614–2620.

237. Shang, L., Stockmar, F., Azadfar, N., & Nienhaus, G. U. (2013). Intracellular Thermometry by Using Fluorescent Gold Nanoclusters. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(42), 11154–11157.

238. Shi, F., Wang, J., Zhai, X., Zhao, D., & Qin, W. (2011). Facile synthesis of β -NaLuF₄: Yb/Tm hexagonal nanoplates with intense ultraviolet upconversion luminescence. *CrystEngComm*, 13(11), 3782–3787.

239. Shin, J., Anisur, R. M., Ko, M. K., Im, G. H., Lee, J. H., & Lee, I. S. (2009). Hollow Manganese Oxide Nanoparticles as Multifunctional Agents for Magnetic Resonance Imaging and Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(2), 321–324.

240. Shin, T.-H., Choi, J., Yun, S., Kim, I.-S., Song, H.-T., Kim, Y., Park, K. I., & Cheon, J. (2014). T1 and T2 Dual-Mode MRI Contrast Agent for Enhancing Accuracy by Engineered Nanomaterials. *ACS Nano*, 8(4), 3393–3401.

241. Short, J. M., Berriman, J. A., Kübel, C., El-Hachemi, Z., Naubron, J.-V., & Balaban, T. S. (2013). Electron Cryo-Microscopy of TPPS₄·2HCl Tubes Reveals a Helical Organisation Explaining the Origin of their Chirality. *ChemPhysChem*, 14(14), 3209–3214.

242. Sikora-Dobrowolska, B., Borodziuk, A., Kulpa-Greszta, M., Pazik, R., Wojciechowski, T., Sobczak, K., Rybusinski, J., Szczytko, J., & Klopotoski, L. (2024). Opto-magnetic nanoparticles with upconverting properties for optical imaging and photothermal therapies. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 591, 171714.

243. Silva, S. M., Tavallaie, R., Sandiford, L., Tilley, R. D., & Gooding, J. J. (2016). Gold coated magnetic nanoparticles: From preparation to surface modification for analytical and biomedical applications. *Chemical Communications*, 52(48), 7528–7540.

244. Sima, A. A., Kennedy, J. C., Blakeslee, D., & Robertson, D. M. (1981). Experimental porphyric neuropathy: A preliminary report. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 8(2), 105–113.

245. Simon, Y. C., & Weder, C. (2012). Low-power photon upconversion through triplet–triplet annihilation in polymers. *Journal of Materials Chemistry*, 22(39), 20817–20830.
246. Skripka, A., Karabanovas, V., Jarockyte, G., Marin, R., Tam, V., Cerruti, M., Rotomskis, R., & Vetrone, F. (2019). Decoupling Theranostics with Rare Earth Doped Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 29(12), 1807105.
247. Sonay, A. Y., Kalyviotis, K., Yaganoglu, S., Unsal, A., Konantz, M., Teulon, C., Lieberwirth, I., Sieber, S., Jiang, S., Behzadi, S., Crespy, D., Landfester, K., Roke, S., Lengerke, C., & Pantazis, P. (2021). Biodegradable Harmonophores for Targeted High-Resolution In Vivo Tumor Imaging. *ACS Nano*, 15(3), 4144–4154.
248. Song, G., Chen, M., Zhang, Y., Cui, L., Qu, H., Zheng, X., Wintermark, M., Liu, Z., & Rao, J. (2018). Janus Iron Oxides @ Semiconducting Polymer Nanoparticle Tracer for Cell Tracking by Magnetic Particle Imaging. *Nano Letters*, 18(1), 182–189.
249. Spanoudaki, V. C., & Ziegler, S. I. (2008). PET & SPECT Instrumentation. In W. Semmler & M. Schwaiger (Eds.), *Molecular Imaging I* (pp. 53–74). Springer.
250. Starmans, L. W. E., Moonen, R. P. M., Aussems-Custers, E., Daemen, M. J. A. P., Strijkers, G. J., Nicolay, K., & Grüll, H. (2015). Evaluation of Iron Oxide Nanoparticle Micelles for Magnetic Particle Imaging (MPI) of Thrombosis. *PLOS ONE*, 10(3), e0119257.
251. Steinbach, G., Nagy, D., Sipka, G., Manders, E., Garab, G., & Zimányi, L. (2019). Fluorescence-detected linear dichroism imaging in a re-scan confocal microscope equipped with differential polarization attachment. *European Biophysics Journal*, 48(5), 457–463.
252. Stephen P Power, F. M., & Connor, M. M. M. (2016). Computed tomography and patient risk: Facts, perceptions and uncertainties. *World Journal of Radiology*, 8(12), 902–915.
253. Stephen, Z. R., Kievit, F. M., & Zhang, M. (2011). Magnetite nanoparticles for medical MR imaging. *Materials Today*, 14(7), 330–338.
254. Stuchinskaya, T., Moreno, M., Cook, M. J., Edwards, D. R., & Russell, D. A. (2011). Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 10(5), 822–831.
255. Sugiyama, N., Sonay, A. Y., Tussiwand, R., Cohen, B. E., & Pantazis, P. (2018). Effective Labeling of Primary Somatic Stem Cells with BaTiO₃ Nanocrystals for Second Harmonic Generation Imaging. *Small*, 14(8), 1703386.

256. Sun, C., Lee, J. S. H., & Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1252–1265.
257. Sun, L., Liu, H., Ye, Y., Lei, Y., Islam, R., Tan, S., Tong, R., Miao, Y.-B., & Cai, L. (2023). Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–28.
258. Sun, S.-K., Dong, L.-X., Cao, Y., Sun, H.-R., & Yan, X.-P. (2013). Fabrication of Multifunctional Gd₂O₃/Au Hybrid Nanoprobe via a One-Step Approach for Near-Infrared Fluorescence and Magnetic Resonance Multimodal Imaging in Vivo. *Analytical Chemistry*, 85(17), 8436–8441.
259. Sun, Y., Zhu, X., Peng, J., & Li, F. (2013). Core–Shell Lanthanide Upconversion Nanophosphors as Four-Modal Probes for Tumor Angiogenesis Imaging. *ACS Nano*, 7(12), 11290–11300.
260. Sutherland, R. L. (2003). *Handbook of Nonlinear Optics*. CRC Press.
261. Kobayashi, T. (2011). *J-Aggregates*. WORLD SCIENTIFIC.
262. Taku, N., Koulouri, O., Scoffings, D., Gurnell, M., & Burnet, N. (2017). The use of 11 carbon methionine positron emission tomography (PET) imaging to enhance radiotherapy planning in the treatment of a giant, invasive pituitary adenoma. *BJR|Case Reports*, 3(2), 20160098.
263. Tarkistani, M. A. M., Komalla, V., & Kayser, V. (2021). Recent Advances in the Use of Iron–Gold Hybrid Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 11(5), 1227.
264. Taylor, K. M. L., Rieter, W. J., & Lin, W. (2008). Manganese-Based Nanoscale Metal–Organic Frameworks for Magnetic Resonance Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 130(44), 14358–14359.
265. Tessore, F., Orbelli Biroli, A., Di Carlo, G., & Pizzotti, M. (2018). Porphyrins for Second Order Nonlinear Optics (NLO): An Intriguing History §. *Inorganics*, 6(3), 81.
266. Tran, N., & Webster, T. J. (2010). Magnetic nanoparticles: Biomedical applications and challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 20(40), 8760–8767.
267. Tromsdorf, U. I., Bruns, O. T., Salmen, S. C., Beisiegel, U., & Weller, H. (2009). A Highly Effective, Nontoxic T1 MR Contrast Agent Based on Ultrasmall PEGylated Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Letters*, 9(12), 4434–4440.
268. Tu, C., Osborne, E. A., & Louie, A. Y. (2011). Activatable T1 and T2 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(4), 1335–1348.

269. van de Looij, S. M., Hebels, E. R., Viola, M., Hembury, M., Oliveira, S., & Vermonden, T. (2022). Gold Nanoclusters: Imaging, Therapy, and Theranostic Roles in Biomedical Applications. *Bioconjugate Chemistry*, 33(1), 4–23.
270. Vankayala, R., Kuo, C.-L., Nuthalapati, K., Chiang, C.-S., & Hwang, K. C. (2015). Nucleus-Targeting Gold Nanoclusters for Simultaneous In Vivo Fluorescence Imaging, Gene Delivery, and NIR-Light Activated Photodynamic Therapy. *Advanced Functional Materials*, 25(37), 5934–5945.
271. Veisheh, O., Sun, C., Gunn, J., Kohler, N., Gabikian, P., Lee, D., Bhattarai, N., Ellenbogen, R., Sze, R., Hallahan, A., Olson, J., & Zhang, M. (2005). Optical and MRI Multifunctional Nanoprobe for Targeting Gliomas. *Nano Letters*, 5(6), 1003–1008.
272. Verma, A., & Stellacci, F. (2010). Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small*, 6(1), 12–21.
273. Voronovic, E., Skripka, A., Jarockyte, G., Ger, M., Kuciauskas, D., Kaupinis, A., Valius, M., Rotomskis, R., Vetrone, F., & Karabanovas, V. (2021). Uptake of Upconverting Nanoparticles by Breast Cancer Cells: Surface Coating versus the Protein Corona. *ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES*, 13(33), 39076–39087.
274. Vuong, Q. L., Berret, J.-F., Fresnais, J., Gossuin, Y., & Sandre, O. (2012). A Universal Scaling Law to Predict the Efficiency of Magnetic Nanoparticles as MRI T2-Contrast Agents. *Advanced Healthcare Materials*, 1(4), 502–512.
275. Wahajuddin, & Arora, S. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3445–3471.
276. Wang, B., Hu, S., Teng, Y., Chen, J., Wang, H., Xu, Y., Wang, K., Xu, J., Cheng, Y., & Gao, X. (2024). Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1–65.
277. Wang, C., Fan, W., Zhang, Z., Wen, Y., Xiong, L., & Chen, X. (2019). Advanced Nanotechnology Leading the Way to Multimodal Imaging-Guided Precision Surgical Therapy. *Advanced Materials*, 31(49), 1904329.
278. Wang, C., Wang, Y., Xu, L., Shi, X., Li, X., Xu, X., Sun, H., Yang, B., & Lin, Q. (2013). A Galvanic Replacement Route to Prepare Strongly Fluorescent and Highly Stable Gold Nanodots for Cellular Imaging. *Small*, 9(3), 413–420.
279. Wang, C., Yao, Y., & Song, Q. (2015). Gold nanoclusters decorated with magnetic iron oxide nanoparticles for potential multimodal optical/magnetic resonance imaging. *Journal of Materials Chemistry C*, 3(23), 5910–5917.

- 280.** Wang, G., Huang, T., Murray, R. W., Menard, L., & Nuzzo, R. G. (2005). Near-IR Luminescence of Monolayer-Protected Metal Clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 127(3), 812–813.
- 281.** Wang, G., Zhang, X., Liu, Y., Hu, Z., Mei, X., & Uvdal, K. (2015). Magneto-fluorescent nanoparticles with high-intensity NIR emission, T1- and T2-weighted MR for multimodal specific tumor imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(15), 3072–3080.
- 282.** Wang, L., & Li, Y. (2006). Green upconversion nanocrystals for DNA detection. *Chemical Communications*, 24, 2557–2559.
- 283.** Wang, M., Abbineni, G., Clevenger, A., Mao, C., & Xu, S. (2011). Upconversion nanoparticles: Synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 710–729.
- 284.** Wang, Q., Shen, M., Zhao, T., Xu, Y., Lin, J., Duan, Y., & Gu, H. (2015). Low toxicity and long circulation time of Polyampholyte-coated magnetic nanoparticles for blood pool contrast agents. *Scientific Reports*, 5(1), 7774.
- 285.** Wang, Y., Hu, Y., & Ye, D. (2022). Activatable Multimodal Probes for In Vivo Imaging and Theranostics. *Angewandte Chemie International Edition*, 61(50), e202209512.
- 286.** Wang, Y. W., Reder, N. P., Kang, S., Glaser, A. K., & Liu, J. T. C. (2017). Multiplexed Optical Imaging of Tumor-Directed Nanoparticles: A Review of Imaging Systems and Approaches. *Nanotheranostics*, 1(4), 369–388.
- 287.** Wang, Y.-X. J. (2011). Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 1(1), 35–40.
- 288.** Wei, H., Bruns, O. T., Kaul, M. G., Hansen, E. C., Barch, M., Wiśniowska, A., Chen, O., Chen, Y., Li, N., Okada, S., Cordero, J. M., Heine, M., Farrar, C. T., Montana, D. M., Adam, G., Ittrich, H., Jasanoff, A., Nielsen, P., & Bawendi, M. G. (2017). Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), 2325–2330.
- 289.** Werner, E. J., Datta, A., Jocher, C. J., & Raymond, K. N. (2008). High-Relaxivity MRI Contrast Agents: Where Coordination Chemistry Meets Medical Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(45), 8568–8580.
- 290.** Wild, J. de, Meijerink, A., Rath, J. K., Sark, W. G. J. H. M. van, & Schropp, R. E. I. (2011). Upconverter solar cells: Materials and applications. *Energy & Environmental Science*, 4(12), 4835–4848.

- 291.** Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J. N., Bacri, J.-C., & Gazeau, F. (2003). Intracellular Uptake of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles as a Function of Their Surface Coating. *Biomaterials*, *24*(6), 1001–1011.
- 292.** Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1993). Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *22*(1), 113–262.
- 293.** Winkelman, J. (1962). The Distribution of Tetraphenylporphinesulfonate in the Tumor-bearing Rat. *Cancer Research*, *22*, 589–596.
- 294.** Winkelman, J. W., & Collins, G. H. (1987). Neurotoxicity of Tetraphenylporphinesulfonate TPPS₄ and its Relation To Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, *46*(5), 801–807.
- 295.** Wu, L. C., Zhang, Y., Steinberg, G., Qu, H., Huang, S., Cheng, M., Bliss, T., Du, F., Rao, J., Song, G., Pisani, L., Doyle, T., Conolly, S., Krishnan, K., Grant, G., & Wintermark, M. (2019). A Review of Magnetic Particle Imaging and Perspectives on Neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*, *40*(2), 206–212.
- 296.** Wu, M., Li, Z., Yao, J., Shao, Z., & Chen, X. (2019). Pea Protein/Gold Nanocluster/Indocyanine Green Ternary Hybrid for Near-Infrared Fluorescence/Computed Tomography Dual-Modal Imaging and Synergistic Photodynamic/Photothermal Therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *5*(9), 4799–4807.
- 297.** Wu, X., He, X., Wang, K., Xie, C., Zhou, B., & Qing, Z. (2010). Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging in vivo. *Nanoscale*, *2*(10), 2244–2249.
- 298.** Xia, F., Hou, W., Liu, Y., Wang, W., Han, Y., Yang, M., Zhi, X., Li, C., Qi, D., Li, T., Martinez de la Fuente, J., Zhang, C., Song, J., & Cui, D. (2018). Cytokine induced killer cells-assisted delivery of chlorin e6 mediated self-assembled gold nanoclusters to tumors for imaging and immunophotodynamic therapy. *Biomaterials*, *170*, 1–11.
- 299.** Xie, J., Zheng, Y., & Ying, J. Y. (2009). Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(3), 888–889. <https://doi.org/10.1021/ja806804u>
- 300.** Xie, X., Li, Z., Zhang, Y., Guo, S., Pendharkar, A. I., Lu, M., Huang, L., Huang, W., & Han, G. (2017). Emerging ≈800 nm Excited Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles. *Small*, *13*(6), 1602843.
- 301.** Xu, C., Wang, Y., Zhang, C., Jia, Y., Luo, Y., & Gao, X. (2017). AuGd integrated nanoprobe for optical/MRI/CT triple-modal in vivo tumor imaging. *Nanoscale*, *9*(13), 4620–4628.

- 302.** Xu, H., Ohulchanskyy, T. Y., Yakovliev, A., Zinyuk, R., Song, J., Liu, L., Qu, J., & Yuan, Z. (2019). Nanoliposomes Co-Encapsulating CT Imaging Contrast Agent and Photosensitizer for Enhanced, Imaging Guided Photodynamic Therapy of Cancer. *Theranostics*, 9(5), 1323–1335.
- 303.** Xu, H., Zong, H., Ma, C., Ming, X., Shang, M., Li, K., He, X., & Cao, L. (2017). Evaluation of nano-magnetic fluid on malignant glioma cells. *Oncology Letters*, 13(2), 677–680.
- 304.** Xu, J. X., Yuan, Y., Zou, S., Chen, O., & Zhang, D. (2019). A Divide-and-Conquer Strategy for Quantification of Light Absorption, Scattering, and Emission Properties of Fluorescent Nanomaterials in Solutions. *Analytical Chemistry*, 91(13), 8540–8548.
- 305.** Xu, W., Chen, X., & Song, H. (2017). Upconversion manipulation by local electromagnetic field. *Nano Today*, 17, 54–78.
- 306.** Xu, X., Liu, K., Wang, Y., Zhang, C., Shi, M., Wang, P., Shen, L., Xia, J., Ye, L., Shi, X., & Shen, M. (2019). A multifunctional low-generation dendrimer-based nanoprobe for the targeted dual mode MR/CT imaging of orthotopic brain gliomas. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(23), 3639–3643.
- 307.** Yamini, S., Gunaseelan, M., Kumar, G. A., Singh, S., Dannangoda, G. C., Martirosyan, K. S., Sardar, D. K., Sivakumar, S., Girigoswami, A., & Senthilselvan, J. (2020). NaGdF₄:Yb,Er-Ag nanowire hybrid nanocomposite for multifunctional upconversion emission, optical imaging, MRI and CT imaging applications. *Microchimica Acta*, 187(6), 317.
- 308.** Yang, L., Ma, L., Xin, J., Li, A., Sun, C., Wei, R., Ren, B. W., Chen, Z., Lin, H., & Gao, J. (2017). Composition Tunable Manganese Ferrite Nanoparticles for Optimized T2 Contrast Ability. *Chemistry of Materials*, 29(7), 3038–3047.
- 309.** Yang, T., Dai, S., Tan, H., Zong, Y., Liu, Y., Chen, J., Zhang, K., Wu, P., Zhang, S., Xu, J., & Tian, Y. (2019). Mechanism of Photoluminescence in Ag Nanoclusters: Metal-Centered Emission versus Synergistic Effect in Ligand-Centered Emission. *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(30), 18638–18645.
- 310.** Yao, J., Yang, M., & Duan, Y. (2014). Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy. *Chemical Reviews*, 114(12), 6130–6178.
- 311.** Yoon, T.-J., Lee, H., Shao, H., Hilderbrand, S. A., & Weissleder, R. (2011). Multicore Assemblies Potentiate Magnetic Properties of Biomagnetic Nanoparticles. *Advanced Materials*, 23(41), 4793–4797.

- 312.** Zhan, Q., Zhang, X., Zhao, Y., Liu, J., & He, S. (2015). Tens of thousands-fold upconversion luminescence enhancement induced by a single gold nanorod. *Laser & Photonics Reviews*, 9(5), 479–487.
- 313.** Zhang, A., Tu, Y., Qin, S., Li, Y., Zhou, J., Chen, N., Lu, Q., & Zhang, B. (2012). Gold nanoclusters as contrast agents for fluorescent and X-ray dual-modality imaging. *Journal of Colloid and Interface Science*, 372(1), 239–244.
- 314.** Zhang, C., Gao, X., Chen, W., He, M., Yu, Y., Gao, G., & Sun, T. (2022). Advances of gold nanoclusters for bioimaging. *iScience*, 25(10), 105022.
- 315.** Zhang, C., Li, C., Liu, Y., Zhang, J., Bao, C., Liang, S., Wang, Q., Yang, Y., Fu, H., Wang, K., & Cui, D. (2015). Gold Nanoclusters-Based Nanoprobes for Simultaneous Fluorescence Imaging and Targeted Photodynamic Therapy with Superior Penetration and Retention Behavior in Tumors. *Advanced Functional Materials*, 25(8), 1314–1325.
- 316.** Zhang, C., Zhou, Z., Qian, Q., Gao, G., Li, C., Feng, L., Wang, Q., & Cui, D. (2013). Glutathione-capped fluorescent gold nanoclusters for dual-modal fluorescence/X-ray computed tomography imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(38), 5045–5053.
- 317.** Zhang, J., Fu, Y., Conroy, C. V., Tang, Z., Li, G., Zhao, R. Y., & Wang, G. (2012). Fluorescence Intensity and Lifetime Cell Imaging with Luminescent Gold Nanoclusters. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(50), 26561–26569.
- 318.** Zhang, L., & Wang, E. (2014). Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9(1), 132–157.
- 319.** Zhang, Q., Su, R., Wang, J.-P., & Zhang, Q. (2016). Influence of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles on Fluorescence Quenching of Dye Molecules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), 7427–7432.
- 320.** Zhang, Z., Shikha, S., Liu, J., Zhang, J., Mei, Q., & Zhang, Y. (2019). Upconversion Nanoprobes: Recent Advances in Sensing Applications. *Analytical Chemistry*, 91(1), 548–568.
- 321.** Zhao, J., Jin, D., Schartner, E. P., Lu, Y., Liu, Y., Zvyagin, A. V., Zhang, L., Dawes, J. M., Xi, P., Piper, J. A., Goldys, E. M., & Monroe, T. M. (2013). Single-nanocrystal sensitivity achieved by enhanced upconversion luminescence. *Nature Nanotechnology*, 8(10), 729–734.
- 322.** Zhao, Z., Zhou, Z., Bao, J., Wang, Z., Hu, J., Chi, X., Ni, K., Wang, R., Chen, X., Chen, Z., & Gao, J. (2013). Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T2 contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nature Communications*, 4(1), 2266.

323. Zheng, J., Zhang, C., & Dickson, R. M. (2004). Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots. *Physical Review Letters*, 93(7), 077402.
324. Zheng, K., Loh, K. Y., Wang, Y., Chen, Q., Fan, J., Jung, T., Nam, S. H., Suh, Y. D., & Liu, X. (2019). Recent advances in upconversion nanocrystals: Expanding the kaleidoscopic toolbox for emerging applications. *Nano Today*, 29, 100797.
325. Zheng, Y., Lai, L., Liu, W., Jiang, H., & Wang, X. (2017). Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 242, 1–16.
326. Zhou, J., Wen, S., Liao, J., Clarke, C., Tawfik, S. A., Ren, W., Mi, C., Wang, F., & Jin, D. (2018). Activation of the surface dark-layer to enhance upconversion in a thermal field. *Nature Photonics*, 12(3), 154–158.
327. Zhou, Z., Huang, D., Bao, J., Chen, Q., Liu, G., Chen, Z., Chen, X., & Gao, J. (2012). A Synergistically Enhanced T1–T2 Dual-Modal Contrast Agent. *Advanced Materials*, 24(46), 6223–6228.
328. Zhou, Z., Wang, L., Chi, X., Bao, J., Yang, L., Zhao, W., Chen, Z., Wang, X., Chen, X., & Gao, J. (2013). Engineered Iron-Oxide-Based Nanoparticles as Enhanced T1 Contrast Agents for Efficient Tumor Imaging. *ACS Nano*, 7(4), 3287–3296.
329. Zhou, Z., Yang, L., Gao, J., & Chen, X. (2019). Structure–Relaxivity Relationships of Magnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced Materials*, 31(8), 1804567.
330. Zhu, S., Wang, X., Cong, Y., & Li, L. (2020). Regulating the Optical Properties of Gold Nanoclusters for Biological Applications. *ACS Omega*, 5(36), 22702–22707.
331. Zhu, X., Zhou, J., Chen, M., Shi, M., Feng, W., & Li, F. (2012). Core–shell Fe₃O₄@NaLuF₄:Yb,Er/Tm nanostructure for MRI, CT and upconversion luminescence tri-modality imaging. *Biomaterials*, 33(18), 4618–4627.
332. Zima, T., Jirsa, M., Jirsa, M., Bradová, V., Stejskal, J., Zabka, J., Povýsil, C., & Janebová, M. (1997). The localisation of TPPS₄ in some organs and its possible nephrotoxicity in rats. *Physiological Research*, 46(5), 351–355.
333. Zou, W., Visser, C., Maduro, J. A., Pshenichnikov, M. S., & Hummelen, J. C. (2012). Broadband dye-sensitized upconversion of near-infrared light. *Nature Photonics*, 6(8), 560–564.
334. Zou, X., Xu, M., Yuan, W., Wang, Q., Shi, Y., Feng, W., & Li, F. (2016). A water-dispersible dye-sensitized upconversion nanocomposite modified with phosphatidylcholine for lymphatic imaging. *Chemical Communications*, 52(91), 13389–13392.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijų sąrašas disertacijos tema:

1. **Pleckaitis, M.**; Habach, F.; Kontenis, L.; Steinbach, G.; Jarockyte, G.; Kalnaityte, A.; Domonkos, I.; Akhtar, P.; Alizadeh, M.; Bagdonas, S.; Karabanovas, V.; Garab, G.; Rotomskis, R.; Barzda, V. Structure and Principles of Self-Assembly of Giant “Sea Urchin” Type Sulfonatophenyl Porphine Aggregates. *Nano Research*, 2022, 15 (6), 5527–5537.
<https://doi.org/10.1007/s12274-021-4048-x>
2. Mikalauskaite, A.; **Pleckaitis, M.**; Grinciene, G.; Karabanovas, V.; Jagminas, A. Designing Red-Fluorescent Superparamagnetic Nanoparticles by Conjugation with Gold Clusters. *RSC Advances*, 2022, 12 (54), 35300–35308.
<https://doi.org/10.1039/D2RA07242D>
3. **Pleckaitis, M.**; Karabanovas, V.; Butkiene, G.; Venius, J.; Burkanas, M.; Grinciene, G.; Jagminas, A.; Rotomskis, R. Magnetic Nanoparticles Decorated with Gold Nanoclusters—Applications in Cancer Theranostics. *Advanced Materials Interfaces*, 2023, 10 (35), 2300462.
<https://doi.org/10.1002/admi.202300462>
4. Parvizian, M.; Mnasri, W.; **Pleckaitis, M.**; Karabanovas, V.; Khan, H.; Nowak, S.; Gam-Derouich, S.; Ben Tahar, L.; Sandre, O.; Rotomskis, R.; Ammar, S. Up-converting β -NaY_{0.8}[Yb_{0.18}Er_{0.02}]F₄ Nanoparticles Coated by Superparamagnetic γ -Fe₂O₃ Nanosatelites: Elaboration, Characterization and In Vitro Cytotoxicity. *RSC Advances*, 2024, 14 (43), 31486-31497.
<https://doi.org/10.1039/D4RA00909F>

Publikacijų sąrašas ne disertacijos tema:

1. Kundrotas, G.; Karabanovas, V.; **Pleckaitis, M.**; Juraleviciute, M.; Steponkiene, S.; Gudleviciene, Z.; Rotomskis, R. Uptake and Distribution of Carboxylated Quantum Dots in Human Mesenchymal Stem Cells: Cell Growing Density Matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, 17 (1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12951-019-0470-6>
2. Dapkute, D.; **Pleckaitis, M.**; Bulotiene, D.; Daunoravicius, D.; Rotomskis, R.; Karabanovas, V. Hitchhiking Nanoparticles:

Mesenchymal Stem Cell-Mediated Delivery of Theranostic Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2021, 13 (37), 43937–43951.

<https://doi.org/10.1021/acsami.1c10445>

3. Jarockyte, G.; Stasys, M.; Poderys, V.; Buivydaite, K.; **Pleckaitis, M.**; Bulotiene, D.; Matulionyte, M.; Karabanovas, V.; Rotomskis, R. Biodistribution of Multimodal Gold Nanoclusters Designed for Photoluminescence-SPECT/CT Imaging and Diagnostic. *Nanomaterials* 2022, 12 (19), 3259.

<https://doi.org/10.3390/nano12193259>

REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Žodiniai pranešimai disertacijos tema:

1. **Pleckaitis M.**, Habach F, Kontenis L, Steinbach G, Jarockytė G, Kalnaitytė A, Domonkos I, Akhtar P, Alizadeh M, Bagdonas S, Karabanovas V, Garab G, Rotomskis R, Barzda V. TPPS₄ molekulių nanostruktūrų saviorganizacija į didelius „jūros ežių“ tipo agregatus. Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija. 2021 m. spalio 6-8 d., Vilnius.

Stendiniai pranešimai disertacijos tema:

1. **Kornelija Buivydaite, Marijus Plečkaitis**, Ričardas Rotomskis, "pH dependent self-assembling of H₂TPPS₄ in aqueous solutions". Tarptautinė studentų konferencija "Open Readings 2021", Kovo 16-19 d., vyko nuotoliniu būdu (internetu).
2. **Pleckaitis M.**, Habach F., Kontenis L., Steinbach G., Jarockyte G., Kalnaityte A., Domonkos I., Akhtar P., Alizadeh A., Bagdonas S., Karabanovas V., Garab G., Rotomskis R., Barzda V. „Principles of self-assembly and structure of sulfonatophenyl porphine aggregates resembling giant “sea urchin”. „3rd Baltic Biophysics Conference“. 2022 spalio 6-7 d., Vilnius, Lietuva.
3. **Marijus Plečkaitis**, Greta Butkiene, Vilius Poderys, Jonas Venius, Marius Burkanas, Giedre Grinciene, Souad Ammar-Merah, Arunas Jagminas, Virginijus Barzda, Ricardas Rotomskis, Vitalijus Karabanovas. „Nanomaterials for Bimodal Imaging: Unlocking Potential in Biomedical Applications“. Tarptautinė konferencija „4th Baltic Biophysics Conference“ 2024 m. spalio 3-4 d., Kaunas, Lietuva.

Kiti stendiniai pranešimai, tiesiogiai nesusiję su disertacijos tema:

1. **Buivydaite K.**, Jarockytė G., Stašys M., Poderys V., Bulotienė D., **Pleckaitis M.**, Karabanovas V. ^{99m}Tc-BSA-Au bioconjugates – potential

in vivo imaging agents for diagnostics. „3-rd Baltic Biophysics Conference“. 2022 m. spalio 6-7 d., Vilnius, Lietuva. Stendinis pranešimas.

2. K. Buivydaite, G. Jarockyte, V. Poderys, D. Bulotienė, **M. Plečkaitis**, V. Karabanovas, R. Rotomskis. „99mTc-BSA-Au nanoclusters – a potential dual-modality optical-radionuclide probe for *in vivo* imaging“. Tarptautinė Biochemijos konferencija „IUBMB-FEBS-PABMB The Biochemistry Global Summit“. 2022 m. liepos 9-14 d., Lisabona, Portugalija. Stendinis pranešimas.
3. Jarockytė G., Poderys V., Buivydaite K., **Plečkaitis M.**, Bulotienė D., Karabanovas V., Rotomskis R. Protein stabilized gold nanoclusters as biosensors for cancer cells detection. The COINS. 2023 m. balandžio 24-27 d. Stendinis pranešimas.
4. Jarockyte G., Poderys V., Buivydaite K., **Plečkaitis M.**, Bulotiene D., Karabanovas V., Rotomskis R. Gold nanoclusters as multifunctional probes for cancer diagnostics and treatment. Tarptautinė mokslinė konferencija “Nordic-Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics” Liepoja, Latvija, 2023 m. birželio 12-14 d. Stendinis pranešimas.

GYVENIMO APRAŠYMAS

MARIJUS PLEČKAITIS

DABARTINĖ VEIKLA

Nuo 2019 m.	Nacionalinis vėžio institutas Biomedicininės fizikos laboratorija Jaunesnysis mokslo darbuotojas
-------------	--

IŠSILAVINIMAS

2019-2025 m.	Vilniaus universitetas Gyvybės mokslų centras Biofizikos doktorantūra
2017-2019 m.	Vilniaus universitetas Gyvybės mokslų centras Biofizikos magistras
2013-2017 m.	Vilniaus universitetas Gyvybės mokslų centras Biofizikos bakalauras

MOKSLINIO DARBO PATIRTIS

2019 m.- iki dabar	Nacionalinis vėžio institutas Biomedicininės fizikos laboratorija Jaunesnysis mokslo darbuotojas
2017-2019 m.	Nacionalinis vėžio institutas Biomedicininės fizikos laboratorija Biofizikas
2016-2017 m.	Nacionalinis vėžio institutas Biomedicininės fizikos laboratorija Praktikantas

DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE

2019-2022 m.	Vilniaus universitetas ES struktūrinių fondų finansuojamas projektas „Poliarimetrinė netiesinė mikroskopija
--------------	---

biomedicininiais tyrimams ir vėžio diagnostikai“.
Dotacijos Nr. 01.2.2-LMT-K-718-02-0016.
Jaunesnysis mokslo darbuotojas

APDOVANOJIMAI

1. Dokt. Marijus Plečkaitis apdovanotas Vilniaus universiteto Gamtos mokslų centro vardine stipendija, 2023 m. pavasario semestras.
2. Dokt. Marijus Plečkaitis apdovanotas tiksline vienkartinė Vilniaus universiteto Gamtos mokslų stipendija, 2023 m. pavasario semestras.
3. Dokt. Marijus Plečkaitis apdovanotas tiksline vienkartinė Vilniaus universiteto Gamtos mokslų stipendija, 2021 m. rudens semestras.
4. Marijus Plečkaitis apdovanotas tiksline vienkartinė Vilniaus universiteto Gamtos mokslų stipendija, 2019 m. pavasario semestras.

SERTIFIKATAI

Nuo 2022 m. – „Laboratorinių (bandomųjų) gyvūnų mokslo“ kurso pažymėjimas, suteikiantis teisę savarankiškai planuoti ir atlikti eksperimentus su bandomaisiais gyvūnais pagal 2010/63/ES Europos Parlamento ir Tarybos Direktyvos 23 straipsnį.

PADĖKA

Noriu išreikšti nuoširdžią padėką savo darbo vadovui prof. Ričardui Rotomskiui už suteiktą galimybę siekti daktaro laipsnio, už kantrybę ir diskusijas, kartais aršias, bet kartu atvedusias mane iki disertacijos parašymo.

Ypatingai dėkoju savo moksliniam vadovui prof. Vitalijui Karabanovui, nenuleidusiam rankų ir visus šiuos metus teikusiam visokeriopą pagalbą, patarimus ir konstruktyvią kritiką tiek moksliniame, tiek kasdieniniame gyvenime.

Didžiulę pagarbą ir padėką reiškiu visam likusiam Biomedicininės fizikos laboratorijos kolektyvui (ypač Gretai Butkienei, Viliui Poderiui). Visi jie bet kuriuo metu buvo pasiruošę ištieti pagalbos ranką, nors BFL liaudies išmintis ir byloja, kad „skęstančiųjų gelbėjimas – pačių skęstančiųjų reikalas“. Neapsakomai dėkingas esu ir Danutei Bulotienei, kuri kaip antra mama rūpinosi manimi ir nuolatos vis „lipo ant sąžinės“, jog judinčiau savo darbus bei rašyčiau disertaciją.

Taip pat dėkoju visiems Lietuvos ir užsienio institucijų kolegoms, prisidėjusiems prie mano mokslinių tyrimų. Jūsų indėlis ypač svarbus.

Neapsakomai vertinu ir esu dėkingas savo draugams, kurie palaikė mane juodžiausiais laikotarpiais bei neleido pasiduoti. Iš visos širdies ačiū Jums, Dominyka, Simona, Monika, Konstancija, Tada, Aivarai, Viktorai, Jonai, Aidai, Vilmantai.

Už besąlygišką meilę, kantrybę ir tikėjimą manimi didžiausią padėką skiriu savo šeimai ir savo antrajai pusei Gintarei – tobulai partnerei tiek realiaame, tiek virtualiaame pasaulyje, besirūpinusia manimi ir puikiai mokėjusia motyvuojančiai grasinti, kad disertacija būtų parašyta.

Jūsų visų rūpestis ir palaikymas man neįkainojami. Be Jūsų visų man nebūtų pavykę. Ačiū!

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.