

Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk

**Właściwości up-konwertujących
nanocząstek i ich zastosowanie w terapii
fotodynamicznej**

Anna Borodziuk

Praca doktorska wykonana w
Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej
pod kierunkiem dr. hab. Łukasza Kłopotowskiego oraz dr Bożeny Sikory

Warszawa 2022

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować **dr. hab. Łukaszowi Kłopotowskiemu** za cierpliwość, wyrozumiałość, poświęcony czas i zaangażowanie. Dziękuję za liczne naukowe dyskusje i nieodzowną pomoc w trakcie przeprowadzania pomiarów oraz w czasie powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pragnę także serdecznie podziękować **dr Bożenie Sikorze** za wsparcie, motywację, opiekę naukową oraz liczne naukowe dyskusje, które pomagały mi na różnych etapach pracy nad doktoratem.

Dziękuję **Wszystkim Osobom**, z którymi miałam przyjemność pracować podczas przeprowadzania badań wykonanych w ramach niniejszej pracy.

Dziękuję **Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Instytutu Fizyki PAN** za miłą atmosferę w pracy, za pożyteczne, i tej mniej pożyteczne, rozmowy przy kawce.

Pragnę serdecznie podziękować **Bartoszowi, Mamie, Tacie, Szymonowi i Kubie** za wsparcie, wyrozumiałość, motywację i wiarę w moje możliwości, gdy mi samej jej brakowało.

Dziękuję **Moim Przyjaciołom** za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.

Badania były częściowo finansowane z projektów Narodowego Centrum Nauki 2014/15/D/ST5/02604, 2017/01/X/ST3/01380, 2018/31/G/ST3/03596, 2021/41/N/ST7/03528, 2019/35/B/ST3/04235, 2019/33/B/ST3/01915.

Badania były częściowo finansowane z projektu Agence Nationale de la Recherche ANR-10-LABX-0037-NEXT, EPSRC (Grant No EP/N01085X/1) oraz z projektu NanoX no ANR-17-EURE-0009 w ramach "Programme des Investissements d'Avenir".

Pracę wykonano w laboratoriach współfinansowanych ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka POIG.02.02.00-00-025/09 oraz w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego w ramach projektu Panda2 Nr. 501-D312-56-0000002

Spis treści

Spis skrótów	xi
Wprowadzenie	1
1 Zagadnienia teoretyczne	5
1.1 Procesy stokesowskie i antystokesowskie	5
1.2 Mechanizmy transferu energii między fluoroforami	7
1.3 Zjawisko up-konwersji w lantanowcach	10
1.3.1 Właściwości fizyczne lantanowców umożliwiające wystąpienie procesu up-konwersji	10
1.3.2 Mechanizmy up-konwersji	12
1.4 Proces up-konwersji w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$	14
1.5 Czynniki zewnętrzne wpływające na proces up-konwersji	18
1.5.1 Moc promieniowania wzbudzającego	18
1.5.2 Pole magnetyczne	18
1.5.3 Struktury metaliczne	20
1.6 Terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem nanocząstek up-konwertujących	24
1.6.1 Fotouczulacze w terapii fotodynamicznej	26
1.6.2 Poprawienie wydajności terapii fotodynamicznej	26
1.6.3 Wpływ obecności ROS na funkcjonowanie komórek	28
2 Metody eksperymentalne	31
2.1 Procedura otrzymywania heksagonalnych UCNPs	31
2.2 Procedura otrzymywania nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs	33
2.2.1 Przygotowanie srebrnych nanodrutów AgNWs	33
2.2.2 Procedura usuwania kwasu oleinowego z powierzchni UCNPs	34
2.2.3 Przygotowanie nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs	34
2.3 Procedury przygotowywania UCNPs do badań wydajności terapii fotodynamicznej	35
2.3.1 Procedura pokrycia UCNPs za pomocą SiO_2	36
2.3.2 Procedura funkcjonalizowania nanocząstek UCNPs@ SiO_2 grupą aminową	36
2.3.3 Procedura przyłączania RB do powierzchni nanocząstek	37
2.4 Metody charakteryzacji strukturalnej nanomateriałów wykorzystywanych w pracy	38
2.4.1 Skaningowa Mikroskopia Elektronowa	38
2.4.2 Skaningowa Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa	38

2.4.3	Dyfraktometria rentgenowska	39
2.4.4	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera	39
2.5	Metody badania właściwości optycznych	40
2.5.1	Pomiary absorpcji oraz luminescencji	40
2.5.2	Pomiary widm wzbudzenia UCL nanocząstek	40
2.5.3	Pomiary widm intensywności UCL nanocząstek w polu magnetycznym	41
2.5.4	Pomiary luminescencji rozdzielone w czasie	43
2.5.5	Pomiary UCL nanocząstek w roztworze	43
2.5.6	Pomiary UCL nanocząstek naniesionych na podłoże	45
2.5.7	Pomiary mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola	47
2.5.8	Detekcja reaktywnych form tlenu	47
2.6	Procedury wykonywania badań nad wydajnością terapii fotodynamicznej w komórkach	48
2.6.1	Charakterystyka linii komórkowej 4T1	48
2.6.2	Test przeżywalności Presto Blue	49
2.6.3	Cytotoksyczność UCNPs@SiO ₂ -RB	49
2.6.4	Ekspozycja komórek 4T1 na promieniowanie podczerwone	50
2.6.5	Terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem nanocząstek UCNPs@SiO ₂ -RB	50
2.6.6	Procedura przygotowania preparatów do mikroskopii konfokalnej	51
2.6.7	Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej	52
3	Charakterystyka strukturalna i właściwości optyczne nanocząstek NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺	53
3.1	Charakteryzacja strukturalna nanocząstek	53
3.2	Charakterystyka widm UCL	55
3.2.1	Wpływ struktury krystalograficznej na widma UCL	55
3.2.2	Wpływ mocy promieniowania wzbudzającego na widma UCL	56
3.3	Widma wzbudzenia UCL	58
3.3.1	Wpływ rozmiaru nanocząstek na widma wzbudzenia UCL	59
3.3.2	Wpływ pokrycia powierzchni nanocząstek na widma wzbudzenia UCL	61
3.3.3	Wpływ struktury krystalograficznej nanocząstek na widma wzbudzenia UCL	62
3.4	Podsumowanie	64
4	Wpływ wysokiego pola magnetycznego na intensywność luminescencji nanocząstek NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺	67
4.1	Wpływ długości fali promieniowania wzbudzającego na wydajności UCL w polu magnetycznym	68
4.2	Porównanie modelu teoretycznego z wynikami eksperymentalnymi	71
4.3	Wpływ pola magnetycznego na wydajność transferu energii oraz przejść optycznych	75
4.4	Podsumowanie	76
5	Wpływ bliskości nanodrutów srebra na ścieżki wzbudzenia UCL w nanocząstkach NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺	79

5.1	Charakterystyka strukturalna nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs .	80
5.2	Wpływ plazmonów generowanych w AgNW na wydajność przejść optycznych w jonie Er^{3+}	86
5.3	Pomiary rozkładu przestrzennego UCL nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs	87
5.4	Wpływ mocy promieniowania wzbudzającego na nanostruktury hybrydowe AgNW-UCNPs	91
5.5	Pomiary UCL rozdzielonej w czasie nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs	92
5.6	Symulacje FDTD nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs	96
5.7	Dyskusja wyników	100
5.8	Wpływ zmiany zaników UCL spowodowanych obecnością nanodrutów na rozkład intensywności UCL	101
5.9	Podsumowanie	103
6	Uproszczenie metody przyłączania RB do powierzchni nanocząstek a skuteczność terapii fotodynamicznej	105
6.1	Charakteryzacja strukturalna UCNPs@SiO ₂ -RB	106
6.2	Właściwości optyczne UCNPs@SiO ₂ -RB	111
6.3	Generacja $^1\text{O}_2$ przez UCNPs@SiO ₂ -RB	116
6.4	Badania <i>in-vitro</i> z wykorzystaniem UCNPs@SiO ₂ -RB	119
6.4.1	Obrazowanie komórek 4T1 wykorzystując technikę mikroskopii konfokalnej	120
6.4.2	Testy przeżywalności komórek 4T1 dla różnych stężeń UCNPs@SiO ₂ -RB	122
6.4.3	Testy przeżywalności komórek 4T1 po ekspozycji na promieniowanie podczerwone	122
6.4.4	Terapia fotodynamiczna <i>in-vitro</i> z zastosowaniem UCNPs@SiO ₂ -RB	123
6.5	Podsumowanie	126
	Podsumowanie	129
	Dorobek naukowy	131
	Bibliografia	133

Spis skrótów

UC	Up-konwersja (ang. <i>upconversion</i>)
UCL	Luminescencja powstająca w wyniku up-konwersji (ang. <i>upconversion luminescence</i>)
UCNPs	Nanocząstki up-konwertujące (ang. <i>upconverting nanoparticles</i>)
UCNPs@SiO₂	Nanocząstki up-konwertujące pokryte warstwą tlenku krzemu
UCNPs@SiO₂-RB	Nanocząstki up-konwertujące z przyłączonym kowalencyjnie RB
AgNWs	Nanodruty srebra (ang. <i>silver nanowires</i>)
SHG	Generacja drugiej harmonicznej (ang. <i>second harmonic generation</i>)
STPA	Równoczesna absorpcja dwufotonowa (ang. <i>simultaneous two-photon absorption</i>)
TTA	Anihilacja tryplet-tryplet (ang. <i>triplet-triplet annihilation</i>)
FRET	Försterowski transfer energii (ang. <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
DET	Dexterowski transfer energii (ang. <i>Dexter Energy Transfer</i>)
BET	Zwrotny transfer energii (ang. <i>back energy transfer</i>)
ESA	Absorpcja ze stanu wzbudzonego (ang. <i>excited state absorption</i>)
ETU	Up-konwersja z transferem energii (ang. <i>energy transfer upconversion</i>)
PA	Lawina fotonów (ang. <i>photon avalanche</i>)
TEOS	Tetraetoksysilan
APTS	3-aminopropylotrietoksysilan
MES	Kwas 2-(N-morfolino)etanosulfonowy
EDC	N-(3-Dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimid
SEM	Skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
STEM	Skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>)

EDS	Spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii (ang. <i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)
XRD	Dyfraktometria rentgenowska (ang. <i>X-ray diffraction</i>)
FTIR	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
BS	Dzielnik wiązki (ang. <i>beam splitter</i>)
TCSPC	Skorelowane w czasie zliczanie pojedynczych fotonów (ang. <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>)
APD	Fotodioda lawinowa (ang. <i>avalanche photodiode</i>)
DM	Lustro dichroiczne (ang. <i>dichroic mirror</i>)
R-A M	Prawoskrętna kość odbijająca (ang. <i>right-angle prism mirror</i>)
PVA	Alkohol poliwyynyłowy (ang. <i>poly(vinyl alcohol)</i>)
PVP	Poliwinylopirolidon (ang. <i>polyvinylpyrrolidone</i>)
PDT	Terapia fotodynamiczna (ang. <i>photodynamic therapy</i>)
ROS	Reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
PS	Fotouczulacz (ang. <i>photosensitizer</i>)
RB	Róż Bengalski (ang. <i>Rose Bengal</i>)
DPBF	1,3-Difenyloizobenzofuran
PBS	Bufor fosforanowy (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
FBS	Płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
PB	Presto Blue
DMEM	Medium do hodowli komórkowej – pożywka Eagle'a z modyfikacją Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
FWHM	szerokość połówkowa (ang. <i>full width at half maximum</i>)
FDTD	Symulacja komputerowa metodą różnic skończonych w dziedzinie czasu (ang. <i>finite-difference time-domain</i>)

Wprowadzenie

Niniejsza praca doktorska poświęcona jest badaniom nad właściwościami nanocząstek konwertujących energię w górę. Konwersja ta bardzo często, choć niepoprawnie gramatycznie, nazywana jest up-konwersją. Up-konwersja jest procesem, w którym w wyniku absorpcji co najmniej dwóch fotonów o niskiej energii zostaje wyemitowany foton o wysokiej energii. Ze względu na częste używanie w pracy określeń dotyczących procesu up-konwersji wprowadzono skróty, które powszechnie używane są w literaturze związanej z tym tematem. W ten sposób proces up-konwersji oznaczony będzie jako UC (ang. *upconversion*), nanocząstki up-konwertujące – jako UCNPs (ang. *upconverting nanoparticles*), a luminescencja powstała w wyniku procesu up-konwersji – jako UCL (ang. *upconversion luminescence*).

Nanocząstki wykazujące proces UC znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach nauki oraz techniki. Mogą zostać wykorzystane, np. w ogniwach słonecznych [1], zabezpieczeniach dokumentów [2–4], nośnikach pamięci optycznej [5, 6], a także w biologii i medycynie do diagnostyki i obrazowania [7–9] oraz poprawy skuteczności terapii fotodynamicznej [10–13]. Ciągły rozwój badań nad zjawiskiem UC otwiera coraz więcej nowych możliwości ich wykorzystania [14–18].

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonano w celu udzielenia odpowiedzi na kilka podstawowych pytań związanych z procesem up-konwersji, na które w momencie podejmowania badań nie było jednoznacznych odpowiedzi. Pierwsze takie pytanie to: jak pole magnetyczne wpływa na proces UC i intensywność UCL? W chwili podejmowania niniejszych badań dane literaturowe dostarczały sprzeczne informacje odnośnie wpływu pola magnetycznego na proces UC. Część badań wykazywała, że obecność pola magnetycznego powoduje spadek UCL [14, 19–21], natomiast inna część, że wzmacnia UCL [22, 23]. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki pomiarów wykonanych w dużym zakresie pól magnetycznych aż do 70 T. Pozwoliło to na znalezienie rozbieżności w opisie wpływu pola magnetycznego na UCL nanocząstek w dostępnych danych literaturowych. Dzięki otrzymanym wynikom badań mogą otworzyć się nowe pola zastosowań UCNPs w detekcji pola magnetycznego [14, 24].

Wydażność konwersji energii w góreg w UCNPs jest zazwyczaj rzędu kilku procent [25]. Większość zastosowań wymaga możliwie dużej wydażności procesu UC. Zatem częstym zagadnieniem badań nad UCNPs jest zwiększenie wydażności tego procesu. Jednym z dostępnych rozwiązań jest umieszczenie UCNPs w sąsiedztwie struktur plazmonicznych [26–28]. Oddziaływanie z plazmonami może wpływać na zmianę wydażności UCL nanocząstek poprzez modyfikację wydażności wzbudzenia, transferu energii czy rekombinacji promienistych i bezpromienistych. W przypadku nanostruktury składającej się z UCNPs oraz nanodrutów srebra (ang. *silver nanowires*, AgNWs) nie jest jasne, jak plazmony wpływają na wydażność tych procesów. W niniejszej pracy podjęto zatem próbę uzyskania odpowiedzi na pytanie w jaki sposób oddziaływanie z plazmonami wpływa na wydażność wzbudzenia, transferu energii oraz wydażność luminescencji w wytworzonej nanostrukturze hybrydowej AgNW-UCNPs. Dzięki przeprowadzonym badaniom określono, jak oddziaływania z plazmonami wpływają na ścieżki wzbudzenia UCL. Otrzymane wyniki doświadczeń otwierają nowe możliwości zastosowań nanostruktur o ulepszonych właściwościach optycznych.

Kolejnym celem pracy było zademonstrowanie skuteczności zastosowania UCNPs w przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej (ang. *photodynamic therapy*, PDT). Terapia fotodynamiczna polega na wprowadzeniu do organizmu barwników organicznych, które pod wpływem wzbudzenia za pomocą promieniowania w zakresie widzialnym generują reaktywne formy tlenu. Barwniki o takich właściwościach określa się mianem fotouczulaczy (ang. *photosensitizer*, PS). Głębokość przenikania przez tkanki promieniowania w zakresie widzialnym jest niewielka, dlatego PDT jest skuteczna jedynie na niewielkich głębokościach tkanek. Z tego względu terapia ta znajduje zastosowanie w leczeniu głównie nienowotworowych i przednowotworowych chorób skóry, takich jak trądzik czy rógowacenie słoneczne [29, 30]. Jednakże ten rodzaj terapii może być także zastosowany do leczenia powierzchniowych zmian nowotworowych, np. nowotworu podstawnokomórkowego oraz zmian nowotworowych ulokowanych wewnątrz ciała takich jak nowotwór pęcherza, przelyku czy płuc [31, 32]. W celu zwiększenia efektywności terapii fotodynamicznej prowadzone są badania, w których wykorzystywane są UCNPs. Dzięki ich wykorzystaniu możliwe jest zastosowanie wzbudzenia za pomocą, wnিকającego głębiej wewnątrz tkanek niż promieniowanie widzialne, promieniowania podczerwonego. W ramach niniejszej pracy doktorskiej wytworzono nanocząstki, do których powierzchni przyłączono cząsteczki fotouczulacza. Jako fotouczulacz wykorzystano Róż Bengalski (ang. *Rose Bengal*, RB). Zademonstrowano, że mimo wykorzystania uproszczonej metody kowalencyjnego przyłączania cząsteczek RB do powierzchni UCNPs wytworzona nanostruktura cechuje się wysoką skutecznością niszczenia komórek nowotworowych.

Porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi dostępnymi w chwili podejmowania opisywanych badań pozwoliło stwierdzić, że wytworzone nanocząstki z przyłączonym do powierzchni RB wyróżniają się jedną z najwyższych efektywności w PDT [33–37].

Niniejsza praca składa się z sześciu rozdziałów.

Rozdział 1 zawiera opis zagadnień teoretycznych, które przybliżają tematykę niniejszej rozprawy doktorskiej.

Rozdział 2 poświęcono opisowi procedur wytwarzania nanomateriałów wykorzystywanych w doświadczeniach prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej. W rozdziale tym opisano także metody charakteryzowania wytworzonych nanostruktur.

Rozdział 3 zawiera wyniki charakteryzacji strukturalnej oraz widma luminescencji nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ o strukturze heksagonalnej i kubicznej. W rozdziale wyznaczono także wpływ różnej długości fali oraz mocy promieniowania wzbudzającego na proces UC. Zbadano jak różne struktury krystalograficzne, rozmiary i pokrycia powierzchni UCNPs wpływają na ich widma wzbudzenia.

Rozdział 4 zawiera wyniki badań nad wpływem pola magnetycznego na proces UC w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$. W ramach badań prezentowanych w niniejszym rozdziale sprawdzono, jak pole magnetyczne wpływa na proces absorpcji promieniowania wzbudzającego o różnej długości fali, na proces transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} oraz na emisję fotonów z jonu Er^{3+} . W rozdziale zaprezentowano również model teoretyczny umożliwiający porównanie otrzymanych wyników doświadczalnych z teorią.

Rozdział 5 poświęcono badaniom nad wpływem obecności nanodrutów srebra w sąsiedztwie nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$. Wykonano nanostrukturę hybrydową składającą się z nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ oraz nanodrutów srebra. Wykonano pomiary map rozkładu przestrzennego luminescencji dla obszarów zawierających wytworzoną nanostrukturę. Wyznaczono również czasy zaniku luminescencji takiej nanostruktury. Wyniki badań zaprezentowane w rozdziale pozwoliły ustalić, jak obecność srebrnych nanodrutów wpływa na UCL nanocząstek.

Rozdział 6 zawiera charakteryzację strukturalną nanocząstek $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$ na każdym etapie przyłączania RB do ich powierzchni. W rozdziale zaprezentowano właściwości optyczne nanocząstek przed i po przyłączeniu cząsteczek RB do powierzchni nanocząstek. Sprawdzone wydajność transferu energii z nanocząstek do cząsteczek fotouczulacza oraz wydajność produkowania tlenu singletowego przez wytworzony materiał. W drugiej części rozdziału przedstawiono wyniki badań *in-vitro*. Określono dawki nanocząstek oraz parametry ekspozycji na promieniowania podczerwone w zastosowanej

terapii fotodynamicznej w komórkach 4T1. Za pomocą mikroskopii konfokalnej sprawdzono, jak nanocząstki wpływają na morfologię komórek.

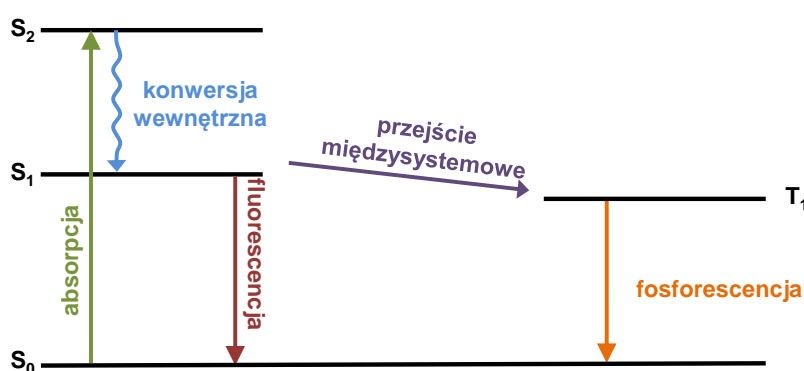
Sprawdzono przeżywalność komórek 4T1 w funkcji stężenia nanocząstek wprowadzanych do ich wnętrza. Następnie sprawdzono przeżywalność komórek inkubowanych z nanocząstkami po ich ekspozycji na promieniowanie podczerwone.

Rozdział 1

Zagadnienia teoretyczne

1.1 Procesy stokesowskie i antystokesowskie

Luminescencja jest procesem polegającym na emisji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym. W zależności od czynnika wzbudzającego wyróżnia się, m.in. fotoluminescencję, gdy czynnikiem wzbudzającym cząsteczkę jest promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego, chemiluminescencję, gdy czynnikiem wzbudzającym są zachodzące procesy chemiczne, katodoluminescencję, gdy czynnikiem wzbudzającym jest wiązka elektronów padająca na fluorofor [38–40]. W niniejszej pracy przedmiotem badań był jedynie proces fotoluminescencji. Przejścia optyczne między stanami elektronowymi w cząsteczce, prowadzące do emisji fotonów opisuje diagram Jabłońskiego, który schematycznie przedstawiono na rysunku 1.1.



RYSUNEK 1.1: Schematyczny diagram Jabłońskiego. Absorpcja fotonu powoduje wzbudzenie fluoroforu z singletowego stanu podstawowego S_0 do wzbudzonego stanu singletowego S_2 . Ze stanu S_2 w wyniku konwersji wewnętrznej następuje przejście do wzbudzonego singletowego stanu S_1 . Przejście ze stanu S_1 do stanu S_0 powoduje emisję fotonu, którego energia jest mniejsza niż energia fotonu wzbudzającego. Proces ten nazywa się fluorescencją. Ze stanu S_1 może wystąpić także przejście międzysystemowe, w wyniku którego fluorofor przechodzi na wzbudzony stan trypletowy T_1 . Z tego stanu także może nastąpić emisja fotonu. Proces ten nazywany jest fosforescencją. Rysunek opracowano na podstawie [38].

Stan podstawowy fluoroforu jest najczęściej stanem singletowym, czyli takim, w którym całkowity spin wszystkich elektronów wynosi 0. Zatem, przed wystąpieniem czynnika wzbudzającego cząsteczka znajduje się w stanie podstawowym S_0 . Znajdujące się na poziomie podstawowym elektrony w wyniku absorpcji fotonu mogą zostać wzbudzone do singletowego stanu wzbudzonego S_2 , co na rysunku 1.1 oznaczono strzałką zieloną. Ze stanu tego możliwe są dwa przejścia nieradiacyjne (bez emisji fotonu). Pierwszym procesem nieradiacyjnym jest konwersja wewnętrzna zachodząca między singletowymi stanami wzbudzonymi zaznaczona strzałką niebieską. Drugim procesem jest przejście międzysystemowe, zaznaczone strzałką fioletową, które zachodzi ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 na wzbudzony stan trypletowy T_1 . Cząsteczka w stanie trypletowym posiada całkowity spin równy 1. Zatem przejściu międzysystemowemu towarzyszy zmiana spinu wzbudzonego elektronu. Procesy radiacyjne (z emisją fotonu) stanowią fluorescencja – strzałka czerwona oraz fosforescencja – strzałka pomarańczowa. Fluorescencja pojawia się w wyniku przejścia ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 do podstawowego stanu singletowego S_0 . Przejście to zgodnie z regułami wyboru jest dozwolone, ponieważ nie towarzyszy mu zmiana całkowitej wartości spinu. Fosforescencja natomiast pojawia się na skutek przejścia z trypletowego stanu wzbudzonego T_1 do singletowego stanu podstawowego S_0 . Takie przejście jest przejściem zabronionym, ponieważ towarzyszy mu zmiana całkowitej wartości spinu cząsteczki. Powoduje to, że proces fosforescencji zachodzi dużo wolniej niż proces fluorescencji. W przypadku związków organicznych czas zaniku fluorescencji wynosi średnio około 10^{-8} s. Natomiast przeciętny czas zaniku luminescencji w przypadku fosforescencji dla takich związków wynosi od 10^{-5} s do nawet kilku sekund [38, 39, 41, 42].

Zarówno fluorescencja, jak i fosforescencja są procesami stokesowskimi, co oznacza, że energia promieniowania wzbudzającego jest większa niż energia promieniowania wyemitowanego przez wzbudzoną cząsteczkę [38, 40]. W przyrodzie występują także procesy antystokesowskie, dla których energia promieniowania emitowanego przez wzbudzoną cząsteczkę jest wyższa niż energia promieniowania wzbudzającego [40]. Takie procesy to, np. generacja drugiej harmonicznej (ang. *second harmonic generation*, SHG), równoczesna absorpcja dwufotonowa (ang. *simultaneous two-photon absorption*, STPA) oraz proces up-konwersji (ang. *upconversion*, UC) [12]. W wymienionych procesach antystokesowskich konieczna jest absorpcja co najmniej dwóch fotonów wzbudzających, w wyniku czego zostaje wyemitowany pojedynczy foton o energii większej niż energia pojedynczego fotonu wzbudzającego. Proces UC jest najwydajniejszym procesem antystokesowskim wśród wymienionych procesów. Wydajność ta wynika z faktu, że w procesie tym pośrednie stany energetyczne, do których w wyniku absorpcji fotonu następuje wzbudzenie, są rzeczywistymi poziomami energetycznymi. W przypadku STPA jedynie stan wzbudzony, z którego przejście do stanu podstawowego odbywa się z emisją fotonu, jest

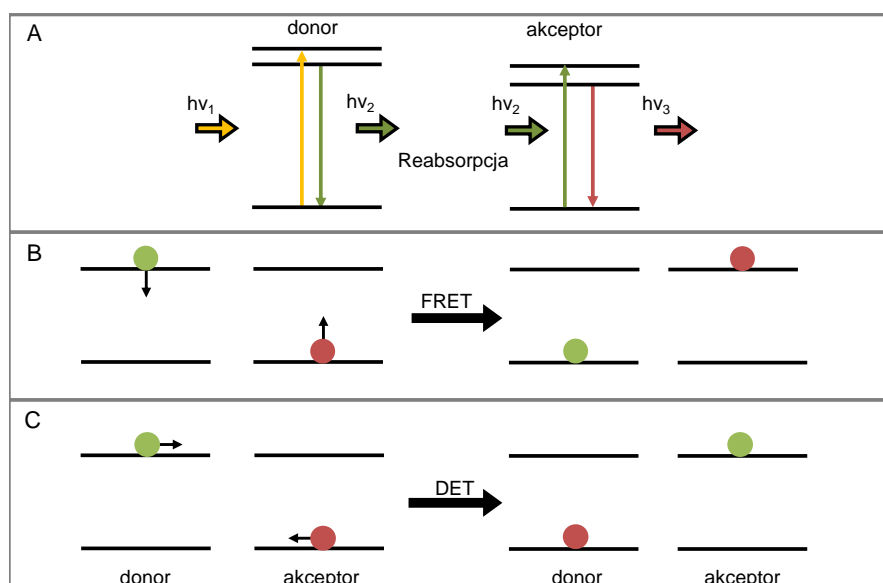
stanem rzeczywistym, natomiast stan pośredni jest stanem wirtualnym. W przypadku SHG wszystkie stany wzbudzone są wirtualne [43–45]. Istnienie rzeczywistych pośrednich stanów energetycznych sprawia, że proces up-konwersji może być obserwowany przy stosunkowo niedużych mocach pobudzenia o gęstościach rzędu Wcm^{-2} . Natomiast minimalna gęstość mocy pobudzenia umożliwiająca wystąpienie procesu SHG jest zazwyczaj rzędu kWcm^{-2} [45].

Proces up-konwersji może, w zależności od rodzaju materiału, zachodzić według różnych mechanizmów. W związkach organicznych UC zachodzi poprzez proces anihilacji tryplet-tryplet (ang. *triplet-triplet annihilation*, TTA). W procesie TTA biorą udział dwa rodzaje cząsteczek. Pierwsza z nich pełni rolę uczulacza, którego zadaniem jest absorpcja fotonów wzbudzających. W wyniku absorpcji uczulacz zostaje wzbudzony do singletowego stanu wzbudzonego, a następnie na skutek przejścia międzysystemowego przechodzi do trypletowego stanu wzbudzonego. Wzbudzony uczulacz może następnie przekazać swoją energię drugiej cząsteczce zwanej anihilatorem lub emiterym. Warunkiem pojawienia się przekazu jest podobna energia trypletowych stanów wzbudzonych uczulacza i emitera. Wzbudzenie dwóch emiterymów do trypletowych stanów wzbudzonych powoduje ich wzajemne oddziaływanie. W konsekwencji jeden emiterym zostaje wzbudzony do singletowego stanu wzbudzonego, zaś drugi ulega deekscytacji. Przejście emitera z singletowego stanu wzbudzonego do stanu podstawowego powoduje emisję fotonu o większej energii niż energia fotonów wzbudzających [46–49]. W związkach nieorganicznych proces UC obserwowany jest najczęściej dla kryształów domieszkowanych za pomocą lantanowców [10–13]. Ten rodzaj up-konwersji jest przedmiotem badań niniejszej pracy doktorskiej i w dalszej części pracy zostanie szczegółowo opisany.

1.2 Mechanizmy transferu energii między fluoroforami

Zanim wyjaśniony zostanie proces UC w jonach lantanowców należy najpierw wyjaśnić mechanizmy transferu energii między dwiema cząsteczkami. Transfer energii odbywa się z jednej cząsteczki, zwanej donorem, do drugiej cząsteczki, zwanej akceptorem. Warunkiem zachodzenia transferu energii jest przekrycie widma emisji donora i absorpcji akceptora [38]. Na skutek przekazu energii wzbudzona cząsteczka donora ulega deekscytacji do stanu podstawowego, a jednocześnie akceptor ulega wzbudzeniu [38]. Wyróżnia się promieniste lub bezpromieniste mechanizmy transferu energii [50]. Mechanizmy transferu energii rozważmy dla cząsteczek donora i akceptora umieszczonych w ośrodku o współczynniku załamania światła n . Promienistym transferem energii między dwiema cząsteczkami jest reabsorpcja. Mechanizm jej zachodzenia przedstawiono na rysunku 1.2(A). Donor w wyniku wzbudzenia promieniowaniem o energii wynoszącej

$h\nu_1$ emituje foton o energii $h\nu_2$. Foton ten jest następnie absorbowany przez akceptor powodując jego wzbudzenie. Wzbudzony akceptor emituje foton o energii $h\nu_3$ [50].



RYSUNEK 1.2: (A) Schemat procesu reabsorpcji między donorem a akceptorem. Proces reabsorpcji polega na wzbudzeniu cząsteczki donora i emisji fotonu. Foton ten jest następnie absorbowany przez cząsteczkę akceptora powodując jego wzbudzenie. W wyniku wzbudzenia akceptor może wyemitować foton. Oznaczenia: Strzałka żółta – wzbudzenie donora poprzez absorpcję fotonu o energii $h\nu_1$. Strzałki zielone – emisja fotonu o energii $h\nu_2$ przez wzbudzony donora i wzbudzenie akceptora dzięki absorpcji tego fotonu. Strzałka czerwona – emisja fotonu o energii $h\nu_3$ przez wzbudzony akceptora. Schemat procesu transferu energii dla mechanizmu typu (B) Förstera i (C) Dextera. W przypadku FRET energia elektronu znajdującego się w stanie wzbudzonym w donorze (zielona kropka) zostaje przekazana elektronowi w stanie podstawowym (czerwona kropka) w akceptorze. Po transferze energii elektron w donorze powraca do stanu podstawowego, zaś elektron w akceptorze przechodzi do stanu wzbudzonego. W przypadku DET następuje przejście elektronu ze wzbudzonego stanu donora na stan wzbudzony akceptora z towarzyszącym przejściem elektronu ze stanu podstawowego akceptora na stan podstawowy donora. Rysunek opracowano na podstawie [51]

Bezpromienisty transfer energii może odbywać się według dwóch mechanizmów. Pierwszym z nich jest mechanizm typu Förstera (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*, FRET), a drugim mechanizmem typu Dextera (ang. *Dexter Energy Transfer*, DET) [38, 50, 52].

Na rysunku 1.2(B) przedstawiono mechanizm transferu energii typu Förstera. Ten rodzaj transferu energii wynika z oddziaływania dipol-dipol między donorem i akceptorem.

Szybkość przekazu energii opisana jest wzorem [38]:

$$k_{FRET}(r_{DA}) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r_{DA}} \right)^6 \quad (1.1)$$

gdzie:

τ_D – czas zaniku luminescencji donora,

R_0 – promień Förstera – odległość między donorem a akceptorem, przy której wydajność transferu energii wynosi 50%,

r_{DA} – odległość między donorem a akceptorem.

Pojawiający się we wzorze 1.1 promień Förstera R_0 opisany jest wzorem [38]:

$$R_0 = \left[\frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_d}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right]^{\frac{1}{6}} \quad (1.2)$$

gdzie:

κ – współczynnik zależny od wzajemnej orientacji dipoli donora i akceptora,

Q_D – wydajność kwantowa luminescencji donora,

N – liczba Avogadro,

n – współczynnik załamania ośrodka, w którym zachodzi FRET,

$F_D(\lambda)$ – znormalizowana funkcja opisująca widmo emisji donora,

$\epsilon_A(\lambda)$ – funkcja opisująca widmo absorpcji akceptora.

Jak można zauważyć we wzorze 1.1, szybkość zachodzenia FRET zależy od szóstej potęgi odległości między donorem a akceptorem. Aby zapewnić jak najbardziej wydajny transfer energii z donora do akceptora, należy zgodnie ze wzorami 1.1 i 1.2, wybrać donor charakteryzujący się jak największą wydajnością kwantową Q_D , umieścić donora i akceptor w ośrodku o możliwie najmniejszym współczynniku załamania światła n , zapewnić jak najmniejszą odległość między cząsteczką donora i cząsteczką akceptora r_{DA} oraz dobrać donora i akceptora tak, aby wartość całki przekroczenia była jak największa.

Na rysunku 1.2(C) przedstawiono mechanizm transferu energii typu Dextera. W mechanizmie tym elektron w stanie wzbudzonym w donorze przechodzi na wzbudzony stan w akceptorze. Natomiast elektron znajdujący się w stanie podstawowym w akceptorze przechodzi do stanu podstawowego w donorze. Transfer energii typu Dextera polega zatem na wymianie elektronów między cząsteczką donora i cząsteczką akceptora. Wymiana ta możliwa jest, gdy funkcje falowe elektronów w obu cząsteczkach przekrywają się. Z tego powodu ten rodzaj transferu energii może zachodzić jedynie w przypadku, gdy odległość donora i akceptora jest nie większa niż około 1 nm [50, 53, 54].

1.3 Zjawisko up-konwersji w lantanowcach

Proces up-konwersji zachodzący w lantanowcach jest zjawiskiem opisywanym już od lat 60 ubiegłego wieku [12, 55]. Materiały up-konwertujące domieszkowane lantanowcami wzbudzone są najczęściej promieniowaniem podczerwonym, a następnie emitują promieniowanie w zakresie widzialnym. W celu otrzymania materiału up-konwertującego wytwarza się matrycę o strukturze krystalicznej, do której wprowadzane są jony lantanowców, takich jak, np. Er^{3+} , Yb^{3+} , Tm^{3+} , Nd^{3+} czy Ho^{3+} [56]. Aby wyjaśnić proces up-konwersji w lantanowcach warto najpierw przybliżyć ich właściwości fizyczne, które umożliwiają występowanie tego procesu.

1.3.1 Właściwości fizyczne lantanowców umożliwiające wystąpienie procesu up-konwersji

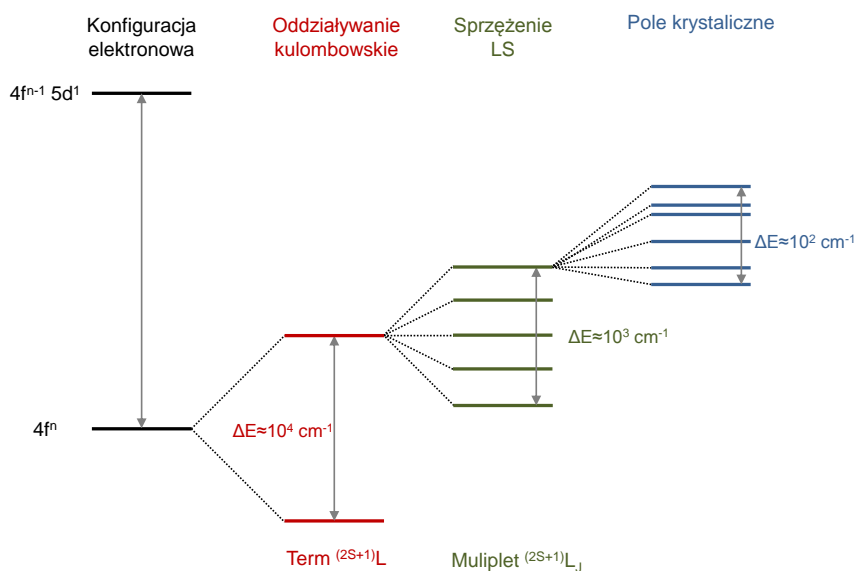
Lantanowce są grupą pierwiastków, które charakteryzują się podobnymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Podobieństwo to wynika z konfiguracji elektronowej tych pierwiastków [57, 58]. Ogólna konfiguracja elektronowa lantanowców może zostać zapisana jako:



Wraz ze wzrostem liczby atomowej, od 57 w przypadku lantanu do 71 w przypadku lutetu, zmienia się liczba elektronów znajdujących się na powłoce 4f. W zależności od rodzaju pierwiastka liczba elektronów n na powłoce 4f wynosi od 0 do 14. Jedynie w przypadku atomów lantanu, ceru, gadolinu i lutetu na powłoce 5d znajduje się jeden elektron ($m = 1$). W pozostałych przypadkach $m = 0$. Lantanowce w związkach chemicznych występują najczęściej jako trójwartościowe jony (Ln^{3+}) [57, 59, 60]. Jest to zazwyczaj konsekwencja oddania dwóch elektronów z powłoki $6s^2$ oraz jednego elektronu z powłoki 4f lub 5d podczas wytwarzania wiązań chemicznych. Zewnętrzne powłoki 5s oraz 5p pozostają całkowicie zapełnione. Dzięki tej własności elektrony znajdujące się na wewnętrznej powłoce 4f są elektrostatycznie ekranowane od wpływu otoczenia [61, 62]. Innymi słowy jony Ln^{3+} umieszczone w sieci krystalicznej słabo oddziałują z innymi atomami znajdującymi się w tej sieci. Z tego względu struktura elektronowa lantanowców, zarówno dla jonów znajdujących się w sieci krystalicznej, jak i wolnych jonów jest podobna [63]. Dodatkowo, dzięki ekranowaniu elektronów na powłoce 4f, pasma emisyjne występujące w lantanowcach są wąskie [60, 63].

Jak już wspomniano na początku tego podrozdziału lantanowce posiadają niezapełnioną powłokę 4f. Sprawia to, że pojedynczy elektron może zająć jeden z $n = 14$

dostępnych stanów jednoelektronowych. Występowanie k niesparowanych spinowo elektronów w układzie wieloelektronowym daje zatem $\binom{n}{k}$ możliwości obsadzenia n stanów jednoelektronowych. Dla przykładu w konfiguracji jonu Er^{3+} występują 3 niesparowane elektrony, które mogą zająć dowolne 3 z 14 dostępnych stanów jednoelektronowych. Oznacza to, że dla jonu Er^{3+} występują 364 konfiguracje jednoelektronowe, na których może znaleźć się elektron. Konfiguracje te tworzą następnie stany wieloelektronowe jonów Ln^{3+} , które przedstawiono schematycznie na rysunku 1.3.



RYSUNEK 1.3: Schematyczne przedstawienie stanów wieloelektronowych w jonie Ln^{3+} umieszczonym w sieci krystalicznej. Oddziaływanie kulombowskie powoduje rozszczepienie stanów elektronowych dla elektronów z powłoki 4f na stany zwane termami. Energia między najwyższym i najniższym rozszczepionym termem wynosi 10^4 cm^{-1} . Sprzężenie LS powoduje, że termy ulegają dalszemu rozszczepieniu ze względu na wartość liczby J . Powstałe w wyniku rozszczepienia stany określa się mianem multipletów. Energia między najwyższym i najniższym multipletem wynosi 10^3 cm^{-1} . Pole krystaliczne powoduje dodatkowe rozszczepienie multipletów. Energia między najwyższym i najniższym multipletem wynosi 10^2 cm^{-1} . Rysunek opracowano na podstawie [58, 62].

Najsilniejszym z oddziaływań determinujących stany elektronowe w jonie Ln^{3+} jest oddziaływanie kulombowskie. Rozszczepione w wyniku tego oddziaływania stany energetyczne określa się mianem termów. Każdy term opisany jest liczbami kwantowymi całkowitego spinu elektronów w jonie (S) oraz całkowitego orbitalnego momentu pędu (L) i wyraża się w notacji $(2S+1)L$. Różnica energii między najbardziej odległymi stanami powstałymi w wyniku rozszczepienia pod wpływem oddziaływania kulombowskiego wynosi około 10^4 cm^{-1} [58, 62, 63]. Kolejnym czynnikiem powodującym dalsze znośenie degeneracji stanów energetycznych jest sprzężenie spin-orbita (LS), które znosi degenerację stanów ze względu na liczbę J , która opisuje wartość całkowitego momentu pędu elektronów w jonie. Poziomy energetyczne powstające w wyniku tego rozszczepienia, tzw. multiplety, zapisuje się w notacji $(2S+1)L_J$ [58, 61–63]. Różnica energii między

multipletami o najniższej i najwyższej energii wynosi około 10^3 cm^{-1} . Umieszczenie jonu Ln^{3+} w sieci krystalicznej matrycy sprawia, że każdy multiplet ulega dodatkowemu rozszczepieniu pod wpływem oddziaływania elektronów z polem krystalicznym, czyli polem wytwarzanym przez pozostałe atomy znajdujące się w matrycy. Rozszczepienie to jest nie większe niż 10^2 cm^{-1} .

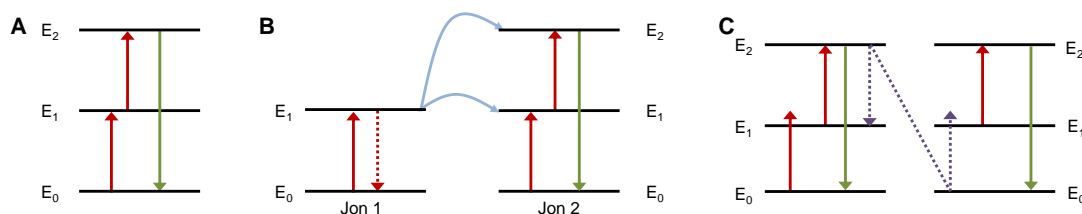
Rozbudowana struktura elektronowa jonów Ln^{3+} jest zaletą zastosowania ich w materiałach zdolnych do up-konwersji. Wiele dostępnych stanów pośrednich sprawia, że proces wzbudzenia jonów Ln^{3+} do stanów emisyjnych jest łatwiejszy w porównaniu do materiałów posiadających niewielką liczbę stanów pośrednich. Dodatkowo, rozbudowana struktura elektronowa w jonach Ln^{3+} sprawia, że długość fali wzbudzenia może być dopasowana do różnych poziomów występujących w danym jonie. Dla przykładu nanocząstki posiadające w sieci krystalicznej jony Nd^{3+} są wzbudzane promieniowaniem o długości fali 808 nm, zaś posiadające jony Yb^{3+} są wzbudzane promieniowaniem o długości fali 980 nm [64–66].

Luminescencja jonów Ln^{3+} jest konsekwencją występowania w nich wewnątrzkonfiguracyjnych przejść $4f \rightarrow 4f$. Zgodnie z regułą Laporte'a występowanie takich przejść jest zabronione, ponieważ przejścia optyczne są dozwolone jedynie w przypadku, gdy przejściu towarzyszy zmiana parzystości [67, 68]. Jednakże umieszczenie jonów Ln^{3+} w sieci krystalicznej powoduje, że w wyniku oddziaływania pola krystalicznego następuje mieszanie stanów o przeciwnej parzystości. Sprawia to, że przejścia, pierwotnie zabronione ze względu na parzystość, stają się częściowo dozwolone [57, 63]. Mieszanie się stanów o przeciwnej parzystości jest tym mocniejsze, im silniejsza jest asymetria sieci krystalicznej, do której wprowadzono jony Ln^{3+} . W konsekwencji zwiększone zostaje prawdopodobieństwo wystąpienia przejść optycznych, co powoduje wzrost wydajności UCL [63]. Dla przykładu jony Ln^{3+} wprowadzone do matrycy NaYF_4 o strukturze heksagonalnej zajmują pozycję, dla której symetria względem pozostałych jonów sieci jest niższa niż w przypadku wprowadzenia ich do tej samej matrycy NaYF_4 o strukturze kubicznej [63]. Oznacza to, że wydajność UCL dla nanocząstek o strukturze heksagonalnej jest większa niż UCNPs o strukturze kubicznej.

1.3.2 Mechanizmy up-konwersji

Wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy procesu up-konwersji: absorpcję ze stanu wzbudzonego, up-konwersję z transferem energii oraz lawinę fotonów [12, 69, 70]. Podstawa zachodzenia każdego procesu jest jednakowa – wymaga sekwencyjnej absorpcji co najmniej dwóch fotonów podczerwonych, co skutkuje emisją pojedynczego fotonu w

zakresie widzialnym. Schematycznie proces up-konwersji dla wymienionych wyżej mechanizmów przedstawiono na rysunkach 1.4 (A-C).



RYSUNEK 1.4: Mechanizmy procesu up-konwersji. (A) Absorpcja ze stanu wzbudzonego, (B) up-konwersja z transferem energii oraz (C) lawina fotonów. Oznaczenia: strzałki czerwone – absorpcja fotonu wzbudzającego, strzałki zielone – relaksacja promienista, strzałki niebieskie – transfer energii, czerwone przerywane strzałki – deekscytacja spowodowana wystąpieniem przekazu energii, fioletowe przerywane strzałki – relaksacją krzyżową. Rysunek opracowano na podstawie [12, 69, 71]

Proces absorpcji ze stanu wzbudzonego (ang. *excited state absorption*, ESA) przedstawiono na rysunku 1.4(A). Absorpcja pierwszego fotonu podczerwonego powoduje wzbudzenie elektronu ze stanu podstawowego E_0 do stanu wzbudzonego o energii E_1 . Następnie absorpcja kolejnego fotonu podczerwonego powoduje wzbudzenie elektronu na stan wzbudzony o energii E_2 . Przejście elektronu ze stanu wzbudzonego E_2 do stanu podstawowego E_0 odbywa się z emisją fotonu o energii większej niż energia pojedynczego fotonu wzbudzającego [12, 55, 69].

Kolejnym rodzajem procesu UC jest up-konwersja z transferem energii (ang. *energy transfer upconversion*, ETU), która zachodzi dla pary dwóch różnych jonów. Jon, który absorbuje promieniowanie podczerwone określa się mianem uczulacza, natomiast jon, z którego odbywa się emisja fotonu określany jest mianem aktywatora [69]. Uczulacz silniej absorbuje promieniowanie wzbudzające niż aktywator. Dzięki tej właściwości efektywność procesu UC jest większa dla materiałów zawierających zarówno uczulacz jak i aktywator niż w przypadku materiałów zawierających jedynie aktywator, dla którego zachodzi tylko proces absorpcji ze stanu wzbudzonego [12].

Mechanizm ETU przedstawiono na rysunku 1.4(B). Absorpcja pierwszego fotonu podczerwonego w jonie 1 powoduje wzbudzenie elektronu na poziom E_1 . Ze względu na podobną różnicę energii między poziomami E_1 w jonach 1 i 2 energia zostaje przekazana z jonu 1 do sąsiadującego jonu 2 poprzez transfer energii typu Förstera. Przekaz energii sprawia, że elektron w jonie 2 zostaje wzbudzony do stanu wzbudzonego E_1 , zaś elektron w jonie 1 powraca do stanu podstawowego E_0 . Absorpcja kolejnego fotonu i kolejny transfer energii z jonu 1 do jonu 2 powoduje wzbudzenie elektronu ze stanu E_1 do stanu E_2 . Z tego stanu elektron może powrócić do stanu podstawowego, czemu towarzyszy emisja fotonu. [12, 55, 69, 72].

Trzecim rodzajem up-konwersji jest lawina fotonów (ang. *photon avalanche*, PA). Proces ten jest złożeniem procesów relaksacji krzyżowej i absorpcji ze stanu wzbudzonego. Relaksacja krzyżowa jest procesem, w którym na skutek transferu energii między dwoma jonami, jeden jon przechodzi ze stanu wzbudzonego do stanu o niższej energii niż energia stanu początkowego, natomiast drugi jon ulega wzbudzeniu do stanu o wyższej energii niż energia stanu początkowego. Schematycznie proces lawiny fotonów przedstawiono na rysunku 1.4(C). Lawina fotonów zachodzi między dwoma jednakowymi jonami. W celu rozpoczęcia PA jon musi zostać wzbudzony do stanu o energii E_1 . Wzbudzenie takie najczęściej zachodzi w wyniku nierezonansowej absorpcji ze stanu podstawowego [71]. Ze stanu E_1 odbywa się rezonansowa absorpcja fotonów podczerwonych, która powoduje wzbudzenie jonu do stanu E_2 . Efektywność wzbudzenia $E_0 \rightarrow E_1$ jest mniejsza niż efektywność wzbudzenia $E_1 \rightarrow E_2$ [71]. Energia jonu znajdującego się w stanie E_2 może być przekazywana na drodze relaksacji krzyżowej do sąsiadującego jonu lub emitowana w postaci fotonu. Wystąpienie relaksacji krzyżowej powoduje, że z jednego jonu na stanie o energii E_2 powstają dwa jony na stanach o energiach E_1 . Dzięki efektywnej relaksacji krzyżowej liczba jonów w stanie wzbudzonym E_1 rośnie wykładniczo. Lawina fotonów silnie zależy od mocy pobudzenia i koncentracji jonów. Moc pobudzenia wpływa na wydajność absorpcji ze stanu wzbudzonego. Koncentracja jonów wpływa natomiast na wydajność relaksacji krzyżowej między jonami. [12, 71–73].

1.4 Proces up-konwersji w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$

Najważniejszym czynnikiem podczas wytwarzania materiałów up-konwertujących jest dobór materiału matrycowego, do którego sieci krystalicznej muszą zostać wprowadzone domieszki jonów lantanowców [69, 74]. Jony Ln^{3+} zajmują w sieci krystalicznej pozycję, dla której liczba koordynacyjna wynosi 8 [75]. Zatem aby zapewnić efektywne wprowadzenie jonów Ln^{3+} do matrycy taka pozycja musi występować w sieci krystalicznej matrycy. Matryca powinna charakteryzować się także niską energią drgań fononowych sieci krystalicznej. Dzięki temu ograniczone jest bowiem występowanie relaksacji bezpromienistych i zwiększona tym samym efektywność przejść promienistych. Najczęściej jako matrycę dla nanostruktur up-konwertujących najczęściej wybiera się fluorki (np. NaYF_4 , LaF_3 , NaGdF_4), tlenki (np. Al_2O_3 , Gd_2O_3) oraz halogenki, tj. chlorki, bromki, jodki (np. $\text{Cs}_3\text{Y}_2\text{I}_9$, $\text{Cs}_3\text{Lu}_2\text{Cl}_9$, $\text{Cs}_3\text{Lu}_2\text{Br}_9$) [76, 77]. Tlenki wyróżniają się dużą stabilnością chemiczną, lecz energia drgań fononów ich sieci krystalicznej jest stosunkowo duża i wynosi około 500 cm^{-1} . Halogenki natomiast posiadają niższą energię drgań fononów ($<300 \text{ cm}^{-1}$), lecz często są higroskopijne i niestabilne chemicznie. Jako

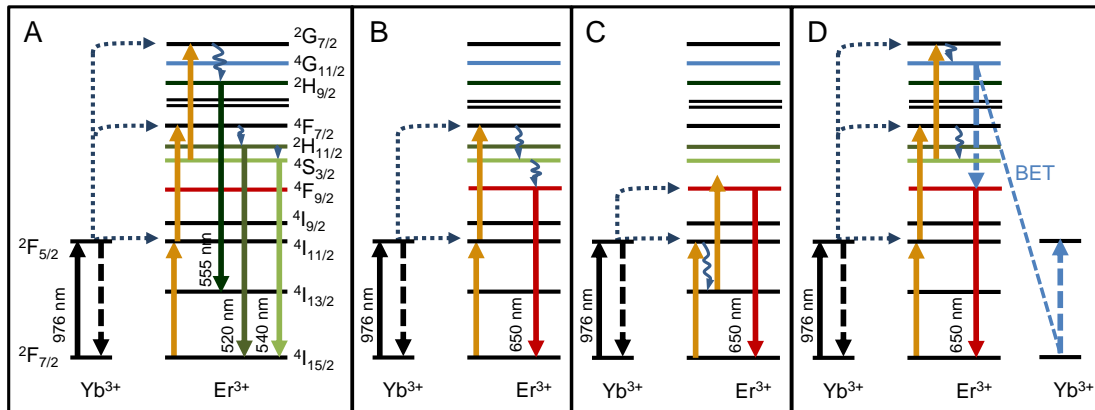
najlepsze materiały matrycowe uznaje się fluorki, ponieważ mają zarówno niską energię drgań fononów (około 350 cm^{-1}), jak i odznaczają się dużą stabilnością chemiczną [12, 70, 74, 78].

Jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów matrycowych jest NaYF_4 . Matryca ta najczęściej domieszkowana jest za pomocą jonów Yb^{3+} , Er^{3+} lub Tm^{3+} , które wbudowują się w miejsce jonów Y^{3+} . Długości promieni jonowych Yb^{3+} , Er^{3+} i Tm^{3+} są podobne do długości promienia jonowego Y^{3+} [75]. Dzięki temu po wprowadzeniu domieszek Yb^{3+} , Er^{3+} czy Tm^{3+} do matrycy NaYF_4 obserwowana jest ograniczona ilość defektów w sieci krystalicznej. W konsekwencji ogranicza to występowanie relaksacji bezpromienistych w kryształach i poprawia wydajność UCL [74, 79].

Proces up-konwersji najwydajniej zachodzi dla nanocząstek NaYF_4 o zawartości jonów Yb^{3+} w przedziale 17%-20% oraz o zawartości jonów Er^{3+} w przedziale 2%-3% [80, 81]. Z tego względu badania opisane w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono wykorzystując nanocząstki $\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}^{3+},2\%\text{Er}^{3+}$, które w dalszej części pracy oznaczano jako $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$.

Mechanizm UC z transferem energii występujący między parą jonów $\text{Yb}^{3+} - \text{Er}^{3+}$ znajdującą się w sieci krystalicznej przedstawiono na rysunkach 1.5 (A-D). Jon Yb^{3+} pełni w procesie UC rolę uczulacza i odpowiada za absorpcję promieniowania podczerwonego. Natomiast jon Er^{3+} pełni rolę aktywatora i odpowiada za emisję promieniowania w zakresie widzialnym [74]. Energia przejścia ${}^2F_{7/2} \rightarrow {}^2F_{5/2}$ w jonie Yb^{3+} jest podobna do energii przejść ${}^4I_{15/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$, ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4F_{7/2}$ oraz ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^2G_{7/2}$ w jonie Er^{3+} . Dzięki temu możliwe jest występowanie transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} i obsadzanie kolejnych poziomów wzbudzonych.

Na rysunku 1.5(A) przedstawiono mechanizmy wzbudzenia UC, które prowadzą do wyemitowania fotonów w zielonym zakresie spektralnym. Absorpcja fotonu podczerwonego o długości fali około 980 nm powoduje wzbudzenie jonu Yb^{3+} ze stanu podstawowego ${}^2F_{7/2}$ do stanu wzbudzonego ${}^2F_{5/2}$. Następnie z tego stanu następuje przekaz energii do jonu Er^{3+} , w wyniku którego zostaje on wzbudzony do stanu ${}^4I_{11/2}$, a jon Yb^{3+} ulega deekscytacji do stanu podstawowego. Absorpcja kolejnego fotonu podczerwonego i kolejny transfer energii powoduje wzbudzenie jonu Er^{3+} do stanu ${}^4F_{7/2}$. Z tego stanu w wyniku pojawienia się relaksacji bezpromienistych ${}^4F_{7/2} \rightarrow {}^2H_{11/2}$ i ${}^2H_{11/2} \rightarrow {}^4S_{3/2}$ obsadzone są stany ${}^2H_{11/2}$ i ${}^4S_{3/2}$. Przejścia z tych stanów do stanu podstawowego ${}^4I_{15/2}$ powodują odpowiednio emisję fotonów o długości fali 520 i 540 nm. Dodatkowo, gdy jon Er^{3+} znajduje się w stanie ${}^4S_{3/2}$, w wyniku trzeciego przekazu energii z jonu Yb^{3+} , może zostać wzbudzony do stanu ${}^2G_{7/2}$. Z tego stanu w wyniku relaksacji bezpromienistej następuje przejście do stanu ${}^2H_{9/2}$. Przejściu ${}^2H_{9/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ towarzyszy emisja fotonu o długości fali 555 nm.



RYSUNEK 1.5: Mechanizmy wzbudzenia up-konwersji z transferem energii zachodzące dla jonów $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$ powodujące emisję fotonów w (A) zielonym zakresie spektralnym oraz (B-D) czerwonym zakresie spektralnym. Oznaczenia: czarna strzałka – wzbudzenie w jonie Yb^{3+} , czarne przerywane strzałki – deekscytacja w jonie Yb^{3+} spowodowana występowaniem przekazu energii do jonu Er^{3+} , granatowe przerywane strzałki – transfer energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} , żółte strzałki – wzbudzenie w jonie Er^{3+} w wyniku transferu energii z Yb^{3+} , zielone i czerwone strzałki – relaksacja promienista, niebieskie strzałki – zwrotny transfer energii z Er^{3+} do Yb^{3+} . (A) Emisja fotonów o długości fali 525, 540 oraz 555 nm zachodzi na skutek dwu- lub trzyfotonowego wzbudzenia w jonie Er^{3+} . (B) Dwufotonowy mechanizm wzbudzenia w jonie Er^{3+} skutkujący emisją fotonu o długości fali około 650 nm. Ze względu na niską wydajność przejść bezpromienistych ze stanu ${}^4F_{7/2}$ do stanu ${}^4F_{9/2}$ mechanizm wydajność tego mechanizmu jest mała. (C) Dwufotonowy mechanizm wzbudzenia w jonie Er^{3+} skutkujący emisją fotonu o długości fali około 650 nm. Mechanizm ten występuje dla nanocząstek umieszczonych w roztworach wodnych, w których obecność grup hydroksylowych powoduje wzrost wydajności relaksacji bezpromienistej ze stanu ${}^4I_{11/2}$ do stanu ${}^4I_{13/2}$. (D) Trzyfotonowy mechanizm wzbudzenia w jonie Er^{3+} skutkujący emisją fotonu o długości fali około 650 nm. Mechanizm ten występuje najwydajniej dla nanocząstek umieszczonych w roztworach pozbawionych grup -OH. Rysunek opracowano na podstawie [80, 82, 83].

Mechanizmy wzbudzenia wymagające dwukrotnej absorpcji fotonu wzbudzającego i dwóch przekazów energii w dalszej części pracy określane będą mianem mechanizmów dwufotonowych. Mechanizmy wymagające trzykrotnej absorpcji fotonu wzbudzającego i trzech przekazów energii w dalszej części pracy określane będą mianem mechanizmów trzyfotonowych.

Na rysunku 1.5(B) przedstawiono dwufotonowy mechanizm wzbudzenia jonu Er^{3+} , w którego następstwie pojawia się emisja fotonu o długości fali około 650 nm. Dwukrotna absorpcja promieniowania wzbudzającego przez jon Yb^{3+} , a następnie dwukrotny transfer energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} powoduje wzbudzenie jonu Er^{3+} do stanu ${}^4F_{7/2}$. Relaksacje bezpromieniste ${}^4F_{7/2} \rightarrow {}^4S_{3/2}$ oraz ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$ powodują przejście do stanu ${}^4F_{9/2}$. Przejście z tego stanu do stanu podstawowego ${}^4I_{15/2}$ odbywa się z emisją fotonu o długości fali około 650 nm. Ten mechanizm jest najmniej efektywnym mechanizmem wzbudzenia skutkującym emisją w czerwonym zakresie spektralnym. Niska efektywność wynika z małej efektywności relaksacji bezpromienistej ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$ [84, 85].

Na rysunku 1.5(C) przedstawiono inny dwufotonowy mechanizm wzbudzenia w jonie Er^{3+} , w którego następstwie pojawia się emisja fotonu o długości fali około 650 nm. Tak samo, jak w przypadku poprzedniego mechanizmu, absorpcja pierwszego fotonu podczerwonego przez jon Yb^{3+} i pierwszy przekaz energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} prowadzi do wzbudzenia jonu Er^{3+} do stanu ${}^4I_{11/2}$. Ze stanu tego występuje następnie relaksacja bezpromienista do stanu ${}^4I_{13/2}$. Kolejna absorpcja i transfer energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} powoduje przejście ${}^4I_{13/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$. Przejście do stanu podstawowego ${}^4I_{15/2}$ ze stanu ${}^4F_{9/2}$ odbywa się z emisją fotonu około 650 nm. Opisany mechanizm wzbudzenia dwufotonowego występuje dla nanocząstek umieszczonych w roztworach wodnych. Wynika to ze zbliżonej energii drgań grup -OH znajdujących się w cząsteczce wody do energii przejścia ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ w jonie Er^{3+} [83, 86]. Obecność grup -OH sprawia zatem, że rośnie prawdopodobieństwo tych przejść. W konsekwencji prowadzi to do zwiększenia wydajności emisji fotonów o długości fali około 650 nm w porównaniu do wydajności emisji tych fotonów dla nanocząstek zawieszonych w rozpuszczalniku pozbawionym grup -OH.

Trzyfotonowy mechanizm wzbudzenia w jonie Er^{3+} , prowadzący do emisji fotonu o długości fali około 650 nm, przedstawiono na rysunku 1.5(D). W tym przypadku na skutek procesu dwufotonowego jon Er^{3+} zostaje wzbudzony do stanu ${}^4F_{7/2}$, z którego następuje relaksacja bezpromienista do stanu ${}^4S_{3/2}$. Trzeci przekaz energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} powoduje, że jon Er^{3+} zostaje wzbudzony do stanu ${}^2G_{7/2}$. Następnie z tego stanu występuje relaksacja do stanu ${}^4G_{11/2}$. Energia przejścia ${}^4G_{11/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$ jest podobna do energii przejścia ${}^2F_{7/2} \rightarrow {}^2F_{5/2}$ w jonie Yb^{3+} . Z tego względu z jonu Er^{3+} następuje zwrotny transfer energii (ang. *back energy transfer*, BET) do jonu Yb^{3+} , co na rysunku 1.5(D) oznaczono niebieskimi, przerywanymi strzałkami. W konsekwencji BET jon Er^{3+} znajduje się w stanie ${}^4F_{9/2}$, z którego, jak opisywano wyżej, odbywa się emisja fotonu o długości fali około 650 nm. Mechanizm trzyfotonowy jest najwydajniejszym mechanizmem wzbudzenia UCL w czerwonym zakresie spektralnym, z wyjątkiem UCL nanocząstek umieszczonych w roztworach zawierających grupy -OH [83].

Wydajność poszczególnych przejść promienistych w UCNPs zależy od wielu czynników, m.in. struktury krystalicznej matrycy, obecności defektów w sieci krystalicznej matrycy, zawartości domieszek lantanowców, rozmiaru i kształtu nanocząstek, środowiska zewnętrznego nanocząstek – tj. rodzaju rozpuszczalnika, czy też mocy pobudzenia [74, 80, 81, 83, 87, 88].

Dla przykładu, rozważmy wydajność poszczególnych przejść optycznych w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ w zależności od zawartości domieszek Yb^{3+} i Er^{3+} w sieci krystalicznej matrycy. W przypadku nanocząstek o stałej zawartości jonów Er^{3+} wzrost zawartości jonów Yb^{3+} w sieci krystalicznej powoduje zmniejszenie odległości między

jonami $\text{Yb}^{3+} - \text{Er}^{3+}$. Powoduje to, że prawdopodobieństwo występowania zwrotnego transferu energii (rysunek 1.5(D)) z jonu Er^{3+} do jonu Yb^{3+} rośnie. W wyniku wydajnego BET następuje wzrost wydajności emisji fotonów czerwonych [81, 87]. W przypadku nanocząstek o stałej zawartości jonów Yb^{3+} wzrost liczby jonów Er^{3+} w sieci krystalicznej także powoduje wzrost wydajności emisji fotonów czerwonych. Jest to spowodowane występowaniem relaksacji krzyżowych w sąsiadujących jonach Er^{3+} [80, 87, 88].

1.5 Czynniki zewnętrzne wpływające na proces up-konwersji

Oprócz wymienionych w poprzednim podrozdziale czynników związanych bezpośrednio z morfologią nanocząstek, środowiska w jakim się znajdują oraz właściwości fizycznych lantanowców, na wydajność procesu up-konwersji mogą dodatkowo wpływać czynniki zewnętrzne, takie jak temperatura otoczenia [89, 90], moc promieniowania wzbudzającego UCL [83, 91], obecność pola magnetycznego [92] czy też obecność struktur metalicznych [91].

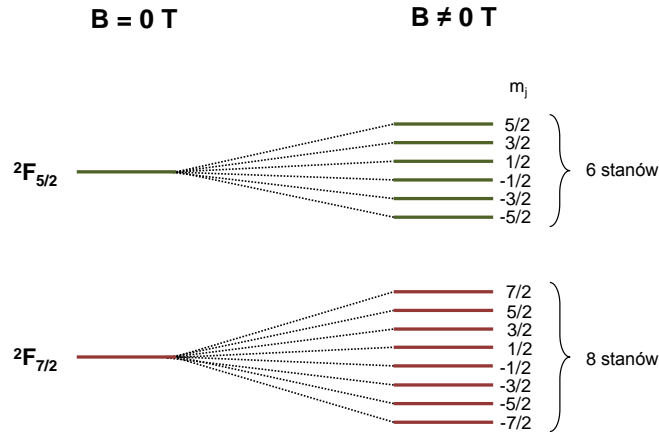
1.5.1 Moc promieniowania wzbudzającego

Intensywność UCL zależy nieliniowo od mocy promieniowania wzbudzającego. Dla niskich mocy promieniowania wzbudzającego zależność ta jest następująca: $I(P) \propto P^n$, gdzie I to intensywność luminescencji, P – moc promieniowania wzbudzającego oraz n to liczba fotonów wzbudzająca UCL [12]. Mechanizm wzbudzenia UCL można zatem określić poprzez wyznaczenie zależności intensywności luminescencji od mocy promieniowania. Wraz ze wzrostem mocy wzbudzenia powyżej pewnej wartości progowej następuje wysycenie przejściowych stanów wzbudzonych. Stany przejściowe są stanami, z których następuje wzbudzenie do stanów emisyjnych. Na skutek wysycenia stanów pośrednich zależność intensywności luminescencji od mocy wzbudzenia staje się liniowa [12, 83]. Dalszy wzrost mocy promieniowania wzbudzającego powoduje wysycenie stanów wzbudzonych, z których występuje emisja promieniowania.

1.5.2 Pole magnetyczne

Umieszczenie jonów Ln^{3+} w polu magnetycznym powoduje zniesienie degeneracji stanów energetycznych ze względu na wartość rzutu wypadkowego momentu magnetycznego na kierunek B . Przyłożenie pola magnetycznego powoduje zatem rozszczepienie początkowego stanu energetycznego na $2J + 1$ poziomów energetycznych o różnych wartościach

m_j wynoszących $(-j, -j + 1, \dots, j - 1, j)$ [58, 61]. Rozszczenie poziomów energetycznych w wyniku obecności pola magnetycznego na przykładzie jonu Yb^{3+} przedstawiono na rysunku 1.6.



RYSUNEK 1.6: Rozszczenie poziomów energetycznych jonu Yb^{3+} w polu magnetycznym ze względu na liczbę m_j . Stan ${}^2F_{7/2}$ rozszczepia się na 8 stanów zeemanowskich. Stan ${}^2F_{5/2}$ rozszczepia się na 6 stanów zeemanowskich.

Umieszczenie jonu Yb^{3+} w polu magnetycznym powoduje rozszczenie stanów ${}^2F_{7/2}$ oraz ${}^2F_{5/2}$ na odpowiednio 8 oraz 6 stanów zeemanowskich, których energia opisywana jest wzorem:

$$E_B = E_0 + m_j g \mu_B B, \quad (1.4)$$

gdzie:

E_B – energia poziomu rozszczonego pod wpływem pola o indukcji B ,

E_0 – energia poziomu w zerowym polu magnetycznym,

m_j – rzut wypadkowego momentu magnetycznego na kierunek B ,

g – czynnik Landégo zależny od wartości L , S oraz J ,

μ_B – magneton Bohra,

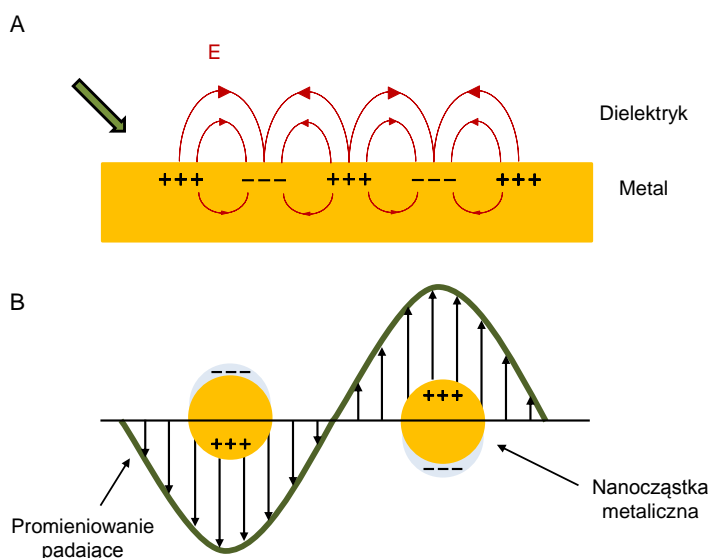
B – wartość indukcji pola magnetycznego.

Wzrost wartości indukcji pola magnetycznego, w którym umieszczony zostaje jon Ln^{3+} powoduje zwiększenie różnicy energii między rozszczionymi poziomami. Dostępne w chwili podejmowanych badań dane literaturowe wskazywały, że wzrost wartości pola magnetycznego, w którym znajduje się nanocząstka up-konwertująca, może powodować wzmocnienie [22, 23] lub osłabienie [14, 19–21] wydajności UCL. Te sprzeczne wnioski wyciągano w oparciu o fakt, że obecność pola magnetycznego może wpływać na zmianę wydajności wzbudzenia, zmianę wydajności procesów bezpromienistych i promienistych,

a także zmianę efektywności transferu energii między jonami Ln^{3+} znajdującymi się w nanostrukturach up-konwertujących [92, 93].

1.5.3 Struktury metaliczne

Struktury metaliczne, takie jak nanocząstki ze złota czy nanodruty ze srebra, mogą być użyte do modyfikacji właściwości optycznych UCNPs. Ekspozycja nanostruktur metalicznych na promieniowanie elektromagnetyczne może spowodować pojawienie się oscylacji swobodnych elektronów znajdujących się w materiale metalicznym. Pojedynczy kwant takiej oscylacji nazywa się plazmonem. Sprężenia oscylacji gęstości elektronów z falą elektromagnetyczną pojawiające się na granicy dwóch ośrodków, metalu i dielektryka, określa się mianem powierzchniowych plazmonowych polarytonów (ang. *surface plasmon polaritons*, SPPs). Oscylacje elektronów są źródłem pola elektrycznego powstającego na granicy ośrodków dielektryk-metal [94–96]. Rozkład tak wygenerowanego pola elektrycznego przedstawiono na rysunku 1.7(A).

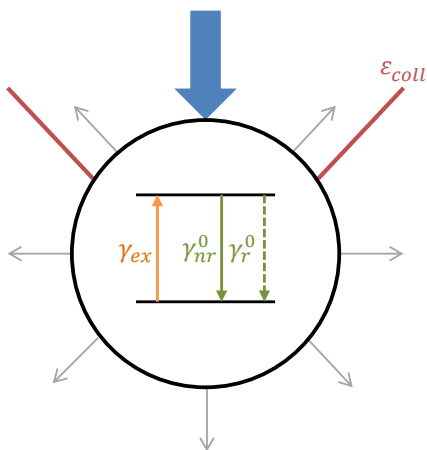


RYSUNEK 1.7: (A) Rozkład pola elektrycznego na granicy ośrodków dielektryk metal spowodowany generowaniem SPPs. Występowanie przy powierzchni metalu obszarów naładowanych dodatnio i ujemnie jest źródłem lokalnego pola elektrycznego (czerwone linie). (B) Generowanie plazmonów w nanostrukturze metalicznej. Pole elektryczne fali promieniowania padającego (zielona linia) powoduje ruch swobodnych elektronów w tej nanostrukturze zgodnie z tym polem. Czarne strzałki wskazują kierunki pola elektrycznego fali padającej. Uporządkowanie różnoimennych ładunków w nanostrukturze wywołane polem elektrycznym fali padającej powoduje generowanie w niej dodatkowego lokalnego pola elektrycznego. Rysunek opracowano na podstawie [97].

Na rysunku 1.7(B) przedstawiono generowanie pola elektrycznego w nanocząstce metalicznej. Plazmony generowane są gdy nanocząstka oświetlana jest promieniowaniem o energii będącej w rezonansie z modem oscylacji gęstości elektronów. Pole elektryczne fali oświetlającej powoduje oscylacje swobodnych elektronów w nanocząstce zgodnie z tym polem. Powstanie obszarów naładowanych dodatnio i obszarów naładowanych ujemnie powoduje wytworzenie dodatkowego pola elektrycznego wokół nanocząstki.

Plazmony generowane w nanostrukturach metalicznych mogą wpływać na właściwości optyczne emiterów. Lokalne pole elektryczne wynikające z obecności plazmonów może spowodować zmianę wydajności wzbudzenia, a także wzmocnienie lub osłabienie luminescencji poprzez modyfikację wydajności przejść promienistych oraz bezpromienistych [94, 96, 98, 99].

Rozważmy cząsteczkę fluoroforu umieszczoną w jednorodnym ośrodku. Schematycznie taką cząsteczkę przedstawiono na rysunku 1.8.



RYSUNEK 1.8: Emiter umieszczony w jednorodnym ośrodku. Oznaczenia: szeroka, niebieska strzałka – promieniowanie wzbudzające emiter, szare strzałki – promieniowanie emitowane przez fluorofor, czerwone linie – zakres kąta bryłowego, z którego mierzona jest luminescencja fluoroforu, pomarańczowa strzałka – wzbudzenie fluoroforu z wydajnością γ_{ex} , ciągła, zielona strzałka - przejście promieniste z wydajnością γ_r^0 , przerywana, zielona strzałka – przejście bezpromieniste z wydajnością γ_{nr}^0 .

Swobodny fluorofor pod wpływem wzbudzenia emituje promieniowanie w sposób izotropowy, czyli równomiernie we wszystkie strony. Na rysunku 1.8 promieniowanie wzbudzające padające na fluorofor oznaczono szeroką, niebieską strzałką, a emisję fluoroforu oznaczono szarymi strzałkami.

Mierzoną intensywność luminescencji fluoroforu I opisuje wzór [94, 100]:

$$I = \gamma_{ex}\eta_0\epsilon_{coll} \quad (1.5)$$

gdzie:

γ_{ex} – prawdopodobieństwo wzbudzenia fluoroforu wyrażone w jednostkach odwrotności czasu,

η_0 – wydajność kwantowa emisji fluoroforu,

ϵ_{coll} – wydajność zbierania fotonów przez układ pomiarowy.

Prawdopodobieństwo wzbudzenia (γ_{ex}) może być opisane złotą regułą Fermiego [94]:

$$\gamma_{ex} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle i | \mathbf{E} \cdot \mathbf{p} | f \rangle|^2 \rho_f \quad (1.6)$$

gdzie:

\hbar – zredukowana stała Plancka,

$\langle i |$ – stan początkowy,

\mathbf{E} – lokalne pole elektryczne,

\mathbf{p} – moment dipolowy przejścia,

$|f\rangle$ – stan końcowy,

ρ_f – gęstość stanów końcowych.

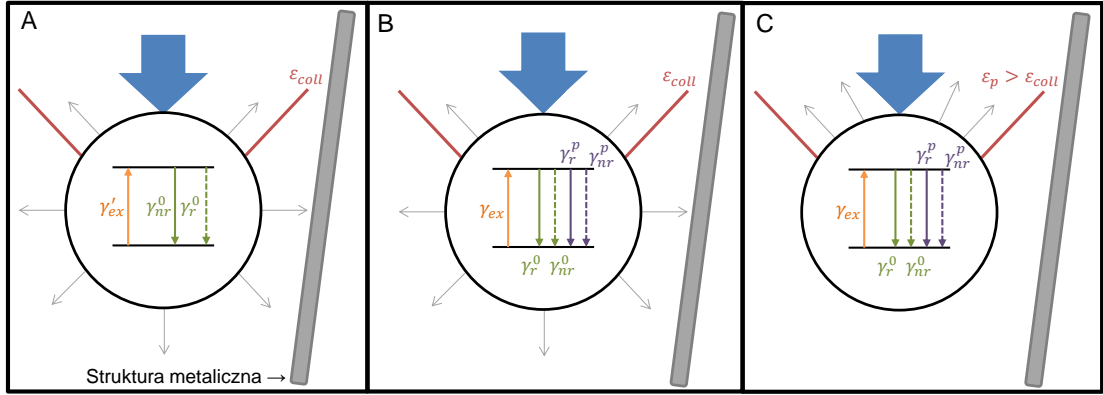
Przejścia promieniste i bezpromieniste oznaczono na rysunku 1.8 odpowiednio ciągłą i przerywaną, zieloną strzałką. Wydajność kwantowa emisji fluoroforu (η_0) zależy od prawdopodobieństwa przejść promienistych (γ_r^0) oraz prawdopodobieństwa przejść bezpromienistych (γ_{nr}^0). Wartość η_0 dana jest wzorem [94]:

$$\eta_0 = \frac{\gamma_r^0}{\gamma_r^0 + \gamma_{nr}^0} \quad (1.7)$$

Wydajność zbierania fotonów emitowanych przez fluorofor (ϵ_{coll}) jest wielkością charakterystyczną dla danego układu pomiarowego. Na rysunku 1.8 wydajność zbierania fotonów ϵ_{coll} oznaczono schematycznie jako zakres kąta bryłowego, z którego fotony trafiają do detektora.

Rozważmy teraz emiter umieszczony w sąsiedztwie struktury metalicznej. Na rysunku 1.9(A) przedstawiono wpływ obecności struktury metalicznej na wydajność wzbudzenia emitera. Promieniowanie padające na strukturę metaliczną powoduje generowanie plazmonów, co prowadzi do wytworzenia dodatkowego lokalnego pola elektrycznego wokół niej [101]. Jeżeli fluorofor znajduje się blisko struktury metalicznej pole elektryczne

w emiterze również wzrasta. Zgodnie ze złotą regułą Fermiego, opisaną wzorem 1.6, prawdopodobieństwo wzbudzenia emitera zależy od lokalnego pola elektrycznego. Oznacza to, że obecność struktury metalicznej, w której generowane są plazmony, prowadzi do zwiększenia prawdopodobieństwa wzbudzenia emitera [94, 100]. Na rysunku 1.9 symbolicznie oznaczono to niebieską strzałką, której szerokość jest większa niż szerokość odpowiadającej jej strzałce z rysunku 1.8.



RYСУNEK 1.9: Wpływ obecności nanostruktury metalicznej na wydajności (A) wzbudzenia, (B) luminescencji, (C) zbierania fotonów emitowanych przez fluorofor. Oznaczenia: szeroka, niebieska strzałka – promieniowanie wzbudające emiter, szare strzałki – promieniowanie emitowane przez fluorofor, czerwone linie – zakres kąta bryłowego, z którego mierzona jest luminescencja fluoroforu, pomarańczowa strzałka – wzbudzenie fluoroforu z wydajnością γ_{ex} lub γ_{ex} , ciągła, zielona strzałka - przejście promieniste z wydajnością γ_r^0 , przerywana, zielona strzałka – przejście bezpromieniste z wydajnością γ_{nr}^0 , ciągła, fioletowa strzałka - przejście promieniste z wydajnością γ_r^p , przerywana, fioletowa strzałka – przejście bezpromieniste z wydajnością γ_{nr}^p .

Na rysunku 1.9(B) przedstawiono wpływ obecności struktury metalicznej na wydajność luminescencji emitera. Plazmony generowane w nanostrukturze metalicznej powodują pojawienie się dodatkowych kanałów przejść promienistych (γ_r^p) i bezpromienistych (γ_{nr}^p). Na rysunku 1.9(B) przedstawione są one fioletowymi liniami. Wydajność kwantowa emisji fluoroforu w obecności struktury metalicznej opisana jest wzorem [94]:

$$\eta_p = \frac{\gamma_r^0 + \gamma_r^p}{\gamma_r^0 + \gamma_{nr}^0 + \gamma_r^p + \gamma_{nr}^p} = \frac{\gamma_r^0 (1 + F_r)}{\gamma_r^0 (1 + F_r) + \gamma_{nr}^0 (1 + F_{nr})} \quad (1.8)$$

Zwiększenie prawdopodobieństwa przejść radiacyjnych spowodowanych obecnością SPPs wynosi $F_r = \gamma_r^p / \gamma_r^0$, zaś zwiększenie prawdopodobieństwa przejść bezpromienistych $F_{nr} = \gamma_{nr}^p / \gamma_{nr}^0$. Zwiększenie prawdopodobieństwa przejść promienistych lub bezpromienistych emitera zależy od tego, jak silnie struktura metaliczna odpowiednio rozprasza i absorbuje promieniowanie emitowane przez fluorofor [100]. W zależności od wartości F_{nr} oraz F_r wydajność kwantowa fluoroforu η_p jest zwiększana lub osłabiana. W przypadku, gdy wartość F_{nr} jest większa niż wartość F_r obserwuje się zmniejszenie wydajności kwantowej emitera ($\eta_p < \eta_0$). Natomiast w przypadku, gdy wartość F_{nr} jest mniejsza

niż wartość F_r obserwuje się zwiększenie wydajności kwantowej emitera ($\eta_p > \eta_0$). Warto podkreślić, że zwiększenie wydajności kwantowej emitera pod wpływem obecności struktury metalicznej jest tym większe im mniejsza jest wydajność kwantowa emitera η_0 [94].

Znajomość wzrostu prawdopodobieństwa przejść promienistych i bezpromienistych spowodowanych generowanymi w strukturze metalicznej SPPs dla emitera o znanej wydajności kwantowej pozwala wyznaczyć wzmocnienie wydajności kwantowej dla tego emitera.

Dla przykładu dla emitera o wydajności kwantowej 5%, gdy wartość F_r wynosi 10, a F_{nr} wynosi 1 wydajność kwantowa emisji wzrasta około 4.5 raza. Dodatkowo, gdy znane są także prawdopodobieństwa przejścia promienistego (γ_r^0) i bezpromienistego γ_{nr}^0 dla samego emitera możliwe jest określenie, jak obecność struktury metalicznej wpływa na czasy zaniku luminescencji tego emitera. Dla rozważanego wyżej przypadku, gdy $\gamma_r^0 = 1$ i $\gamma_{nr}^0 = 19$ zmianę czasu zaniku luminescencji emitera pod wpływem obecności struktury metalicznej można wyznaczyć ze wzoru:

$$\frac{\tau_0}{\tau_p} = 1 + \frac{\gamma_r^0 F_r + \gamma_{nr}^0 F_{nr}}{\gamma_r^0 + \gamma_{nr}^0} \quad (1.9)$$

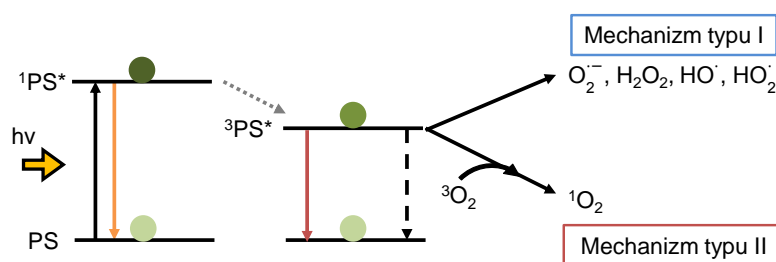
Dla rozważanego wyżej przypadku czas zaniku luminescencji emitera znajdującego się blisko nanostruktury metalicznej skraca się około 2.5 raza.

Na rysunku 1.9(C) przedstawiono wpływ zmiany wydajności zbierania fotonów emitowanych przez próbkę. Zwiększenie wydajności zbierania fotonów ϵ_p przez układ możliwe jest do zaobserwowania jedynie, gdy pojawienie się struktury metalicznej spowoduje emisję ukierunkowaną w stronę detektora [102].

1.6 Terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem nanocząstek up-konwertujących

Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*, PDT) jest jednym z rodzajów terapii przeciwnowotworowej, nad którą prowadzone są liczne badania kliniczne [103–106]. W odróżnieniu od powszechnie stosowanych terapii przeciwnowotworowych, takich jak chemioterapia, radioterapia czy leczenie chirurgiczne, jest to metoda stosunkowo niedroga, mało inwazyjna i nie posiadająca wielu skutków ubocznych [107].

Terapia fotodynamiczna bazuje na wykorzystaniu trzech czynników – tlenu cząsteczkowego, promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym lub ultrafioletowym oraz barwnika organicznego tzw. fotouczulacza (ang. *photosensitizer*, PS). W kontekście zastosowania w terapii fotodynamicznej fotouczulacz definiuje się jako cząsteczkę, która znajdując się w stanie wzbudzonym może powodować powstawanie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Wymienione czynniki występując niezależnie nie są szkodliwe dla komórek. Aczkolwiek jednocześnie ich wystąpienie może wywołać efekt terapeutyczny tzn. doprowadzić do zniszczenia komórek. W obecności tlenu wzbudzenie fotouczulacza powoduje bowiem powstawanie ROS, których nadmiarowa liczba w komórce powoduje jej niszczenie. Mechanizmy generowania ROS w wyniku wzbudzenia fotouczulacza przedstawiono schematycznie na rysunku 1.10.



RYSUNEK 1.10: Schemat procesu generowania ROS. Absorpcja fotonu wzbudzającego powoduje przejście PS ze stanu podstawowego do singletowego stanu wzbudzonego ($^1PS^*$), a następnie do trypletowego stanu wzbudzonego ($^3PS^*$). Znajdując się w tym stanie wzbudzonym fotouczulacz może przekazać swoją energię cząsteczce tlenu. Oznaczenia: Czarna strzałka – absorpcja fotonu wzbudzającego, pomarańczowa strzałka – fluorescencja, przerywana szara strzałka – przejście między systemowe, czerwona strzałka – fosforescencja, czarna przerywana strzałka – przejście do stanu podstawowego w wyniku procesu wygenerowania ROS. Rysunek opracowano na podstawie [108].

Absorpcja fotonu przez cząsteczkę PS znajdującą się w stanie podstawowym powoduje jego wzbudzenie do singletowego stanu wzbudzonego oznaczonego na rysunku 1.10 jako $^1PS^*$. Wzbudzony do stanu $^1PS^*$ fotouczulacz, zgodnie z opisywanym wcześniej diagramem Jabłońskiego (rysunek 1.1), może powrócić do stanu podstawowego z jednoczesną emisją fotonu lub w wyniku przejścia międzysystemowego przejść do trypletowego stanu wzbudzonego. Stan ten oznaczono na rysunku 1.10 jako $^3PS^*$. Fotouczulacz znajdujący się w stanie $^3PS^*$ może wyemitować foton w wyniku fosforescencji lub reagować z innymi otaczającymi go cząsteczkami. W wyniku takiego oddziaływania mogą powstawać reaktywne formy tlenu. Wyróżnia się dwa typy mechanizmów generowania ROS [41, 109–111]. Mechanizm typu I polega na reakcji fotouczulacza z cząsteczkami organicznymi w komórce poprzez transfer protonu lub elektronu i wytworzenie rodników. Powstałe rodniki reagując z tlenem cząsteczkowym powodują powstanie reaktywnych form tlenu takich jak nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (HO^{\cdot}) oraz rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\cdot}) [41, 111]. Mechanizm typu II polega na przekazaniu energii ze wzbudzonego fotouczulacza do cząsteczki tlenu

w stanie podstawowym (w przypadku tlenu jest to stan trypletowy – $^3\text{O}_2$). Powoduje to powstanie silnie reaktywnej cząsteczki tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$). Energia potrzebna do wzbudzenia jednej cząsteczki tlenu w stanie trypletowym do stanu singletowego wynosi około $7\,883\text{ cm}^{-1}$ [111].

Większość fotouczulaczy posiada zdolność generowania ROS według mechanizmu typu II. Jednakże często powstawanie reaktywnych form tlenu w komórce zachodzi w wyniku występowania obu rodzajów mechanizmów. Wydajność danego typu mechanizmu generowania ROS zależy od rodzaju zastosowanego fotouczulacza, zawartości tlenu cząsteczkowego w komórce oraz obecności cząsteczek biologicznych, z którymi wzbudzony fotouczulacz mógłby reagować [42, 112].

1.6.1 Fotouczulacze w terapii fotodynamicznej

Aby barwnik organiczny mógł być zastosowany w badaniach klinicznych jako fotouczulacz musi spełniać następujące warunki: być stabilny chemicznie, nie zawierać innych związków chemicznych powstających w procesie jego syntezy, metoda jego produkcji powinna być łatwa i niedroga. Ze względu na aspekty medyczne i biologiczne, fotouczulacz powinien mieć niską cytotoksyczność przy braku ekspozycji na światło, efektywnie generować ROS, mieć wysoki molowy współczynnik absorpcji, kumulować się w komórkach nowotworowych, być szybko usuwany ze zdrowych komórek, a także rozpuszczać się w wodzie [42, 109, 110].

Do badań przedstawionych w niniejszej pracy jako fotouczulacz wykorzystano Róż Bengalski (RB). W przypadku RB efektywność produkowania tlenu singletowego wynosi 76%. Sprawia to, że wśród fotouczulaczy o właściwościach hydrofilowych charakteryzuje się on jedną z najwyższych wydajności [113, 114]. W wyniku wzbudzenia RB, oprócz tlenu singletowego, produkowany jest także anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-). Wydajność generowania O_2^- przez RB jest jednak dużo mniejsza niż wydajność produkcji tlenu singletowego i wynosi 20% [115]. Niewątpliwą zaletą wykorzystania RB w terapii fotodynamicznej jest fakt, że RB jest związkiem testowanym klinicznie i powszechnie stosowanym, np. w okulistyce w celu detekcji uszkodzeń rogówki oraz spojówki. Przeprowadzono także badania kliniczne nad zastosowaniem RB w leczeniu czerniaka [103–105, 116].

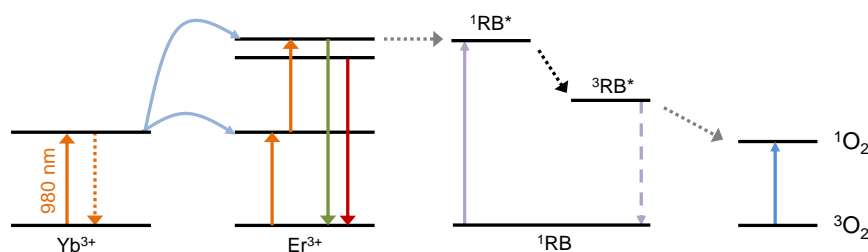
1.6.2 Poprawienie wydajności terapii fotodynamicznej

Mimo wymienionych na początku tego rozdziału zalet terapii fotodynamicznej, ten rodzaj leczenia ma również wady. Wśród głównych wad terapii fotodynamicznej należy wymienić, np.: niekontrolowaną biodystrybucję PS w organizmie wynikającą z braku

selektywnego przyłączania się fotouczulaczy do komórek nowotworowych czy trudności w zastosowaniu terapii w przypadku dużych guzów oraz zmian położonych w głębszych warstwach organizmu, wynikające z silnego absorbowania przez tkanki promieniowania UV/VIS wzbudzającego fotouczulacz [42]. Obecnie prowadzone są badania, których zadaniem jest eliminacja wymienionych wad. W celu rozwiązania pierwszego problemu do fotouczulaczy przyłączane są przeciwciała, które poprawiają selektywność terapii poprzez specyficzne łączenie się z komórkami nowotworowymi [117–119]. W celu rozwiązania problemu drugiego prowadzone są prace nad zwiększeniem głębokości penetracji promieniowania wzbudzającego stosując w tym celu promieniowanie w zakresie podczerwonym [78, 120–122]. Takie badania wykonano także w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Wykorzystanie wzbudzenia za pomocą promieniowania podczerwonego otrzymuje się dzięki wykorzystaniu nanocząstek up-konwertujących, do których powierzchni przyłącza się następnie cząsteczki fotouczulacza. Nanocząstki z przyłączonym fotouczulaczem w dalszej części oznaczono skrótowo jako UCNP-PS. Zadaniem nanocząstki jest absorpcja promieniowania podczerwonego, zaś zadaniem fotouczulacza produkcja ROS. W celu ich wygenerowania, przez wytworzoną nanostrukturę UCNP-PS, z wzbudzonej w wyniku absorpcji fotonów podczerwonych nanocząstki musi wystąpić przekaz energii do cząsteczki fotouczulacza [107, 123–126].

Przykładem struktury, w której przekaz energii wydajnie następuje są nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ oraz Róż Bengalski, które opisano odpowiednio w podrozdziałach 1.4 oraz 1.6.1. Absorpcja RB występuje w zakresie od 450 do 600 nm z maksimum przypadającym na około 550 nm. Nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ emitują w zielonym zakresie spektralnym fotony o długościach fal od 510 do 560 nm. Przekrycie widm absorpcji RB i emisji UCNPs umożliwia, zgodnie z opisem w podrozdziale 1.2, wystąpienie transferu energii z nanocząstki do fotouczulacza. Mechanizm generowania ROS przez układ nanocząstka $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ oraz RB przedstawiono na rysunku 1.11.

Jak przedstawiono na rysunku 1.11 oraz wcześniej na rysunku 1.5(A) dwukrotna absorpcja fotonu podczerwonego przez jon Yb^{3+} i dwukrotny transfer energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} powoduje wzbudzenie jonu Er^{3+} do stanu $^2H_{11/2}$ oraz $^4S_{3/2}$. Następnie jon Er^{3+} może powrócić do stanu podstawowego emitując przy tym foton w zielonym zakresie spektralnym lub przekazać energię do sąsiadującej cząsteczki RB. Na skutek przekazu energii cząsteczka RB ze stanu podstawowego ^1RB zostaje wzbudzona do stanu singletowego $^1\text{RB}^*$. Następnie w wyniku przejścia międzysystemowego przechodzi ona do stanu trypletowego $^3\text{RB}^*$. Znajdująca się w stanie trypletowym cząsteczka może przekazać swoją energię cząsteczce tlenu w stanie podstawowym. W konsekwencji cząsteczka RB powraca do stanu podstawowego, natomiast cząsteczka tlenu przechodzi na wzbudzony stan singletowy ($^1\text{O}_2$) [108].



RYSUNEK 1.11: Schemat procesu wytwarzania tlenu singletowego przez cząsteczki RB przyłączone do powierzchni UCNPs. Oznaczenia: absorpcja fotonu podczerwonego – strzałki pomarańczowe, rekombinacja promienista – zielona i czerwona strzałka, transfer energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} – strzałki jasnoniebieskie, transfer energii z nanocząstki do RB oraz z RB na cząsteczkę tlenu – strzałki szare, przejście międzysystemowe we wzbudzonej cząsteczce RB – strzałka czarna, wzbudzenie cząsteczki tlenu singletowego ze stanu $^3\text{O}_2$ do stanu $^1\text{O}_2$ – strzałka niebieska, wzbudzenie cząsteczki RB – strzałka fioletowa, deekscytacja RB – przerywana strzałka fioletowa. Rysunek opracowano na podstawie [108, 111].

1.6.3 Wpływ obecności ROS na funkcjonowanie komórek

Jak opisano na początku podrozdziału 1.6, efekt terapeutyczny w terapii fotodynamicznej polega na generowaniu toksycznych dla komórek ROS. Komórki funkcjonujące w normalnych warunkach przeprowadzają procesy biochemiczne, których produktami ubocznymi mogą być różne formy ROS. Z tego względu komórki posiadają mechanizmy umożliwiające ich neutralizację. W prawidłowo metabolizującej komórce zachowana jest równowaga między powstającymi i neutralizowanymi ROS. W komórce poddanej działaniu terapii fotodynamicznej produkowana jest tak duża liczba ROS, że równowaga ta zostaje zaburzona: mechanizmy obronne komórki nie są w stanie neutralizować nadmiarowej ilości ROS [111, 127]. Obecność ROS powoduje utlenianie lipidów, białek, uszkodzenia DNA, które w konsekwencji prowadzą do zniszczenia komórki [41, 42].

Komórki nowotworowe charakteryzują się dużym zapotrzebowaniem energetycznym. Intensywny wzrost wielkości zmiany nowotworowej wymaga zwiększonego dopływu substancji odżywczych oraz tlenu co możliwe jest jedynie poprzez szybkie stworzenie dużej sieci naczyń krwionośnych. Jednakże powstające naczynia mają słabe, często nieszczelne ścianki. Obecność ROS może dodatkowo zaburzać procesy angiogenezy (tworzenia naczyń krwionośnych) w zmianach nowotworowych [128]. W konsekwencji zaburza to funkcjonowanie komórek nowotworowych prowadząc do ich niedożywienia oraz niedotlenienia [41].

Niszczenie komórek nowotworowych poprzez produkcję ROS może odbywać się także poprzez stymulację układu odpornościowego. Wzmocniona produkcja ROS powoduje wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej poprzez zwiększenie produkcji m.in. neutrofilów i makrofagów. W wyniku przeprowadzanej przez makrofagi fagocytozy, białka zawarte w komórkach nowotworowych są prezentowane limfocytom T. Odpowiadają one

za wytworzenie reakcji odpornościowej organizmu, dzięki czemu możliwe jest niszczenie komórek nowotworowych. Dzięki wytworzeniu komórkowej odpowiedzi immunologicznej (poprzez utworzenie limfocytów T), ponowne pojawienie się nowych komórek nowotworowych tego samego rodzaju spowoduje natychmiastową reakcję układu odpornościowego [41, 42, 129].

Rozdział 2

Metody eksperymentalne

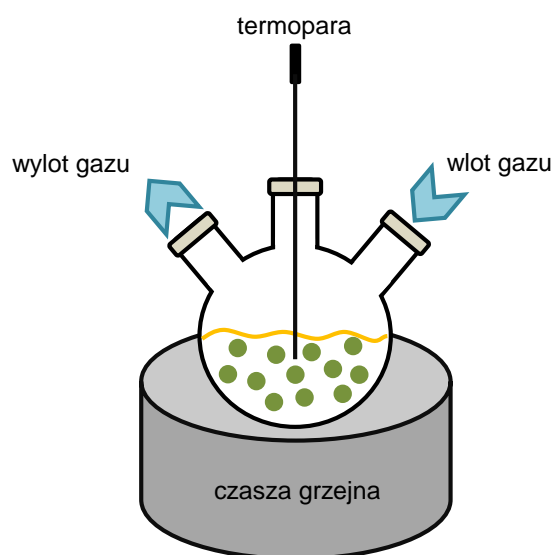
W niniejszym rozdziale przedstawiono procedury otrzymywania nanocząstek up-konwertujących wytwarzanych na potrzeby badań wykonywanych w ramach niniejszej pracy. Opisano sposób przygotowywania nanostruktur hybrydowych złożonych z nanocząstek i srebrnych drutów wykorzystywanych do badań plazmonicznych oraz opisano wszystkie etapy przygotowania nanocząstek do zastosowań w terapii fotodynamicznej. W dalszej części rozdziału przedstawiono metody charakteryzacji strukturalnej wytworzonych materiałów. Następnie przedstawiono opisy układów doświadczalnych zbudowanych na potrzeby przeprowadzenia badań optycznych. W ostatniej części tego rozdziału przedstawiono procedury przeprowadzania testów cytotoksyczności, testów określających skuteczność terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem UCNPs oraz przygotowywania preparatów do mikroskopii konfokalnej.

2.1 Procedura otrzymywania heksagonalnych UCNPs

Jak wspomniano w rozdziale 1.3.1 nanocząstki up-konwertujące $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ mogą krystalizować w jednej z dwóch struktur krystalograficznych – kubicznej (α) oraz heksagonalnej (β). W przypadku nanocząstek heksagonalnych obserwuje się większą wydajność procesu UC niż dla nanocząstek kubicznych [63]. Z tego względu do większości badań zaprezentowanych w niniejszej pracy wykorzystano nanocząstki o strukturze heksagonalnej. Dodatkowo, jak wykazano w pracach [80, 81] i opisano w podrozdziale 1.4, optymalne stężenie jonów Yb^{3+} i Er^{3+} , przy których proces UC zachodzi z największą wydajnością, zawiera się w zakresie 17%-20% w przypadku jonów Yb^{3+} oraz 2%-3% w przypadku jonów Er^{3+} . Z tego względu do doświadczeń wykonanych w tej pracy wykorzystano nanocząstki zawierające w matrycy 20% jonów Yb^{3+} oraz 2% jonów Er^{3+} .

Proces syntezy nanocząstek składał się z dwóch niezależnych etapów. W pierwszym etapie przygotowano prekursory do syntezy – sole trifluorooctowe jonów ziem rzadkich. Prekursory Y, Yb oraz Er wykonano na podstawie pracy [130], w której opisano procedury otrzymywania prekursorów zawierających Ln oraz Nd. Aby otrzymać prekursor Y, Yb lub Er odważono odpowiednio 0.9 g tlenku itru (99.99%, Sigma-Aldrich) lub 1.58 g tlenku iterbu (99.9%, Sigma-Aldrich) lub 1.53 g tlenku erbu (99.9%, Sigma-Aldrich). Następnie odpowiedni tlenek dodano do 20 ml 50% wodnego roztworu kwasu trifluoroctowego (CF_3COOH , 99%, Sigma-Aldrich). Roztwór ogrzano do temperatury wrzenia (około 73°C) i pozostawiono mieszając do momentu zredukowania objętości roztworu o około 70%. Następnie roztwór przefiltrowano na gorąco i umieszczono w kolbie stożkowej. Roztwór ponownie ogrzano do temperatury wrzenia w celu zredukowania objętości do około 10%. Pozostałą część roztworu przelano na szklaną szalkę Petriego, którą naprzemiennie ogrzewano i ochładzano, aż do momentu całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Otrzymany prekursor w postaci proszku przeniesiono do szklanego naczynka i pozostawiono w temperaturze 140°C do całkowitego osuszenia.

W drugim etapie syntezę wykonano w oparciu o procedurę otrzymywania nanocząstek heksagonalnych metodą dysocjacji termicznej opisaną w [131]. Schemat układu wykorzystywanego do syntezy nanocząstek przedstawiono na rysunku 2.1.



RYSUNEK 2.1: Schemat układu do syntezy nanocząstek. Kolba trój szyjkowa umieszczona jest w czaszy grzejnej podłączonej do kontrolera temperatury. Do jednej szyjki podłączono kranik laboratoryjny umożliwiający wlot argonu. Do drugiej szyjki, położonej naprzeciwko szyjki wlotowej, podłączono kranik laboratoryjny umożliwiający wylot argonu. Środkową szyjkę szczelnie zamknięto gumowym korkiem, przez który wprowadzono termoparę monitorującą temperaturę mieszaniny reakcyjnej.

W kolbie trój szyjnej o objętości 50 ml umieszczono 0.34 g trifluorooctanu sodu (NaCF_3COO , >95%, Acros Organics) oraz, wykonane według opisanej wyżej procedury, prekursorzy – 0.33 g trifluorooctanu itru ($\text{Y}(\text{CF}_3\text{COO})_3$), 0.1 g trifluorooctanu iterbu ($\text{Yb}(\text{CF}_3\text{COO})_3$) oraz 0.01 g trifluorooctanu erbu ($\text{Er}(\text{CF}_3\text{COO})_3$). Następnie do kolby dodano 6.35 ml kwasu oleinowego (99%, Sigma-Aldrich) oraz 6.39 ml 1-oktadekenu (90%, Sigma-Aldrich). Warunki, w których przeprowadzana jest synteza, wpływają na strukturę otrzymanego produktu. W celu uzyskania nanocząstek heksagonalnych synteza musi zachodzić w atmosferze beztlenowej. W tym celu kolbę trój szyjną umieszczono w układzie umożliwiającym przepływ gazu obojętnego. Do zapewnienia atmosfery beztlenowej wykorzystano argon o czystości 5N, którego gęstość jest większa niż gęstość powietrza, dzięki czemu powietrze jest skutecznie usuwane z kolby. Proces usuwania powietrza przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Obecność wody w roztworze, podobnie jak obecność tlenu, wpływa na strukturę otrzymywanych nanocząstek. W celu usunięcia cząsteczek wody znajdujących się w roztworze temperaturę roztworu podniesiono do 120°C. Proces usuwania wody z roztworu przeprowadzano przez 60 min. Po upływie tego czasu temperaturę roztworu zwiększono do 330°C. W tej temperaturze następuje nukleacja nanocząstek i wzrost ich rozmiaru.

W celu uzyskania nanocząstek o średnicy 20-30 nm roztwór pozostawiono w wyżej opisanych warunkach przez 30 min. Następnie, zawartość kolby pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej. Uzyskany materiał poddano procesowi oczyszczania. W tym celu nanocząstki wytrącono etanolem (99.8%, Chempur) i odwirowano z prędkością 6000 obr/min w temperaturze 10-15°C przez 10 min. Otrzymany pellet zawieszono w cykloheksanie (bezwodny, 99.5%, Chempur), po czym wytrącono za pomocą etanolu. Proces oczyszczania UCNPs przeprowadzono kilkakrotnie monitorując, za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, ilość zanieczyszczeń organicznych pozostałych w próbce.

2.2 Procedura otrzymywania nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs

2.2.1 Przygotowanie srebrnych nanodrutów AgNWs

Srebrne nanodruty wykorzystywane do wytworzenia nanostruktur hybrydowych zostały wykonane na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przez mgr inż. Karolinę Sulowską. Nanodruty otrzymano zmodyfikowaną metodą polioliową, która polega na redukcji azotanu srebra AgNO_3 za pomocą glikolu etylenowego w obecności prekursora $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [132]. Otrzymane

w wyniku syntezy nanodrutu posiadają na powierzchni warstwę poliwinylpyrrolidonu (ang. *polyvinylpyrrolidone*, PVP).

Otrzymane w wyniku syntezy AgNWs zawieszono w wodzie. W celu usunięcia pozostałości po syntezie oraz odłamków drutów roztwór odwirowano (20 min, 10-15°C, 3800 obr/min). Następnie zawiesinę AgNWs rozcieńczono tak, aby maksimum absorpcji przy długości fali 405 nm wynosiło około 0.8. Stężenie tak przygotowanej zawiesiny AgNWs wynosi około 0.36 mg/ml. Sprawdzono, że nałożenie na podłoże nanodrutów w takim stężeniu umożliwia wykonanie pomiarów optycznych dla pojedynczych AgNW.

2.2.2 Procedura usuwania kwasu oleinowego z powierzchni UCNPs

Nanocząstki otrzymane w wyniku syntezy opisanej w podrozdziale 2.1 posiadają na swojej powierzchni cienką warstwę oleinianu. Warstwa ta ogranicza agregację nanocząstek zawieszonych w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak cykloheksan, jednakże uniemożliwia zawieszenie nanocząstek w wodzie, będącej rozpuszczalnikiem polarnym. Jako, że AgNWs zawieszono w wodzie, w celu wytworzenia nanostruktury hybrydowej, konieczne jest przeniesienie nanocząstek z cykloheksanu do wody. Jest to możliwe poprzez usunięcie oleinianu z powierzchni nanocząstek. Procedurę oczyszczania nanocząstek z cząsteczek oleinianu zaadaptowano z procedur opisanych w [133–136]. W tym celu 0.5 ml UCNPs zawieszonych w cykloheksanie wytrącono za pomocą 0.5 ml etanolu, a następnie odwirowano (10 min, 10-15°C, 6000 obr/min). Do nanocząstek dodano 2 ml kwasu solnego (HCl, 35-37%, Chempur) o stężeniu 0.1 M i sonikowano przez 60 min do otrzymania jednorodnie wyglądającej zawiesiny. W obecności HCl oleinian ulega uprotowaniu, co powoduje jego odczepienie od powierzchni nanocząstki w wyniku powstania cząsteczki kwasu oleinowego [136]. Rozsonikowane nanocząstki odwirowano (20 min, 10-15°C, 16.5 tys. obr/min). W kolejnym kroku do odwirowanych nanocząstek dodano 1 ml roztworu HCl w etanolu o pH=4. Mieszaninę sonikowano przez 20 min, po czym odwirowano (20 min, 10-15°C, 16.5 tys. obr/min). Proces powtórzono dwukrotnie, co umożliwiło usunięcie pozostałości oleinianu z powierzchni nanocząstek. Następnie nanocząstki trzykrotnie umyto etanolem i trzykrotnie wodą, po czym zawieszono w wodzie.

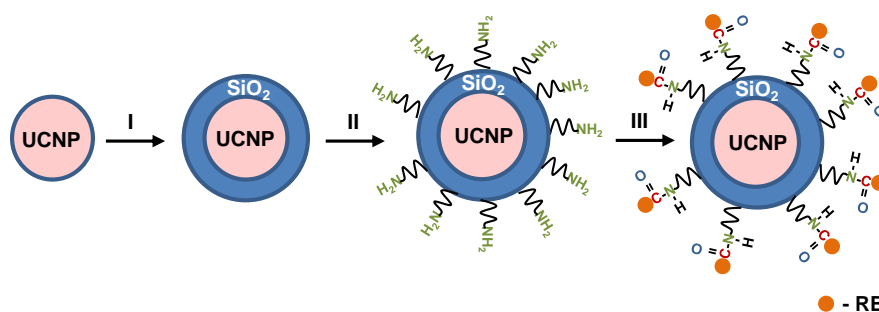
2.2.3 Przygotowanie nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs

W celu przygotowania nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs w probówce Eppendorfa umieszczono 1.5 ml roztworu drutów o stężeniu 0.36 mg/ml w wodzie oraz 40 μ l roztworu nanocząstek o stężeniu 3.12 mg/ml w wodzie. Powstały roztwór energicznie wymieszano, a następnie w celu wykonania pomiarów przeniesiono do kuwety

spektrofotometrycznej lub naniesiono na podłoże w sposób kroplowy lub wykorzystując technikę powlekania obrotowego.

2.3 Procedury przygotowywania UCNPs do badań wydajności terapii fotodynamicznej

Przeprowadzenie badań nad wykorzystaniem UCNPs w PDT wymaga wieloetapowego procesu przygotowania nanocząstek. Pierwszym z nich jest synteza nanocząstek β -NaYF₄:20%Yb,2%Er. Jednakże bezpośrednio po syntezie otrzymane nanocząstki nie posiadają zdolności generowania ROS. Aby nanocząstki mogły zostać zastosowane w PDT ich powierzchnia musi zostać zmodyfikowana tak, aby możliwe było przyłączenie do niej cząsteczek fotouczulacza. Kolejne etapy przygotowania UCNPs do zastosowań terapeutycznych przedstawiono na rysunku 2.2. W pierwszym etapie powierzchnię nanocząstek pokrywa się cienką warstwą tlenku krzemu. Wynikiem tego procesu jest powstanie nanostruktury typu rdzeń-powłoka, która w dalszej części pracy oznaczona będzie jako UCNPs@SiO₂. Aby do przygotowanych UCNPs@SiO₂ możliwe było przyłączenie fotouczulacza w kolejnym etapie do warstwy SiO₂ dołączane są aminowe grupy funkcyjne. Sfunkcjonalizowane grupą aminową nanocząstki w dalszej części pracy oznaczone będą skrótem UCNPs@SiO₂-NH₂. W trzecim kroku do sfunkcjonalizowanych nanocząstek przyłączono cząsteczki RB poprzez wytworzenie wiązania amidowego między grupą aminową sfunkcjonalizowanej nanocząstki a grupą karboksylową RB. Dzięki wytworzonemu wiązaniu nanocząstka kowalencyjnie łączy się z cząsteczkami RB. W dalszej części pracy UCNPs z przyłączonymi cząsteczkami RB oznaczone będą skrótem UCNPs@SiO₂-RB.



RYSUNEK 2.2: Schemat poszczególnych etapów syntezy nanocząstek UCNPs@SiO₂-RB. W kroku I wytworzona zostaje otoczka z SiO₂ na powierzchni UCNPs. W kroku II powierzchnia UCNPs@SiO₂ zostaje sfunkcjonalizowana za pomocą grup -NH₂. W kroku III następuje kowalencyjne połączenie UCNPs@SiO₂-NH₂ z cząsteczkami RB poprzez wytworzenie wiązania amidowego między grupą aminową UCNPs@SiO₂-NH₂ a grupą karboksylową RB.

2.3.1 Procedura pokrycia UCNPs za pomocą SiO₂

Pokrycie powierzchni UCNPs za pomocą SiO₂ przeprowadzono wykorzystując metodę odwróconej mikroemulsji opisaną w [107, 137]. W tym celu w kolbie trój szyjnej o objętości 50 ml umieszczono 50 ml cykloheksanu, a następnie dodano około 30 mg UCNPs oraz 2.2 ml surfaktantu Igepal CO-520 (Sigma-Aldrich). W celu rozseparowania zagregowanych nanocząstek i otoczenia powierzchni każdej nanocząstki przez cząsteczki surfaktantu kolbę umieszczono w płuczce ultradźwiękowej i sonikowano przez 10 min. Po tym czasie do mieszaniny w kolbie kroplowo dodano 0.5 ml 28% roztworu amoniaku (Sigma-Aldrich) i pozostawiono mieszając na 30 min. Dodanie amoniaku powoduje wzrost pH roztworu, czyli zmianę środowiska zachodzącej reakcji na zasadowe. Po tym czasie do mieszaniny dodano 0.4 ml tetraetoksylanu (TEOS, 98%, Sigma-Aldrich), który w warunkach zasadowych ulega hydrolizie, a następnie polimeryzuje na powierzchni nanocząstek, tworząc na nich warstwę SiO₂. Proces polimeryzacji TEOSu zachodził w temperaturze pokojowej przez 24h. Po tym czasie otrzymane UCNPs@SiO₂ poddano procesowi oczyszczania. W tym celu nanocząstki odwirowano (30 min, 10-15°C, 6000 obr/min), a następnie zawieszono w roztworze woda:etanol (1:1). Czynność powtórzono kilkakrotnie, w celu całkowitego usunięcia nieprzereagowanych substratów reakcji i oczyszczenia powierzchni nanocząstek. Po oczyszczeniu materiał zawieszono w 20 ml izopropanolu (Avantor Performance Materials Poland S.A.).

2.3.2 Procedura funkcjonalizowania nanocząstek UCNPs@SiO₂ grupą aminową

Procedurę funkcjonalizacji UCNPs@SiO₂ za pomocą grup aminowych -NH₂ opracowano bazując na podstawie pracy [138], w której funkcjonalizację wykonano dla nanocząstek SiO₂. W procesie funkcjonalizacji wykorzystano około 10 mg UCNPs@SiO₂, przygotowanych według procedury opisanej w rozdziale 2.3.1, które następnie zawieszono w 20 ml izopropanolu i umieszczono w kolbie trój szyjnej o objętości 50 ml. W celu rozseparowania zagregowanych nanocząstek umieszczono je w płuczce ultradźwiękowej na 30 min. Następnie w celu uzyskania zasadowego pH roztworu do mieszaniny dodano 1 ml amoniaku 28% i mieszano przez 20 min. Po upływie tego czasu do mieszaniny dodano 10 μ l 3-aminopropylotrietoksylanu (APTS, \geq 98%, Sigma-Aldrich) i mieszano przez kolejne 3 godziny. Analogicznie, jak w przypadku TEOSu, APTS w warunkach zasadowych hydrolizuje, a następnie polimeryzuje na powierzchni UCNPs@SiO₂. W konsekwencji na powierzchni UCNPs@SiO₂ powstaje dodatkowa warstwa tlenku krzemu zakończona grupami -NH₂. Otrzymane UCNPs@SiO₂-NH₂ wytrącono etanolem i odwirowano (30 min, 10-15°C, 6000 obr/min). Materiał poddano procesowi oczyszczania poprzez kilkakrotne

odwirowanie nanocząstek zawieszonych w roztworze woda:aceton (1:1), po czym zawieszono w wodzie. W wyniku syntezy otrzymano około 12 mg UCNPs@SiO₂-NH₂, które wykorzystano następnie w procesie przyłączania RB.

2.3.3 Procedura przyłączania RB do powierzchni nanocząstek

Procedurę przyłączania cząsteczek RB do powierzchni UCNPs@SiO₂ zaadaptowano z pracy [138]. Proces przyłączania cząsteczek RB do powierzchni sfunkcjonalizowanych UCNPs@SiO₂-NH₂ należy przeprowadzać w środowisku kwaśnym o pH=6. W celu zapewnienia takiego środowiska do przeprowadzenia syntezy przygotowano 0.1 M bufor MES, który przygotowano poprzez rozpuszczenie 4.881 g kwasu 2-(N-morfolino) etanosulfonowego (MES, Bioperformance, ≥99.5%, Sigma-Aldrich) w 250 ml wody. Następnie przy użyciu pH-metru zmierzono odczyn otrzymanego buforu. W zależności od uzyskanej wartości pH przygotowanego buforu MES za pomocą 0.1 M roztworu HCl lub NaOH doprowadzono go do pH=6.

Przygotowane wcześniej UCNPs@SiO₂-NH₂ odwirowano (30 min, 10-15°C, 6000 obr/min), dwukrotnie przepłukano 1 ml buforu MES (pH=6.0, 0.1 M) i zawieszono w 2 ml buforu MES.

W kolbie o objętości 50 ml umieszczono 3 ml buforu MES i dodano 5 mg chlorowodoru N-(3-Dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu (EDC, Sigma-Aldrich) oraz 1 μmol RB (95%, Sigma-Aldrich). Użyty do reakcji EDC katalizuje proces wytwarzania wiązania amidowego między RB a UCNPs@SiO₂-NH₂ poprzez aktywację grup karboksylowych RB. Roztwór mieszało 60 min, po czym dodano UCNPs@SiO₂-NH₂ zawieszony wcześniej w 2 ml buforu MES. Mieszaninę pozostawiono, mieszając, na 3 h w temperaturze pokojowej. Następnie w celu pozbycia się nieprzyłączonych cząsteczek RB otrzymany roztwór UCNPs@SiO₂-RB oczyszczono poprzez kilkukrotne odwirowanie (30 min, 10-15°C, 6000 obr/min), aż do otrzymania bezbarwnego supernatantu. Po odwirowaniu nanocząstki zawieszono w roztworze woda:etanol (1:1). Następnie UCNPs@SiO₂-RB poddano dializie. W tym celu UCNPs@SiO₂-RB umieszczono w półprzepuszczalnym woreczku dializacyjnym, który przepuszcza cząsteczki wody oraz cząsteczki nieprzyłączonego RB, a uniemożliwia przedostanie się UCNPs@SiO₂-RB poza woreczek. Woreczek dializacyjny zawierający UCNPs@SiO₂-RB umieszczono w zlewce zawierającej 500 ml wody destylowanej i dializowano przez 72 h. Oczyszczone za pomocą dializy UCNPs@SiO₂-RB zawieszono w wodzie destylowanej.

2.4 Metody charakteryzacji strukturalnej nanomateriałów wykorzystywanych w pracy

2.4.1 Skaningowa Mikroskopia Elektronowa

Analizę morfologii i rozmiaru UCNPs przeprowadzono wykorzystując obrazowanie za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM). Ten rodzaj mikroskopii polega na wykorzystaniu wiązki elektronów do skanowania powierzchni badanego materiału. Wiązka elektronów pierwotnych padając na powierzchnię badanego materiału powoduje głównie emisję elektronów wtórnych, wstecznie rozproszonych oraz promieniowania rentgenowskiego. Detekcja elektronów wtórnych dostarcza informację o morfologii próbki, detekcja elektronów wstecznie rozproszonych – o liczbie atomowej, natomiast detekcja promieniowania rentgenowskiego – o składzie pierwiastkowym próbki [139].

W ramach niniejszej pracy do analizy morfologii nanomateriałów wykorzystywano dwa mikroskopy SEM. Jeden firmy Zeiss model Auriga Neon 40, zaś drugi firmy Hitachi SU-70. W celu zobrazowania badanych nanomateriałów próbkę nanoszono na oczyszczone podłoże krzemowe, które następnie umieszczano na dopasowanym do mikroskopu uchwycie. Zdjęcia otrzymane za pomocą SEM umożliwiły określenie morfologii oraz rozmiarów nanomateriałów wykorzystywanych do badań w ramach niniejszej pracy. Dodatkowo, na etapie oczyszczania nanomateriałów wykonane zdjęcia pozwalały na sprawdzanie stopnia zanieczyszczenia próbki substancjami organicznymi. Zdjęcia zrobione za pomocą SEM zamieszczone w niniejszej pracy zostały wykonane przez dr. Tomasza Wojciechowskiego, dr Małgorzatę Szymurę oraz mgr Annę Reszkę z Instytutu Fizyki PAN.

2.4.2 Skaningowa Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa

W celu dokładnej analizy składu pierwiastkowego nanomateriałów wykorzystano skaningową transmisyjną mikroskopię elektronową (ang. *Scanning Transmission Electron Microscopy*, STEM). Zasada działania STEM bazuje na takim samym oddziaływaniu próbki z wiązką elektronów jak w mikroskopie SEM, jednakże rejestrowane są elektrony przechodzące przez próbkę [140].

W ramach niniejszej pracy analizę rozmieszczenia pierwiastków zawartych w badanych nanomateriałach wykonano przy użyciu wysokorozdzielczego skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego TALOS F200X (200 kV) umożliwiającego spektroskopię rentgenowską z dyspersją energii (ang. *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, EDS). W celu zobrazowania badanych nanomateriałów próbkę nanoszono na siatkę

miedzianą. Zdjęcia otrzymane za pomocą STEM zostały wykonane przez dr. Kamila Sobczaka z Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego.

2.4.3 Dyfraktometria rentgenowska

W celu określenia struktury krystalograficznej badanych nanocząstek wykonano pomiary proszkowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. W zależności od rodzaju struktury krystalicznej próbki dyfrakcja fali padającej występuje przy różnych kątach. Pomiary intensywności fali ugiętej od próbki w funkcji kąta pozwalają przyporządkować próbkę do określonego układu krystalograficznego [141].

W ramach niniejszej pracy pomiary dyfrakcji rentgenowskiej przeprowadzono za pomocą dyfraktometru Philips X'Pert Pro Alpha1 MPD (Panalytical) w zakresie kątów 2θ od 15° do 140° . Pomiary dyfrakcji rentgenowskiej zostały wykonane przez dr. Romana Minikayeva z Instytutu Fizyki PAN.

2.4.4 Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) umożliwia detekcję wiązań występujących w próbce. Pozwala to na określenie czy między dwiema molekułami zostało wytworzone wiązanie. Spektroskopia w podczerwieni wykorzystuje właściwość zmiany energii oscylacyjnej atomów w cząsteczce na skutek absorpcji promieniowania podczerwonego. Grupy funkcyjne w cząsteczce drgają w charakterystyczny sposób, dzięki czemu absorbują promieniowanie jedynie o określonej częstotliwości [142]. Otrzymane w wyniku pomiarów absorpcji promieniowania podczerwonego widmo FTIR umożliwia określenie wiązań występujących w badanym materiale.

W niniejszej pracy do wykonania pomiarów spektroskopii w podczerwieni wykorzystano spektrometr Thermo Scientific Nicolet iS5 FTIR z przystawką ATR. Próbki wykorzystywane do pomiarów FTIR mierzono w postaci proszków. Widma FTIR zostały zmierzone we współpracy z dr Dianą Kalinowską z Instytutu Fizyki PAN.

2.5 Metody badania właściwości optycznych

2.5.1 Pomiary absorpcji oraz luminescencji

Pomiary absorpcji badanych barwników oraz nanocząstek wykonano używając spektrofotometru UV-VIS Varian Cary 50. Źródło światła spektrofotometru stanowiła lampa ksenonowa, natomiast detektor – dwie diody krzemowe.

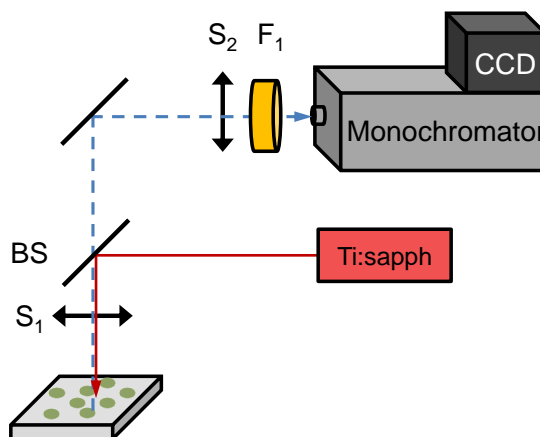
Część pomiarów luminescencji badanych nanomateriałów wykonano za pomocą spektrofluorymetru Fluorolog-3 (model FL3-11) firmy Horiba Jobin Yvon. Źródło światła w tym spektrofluorymetrze stanowiła lampa ksenonowa o mocy 450 W. Do detekcji promieniowania emitowanego przez próbkę wykorzystywano fotopowielacz R982P firmy Hamamatsu. W celu pomiarów luminescencji nanocząstek up-konwertujących do układu podłączono laser emitujący promieniowanie podczerwone o długości fali 980 nm firmy Lumics LuOcean.

Część pomiarów luminescencji wykonano za pomocą układów optycznych zbudowanych na potrzeby wykonywanych eksperymentów. Opisy poszczególnych układów przedstawiono w dalszej części rozdziału.

2.5.2 Pomiary widm wzbudzenia UCL nanocząstek

Pomiary widm wzbudzenia nanocząstek wykonano w Laboratorium Silnych Pól Magnetycznych w Tuluzie. W celu przeprowadzenia pomiarów wzbudzenia luminescencji UCNPs nakropiono na czyste podłoże krzemowe. Do pomiarów skonstruowano układ optyczny przedstawiony na rysunku 2.3, w którym źródło wzbudzenia stanowił przestrajalny femtosekundowy impulsowy laser tytanowo-szafirowy (Ti:sapph) firmy Coherent Chameleon Ultra II. Długość pojedynczego impulsu emitowanego przez laser wynosiła około 300 fs. W konsekwencji widmo promieniowania wzbudzającego miało szerokość połówkową wynoszącą 100 cm^{-1} . Wartość ta określa zdolność rozdzielczą w wykonanych pomiarach widm wzbudzenia. W układzie wiązkę promieniowania emitowaną przez laser skierowano na próbkę wykorzystując kość światłodzielącą jako dzielnik wiązki (ang. *beam splitter*, BS). Wiązkę promieniowania wzbudzającego skupiono na próbce za pomocą soczewki S_1 do plamki o średnicy około 0.5 mm. Promieniowanie emitowane przez wzbudzoną próbkę zebrano w geometrii odbiciowej. Zebrany sygnał za pomocą soczewki S_2 skupiono na wejściu monochromatora o odległości ogniskowej 500 mm (Princeton). W monochromatorze do spektralnego rozdzielenia widma wykorzystano siatkę dyfrakcyjną (600 linii/mm), a do detekcji użyto kamery CCD chłodzonej ciekłym azotem (Princeton).

W celu detekcji jedynie fotonów emitowanych przez nanocząstki w układzie zamontowano filtr górnoprzepustowy (ang. *shortpass*) F_1 – FSH0750 (Thorlabs) odcinający promieniowanie o długości fali większej niż 750 nm. Wykorzystany filtr sprawia zatem, że promieniowanie podczerwone emitowane przez laser nie jest rejestrowane przez detektor.

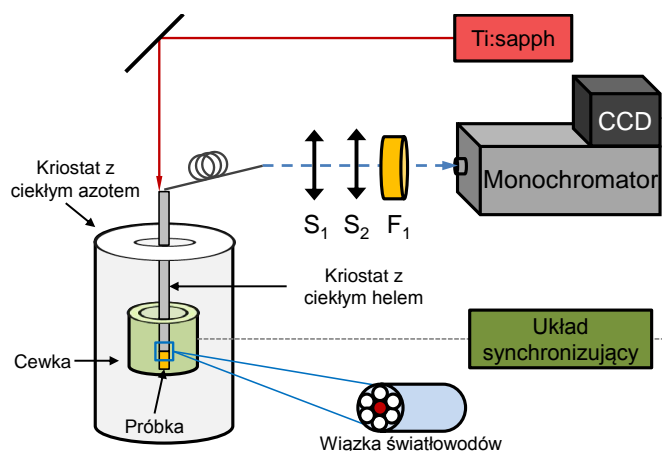


RYSUNEK 2.3: Układ optyczny umożliwiający pomiary widm wzbudzenia UCNP. Źródło promieniowania wzbudzającego stanowił laser Ti:sapph. Detektor promieniowania emitowanego przez UCNP stanowiła kamera CCD. Oznaczenia elementów optycznych: BS – dzielnik wiązki, S_1, S_2 – soczewki, F_1 – filtr.

2.5.3 Pomiary widm intensywności UCL nanocząstek w polu magnetycznym

Pomiary luminescencji UCNP w wysokim polu magnetycznym o indukcji do 68 T wykonano w Laboratorium Silnych Pól Magnetycznych w Tuluzie wykorzystując układ przedstawiony na rysunku 2.4. Nanocząstki umieszczono na końcu długiej sondy. W celu przeprowadzenia pomiarów niskotemperaturowych sondę z UCNP umieszczono w kriostacie chłodzonym za pomocą ciekłego helu we wnętrzu cewki. Pole magnetyczne wytwarzano poprzez przepływ impulsu prądu przez cewkę, który generowano za pomocą układu rozładowujących się kondensatorów. W celu uniknięcia przegrzania się cewki w trakcie generowania pola magnetycznego, cewka umieszczona była w kriostacie chłodzonym za pomocą ciekłego azotu [143]. Nanocząstki wzbudzono za pomocą femtosekundowego lasera Ti:sapph, którego użyto wcześniej do pomiarów widm wzbudzenia opisanych w rozdziale 2.5.2. Pomiary luminescencji przeprowadzono w geometrii odbiciowej z wykorzystaniem wiązki siedmiu światłowodów o średnicy $\phi=100 \mu\text{m}$ każdy. Podczerwone promieniowanie wzbudzające UCNP doprowadzono światłowodem znajdującym się wewnątrz wiązki (na rysunku 2.4 zaznaczony kolorem czerwonym), a promieniowanie emitowane przez UCNP za pomocą pozostałych światłowodów znajdujących się w wiązce. Luminescencja próbki wychodząca ze światłowodów została skolimowana przez

soczewkę S_1 . Następnie za pomocą soczewki S_2 została skupiona na wejściu do monochromatora o odległości ogniskowej 300 mm firmy Princeton i zarejestrowana przez kamerę CCD chłodzoną za pomocą ciekłego azotu. W celu eliminacji tła pochodzącego od promieniowania wzbudzającego w układzie zamontowano górnoprzepustowy filtr F_1 – FSH0750 blokujący promieniowanie podczerwone emitowane przez laser.



RYSUNEK 2.4: Układ optyczny umożliwiający pomiary fotoluminescencji nanocząstek UCNPs w wysokim polu magnetycznym. Źródło promieniowania wzbudzającego stanowił laser Ti:sapph. Próbkę oznaczono jako P. Detektor promieniowania emitowanego przez UCNPs stanowiła kamera CCD. Oznaczenia elementów optycznych: S_1, S_2 – soczewki, F_1 – filtr. Rysunek opracowano na podstawie [143].

Szerokość połówkowa widma impulsu pola magnetycznego wynosiła około 35 ms. W początkowej fazie impuls narasta bardzo szybko do osiągnięcia zadanej wartości pola B , po czym bardzo długo zanika. W czasie pojedynczego impulsu pola magnetycznego zmierzono 60 widm UCL. Ze względu na kształt impulsu pola magnetycznego w końcowej fazie trwania impulsu widma UCL mierzone są w polach o bardzo podobnej indukcji. Z tego względu w analizie danych ostatnie 30 zmierzonych widm UCL zostało uśrednionych. Ze względu na krótki czas trwania impulsu pola magnetycznego, pomiary widm intensywności UCL wymagają krótkich czasów ekspozycji. W wykorzystywanym układzie czas ten wynosił 3 ms. Bardzo krótki czas pomiaru widma UCL wymaga precyzyjnego zsynchronizowania kamery CCD rejestrującej widmo UCL z impulsem pola magnetycznego. Oba sygnały zsynchronizowano wykorzystując elektroniczny układ synchronizujący. W wykorzystywanym układzie dokładność synchronizacji czasowej kamery CDD i generowanego impulsu pola magnetycznego wynosi 0.1 ms [143].

Pomiary wykonano we współpracy z dr. hab. Michałem Baranowskim z Laboratorium Silnych Pól Magnetycznych w Tuluzie.

2.5.4 Pomiary luminescencji rozdzielone w czasie

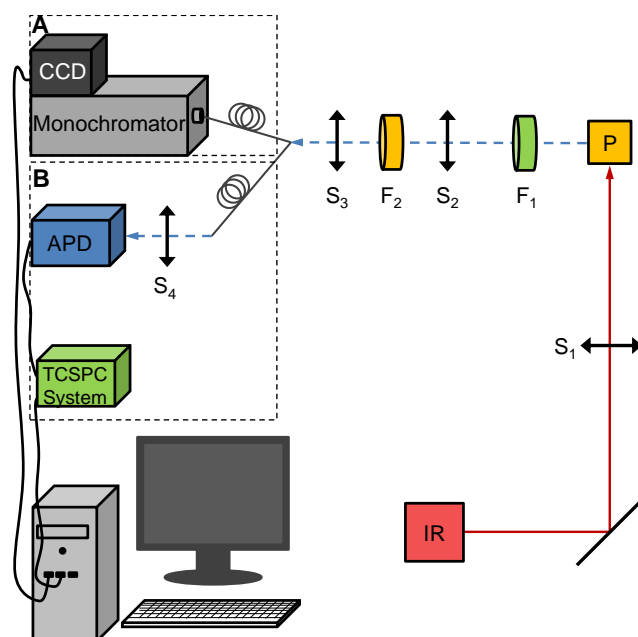
Pomiary czasów zaniku luminescencji przeprowadzono wykorzystując metodę skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC). Metoda ta polega na pomiarze czasu między wzbudzającym próbkę impulsem lasera a emisją fotonu z próbki. Kontroler lasera generuje referencyjne impulsy elektryczne z częstością repetycji impulsów lasera. Impuls referencyjny rejestrowany jest przez moduł TCSPC i rozpoczyna pomiar czasu. Detekcja fotonu zatrzymuje odmierzenie czasu. Wielokrotna detekcja fotonów pozwala na wyznaczenie zależności liczby wyemitowanych fotonów od czasu [38]. Zastosowanie metody TCSPC umożliwia wykończenie pomiarów czasów zaniku luminescencji z rozdzielczością rzędu kilkuset ps.

W ramach niniejszej pracy pomiary czasów zaniku luminescencji wykonano dla próbek zawieszonych w roztworze oraz naniesionych na podłoże.

2.5.5 Pomiary UCL nanocząstek w roztworze

Opisany poniżej układ pomiarowy wykorzystano do pomiarów czasu zaników luminescencji UCNP@SiO₂ oraz UCNP@SiO₂-RB.

Próbki do pomiarów w roztworze umieszczano, w zależności od rodzaju wykorzystywanego rozpuszczalnika, w kwarcowej lub plastikowej kuwecie spektrofotometrycznej o długości drogi optycznej wynoszącej 1 cm. Na potrzeby badań wykonywanych w ramach niniejszej pracy zbudowano układ pomiarowy, który przedstawiono schematycznie na rysunku 2.5. W zależności od sposobu detekcji luminescencji układ ten umożliwia wykonywanie pomiarów widm luminescencji (układ detekcyjny A) lub czasów zaniku luminescencji (układ detekcyjny B). Do pomiarów widm UCL jako źródło wzbudzającego promieniowania podczerwonego wykorzystano laser podczerwony emitujący promieniowanie o długości fali 980 nm (Lumics LuOcean) pracujący w trybie ciągłym. Wiązkę promieniowania podczerwonego wyemitowaną przez laser skupiono na próbce za pomocą soczewki S₁. Luminescencję pochodzącą z próbki zebrano przez soczewkę S₂ prostopadle do wiązki wzbudzającego promieniowania podczerwonego by uniknąć prześwietlenia detektora przez laser. W celu wyeliminowania fotonów emitowanych przez laser w układzie zamontowano filtr górnoprzepustowy F₂ – FSH0750. Za pomocą kolejnej soczewki S₃ zebrany sygnał skupiono na wejściu do wielomodowego światłowodu o średnicy $\phi=600 \mu\text{m}$. Drugi koniec światłowodu umieszczono na wejściu monochromatora (Shamrock SR-500i, Andor) o długości ogniskującej 500 mm wyposażonego w siatkę dyfrakcyjną (300 linii/mm). Widma UCL rejestrowano za pomocą kamery CCD (iDus DV420A-OE, Andor).



RYSUNEK 2.5: Schemat układu do pomiarów luminescencji (A) oraz czasów zaników luminescencji (B) dla próbki zawieszony w roztworze. Źródło promieniowania wzbudającego stanowił laser podczerwony (IR). Detektor promieniowania emitowanego przez UCNPs stanowiła kamera CCD lub APD. Oznaczenia elementów optycznych: $S_1 - S_4$ – soczewki, F_1, F_2 – filtry.

W pomiarach czasów zaniku luminescencji źródło światła stanowił ten sam laser, który wykorzystano w pomiarach widm UCL, aczkolwiek emitujący promieniowanie podczerwone w trybie impulsowym. Impuls promieniowania podczerwonego trwający $500 \mu\text{s}$ wyzwalany był co 2 ms. Pomiarów czasów zaniku przeprowadzono dla trzech pasm luminescencji 520 nm, 540 nm oraz 650 nm. W zależności od pasma luminescencji, dla którego mierzono czas zaniku w pomiarach wykorzystano odpowiedni wymienny filtr F_1 , umożliwiającą detekcję promieniowania w konkretnym zakresie widmowym. Do pomiaru czasu zaniku pasma 520 nm zastosowano filtr pasmowy FF01-520/15-25 (Semrock), do pasma 540 nm filtr pasmowy FF01-550/32-25 (Semrock), natomiast do pasma 650 nm – filtr dolnoprzepustowy (ang. *longpass*) FEL0650 (Thorlabs). Dodatkowo, w celu wyeliminowania fotonów emitowanych przez laser w każdym pomiarze wykorzystano filtr górnoprzepustowy F_2 – FSH0750. Fotony emitowane przez próbkę rejestrowano za pomocą fotodiody lawinowej SPCM-AQRH-15 (ang. *Avalanche Photodiode*, APD) firmy Excelitas. Do skorelowanego w czasie zliczania fotonów wykorzystano układ TimeHarp 200 (PicoQuant). Pomiarów przeprowadzono z rozdzielczością czasową wynoszącą około 1 ns. Ze względu na pomiarów czasów życia rzędu setek μs dla zmierzonego sygnału UCL wykonano histogram, w którym pojedynczy przedział czasowy wynosił 50 ns. W zbudowanym układzie pomiarowym liczba rejestrowanych fotonów tła wynosiła około 100 zliczeń/s, natomiast liczba fotonów emitowanych przez próbki wynosiła od 150 do 9000 zliczeń/s.

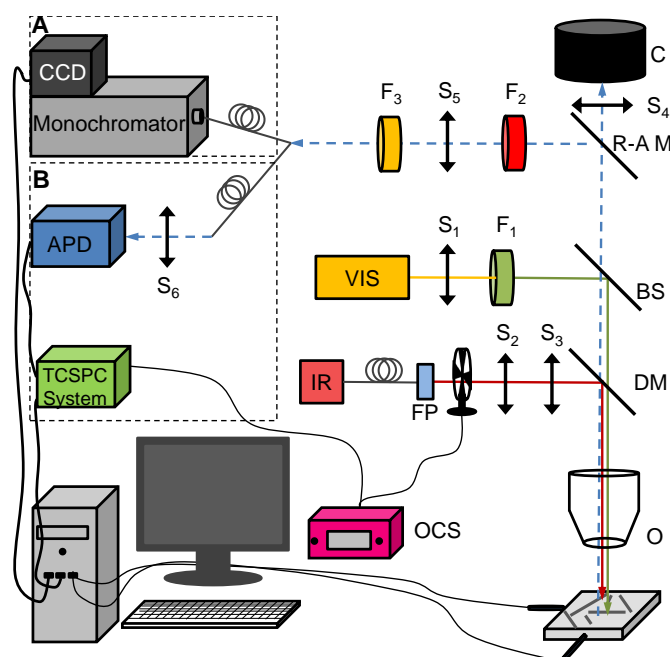
2.5.6 Pomiary UCL nanocząstek naniesionych na podłoże

Na potrzeby pomiarów luminescencji oraz czasów zaniku luminescencji nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs zbudowano układ pomiarowy, który przedstawiono schematycznie na rysunku 2.6. W celu przeprowadzenia pomiarów próbkę naniesiono na oczyszczone podłoże krzemowe w sposób kroplowy lub wykorzystując technikę powlekania obrotowego. Następnie próbkę naniesioną na podłoże umieszczono na przesuwym stoliku, którego ruch w płaszczyźnie XY kontrolowano za pomocą komputerowo sterowanych przesuwów serwomechanicznych CONEX-CC controllers (Newport). Ruch w osi Z wykonywano ręcznie przy użyciu śruby mikrometrycznej.

W celu obejrzenia powierzchni przygotowanej próbki i znalezienia odpowiedniego obszaru do badań próbkę oświetlono za pomocą lampy halogenowej (na rysunku 2.6 oznaczonej jako VIS). Promieniowanie w zakresie widzialnym emitowane przez lampę skolimowano za pomocą soczewki S_1 . W celu zwiększenia ostrości otrzymanego obrazu w układzie zastosowano filtr pasmowy F_1 – FL532-3 (Thorlabs) przepuszczający jedynie promieniowanie widzialne o długości fali 532 ± 3 nm. Dzięki oświetleniu próbki jedną długością fali minimalizowany jest wpływ aberracji chromatycznej obiektywu zastosowanego w układzie. Promieniowanie oświetlające próbkę przy użyciu dzielnika wiązki (BS) skierowano na wejście do obiektywu Olympus LMPlanFI o aperturze numerycznej $NA = 0.5$, co umożliwiło skupienie światła na powierzchni próbki. Promieniowanie odbite od powierzchni próbki zostało zebrane za pomocą obiektywu i skupione za pomocą soczewki tubusowej S_4 na kamerze CCD (DCC3240M, Thorlabs).

Do pomiarów widm luminescencji jako źródło promieniowania podczerwonego wykorzystano laser podczerwony (BL976-SAG300, Thorlabs). Wiązka promieniowania podczerwonego o długości 976 nm wyemitowana przez laser po opuszczeniu światłowodu jednomodowego zostaje skolimowana przez kolimator o ogniskowej 7.5 mm (PAF2-7B, Thorlabs), a następnie za pomocą układu soczewek S_2 i S_3 powiększona do rozmiarów apertury obiektywu. Dzięki temu na próbce uzyskuje się plamkę lasera o rozmiarze zbliżonym do limitu dyfrakcyjnego obiektywu, który wynosi około $1.2 \mu\text{m}$. Zamontowane za układem soczewek zwierciadło dichroiczne (DMSP950R, Thorlabs) umożliwiło odbicie wiązki lasera i skierowanie jej na wejście do obiektywu. Promieniowanie emitowane przez próbkę zebrano za pomocą tego samego obiektywu. Aby umożliwić detekcję zebranego promieniowania w układzie umieszczono prawoskrętną kość odbijającą R-A M (DFM1/M-P01, Thorlabs), co umożliwiło skierowanie wiązki promieniowania na soczewkę S_5 . Po przejściu przez soczewkę wiązka promieniowania emitowanego przez próbkę została skupiona na wejściu do wielomodowego światłowodu o średnicy $\phi=600$ nm. Drugi koniec światłowodu umieszczono w miejscu szczeliny wejściowej monochromatora. Ten

sam monochromator wykorzystano wcześniej do pomiarów widm UCL w roztworze. Widma UCL próbek naniesionych na podłoże rejestrowano, tak jak w układzie pomiarowym w roztworze, za pomocą kamery CCD iDus.



RYSUNEK 2.6: Schemat układu do pomiarów luminescencji (A) oraz czasów zaników luminescencji (B) dla próbki naniesionej na podłoże. Źródło promieniowania wzbudzającego stanowił laser podczerwony (IR). Detektor promieniowania emitowanego przez UCNPs stanowiła kamera CCD lub APD. Oznaczenia elementów optycznych: VIS – lampa halogenowa, FP – kolimator, OCS – chopper, $S_1 - S_6$ – soczewki, $F_1 - F_3$ – filtry, O – obiektyw, DM – zwierciadło dichroiczne, BS – dzielnik wiązki, R-A M – prawoskrętna kość odbijająca, C – kamera CCD do podglądu powierzchni próbki.

Do pomiarów czasów zaniku luminescencji wiązkę promieniowania laserowego modulowano mechanicznie przy pomocy tzw. choppera (MC2000B, Thorlabs) pracującego z częstotliwością 250 Hz i generującego impulsy o czasie trwania 2 ms. Ze względu na skończoną prędkość obrotową choppera, czasy narastania oraz zaniku impulsów lasera wynosiły około $50 \mu\text{s}$. Pomiarów czasów zaniku przeprowadzono dla pasm luminescencji z maksimum długości fali przypadającym na 540 nm oraz 650 nm. W zależności od pasma luminescencji, dla którego mierzono czas zaniku w pomiarach wykorzystano odpowiedni wymienny filtr, mający na celu przepuszczenie jedynie promieniowanie danego pasma. Do pomiaru czasu zaniku pasma 540 nm zastosowano filtr pasmowy F_2 – FF01-550/32-25 (Semrock), natomiast do pasma 650 nm filtr dolnoprzepustowy F_3 – FEL0600 (Thorlabs). Dodatkowo, w każdym pomiarze wykorzystano filtr górnoprzepustowy F_4 – FSH0750 (Thorlabs). Fotony emitowane przez próbkę rejestrowano za pomocą fotodiody lawinowej APD. Do skorelowanego w czasie zliczania fotonów wykorzystano układ PicoHarp 300 (PicoQuant). Rozdzielczość czasowa wykonanych pomiarów wynosiła 1 ns. W zbudowanym układzie pomiarowym liczba rejestrowanych fotonów tła wynosiła około

70 zliczeń/s, natomiast liczba fotonów emitowanych przez próbkę wynosiła od 150 do 3000 zliczeń/s.

2.5.7 Pomiary mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola

Pomiary zmian luminescencji podczas wysychania próbek nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs wykonano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola. Pomiary wykonano w dwóch trybach: transmisyjnym i fluorescencyjnym. W trybie transmisyjnym próbkę oświetlono od góry promieniowaniem widzialnym, co umożliwiło obejrzenie powierzchni szkiełka z nałożoną próbką i zlokalizowanie nanostruktur. W trybie fluorescencyjnym zmierzono fluorescencję znalezionej wcześniej, w trybie transmisyjnym, nanostruktury. Pomiary fluorescencyjne wykonano wykorzystując korpus odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse Ti. Do wzbudzenia próbki wykorzystano diodę LED (Prizmatix) emitującą promieniowanie widzialne o długości fali 535 nm z mocą 200 μ W. Wiązkę promieniowania wzbudzającego za pomocą zwierciadła dichroicznego – FF580-FDi01 (Semrock) skierowano na wejście do olejowego obiektywu Nikon Plan Apo o 100-krotnym powiększeniu i aperturze numerycznej $NA = 1.4$. Promieniowanie emitowane przez wzbudzoną próbkę zebrano za pomocą tego samego obiektywu. Po przejściu przez zestaw filtrów dolnoprzepustowych FEL0550 (Thorlabs) i FEL0600 (Thorlabs) oraz filtr pasmowy FB650/40 (Thorlabs) luminescencję próbki zarejestrowano wykorzystując kamerę EmCCD (iXon3, Andor).

Pomiary z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego wykonano we współpracy z mgr inż. Karoliną Sulowską na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

2.5.8 Detekcja reaktywnych form tlenu

Detekcję reaktywnych form tlenu produkowanych przez UCNPs@SiO₂-RB przeprowadzono używając metody spektrofotometrycznej. Jak wspomniano w podrozdziale 1.6.1 wzbudzenie cząsteczek RB w roztworze wodnym powoduje produkcję ROS: tlenu singletowego (¹O₂) z wydajnością 76% oraz anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻) z wydajnością 20% [115]. Ze względu na wysoką wydajność produkcji ¹O₂ przez cząsteczki RB jako wskaźnik obecności ROS wybrano 1,3-Difenylo-2-benzofuran (DPBF, 97%, Sigma-Aldrich). W obecności tlenu singletowego DPBF ulega utlenieniu, a następnie rozpada się do 1,2-dibenzoylobenzenu (DBB). Powstała cząsteczka DBB w przeciwieństwie do DPBF nie absorbuje światła, co powoduje spadek mierzonej wartości absorpcji roztworu [144, 145].

W celu przeprowadzenia doświadczenia umożliwiającego detekcję $^1\text{O}_2$ przygotowano 2 mM roztwór DPBF w etanolu. W kuwecie spektrofotometrycznej o objętości 3 ml umieszczono 75 μl roztworu DPBF, 200 μl UCNPs@SiO₂-RB o stężeniu 1 mg/ml w wodzie oraz 2725 μl wody destylowanej. Tak przygotowany roztwór naświetlono promieniowaniem podczerwonym o długości fali 980 nm. Następnie za pomocą spektrofotometru, opisanego w podrozdziale 2.5.1, zmierzono absorpcję roztworu w zakresie długości fal od 300 do 700 nm. Pomiar absorpcji przeprowadzono w funkcji czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Wzrost ilości $^1\text{O}_2$ produkowanego przez UCNPs@SiO₂-RB w roztworze jest wprost proporcjonalny do spadku absorpcji DPBF, co umożliwia określenie efektywności generowania $^1\text{O}_2$ przez badaną próbkę.

2.6 Procedury wykonywania badań nad wydajnością terapii fotodynamicznej w komórkach

Badania z wykorzystaniem komórek nowotworowych przedstawione w niniejszej pracy wykonano we współpracy z mgr. inż. Przemysławem Kowalikiem z Instytutu Fizyki PAN.

2.6.1 Charakterystyka linii komórkowej 4T1

W ramach badań komórkowych przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu określenie wpływu nanocząstek UCNPs@SiO₂-RB na przeżywalność komórek oraz oszacowanie efektywności terapii fotodynamicznej. Do testów wykorzystano mysie komórki nowotworu piersi 4T1-Luc2 (ATCC-CRL2539). Komórki te mogą być wykorzystywane zarówno do badań *in vitro*, jak i *in vivo*. W ramach niniejszej pracy przeprowadzono jedynie badania *in vitro*. Ze względu na wykorzystanie w przeprowadzonych badaniach tylko jednej linii komórkowej w dalszej części pracy dla zwiększenia czytelności komórki 4T1-Luc2 oznaczono skrótem 4T1. Wykorzystywane do badań biologicznych komórki 4T1 hodowano w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) zawierającej 10% płodowej surowicy bydlęcej (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS). Komórki przechowywano w inkubatorze (Innova CO-48, NewBrunswick Scientific) w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Hodowla komórkowa była prowadzona bez wykorzystania antybiotyków.

2.6.2 Test przeżywalności Presto Blue

Do przeprowadzenia wszystkich testów przeżywalności opisywanych w ramach niniejszej pracy wykorzystano test Presto Blue (PB, Life Technologies). Test ten polega na dodaniu do komórek roztworu PB, który zawiera niezdolny do luminescencji związek zwany resazuryną. Resazuryna w wyniku zachodzących w żyjącej komórce procesów metabolicznych ulega redukcji do resorufiny zdolnej do luminescencji. Intensywność luminescencji resorufiny jest zatem wprost proporcjonalna do ilości żyjących komórek. Resorufyna jest związkiem nietoksycznym dla komórek, więc nie prowadzi do ich uszkodzenia. Z tego względu po wykonaniu testu PB możliwe jest przeprowadzanie kolejnych eksperymentów na tej samej grupie komórek [146, 147].

2.6.3 Cytotoksyczność UCNPs@SiO₂-RB

W celu przeprowadzenia testów przeżywalności PB w pojedynczym dołku na płytce 96-dółkowej umieszczono około 10 tys. komórek 4T1, które zawieszono w 200 μl pożywki. Komórki inkubowano następnie przez 24 h. Po upływie tego czasu pożywkę usunięto i dodano 200 μl roztworu UCNPs@SiO₂-RB o stężeniach w zakresie od 0 do 1600 μgml^{-1} zawieszonych w świeżej pożywce. Komórki inkubowano z nanocząstkami przez 2.5 oraz 24 h. Po inkubacji w celu usunięcia UCNPs@SiO₂-RB znajdujących się poza wnętrzem komórek, każdy dołek przepłukano dwukrotnie wykorzystując 150 μl roztworu buforu fosforanowego o pH obojętnym (ang. *phosphate buffered saline*, PBS). W celu przeprowadzenia testu cytotoxyczności na bazie pożywki przygotowano 10% roztwór PB. Do każdego dołka z komórkami 4T1 dodano 100 μl 10% roztworu PB, inkubowano przez 1 godzinę, a następnie za pomocą czytnika mikropłytek GloMax Discover System (GM3000, Promega) zmierzono fluorescencję roztworów w każdym dołku. Pomiar przeprowadzono wzbudzając próbkę promieniowaniem widzialnym o długości fali 520 nm i mierząc fluorescencję roztworu w zakresie od 580 do 640 nm. Na podstawie zmierzonej intensywności fluorescencji dla grupy kontrolnej i grup eksperymentalnych wyznaczono przeżywalność komórek 4T1 dla każdej badanej grupy. Założono, że średnia wartość intensywności luminescencji grupy kontrolnej odpowiada 100-procentowej przeżywalności komórek 4T1. Zmiany średniej wartości luminescencji grup eksperymentalnych względem grupy kontrolnej odpowiadają zatem zmianom przeżywalności komórek w danej grupie.

2.6.4 Ekspozycja komórek 4T1 na promieniowanie podczerwone

Przed przystąpieniem do badań skuteczności terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem UCNPs@SiO₂-RB przeprowadzono badania umożliwiające dobranie bezpiecznego poziomu ekspozycji komórek 4T1 na promieniowanie podczerwone. W tym celu komórki 4T1 przygotowano na płytkach 96-dółkowych, analogicznie jak w przypadku testów cytotoksyczności. Następnie komórki należące do grup eksperymentalnych naświetlono za pomocą lasera emitującego promieniowanie podczerwone o długości fali 980 nm (MDL-N-980nm, CNI), natomiast grupę kontrolną pozostawiono nienaświetloną. W ramach doświadczeń wykonano naświetlania według czterech schematów:

- naświetlanie ciągle przez 10 min wykorzystując promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm⁻²
- naświetlanie przerywane przez 10 min (cykl 1.5 min naświetlania/0.5 min przerwy) wykorzystując promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm⁻²
- naświetlanie ciągle przez 10 min wykorzystując promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2.5 Wcm⁻²
- naświetlanie przerywane przez 10 min (cykl 1.5 min naświetlania/0.5 min przerwy) wykorzystując promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2.5 Wcm⁻²

Po ekspozycji poszczególnych grup na promieniowanie podczerwone wykonano test przeżywalności PB.

2.6.5 Terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem nanocząstek UCNPs@SiO₂-RB

W celu zbadania skuteczności terapii fotodynamicznej komórki 4T1 przygotowano w analogiczny sposób, jak w przypadku badania cytotoksyczności UCNPs@SiO₂-RB. Do grupy eksperymentalnych dodano 200 μl pożywki zawierającej UCNPs@SiO₂-RB o stężeniu 250 μgml⁻¹ i inkubowano przez 2.5 h. Po upływie tego czasu pożywkę zamieniono na świeżą i naświetlono za pomocą promieniowania podczerwonego o gęstości mocy 2 Wcm⁻² wykorzystując różne schematy naświetlań. Pierwszy test przeżywalności PB przeprowadzono bezpośrednio po naświetleniu danej grupy komórek 4T1 za pomocą promieniowania podczerwonego wykorzystując procedurę opisaną w podrozdziale 2.6.3. Kolejne testy PB na tych samych grupach komórek przeprowadzono odpowiednio po 24, 48 lub 72 h.

2.6.6 Procedura przygotowania preparatów do mikroskopii konfokalnej

Komórki 4T1 wykorzystane do sporządzenia preparatów mikroskopowych hodowano na szkiełku nakrywkowym umieszczonym na szalce o średnicy 35 mm. Na każde szkiełko naniesiono zawiesinę zawierającą około 100 tys. komórek i dopełniono świeżą pożywką, aby końcowa objętość zawiesiny wynosiła 2 ml. Szalkę pozostawiono na noc w inkubatorze w celu przyklejenia się komórek do powierzchni szkiełek.

W doświadczeniu wykorzystano dwie grupy komórek – grupę kontrolną oraz grupę badaną inkubowaną z nanocząstkami w stężeniu $250 \mu\text{gml}^{-1}$ przez 2.5 h. Preparatykę z wykorzystaniem UCNPs@SiO₂-RB przeprowadzono w ciemności. Po inkubacji z każdej szalki usunięto pożywkę oraz dwukrotnie przepłukano każdy preparat 1.5-2 ml buforu PBS. Następnie do każdego preparatu dodano po 2 ml 3.7% roztworu formaldehydu w PBS i inkubowano 15-20 minut pod komorą laminarną w celu utrwalenia komórek. Preparaty ponownie dwukrotnie przepłukano buforem PBS (2ml/szalkę).

W celu zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej komórek (tzw. permabilizacja) do każdego preparatu dodano po 2 ml 1% roztworu Tritonu X-100 zawieszonego w 5% FBS w PBS i inkubowano przez 10 minut. Preparat ponownie przepłukano 2 ml buforu PBS. Następnie w celu zablokowania dalszej permeabilizacji do każdego dołka dodano 2 ml 5% roztworu FBS w PBS i inkubowano 30 minut.

Po tym czasie komórki 4T1 wyznakowano za pomocą króliczego poliklonalnego przeciwciała I-rzędowego (Anti-LAMP1, Invitrogen) w celu wybarwienia lizosomów występujących w komórkach. Na każdą szalkę dodano 25 μl roztworu przeciwciał zawieszonych w 5% FBS w PBS, przykryto czystym szkiełkiem nakrywkowym i inkubowano przez 1 h. Po upływie tego czasu dodano 2 ml PBS i usunięto szkiełko z góry, PBS odciągnięto i dwukrotnie przepłukano 2 ml PBS. Następnie, w analogiczny sposób jak w przypadku przeciwciała I-rzędowego, przyłączono II-rzędowe kozie przeciwciało anty-królicze IgG znakowane barwnikiem Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Po wybarwieniu preparat przepłukano dwukrotnie 2 ml buforu PBS. W ostatnim etapie przygotowywania preparatów konfokalnych wybarwiono jądra komórkowe. W tym celu do szalki dodano 25 μl roztworu Hoechst33342 w 5% FBS w PBS (w proporcji 1:5000), inkubowano przez 10 minut i przepłukano, jak wyżej, buforem PBS. Gotowe preparaty przyklejono do szkiełek podstawowych z pomocą utrwalacza (ProLong Gold Antifade Mountant, Invitrogen).

2.6.7 Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej

W celu stwierdzenia, czy UCNPs@SiO₂-RB znajdują się we wnętrzu komórek, a także określenia wpływu obecności nanocząstek na ich morfologię wykonano obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego. Przed przystąpieniem do obrazowania komórek konieczne jest odpowiednie przygotowanie preparatu mikroskopowego poprzez wyznaczenie organelli komórkowych za pomocą barwników fluorescencyjnych, co opisano w poprzednim podrozdziale.

Do zobrazowania wykonanych preparatów wykorzystano mikroskop konfokalny Zeiss LSM 710 NLO wyposażony w przestrajalny femtosekundowy laser Ti:sapph (Coherent, Chameleon), dzięki któremu możliwe jest zobrazowanie nanocząstek up-konwertujących znajdujących się w komórkach. Po wybarwieniu organelli komórkowych za pomocą odpowiednich barwników fluorescencyjnych, wymienionych w podrozdziale 2.6.6, obserwowano luminescencję w trzech kanałach:

- niebieskim – przedstawiającym jądra komórkowe znakowane za pomocą barwnika Hoechst33342 przy dwufotonowym pobudzeniu laserem emitującym promieniowanie o długości fali 705 nm z gęstością mocy $1.37 \text{ W}\mu\text{m}^{-2}$ i detekcją w zakresie emisji od 425 do 475 nm;
- zielonym – przedstawiającym lizosomy znakowane za pomocą barwnika Alexa Fluor 488 przy pobudzeniu laserem emitującym promieniowanie o długości fali 488 nm z gęstością mocy $0.05 \text{ W}\mu\text{m}^{-2}$ i detekcją w zakresie emisji od 495 do 572 nm;
- czerwonym – przedstawiającym nanocząstki UCNPs, przy pobudzeniu laserem emitującym promieniowanie o długości fali 980 nm z gęstością mocy $0.20 \text{ W}\mu\text{m}^{-2}$ i detekcją w zakresie emisji od 500 do 730 nm.

Rozdział 3

Charakterystyka strukturalna i właściwości optyczne nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$

Jak wspomniano w rozdziale 1 nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ krystalizują w jednej z dwóch struktur krystalograficznych – kubicznej (α) lub heksagonalnej (β). W niniejszym rozdziale zaprezentowano wyniki badań strukturalnych oraz ogólne właściwości optyczne nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. W szczególności opisano wyniki eksperymentów, które określiły właściwości widm UCL nanocząstek w zależności od struktury krystalograficznej. Przedstawiono także wyniki badań zależności intensywności UCL od mocy promieniowania wzbudzającego oraz od długości fali promieniowania wzbudzającego. Widma wzbudzenia UCL zbadano w zależności od rozmiarów, pokrycia powierzchni oraz struktur krystalograficznych.

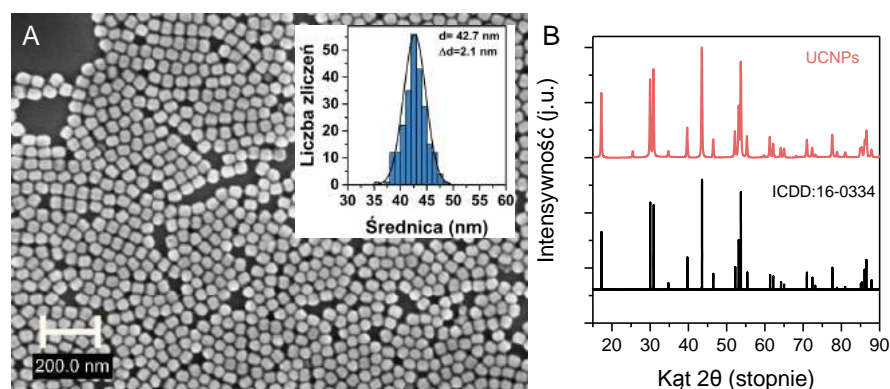
Część wyników opisanych w poniższym rozdziale opublikowano w pracy:

A. Borodziuk, M. Baranowski, T. Wojciechowski, R. Minikayev, B. Sikora, D. K. Maude, P. Plochocka, Ł. Kłopotowski, „Excitation efficiency determines the upconversion luminescence intensity of $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ nanoparticles in magnetic fields up to 70 T”, *Nanoscale*, 2020, 12(39), 20300-20307.

3.1 Charakteryzacja strukturalna nanocząstek

W wyniku syntezy opisanej w rozdziale 2.1 otrzymano nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, które zobrazowano wykorzystując technikę SEM. Na rysunku 3.1(A) przedstawiono przykładowe zdjęcie UCNPs wykorzystywanych do badań opisanych w ramach niniejszej

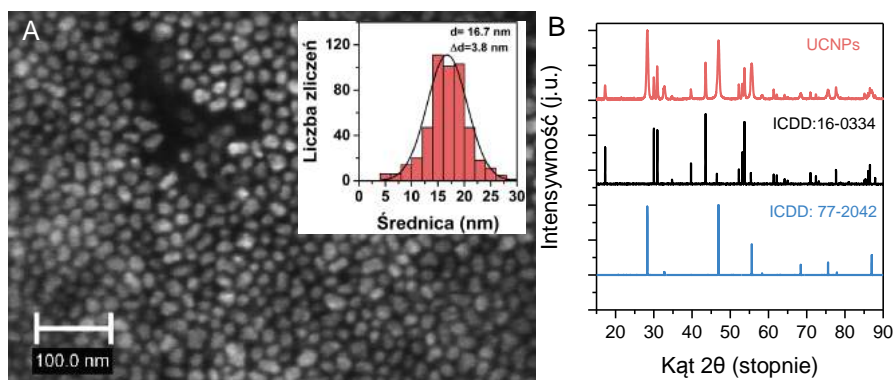
pracy. Na podstawie zdjęć SEM wyznaczono rozkład średnic nanocząstek (wstawka do rysunku 3.1(A)). Dopasowanie do otrzymanych danych funkcji Gaussa umożliwiło wyznaczenie średniej wielkości nanocząstek, która w tym wypadku wynosi 42.7 ± 2.1 nm. Strukturę krystalograficzną UCNPs określono dzięki pomiarom XRD, których wyniki zaprezentowano na rysunku 3.1(B). Linia czerwona przedstawiono dyfraktogram badanej próbki, natomiast linią czarną przedstawiono dyfraktogram wzorcowy z bazy International Centre for Diffraction Data (ICDD) odpowiadający β -NaYF₄ (ICDD: 16-0334). Porównanie położenia i intensywności maksimów Bragga zmierzonych dla UCNPs i wzorca wskazuje na zgodność obu dyfraktogramów. Pozwala to stwierdzić, że przedstawione na rysunku 3.1 nanocząstki posiadają strukturę heksagonalną [148].



RYSUNEK 3.1: (A) Zdjęcie SEM oraz histogram rozkładu średnic nanocząstek NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺. (B) Dyfraktogram rozpraszania rentgenowskiego dla β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ (czerwona linia) oraz dyfraktogram wzorcowy ICDD 16-0334 (czarna linia).

Opisane wyżej nanocząstki przygotowywano według procedury, która została zaprojektowana tak, aby wytwarzane UCNPs posiadały strukturę heksagonalną. Jednakże, czasami z powodu niedokładnego odparowania wody czy też nieszczelności w układzie sprawiającej, że znajduje się w nim tlen, otrzymane UCNPs bywają niejednorodne: mają nieregularny kształt i rozmiar. Przykładowe zdjęcie takich nanocząstek przedstawiono na rysunku 3.2(A). Analogicznie, jak w przypadku opisanych wyżej nanocząstek o strukturze heksagonalnej, na podstawie zdjęć SEM wyznaczono rozkład średnic nanocząstek (wstawka do rysunku 3.2(A)). W wyniku dopasowania funkcji Gaussa do otrzymanego rozkładu wyznaczono średni rozmiar nanocząstek, który w tym wypadku wynosi 16.7 ± 3.8 nm. Otrzymane UCNPs, w przeciwieństwie do przedstawionej na rysunku 3.1 próbki, mają większy rozrzut wielkości. W celu określenia struktury krystalograficznej nanocząstek wykonano pomiary XRD, których wyniki przedstawiono na rysunku 3.2(B). Linia czerwona przedstawiono dyfraktogram wytworzonych UCNPs, linią czarną – dyfraktogram wzorcowy dla β -NaYF₄ (ICDD: 16-0334), zaś linią niebieską – dyfraktogram wzorcowy dla α -NaYF₄ (ICDD: 77-2042). Porównanie położenia maksimów Bragga na wszystkich dyfraktogramach wskazuje, że w otrzymanej próbce znajduje się mieszanina UCNPs o strukturze kubicznej i heksagonalnej. Analiza zmierzonego dyfraktogramu

pozwała stwierdzić, że większość (około 2/3) próbki stanowią α -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺, zaś pozostała część to β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺.



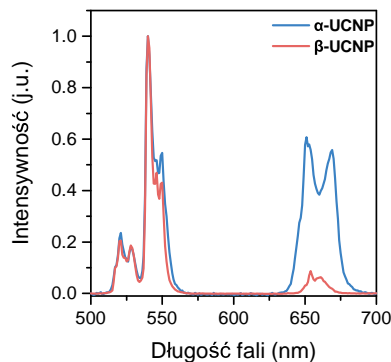
RYSUNEK 3.2: (A) Zdjęcie SEM oraz histogram wielkości średnic nanocząstek. (B) Dyfraktogram rozpraszania rentgenowskiego dla wytworzonych NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ (czerwona linia) oraz dyfraktogramy wzorcowe dla β -NaYF₄ – ICDD 16-0334 (czarna linia) i dla α -NaYF₄ ICDD 77-2042 (niebieska linia).

3.2 Charakterystyka widm UCL

3.2.1 Wpływ struktury krystalograficznej na widma UCL

Nanocząstki kubiczne α - oraz heksagonalne β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ różnią się od siebie nie tylko morfologią, co zaprezentowano w poprzednim podrozdziale, ale także jak opisano w podrozdziale 1.4, wydajnością UCL. W celu porównania widm UCL nanocząstek o różnych strukturach krystalograficznych należy wykorzystać UCNPs o takich samych rozmiarach. Wykonanie takiego porównania w tej pracy jest niemożliwe, dlatego też poniżej przedstawiono porównanie względnych natężeń UCL. Na rysunku 3.3 przedstawiono znormalizowane widma luminescencji zmierzone dla α -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ o średnicy wynoszącej 17 nm oraz β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ o średnicy wynoszącej 23 nm. Pomiar wykonano dla próbek o takich samych stężeniach, równych 4.85 mM, przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym z taką samą gęstością mocy, równą 12 Wcm⁻². Na otrzymanych widmach zaobserwowano, że UCNPs o strukturze kubicznej posiadają dużo wydajniejszą emisję w zakresie czerwonym niż nanocząstki o strukturze heksagonalnej. Stosunek intensywności pasma UCL wokół długości fali 650 nm (I_{650}) do intensywności pasma UCL wokół długości fali 540 nm (I_{540}) dla nanocząstek kubicznych wynosi 0.6, natomiast dla nanocząstek heksagonalnych wynosi 0.09. Większa względna wydajność emisji fotonów wokół długości fali 650 nm przez nanocząstki o strukturze kubicznej niż heksagonalnej spowodowana jest bardziej wydajnym procesem bezpromienistej relaksacji $^4I_{11/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$ w jonie Er³⁺ w nanocząstkach kubicznych. Wydajność tej relaksacji zależy bowiem od oddziaływania jonów Er³⁺ z jonami F⁻ [84, 149]. W

przypadku, gdy jon Er^{3+} znajduje pozycję o wysokiej symetrii względem pozycji pozostałych jonów w sieci krystalicznej, jak w przypadku struktury kubicznej, oddziaływanie jonów Er^{3+} z jonami F^- jest silne. Powoduje to wzrost wydajności relaksacji bezpromienistej ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$. Natomiast, gdy pozycja ta ma niską symetrię względem położenia pozostałych jonów w sieci krystalicznej, tak jak w przypadku struktury heksagonalnej, siła oddziaływania jonów Er^{3+} - F^- jest mała [149]. W konsekwencji spada też wydajność relaksacji ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$.



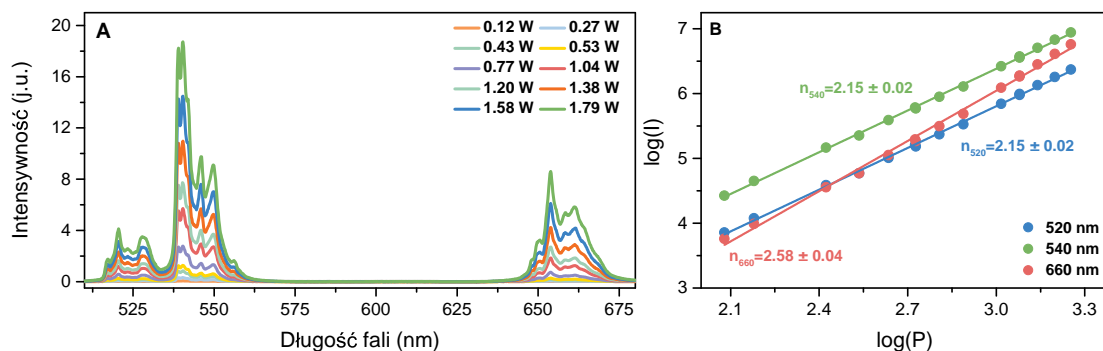
RYSUNEK 3.3: Znormalizowane widma luminescencji nanocząstek α - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (niebieska linia) oraz β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (czerwona linia) o stężeniu 4.85 mM zawieszonych w cykloheksanie przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym o długości fali 980 nm z gęstością mocy 12 Wcm^{-2} .

3.2.2 Wpływ mocy promieniowania wzbudzającego na widma UCL

Zależność intensywności UCL w funkcji mocy promieniowania wzbudzającego o długości fali 980 nm wyznaczono dla β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ zawieszonych w cykloheksanie. Widma UCL nanocząstek β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ dla różnych mocy promieniowania wzbudzającego przedstawiono na rysunku 3.4(A). Jak opisano w podrozdziale 1.5.1, dla niskich gęstości mocy zależność intensywności luminescencji I od mocy promieniowania wzbudzającego P opisuje wzór: $I(P) \propto P^n$. Wyznaczenie zależności $I(P) \propto P^n$ dla trzech głównych pasm emisyjnych I_{520} , I_{540} oraz I_{650} umożliwia określenie liczby zaabsorbowanych fotonów wzbudzających n , które potrzebne są do wyemitowania fotonów odpowiednio w pasmach 520 nm, 540 nm oraz 650 nm. Na rysunku 3.4(B) przedstawiono zależność scałkowanej intensywności UCL tych trzech pasm emisyjnych w funkcji mocy promieniowania wzbudzającego w skali podwójnie logarytmicznej.

Dla pasm zielonych wokół długości fali 520 nm i 540 nm do otrzymanej zależności intensywności od mocy dopasowano funkcję liniową. Wyznaczone nachylenie prostej odpowiada liczbie fotonów wzbudzających UCL. Wyznaczona, w wyniku dopasowania funkcji liniowej, liczba fotonów wzbudzających UCL dla pasm zielonych wyniosła $n_{520}=n_{540}=2.15 \pm 0.02$. Otrzymana wartość $n_{520} = n_{540}$ wskazuje, że emisja w zielonym

zakresie spektralnym pojawia się na skutek dwufotonowego mechanizmu wzbudzenia UCL, który szczegółowo opisano w podrozdziale 1.4.



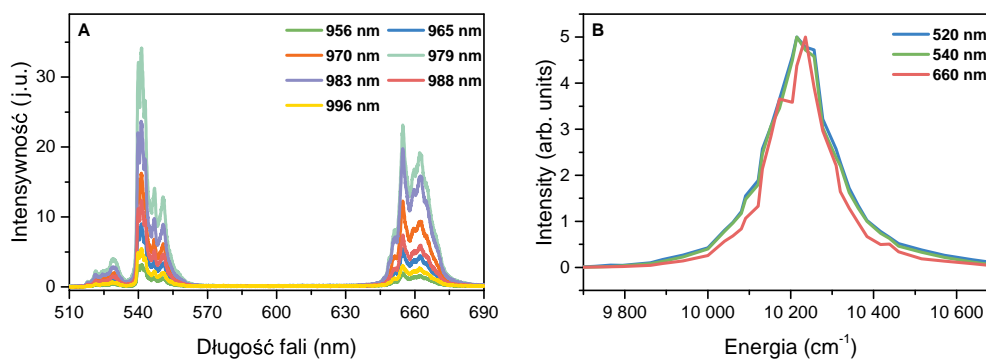
RYSUNEK 3.4: (A) Widma luminescencji nanocząstek zawieszonych w cykloheksanie o stężeniu 2.4 mM przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym 980 nm o mocy zawierającej się w przedziale 0.2-1.79 W. (B) Zależność zlogarytmowanej intensywności luminescencji UCNPs wokół długości fali 520 nm (kolor niebieski), 540 nm (kolor zielony) oraz 650 (kolor czerwony) w zależności od zlogarytmowanej wartości mocy promieniowania wzbudzającego.

Do danych wyznaczonych dla pasma w czerwonym paśmie spektralnym, przedstawionych na rysunku 3.4(B) także dopasowano funkcję liniową, a następnie wyznaczono jej nachylenie. Odpowiadająca nachyleniu liczba fotonów wzbudzających powodująca emisję fotonów w czerwonym zakresie spektralnym wyniosła $n_{650} = 2.58 \pm 0.04$. Aby zinterpretować otrzymany wynik należy przypomnieć mechanizmy wzbudzenia UCL w czerwonym zakresie spektralnym. Emisja fotonu czerwonego o długości fali 650 nm może wystąpić w wyniku trzech różnych dróg wzbudzenia elektronu na poziom $^4F_{9/2}$ w jonie Er^{3+} [82, 83, 85, 150]. Jak szczegółowo opisano w podrozdziale 1.4 wyróżnia się mechanizmy wzbudzenia w sposób dwu- i tryfotonowy. Ze względu na strukturę krystalograficzną nanocząstek i rodzaj rozpuszczalnika, w którym zostały one umieszczone, spodziewano się, że w badanych warunkach najbardziej prawdopodobnym mechanizmem wzbudzenia UCNPs, który powoduje emisję fotonów czerwonych, jest mechanizm tryfotonowy, który przedstawiono na rysunku 1.5(D). Natomiast mechanizmy dwufotonowe, przedstawione na rysunkach 1.5(B-C), zachodzą z dużo mniejszą wydajnością niż mechanizm tryfotonowy. Wyznaczona wartość n_c wskazuje jednak, że w badanych warunkach wzbudzenie UCL nanocząstek w zakresie czerwonym odbywa się nie tylko na drodze wzbudzenia tryfotonowego, lecz także w wyniku wzbudzenia dwufotonowego. Uzyskana wartość $n_c = 2.58$ sugeruje, iż wzbudzenie w sposób dwu- i tryfotonowy występuje z porównywalną wydajnością.

3.3 Widma wzbudzenia UCL

Opisane powyżej pomiary widm UCL w funkcji mocy przeprowadzono wykorzystując jedną długość fali promieniowania wzbudzającego wynoszącą 980 nm. W celu sprawdzenia, jak zmiana długości fali wzbudzenia wpływa na widmo UCL nanocząstek przeprowadzono pomiary widm UCL w funkcji długości fali wzbudzenia. Z otrzymanych widm UCL wyznaczono następnie widma wzbudzenia UCL, czyli zależności scałkowanej intensywności UCL pasm zielonych oraz czerwonego od energii fotonów wzbudzających. Przykładowy wynik przedstawiono na rysunku 3.5. Próbkę heksagonalnych nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ o średnicy 43 nm posiadającą na powierzchni warstwę oleinianu nakropiono na oczyszczone podłoże krzemowe. Nanocząstki wzbudzano za pomocą przestrajanego impulsowego lasera tytanowo-szafirowego wykorzystując układ przedstawiony w podrozdziale 2.5.2. Pomiary widm intensywności UCL przeprowadzono w funkcji długości fali zakresie od 900 do 1050 nm. Gęstość mocy promieniowania emitowanego przez laser wynosiła 4.2 Wcm^{-2} . Otrzymane przykładowe widma przedstawiono na rysunku 3.5(A). Dla każdego zmierzonego widma wyznaczono wartość całki intensywności luminescencji dla pasm emisji wokół długości fali 520 nm, 540 nm oraz 650 nm, co oznaczono odpowiednio I_{520} , I_{540} oraz I_{650} . Otrzymane wartości całek w funkcji energii fali wzbudzenia przedstawiono na rysunku 3.5(B). Maksimum intensywności każdego pasma emisyjnego występuje przy wzbudzeniu promieniowaniem podczerwonym o energii około $10\,235 \text{ cm}^{-1}$, co odpowiada długości fali 977 nm. Otrzymany wynik wskazuje, że przy tej energii obserwuje się najefektywniejsze wzbudzenie jonu Yb^{3+} ze stanu podstawowego $^2F_{7/2}$ do stanu wzbudzonego $^2F_{5/2}$. Kształty, zmierzonych w 300 K, widm wzbudzenia UCL są podobne do widma absorpcji jonu Yb^{3+} prezentowanego w pracy Aarts *et al.* [151]. Jak widać na rysunku 3.5(B) szerokość połówkowa rezonansu wzbudzenia UCL wynosi około 120 cm^{-1} . Do pomiarów widm wzbudzenia UCL, prezentowanych w niniejszej pracy, wykorzystano laser podczerwony, którego szerokość spektralna wynosiła około 100 cm^{-1} . Otrzymane widmo wzbudzenia UCL jest zatem splotem widma absorpcji jonu Yb^{3+} oraz widma lasera.

Należy zwrócić uwagę, że widmo absorpcji jonu Yb^{3+} posiada strukturę subtelną związaną z przejściami pomiędzy poziomami powstającymi w wyniku rozszczepienia stanów jonu Yb^{3+} polem krystalicznym, co opisano w podrozdziale 1.3.1. Struktura subtelna ujawnia się, np. w pomiarach widm wzbudzenia przeprowadzonych w temperaturze 5 K [152]. Pojawiające się na widmach wzbudzenia UCL, na rysunku 3.5(B), odchylenia od kształtów pojedynczej linii, np. przy energii około $10\,175 \text{ cm}^{-1}$ mogą wynikać z ujawniania się wspomnianej wyżej struktury subtelnej Yb^{3+} . W dalszej części pracy odchylenia te oznaczono gwiazdkami.



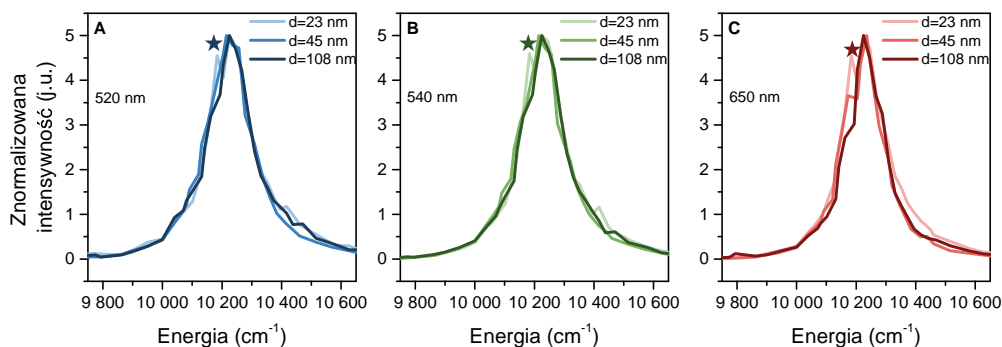
RYSUNEK 3.5: (A) Widma UCL nanocząstek przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym w zakresie od 956 do 996 nm z taką samą gęstością mocy 4.2 Wcm^{-2} . (B) Zależność całki intensywności luminescencji UCNPs wokół długości fali 520 nm (kolor niebieski), 540 nm (kolor zielony) oraz 660 nm (kolor czerwony) od energii promieniowania wzbudzającego.

Jak widać na rysunku 3.5(B) szerokość rezonansu wzbudzenia UCL dla pasma czerwonego jest zauważalnie mniejsza niż w przypadku obu pasm zielonych. Jak opisano na początku tego rozdziału w przypadku pasm zielonych emisja następuje w wyniku wzbudzenia poprzez mechanizm dwufotonowy. Natomiast emisja fotonów z pasma czerwonego może występować w wyniku wzbudzenia zarówno dwu- oraz trzyfotonowego. Wydajność wzbudzenia odbywającego się poprzez mechanizm trzyfotonowy silniej zależy od mocy promieniowania wzbudzającego niż wydajność wzbudzenia poprzez mechanizm dwufotonowy. Zmniejszenie zaabsorbowanej mocy promieniowania wzbudzającego spowodowane odstrojeniem lasera od rezonansu absorpcyjnego wpływa zatem szybciej na spadek wydajności wzbudzenia trzyfotonowego niż dwufotonowego. Ze względu na silniejszą zależność intensywności UCL od mocy wzbudzenia pasma czerwonego niż pasm zielonych (rysunek 3.5(B)), szerokość rezonansu wzbudzenia dla pasma czerwonego jest mniejsza niż dla pasm zielonych.

W dalszej części rozdziału przedstawione zostaną widma wzbudzenia UCL w zależności od struktury krystalograficznej, rozmiaru i pokrycia powierzchni nanocząstek.

3.3.1 Wpływ rozmiaru nanocząstek na widma wzbudzenia UCL

W celu określenia, czy kształt i położenie rezonansu w widmach wzbudzenia zależy od rozmiaru nanocząstek zmierzono widma wzbudzenia UCL dla nanocząstek o średnicach: 23 nm, 43 nm oraz 108 nm. We wszystkich próbkach UCNPs posiadały strukturę heksagonalną, a ich powierzchnia była pokryta warstwą oleinianu. Wyniki pomiarów przedstawiono na rysunkach 3.6(A-C).



RYSUNEK 3.6: Widma wzbudzenia β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ o średnicy (A) 23 nm, (B) 43 nm oraz (C) 108 nm pokrytych warstwą oleinianu.

W celu określenia, jak zmienia się kształt widma wzbudzenia w zależności od rozmiaru nanocząstek do otrzymanych danych dopasowano funkcję Voigta, która jest splotem funkcji Gaussa oraz funkcji Lorentza. Jako, że widmo lasera opisuje funkcja Gaussa, której szerokość połówkowa (ang. *full width at half maximum*, FWHM) jest znana i wynosi 100 cm⁻¹ w wyniku dopasowywania funkcji Voigta możliwe jest bezpośrednie określenie szerokości połówkowej funkcji Lorentza. Szerokość tą zinterpretowano jako szerokość połówkową widma rezonansu absorpcyjnego jonów Yb³⁺. Wyznaczone wartości szerokości połówkowych funkcji Lorentza w zależności od rozmiaru UCNP przedstawiono w tabeli 3.1. Jak można zauważyć szerokości połówkowe wyznaczone dla pasm zielonych wokół długości fali 520 nm i 540 nm były w granicy błędów takie same niezależnie od rozmiaru UCNP. Natomiast wartości szerokości połówkowych wyznaczonych dla pasma czerwonego malały wraz ze wzrostem rozmiaru UCNP.

TABELA 3.1: Szerokości połówkowe (FWHM) rezonansu absorpcyjnego w zależności od rozmiaru nanocząstek. Wartości wyznaczone poprzez dopasowanie funkcji Voigta do widm wzbudzenia przedstawionych na rysunku 3.6.

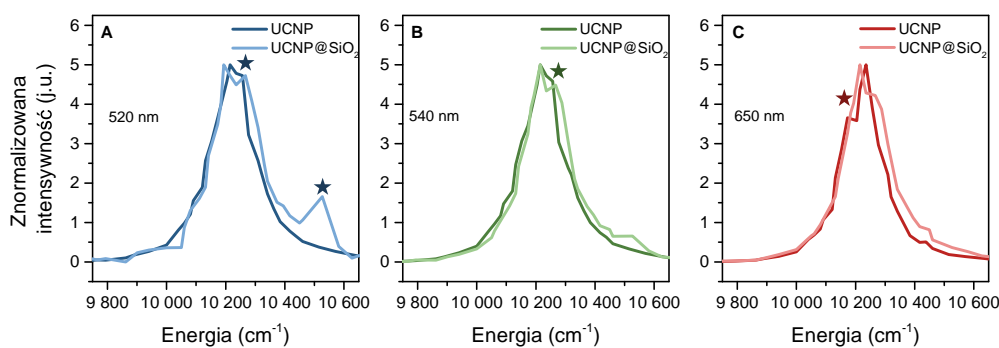
Średnica UCNP (nm)	Pasmo 520 nm FWHM (cm ⁻¹)	Pasmo 540 nm FWHM (cm ⁻¹)	Pasmo 650 nm FWHM (cm ⁻¹)
23	120.4 ± 8	114.9 ± 7	116.9 ± 7
43	126.7 ± 5	123.1 ± 5	104.1 ± 7
108	126.7 ± 7	119.5 ± 6	87.8 ± 6

Zaobserwowana zależność wskazuje, że wraz z malejącym rozmiarem UCNP maleje czułość intensywności UCL w zakresie czerwonym na odstrojenie lasera wzbudzającego od rezonansu absorpcyjnego w jonach Yb³⁺. Aby zrozumieć ten wynik należy ponownie przeanalizować mechanizmy wzbudzenia do stanu ⁴F_{9/2} w jonie Er³⁺. Wzbudzenie UCL w czerwonym zakresie spektralnym może odbywać się poprzez mechanizm dwu- lub tryfotonowy. Zaobserwowane poszerzenie rezonansu absorpcyjnego jonu Yb³⁺ wraz z malejącym rozmiarem nanocząstek, czyli zmniejszenie wrażliwości na odstrojenie lasera, można zinterpretować jako zmniejszenie wydajności wzbudzenia w sposób tryfotonowy. Może być to spowodowane tym, że wraz z malejącym rozmiarem UCNP rośnie

względna liczba jonów Yb^{3+} i Er^{3+} , które znajdują się na powierzchni nanocząstek. Jony powierzchniowe są wyeksponowane na wpływ wysokoenergetycznych fononów pochodzących z podłoża krzemowego lub z cząsteczek wody zaadsorbowanych na powierzchni próbki [86]. W konsekwencji w małych UCNP's obserwuje się wydajniejsze relaksacje bezpromienne ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ oraz ${}^4F_{7/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$ w porównaniu do większych UCNP's [153]. Przyczynia się to zwiększenia wydajności wzbudzenia w sposób dwufotonowy, kosztem wzbudzenia tryfotonowego.

3.3.2 Wpływ pokrycia powierzchni nanocząstek na widma wzbudzenia UCL

Kolejnym czynnikiem, którego wpływ na widma wzbudzenia UCL zbadano było pokrycie powierzchni nanocząstek. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano nanocząstki o strukturze heksagonalnej o takim samym rozmiarze rdzenia wynoszącym 43 nm. Jedna próbka UCNP's zawierała na powierzchni nanocząstek warstwę oleinianu, druga zaś – warstwę tlenku krzemu. Na rysunkach 3.7(A-C) przedstawiono widma wzbudzenia UCL wyznaczone dla pasm emisji wokół długości fali 520, 540 oraz 650 nm w zależności od rodzaju pokrycia powierzchni nanocząstek.



RYSUNEK 3.7: Widma wzbudzenia heksagonalnych UCNP's o średnicy 43 nm pokrytych warstwą oleinianu oraz pokrytych warstwą tlenku krzemu. Widma wzbudzenia wyznaczone dla pasm emisji wokół długości fali (A) 520 nm, (B) 540 nm oraz (C) 650 nm.

Do uzyskanych danych dopasowano funkcję Voigta. Dzięki dopasowaniu możliwe było określenie szerokości połówkowej funkcji Lorentza, która odpowiada szerokości rezonansu absorpcyjnego. Uzyskane wartości szerokości połówkowych przedstawiono w tabeli 3.2. Dla pasm zielonych wyznaczona szerokość połówkowa jest równa w granicach błęd pomiarowego niezależnie od pokrycia powierzchni UCNP's. Dla pasma czerwonego w przypadku nanocząstek pokrytych warstwą SiO_2 wartość szerokości połówkowej jest większa od wartości szerokości połówkowej wyznaczonej dla nanocząstek pokrytych warstwą oleinianu. Różnica między tymi wartościami wynosi około 20 cm^{-1} .

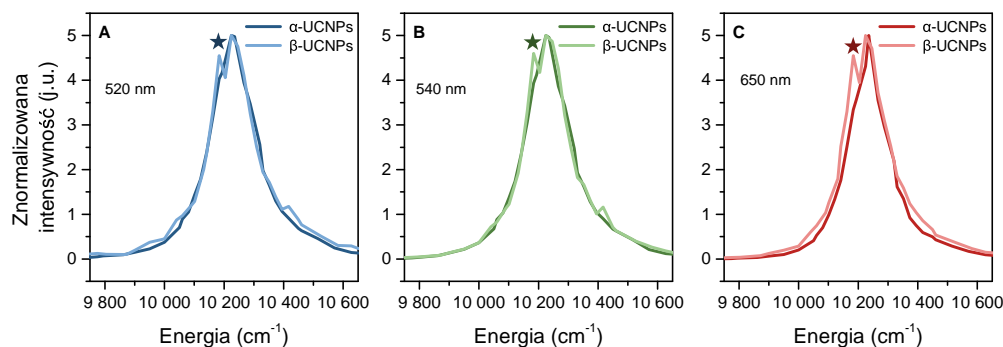
TABELA 3.2: Szerokości połówkowe (FWHM) rezonansu absorpcyjnego w zależności od pokrycia powierzchni nanocząstek. Wartości wyznaczone poprzez dopasowanie funkcji Voigta do widm wzbudzenia przedstawionych na rysunku 3.7.

Pokrycie powierzchni	Pasmo 520 nm FWHM (cm^{-1})	Pasmo 540 nm FWHM (cm^{-1})	Pasmo 650 nm FWHM (cm^{-1})
oleinian	126.7 ± 5	123.1 ± 5	104.1 ± 7
SiO ₂	131.8 ± 12	125.4 ± 7	123.7 ± 6

Otrzymany wynik wskazuje, że w przypadku nanocząstek pokrytych warstwą tlenku krzemu intensywność UCL w czerwonym zakresie spektralnym jest mniej czuła na odstrojenie od rezonansu absorpcyjnego niż w przypadku nanocząstek pokrytych oleinianem. Oznacza to, dla nanocząstek z SiO₂ spada wydajność wzbudzenia tryfotonowego. Zaobserwowana zależność może wynikać z silniejszego wpływu wysokoenergetycznych fononów, pochodzących z podłoża krzemowego i spowodowanych obecnością cząsteczek wody zaadsorbowanych na powierzchni próbki, na nanocząstki pokryte warstwą SiO₂ niż warstwą oleinianu. Silny wpływ fononów na nanocząstki pokryte warstwą tlenku krzemu wynika z właściwości hydrofilowych SiO₂. W konsekwencji cząsteczki wody chętnie adsorbują się na powierzchni próbki. Oleinian posiada natomiast właściwości hydrofobowe, dzięki którym adsorpcja cząsteczek wody na powierzchni próbki jest utrudniona. Na skutek adsorpcji cząsteczek wody i występowaniu oddziaływań z grupami wodorotlenowymi w nanocząstkach pokrytych warstwą tlenku krzemu, rośnie wydajność relaksacji bezpromienistych ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ oraz ${}^4F_{7/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$. W konsekwencji, w czerwonym zakresie spektralnym wydajność wzbudzenia UCL w sposób dwufotonowy wzrasta kosztem wydajności wzbudzenia w sposób tryfotonowy.

3.3.3 Wpływ struktury krystalograficznej nanocząstek na widma wzbudzenia UCL

Wpływ struktury krystalograficznej na widma wzbudzenia UCL zbadano dla nanocząstek $\alpha\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ o średnicy 17 ± 4 nm oraz $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, których średnica wynosiła 23 ± 2 nm. Na powierzchni obu próbek nanocząstek znajdowała się warstwa oleinianu. Na rysunku 3.8 przedstawiono widma wzbudzenia UCL wyznaczone dla emisji w zakresie zielonym oraz czerwonym dla nanocząstek o strukturze kubicznej i heksagonalnej.



RYSUNEK 3.8: Porównanie wpływu struktur krystalograficznych na widma wzbudzenia UCL. Widma wyznaczone dla α - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ o średnicy 17 nm oraz β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ o średnicy 23 nm pokrytych warstwą oleinianu dla pasma emisji wokół długości fali (A) 520 nm, (B) 540 nm oraz (C) 650 nm.

Do otrzymanych widm dopasowano funkcję Voigta, dzięki której wyznaczono szerokość połówkową rezonansu absorpcyjnego. Uzyskane wartości FWHM wyznaczonych dla wszystkich pasm przedstawiono w tabeli 3.3.

TABELA 3.3: Szerokości połówkowe (FWHM) rezonansu absorpcyjnego w zależności od struktury krystalograficznej nanocząstek. Wartości wyznaczone poprzez dopasowanie funkcji Voigta do widm wzbudzenia przedstawionych na rysunku 3.8.

Struktura krystalograficzna UCNPs	Pasmo 520 nm FWHM (cm^{-1})	Pasmo 540 nm FWHM (cm^{-1})	Pasmo 650 nm FWHM (cm^{-1})
α	124.3 ± 4	122.5 ± 4	96.2 ± 5
β	120.4 ± 8	114.9 ± 7	116.9 ± 7

Dla pasm zielonych otrzymane wartości szerokości połówkowych są równe w granicy błęd pomiarowego. Natomiast w przypadku pasm czerwonych wyznaczona wartość szerokości połówkowej dla nanocząstek o strukturze kubicznej jest mniejsza niż nanocząstek o strukturze heksagonalnej. Zatem, dla nanocząstek o strukturze kubicznej pasmo w czerwonym zakresie spektralnym jest bardziej wrażliwe na odstrojenie lasera od rezonansu absorpcyjnego niż dla nanocząstek o strukturze heksagonalnej. W celu dokładnego zrozumienia otrzymanych wyników konieczne jest przeanalizowanie mechanizmów wzbudzenia pasma czerwonego. Jak opisano w podrozdziale 3.2, dla nanocząstek kubicznych, w przeciwieństwie do nanocząstek heksagonalnych, obserwuje się wydajną relaksację bezpromienistą ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ [154]. Spowodowane jest to, wspomnianym wcześniej, oddziaływaniem jonów Er^{3+} i jonów F^- znajdujących się w matrycy [84]. Wydajna relaksacja bezpromienista ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ powoduje wzrost wydajności wzbudzenia w sposób dwufotonowy. Można by się zatem spodziewać, że wartość szerokości połówkowej dla nanocząstek o strukturze kubicznej będzie większa niż dla nanocząstek o strukturze heksagonalnej. Analiza widm wzbudzenia UCL pokazała jednak, że nanocząstki o strukturze kubicznej wykazują węższy rezonans absorpcyjny niż nanocząstki o strukturze

heksagonalnej. Oznacza to, że są one bardziej czułe na odstrojenie od rezonansowej długości fali pobudzenia niż nanocząstki o strukturze heksagonalnej. Zaobserwowany efekt może być spowodowany tym, że w próbce znajdują się nie tylko α -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺, lecz także duże β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺, w których wzbudzenie UCL odbywa się w sposób trzyfotonowy. Większa szerokość widma wzbudzenia UCL dla nanocząstek o strukturze heksagonalnej niż nanocząstek o strukturze kubicznej może także wynikać z ujawnienia się struktury subtelnej. Na wszystkich widmach wzbudzenia UCL wyznaczonych dla heksagonalnych NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ przy energii około 10 175 cm⁻¹ pojawia się zaburzenie mogące być przejawem struktury subtelnej widma absorpcji jonu Yb³⁺.

3.4 Podsumowanie

Niniejszy rozdział poświęcono charakteryzacji strukturalnej oraz zbadaniu właściwości optycznych nanocząstek NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺. Do badań strukturalnych wykorzystano nanocząstki o strukturze kubicznej oraz heksagonalnej. Przykładowe nanocząstki zobrażowano za pomocą SEM. Strukturę krystalograficzną nanocząstek określono za pomocą przeprowadzonych pomiarów XRD i porównaniu otrzymanych dyfraktogramów z dyfraktogramami wzorcowymi. Następnie zbadano wpływ struktury krystalograficznej na widma UCL. W tym celu porównano intensywności UCL pasma w czerwonym zakresie spektralnym do pasm w zielonym zakresie spektralnym. Otrzymane wyniki wskazały, że względna wydajność UCL w paśmie czerwonym jest większa dla nanocząstek o strukturze kubicznej niż nanocząstek o strukturze heksagonalnej. Jest to spowodowane większą wydajnością relaksacji bezpromienistej $^4I_{11/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$, która wynika z silniejszego oddziaływania jonów Er³⁺ z jonami F⁻ w nanocząstkach o strukturze kubicznej w porównaniu do nanocząstek o strukturze heksagonalnej. Następnie, dla nanocząstek o strukturze heksagonalnej zawieszonych w cykloheksanie, zbadano wpływ mocy promieniowania wzbudzającego na widma UCL. Przeprowadzone pomiary widm UCL, a następnie wyznaczenie zależności intensywności luminescencji pasm zielonych oraz pasma czerwonego w funkcji mocy promieniowania wzbudzającego umożliwiły określenie mechanizmów wzbudzenia UCL w badanej próbce. Wyznaczona wartość $n_{520}=n_{540}=2.15 \pm 0.02$ wskazała, że UCL w zielonym zakresie spektralnym następuje w wyniku absorpcji dwóch fotonów podczerwonych. W przypadku czerwonego zakresu spektralnego wyznaczona wartość $n_{650}=2.58 \pm 0.04$ wskazała, że obserwowana UCL jest konsekwencją współwystępowania wzbudzenia dwu- i trzyfotonowego. Zaprezentowane w niniejszym rozdziale wyniki pomiarów widm wzbudzenia UCL umożliwiły wyznaczenie rezonansowej długości fali wzbudzenia UCL, która wynosi 977 nm. Wyznaczona rezonansowa długość fali jest

niezależna od struktury krystalograficznej, rozmiaru czy pokrycia powierzchni nanocząstek. Wymienione czynniki nie wpływają także na zmianę szerokości połówkowych rezonansu absorpcyjnego w zielonym zakresie spektralnym. Szerokość połówkowa rezonansu absorpcyjnego zarówno pasma wokół długości fali 520 nm, jak i pasma wokół długości fali 540 nm, wynosi około 120 cm^{-1} . Natomiast w przypadku pasma intensywności UCL w czerwonym zakresie spektralnym, dla którego wzbudzenie odbywa się w sposób dwu- lub tryfotonowy, wykonane doświadczenia wykazały, że szerokość rezonansu absorpcyjnego, zależy od rozmiaru, pokrycia powierzchni i struktury krystalograficznej UCNPs. Ze względu na silną zależność wzbudzenia tryfotonowego od zastosowanej mocy wzbudzenia, mechanizm ten jest dużo bardziej czuły na odstrojenia długości fali promieniowania wzbudzającego od rezonansu absorpcyjnego niż mechanizm dwufotonowy. Dzięki wyznaczeniu FWHM rezonansu absorpcyjnego możliwe jest określenie wpływu rozmiaru, pokrycia powierzchni oraz struktury krystalograficznej na wydajność poszczególnych mechanizmów wzbudzenia do stanu ${}^4F_{9/2}$ w jonie Er^{3+} . Spadek rozmiaru UCNPs powoduje spadek wydajności wzbudzenia tryfotonowego. Spadek ten wynika ze wzrostu wydajności relaksacji bezpromienistych ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ oraz ${}^4F_{7/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$ wraz ze spadkiem rozmiaru nanocząstek. Wydajność wzbudzenia tryfotonowego jest także mniejsza dla UCNPs pokrytych warstwą tlenku krzemu w porównaniu do wydajności wyznaczonej dla UCNPs pokrytych warstwą oleinianu. Jest to spowodowane wydajniejszymi relaksacjami bezpromienistymi ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ oraz ${}^2H_{11/2}, {}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4F_{9/2}$ w nanocząstkach posiadających na powierzchni SiO_2 niż w nanocząstkach posiadających na powierzchni warstwę oleinianu. Jednoznaczne określenie wpływu zmiany długości fali pobudzenia dla UCNPs o różnych strukturach krystalograficznych wymaga przeprowadzenia dokładniejszych badań. Wydajniejsza relaksacja bezpromienista ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ występuje w nanocząstkach o strukturze kubicznej niż w nanocząstkach o strukturze heksagonalnej. Sugeruje to, że w nanocząstkach o strukturze kubicznej dominuje dwufotonowy mechanizm wzbudzenia. Jednakże wyznaczone widma wzbudzenia UCL w czerwonym zakresie spektralnym wykazały, że pasmo to jest bardziej czułe na odstrojenie od rezonansu absorpcyjnego w nanocząstkach kubicznych. Otrzymany wynik sugeruje zatem, że wydajność wzbudzenia dwufotonowego jest dla nich mniejsza niż wydajność wzbudzenia tryfotonowego.

Rozdział 4

Wpływ wysokiego pola magnetycznego na intensywność luminescencji nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$

Wydażność UCL zależna jest od wielu czynników zewnętrznych, co dokładnie opisano w rozdziale 1.5. Jednym z takich czynników jest pole magnetyczne. W chwili podejmowania opisywanych badań dostępne dane literaturowe nie dostarczały jednak spójnego opisu wpływu pola magnetycznego na wydażność UCL. Część grup badawczych obserwowała spadek intensywności UCL materiałów up-konwertujących wraz ze wzrostem pola magnetycznego [14, 19–21]. Spadek ten wyjaśniano wpływem pola magnetycznego na zwiększenie obsadzenia nieaktywnych optycznie poziomów energetycznych [14, 19, 155], zmianę absorpcji wzbudającego promieniowania laserowego [20], zniekształcenie symetrii kryształu NaYF_4 lub przyspieszenie szybkości relaksacji krzyżowych [21]. Inne grupy badawcze obserwowały zaś wzrost intensywności luminescencji nanocząstek wraz ze wzrostem pola magnetycznego. Efekt ten wyjaśniano wzrostem wydażności transferu energii z jonów Yb^{3+} do jonów Er^{3+} [22, 23]. W pracach Chen *et al.* [22] oraz Xiao *et al.* [23] obecność pola magnetycznego wpłynęła nie tylko na intensywność luminescencji nanocząstek, ale także na stosunek intensywności pasm zielonych względem pasma czerwonego, co wskazywałoby, że pole magnetyczne przyczynia się także do zmiany wydażności relaksacji bezpromienistych w jonach Er^{3+} . Warto podkreślić, że w większości raportowanych badań pomiary UCL w polu magnetycznym przeprowadzono wykorzystując wzbudzenie promieniowaniem podczerwonym o jednej długości

fali. Co więcej, długość ta była różna w różnych pracach. Tymczasem, jak przedstawiono w podrozdziale 3.2 nawet niewielkie odstrojenie lasera od rezonansowej długości fali pobudzenia powoduje zmianę intensywności luminescencji nanocząstek. Aby zrozumieć, jak pole magnetyczne wpływa na wydajność UCL w ramach niniejszej pracy przeprowadzono pomiary intensywności luminescencji nanocząstek w zależności od wartości indukcji pola magnetycznego do 68 T i w zależności od długości fali wzbudzenia w zakresie od 960 do 990 nm. Zastosowanie w badaniach wysokich pól magnetycznych jest konieczne, aby rozszczepienie poziomów energetycznych w jonach Yb^{3+} oraz Er^{3+} było porównywalne z szerokością widma lasera wzbudzającego. Otrzymane w niniejszym rozdziale wyniki doświadczalne porównano z modelem teoretycznym.

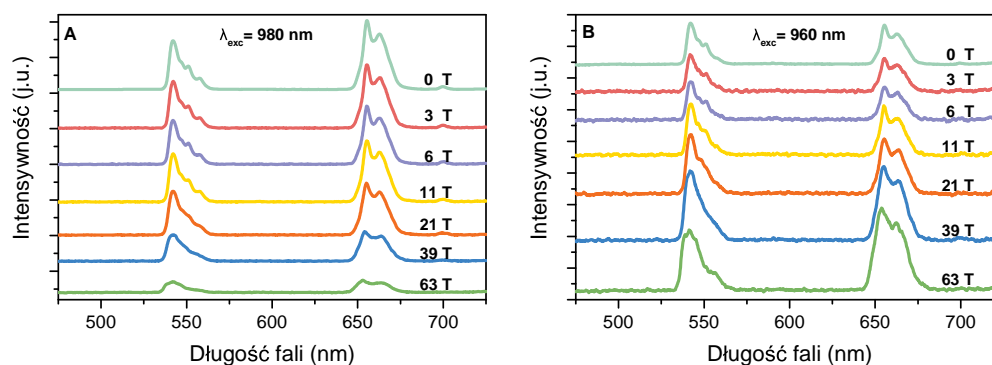
Wyniki opisane w poniższym rozdziale opublikowano w pracy:

A. Borodziuk, M. Baranowski, T. Wojciechowski, R. Minikayev, B. Sikora, D. K. Maude, P. Plochocka, Ł. Kłopotowski, „Excitation efficiency determines the upconversion luminescence intensity of $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ nanoparticles in magnetic fields up to 70 T”, *Nanoscale*, 2020, 12(39), 20300-20307.

4.1 Wpływ długości fali promieniowania wzbudzającego na wydajności UCL w polu magnetycznym

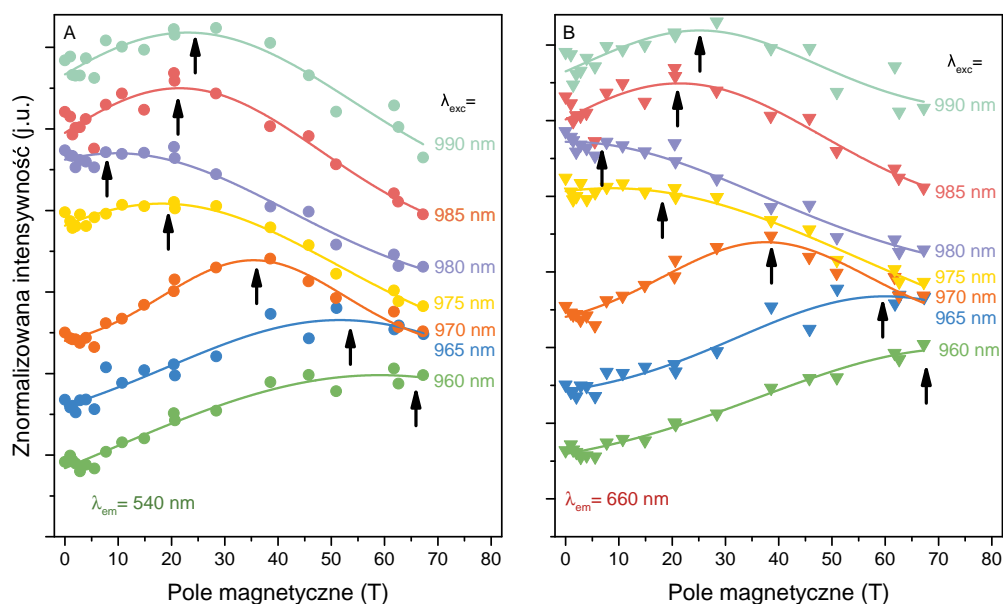
Do badań wydajności UCL w polu magnetycznym wykorzystano heksagonalne nanocząstki scharakteryzowane w podrozdziale 3.1, których zdjęcia przedstawiono na rysunku 3.1. Dokładny opis układu pomiarowego przedstawiono w podrozdziale 2.5.3. Pomiary optyczne w polu magnetycznym przeprowadzono nakrapiając nanocząstki na koniec sondy, którą następnie umieszczono we wnętrzu cewki elektromagnetycznej. Pole magnetyczne wytwarzano poprzez przepływ impulsu prądu przez cewkę. Impuls prądu generowany był poprzez rozładowanie układu kondensatorów. W konsekwencji impuls pola magnetycznego charakteryzował się szerokością połówkową wynoszącą około 35 ms. Aby zmierzyć widma UCL w zależności od pola, czas integracji musiał być więc bardzo krótki, dlatego czas pomiaru pojedynczego widma wynosił 3 ms. Aby zapewnić wysoki stosunek sygnału do szumu, intensywność UCL nanocząstek musiała być odpowiednio wysoka. Z tego względu pomiary przeprowadzono w temperaturze 100 K, ponieważ w tej temperaturze obserwowana jest największa intensywność UCL nanocząstek [156, 157]. Na widmach zmierzonych w ten sposób nie zaobserwowano UCL dla pasma emisji z maksimum przy długości fali 520 nm. Wynika to z efektywnej relaksacji bezpromienistej ze stanu $^2H_{11/2}$ do stanu $^4S_{3/2}$ w jonach Er^{3+} prowadzącej do termicznego obsadzenia tych stanów w badanej temperaturze [158].

Na rysunku 4.1(A) przedstawiono widma UCL nanocząstek w funkcji pola magnetycznego dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali 980 nm. Ta długość fali znajduje się stosunkowo blisko rezonansowej długości fali wzbudzenia przy braku pola magnetycznego, co opisano w rozdziale 3. Jak można zauważyć na rysunku 4.1(A) przy wzbudzeniu nanocząstek promieniowaniem o długości fali 980 nm wzrost indukcji pola magnetycznego powoduje zmniejszenie UCL. W celu sprawdzenia, czy stosując inną długość fali pobudzenia zaobserwowany zostanie taki sam efekt, pomiary przeprowadzono dla pobudzenia promieniowaniem o różnych długościach fal. Widma luminescencji nanocząstek w funkcji pola magnetycznego dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali 960 nm przedstawiono na rysunku 4.1(B). W tym przypadku zaobserwowano odwrotną zależność niż dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali 980 nm. Mianowicie, intensywność UCL nanocząstek wzrasta wraz ze wzrostem wartości indukcji pola magnetycznego. Analiza widm przedstawionych na rysunkach 4.1(A) i (B) wskazuje zatem, że w zależności od długości fali wzbudzenia pole magnetyczne może powodować wzrost lub spadek intensywności UCL. Otrzymany wynik wskazuje zatem źródło rozbieżności wyników prezentowanych w literaturze.



RYSUNEK 4.1: Zależność widm UCL nanocząstek od indukcji pola magnetycznego. Pomiary widm UCL wykonano dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali (A) 980 nm oraz (B) 960 nm.

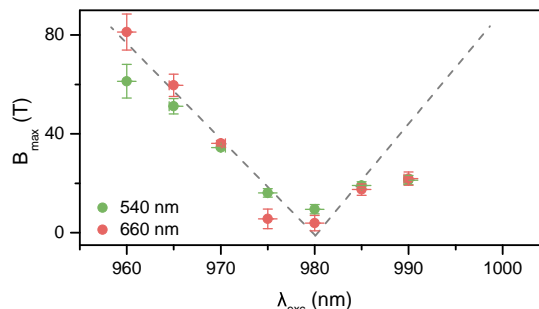
Aby dokładniej zbadać wpływ pola magnetycznego B na wydajność UCL przeprowadzono pomiary widm luminescencji nanocząstek dla długości fali pobudzenia w zakresie od 960 do 990 nm dla różnych wartości indukcji pola magnetycznego B . Na rysunku 4.2(A) przedstawiono całki pasma I_{540} w funkcji indukcji pola magnetycznego wyznaczone dla różnych długości fali pobudzenia. Punktami oznaczono dane eksperymentalne, linie stanowią wizualizację trendu, natomiast strzałkami wskazano położenie maksimum. Jak można zauważyć, maksima intensywności I_{540} przesuwają się w zależności od długości fali wzbudzenia. Dla pobudzenia nanocząstek promieniowaniem podczerwonym o długości fali 960 nm oraz 965 nm zaobserwowano wzrost wartości I_{540} wraz ze wzrostem wartości indukcji pola magnetycznego B . Przy wzbudzeniu UCNPs promieniowaniem o długości fali 970 nm maksimum I_{540} występuje przy $B \approx 35$ T.



RYSUNEK 4.2: Zależności całek luminescencji nanocząstek dla pasma wokół długości fali (A) 540 nm oraz (B) 660 nm dla pobudzenia promieniowaniem podczerwonym o długości fali w zakresie od 960 do 990 nm od indukcji pola magnetycznego. Punktami zaznaczono dane otrzymane eksperymentalne. Linie ciągłe stanowią wizualizację trendu. Strzałkami oznaczono położenie maksimum.

Dla pobudzenia nanocząstek promieniowaniem o długości fali 975 nm oraz 980 nm maksimum I_{540} przesuwa się w stronę niższych pól i występuje odpowiednio w około 16 T i około 10 T. Zwiększenie długości fali wzbudzającej do 985 nm i 990 nm powoduje natomiast przesunięcie maksimum I_{540} , w stronę wyższych pól, odpowiednio do około 20 T i około 25 T. Zatem, jak wskazują strzałki na rysunku 4.2(A), maksima zależności $I_{540}(B)$ przesuują się w stronę niższych pól magnetycznych dla rosnących długości fal pobudzenia między 960 a 980 nm, a następnie przesuują się w stronę wyższych pól dla długości fal 985 i 990 nm. Jak przedstawiono na rysunku 4.2(B), ilościowo podobne wyniki uzyskano dla pomiarów I_{650} w zależności od długości fali wzbudzenia i indukcji pola magnetycznego.

Wartości indukcji pola magnetycznego B_{max} , przy których zaobserwowano maksymalne wartości intensywności UCL dla emisji w zakresie zielonym i czerwonym, w funkcji długości fali pobudzenia przedstawiono na rysunku 4.3. Jak można zauważyć, pole magnetyczne podobnie wpływa na wartości I_{540} oraz I_{650} . Wynik przedstawiony na rysunku 4.3 można zinterpretować jako konsekwencję zjawiska Zeemana, które opisano w podrozdziale 1.5.2. Rozszczepienie stanów energetycznych w jonie Yb^{3+} oraz preferencyjne obsadzenie najniższego ze stanów powoduje rozszczepienie rezonansu absorpcyjnego. Efekt ten schematycznie przedstawiono na rysunku 4.3 linią przerywaną.



RYSUNEK 4.3: Zależność indukcji pola magnetycznego, przy której obserwowana jest maksymalna intensywność luminescencji pasma zielonego (zielone punkty) oraz czerwonego (czerwone punkty) od długości fali promieniowania wzbudzającego. Linia przerywaną przedstawiono schematycznie rozszczepienie rezonansu absorpcyjnego w jonie Yb^{3+} .

Wykonane pomiary zależności widm UCL od pola magnetycznego przy zastosowaniu różnych długości fal umożliwiły zatem określenie tego, jak rezonans absorpcyjny w jonach Yb^{3+} rozszczepia się z polem. Dla przykładu, jak przedstawiono na rysunku 4.3, rezonans absorpcyjny w jonach Yb^{3+} umieszczonych w polu magnetycznym o wartości indukcji około 50 T występuje dla pobudzenia nanocząstek promieniowaniem o długość fali 965 nm. Zbadane zależności intensywności UCL w polu magnetycznym sugerują, że pole magnetyczne wpływa na intensywność UCL głównie poprzez modyfikację wydajności wzbudzenia. Modyfikacja ta wynika z rozszczepienia stanów absorpcyjnych w jonie Yb^{3+} spowodowanego wystąpieniem efektu Zeemana. W konsekwencji, pole magnetyczne powoduje odstrojenie lasera od rezonansu absorpcyjnego w jonie Yb^{3+} i obniżenie wydajności wzbudzenia UCL. W dalszej części pracy zaprezentowane zostaną obliczenia teoretyczne, które umożliwią zweryfikowanie słuszności postawionej wyżej hipotezy.

4.2 Porównanie modelu teoretycznego z wynikami eksperymentalnymi

Chcąc opisać wpływ pola magnetycznego na wydajność procesu wzbudzenia luminescencji nanocząstek należy uwzględnić co najmniej:

- wpływ pola krystalicznego NaYF_4 na stany w jonie Yb^{3+} , co umożliwi opis rezonansu absorpcyjnego dla $B = 0$ T;
- wartości czynnika Landégo, który opisuje rozszczepienie poszczególnych stanów w polu magnetycznym;
- wpływ anizotropii czynnika Landégo (jako, że w doświadczeniu zmierzono UCNPs przypadkowo zorientowane względem kierunku B , wynik pomiarów jest uśredniony po rzutach kierunku pola magnetycznego na osie kwantyzacji);

- zmianę prawdopodobieństwa przejść optycznych (absorpcji oraz emisji) między stanami ${}^2F_{7/2}$ oraz ${}^2F_{5/2}$ w jonie Yb^{3+} , rozszczepionymi w wyniku umieszczenia materiału w polu magnetycznym, ponieważ pole magnetyczne może wpływać na mieszanie stanów energetycznych, a zatem także na intensywność przejść;
- zależność prawdopodobieństwa absorpcji promieniowania wzbudzającego od kąta między osią kwantyzacji a kierunkiem pola magnetycznego.

Z powodu braku dostępu do parametrów związanych z opisanymi wyżej zjawiskami, na potrzeby badań wykonywanych w ramach niniejszej pracy, stworzono uproszczony model teoretyczny. Należy podkreślić, że celem obliczeń wykonanych w ramach tego modelu jest zobrazowanie wpływu pola magnetycznego na wydajności UCL, a nie uzyskanie ilościowej zgodności z danymi doświadczalnymi.

Zgodnie z twierdzeniem Kramersa stan podstawowy jonu, który posiada nieparzystą liczbę elektronów, musi być przynajmniej dwukrotnie zdegenerowany [159]. Podstawowy stan energetyczny ${}^2F_{7/2}$ w jonie Yb^{3+} pod wpływem działania pola krystalicznego NaYF_4 rozszczepia się na cztery dublety o różnych wartościach $|m_j|$. W kolejności od najniższej do najwyższej energii są to stany o $m_j = \pm 1/2$, $m_j = \pm 3/2$, $m_j = \pm 5/2$ oraz $m_j = \pm 7/2$ [159]. W prezentowanym modelu teoretycznym założono, że obsadzenie tych stanów określone jest przez równowagę termiczną z otoczeniem. Uwzględniając rozszczepienie między stanami o $m_j = \pm 1/2$ a $m_j = \pm 3/2$ wynoszące około 70 cm^{-1} [151], zgodnie z rozkładem Boltzmanna, stan o $m_j = \pm 1/2$ jest co najmniej dwukrotnie bardziej zapełniony niż pierwszy stan wzbudzony o $m_j = \pm 3/2$. Z tego względu w modelu uwzględniono jedynie przejścia optyczne zachodzące ze stanu o $m_j = \pm 1/2$. Umieszczenie UCNPów w polu magnetycznym powoduje zniesienie degeneracji poziomów energetycznych ze względu na wartość m_j , co zostało opisane w podrozdziale 1.5.2. Zatem, uwzględnienie jedynie stanów o $m_j = \pm 1/2$ prowadzi do rozszczepienia rezonansu absorpcyjnego w jonach Yb^{3+} na dwie gałęzie zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 4.3.

Jak opisano w rozdziale 3.3, w wykorzystywanych warunkach pomiarowych prawdopodobieństwo wzbudzenia jonu Yb^{3+} jest splotem widma lasera i widma absorpcji Yb^{3+} . Zależność tego prawdopodobieństwa od pola magnetycznego, $p_w(B)$, opisuje wzór:

$$p_w(B) = \int_0^\infty L(E, E_L, \Gamma_L) G(E, E_G, \Gamma_G) dE. \quad (4.1)$$

gdzie:

$L(E, E_L, \Gamma_L)$ – funkcja opisująca rezonans absorpcyjny w jonach Yb^{3+} ,

$G(E, E_G, \Gamma_G)$ – funkcja opisująca widmo lasera.

W powyższym równaniu przyjęto, że rezonans absorpcyjny opisuje funkcja Lorentza:

$$L(E, E_L, \Gamma_L) = \frac{\Gamma_L^2}{(E - E_L)^2 + \Gamma_L^2} \quad (4.2)$$

gdzie:

Γ_L – szerokość połówkowa rezonansu absorpcyjnego,
 E_L – energia przejścia optycznego zależna od pola B dana wzorem $E_L = E_0 + 1/2g\mu_B B$,
gdzie E_0 jest energią poziomą w zerowym polu magnetycznym, g – czynnikiem Landégo,
 μ_B – magnetonem Bohra, a B – wartością indukcji pola magnetycznego.

Widmo lasera opisane jest natomiast funkcją Gaussa:

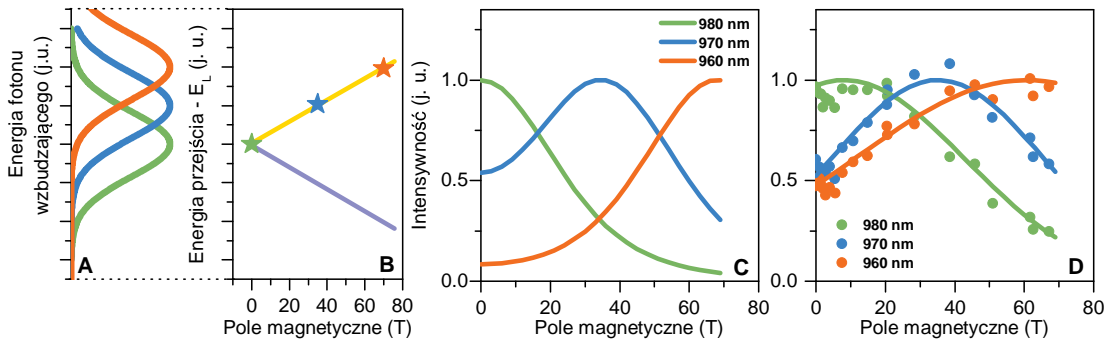
$$G(E, E_G, \Gamma_G) = \exp(-4 \ln(2)(E - E_G)^2 / \Gamma_G^2) \quad (4.3)$$

gdzie:

Γ_G – szerokość połówkowa widma impulsu lasera wzbudzającego,
 E_G – energia, przy której obserwowane jest maksimum intensywności promieniowania emitowanego przez laser.

Przedstawiony wyżej model teoretyczny zastosowano do obliczenia zależności intensywności UCL w zielonym zakresie spektralnym od pola magnetycznego, czyli $I_{540}(B)$. Jako, że wzbudzenie zielonego pasma odbywa się zgodnie z mechanizmem dwufotonowym teoretyczna wartość intensywności UCL w polu magnetycznym I_{teo} jest wprost proporcjonalna do $(p_w(B))^2$. Obliczenia wykonano dla następujących parametrów: $g=14$, $\Gamma_G = 100 \text{ cm}^{-1}$ (wartość wyznaczona doświadczalnie w podrozdziale 3.3), $\Gamma_L = 200 \text{ cm}^{-1}$ (wartość większa od wyznaczonej doświadczalnie w rozdziale 3.3) oraz $E_0 = hc/(980 \text{ nm})$ (wartość zbliżona do wartości wyznaczonej w podrozdziale 3.3).

Na rysunku 4.4(A) przedstawiono schematycznie kształt widm promieniowania emitowanego przez laser dla różnych E_G . Na rysunku 4.4(B) przedstawiono energie przejść optycznych w zależności od przyłożonego pola magnetycznego. Gwiazdkami oznaczono energie przejść optycznych, dla których $E_L = E_G$. Dla odpowiadających im pól magnetycznych należy spodziewać się maksimum UCL. Dla przykładu: maksymalna energia promieniowania emitowanego przez laser, którego widmo oznaczono linią zieloną, odpowiada energii przejścia absorpcyjnego w polu $B = 0 \text{ T}$. Maksymalna energia promieniowania emitowanego przez laser, którego widmo oznaczono linią niebieską, odpowiada energii przejścia absorpcyjnego w polu około 35 T. Natomiast maksymalna energia promieniowania emitowanego przez laser, którego widmo oznaczono linią pomarańczową, odpowiada energii przejścia absorpcyjnego w polu o około 70 T. Zatem, w sytuacji gdy promieniowanie emitowane przez laser jest odstrojone od rezonansu absorpcyjnego,



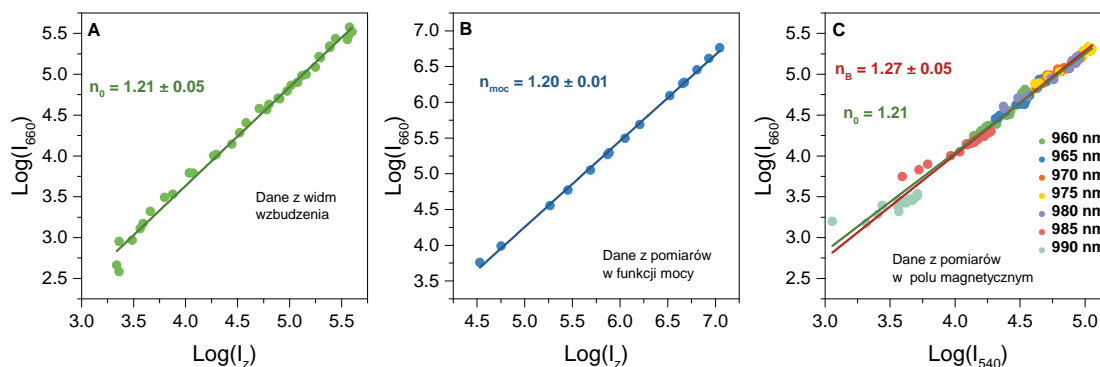
RYSUNEK 4.4: (A) Kształty widm lasera o różnej wartości E_G . (B) Energie przejść optycznych E_L w polu magnetycznym. Gwiazdkami zaznaczono energię przejść, dla których $E_G = E_L$. (C) Znormalizowane zależności I_{teo} od pola magnetycznego dla pobudzenia długościami fal 960, 970 oraz 980 nm. (D) Znormalizowane zależności I_{540} od pola magnetycznego dla pobudzenia długościami fal 960, 970 oraz 980 nm.

przyłożenie pola B_{max} powoduje dostrojenie rezonansu absorpcyjnego do wzbudzenia. Na rysunku 4.4(C) zaprezentowano obliczoną znormalizowaną zależność I_{teo} w funkcji pola magnetycznego dla długości fal wzbudzenia wynoszących 960, 970 oraz 980 nm oznaczone odpowiednio linią pomarańczową, niebieską oraz zieloną. Wyniki obliczeń wykazały, że dla pobudzenia długością fali 960 nm maksimum I_{teo} występuje, gdy pole magnetyczne wynosi około 70 T. Przy zastosowaniu wzbudzenia o długości fali 970 nm maksimum przesuwa się do około 35 T, zaś przy wzbudzeniu falą o długości 980 nm I_{teo} osiąga wartość maksymalną, gdy $B = 0$ T. Na rysunku 4.4(C) przedstawiono zależności znormalizowanych całek I_{540} w funkcji pola magnetycznego wyznaczonych przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 960, 970 oraz 980 nm. Dane na rysunku są znormalizowanymi wartościami, które przedstawiono wcześniej na rysunku 4.2(A). Otrzymane dane eksperymentalne wskazały, że dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali 960 nm maksimum I_{540} obserwuje się w polu około 60 T, przy wzbudzeniu długością fali 970 nm – przy około 40 T, zaś przy wzbudzeniu długością fali 980 nm – przy około 10 T. Wyniki eksperymentalne są więc jakościowo zgodne z wynikami teoretycznymi uzyskanymi dla takich samych długości fal wzbudzenia. Przedstawiona zgodność wyników doświadczalnych i obliczeń teoretycznych potwierdza hipotezę przedstawioną na końcu podrozdziału 4.1. Hipoteza ta zakłada, że pole magnetyczne wpływa na intensywność UCL jedynie poprzez modyfikację wydajności wzbudzenia. Jednakże, wydajność wzbudzenia zależy także od wydajności transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} oraz od wydajności przejść promienistych i bezpromienistych w jonie Er^{3+} . W dalszej części rozdziału sprawdzone zostanie, czy pole magnetyczne wpływa na modyfikację wydajności transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} oraz przejść optycznych. W tym celu sprawdzone zostanie, czy poprzez dostrojenie lasera do rezonansu absorpcyjnego można uzyskać maksymalną UCL dla $B \neq 0$ T.

4.3 Wpływ pola magnetycznego na wydajność transferu energii oraz przejść optycznych

W celu ustalenia, czy pole magnetyczne wpływa jedynie na wydajność wzbudzenia czy także na dalsze etapy procesu UC, tj. wydajność transferu energii z Yb^{3+} na Er^{3+} oraz wydajność rekombinacji promienistych i bezpromienistych w Er^{3+} zbadano wpływ odstrojenia wzbudzenia od rezonansu absorpcyjnego na wydajność UCL. Odstrojenie to można wygenerować na dwa sposoby. Pierwszy z nich polega na umieszczeniu UCNPs w polu magnetycznym, co powoduje odstrojenie poprzez zjawisko Zeemana. Drugi sposób polega na bezpośrednim odstrojeniu lasera od rezonansowej długości fali wzbudzenia. Wpływ odstrojenia lasera od rezonansu absorpcyjnego szczegółowo opisano w podrozdziale 3.3. W tym podrozdziale porównane zostanie to, jak wpływa bezpośrednio odstrojenie rezonansu absorpcyjnego od wzbudzenia z tym, jak wpływa odstrojenie poprzez zjawisko Zeemana.

Dla widm UCL zmierzonych w funkcji długości fali promieniowania wzbudzającego, przedstawionych na rysunku 3.5(A), wyznaczono zależność całki I_{650} od całki intensywności obu pasm zielonych $I_z = I_{520} + I_{540}$. Otrzymaną zależność przedstawiono na rysunku 4.5(A) w skali podwójnie logarytmicznej. Wynik ten pokazuje, jak zmienia się stosunek intensywności pasma czerwonego do intensywności pasm zielonych, gdy laser odstrajany jest od rezonansu absorpcyjnego. Do wyznaczonej zależności $I_{650}(I_z)$ dopasowano funkcję liniową, której nachylenie wyniosło $n_0 = 1.21 \pm 0.05$.



RYSUNEK 4.5: Zależność intensywności luminescencji pasma czerwonego od intensywności pasm zielonych. (A) Zależność wyznaczona z widm UCL zmierzonych w funkcji długości fali pobudzenia w zerowym polu magnetycznym. (B) Zależność wyznaczona z widm UCL zmierzonych w funkcji mocy promieniowania wzbudzającego dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali 980 nm. (C) Zależność wyznaczona z widm UCL zmierzonych w funkcji długości fali pobudzenia i pola magnetycznego. Punktami zaznaczono wartości wyznaczone doświadczalnie. Proste stanowią dopasowanie funkcji liniowej do danych doświadczalnych.

Na rysunku 4.5(B) przedstawiono zależność $I_{650}(I_z)$ wyznaczoną dla różnych mocy pobudzenia. Zależność tą wyznaczono z widm UCL zmierzonych w funkcji mocy przedstawionych na rysunku 3.4. Do otrzymanych danych dopasowano funkcję liniową.

Nachylenie prostej n_{moc} wyniosło 1.20 ± 0.01 . Wartość ta w granicy błędu pomiarowego zgodna jest z wartością n_0 .

Wpływ odstrojenia od rezonansu absorpcyjnego za pomocą pola magnetycznego przedstawiono na rysunku 4.5(C). Przedstawia on zależność I_{650} od I_{540} wyznaczoną z widm UCL zmierzonych w funkcji pola magnetycznego wzbudzanych promieniowaniem o różnych długościach fal, czyli zebrano dane przedstawione na rysunku 4.2. Do otrzymanych danych dopasowano funkcję liniową. Nachylenie funkcji liniowej wyniosło $n_B = 1.27 \pm 0.05$. Wyznaczona wartość n_B jest, w granicach błędu dopasowania, równa wartościom n_0 oraz n_{moc} . Otrzymany wynik wskazuje zatem, że odstrojenie polem magnetycznym absorbującego stanu w jonie Yb^{3+} od lasera wzbudzającego ma ten sam efekt, co odstrojenie długości fali promieniowania wzbudzającego od rezonansu absorpcyjnego w $B = 0$ T i ten sam, co obniżenie mocy promieniowania wzbudzającego! Wynik ten pozwala więc wnioskować, że pole magnetyczne nie wprowadza istotnych modyfikacji w wydajności transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} oraz w wydajności przejść radiacyjnych i nieradiacyjnych w jonie Er^{3+} .

4.4 Podsumowanie

W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki doświadczeń przeprowadzonych w celu zbadania, jak pole magnetyczne wpływa na wydajność UCL nanocząstek o strukturze heksagonalnej. W przeprowadzonych pomiarach widm UCL nanocząstek dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali 980 nm wykonanych dla różnych pól magnetycznych zaobserwowano spadek intensywności UCL w czerwonym i zielonym zakresie spektralnym wraz ze wzrostem pola. W przypadku, gdy nanocząstki wzbudzono promieniowaniem o długości fali 960 nm, zaobserwowano wzrost intensywności luminescencji tych pasm wraz ze wzrostem pola magnetycznego. Otrzymane wyniki wskazują, że w zależności od zastosowanej długości fali pobudzenia, obecność pola magnetycznego może wzmacniać lub osłabiać intensywność UCL nanocząstek. Rezultat ten wskazuje, że rozbieżności wyników prezentowanych w literaturze są spowodowane zastosowaniem różnej długości fali wzbudzenia. Zależność intensywności I_{540} oraz I_{650} od pola magnetycznego, dla pobudzenia promieniowaniem w zakresie długości fal od 960 do 990 nm, umożliwiło określenie długości fali, przy której występuje rezonans absorpcyjny w jonie Yb^{3+} . Dzięki wyznaczeniu zależności pola magnetycznego B_{max} od odpowiadającej mu rezonansowej długości fali wzbudzenia wykazano, że obecność pola magnetycznego wpływa na wydajność UCL głównie przez zmiany wydajności wzbudzenia jonów Yb^{3+} . W wyniku zjawiska Zeemana następuje bowiem rozszczepienie stanów absorpcyjnych w jonie Yb^{3+} , które prowadzi do odstrojenia rezonansu absorpcyjnego od wzbudzenia. Otrzymane wyniki doświadczalne

porównano z prostym modelem teoretycznym. Wyznaczona za pomocą modelu zależność intensywności UCL była spójna z wynikami eksperymentalnymi. Jest to kolejny argument, który sugeruje, że pole magnetyczne powoduje głównie zmianę wydajności wzbudzenia UCL. W celu określenia, czy pole magnetyczne powoduje także zmiany w transferze energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} zbadano, jak zmienia się stosunek intensywności UCL pasma czerwonego do pasm zielonych. Wyznaczone zależności wartości UCL pasma I_{650} w funkcji I_{540} dla różnych długości fal wzbudzenia dla UCNPs umieszczonych w polu magnetycznym wykazały, że pole magnetyczne wpływa na stosunek I_{650}/I_{540} w taki sam sposób, jak zmiana długości fali lub zmiana mocy promieniowania wzbudzającego. Oznacza to, że pole magnetyczne nie wpływa znacząco na wydajność transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} oraz na wydajność relaksacji w jonie Er^{3+} . Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań umożliwiły zatem opis wpływu pola magnetycznego na UCL nanocząstek. Przeprowadzone badania doświadczalne, uzupełnione dodatkowo modelem teoretycznym, umożliwiły wyjaśnienie pochodzenia rozbieżności w wynikach prezentowanych w pracach poświęconych badaniom nad właściwościami optycznymi UCNPs w polu magnetycznym [14, 19, 20, 20, 22, 23].

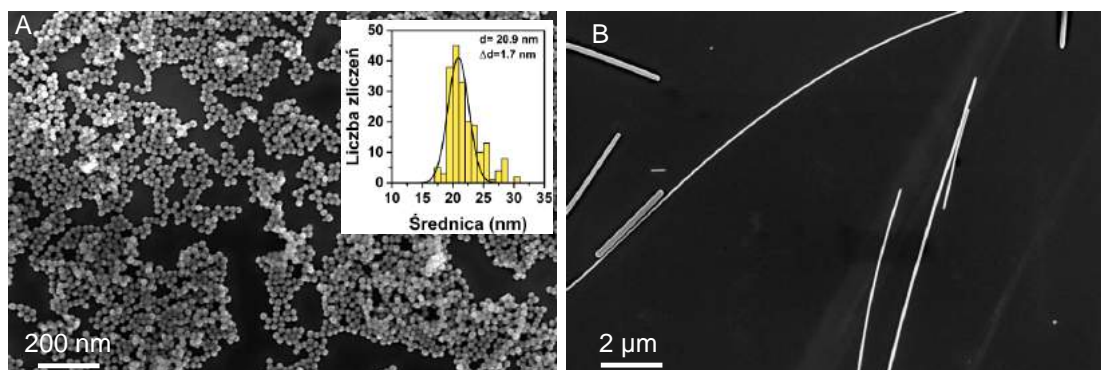
Rozdział 5

Wpływ bliskości nanodrutów srebra na ścieżki wzbudzenia UCL w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$

W niniejszym rozdziale zaprezentowano doświadczenia, które mają na celu wyjaśnienie, jak obecność srebrnych nanodrutów wpływa na właściwości optyczne nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, a w szczególności na ich mechanizmy wzbudzenia i emisji. Poniższy rozdział składa się z dwóch części. W części pierwszej przedstawiono charakterystykę strukturalną wytworzonej nanostruktury oraz zaproponowano mechanizm jej powstania. Druga część opisuje badania nad właściwościami optycznymi nanostruktur hybrydowych. W celu określenia wpływu obecności srebrnych nanodrutów na nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ porównano widma UCL oraz czasy narastania i zaniku UCL nanocząstek znajdujących się w bliskim sąsiedztwie nanodrutu oraz poza nim. Dodatkowo zbadano zależność UCL w funkcji mocy promieniowania wzbudzającego dla wytworzonych nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs. Oprócz badań doświadczalnych wykonano symulacje pola elektrycznego wokół nanostruktury hybrydowej. Obliczenia wykonano za pomocą symulacji komputerowych metodą różnic skończonych w dziedzinie czasu (ang. *finite-difference time-domain*, FDTD). Wykonane obliczenia umożliwiły zbadanie, na które przejścia optyczne wpływa obecność nanodrutów. Symulacje przeprowadzone zostały przez dr. Łukasza Zinkiewicza oraz mgr. Aleksandra Boguckiego z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach silnego wzbudzenia oddziaływanie nanocząstek z nanodrutami powoduje modyfikację ścieżek wzbudzenia UCL i w konsekwencji zmiany kształtu widma UCL.

5.1 Charakterystyka strukturalna nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs

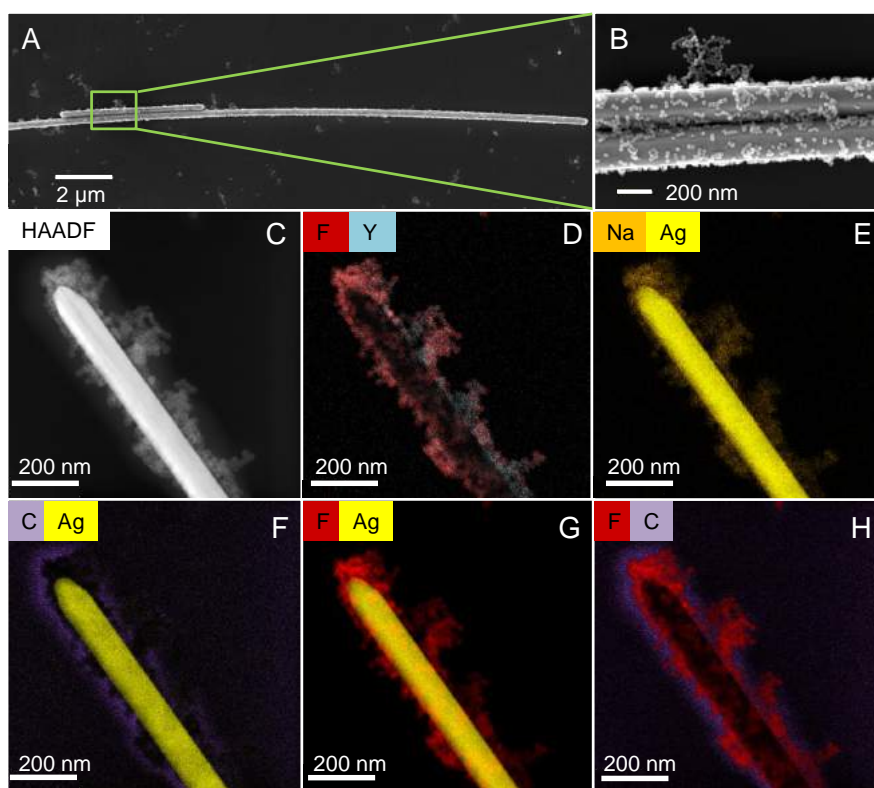
Jak opisano w podrozdziale 2.2 w celu wytworzenia nanostruktury hybrydowej z powierzchni nanocząstek usunięto warstwę oleinianu. Umożliwiło to zawieszenie UCNPs w wodzie. Wykorzystane do wytworzenia nanostruktury hybrydowej nanodrutu srebra posiadały na powierzchni ciekłą warstwę PVP i tak samo, jak nanocząstki, zawieszono były w wodzie. Przed przystąpieniem do wytworzenia nanostruktury hybrydowej przygotowane UCNPs oraz AgNW zobrazowano za pomocą SEM. Otrzymane zdjęcia UCNPs przedstawiono na rysunku 5.1(A). Na podstawie wykonanych zdjęć SEM wyznaczono rozkład średnic nanocząstek (wstawka do rysunku 5.1(A)). Dopasowanie do otrzymanych danych funkcji Gaussa umożliwiło wyznaczenie średniej wielkości UCNPs, która wyniosła 20 ± 1.7 nm. Jak widać na rysunku 5.1(B) nanodrutu nie są jednorodne. Ich średnica mieści się w zakresie od 100 do 300 nm, natomiast ich długość wynosi od kilku do kilkunastu mikrometrów.



RYSUNEK 5.1: (A) Zdjęcie SEM wraz z histogramem wielkości średnic nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ o strukturze heksagonalnej. Nanocząstki zostały pozbawione z powierzchni warstwy oleinianu. (B) Zdjęcie SEM srebrnych nanodrutów.

Nanostrukturę hybrydową wykonano poprzez przygotowanie wodnego roztworu srebrnych nanodrutów, do których następnie dodano nanocząstki. Na rysunkach 5.2(A-B) przedstawiono przykładowe zdjęcie nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs zobrazonej za pomocą SEM. Na rysunku 5.2(B) przedstawiono zdjęcie SEM tej nanostruktury będące powiększeniem obszaru zaznaczonego zieloną ramką na zdjęciu 5.2(A). Analiza otrzymanych zdjęć SEM sugeruje, że UCNPs zostały zaadsorbowane na powierzchni AgNW. Wytworzoną nanostrukturę hybrydową zobrazowano również za pomocą STEM. Przedstawione na rysunku 5.2(C) zdjęcie nanostruktury także wskazuje, że nanocząstki znajdują się na powierzchni nanodrutu. Dla obszaru zobrazowanego za pomocą STEM, przy użyciu techniki EDS, zbadano rozmieszczenie pierwiastków. Otrzymane mapy rozkładu przestrzennego pierwiastków przedstawiono na rysunkach 5.2(D-H). Na zdjęciach przedstawionych na rysunkach 5.2(E-G) położenie atomów Ag wskazuje na położenie

nanodrutu. Jak można zauważyć na rysunkach 5.2(D, E, G) atomy Na, Y, F, znajdujące się w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, występują na powierzchni nanodrutów. Warto zwrócić uwagę na rysunki 5.2(F) i (H), na których przedstawiono mapy rozmieszczenia atomów węgla. Liczne atomy węgla występują w warstwie PVP, która pierwotnie pokrywała powierzchnię AgNW. Natomiast na zdjęciach przedstawionych na rysunkach 5.2(F) oraz (H) można wyraźnie zauważyć, że pod warstwą atomów węgla znajdują się atomy fluoru. Na podstawie analizy otrzymanych map EDS można wywnioskować zatem, że w czasie powstawania nanostruktury hybrydowej nanocząstki adsorbują się bezpośrednio na powierzchni srebrnego nanodrutu pod warstwą polimeru PVP.



RYSUNEK 5.2: (A-B) Zdjęcia SEM nanostruktury hybrydowej AgNW- $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. (C-H) Zdjęcie HAADF STEM oraz mapy EDS rozkładu pierwiastków w nanostrukturze hybrydowej AgNW-UCNPs.

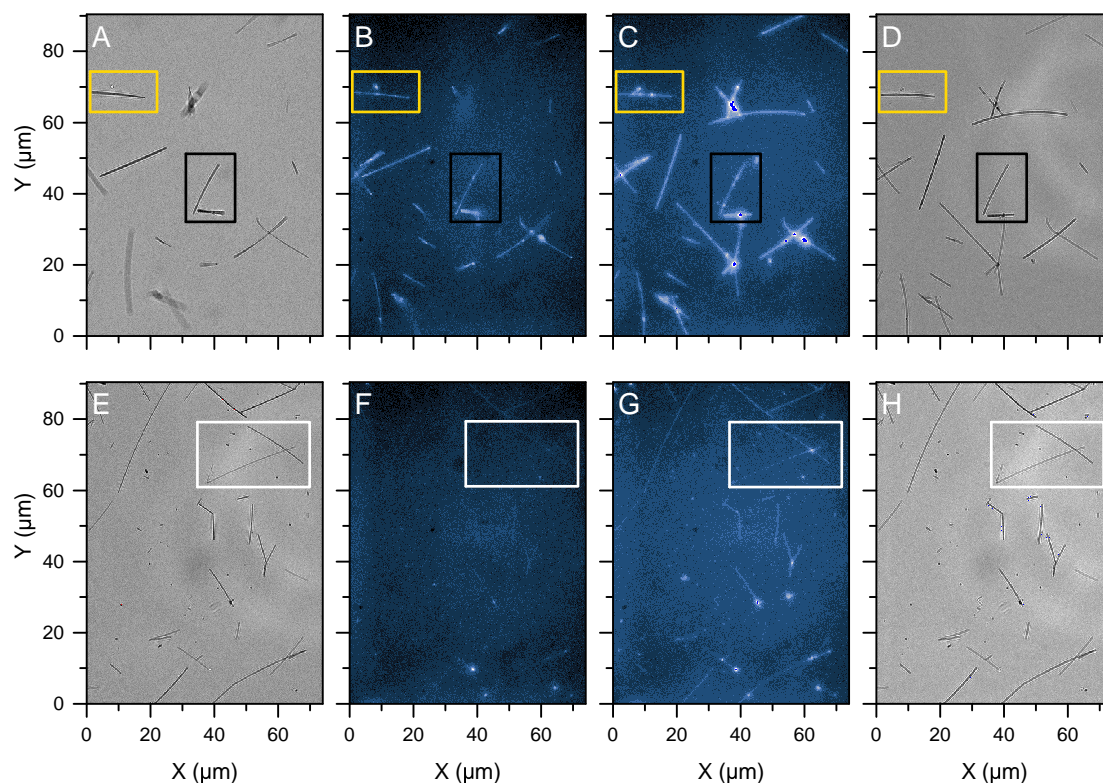
W celu określenia najbardziej prawdopodobnego mechanizmu powstawania nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs należy najpierw opisać właściwości UCNPs, pozbawionych warstwy oleinianu oraz właściwości AgNWs otoczonych warstwą PVP. Nanocząstki, otrzymane w wyniku opisanej w podrozdziale 2.1 syntezy, posiadają na swojej powierzchni warstwę oleinianu. Jego obecność na powierzchni nanocząstek możliwa jest dzięki oddziaływaniu jonów Y^{3+} , Yb^{3+} , Er^{3+} na powierzchni UCNPs z atomami tlenu z grupy $-\text{COO}^-$ z cząsteczki oleinianu [136]. Zastosowana procedura usuwania cząsteczek oleinianu z powierzchni nanocząstek polega na uprotonowaniu cząsteczek oleinianu. W wyniku uprotonowania powstają cząsteczki kwasu oleinowego, które odłączają się od

powierzchni nanocząstek. W konsekwencji powierzchnia nanocząstek zostaje dodatnio naładowana [136, 160, 161]. W pracy Bogdan *et al.* [136] dzięki przeprowadzeniu pomiarów potencjału zeta wykazano, że umieszczenie nanocząstek pozbawionych kwasu oleinowego w roztworze o pH wynoszącym 7.4 powoduje, że do powierzchni nanocząstek przyciągane są ujemne ładunki. W pracy Li *et al.* [160] pomiary potencjału zeta dla UCNPs zawieszonych w wodzie wykazały, że nanocząstki świeżo pozbawione oleinianu posiadają dodatni ładunek na swojej powierzchni. Natomiast z upływem czasu, ładunek ten staje się ujemny. Ze względu na brak możliwości przeprowadzenia pomiarów potencjału zeta nanocząstek, które wykorzystano do wytworzenia nanostruktur hybrydowych, założono, że ich powierzchnia naładowana jest ujemnie. Jak wspomniano w rozdziale 2.2 otrzymane w wyniku syntezy nanodrutu pokryte są warstwą PVP. PVP jest polimerem o właściwościach polarnych, co oznacza, że posiada moment dipolowy. Dzięki tej własności cząsteczki PVP znajdujące się na powierzchni AgNW mogą dipolowo oddziaływać atomami srebra znajdującymi się w nanodrucie. Oddziaływanie to odbywa się poprzez atomy tlenu z grupy karbonylowej znajdującej się w cząsteczce PVP [162]. Umieszczenie w wodzie zarówno nanodrutów otoczonych warstwą PVP, jak i ujemnie naładowanych nanocząstek powoduje współwystępowanie oddziaływania dipol-dipol między nanodrutem i PVP oraz oddziaływania między nanocząstką a cząsteczkami wody. Ze względu na ujemny ładunek znajdujący się na powierzchni nanocząstek między nanodrutem i nanocząstką może pojawić się oddziaływanie międzycząsteczkowe typu jon-dipol. Oddziaływania jon-dipol są dużo silniejsze niż oddziaływania dipol-dipol [163]. Z tego względu nanodrutu silniej oddziałują z nanocząstkami niż cząsteczkami PVP. W konsekwencji nanocząstki mogą znaleźć się bliżej powierzchni nanodrutu. Jak widać szczególnie na rysunkach 5.2(F-H) w wytworzonej nanostrukturze hybrydowej nanocząstki znajdują się pod warstwą polimeru PVP. Oznacza to, że nanostruktura ta powstaje poprzez adsorpcję nanocząstek bezpośrednio na powierzchni AgNWs.

Zaprezentowane na rysunku 5.2(A) zdjęcie SEM nanostruktury hybrydowej wykonano dla próbki nakropionej na podłożu krzemowe i pozbawionej rozpuszczalnika. Powstaje zatem pytanie, czy nanostruktura ta powstaje już w roztworze czy dopiero w trakcie wysychania próbki. Znajomość procesu powstawania nanostruktury AgNW-UCNPs jest istotna z aplikacyjnego punktu widzenia. Wytwarzanie zawiesin z nanostrukturami hybrydowymi daje potencjalnie większe możliwości otrzymywania docelowych urządzeń. Aby zbadać proces powstawania nanostruktury hybrydowej przeprowadzono obrazowanie procesu wysychania kropli roztworu za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola. Wykorzystany w badaniach mikroskop szczegółowo opisano w podrozdziale 2.5.7. Na początku za pomocą pomiarów w trybie transmisyjnym znaleziono obszar, który wykorzystano do dalszych badań. Następnie przez 5 minut co 1 sekundę w czasie wysychania kropli rejestrowano obrazy luminescencji (ang. *photoluminescence*, PL)

wzbudzanej promieniowaniem o długości fali 535 nm i o mocy 200 μ W. Ekspozycja UCNPs na promieniowanie o długości fali 535 nm powoduje bezpośrednie wzbudzenie w jonie Er^{3+} do stanu $^4S_{3/2}$. Z tego stanu pojawia się relaksacja bezpromienista do stanu $^4F_{9/2}$, a następnie przejście $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, któremu towarzyszy emisja fotonów o długości fali około 650 nm. W przeprowadzonym eksperymencie obserwowana jest zatem luminescencja stokesowska, która nie jest wynikiem procesu UC. W doświadczeniu zbadano dwie próbki różniące się od siebie sposobem przygotowania. Próbkę A wykonano w sposób opisany na początku tego rozdziału, tj. mieszało UCNPs i AgNW w roztworze, a następnie naniesiono kroplowo na szkiełko. Próbkę B przygotowano poprzez naniesienie na szkiełko zawiesiny AgNW, którą pozostawiono do wyschnięcia. Następnie, na tak przygotowane szkiełko naniesiono kroplowo roztwór zawierający UCNPs. W obu próbkach stężenie nanocząstek i drutów nanoszonych na podłoże było takie samo.

Wyniki obrazowania próbki A przedstawiono na rysunkach 5.3(A-D). Badany obszar wybrano tak, aby zawierał pojedyncze nanodrut. Na rysunku 5.3(A) przedstawiono obraz próbki A wykonany w trybie transmisyjnym przy oświetleniu światłem białym przed wyschnięciem kropli próbki. Obraz części drutów przedstawionych na zdjęciu jest rozmyty, co spowodowane jest ich ruchem w wodzie oraz tym, że znajdują się one poza płaszczyzną ogniskową obiektywu mikroskopu. Dla tego samego obszaru zbadano PL w trakcie wysychania próbki. Na rysunku 5.3(B) przedstawiono uśredniony obraz 50 pierwszych obrazów PL próbki. Jest to zatem obraz próbki przed wyschnięciem. Na rysunku 5.3(C) przedstawiono obraz 50 ostatnich obrazów PL próbki. Jest to zatem obraz próbki po wyschnięciu. Wyschniętą próbkę ponownie zobrazowano w trybie transmisyjnym, a otrzymane zdjęcie przedstawiono na rysunku 5.3(D). Zdjęcia wykonane w trybie transmisyjnym wskazują położenie AgNWs, natomiast w trybie fluorescencyjnym – położenie UCNPs. Jak można zaobserwować na rysunku 5.3(B) na obszarach zaznaczonych żółtą i czarną ramką, jeszcze przed odparowaniem wody zarejestrowana luminescencja nanocząstek koreluje z położeniem AgNW. Sugeruje to, że UCNPs zostały zaadsorbowane na powierzchni AgNW już w roztworze. Na rysunku 5.3(C) na obszarach zaznaczonych ramkami można zauważyć wzrost PL po wyschnięciu próbki w porównaniu do PL próbki przed wyschnięciem. Wskazuje to, że odparowywanie wody powoduje, że swobodne UCNPs, niezaadsorbowane pierwotnie na powierzchni nanodrutu, w miarę zmniejszania się ilości rozpuszczalnika agregują w okolicach nanodrutu. Wykonane po wyschnięciu kropli zdjęcie w trybie transmisyjnym, przedstawione na rysunku 5.3(D), potwierdza, że zarejestrowana PL odpowiada położeniom nanodrutów na podłożu. Wyniki obrazowania próbki B przedstawiono na rysunkach 5.3(E-H). Na rysunku 5.3(E) przedstawiono obraz wykonany w trybie transmisyjnym dla szkiełka z naniesionymi na jego powierzchnię nanodrutami. Na rysunkach 5.3(E-F) przedstawiono uśrednione, analogicznie jak w przypadku próbki A, obrazy PL przed i po wyschnięciu kropli zawierającej UCNPs.

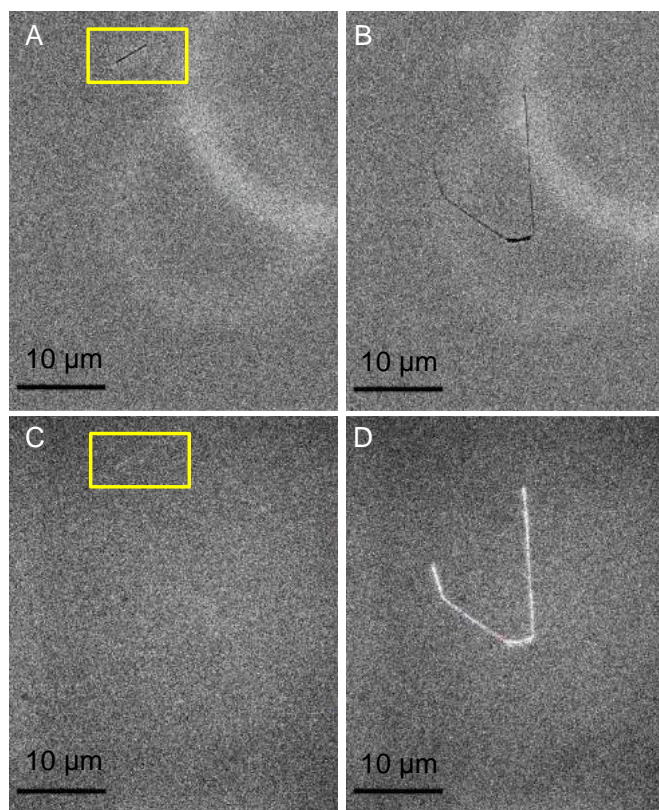


RYSUNEK 5.3: Wyniki obrazowania próbki A i B wykonane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola. Obrazowanie przeprowadzono w trybie transmisyjnym i fluorescencyjnym. Pomiar w trybie fluorescencyjnym wykonano wykorzystując pobudzenie próbek za pomocą promieniowania o długości fali 535 nm z mocą 200 μ W. (A) Obraz próbki A nałożonej kroploво na szklane podłoże wykonany w trybie transmisyjnym. (B) Uśredniony obraz próbki A przed wyschnięciem wykonany w trybie fluorescencyjnym. (C) Uśredniony obraz próbki A po wyschnięciu wykonany w trybie fluorescencyjnym. (D) Obraz próbki A po wyschnięciu wykonany w trybie transmisyjnym. (E) Obraz AgNW nałożonych na szklane podłoże wykonany w trybie transmisyjnym. (F) Uśredniony obraz nanocząstek nałożonych na podłoże z AgNW przed wyschnięciem wykonany w trybie fluorescencyjnym. (G) Uśredniony obraz nanocząstek nałożonych na podłoże z AgNW po wyschnięciu wykonany w trybie fluorescencyjnym. (H) Obraz próbki B po wyschnięciu wykonany w trybie transmisyjnym. Ramkami zaznaczono przykładowe nanodruty.

Na rysunku 5.3(H) przedstawiono obraz wyschniętej próbki w trybie transmisyjnym. Jak można zauważyć na rysunku 5.3(F) na obszarze zaznaczonym białą ramką nie zarejestrowano PL nanocząstek. Luminescencja zarejestrowana została jedynie dopiero po odparowaniu wody, co widoczne jest na rysunku 5.3(G). Jak można zauważyć na rysunku 5.3(H) naniesienie na szkiełko zawiesiny UCNP w wodzie nie spowodowało zmiany położenia nanodrutów na szkiełku w porównaniu do ich położenia przed naniesieniem próbki. Zatem w przypadku próbki B przed wyschnięciem nie zaobserwowano luminescencji skorelowanej z położeniem nanodrutów. Dopiero po wyschnięciu kropli można zaobserwować, że położenie świecących nanocząstek odpowiada położeniu nanodrutów. Otrzymane wyniki wskazują zatem, że nanostruktury hybrydowe AgNW-UCNPs powstają w sposób dwuetapowy. Pierwszy etap zachodzi w roztworze, czyli bezpośrednio po umieszczeniu nanocząstek oraz nanodrutów srebra w wodzie. Na etapie tym UCNP adsorbują się

na powierzchni AgNWs. Drugi etap pojawia się w czasie wysychania próbki, w którym UCNPs dodatkowo agregują wokół AgNWs.

W celu potwierdzenia tej tezy wykonano jeszcze jeden eksperyment, w którym AgNWs oraz mieszaninę AgNWs oraz UCNPs zawieszono w polimerze PVA (ang. *polivinył alcohol*). Wszystkie próbki naniesiono na szkiełka mikroskopowe metodą powlekania obrotowego. Próbki naniesione na szkiełko tworzą cienką warstwę polimeru, w której UCNPs i AgNW nie mogą się swobodnie przemieszczać. Wykonane preparaty zobrazowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, podobnie jak poprzednio, w trybie transmisyjnym oraz przy pobudzeniu promieniowaniem o długości fali 535 nm.



RYSUNEK 5.4: Zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego dla (A) AgNW oraz (B) nanostruktury AgNW-UCNPs zawieszonych w polimerze PVA i naniesionych metodą powlekania obrotowego na podłoże szklane. Zdjęcia wykonano w trybie transmisyjnym. Zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego w trybie fluorescencyjnym dla (C) AgNW oraz (D) nanostruktury AgNW-UCNPs. W trybie fluorescencyjnym obraz zarejestrowano dla pobudzenia promieniowaniem o długości fali 535 nm z mocą 200 μ W. Żółta ramka w części (A) i (C) wskazuje położenie AgNW w próbce.

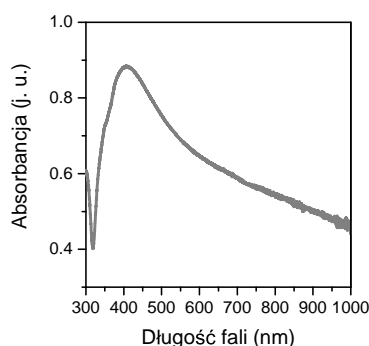
Na rysunku 5.4(A) oraz (B) przedstawiono odpowiednio obrazy nanodrutu oraz mieszaniny nanodrutu i nanocząstek wykonane w trybie transmisyjnym. Dla tych samych obszarów wykonano obrazowanie w trybie fluorescencyjnym, które przedstawiono na rysunkach 5.4(C) i (D). Jak można zauważyć na rysunku 5.4(C) dla próbki zawierającej jedynie AgNW nie zarejestrowano luminescencji. Luminescencję zarejestrowano natomiast dla próbki zawierającej mieszaninę nanodrutów oraz nanocząstek. Przedstawiona

na rysunku 5.4(D) luminescencja spowodowana wzbudzeniem UCNPs jest skorelowana z położeniem nanodrutu. Oznacza to, że UCNPs musiały zostać zaadsorbowane na powierzchni AgNW w momencie wymieszania obu nanostruktur w wodzie. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują zatem na słuszność postawionej wcześniej tezy, że pierwszy etap powstawania nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs odbywa się w momencie umieszczenia UCNPs oraz AgNW w wodzie.

5.2 Wpływ plazmonów generowanych w AgNW na wydajność przejść optycznych w jonie Er^{3+}

W celu wyjaśnienia sposobu, w jaki obecność AgNWs wpływa na poszczególne etapy procesu UC należy przypomnieć charakterystykę rezonansu plazmonowego. Jak wspomniano w rozdziale 1.5.3 dla małych struktur metalicznych, takich jak, np. nanocząstki czy nanosfery złota obserwuje się zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonowy. Położenie tego rezonansu jest ściśle określone przez rozmiar, geometrię i skład chemiczny dla danej nanostruktury metalicznej. Ze względu na zlokalizowany charakter rezonansu widmo ekstynkcji tych nanostruktur posiada wąskie maksimum [96, 164]. Położenie rezonansu można dobrać do energii wzbudzenia lub emisji emitera [94, 96, 98, 99].

W niniejszej pracy do badań wykorzystano nanodrutu ze srebra, dla których obserwuje się występowanie SPPs [97, 101]. Na rysunku 5.5 przedstawiono widmo ekstynkcji AgNWs wykorzystywanych do badań opisanych w niniejszej pracy. Obserwowane widmo ekstynkcji nanodrutów jest szerokie. Oznacza to, że zarówno wydajność wzbudzenia jak i deekscytacji UCNPs może być zmieniona poprzez oddziaływanie plazmonów z emiterami. Jak można zauważyć na rysunku 5.5 maksimum ekstynkcji występuje przy długości fali około 405 nm, ale ekstynkcja pozostaje niezerowa w całym zmierzonym zakresie spektralnym. Z tego względu można spodziewać się, że obecność plazmonów generowanych w AgNW spowoduje silniejszy wpływ na wydajność emisji niż wydajność wzbudzenia w jonach Er^{3+} .



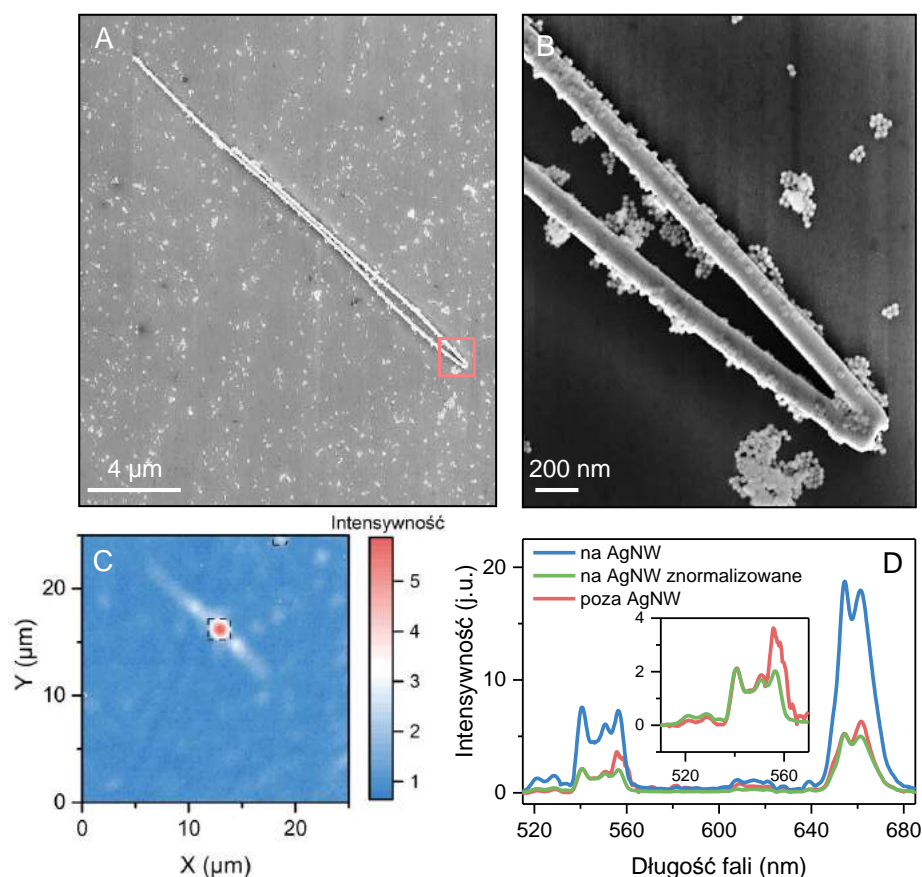
RYSUNEK 5.5: Widmo ekstynkcji nanodrutów srebra zawieszonych w wodzie.

Generowane w srebrnym nanodrucie plazmony mogą zatem wpływać na wszystkie etapy procesu UC, tj. wzbudzenie, przekaz energii oraz emisję w jonie Er^{3+} . Z tego względu w dalszej części pracy zostaną przeprowadzone pomiary widm i dynamik UCL dla nanocząstek znajdujących się blisko i daleko od nanodrutu oraz symulacje rozkładu lokalnego pola elektrycznego wokół nanocząstek umieszczonych na nanodrucie i na podłożu krzemowym. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń umożliwią rozstrzygnięcie, na które przejścia optyczne w jonie Er^{3+} wpływa bliskość nanodrutu.

5.3 Pomiary rozkładu przestrzennego UCL nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs

W celu zbadania, jak obecność nanodrutów wpływa na UCL nanocząstek wykonano pomiary rozkładu przestrzennego luminescencji wykorzystując technikę mapowania hiperspektralnego. Technika ta polega, w tym wypadku, na pomiarze widma UCL w zakresie od 510 do 685 nm dla każdego punktu na mapowanym obszarze. Dzięki pomiarom widm możliwe jest zbadanie, jak obecność AgNWs wpływa na względne intensywności UCL poszczególnych pasm.

Do przeprowadzenia pomiarów map UCL przygotowano dwa rodzaje próbek. Pierwsza próbka, oznaczana dalej jako P1, zawierała nanostruktury hybrydowe składające się z nanodrutów srebra i jednorodnych nanocząstek o strukturze heksagonalnej. Średnica wykorzystanych nanocząstek wynosiła 20.9 ± 1.7 nm. Na rysunkach 5.6(A-B) przedstawiono zdjęcia SEM wykonane dla próbki P1. Dla obszarów przedstawionych na zdjęciach SEM przeprowadzono pomiary map UCL. Pomiary map UCL, prezentowane w niniejszym rozdziale, wykonano wykorzystując układ pomiarowy szczegółowo opisany w podrozdziale 2.5.6. Pomiary przeprowadzono wykorzystując wzbudzenie promieniowaniem podczerwonym o długości fali 976 nm o gęstości mocy rzędu 100 kWcm^{-2} . Wykorzystanie w pomiarach tak dużej mocy wzbudzenia powoduje wydajne wzbudzenie tryfotonowe do stanu ${}^2G_{7/2}$ w jonie Er^{3+} . Jak pokazano na rysunku 1.5(A) w wyniku takiego wzbudzenia, a następnie relaksacji bezpromienistej ze stanu ${}^2G_{7/2}$ do stanu ${}^2H_{9/2}$ możliwe jest wyemitowanie fotonu o długości fali 555 nm. Jako, że pasmo wokół długości fali 555 nm zależy od mocy pobudzenia silniej niż pozostałe (patrz podrozdział 1.5.1) jest najbardziej czułe na odstrojenie przestrzenne lasera wśród pasm w zielonym zakresie spektralnym. Z tego powodu mapy UCL narysowano dla tego pasma. Na rysunku 5.6(C) przedstawiono mapę całki intensywności luminescencji I_{555} . Jak można zauważyć, wartości I_{555} wyznaczone dla nanocząstek znajdujących się blisko nanodrutu są większe niż intensywności I_{555} dla nanocząstek znajdujących się daleko od nanodrutu.



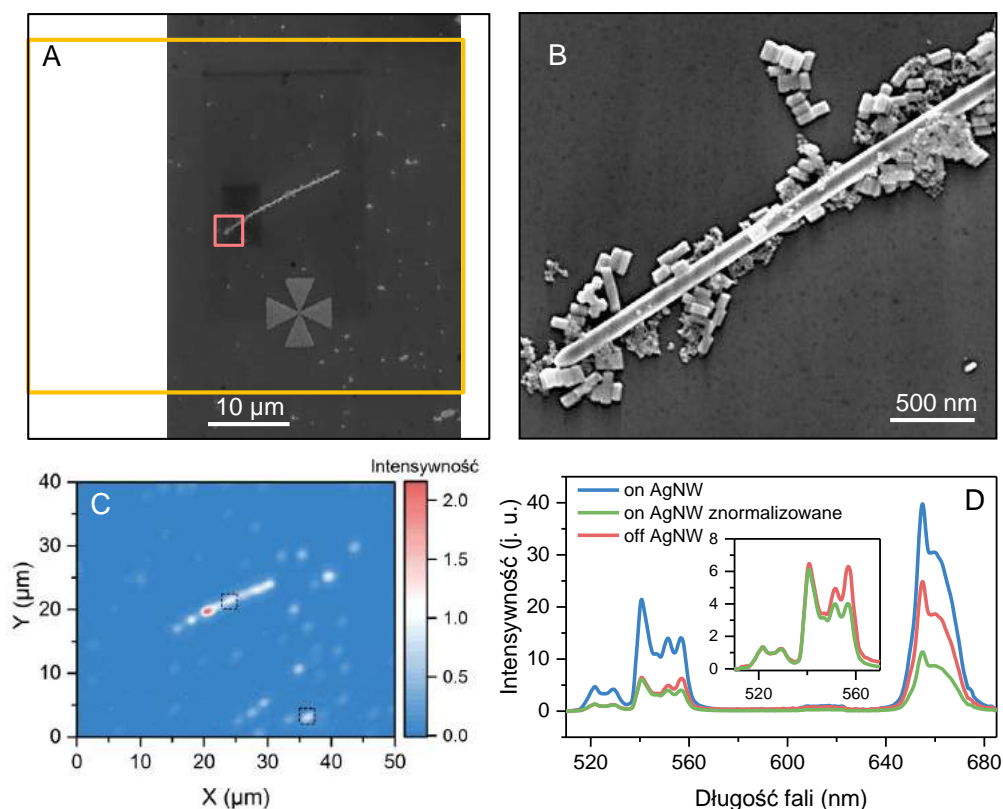
RYSUNEK 5.6: (A) Zdjęcie SEM nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs w próbce P1. (B) Zdjęcie SEM obszaru zaznaczonego czerwonym kwadratem w części (A) przedstawiające fragment nanostruktury hybrydowej w większym powiększeniu. (C) Mapa rozkładu UCL pasma wokół długości fali 555 nm zmierzona dla próbki P1. Mapę UCL wykonano stosując wzbudzenie za pomocą promieniowania o długości fali 976 nm o gęstości mocy 152 kWcm^{-2} . (D) Widma intensywności UCL nanocząstek na nanodrucie AgNWs (kolor niebieski) i poza nim (kolor czerwony). Widmo UCNPs w sąsiedztwie nanodrutu znormalizowane do intensywności pasma wokół długości fali 540 nm oznaczono kolorem zielonym.

Należy podkreślić, że sygnał UCL od nanocząstek blisko nanodrutu pochodzi zarówno od nanocząstek zaadsorbowanych na AgNW, jak i zaagregowanych wokół AgNW. Jest to konsekwencja stosunkowo dużej średnicy plamki lasera wzbudzającego wynoszącej około $1.2 \mu\text{m}$. Jest ona znacznie większa niż średnica AgNW, która wynosi około 100 nm oraz średnica nanocząstek, która wynosi około 20 nm. Zatem sygnał UCL obserwowany blisko nanodrutu pochodzi zarówno od emitujących jonów Er^{3+} oddziałujących z plazmonami w nanodrucie, jak i tych nieoddziałujących. Ze względu na stosunkowo duży rozmiar plamki lasera, jak i zależnej od odległości natury oddziaływań emiterów z plazmonami sygnał pochodzący od oddziałujących i nieoddziałujących emiterów jest trudny do rozdzielania. W dalszej części pracy nanocząstki znajdujące się blisko nanodrutu oznaczono jako znajdujące się „na nanodrucie”, zaś nanocząstki znajdujące się daleko od nanodrutu jako „poza nanodrucie”.

W celu oszacowania, jak obecność AgNW wpływa na intensywność widm UCL wyznaczono średnie widma intensywności UCL nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” i „poza nanodrutem”. Otrzymano je poprzez uśrednienie widm UCL zarejestrowanych na obszarze odpowiadającym położeniu nanodrutu. Średnie widma UCL nanocząstek znajdujących się „poza nanodrutem” wyznaczono poprzez uśrednienie widm UCL z pozostałego obszaru. Następnie otrzymane widma UCL znormalizowano do liczby punktów, z których zbierano widma wykorzystane do wyznaczenia średniej. Uśrednione dla próbki P1 widma UCL przedstawiono na rysunku 5.6(D). Średnia intensywność UCL pasma wokół długości fali 540 nm nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” jest ok. 4 razy większa niż średnia intensywność tego pasma zmierzona dla nanocząstek położonych „poza nanodrutem”. Jednakże, w badanej próbce rozmieszczenie nanocząstek na podłożu jest niejednorodne, co może wpływać na zbadaną intensywność UCL. Z tego względu zaobserwowany wzrost intensywności UCL nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” nie musi być spowodowany wystąpieniem wzmocnienia plazmonowego. W celu sprawdzenia, czy obecność nanodrutów wpływa na względne intensywności poszczególnych pasm UCL wyznaczono stosunki intensywności pasm UCL. Widmo nanocząstek „na nanodrucie” znormalizowano do maksimum intensywności widma wokół długości fali 540 nm (linia zielona na rysunku 5.6(D)). Dla wyznaczonych średnich widm UCL zaobserwowano spadek średniego stosunku intensywności I_{555}/I_{540} dla nanocząstek umieszczonych „na nanodrucie” w porównaniu ze stosunkiem wyznaczonym dla nanocząstek „poza nanodrutem”. Spadek ten wyraźnie widać na wstawce do rysunku 5.6(D). Dla nanocząstek „na nanodrucie” średni stosunek I_{555}/I_{540} wynosi około 0.9. Natomiast dla nanocząstek „poza nanodrutem” wynosi około 1.6, czyli jest prawie dwukrotnie wyższy. Jak można zauważyć na rysunku 5.6(D) średni stosunek intensywności UCL pasma wokół długości fali 650 nm do intensywności pasma wokół długości fali 540 nm (I_{650}/I_{540}) jest podobny dla nanocząstek „na nanodrucie” i „poza nanodrutem” i wynosi ok. 2.4. Średni stosunek intensywności pasm I_{520}/I_{540} niezależnie od położenia nanocząstek względem nanodrutu jest taki sam i wynosi ok. 0.2.

Druga próbka wykorzystana do badań prezentowanych w tym rozdziale także zawierała nanostruktury hybrydowe składające się z nanodrutów srebra oraz nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. Próbkę tą oznaczono dalej jako P2. Na rysunkach 5.7(A-B) przedstawiono zdjęcia SEM próbki P2. Na rysunku 5.7(B) przedstawiono zdjęcie obszaru zaznaczonego czerwoną ramką na rysunku 5.7(A) w większym powiększeniu. Jak można zauważyć próbka ta, zawiera dwie frakcje nanocząstek. Pierwszą frakcję stanowią duże, regularne UCNPs, których kształt wskazuje, że posiadają one strukturę heksagonalną. Drugą frakcję stanowią małe, nieregularne UCNPs, co sugeruje, że mają one strukturę kubiczną. Jak opisano w rozdziałach 1.4 i 3.2.1 nanocząstki o strukturze heksagonalnej wykazują większą wydajność UCL niż nanocząstki o strukturze kubicznej

[63]. Dodatkowo, jak widać na rysunku 5.7(B) nanocząstki o strukturze heksagonalnej wykorzystywane w doświadczeniu mają dużo większy rozmiar niż nanocząstki o strukturze kubicznej. Rozmiar nanocząstek wpływa na wydajność UCL, ponieważ UCL z jonów Er^{3+} znajdujących blisko powierzchni jest silnie wygaszana. Właściwość ta powoduje, że im mniejszy jest stosunek powierzchni do objętości nanocząstki tym większa jest wydajność UCL [153]. Zatem założono, że mierzony sygnał z próbki pochodzi od nanocząstek o strukturze heksagonalnej.



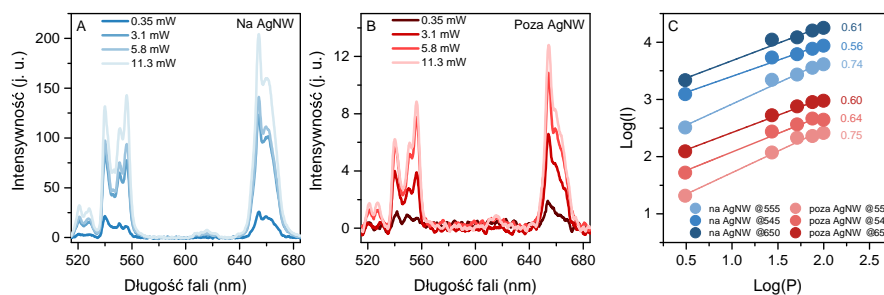
RYSUNEK 5.7: (A) Zdjęcie SEM nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs w próbce P2. (B) Zdjęcie SEM obszaru zaznaczonego czerwonym kwadratem w części (A) przedstawiające fragment nanostruktury hybrydowej w większym powiększeniu. (C) Mapa rozkładu UCL pasma wokół długości fali 555 nm zmierzona dla próbki P2. Mapę UCL wykonano stosując wzbudzenie za pomocą promieniowania podczerwonego o długości fali 976 nm o gęstości mocy 179 kWcm^{-2} . (D) Widma intensywności UCL nanocząstek UCNPs przy nanodrucie AgNWs (kolor niebieski) i poza nim (kolor czerwony). Widmo nanocząstek w sąsiedztwie nanodrutu znormalizowane do intensywności pasma wokół długości fali 540 nm oznaczono kolorem zielonym.

Wyznaczona na podstawie I_{555} mapa UCL przedstawiona jest na rysunku 5.7(C). Mapowany obszar odpowiada obszarowi zaznaczonemu żółtą ramką na rysunku 5.7(A). Jak można zauważyć na rysunku 5.7(C) rozłożenie nanocząstek na mapowanym obszarze jest nierównomierne. Na rysunku 5.7(D) przedstawiono średnie widma UCL nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” i „poza nanodrutem”. W próbce P2 zaobserwowano średnio czterokrotny wzrost intensywności UCL pasma zielonego dla nanocząstek „na

nanodrucie” w porównaniu do nanocząstek „poza nanodrutem”. Na podstawie uśrednionych widm intensywności UCL, przedstawionych na rysunku 5.7(D) wyznaczono średnie stosunki intensywności UCL poszczególnych pasm. Średni stosunek I_{555}/I_{540} , gdy nanocząstki znajdują się „na nanodrucie” wynosi 0.7, podczas gdy „poza nanodrutem” wartość wynosi 1, czyli 1.5 raza więcej, podobnie jak dla próbki P1. Wartość średniego stosunku I_{650}/I_{540} wynosi 1.8 gdy nanocząstki umieszczone są „na nanodrucie”. Natomiast gdy nanocząstki znajdują się „poza nanodrutem” stosunek ten wynosi 4, czyli ponad dwa razy więcej. W przypadku średnich stosunków intensywności I_{520}/I_{540} , podobnie, jak w próbce P1, nie zaobserwowano zmiany ich wartości po umieszczeniu UCNPs w sąsiedztwie AgNWs. Analiza widm intensywności UCL oraz stosunków poszczególnych pasm emisyjnych wyznaczonych dla obu próbek sugeruje, że obecność AgNW wpływa na procesy wzbudzenia w jonie Er^{3+} . W konsekwencji prowadzi to do zmiany wartości względnych stosunków intensywności UCL dla poszczególnych pasm emisyjnych.

5.4 Wpływ mocy promieniowania wzbudzającego na nanostruktury hybrydowe AgNW-UCNPs

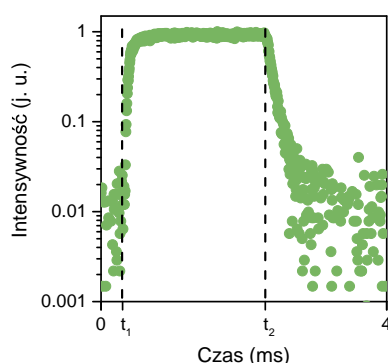
Zanim podjęta zostanie próba wyjaśnienia wpływu bliskości nanodrutów na UCL należy przedyskutować w jakich warunkach pobudzenia prowadzone są niniejsze doświadczenia. Moc promieniowania użyta do wzbudzenia UCL była rzędu 100 kWcm^{-2} . Jak wspomniano w podrozdziale 1.5.1 intensywność I w funkcji mocy P opisuje zależność $I \propto P^n$. W zakresie małych mocy wartość n odpowiada liczbie fotonów, których absorpcja jest potrzebna do wzbudzenia elektronów do stanów emisyjnych. W zakresie dużych mocy stany pośrednie ulegają nasyceniu. W tych warunkach wartość n wynosi 1. Dalszy wzrost mocy pobudzenia powoduje nasycenie także stanów emisyjnych [80, 83]. W celu sprawdzenia, jak moc promieniowania wzbudzającego wpływa na UCL nanocząstek znajdujących się „na” i „poza nanodrutem” przeprowadzono pomiary widm UCL próbki nanostruktur hybrydowych naniesionych na podłoże krzemowe. Otrzymane widma UCL przedstawiono na rysunkach 5.8(A) i (B). Na podstawie tych widm wyznaczono całki intensywności UCL pasm wokół długości fali 540, 555 i 650 nm. Otrzymane wartości całek w funkcji mocy wzbudzenia przedstawiono na rysunku 5.8(C). Do otrzymanej zależności dopasowano funkcję liniową, dzięki czemu możliwe jest wyznaczenie liczby fotonów wzbudzających n . Jak można zauważyć na rysunku 5.8(C) dla wszystkich wyznaczonych zależności $I(P)$ nachylenie prostej dopasowania jest mniejsze niż 1. Oznacza to, że w warunkach pobudzenia wykorzystanych w pomiarach widm oraz zaników UCL stany pośrednie są nasycone, a stany emitujące są bliskie nasycenia.



RYSUNEK 5.8: Widma intensywności UCL nanocząstek przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym o długości fali 976 nm o różnej mocy, znajdujących się (A) na nanodrucie i (B) poza nim. (C) Zależność intensywności UCL nanocząstek, umieszczonych na AgNW (kolor niebieski) i poza nim (kolor czerwony) od mocy promieniowania wzbudzającego w skali podwójnie logarytmicznej.

5.5 Pomiary UCL rozdzielonej w czasie nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs

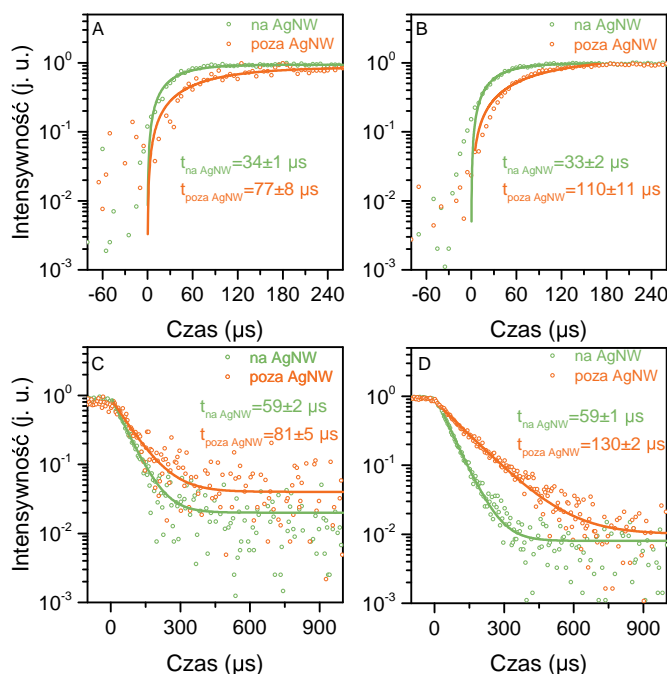
Jak wspomniano w podrozdziale 1.5.3 znajomość zmian czasu zaniku UCL nanocząstek po umieszczeniu ich w sąsiedztwie struktur metalicznych pozwala określić, w jaki sposób bliskość nanostruktur metalicznych wpływa na poszczególne etapy procesu UC. Pomiary UCL rozdzielonej w czasie przeprowadzono wykorzystując układ opisany w podrozdziale 2.5.6. Na rysunku 5.9 przedstawiono przykładowy przebieg czasowy UCL zmierzony dla nanostruktury hybrydowej. W dalszej części pracy, w celu ułatwienia analizy czasów narastania i zaniku UCL oś czasową przesunięto tak, aby $t = 0$ odpowiadało odpowiednio momentowi włączenia (t_1) i wyłączenia (t_2) lasera (patrz rysunek 5.9).



RYSUNEK 5.9: Przykładowy przebieg czasowy pomiaru narastania i zaniku UCL nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs. Czas t_1 odpowiada momentowi włączenia lasera, natomiast t_2 odpowiada momentowi wyłączenia lasera.

Pomiary czasów narastania i zaników UCL zmierzono dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” oraz „poza nanodrutem”. Miejsca, dla których zbadano narastania i zaniki UCL oznaczono na rysunku 5.6(C) czarnymi ramkami. Na rysunku 5.10(A)

przedstawiono wyniki pomiarów narastania UCL w próbce P1 dla nanocząstek „na nanodrucie” oraz „poza nanodrutem” dla pasma zielonego (540 nm). Narastanie UCL nanocząstek umieszczonych „na nanodrucie” zachodzi szybciej niż „poza nanodrutem”. Na rysunku 5.10(B) przedstawiono wynik pomiarów narastania UCL dla pasma czerwonego (650 nm). W tym przypadku także zaobserwowano przyspieszenie czasu narastania UCL, gdy nanocząstki umieszczone były „na nanodrucie” w porównaniu do czasu narastania wyznaczonego dla nanocząstek „poza nanodrutem”.



RYSUNEK 5.10: (A-B) Krzywe narastania UCL wokół długości fali (A) 540 nm oraz (B) 650 nm zmierzonych dla UCNPów znajdujących się w sąsiedztwie AgNW (kolor zielony) oraz poza nim (kolor pomarańczowy) w próbce P1. (C-D) Krzywe zaniku UCL wokół długości fali (C) 540 nm oraz (D) 650 nm zmierzonych dla UCNPów znajdujących się w sąsiedztwie AgNW oraz poza nim. Linie ciągłe na rysunkach odpowiadają dopasowanym do danych eksperymentalnych funkcjom jednowykładniczego narastania lub zaniku opisanych odpowiednio wzorem 5.1 oraz 5.2.

W celu oszacowania wartości czasów narastania UCL poszczególnych pasm do otrzymanej zależności intensywności UCL od czasu $I(t)$ dopasowano funkcję jednowykładniczego narastania wyrażoną wzorem:

$$I_n(t) = A \left(1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_n} \right) \right) \quad (5.1)$$

gdzie:

A – maksymalna wartość intensywności UCL,

τ_n – czas narastania UCL.

W przypadku pasma 540 nm τ_n dla nanocząstek „poza nanodrutem” wynosi 77 μs . Dla nanocząstek umieszczonych „na nanodrucie” τ_n wynosi 34 μs . Obecność nanodrutu powoduje zatem ponad dwukrotny spadek wartości τ_n . Dla pasma wokół długości fali

650 nm, otrzymana w wyniku dopasowania, wartość τ_n dla nanocząstek „poza nanodrutem” wynosi 110 μs , a wartość τ_n dla nanocząstek „na nanodrucie” – 33 μs . Obecność nanodrutu powoduje zatem, tak jak w przypadku pasma zielonego, ponad dwukrotny spadek wartości τ_n .

Na rysunku 5.10(C) i (D) przedstawiono krzywe zaników UCL odpowiednio pasma zielonego i czerwonego dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” oraz „poza nanodrutem”. Dla obu pasm zaobserwowano przyspieszenie zaniku UCL nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” w porównaniu do nanocząstek „poza nanodrutem”. W celu oszacowania czasów zaniku UCL dla poszczególnych pasm do otrzymanych danych doświadczalnych dopasowano funkcję zaniku jednowykładniczego wyrażonego wzorem:

$$I_z(t) = A \exp\left(\frac{-t}{\tau_z}\right) + b \quad (5.2)$$

gdzie:

A – początkowa wartość intensywności UCL,

τ_z – czas zaniku UCL,

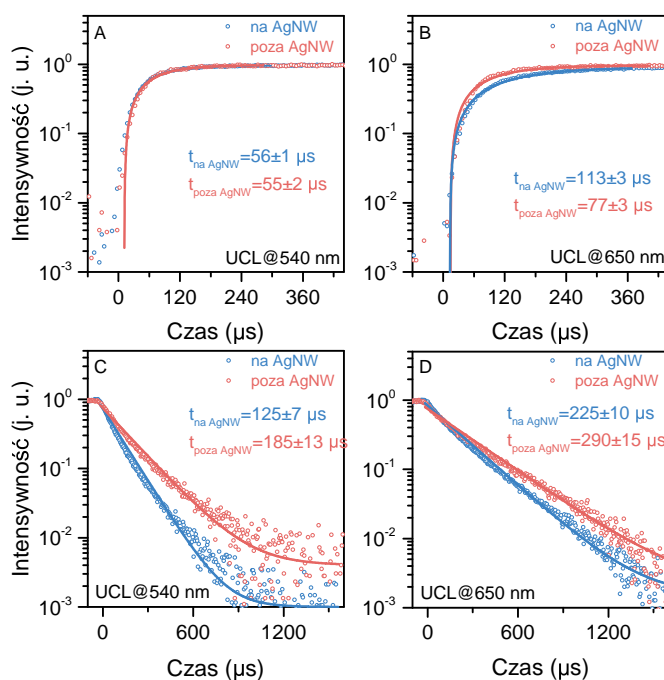
b – tło.

W przypadku pasma zielonego dla nanocząstek „poza nanodrutem” τ_z wynosi 81 μs , a dla nanocząstek „na nanodrucie” τ_z wynosi 59 μs . Bliskość AgNW powoduje zatem skrócenie τ_z o 1.4 raza. W przypadku pasma czerwonego τ_z wyznaczony dla nanocząstek „poza nanodrutem” wynosi 130 μs . Natomiast τ_z dla nanocząstek „na nanodrucie” wynosi 59 μs . Obecność AgNW powoduje zatem ponad dwukrotne skrócenie wartości τ_z .

Pomiary narastania i zaniku UCL wykonano także dla próbki P2. Miejsca, dla których zbadano narastania i zaniki UCL oznaczono na rysunku 5.7(C) czarnymi ramkami. Na rysunku 5.11(A) i (B) przedstawiono wyniki pomiarów narastania pasma zielonego oraz pasma czerwonego. Otrzymane krzywe sugerują, że w przypadku pasma zielonego narastanie UCL nanocząstek „na nanodrucie” oraz „poza nanodrutem” jest podobne. Zaś w przypadku pasma czerwonego narastanie UCL nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” jest znacznie wolniejsze niż obserwowane dla nanocząstek „poza nanodrutem”. Do otrzymanych danych doświadczalnych dopasowano funkcję $I_n(t)$ opisaną wzorem 5.1. W wyniku dopasowania wyznaczono, że czas narastania UCL pasma zielonego dla nanocząstek znajdujących się „na” i „poza nanodrutem” był taki sam i wynosił 55 μs . W przypadku pasma czerwonego czas narastania UCL nanocząstek „poza nanodrutem” wynosił 77 μs . Dla nanocząstek umieszczonych „na nanodrucie” czas ten wydłużył się do 113 μs . Na rysunku 5.11(C) przedstawiono krzywe zaniku UCL pasma zielonego dla

nanocząstek „na nanodrucie” i „poza nanodrutem”. Zanik UCL zmierzony dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” jest widocznie szybszy niż zanik wyznaczony dla nanocząstek znajdujących się „poza nanodrutem”.

Na rysunku 5.11(D) przedstawiono krzywe zaniku UCL pasma czerwonego dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” i „poza nanodrutem”. W przypadku pasma czerwonego obecność nanodrutu także powoduje przyspieszenie zaniku UCL. W celu wyznaczenia czasów zaniku UCL do danych doświadczalnych przedstawionych na rysunkach 5.11(C) i (D), analogicznie jak w próbie P1, dopasowano funkcję $I_z(t)$ opisaną wzorem 5.2. W przypadku pasma zielonego dla nanocząstek znajdujących się „poza nanodrutem” czas τ_z wynosi $185 \mu\text{s}$. Czas ten wyznaczony dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” wynosi $125 \mu\text{s}$. Wyznaczone wartości wskazują, że obecność AgNW powoduje spadek wartości τ_z o ok. 1.5 raza. Wyznaczona wartość τ_z dla pasma czerwonego, gdy nanocząstki znajdowały się „poza nanodrutem” wynosi $290 \mu\text{s}$. Natomiast dla nanocząstki umieszczone były „na nanodrucie” czas τ_z skrócił się do $225 \mu\text{s}$. Czas τ_z spowodowany obecnością AgNW skrócił się zatem 1.3 raza.



RYSUNEK 5.11: (A-B) Krzywe narastania UCL wokół długości fali (A) 540 nm oraz (B) 650 nm zmierzonych dla UCNPów znajdujących się w sąsiedztwie AgNW (kolor niebieski) oraz poza nim (kolor czerwony) w próbce P2. (C-D) Krzywe zaniku UCL wokół długości fali (C) 540 nm oraz (D) 650 nm zmierzonych dla UCNPów znajdujących się w sąsiedztwie AgNW oraz poza nim. Linie ciągłe na rysunkach odpowiadają dopasowanym do danych eksperymentalnych funkcjom jednowykładniczego narastania lub zaniku opisanych odpowiednio wzorem 5.1 oraz 5.2.

Należy podkreślić, że w przeprowadzonych pomiarach narastania i zaniku UCL dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” otrzymane wartości czasów τ_z są uśrednionymi wartościami czasów wyznaczonych dla nanocząstek zaadsorbowanych i oddziałujących z AgNW oraz nanocząstek nieoddziałujących z AgNW. Co więcej, obie wartości stanowią średnią po rozmieszczeniu jonów Er^{3+} wewnątrz nanocząstki. W konsekwencji rzeczywista wartość czasu zaniku/narastania UCL dla jonów Er^{3+} znajdujących się blisko nanodrutu może różnić się tych parametrów UCL wyznaczonych dla jonów Er^{3+} położonych daleko od nanodrutu.

5.6 Symulacje FDTD nanostruktur hybrydowych AgNW-UCNPs

Wydajność poszczególnych przejść optycznych opisuje złota reguła Fermiego [94]. Zgodnie z tą regułą prawdopodobieństwo wystąpienia przejścia γ_{if} opisuje, wspomniany w podrozdziale 1.5.3, wzór:

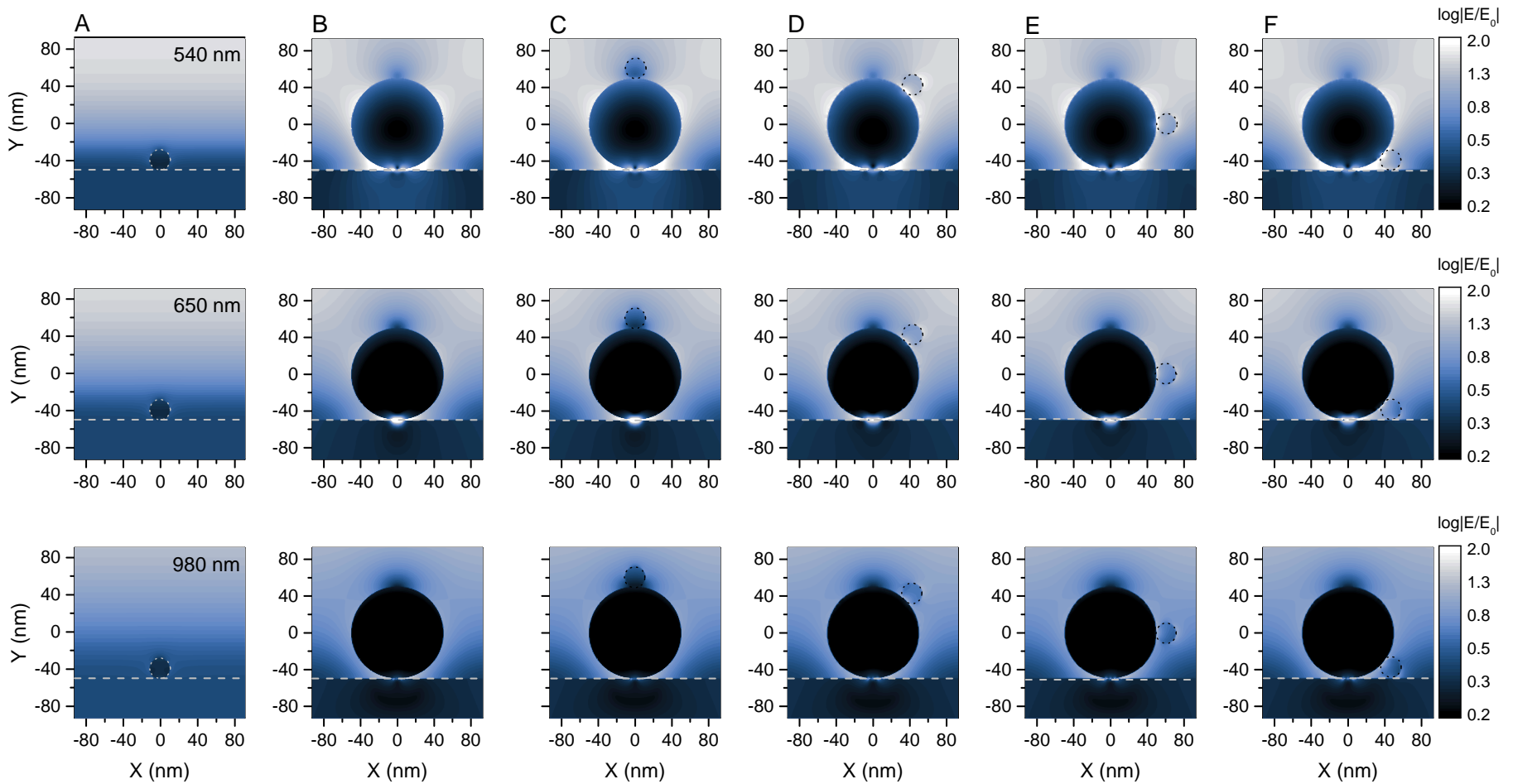
$$\gamma_{if} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle i | \mathbf{E} \cdot \mathbf{p} | f \rangle|^2 \rho_f \quad (5.3)$$

Zgodnie z powyższym wzorem zmiana lokalnego pola elektrycznego prowadzi do zmiany prawdopodobieństwa przejścia optycznego. W celu sprawdzenia, jak zmiana pola elektrycznego spowodowana obecnością plazmonów powierzchniowych generowanych w nanodrucie wpływa na prawdopodobieństwa przejść optycznych w jonie Er^{3+} wykonano symulacje pola elektrycznego metodą FDTD. Symulacje FDTD przeprowadzone zostały przez dr. Łukasza Zinkiewicza oraz mgr. Aleksandra Boguckiego z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

W symulacjach FDTD przyjęto, że średnica UCNP wynosi 22 nm, a średnica AgNW wynosi 50 nm. Dzięki wykonanym symulacjom obliczono, jak redystrybuuje się pole elektryczne fali elektromagnetycznej o długości 540, 650 oraz 980 nm padającej na: (i) nanocząstkę umieszczoną na podłożu krzemowym, (ii) srebrny nanodrut umieszczony na podłożu krzemowym oraz (iii) nanostrukturę hybrydową AgNW-UCNP umieszczoną na podłożu krzemowym. W przypadku (iii) zbadano rozkłady pola elektrycznego dla różnych położenia nanocząstki wokół AgNW. We wszystkich wariantach symulacji fala elektromagnetyczna padała na próbkę od góry, tzn. wzdłuż osi Y, a oś nanodrutu pokrywała się z osią Z.

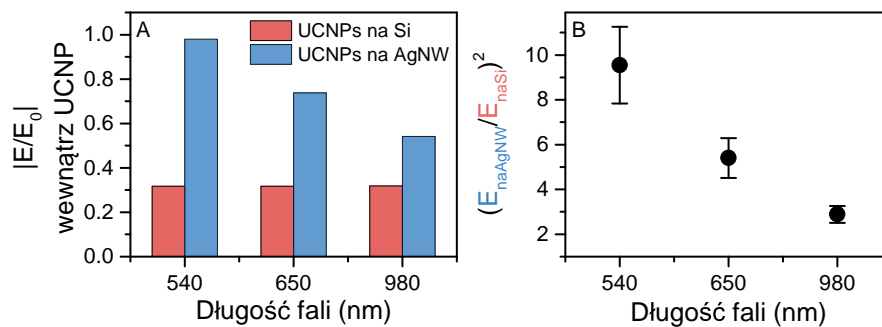
Na rysunku 5.12(A) przedstawiono rozkład pola elektrycznego E powstałego w wyniku padania na nanocząstkę umieszczoną na podłożu krzemowym fali o długości 540, 650

lub 980 nm. Pole elektryczne znajdujące się wewnątrz nanocząstki ma mniejszą wartość niż pole elektryczne ją otaczające. Zaobserwowana zależność wynika z faktu, że współczynnik załamania światła w nanocząstce wynosi 1.55 [165]. Jest on zatem wyższy niż współczynnik załamania światła w próżni, w której nanocząstka się znajduje. Sprawia to, że pole elektryczne wewnątrz nanocząstki jest ekranowane. Na rysunku 5.12(B) przedstawiono rozkłady pola elektrycznego wokół nanodrutu umieszczonego na podłożu krzemowym i oświetlonym falami o długościach 540, 650 oraz 980 nm. Na rysunku wyraźnie widać wzmocnienie pola E przy powierzchni nanodrutu przy oświetleniu go długością fali 540 nm. Szczególnie jest ono widoczne pomiędzy krawędzią AgNW i powierzchnią Si. Wzmocnienie to wynika z efektywnego generowania plazmonów powierzchniowych w nanodrucie AgNW światłem o tej długości fali. Wzmocnienie pola E w znacznie mniejszym stopniu występuje przy długości fali 650 nm, a prawie niezauważalne jest przy długości fali 980 nm. Jak pokazano na rysunku 5.5, przy tych długościach fali ekstynkcja światła przez AgNW jest dużo słabsza niż w przypadku fali o długości 540 nm. Dalsze symulacje FDTD rozkładu pola elektrycznego wykonano dla nanocząstki umieszczonej na powierzchni nanodrutu. Rozkłady pól elektrycznych dla tych konfiguracji przedstawiono na rysunkach 5.12(C)-(F). Jak można zauważyć, dla wszystkich położenia nanocząstki względem nanodrutu pole E w jej wnętrzu zmniejsza się wraz ze wzrostem długości fali padającej na próbkę.



RYSUNEK 5.12: Rozkład pola elektrycznego otrzymanego w wyniku symulacji FDTD dla (A) UCNP, (B) AgNW, (C-F) UCNP umieszczonej w różnych konfiguracjach na AgNW nałożonych na podłoże krzemowe. Granicę podłoża przy osi $y=50 \mu\text{m}$ zaznaczono szarą, przerywaną linią. Położenie nanocząstek względem AgNW i względem podłoża krzemowego zaznaczono szarą lub czarną, przerywaną linią. Rozkłady pola wyznaczone przy oświetleniu próbki promieniowaniem o długości fali 540 nm przedstawiono na górnej części rysunku, 650 nm – na środkowej części rysunku oraz 980 nm – na dolnej części rysunku.

W celu określenia wzmocnienia pola elektrycznego spowodowanego obecnością AgNW porównano wartość pola E w nanocząstce znajdującej się na nanodrucie z wartością pola E w nanocząstce umieszczonej na podłożu krzemowym. Wartość tego pola wzięto z rysunku 5.12(A). Do obliczeń wykorzystano wartość pola w środku nanocząstki. W celu wyznaczenia wartości pola wewnątrz nanocząstki umieszczonej na nanodrucie uśredniono wartość pola E_{naAgNW} w nanocząstce po położeniu nanocząstki wokół obwodu AgNW. Na rysunku 5.13(A) przedstawiono średnie wartości pola elektrycznego w środku nanocząstek w przypadku umieszczenia jej na drucie (kolor niebieski) oraz na podłożu krzemowym (kolor czerwony). Na rysunku 5.13(B) przedstawiono wartość kwadratu stosunku średniego pola E_{naAgNW} w nanocząstce znajdującej się na powierzchni nanodrutu do wartości pola E_{naSi} dla nanocząstki znajdującej się na podłożu krzemowym. Stosunki wyznaczone dla fal o długościach 540, 650 oraz 980 nm. Wyznaczone wartości wskazują, że na skutek obecności nanodrutu pole elektryczne w środku nanocząstki wzmacnia się prawie 10-krotnie przy oświetleniu długością fali 540 nm, około 5-krotnie – przy długości fali 650 nm oraz około 3-krotnie – przy długości fali 980 nm.



RYСУNEK 5.13: (A) Wartości pola elektrycznego wewnątrz nanocząstki umieszczonej na nanodrucie uśrednione dla wszystkich położań UCNP względem AgNW (kolor niebieski) oraz nanocząstki umieszczonej na podłożu krzemowym w wyniku oświetlenia próbki promieniowaniem o długości fali 540, 650 oraz 980 nm. (B) Wartość wzmocnienia pola elektrycznego we wnętrzu UCNP w wyniku obecności AgNW.

Jak opisano w poprzednim podrozdziale, zgodnie ze złotą regułą Fermiego, prawdopodobieństwo przejścia optycznego wzrasta wraz ze wzrostem pola elektrycznego. Wyniki z przeprowadzonych symulacji wykazują, że pole elektryczne wzrasta najbardziej dla długości fali 540 nm. Oznacza to, że obecność plazmonów powoduje najwyższy wzrost prawdopodobieństwa występowania przejścia ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ w jonie Er^{3+} . Wzrost pola elektrycznego spowodowany obecnością plazmonów, powoduje też, choć dużo słabszy, wzrost prawdopodobieństwa przejścia ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$. Najślabiej obecność plazmonów wpływa na zwiększenie prawdopodobieństwa przejść ${}^4I_{15/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ oraz ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4F_{7/2}$. Otrzymane wyniki obliczeń FDTD sugerują zatem, że zaobserwowane w poprzednim podrozdziale zmiany czasu zaniku UCL są spowodowane wpływem obecności AgNW na przejścia ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ oraz ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$.

5.7 Dyskusja wyników

Jak wspomniano w podrozdziale 5.2 przeprowadzone doświadczenia miały na celu rozstrzygnięcie, na które przejścia optyczne w jonie Er^{3+} wpływają generowane w AgNW plazmony. Poniżej przedstawiono dyskusję nad wpływem bliskości AgNW na wzmocnienie wydajności wzbudzenia, transferu energii oraz emisji w jonach Er^{3+} .

Otrzymane wyniki obliczeń FDTD wykazały, że oświetlenie nanocząstek umieszczonych na nanodrucie falą o długości 980 nm powoduje najslabszy wzrost lokalnego pola elektrycznego w porównaniu do zastosowanych krótszych długości fali. Oznacza to, że wzrost prawdopodobieństwa zachodzenia przejść ${}^4I_{15/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ oraz ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4F_{7/2}$ jest mały. Dodatkowo, jak wyznaczono w podrozdziale 5.4 stan pośredni ${}^4I_{11/2}$ przy zastosowanych mocach wzbudzenia jest nasycony, a stany emisyjne ${}^2H_{11/2}$ i ${}^4S_{3/2}$ są bliskie wysycenia. Otrzymane wyniki teoretyczne i doświadczalne sugerują zatem, że w badanych warunkach silnego wzbudzenia wzmocnienie wydajności wzbudzenia nie występuje.

Dostępne w chwili opisywania niniejszych badań dane literaturowe wskazywały, że zjawisko rezonansu plazmonowego w znacznie mniejszym stopniu wpływa na wzmocnienie transferu energii niż na wzmocnienie intensywności oraz skrócenia zaniku UCL nanocząstek [166, 167]. W pracy Lu *et al.* przy wykorzystaniu srebrnej nanosiatki, do której dołączono nanocząstki zaobserwowano około 3-krotne wzmocnienie transferu energii [168]. Natomiast, dla porównania w pracy Das *et al.* [169] zaobserwowano 1000-krotne zwiększenie intensywności UCL nanocząstek w wyniku wzmocnienia plazmonowego, a w pracy Wu *et al.* [102] zaobserwowano 166-krotne skrócenie czasu zaniku UCL nanocząstek w obecności srebrnych nanosześcianów. W porównaniu do wzmocnienia wydajności UCL wzmocnienie transferu energii jest zatem nieznaczne. Nasylenie stanu pośredniego ${}^4I_{11/2}$ powoduje także, że wzrost wydajności transferu energii także jest mało prawdopodobny. Ze względu na wysoką moc wzbudzenia wykorzystaną w przeprowadzonych badaniach wzrost wydajności transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} mógłby prowadzić jedynie do wzrostu wydajności UCL pasm wzbudzanych w sposób tryfotonowy. Jednakże, jak można zauważyć na rysunkach 5.6(D) oraz 5.7(D) dla pasm UCL wokół długości fal 555 oraz 650 nm, dla których wzbudzenie następuje w sposób tryfotonowy, obecność nanodrutu nie spowodowała wzrostu intensywności UCL. Co więcej, bliskość AgNW spowodowała spadek intensywności UCL tych pasm. Z tego względu założono, że w badanych warunkach nie występuje wzmocnienie wydajności transferu energii.

Wykluczenie występowania wzmocnienia wydajności wzbudzenia oraz transferu energii w UCNPs wskazuje, że obecność AgNW powoduje wzmocnienie wydajności emisji w jonie Er^{3+} ! Wyniki pomiarów zaników UCL wykazały, że czas zaniku UCL pasm wokół

długości fal 540 i 650 nm w wyniku bliskości nanodrutu ulega skróceniu. Jest to konsekwencja przyspieszenia opróżniania stanów $^2H_{11/2}$, $^4S_{3/2}$ oraz $^4F_{9/2}$. Dodatkowo, wyniki obliczeń FDTD wykazały, że generowane w nanodrucie plazmony silniej wpływają na przejścia ze stanu $^4S_{3/2}$ do stanu $^4I_{15/2}$ niż ze stanu $^4F_{9/2}$ do stanu $^4I_{15/2}$.

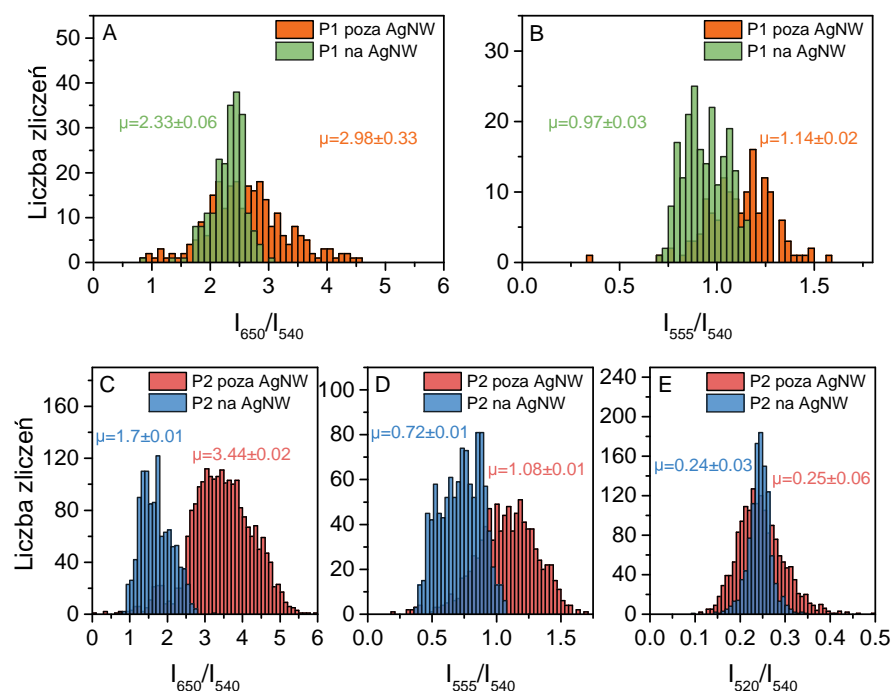
5.8 Wpływ zmiany zaników UCL spowodowanych obecnością nanodrutów na rozkład intensywności UCL

W niniejszym podrozdziale sprawdzono, jak spowodowana obecnością plazmonów, zmiana czasu zaniku UCL wpływa na stosunki intensywności poszczególnych pasm UCL. W tym celu wyznaczono, na podstawie wykonanych map intensywności UCL, rozkłady stosunków intensywności pasma czerwonego i pasma zielonego (I_{650}/I_{540}), trzyfotonowego pasma zielonego i dwufotonowego pasma zielonego (I_{555}/I_{540}) oraz dwufotonowych pasm zielonych (I_{520}/I_{540}). Rozkłady wyznaczono dla UCL z obszarów z nanocząstką „na” i „poza nanodrutem”. Do wyznaczenia rozkładów wykorzystano tylko te punkty, dla których intensywność UCL danego pasma była większa od zdefiniowanego indywidualnie progu. Na rysunku 5.14(A) przedstawiono rozkład stosunku intensywności I_{650}/I_{540} wyznaczony dla nanocząstek w próbce P1. W przypadku, gdy nanocząstki znajdują się „poza nanodrutem” średnia wartość stosunku I_{650}/I_{540} wynosi 3. Gdy nanocząstki umieszczone są „na nanodrucie” średnia wartość tego stosunku wynosi 2.3. Zatem w wyniku obecności AgNW średnia wartość stosunku I_{650}/I_{540} maleje około 1.3 raza. Jak można zauważyć na rysunku 5.14(C), podobny efekt zaobserwowano w próbce P2. Średnia wartość stosunku I_{650}/I_{540} wynosi 3.4, gdy nanocząstki znajdują się „poza nanodrutem”, a wartość ta wynosi 1.7 dla nanocząstek „na nanodrucie”. Dla próbki P2 zaobserwowano zatem średnio dwukrotny spadek wartości stosunku I_{650}/I_{540} .

Spadek średniej wartości stosunku I_{650}/I_{540} w wyniku obecności AgNW spowodowany jest szybszym zanikiem UCL pasma 540 nm w porównaniu do zaniku pasma 650 nm. Jak opisano w podrozdziale 3.3 emisja fotonu 650 nm jest konsekwencją wzbudzenia zarówno dwufotonowego i trzyfotonowego do stanu $^4F_{9/2}$ w jonie Er^{3+} . Przyspieszenie relaksacji ze stanów $^2H_{11/2}$ oraz $^4S_{3/2}$ do stanu $^4I_{15/2}$ w jonie Er^{3+} powoduje zmniejszenie wydajności wzbudzenia trzyfotonowego i w rezultacie spadek intensywności UCL w czerwonym zakresie spektralnym. Potwierdzeniem słuszności tej tezy jest zaobserwowany w próbce P2 spadek szybkości narastania UCL pasma 650 nm nanocząstek w obecności AgNW (rysunek 5.11(B)).

Na rysunkach 5.14(B) i (D) przedstawiono rozkłady stosunków pasm intensywności I_{555}/I_{540} nanocząstek umieszczonych „na” i „poza nanodrutem” odpowiednio dla próbki

P1 i P2. Jak można zaobserwować na rysunku 5.14(B) średnia wartość stosunku I_{555}/I_{540} wyznaczona dla nanocząstek znajdujących się „poza nanodrutem” wynosi 1.1. Podczas gdy dla nanocząstek umieszczonych „na nanodrucie” wartość ta wynosi 1. Jak widać na rysunku 5.14(D) podobny efekt zaobserwowano dla próbki P2. Średnia wartość stosunku I_{555}/I_{540} dla nanocząstek „poza nanodrutem” wynosi 1.1, zaś dla znajdujących się „poza nanodrutem” wynosi 0.7. Zmiana średnich stosunków intensywności pasm I_{555}/I_{540} na skutek obecności AgNW jest mała, ale zauważalnie większa niż szerokość rozkładów przedstawionych na rysunkach 5.14(B) i (D). Spadek ten spowodowany jest, podobnie jak w przypadku opisywanego wyżej stosunku I_{650}/I_{540} , spadkiem wydajności wzbudzenia tryfotonowego. W konsekwencji przyspieszonej relaksacji z poziomów ${}^2H_{11/2}$ oraz ${}^4S_{3/2}$ do poziomu ${}^4I_{15/2}$ w jonie Er^{3+} maleje prawdopodobieństwo wzbudzenia do stanu ${}^2G_{7/2}$ i również intensywność pasma wokół długości fali 555 nm.



RYСУNEK 5.14: Rozkłady stosunków intensywności UCL pasm: (A) I_{650}/I_{540} i (B) I_{555}/I_{540} wyznaczone na podstawie map rozkładu UCL w próbce P1. Rozkłady stosunków intensywności UCL pasm: (C) I_{650}/I_{540} , (D) I_{555}/I_{540} i (E) I_{520}/I_{540} wyznaczone na podstawie map rozkładu UCL w próbce P2.

Otrzymane wyniki wskazują, że obecność plazmonów powoduje zmianę wydajności poszczególnych mechanizmów wzbudzenia nanocząstek. Na skutek generowanych w nanodrucie plazmonów następuje przyspieszenie opróżniania stanu emisyjnego ${}^4S_{3/2}$, co następnie powoduje spadek wydajności mechanizmu tryfotonowego. W konsekwencji względne intensywności UCL pasm wokół długości fali 555 oraz 650 nm są mniejsze dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie” w porównaniu do położonych „poza nanodrutem”. Przekłada się to bezpośrednio na zmianę widma intensywności UCL nanocząstek w nanostrukturze hybrydowej AgNW-UCNPs.

Wykorzystanie techniki mapowania hiperspektralnego pozwala na wyznaczenie stosunku intensywności UCL pasm I_{520}/I_{540} , co umożliwia wyznaczenie temperatury w otoczeniu nanocząstek. W stanie równowagi termicznej obsadzenie stanów $^2H_{11/2}$ oraz $^4S_{3/2}$ opisane jest rozkładem Boltzmann'a. Wyznaczenie zależności stosunku I_{520}/I_{540} od temperatury umożliwia zatem skalibrowanie nanocząstek jako nanotermometrów [170, 171]. Ze względu na niską intensywność UCL pasma wokół długości fali 520 nm w próbce P1 stosunek intensywności pasm I_{520}/I_{540} wyznaczono jedynie dla próbki P2. Rozkład stosunków I_{520}/I_{540} próbki P2 przedstawiono na rysunku 5.14(E). Średnia wartość I_{520}/I_{540} wyznaczona dla nanocząstek znajdujących się „na nanodrucie”, jak i „poza” nim była w granicy błędów pomiarowych taka sama i wynosiła ok. 0.25. Wartość ta odpowiada temperaturze ok. 20°C [172]. Otrzymany wynik wskazuje, że mimo zastosowania bardzo dużej mocy wzbudzenia promieniowaniem podczerwonym nie zaobserwowano wzrostu temperatury próbki. Brak efektu grzania może być spowodowany skutecznym odprowadzeniem ciepła przez podłoże krzemowe, na którym umieszczono próbkę.

5.9 Podsumowanie

Niniejszy rozdział składa się z dwóch części. W pierwszej części opisano proces wytwarzania nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs. W celu jej otrzymania połączono zawiesinę nanocząstek oraz nanodrutów w wodzie. Przeprowadzone za pomocą SEM i TEM obrazowanie wykazało, że w wyniku zmieszania obu nanostruktur, nanocząstki adsorbują się na powierzchni nanodrutu. Wykonane za pomocą EDS mapowanie rozmieszczenia pierwiastków w wytworzonej nanostrukturze hybrydowej wykazało, że nanocząstki znajdują się bezpośrednio na powierzchni nanodrutu pod warstwą PVP. W wyniku przeprowadzonego obrazowania zaproponowano potencjalny mechanizm powstawania nanostruktury AgNW-UCNPs. Mianowicie, nanostruktura ta powstaje w wyniku pojawienia się oddziaływania jon-dipol między UCNPs a AgNW. W celu sprawdzenia, czy nanostruktura hybrydowa AgNW-UCNPs powstaje bezpośrednio w roztworze, czy też formuje się w trakcie wysychania próbki przeprowadzono eksperyment, w czasie którego obserwowano proces wysychania kropli próbki. Obrazowanie, wykonane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola, wykazało, że nanostruktura hybrydowa AgNW-UCNPs powstaje dwuetapowo. Etap pierwszy zachodzi bezpośrednio po umieszczeniu nanocząstek i nanodrutów w roztworze. Na tym etapie część nanocząstek adsorbuje się na powierzchni nanodrutu. Etap drugi zachodzi w czasie odparowywania rozpuszczalnika, powodując zwiększenie liczby nanocząstek zaadsorbowanych na powierzchni nanodrutu, a także ich agregację wokół nanodrutu.

W drugiej części rozdziału zbadano właściwości optyczne wytworzonej nanostruktury hybrydowej AgNW-UCNPs. W celu sprawdzenia, jak obecność nanodrutów wpływa na wydajność UCL wykonano pomiary map rozkładu przestrzennego UCL oraz pomiary czasów narastania i zaniku UCL nanostruktur AgNW-UCNPs. Przeprowadzone pomiary wykazały, że obecność nanodrutów powoduje względną zmianę intensywności UCL poszczególnych pasm. Obserwowane skrócenia czasów życia UCL są wynikiem przyspieszenia przejść $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ oraz $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ w jonie Er^{3+} . Otrzymane wyniki wskazują, że obecność nanodrutów wpływa na wydajność poszczególnych ścieżek wzbudzenia w jonie Er^{3+} . W szczególności obecność AgNW powoduje przyspieszenie opróżniania stanów $^4S_{3/2}$ i $^2H_{11/2}$, czego konsekwencją jest spadek wydajności wzbudzenia trzyfotonowego do stanu $^2G_{7/2}$ w jonie Er^{3+} . Efekt ograniczenia wzbudzenia trzyfotonowego jest szczególnie widoczny przy porównaniu intensywności UCL pasma wokół długości fali 555 nm dla nanocząstek znajdujących się „na” i „poza nanodrutem”. Obecność nanodrutu w pobliżu nanocząstek powoduje bowiem zauważalny spadek intensywności UCL tego pasma. Spadek wzbudzenia w sposób trzyfotonowy wpływa także na czerwone pasmo spektralne. Spadek wydajności wzbudzenia trzyfotonowego sprawia, że emisja fotonów w czerwonym zakresie spektralnym odbywa się głównie w wyniku wzbudzenia dwufotonowego. Wzbudzenie w sposób dwufotonowy jest wolniejsze niż wzbudzenie w sposób trzyfotonowy. Z tego względu, zaobserwowane na rysunku 5.11(B), wydłużenie czasu narastania UCL w czerwonym zakresie spektralnym wskazuje, że efektywność wzbudzenia w sposób trzyfotonowy spadła. Dzięki przeprowadzonemu mapowaniu hiperspektralnemu możliwe było wyznaczenie średniej wartości stosunku I_{520}/I_{540} . Jego znajomość umożliwia wyznaczenie temperatury w próbce. W warunkach doświadczalnych mimo zastosowania wysokich mocy pobudzenia nie zaobserwowano wzrostu temperatury w próbce.

Rozdział 6

Uproszczenie metody przyłączania RB do powierzchni nanocząstek a skuteczność terapii fotodynamicznej

Nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ mogą być z powodzeniem wykorzystywane do celów terapeutycznych, co opisano w podrozdziale 1.6. Jak wspomniano wcześniej, terapia fotodynamiczna opiera się na zastosowaniu barwników organicznych, tzw. fotouczulaczy, które wzbudzone promieniowaniem w zakresie widzialnym generują toksyczne dla komórek reaktywne formy tlenu. Ze względu na niewielką przenikliwość promieniowania widzialnego przez tkanki poszukuje się innych rozwiązań, które poprawią wydajność tego rodzaju terapii. Jednym z rozwiązań jest wykorzystanie nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$, dzięki którym możliwe jest wykorzystanie w terapii głębiej wnikającego promieniowania podczerwonego. Nanocząstki używane do celów terapeutycznych łączy się z cząsteczkami fotouczulacza, który dobrany jest tak, aby jego widmo absorpcji przekrywało się z widmem UCL nanocząstek. Dzięki odpowiedniemu dobraniu nanocząstek i fotouczulacza energia ze wzbudzonych nanocząstek może zostać przekazana cząsteczkom fotouczulacza. W konsekwencji powoduje to produkcję ROS i uszkodzenie komórek.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej wytworzono nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$, do powierzchni których przyłączono Róż Bengalski (RB). Najpowszechniejsza metoda przyłączania RB do nanocząstek wymaga wykorzystania kwasu kapronowego jako linkera [35, 37, 108]. Jednakże wykorzystanie go powoduje wzrost odległości między nanocząstką a barwnikiem. Może to wpływać na wydajność transferu energii i generowania ROS, co w konsekwencji przekłada się na skuteczność zastosowania tak przygotowanego materiału

w PDT. Podjęto zatem próbę przyłączenia RB do powierzchni nanocząstek za pomocą uproszczonej procedury. Procedura ta nie wymaga zastosowania kwasu kapronowego dzięki czemu odległość między nanocząstką a barwnikiem jest mniejsza niż przy użyciu procedury z wykorzystaniem kwasu kapronowego. Dzięki temu możliwe jest otrzymanie materiału o większej wydajności transferu energii oraz efektywności generowania ROS niż dla materiału wytworzonego standardową metodą.

W poniższym rozdziale przedstawiono charakteryzację otrzymanego materiału. Następnie zaprezentowano wyniki badań sprawdzających, czy między nanocząstką a przyłączonymi do jej powierzchni cząsteczkami RB zachodzi transfer energii i generowane są reaktywne formy tlenu. Dzięki przeprowadzonym testom cytotoksyczności sprawdzono, jak wytworzona próbka wpływa na komórki nowotworowe 4T1. Uzyskane wyniki badań cytotoksyczności wykazały, że otrzymane w wyniku uproszczonej procedury przyłączenia RB nanocząstki skutecznie niszczą komórki nowotworowe 4T1.

Wyniki opisane w poniższym rozdziale opublikowano w pracy:

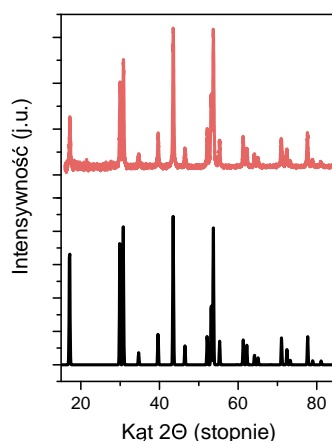
Borodziuk, A., Kowalik, P., Duda, M., Wojciechowski, T., Minikayev, R., Kalinowska, D., Klepka, M., Sobczak, K., Kłopotowski, Ł., Sikora, B., „Unmodified Rose Bengal photosensitizer conjugated with NaYF₄: Yb, Er upconverting nanoparticles for efficient photodynamic therapy.”, *Nanotechnology*, 2020, 31(46), 465101.

W celu zamieszczenia w rozdziale pracy rysunków znajdujących się w powyższej publikacji uzyskano pozwolenie na ich wykorzystanie i modyfikację nr 1263556-1.

6.1 Charakteryzacja strukturalna UCNP_s@SiO₂-RB

Wykorzystywane do badań komórkowych nanocząstki powinny mieć z jednej strony niewielkie rozmiary, a z drugiej strony wysoką wydajność UCL [173]. W celu efektywnej dystrybucji nanocząstek w organizmie rozmiar nanocząstki powinien być jak najmniejszy. Zbyt mały rozmiar może jednak spowodować, że zostaną one odfiltrowane przez nerki [174]. Natomiast zbyt duże będą łatwo neutralizowane przez układ odpornościowy i nie będą efektywnie wprowadzane do wnętrza komórek [128, 175]. Najbardziej odpowiedni rozmiar nanocząstek do zastosowań terapeutycznych zawiera się w przedziale od 10 do 100 nm [128, 174, 176, 177]. Jednakże im mniejszy rozmiar nanocząstki tym mniejsza wydajność UCL [153]. Zatem, w celu uzyskania rozwiązania kompromisowego, czyli zastosowania materiału o stosunkowo niewielkich rozmiarach, ale o stosunkowo wysokiej wydajności UCL, do badań komórkowych wykorzystuje się najczęściej nanocząstki o średnicach w zakresie od 20 do 40 nm [13, 178–182]. Na potrzeby przeprowadzenia badań opisanych w tym rozdziale zsyntetyzowano próbkę nanocząstek NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺

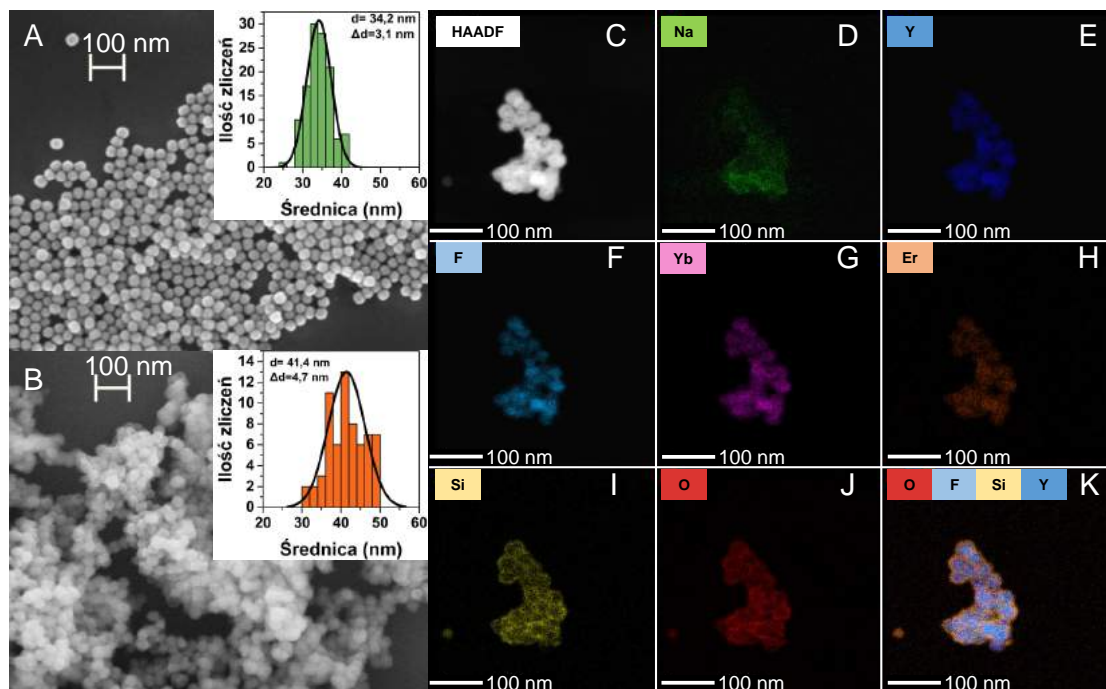
wykorzystując procedurę opisaną w podrozdziale 2.1. W celu ustalenia struktury krystalograficznej otrzymanych nanocząstek wykonano pomiary dyfrakcji rentgenowskiej. Wyniki przedstawiono na rysunku 6.1. Linia czerwoną oznaczono dyfraktogram nanocząstek wykorzystywanych w eksperymencie, zaś linią czarną – dyfraktogram wzorcowy ICDS #259179. Dyfraktogram wzorcowy odpowiada nanocząstkom $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ należącym do krystalograficznej grupy przestrzennej $P6_3/m$, czyli będącym materiałem o strukturze heksagonalnej [183]. Jak można zauważyć na rysunku 6.1 położenie i intensywności maksimów Bragga na obu dyfraktogramach są identyczne. Oznacza to, że wytworzono nanocząstki o heksagonalnej strukturze krystalograficznej.



RYСУNEK 6.1: Dyfraktogram rozpraszania rentgenowskiego dla nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (czerwona linia) oraz dla wzorca ICDS #259179 (czarna linia) należącego do grupy przestrzennej $P6_3/m$.

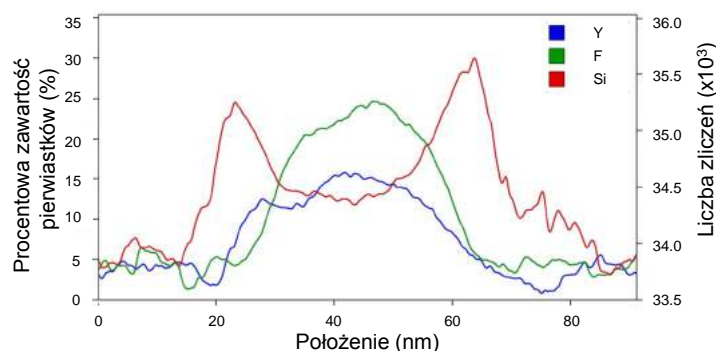
Nanocząstki $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ zobrazowano wykorzystując zarówno technikę SEM, jak i STEM. Zdjęcia wykonane za pomocą SEM przedstawiono na rysunku 6.2(A). Wykonanie zdjęć SEM umożliwiło określenie rozkładu wielkości średnic UCNP. W tym celu zmierzono średnice nanocząstek, które następnie przedstawiono na histogramie wielkości (wstawka w rysunku 6.2(A)). Dopasowanie do otrzymanego rozkładu funkcji Gaussa pozwoliło na wyznaczenie średniej wielkości nanocząstek, która wynosi 34.2 ± 3.1 nm.

Jak opisano w podrozdziale 2.3 przyłączenie cząsteczek RB do powierzchni UCNP możliwe jest jedynie, gdy znajdują się na niej odpowiednie grupy funkcyjne. W tym celu nanocząstki otaczane są warstwą tlenku krzemu, a następnie funkcjonalizowane za pomocą grup aminowych. Zdjęcia nanocząstek pokrytych warstwą tlenku krzemu ($\text{UCNPs}@SiO_2$) przedstawiono na rysunku 6.2(B). W wyniku wytworzenia otoczki krzemowej średnia wielkość nanocząstek zwiększyła się do 41.1 ± 4.7 nm. Oznacza to, że średnia grubość warstwy SiO_2 wynosi około 3-4 nm. W celu sprawdzenia, czy otrzymana warstwa SiO_2 jest jednorodna przeprowadzono obrazowanie za pomocą STEM. Na rysunku 6.2(C) przedstawiono zdjęcie STEM obszaru, dla którego, wykorzystując technikę EDS, zbadano rozmieszczenie poszczególnych pierwiastków.



RYSUNEK 6.2: Zdjęcie SEM oraz histogram wielkości nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (A) przed oraz (B) po otoczeniu warstwą SiO_2 . (C) Zdjęcie HAADF STEM oraz (D-K) mapy EDS rozkładu pierwiastków w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}@\text{SiO}_2$.

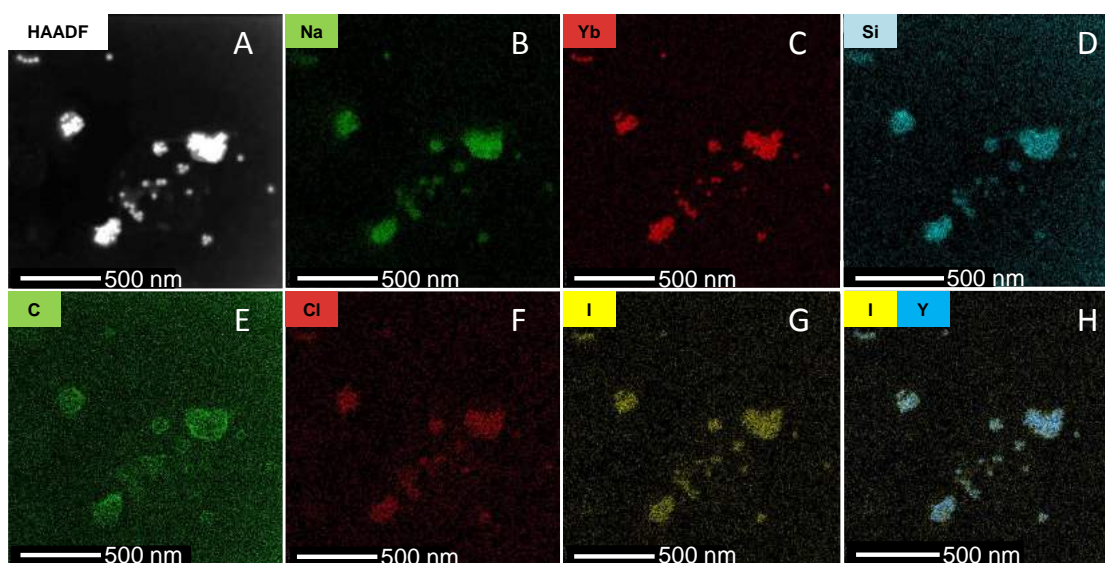
Przedstawione na rysunkach 6.2(D-H) mapy EDS rozkładu pierwiastków w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ wykazują równomierne rozmieszczenie atomów: Na, Y, F, Er oraz Yb w ich wnętrzu. Natomiast przedstawione na rysunkach 6.2(I-J) mapy rozkładu atomów Si oraz O wskazują na obecność tych pierwiastków na powierzchni nanocząstek. Położenie atomów Si oraz O na powierzchni nanocząstek szczególnie widać, na rysunku 6.2(K), gdy na mapie EDS umieścimy także pierwiastki występujące wewnątrz nanocząstek. Otrzymane obrazy pozwalają przypuszczać, że na powierzchni nanocząstek wytworzono otoczkę z SiO_2 . W celu sprawdzenia, czy warstwa SiO_2 faktycznie została utworzona wykonano liniową analizę EDS występowania poszczególnych pierwiastków w próbce. Analizę tę przedstawiono na rysunku 6.3.



RYSUNEK 6.3: Liniowa analiza EDS rozmieszczenia pierwiastków: Y (linia niebieska), F (linia zielona) oraz Si (linia czerwona) w $\text{UCNPs}@\text{SiO}_2$.

Jak można zauważyć atomy zawarte w nanocząstce, tj. Y oraz F, znajdują się w wewnętrznej warstwie, natomiast atomy Si znajdują się w zewnętrznej warstwie badanych nanocząstek. Analiza otrzymanych wyników pozwala stwierdzić, że na powierzchni nanocząstek utworzono warstwę SiO_2 .

Nanocząstki posiadające na powierzchni otoczkę krzemową UCNPs@SiO_2 poddano procesowi funkcjonalizacji powierzchni za pomocą grup aminowych $-\text{NH}_2$. Funkcjonalizacja powierzchni UCNPs@SiO_2 umożliwia przyłączenie cząsteczek RB poprzez wytworzenie wiązania amidowego między azotem z grupy aminowej $-\text{NH}_2$ nanocząstek i węglem z grupy karboksylowej $-\text{COOH}$ w RB. W celu sprawdzenia, czy po przeprowadzonym procesie przyłączania cząsteczki RB znajdują się na powierzchni sfunkcjonalizowanych UCNPs@SiO_2 konieczne jest zbadanie rozmieszczenia pierwiastków w otrzymanej próbce. W tym celu wykorzystano mapowanie rozkładu pierwiastków w próbce za pomocą techniki EDS. Umożliwiło to sprawdzenie rozmieszczenia atomów znajdujących się w cząsteczkach RB, tj. C, I oraz Cl z położeniem pierwiastków znajdujących się w $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}\text{@SiO}_2$, tj. Na, Yb oraz Si. Na rysunku 6.4(A) przedstawiono zdjęcie STEM badanej próbki. Dla tego obszaru wyznaczono mapy rozkładu pierwiastków EDS.

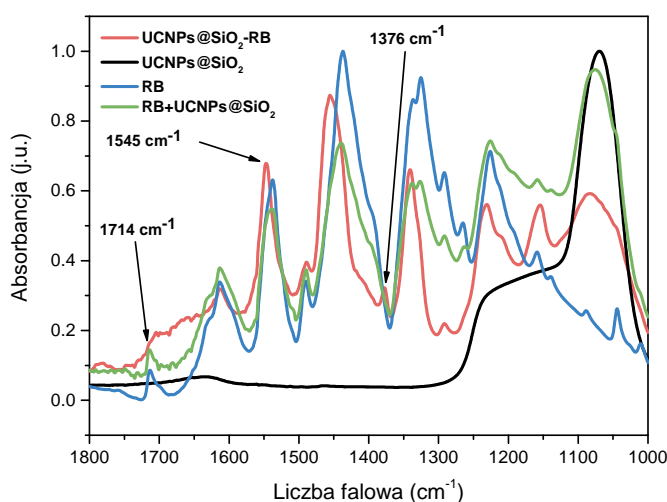


RYSUNEK 6.4: Zdjęcie HAADF STEM (A) oraz mapy EDS rozkładu pierwiastków występujących w nanocząstkach $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$ otoczonych warstwą SiO_2 z przyłączonymi cząsteczkami RB (B-H).

Na rysunkach 6.4(B-D) zaprezentowano rozmieszczenie atomów znajdujących się w UCNPs@SiO_2 . Na rysunkach 6.4(E-G) przedstawiono rozmieszczenie atomów, które występują w cząsteczkach RB. Jak można zauważyć na wszystkich rysunkach atomy odpowiadające UCNPs@SiO_2 oraz RB znajdują się w tym samym położeniu. Szczególnie jest to widoczne na rysunku 6.4(H), na którym nałożono dwie mapy EDS zarówno dla atomów Y występujących w UCNPs@SiO_2 , jak i atomów I występujących w RB.

Wykonane obrazowanie wskazuje, że cząsteczki RB znajdują się na powierzchni sfunkcjonalizowanych UCNPs@SiO₂. Otrzymane wyniki nie dostarczają jednakże informacji odnośnie sposobu połączenia RB z nanocząstkami. Cząsteczki RB mogą bowiem zaadsorbować się na powierzchni sfunkcjonalizowanych UCNPs@SiO₂ lub przyłączyć się trwale poprzez wytworzenie wiązania amidowego. Sposób połączenia cząsteczek RB z nanocząstkami UCNPs@SiO₂ ma duże znaczenie w kontekście zastosowania materiału w badaniach komórkowych. Wprowadzenie do wnętrza komórek nanocząstek z trwale przyłączonym barwnikiem zapewnia kontrolę nad wzajemnym położeniem nanocząstki i barwnika. Jest to ważny aspekt, ponieważ jedynie w przypadku, gdy barwnik będzie znajdował się w bezpośrednim sąsiedztwie nanocząstki możliwe będzie jego wzbudzenie i wytworzenie ROS [184].

W celu sprawdzenia sposobu połączenia cząsteczek RB z nanocząstkami pokrytymi warstwą SiO₂ wykorzystano analizę spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Pomiary przeprowadzono dla czterech grup: UCNPs@SiO₂, wolnych cząsteczek RB, UCNPs@SiO₂ wymieszanych z RB oraz UCNPs@SiO₂-RB. W próbce UCNPs@SiO₂ wymieszanej z RB, cząsteczki RB mogą zostać jedynie zaadsorbowane na powierzchni nanocząstek. Natomiast w próbce UCNPs@SiO₂-RB mogą one zostać przyłączone kowalencyjnie. Widma FTIR zmierzone dla wyżej opisanych grup przedstawiono na rysunku 6.5. Porównanie otrzymanych widm pozwala na określenie, w jaki sposób cząsteczki RB przyłączyły się do powierzchni nanocząstek w próbce UCNPs@SiO₂-RB. Na widmie FTIR dla wolnych cząsteczek RB, linia niebieska, oraz cząsteczek RB wymieszanych z UCNPs@SiO₂, linia zielona, widoczne jest wyraźne pasmo absorpcyjne z maksimum przy 1714 cm⁻¹ odpowiadające występowaniu rozciągających drgań wiązania C=O. Pasma te nie występują na widmie próbki UCNPs@SiO₂-RB (linia czerwona).

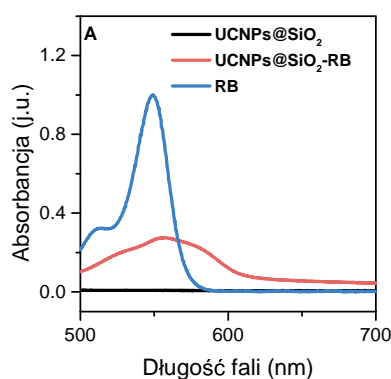


RYСУNEK 6.5: Widmo FTIR zmierzone dla UCNPs@SiO₂ (czarna linia), wolnych cząsteczek RB (niebieska linia), mieszaniny UCNPs@SiO₂ i RB (zielona linia) oraz UCNPs@SiO₂-RB (czerwona linia).

Dodatkowo, na widmie UCNPs@SiO₂-RB pojawiają się dwa nowe pasma absorpcyjne. Pierwsze z nich z maksimum przy 1545 cm⁻¹ odpowiada za zginające drgania wiązania N-H. Drugie pasmo absorpcyjne z maksimum przy 1376 cm⁻¹ odpowiada za rozciągające drgania wiązania C-N [33, 35, 185, 186]. Wiązanie C-N pojawia się na widmie zmierzonej dla próbki UCNPs@SiO₂-RB (linia czerwona), ale nie występuje, gdy cząsteczki RB wymieszamy z UCNPs@SiO₂ (linia zielona). Otrzymane wyniki wskazują, że między grupą karboksylową cząsteczki RB a grupą aminową znajdującą się w odpowiednio sfunkcjonalizowanej nanocząsteczce UCNPs@SiO₂ wytworzone zostało wiązanie amidowe.

6.2 Właściwości optyczne UCNPs@SiO₂-RB

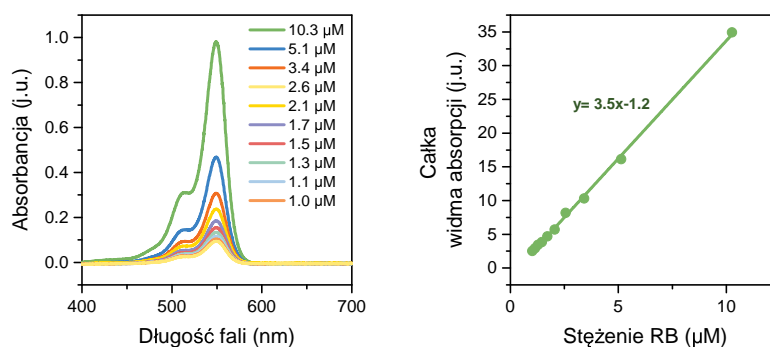
Jak opisano w podrozdziale 2.3.3 w celu usunięcia cząsteczek RB nieprzyłączonych do powierzchni UCNPs@SiO₂-RB próbkę kilkakrotnie oczyszczono poprzez odwirowywanie, a następnie poddano dializie. W dalszych rozważaniach założono zatem, że w roztworze UCNPs@SiO₂-RB znajdują się jedynie cząsteczki RB kowalencyjnie przyłączone do powierzchni UCNPs@SiO₂-RB. Z widm absorpcji przedstawionych na rysunku 6.6 wynika, że po przyłączeniu cząsteczek RB do powierzchni nanocząstek następuje przesunięcie maksimum absorpcji RB o około 5 nm w kierunku fal dłuższych w porównaniu do maksimum absorpcji czystego roztworu RB. Oznacza to, że przyłączenie cząsteczek RB do powierzchni nanocząstek wpływa na właściwości optyczne barwnika.



RYSUNEK 6.6: Widmo absorpcji RB (niebieska linia), UCNPs@SiO₂ (czarna linia) oraz UCNPs@SiO₂-RB (czerwona linia).

Na podstawie wykonanych pomiarów absorpcji UCNPs@SiO₂-RB możliwe jest oszacowanie liczby cząsteczek RB przyłączonych do powierzchni jednej nanocząstki. Oszacowanie to jest możliwe dzięki wyznaczeniu liczby cząsteczek RB oraz liczby nanocząstek w próbce o znanej masie i objętości. W celu wyznaczenia liczby cząsteczek RB znajdujących się w badanej próbce należy najpierw wykonać absorpcyjną krzywą kalibracyjną. Krzywą tą wyznaczono dzięki pomiarom widm absorpcji RB o stężeniach w zakresie

od $1 \mu\text{M}$ do $10.3 \mu\text{M}$. Widma te przedstawiono na rysunku 6.7(A). Następnie każde otrzymane widma scałkowano w całym mierzonym zakresie spektralnym, co pozwoliło na wyznaczenie zależności absorpcji RB w funkcji stężenia. Zależność tą przedstawiono na rysunku 6.7(B). Na podstawie wykonanej kalibracji oraz wyznaczając całkę widma absorpcji UCNPs@SiO₂-RB określono stężenie RB w próbce. Iloczyn wyznaczonego stężenia UCNPs@SiO₂-RB i objętości próbki umożliwił oszacowanie liczby cząsteczek RB w próbce. W następnym kroku wyznaczono liczbę UCNPs, jaka znajduje się w próbce UCNPs@SiO₂-RB o określonej masie i objętości. Dzięki znajomości liczby UCNPs oraz RB w próbce UCNPs@SiO₂-RB wyznaczono liczbę cząsteczek RB przypadających na jedną UCNP.

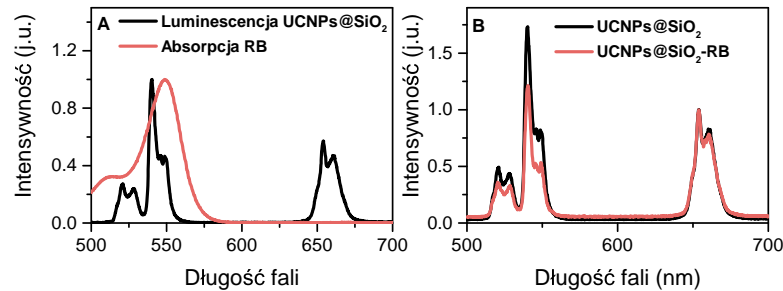


RYSUNEK 6.7: (A) Widma absorpcji RB w zależności od stężenia. (B) Krzywa kalibracyjna dla całek widma absorpcji RB w zależności od stężenia RB.

Wykonane w opisany wyżej sposób obliczenia wykazały, że w badanym materiale na jedną nanocząstkę przypada w przybliżeniu 6900 ± 140 cząsteczek RB. Znajomość liczby cząsteczek RB na powierzchni UCNP pozwala na wyznaczenie stopnia pokrycia jej powierzchni za pomocą tego barwnika. Wyznaczono, że w badanej próbce otrzymano całkowite pokrycie powierzchni UCNP przez cząsteczki RB.

W celu sprawdzenia, czy przyłączenie RB do powierzchni nanocząstek wpływa na zmianę ich właściwości optycznych przeprowadzono pomiary widm UCL. Na rysunku 6.8(A) przedstawiono widmo absorpcji RB oraz widmo UCL nanocząstek pokrytych warstwą SiO₂. Jak można zauważyć przy długościach fali w zakresie od 510 do 560 nm widmo absorpcji RB przekrywa się z widmem emisji nanocząstek. Jak wspomniano w podrozdziale 1.2 nałożenie się widma absorpcji jednej cząsteczki (akceptora) z widmem emisji drugiej cząsteczki (donora) jest jednym z warunków wystąpienia przekazu energii. Z tego względu możliwe jest pojawienie się przekazu energii z nanocząstek do cząsteczek RB. Na rysunku 6.8(B) przedstawiono widma UCL nanocząstek przed i po przyłączeniu RB. Jak można zauważyć po przyłączeniu cząsteczek RB do powierzchni UCNPs@SiO₂ następuje spadek intensywności UCL w obszarze zielonym w porównaniu do intensywności UCL przed jego przyłączeniem. Co więcej, wartość intensywności UCL w obszarze czerwonym pozostała niezmienna. Obecność cząsteczek RB na powierzchni

UCNPs@SiO₂-RB powoduje zatem nie tylko, zaobserwowane na rysunku 6.6, przesunięcie maksimum absorpcji barwnika, ale także zmianę intensywności UCL nanocząstek w zielonym zakresie spektralnym.



RYSUNEK 6.8: (A) Znormalizowane widmo absorpcji cząsteczek RB (linia czerwona) oraz znormalizowane widmo luminescencji UCNPs@SiO₂ (linia czarna). (B) Znormalizowane widma luminescencji UCNPs@SiO₂ oraz UCNPs@SiO₂-RB zawieszonych w wodzie przy pobudzeniu laserem podczerwonym z gęstością mocy 19 Wcm⁻².

Spadek intensywności luminescencji w zielonym zakresie spektralnym po przyłączeniu cząsteczek RB do nanocząstek sugeruje, że część energii ze wzbudzonych nanocząstek mogła zostać przekazana do cząsteczek RB. Wydajność tego przekazu może być wyznaczona ze wzoru [38]:

$$E_1 = 1 - \frac{I_{RB}}{I_0} \quad (6.1)$$

gdzie:

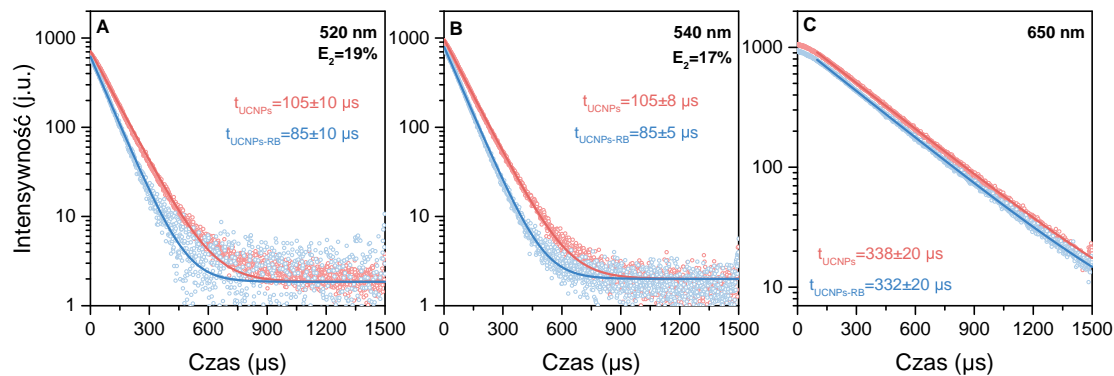
I_{RB} – intensywność luminescencji UCNPs@SiO₂-RB,

I_0 – intensywność luminescencji UCNPs@SiO₂.

Wyznaczona z powyższego wzoru wydajność przekazu energii wynosi 29%. Na podstawie wykonanych pomiarów luminescencji niemożliwe jest jednak określenie sposobu, w jaki energia została przekazana – czy był to przekaz radiacyjny (reabsorpcja), nieradiacyjny (rezonansowy transfer energii) czy oba procesy wystąpiły jednocześnie. Aby proces wzbudzania RB był jak najbardziej efektywny, energia powinna być przekazywana cząsteczkom barwnika na drodze rezonansowego przekazu energii, ponieważ jest to proces dużo bardziej wydajny niż reabsorpcja [50]. Im wydajniej wzbudzona zostanie cząsteczka RB, tym wydajniej produkowane będą ROS, co w konsekwencji doprowadzi do zwiększenia efektywności terapii przeciwnowotworowej.

W celu ustalenia mechanizmu transferu energii zachodzącego dla UCNPs@SiO₂-RB przeprowadzono pomiary zaniku luminescencji UCNPs@SiO₂ oraz UCNPs@SiO₂-RB. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów zaniku UCL i wyznaczeniu czasów życia UCL możliwe jest sprawdzenie, czy w badanej próbce pojawia się nieradiacyjny przekaz energii. Na rysunkach 6.9(A) i 6.9(B) przedstawiono krzywe zaniku luminescencji

w zielonym zakresie spektralnym wokół długości fali 520 nm oraz 540 nm zmierzono dla UCNPs@SiO₂ oraz UCNPs@SiO₂-RB. Jak można zauważyć otrzymane zaniki luminescencji UCNPs@SiO₂-RB są krótsze niż dla UCNPs@SiO₂. Na rysunku 6.9(C) przedstawiono krzywe zaniku luminescencji zmierzone dla pasma w czerwonym zaniku spektralnym. Zanik pasma wokół długości fali 650 nm jest podobny dla obu próbek.



RYСУNEK 6.9: Krzywe zaniku luminescencji dla UCNPs@SiO₂ (czerwone kropki) oraz UCNPs@SiO₂-RB (niebieskie kropki) odpowiednio dla długości fali: (A) 520 nm, (B) 540 nm oraz (C) 650 nm. Do każdego zaniku dopasowano funkcję zaniku jednowykładniczego opisanego wzorem 6.2.

W celu oszacowania wartości czasów zaników luminescencji dla poszczególnych pasm do otrzymanych danych eksperymentalnych dopasowano funkcję jednowykładniczego zaniku wyrażoną wzorem:

$$I(t) = A \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) + b \quad (6.2)$$

gdzie:

A – początkowa wartość intensywności luminescencji,

τ – czas zaniku luminescencji,

b – tło.

W wyniku dopasowania powyższej funkcji wyznaczony czas zaniku luminescencji próbki UCNPs@SiO₂-RB dla pasm emisji z wokół długości fali 520 nm oraz 540 nm wyniósł 85 μ s. W przypadku próbki UCNPs@SiO₂ czas ten wyniósł 105 μ s dla pasma wokół długości fali 520 nm oraz 102 μ s dla pasma wokół długości fali 540 nm. Oznacza to, że obecność cząsteczek RB spowodowała skrócenie czasu zaniku luminescencji pasm w zielonym zakresie spektralnym około 1.2 raza. W przypadku pasma czerwonego wokół długości fali 650 nm wyznaczone czasy zaniku dla obu próbek są porównywalne w granicy błędów pomiarowych i wynoszą odpowiednio 338 μ s dla UCNPs@SiO₂ oraz 332 μ s dla UCNPs@SiO₂-RB. Zaobserwowane skrócenie czasów zaniku pasma zielonego wskazuje, że po przyłączeniu cząsteczek RB do powierzchni UCNPs@SiO₂-RB pojawia się

nieradiacyjny przekaz energii. Wspomniane wcześniej nałożenie widma absorpcji RB i luminescencji UCNPs@SiO₂, a także niewielka odległość między nanocząstką i barwnikiem (dzięki kowalencyjnemu połączeniu) pozwalają stwierdzić, że obserwowanym nieradiacyjnym przekazem energii jest FRET.

W celu wyznaczenia, jak wydajnie zachodzi proces rezonansowego przekazu energii na podstawie wyznaczonych czasów zaniku luminescencji wyznaczono wydajność FRET. Bazując na zależności:

$$E_2 = 1 - \frac{\tau_{RB}}{\tau_0} \quad (6.3)$$

gdzie:

τ_{RB} – czas zaniku luminescencji UCNPs@SiO₂-RB,

τ_0 – czas zaniku luminescencji UCNPs@SiO₂,

obliczono, że wydajność transferu energii dla pasma wokół długości fali 520 nm wynosi 19%, natomiast dla pasma wokół długości fali 540 nm wynosi 17%. Porównując wartości wydajności przekazu energii E_1 oraz E_2 można zauważyć, że wartość wydajności E_1 wyznaczona na podstawie pomiarów intensywności luminescencji jest większa niż wartość wydajności rezonansowego przekazu energii E_2 wyznaczonej na podstawie pomiarów czasów zaniku luminescencji. Oznacza to, że dla badanego materiału FRET nie jest jedyną drogą przekazu energii z nanocząstek do cząsteczek RB, lecz stanowi około 62% całkowitego przekazu energii. Pozostała część energii może być zatem przekazywana na drodze reabsorpcji. Współwystępowanie obu przekazów energii spowodowane jest tym, że wydajność FRET (k) jest proporcjonalna do szóstej potęgi odległości między donorem i akceptorem energii [50], co opisuje wzór:

$$k = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (6.4)$$

gdzie:

τ_D – czas zaniku donora,

R_0 – promień Förstera – odległość między donorem a akceptorem, przy której wydajność transferu energii wynosi 50%,

r – odległość między donorem a akceptorem.

Ze względu na rozmieszczenie jonów Er³⁺ w całej objętości nanocząstki odległość między donorem i akceptorem wynosi od około 5 nm do około 25 nm. Z tego względu

najefektywniej FRET zachodzi dla jonów Er^{3+} znajdujących się blisko powierzchni nanocząstki. Emitery umieszczone bliżej środka nanocząstki mogą przekazywać energię na drodze reabsorpcji.

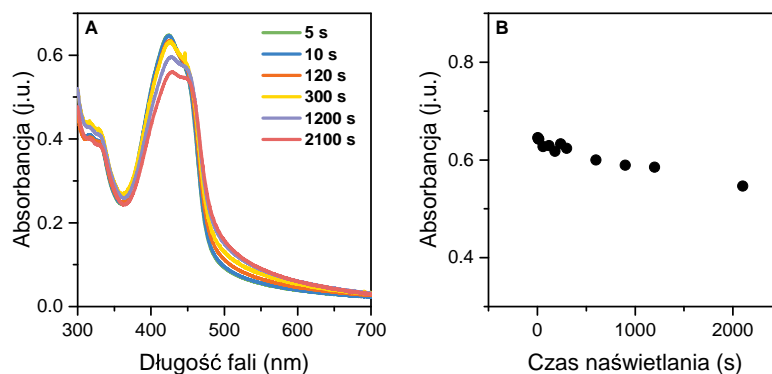
W wielu dostępnych danych literaturowych dotyczących podobnego materiału, jak opisywany w niniejszych badaniach, w celu ułatwienia przyłączenia cząsteczek RB do powierzchni nanocząstki wykorzystywano kwas kapronowy [35, 37, 108]. Mimo że obecność kwasu ułatwia przyłączenie molekuł barwnika to jednocześnie zwiększa odległość między cząsteczką RB a nanocząstką. Odległość ta odpowiada długości łańcucha węglowego w cząsteczce kwasu kapronowego i wynosi 0.6 nm. W celu oszacowania, jak pominięcie zastosowania kwasu kapronowego w procesie wytwarzania próbki wpływa na zwiększenie wydajności FRET przeanalizowano badania przedstawione w pracy Melle *et al.* [187]. W pracy tej wyznaczono zależność wydajności FRET w funkcji odległości między nanocząstkami UCNPs@SiO₂ a kropkami kwantowymi CdTe. Molowy współczynnik absorpcji nanokryształów CdTe w zakresie od 500 do 550 nm zbliżony jest do wartości współczynnika absorpcji cząsteczek RB. Ze względu na podobne właściwości optyczne kropek kwantowych CdTe i cząsteczek RB założono, że wydajność FRET dla UCNPs@SiO₂ i nanokryształów CdTe będzie porównywalna do wydajności FRET dla UCNPs@SiO₂ i cząsteczek RB. Analiza wyników zaprezentowanych w pracy [187] umożliwiła oszacowanie, że wydajność rezonansowego transferu energii E_2 w przypadku wytworzenia materiału bez zastosowania kwasu kapronowego wzrasta o około 30% względem wartości wydajności dla materiału wykonanego z wykorzystaniem kwasu kapronowego.

6.3 Generacja $^1\text{O}_2$ przez UCNPs@SiO₂-RB

Detekcję reaktywnych form tlenu przez UCNPs@SiO₂-RB przeprowadzono stosując metodę spektrofotometryczną. Metoda ta polega na pomiarze absorbancji związku czułego na obecność ROS (indykatora), która maleje się wraz ze wzrostem stężenia ROS w roztworze. Głównym rodzajem ROS produkowanym przez RB jest tlen singletowy – $^1\text{O}_2$. Z tego względu w badaniach jako indykator zastosowano DPBF. Dokładny opis zastosowanej metody opisano w podrozdziale 2.5.8.

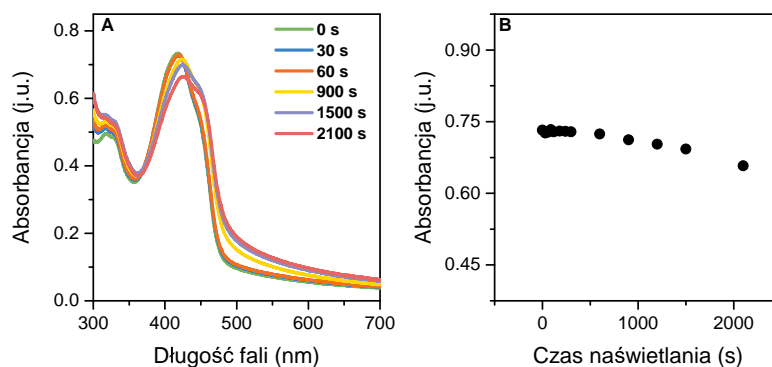
Przed przystąpieniem do eksperymentu, w ramach którego badano produkcję $^1\text{O}_2$ przez UCNPs@SiO₂-RB wykonano szereg eksperymentów kontrolnych. Jako pierwszy przeprowadzono eksperyment mający na celu sprawdzenie stabilności DPBF w wodzie przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym. Na rysunku 6.10(A) przedstawiono widma absorpcji DPBF mierzone w funkcji czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Na rysunku 6.10(B) przedstawiono zależność maksimum absorbancji DPBF

od czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku 6.10(B) pod wpływem ekspozycji na promieniowanie o długości fali 980 nm z gęstością mocy 3 Wcm^{-2} po upływie 2100 s absorbancja DPBF spada o około 15%. Na tej podstawie uznano, że w opisanych warunkach taka stabilność DPBF jest wystarczająca.



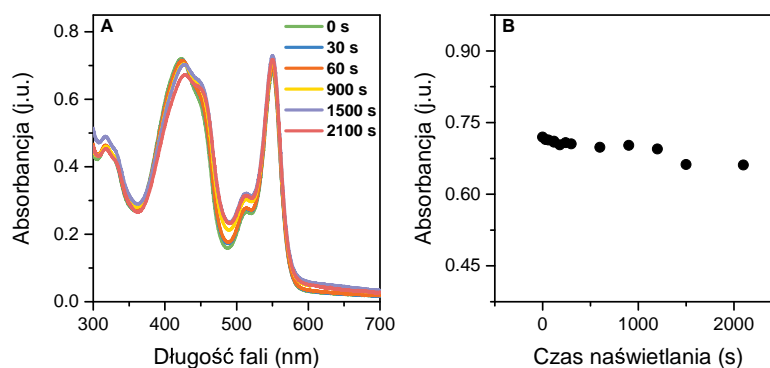
RYSUNEK 6.10: (A) Widma absorpcji $50 \mu\text{M}$ wodnego roztworu DPBF przy pobudzeniu laserem 980 nm z gęstością mocy 3 Wcm^{-2} . (B) Zależność maksimum absorbancji DPBF od czasu ekspozycji roztworu DPBF na promieniowanie podczerwone.

Następnie, przeprowadzono dwa eksperymenty kontrolne, sprawdzające, czy nanocząstki UCNPs@SiO_2 oraz czy wolne cząsteczki RB pod wpływem ekspozycji na promieniowanie podczerwone powodują powstawanie $^1\text{O}_2$. Na rysunkach 6.11(A) i (B) przedstawiono wyniki eksperymentu przeprowadzonego dla UCNPs@SiO_2 . Jak można zauważyć na rysunku 6.11(A) widmo absorpcji spada nieznacznie wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Na rysunku 6.11(B) przedstawiono zależność maksimum absorbancji od czasu naświetlenia promieniowaniem podczerwonym. Z otrzymanej zależności wyznaczono, że maksimum absorbancji DPBF spada wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone o długości fali 980 nm o około 10%, podobnie jak w przypadku roztworu zawierającego tylko DPBF (rysunek 6.10).



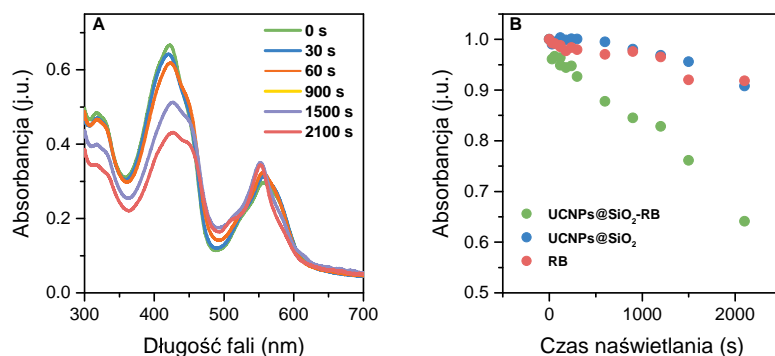
RYSUNEK 6.11: (A) Widma absorpcji $64 \mu\text{gml}^{-1}$ UCNPs@SiO_2 oraz $50 \mu\text{M}$ wodnego roztworu DPBF przy pobudzeniu laserem 980 nm z gęstością mocy 3 Wcm^{-2} . (B) Zależność maksimum absorbancji DPBF od czasu ekspozycji roztworu DPBF z UCNPs@SiO_2 na promieniowanie podczerwone.

Na rysunku 6.12(A) przedstawiono widma absorpcji wyznaczone dla roztworu DPBF i RB. Maksimum przy długości fali około 420 nm odpowiada maksimum absorpcji DPBF, natomiast przy długości fali około 550 nm odpowiada maksimum absorpcji RB. Jak można zauważyć absorbanca RB nie zmienia się znacząco w czasie ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Absorbanca DPBF spada wraz z wydłużaniem tego czasu. W celu oszacowania, jak duży jest to spadek wyznaczono zależność maksimum absorbancji DPBF od czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone, którą przedstawiono na rysunku 6.12(B). Zaobserwowany efekt był porównywalny do efektu jaki zaobserwowano w przypadku UCNP@SiO₂. Mianowicie, po upływie 2100 s powoduje spadek absorbancji DPBF o około 10%. Analiza wyników obu doświadczeń kontrolnych pokazuje, że w wyniku ekspozycji na promieniowanie podczerwone nanocząstki UCNP@SiO₂ oraz cząsteczki RB nie powodują powstawania ¹O₂.



RYСУNEK 6.12: (A) Widma absorpcji 6 μM wodnego roztworu RB oraz 50 μM wodnego roztworu DPBF przy pobudzeniu laserem 980 nm z gęstością mocy 3 Wcm^{-2} . (B) Zależność maksimum absorbancji DPBF od czasu ekspozycji roztworu DPBF z RB na promieniowanie podczerwone.

W celu detekcji ¹O₂ generowanego przez UCNP@SiO₂-RB przygotowano roztwór o stężeniu 64 μgml^{-1} , do którego następnie dodano DPBF i zmierzono absorpcję w funkcji czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Przedstawione na rysunku 6.13(A) widma absorpcji pokazują malejącą, wraz z rosnącym czasem ekspozycji, absorpcję DPBF (maksimum przy długości fali 422 nm) oraz praktycznie niezmienną w czasie absorpcję RB (maksimum przy długości fali 550 nm). Spadek absorpcji DPBF wynika z rosnącego stężenia ¹O₂ w roztworze. Na rysunku 6.13(B) przedstawiono zależność absorbancji DPBF w długości fali 422 nm od czasu ekspozycji. Otrzymana zależność pokazuje, że spadek absorbancji DPBF wynosi około 40%. W celu porównania otrzymanego wyniku z opisanymi wcześniej eksperymentami kontrolnymi na rysunku 6.13(B) przedstawiono zależność absorpcji DPBF od czasu ekspozycji dla roztworu RB (czerwone kropki) oraz UCNP@SiO₂ (niebieskie kropki). Dane te przedstawiono wcześniej na rysunkach 6.11 i 6.12. Z zestawienia wyników eksperymentów kontrolnych oraz eksperymentu z wykorzystaniem UCNP@SiO₂-RB wynika, że spadek absorpcji DPBF wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone zaobserwowany dla roztworu



RYSUNEK 6.13: (A) Widma absorpcji $64 \mu\text{gml}^{-1}$ UCNPs@SiO₂-RB oraz $50 \mu\text{M}$ DPBF w wodzie przy pobudzeniu laserem 980 nm z gęstością mocy 3 Wcm^{-2} . (B) Zależność znormalizowanego maksimum absorpcji DPBF przy 422 nm od czasu ekspozycji na promieniowanie podczerwone dla wodnych roztworów: UCNPs@SiO₂-RB (zielone kropki), UCNPs@SiO₂ (niebieskie kropki) oraz RB (czerwone kropki).

UCNPs@SiO₂-RB jest największy. Oznacza to, że w przypadku UCNPs@SiO₂-RB promieniowanie podczerwone powoduje wzbudzenie nanocząstek NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺@SiO₂, z których następnie energia przekazywana jest do cząsteczek RB, co w konsekwencji prowadzi do powstawania ¹O₂. Natomiast, jak wykazano w doświadczeniach kontrolnych, ekspozycja na promieniowanie podczerwone roztworu RB oraz UCNPs@SiO₂ nie powoduje znacznego spadku absorpcji DPBF. Oznacza to, że ani RB ani UCNPs@SiO₂ nie powoduje powstawania ¹O₂ pod wpływem pobudzenia promieniowaniem podczerwonym.

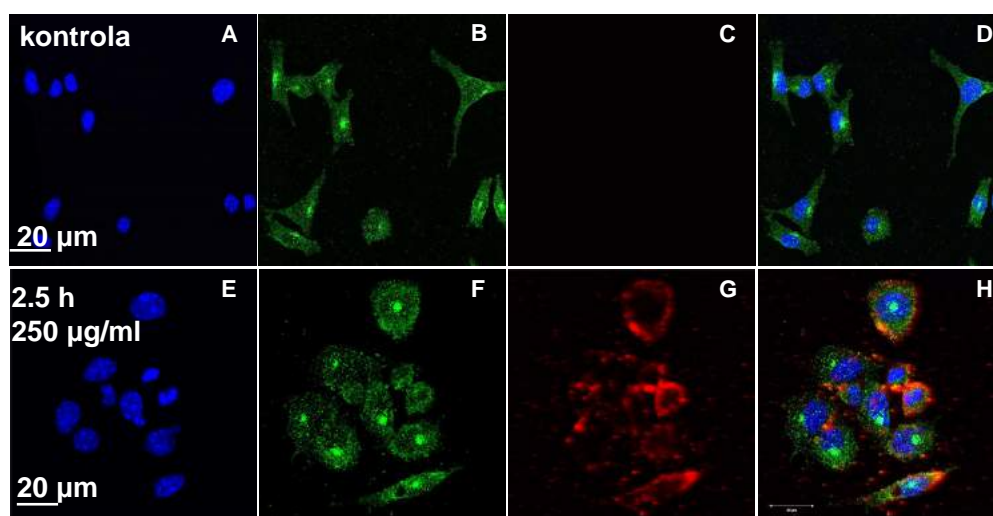
6.4 Badania *in-vitro* z wykorzystaniem UCNPs@SiO₂-RB

Zastosowanie terapii fotodynamicznej na komórkach nowotworowych 4T1 wymaga wprowadzenia UCNPs@SiO₂-RB do ich wnętrza, a następnie ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Przed przystąpieniem do badań nad skutecznością PDT niezbędne jest jednak określenie stężenia nanocząstek oraz dobranie bezpiecznego poziomu ekspozycji komórek na promieniowanie podczerwone wykorzystywanych podczas przeprowadzania naświetlań terapeutycznych. W ramach badań komórkowych za pomocą mikroskopii konfokalnej sprawdzono, czy UCNPs@SiO₂-RB wprowadzane są do wnętrza komórek 4T1. Następnie przeprowadzono badania cytotoksyczności UCNPs@SiO₂-RB przy braku ekspozycji na promieniowanie podczerwone, a także stosując bezpieczną dawkę UCNPs@SiO₂-RB komórki poddano działaniu terapii fotodynamicznej.

Szczegółowe procedury przygotowania komórek 4T1 oraz przeprowadzania badań komórkowych opisano w podrozdziale 2.6. Do wszystkich testów cytotoksyczności opisywanych w ramach niniejszej pracy wykorzystano test przeżywalności Presto Blue (PB).

6.4.1 Obrazowanie komórek 4T1 wykorzystując technikę mikroskopii konfokalnej

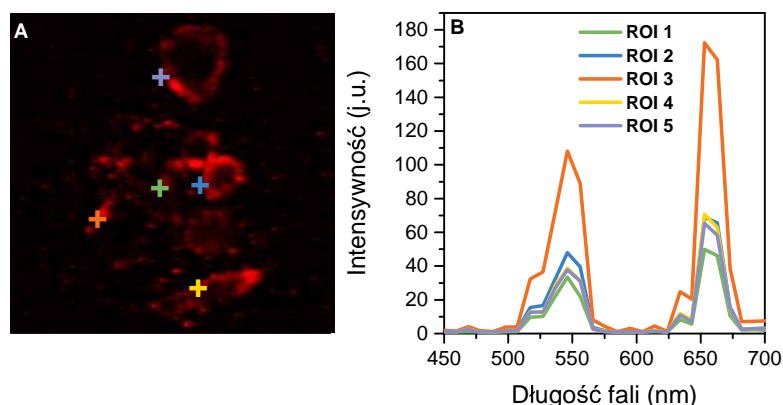
W celu sprawdzenia, czy w wyniku inkubacji UCNPs@SiO₂-RB znajdują się wewnątrz komórek przeprowadzono obrazowanie wykorzystując technikę fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej. Obrazowanie wykonano dla dwóch grup komórek – kontrolnej oraz inkubowanej z nanocząstkami UCNPs@SiO₂-RB. W obu badanych grupach za pomocą barwników fluorescencyjnych – Alexa Fluor 488 oraz Hoechst33342 wyznakowano odpowiednio lizosomy oraz jądra komórkowe. Procedurę przygotowania preparatów opisano w podrozdziale 2.6.6. Obrazy dla grupy kontrolnej przedstawiono na rysunkach 6.14(A-D). Obrazy dla komórek inkubowanych z UCNPs@SiO₂-RB przedstawiono na rysunkach 6.14(E-H). Na rysunkach 6.14(A) i (E) przedstawiono obrazy wyznakowanych jąder komórkowych (kolor niebieski). Na rysunkach 6.14(B) i (F) przedstawiono obrazy wyznakowanych lizosomów (kolor zielony). Na rysunkach 6.14(C) i (G) przedstawiono obraz luminescencji preparatu przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym. Przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym w preparacie zawierającym komórki z grupy kontrolnej (rysunek 6.14(D)) nie zaobserwowano żadnej luminescencji. Pobudzenie promieniowaniem podczerwonym nie wywołuje bowiem autofluorescencji komórek [188–190]. Luminescencja nanocząstek obserwowana jest jedynie w komórkach, do których wcześniej dodano UCNPs@SiO₂-RB.



RYSUNEK 6.14: Obrazy komórek otrzymane za pomocą mikroskopu konfokalnego dla (A-D) grupy kontrolnej oraz (E-H) grupy inkubowanej z UCNPs@SiO₂-RB. Czas inkubacji: 2.5h, stężenie UCNPs@SiO₂-RB: 250 µgml⁻¹. (A) oraz (E) Luminescencja wyznakowanych za pomocą Hoechst 33342 jąder komórkowych (ex. 705 nm, 1.37 Wµm⁻², em. 425-475 nm). (B) oraz (F) Luminescencja wyznakowanych za pomocą AlexaFluor 488 lizosomów (ex. 488 nm, 0.05 Wµm⁻², em. 495-572 nm). (C) oraz (G) Luminescencja UCNPs@SiO₂-RB (ex. 980 nm, 0.20 Wµm⁻², em. 500-730 nm). (D) and (H) Nałożenie obrazów luminescencji z wyznakowanych organelli oraz UCNPs@SiO₂-RB.

Na rysunku 6.14(D) na jednym obrazie nałożono wszystkie wyznaczone wcześniej obrazy wykonane dla komórek z grupy kontrolnej. Otrzymany w ten sam sposób obraz dla komórek inkubowanych z UCNPs@SiO₂-RB przedstawiono na rysunku 6.14(H). Dzięki połączeniu wszystkich otrzymanych obrazów możliwe jest określenie, czy materiał znajduje się wewnątrz komórek. Z analizy obrazów przedstawionych na rysunkach 6.14(D) oraz (H) wynika, że sygnał pochodzący od nanocząstek pokrywa się z sygnałem zmierzonym dla wyznakowanych lizosomów. Oznacza to, że UCNPs@SiO₂-RB znajdują się wewnątrz komórek 4T1.

W celu sprawdzenia, czy przedstawiona na rysunku 6.14(G) luminescencja pochodzi od nanocząstek zmierzono widma UCL z różnych obszarów preparatu. Na rysunku 6.15(A) krzyżykami oznaczono miejsca, z którego zmierzono widma przedstawione na rysunku 6.15(B). Zmierzone widma odpowiadają widmom UCNPs@SiO₂-RB. Oznacza to, że rejestrowany sygnał pochodzi od wzbudzonych promieniowaniem podczerwonym nanocząstek UCNPs@SiO₂-RB.

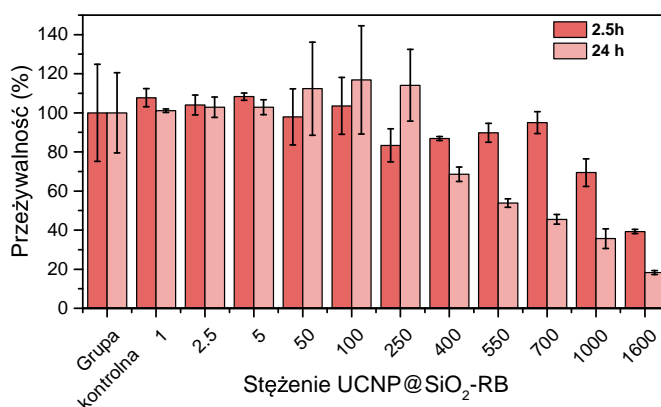


RYSUNEK 6.15: (A) Obraz komórek inkubowanych z UCNPs@SiO₂-RB wykonany za pomocą mikroskopu konfokalnego przy pobudzeniu promieniowaniem podczerwonym z zaznaczonymi obszarami, dla których zmierzono widma UCL. (B) Widma luminescencji UCNPs@SiO₂-RB wewnątrz komórek 4T1.

Wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego obrazowanie umożliwiło nie tylko sprawdzenie, czy nanocząstki znajdują się wewnątrz komórek, ale także określenie wpływu badanej próbki na morfologię komórek. Przed inkubacją z nanocząstkami komórki miały wydłużony kształt, natomiast po dodaniu nanocząstek komórki stały się bardziej okrągłe. Dodanie nanocząstek w stężeniu 250 μgml⁻¹ nie spowodowało jednak rozpadu komórek. Sugeruje to, że ilość materiału wykorzystana w doświadczeniu jest nietoksyczna. Ilościowa analiza możliwa jest jednak poprzez przeprowadzenie testów cytotoksyczności.

6.4.2 Testy przeżywalności komórek 4T1 dla różnych stężeń UCNPs@SiO₂-RB

W celu znalezienia najwyższego stężenia UCNPs@SiO₂-RB, które jest nietoksyczne dla komórek 4T1 wykonano testy przeżywalności PB stosując UCNPs@SiO₂-RB o stężeniach w zakresie od 0 do 1600 μgml^{-1} . Komórki inkubowano z nanocząstkami UCNPs@SiO₂-RB przez 2.5 oraz 24 godziny. Jak przedstawiono na rysunku 6.16 wysoka przeżywalność występuje dla próbek o stężeniu do 250 μgml^{-1} niezależnie od czasu inkubacji komórek z nanocząstkami. Dla stężeń w zakresie od 400 do 700 μgml^{-1} po 2.5-godzinnym czasie inkubacji przeżywalność komórek zaczyna spadać. Jednakże przy wydłużeniu czasu inkubacji do 24 h przeżywalność komórek maleje do około 65%, 50% oraz 45% odpowiednio dla stężeń 400, 550 oraz 700 μgml^{-1} . Dla największych stężeń 1000 oraz 1600 μgml^{-1} niezależnie od czasu inkubacji komórek z nanocząstkami UCNPs@SiO₂-RB przeżywalność komórek jest mniejsza niż 70%. Na podstawie otrzymanych wyników w dalszych badaniach postanowiono zastosować próbkę o stężeniu 250 μgml^{-1} .

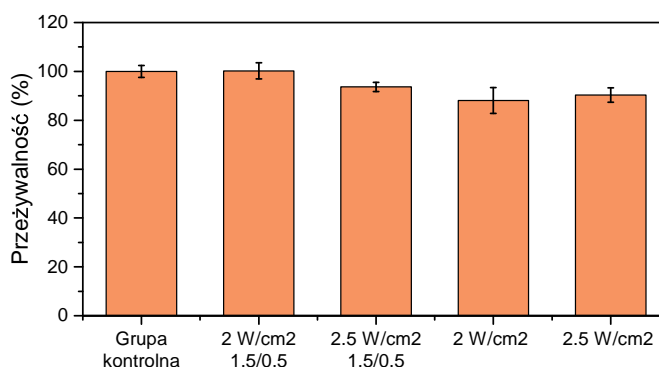


RYSUNEK 6.16: Test cytotoksyczności PB przeprowadzony dla komórek 4T1 inkubowanych z UCNPs@SiO₂-RB w zakresie stężeń od 0 do 1600 μgml^{-1} . Testy przeprowadzono dla dwóch czasów inkubacji wynoszących 2.5 h oraz 24 h.

6.4.3 Testy przeżywalności komórek 4T1 po ekspozycji na promieniowanie podczerwone

Przed przystąpieniem do poddania komórek terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem UCNPs@SiO₂-RB wykonano testy mające na celu dobranie bezpiecznej mocy promieniowania podczerwonego. Naświetlania komórek za pomocą promieniowania podczerwonego o długości fali 980 nm wykonano stosując cztery schematy naświetlań: (i) naświetlanie ciągłe przez 10 minut z gęstością mocy 2 Wcm^{-2} , (ii) naświetlanie ciągłe przez 10 minut z gęstością mocy 2.5 Wcm^{-2} , (iii) naświetlanie przerywane przez 10 minut z gęstością mocy 2 Wcm^{-2} oraz (iv) naświetlanie przerywane przez 10 minut z gęstością mocy 2.5 Wcm^{-2} . W cyklu naświetlania przerywanego po 1.5-minutowej

ekspozycji na promieniowanie podczerwone następowała 0.5-minutowa przerwa (całkowity czas naświetlania wynosił 7.5 minuty). Wyniki eksperymentu przedstawiono na rysunku 6.17. Przeprowadzone testy wykazały, że przeżywalność komórek we wszystkich badanych grupach nie spada poniżej 90%. Oznacza to, że ekspozycja komórek na działanie promieniowania podczerwone w zastosowanych wariantach jest bezpieczna. Ze względu na największą przeżywalność komórek wśród badanych wariantów naświetlań do dalszych badań postanowiono wykorzystać promieniowanie podczerwone o mniejszej mocy (2 Wcm^{-2}) oraz zastosować naświetlanie w sposób ciągły i przerywane.

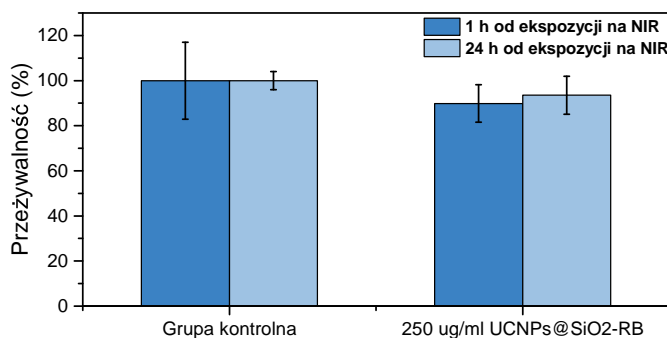


RYSUNEK 6.17: Przeżywalność komórek poddanych ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 oraz 2.5 Wcm^{-2} . Zastosowano dwa schematy naświetlania: ciągłe przez 10 minut oraz przerywane (1.5/0.5), w którym po 1.5-minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone następowała 0.5-minutowa przerwa.

6.4.4 Terapia fotodynamiczna *in-vitro* z zastosowaniem UCNPs@SiO₂-RB

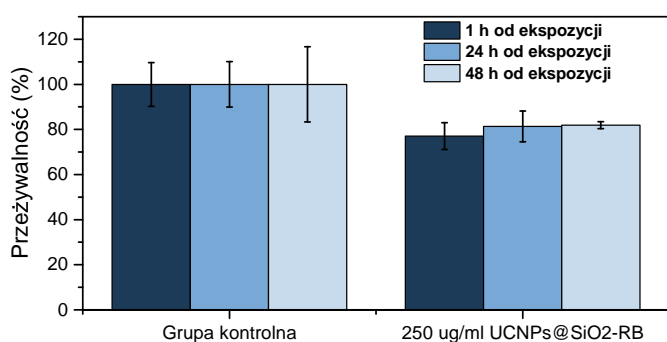
W kolejnym kroku przeprowadzono właściwy eksperyment badający skuteczność zastosowania UCNPs@SiO₂-RB w terapii fotodynamicznej. W tym celu komórki 4T1 inkubowano z UCNPs@SiO₂-RB o stężeniu $250 \mu\text{gml}^{-1}$ przez 2.5 h. Po upływie tego czasu badane grupy komórek naświetlono promieniowaniem podczerwonym z gęstością mocy 2 Wcm^{-2} przez 10 minut w cyklu przerywanym, tj. 1.5/0.5. Bezpośrednio po skończonym naświetlaniu, do komórek dodano PB. Po upływie godziny zmierzono wartości intensywności luminescencji dla wszystkich testowanych grup komórek. Jak wspomniano w podrozdziale 2.6.3 wartość luminescencji jest wprost proporcjonalna do liczby żyjących komórek. Wyniki testu przeżywalności PB przedstawiono na rysunku 6.18.

Jak można zauważyć przeżywalność komórek, po upływie 1 h od ekspozycji na promieniowanie podczerwone, była w granicy błędów pomiarowych porównywalna z przeżywalnością grupy kontrolnej. Dzięki zastosowaniu w przeprowadzonych eksperymentach testu PB, który jest testem przeżyciowym (wykonanie testu nie prowadzi do uszkodzenia komórek), możliwe było ponowne przeprowadzenie testu cytotoxyczności na tych samych grupach



RYSUNEK 6.18: Test cytotoxyczości PB przeprowadzony na komórkach 4T1 inkubowanych z $250 \mu\text{gml}^{-1}$ UCNPs@SiO₂-RB poddanych 10-minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm^{-2} w cyku 1.5/0.5. Testy odczytano po upływie 1 h oraz 24 h do zastosowania terapii fotodynamicznej.

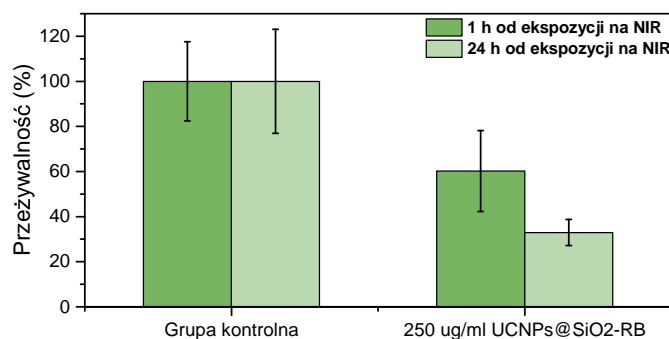
komórek po upływie 24 h (kolor jasnoniebieski na rysunku 6.18). Ponowne wykonanie testu wykazało, że przeżywalność komórek po upływie 24 h nie zmieniła się w porównaniu do przeżywalności zmierzonej po 1 h od ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Otrzymany wynik wskazuje na brak efektu terapeutycznego w badanych warunkach. W celu sprawdzenia, czy ponowne zastosowanie terapii fotodynamicznej pozwoli uzyskać efekt terapeutyczny, komórkom podano drugą dawkę UCNPs@SiO₂-RB i inkubowano przez 2.5 godziny. Następnie, komórki naświetlono za pomocą promieniowania podczerwonego stosując cykl przerywany. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rysunku 6.19. Po dwukrotnej inkubacji komórek z UCNPs@SiO₂-RB i dwukrotnym naświetleniu, testy cytotoxyczości wykonano po upływie 1, 24 oraz 48 h od ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Eksperyment wykazał, że przeżywalność komórek, po ponownym zastosowaniu terapii, spadła do około 80% niezależnie od czasu, który upłynął od naświetlania.



RYSUNEK 6.19: Test cytotoxyczości PB przeprowadzony na komórkach 4T1 poddanych 10-minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm^{-2} w cyku 1.5/0.5 po zastosowaniu drugiej dawki UCNPs@SiO₂-RB. Testy wykonano po upływie 1 h, 24 h oraz 48 h od ponownego zastosowania terapii fotodynamicznej.

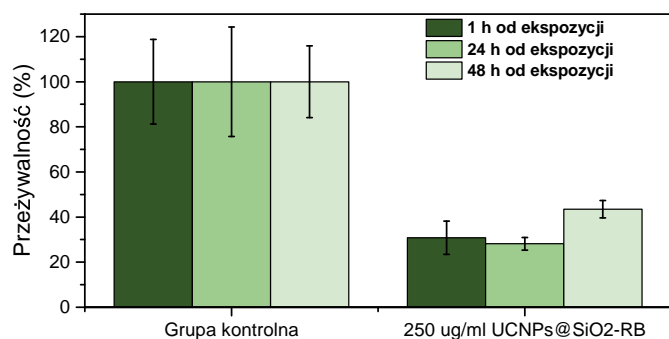
W związku z niewielką skutecznością zastosowanej terapii eksperyment wykonano ponownie stosując takie samo – $250 \mu\text{gml}^{-1}$ stężenie UCNPs@SiO₂-RB i 2.5-godziną

inkubację z komórkami, lecz naświetlając komórki za pomocą promieniowania podczerwonego w cyklu ciągłym przez 10 minut z mocą 2 Wcm^{-2} . Jak przedstawiono na rysunku 6.20 przeżywalność komórek po naświetleniu spadła w porównaniu z przeżywalnością grupy kontrolnej do 60 %. Przeżywalność tej samej grupy komórek po 24 h (kolor jasnozielony na rysunku 6.20) spadła natomiast do 33%. Zatem, po podaniu komórkom jednej dawki próbki zaobserwowano dużą skuteczność terapeutyczną UCNPs@SiO₂-RB.



RYSUNEK 6.20: Test cytotoxyczości PB przeprowadzony na komórkach 4T1 inkubowanych z $250 \mu\text{gml}^{-1}$ poddanych 10-minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm^{-2} . Testy wykonano po upływie 1 h oraz 24 h od zastosowania terapii fotodynamicznej.

W celu sprawdzenia, czy ponowne zastosowanie terapii na tej samej grupie komórek spowoduje dalszy spadek ich przeżywalności, zastosowano drugą dawkę UCNPs@SiO₂-RB i ponownie naświetlono promieniowaniem podczerwonym. Wyniki eksperymentu przedstawiono na rysunku 6.21. Przeżywalność komórek pozostała na poziomie około 30%, a po upływie 48 h od zastosowania drugiego cyklu terapeutycznego wzrosła do 40%. Oznacza to, że żyjące komórki po takim czasie uległy regeneracji i rozpoczęły procesy podziałowe. Zatem ponowne zastosowanie terapii nie wzmocniło efektu terapeutycznego.



RYSUNEK 6.21: Test cytotoxyczości PB przeprowadzony na komórkach 4T1 poddanych 10-minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm^{-2} po podaniu drugiej dawki UCNPs@SiO₂-RB. Testy wykonano po upływie 1 h, 24 h oraz 48 h od ponownego zastosowania terapii fotodynamicznej.

Z przeprowadzonych badań komórkowych wynika, że przeżywalność komórek jest najniższa po inkubacji z UCNPs@SiO₂-RB o stężeniu $250 \mu\text{gml}^{-1}$, a następnie poddaniu ich ciągłej ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm^{-2} .

Przeżywalność po zastosowaniu takiej procedury wynosi około 30%. Opisane w literaturze badania *in-vitro* nad skutecznością terapii fotodynamicznej wykorzystujące podobne procedury, jak badane w ramach niniejszej pracy, charakteryzują się niższą skutecznością niż terapia opisana w niniejszym rozdziale. W tabeli 6.1 przedstawiono parametry terapii fotodynamicznej z zastosowaniem różnych materiałów up-konwertujących oraz RB oraz odpowiadającą im przeżywalność komórek.

TABELA 6.1: Porównanie efektywności terapii fotodynamicznej dla różnych materiałów konwertujących energię w górę.

Referencja	Materiał	Stężenie	Gęstość mocy promieniowania	Czas naświetlania	Linia komórkowa	Przeżywalność
[33]	CaTiO ₃ :Er,Yb	100 μgml ⁻¹	1.5 Wcm ⁻²	6 min	Hep G2	~40%
[34]	NaGdF ₄ :Er,Yb	100 μgml ⁻¹	0.4 Wcm ⁻²	10 min	4T1	~55%
[35]	NaYF ₄ :Er,Yb	200 μgml ⁻¹	1.5 Wcm ⁻²	10 min	JAR	~50%
[36]	NaYF ₄ :Er,Yb	200 μgml ⁻¹	1.5 Wcm ⁻²	10 min	HT-29	~40%
[37]	NaGdF ₄ :Er,Yb	250 μgml ⁻¹	13 Wcm ⁻² (pobudzenie impulsowe)	10 min	A549	~50%
Ta praca	NaYF₄:Er,Yb	250 μgml⁻¹	2 Wcm⁻²	10 min	4T1	~33%

Ze względu na różne rodzaje komórek wykorzystywanych do badań, a także zróżnicowanie materiału, różne dawki nanocząstek i zastosowane moce oraz czasy ekspozycji na promieniowanie podczerwone dokładne porównanie skuteczności terapii wymienionych w tabeli 6.1 nie jest możliwe. W pracy Chen *et al* [34] badania przeprowadzono tak, jak w niniejszej pracy, na linii komórkowej 4T1. W badaniach tych wykorzystano jednak inaczej zmodyfikowane nanocząstki, które pokryto bydlęcą albuminą wołową, a następnie wypełniono cząsteczkami RB. Trwająca 10 minut ekspozycja na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 0.4 Wcm⁻² komórek zawierających 100 μgml⁻¹ wyżej opisanego materiału spowodowała spadek przeżywalności komórek do 60% po 24h od zastosowania terapii. Inna grupa badawcza [35], wykazała, że 200 μgml⁻¹ nanocząstek z przyłączonymi, z wykorzystaniem kwasu kapronowego, cząsteczkami RB po 10-minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 1.5 Wcm⁻² powoduje spadek przeżywalności komórek złośliwego nowotworu łozyska do około 50%. Efekt ten zaobserwowano jednak dopiero po 48h od zastosowania terapii fotodynamicznej. Mimo rozbieżności warunków badań komórkowych w opisanych wyżej danych literaturowych, wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej nanocząstki UCNPs@SiO₂-RB wyróżniają się jedną z najwyższych skuteczności w terapii przeciwnowotworowej.

6.5 Podsumowanie

W niniejszym rozdziale pracy przedstawiono wyniki badań nad próbą poprawy skuteczności zastosowania UCNPs@SiO₂-RB w terapii fotodynamicznej. W tym celu stworzono nanocząstki UCNPs@SiO₂-RB wykorzystując zmodyfikowaną procedurę, która w odróżnieniu od standardowej procedury opisywanej w literaturze nie zawierała

kwasy kapronowe. Kwas kapronowy jest powszechnie wykorzystywany jako element łączący nanocząstkę z cząsteczką RB [35, 37, 108]. Rezygnacja z zastosowania kwasu kapronowego umożliwiła skrócenie odległości między nanocząstką i cząsteczką barwnika, co doprowadziło do zwiększenia wydajności przekazu energii z nanocząstki do RB. Zwiększona wydajność transferu energii przekłada się bezpośrednio na wzrost liczby wzbudzonych cząsteczek RB, co w konsekwencji prowadzi do wydajniejszej produkcji tlenu singletowego. Przeprowadzone pomiary widm UCL oraz czasów zaniku UCL wykazały, że w wytworzonym materiale przekaz energii odbywa się poprzez reabsorpcję oraz FRET, z czego FRET stanowi 62% całego przekazu energii. Przeprowadzone testy cytotoxyczności PB wykazały, że UCNPs@SiO₂-RB wprowadzone do wnętrza komórek 4T1 są nietoksyczne przy braku ekspozycji na promieniowanie podczerwone. Dopiero naświetlenie komórek zawierających UCNPs@SiO₂-RB powoduje spadek ich przeżywalności. Przeprowadzone testy skuteczności terapii fotodynamicznej wykazały, że wykorzystanie UCNPs@SiO₂-RB o stężeniu 250 μgml⁻¹ przy 10 minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone z gęstością mocy 2 Wcm⁻¹ powoduje spadek przeżywalności komórek do około 30%. Porównanie wyników otrzymanych w niniejszej pracy oraz danych literaturowych wykazuje, że wytworzone z wykorzystaniem uproszczonej metody nanocząstki UCNPs@SiO₂-RB posiadają duży potencjał aplikacyjny w terapii fotodynamicznej.

Podsumowanie

W ramach badań zaprezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę odpowiedzi na kilka pytań dotyczących procesu konwersji energii w górę dla nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. W ramach pracy udzielono odpowiedzi na pytania: (i) jak pole magnetyczne wpływa na UCL nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, (ii) jak obecność srebrnych nanodrutów wpływa na UCL nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ oraz (iii) jak uproszczenie metody przyłączania cząsteczek RB do powierzchni nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}@\text{SiO}_2$ wpływa na skuteczność terapii fotodynamicznej.

Przeprowadzone pomiary widm wzbudzenia wykazały, że niezależnie od rozmiaru, struktury, pokrycia powierzchni nanocząstek $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ długość fali, przy której obserwowany jest rezonans absorpcyjny wynosi 977 nm. Umieszczenie UCNPs w polu magnetycznym powoduje przesunięcie rezonansu absorpcyjnego. Wielkość przesunięcia zależy od wartości indukcji pola magnetycznego w jakim nanocząstka zostaje umieszczona, co spowodowane jest zeemanowskim rozszczepieniem stanów energetycznych w Yb^{3+} . Przeprowadzone badania wykazały, że pole magnetyczne wpływa na UCL nanocząstek w analogiczny sposób, jak zmiana długości fali wzbudzenia i obniżenie mocy promieniowania wzbudzającego. Wykonane doświadczenia wykazały, że pole magnetyczne nie wpływa na proces transferu energii z jonu Yb^{3+} do jonu Er^{3+} , a także na wydajność przejść promienistych w jonie Er^{3+} .

W celu odpowiedzi na pytanie (ii) przeprowadzono doświadczenia, które umożliwiły określenie, czy obecność AgNWs powoduje zmianę wydajności wzbudzenia, emisji czy transferu energii w $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. Przeprowadzone eksperymenty spektroskopowe, uzupełnione wynikami symulacji FDTD, wykazały, że w wytworzonych nanostrukturach hybrydowych AgNW-UCNPs nie obserwuje się zmiany wydajności wzbudzenia ani wydajności transferu energii. W badanych warunkach niemożliwe jest stwierdzenie, czy obecność nanodrutów powoduje wzmocnienie intensywności UCL. Wykazano jednak, że obecność nanodrutów powoduje zmianę względnej intensywności poszczególnych pasm UCL nanocząstek. Obecność AgNWs powoduje także modyfikację czasów zaniku i narastania UCL nanocząstek. Przeprowadzone badania wykazały, że w generowane

w nanodrucie SPPs powodują przyspieszenie opróżniania stanu $^4S_{3/2}$. W konsekwencji spada wydajność tryfotonowych mechanizmów wzbudzenia UCNPs.

W ostatniej części pracy przeprowadzono doświadczenia, dzięki którym możliwe było sprawdzenie, jak uproszczenie metody przyłączania cząsteczek RB do powierzchni nanocząstek $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ wpływa na skuteczność terapii fotodynamicznej. Dzięki zastosowanej metodzie uzyskano całkowite pokrycie powierzchni UCNPs@SiO₂ za pomocą barwnika. Co więcej, poprzez zrezygnowanie z wykorzystania kwasu kapronowego, jako linkera, zmniejszono odległość między nanocząstką a cząsteczką RB. Rezygnacja z tego kroku umożliwia zwiększenie wydajności transferu energii z UCNPs do RB o 30% w porównaniu do wydajności tego transferu w nanostrukturze otrzymanej przy zastosowaniu metody z kwasem kapronowym. Badania nad skutecznością terapii fotodynamicznej *in-vitro* wykazały, że nanocząstki UCNPs@SiO₂-RB umieszczone w komórkach 4T1 pod wpływem 10-minutowej ekspozycji na promieniowanie podczerwone o gęstości mocy 2 Wcm^{-2} powodują spadek przeżywalności komórek do 33%. Porównanie otrzymanego wyniku z danymi literaturowymi pozwoliło stwierdzić, że wytworzone w uproszczony sposób UCNPs@SiO₂-RB równie skutecznie niszczą komórki nowotworowe jak podobne nanostruktury wytworzone innymi metodami.

Dorobek naukowy

Publikacje

1. **Borodziuk, A.**, Baranowski, M., Wojciechowski, T., Minikayev, R., Sikora, B., Maude, D. K., Plochocka, P., Kłopotowski Ł., „Excitation efficiency determines the upconversion luminescence intensity of β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ nanoparticles in magnetic fields up to 70 T”, *Nanoscale*, 2020, 12(39), 20300-20307.
2. **Borodziuk, A.**, Kowalik, P., Duda, M., Wojciechowski, T., Minikayev, R., Kalinowska, D., Klepka, M., Sobczak, K., Kłopotowski, Ł., Sikora, B., „Unmodified Rose Bengal photosensitizer conjugated with NaYF₄: Yb, Er upconverting nanoparticles for efficient photodynamic therapy.”, *Nanotechnology*, 2020, 31(46), 465101.

Publikacje niezwiązane z niniejszą pracą

- Kowalik, P., Kamińska, I., Fronc, K., **Borodziuk, A.**, Duda, M., Wojciechowski, T., Sobczak, K., Kalinowska, D., Klepka, M., Sikora, B., „The ROS-generating photosensitizer-free NaYF₄: Yb, Tm@ SiO₂ upconverting nanoparticles for photodynamic therapy application”, *Nanotechnology*, 2021, 32(47), 475101.
- Kowalik, P., Mikulski, J., **Borodziuk, A.**, Duda, M., Kamińska, I., Zajdel, K., Rybusiński, J., Szczytko, J., Wojciechowski, T., Sobczak, K., Minikayev, R., Kulpa-Greszta, M., Pązik, R., Grzączkowska, P., Fronc, K., Łapiński, M., Frontczak-Baniewicz, M., Sikora, B. „Yttrium-doped iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications.”, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2020, 124(12), 6871-6883.
- Sikora, B., Kowalik, P., Mikulski, J., Fronc, K., Kamińska, I., Szewczyk, Konopka, A., Zajdel, K., Minikayev, R., Sobczak, K., Zaleszczyk, W., **Borodziuk, A.**, Rybusiński, J., Szczytko, J., Sienkiewicz, A., Stępień, P., Frontczak-Baniewicz, M.,

Łapiński, M., Wilczyński, G., Paszkowicz, W., Twardowski, A., Elbaum, D., Kalinowska, D., Klepka, M., „Mammalian cell defence mechanisms against cytotoxicity of NaYF₄:(Er,Yb,Gd) nanoparticles.”, *Nanoscale*, 2017, 9(37), 14259-14271.

Bibliografia

- [1] Bryce S Richards, Damien Hudry, Dmitry Busko, Andrey Turshatov, and Ian A Howard. Photon upconversion for photovoltaics and photocatalysis: A critical review: Focus review. *Chemical Reviews*, 121(15):9165–9195, 2021.
- [2] Minli You, Junjie Zhong, Yuan Hong, Zhenfeng Duan, Min Lin, and Feng Xu. Inkjet printing of upconversion nanoparticles for anti-counterfeit applications. *Nanoscale*, 7(10):4423–4431, 2015.
- [3] Jeevan Manikyarao Meruga, Aravind Baride, William Cross, Jon J Kellar, and P Stanley May. Red-green-blue printing using luminescence-upconversion inks. *J. Mater. Chem. C*, 2(12):2221–2227, 2014.
- [4] Rashmi Joshi, Ramaswamy Sandeep Perala, Sandeep Balu Shelar, Anand Balal, Bheeshma Pratap Singh, and Raghmani Singh Ningthoujam. Super bright red upconversion in $\text{NaErF}_4:0.5\%\text{Tm}@ \text{NaYF}_4:20\%\text{Yb}$ nanoparticles for anti-counterfeit and bioimaging applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(2):3481–3490, 2020.
- [5] Chao Zhang, Huan-Ping Zhou, Long-Yan Liao, Wei Feng, Wei Sun, Zhan-Xian Li, Chun-Hu Xu, Chen-Jie Fang, Ling-Dong Sun, Ya-Wen Zhang, et al. Luminescence modulation of ordered upconversion nanopatterns by a photochromic diarylethene: rewritable optical storage with nondestructive readout. *Adv. Mater.*, 22(5):633–637, 2010.
- [6] S Lamon, Y Wu, Q Zhang, X Liu, and M Gu. Nanoscale optical writing through upconversion resonance energy transfer. *Science advances*, 7(9):eabe2209, 2021.
- [7] Jiangbo Zhao, Dayong Jin, Erik P Schartner, Yiqing Lu, Yujia Liu, Andrei V Zvyagin, Lixin Zhang, Judith M Dawes, Peng Xi, James A Piper, et al. Single-nanocrystal sensitivity achieved by enhanced upconversion luminescence. *Nat. Nanotechnol.*, 8(10):729–734, 2013.
- [8] Daniel J Gargas, Emory M Chan, Alexis D Ostrowski, Shaul Aloni, M Virginia P Altoe, Edward S Barnard, Babak Sanii, Jeffrey J Urban, Delia J Milliron, Bruce E

- Cohen, et al. Engineering bright sub-10-nm upconverting nanocrystals for single-molecule imaging. *Nat. Nanotechnol.*, 9(4):300, 2014.
- [9] B Krajnik, LW Golacki, E Fiedorczyk, M Bański, A Nocolak, KM Hołodnik, and A Podhorodecki. Quantitative comparison of luminescence probes for biomedical applications. *Methods and Applications in Fluorescence*, 9(4):045001, 2021.
- [10] Meng Wang, Zhuo Chen, Wei Zheng, Haomiao Zhu, Shan Lu, En Ma, Datao Tu, Shanyong Zhou, Mingdong Huang, and Xueyuan Chen. Lanthanide-doped upconversion nanoparticles electrostatically coupled with photosensitizers for near-infrared-triggered photodynamic therapy. *Nanoscale*, 6(14):8274–8282, 2014.
- [11] Peng Zhang, Wim Steelant, Manoj Kumar, and Matthew Scholfield. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *Journal of the American Chemical Society*, 129(15):4526–4527, 2007.
- [12] Fan Zhang. *Photon upconversion nanomaterials*, volume 416. Springer, 2015.
- [13] Chao Wang, Huiquan Tao, Liang Cheng, and Zhuang Liu. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, 32(26):6145–6154, 2011.
- [14] Yunxin Liu, Dingsheng Wang, Jianxin Shi, Qing Peng, and Yadong Li. Magnetic tuning of upconversion luminescence in lanthanide-doped bifunctional nanocrystals. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 52(16):4366–4369, 2013.
- [15] Zong-Wei Ma, Jun-Pei Zhang, Xia Wang, Ying Yu, Jun-Bo Han, Gui-Huan Du, and Liang Li. Magnetic field induced great photoluminescence enhancement in an $\text{Er}^{3+}:\text{YVO}_4$ single crystal used for high magnetic field calibration. *Opt. Lett.*, 38(19):3754–3757, 2013.
- [16] Leyu Wang and Yadong Li. Green upconversion nanocrystals for DNA detection. *Chem. Comm.*, (24):2557–2559, 2006.
- [17] Jing Zhou, Yun Sun, Xiaoxia Du, Liqin Xiong, He Hu, and Fuyou Li. Dual-modality in vivo imaging using rare-earth nanocrystals with near-infrared to near-infrared (nir-to-nir) upconversion luminescence and magnetic resonance properties. *Biomaterials*, 31(12):3287–3295, 2010.
- [18] Xianmei Chen, Johan Vanacken, Yunxin Liu, Lei Meng, Junyi Ge, Junshan Hu, Shaobing Wu, Zhiqiang Zhong, and Victor V Moshchalkov. Simultaneously control the optical and paramagnetic properties of bifunctional $\text{Na}(\text{Y}_{0.8-x}\text{Dy}_x\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02})\text{F}_4$ nanoparticles. *IEEE J. Sel. Top. in Quant. Elect.*, 25(2):1–6, 2018.

- [19] Victor K Tikhomirov, Liviu F Chibotaru, Damien Saurel, Patrick Gredin, Michel Mortier, and Victor V Moshchalkov. Er³⁺-doped nanoparticles for optical detection of magnetic field. *Nano Lett.*, 9(2):721–724, 2009.
- [20] Junpei Zhang, Zongwei Ma, Junbo Han, Guihuan Du, Yulan Zhou, Liang Li, and Ze Cheng. Absorption induced photoluminescence intensity modulation of Er³⁺:YVO₄ single crystal under pulsed high magnetic field. *J. lumin.*, 144:53–56, 2013.
- [21] Ping Chen, Junpei Zhang, Beibei Xu, Xiangwen Sang, Weibo Chen, Xiaofeng Liu, Junbo Han, and Jianrong Qiu. Lanthanide doped nanoparticles as remote sensors for magnetic fields. *Nanoscale*, 6(19):11002–11006, 2014.
- [22] P Chen, H Jia, Z Zhong, J Han, Q Guo, J Zhou, X Liu, and J Qiu. Magnetic field modulated upconversion luminescence in NaYF₄:Yb,Er nanoparticles. *J. Mater. Chem. C*, 3(34):8794–8798, 2015.
- [23] Quanlan Xiao, Yuanhao Zhang, Han Zhang, Guoping Dong, Junbo Han, and Jianrong Qiu. Dynamically tuning the up-conversion luminescence of Er³⁺/Yb³⁺ co-doped sodium niobate nano-crystals through magnetic field. *Sci. Rep.*, 6:31327, 2016.
- [24] Sunil K Singh, Kaushal Kumar, Manish K Srivastava, Devendra K Rai, and Shyam B Rai. Magnetic-field-induced optical bistability in multifunctional Gd₂O₃:Er³⁺/Yb³⁺ upconversion nanophosphor. *Optics letters*, 35(10):1575–1577, 2010.
- [25] Jan Christoph Goldschmidt and Stefan Fischer. Upconversion for photovoltaics—a review of materials, devices and concepts for performance enhancement. *Advanced Optical Materials*, 3(4):510–535, 2015.
- [26] Qi Zhu, Tianying Sun, and Feng Wang. Optical tuning in lanthanide-based nanostructures. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 53(5):053002, 2019.
- [27] Wen Xu, Xu Chen, and Hongwei Song. Upconversion manipulation by local electromagnetic field. *Nano Today*, 17:54–78, 2017.
- [28] Marcin Szalkowski, Karolina Sulowska, Martin Jönsson-Niedziółka, Kamil Wiwatowski, Joanna Niedziółka-Jönsson, Sebastian Maćkowski, and Dawid Piątkowski. Photochemical printing of plasmonically active silver nanostructures. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6):2006, 2020.
- [29] Monica Boen, Joshua Brownell, Priyanka Patel, and Maria M Tsoukas. The role of photodynamic therapy in acne: an evidence-based review. *American Journal of Clinical Dermatology*, 18(3):311–321, 2017.

- [30] Ali M Rkein and David M Ozog. Photodynamic therapy. *Dermatologic clinics*, 32(3):415–425, 2014.
- [31] Demian Van Straten, Vida Mashayekhi, Henriette S De Bruijn, Sabrina Oliveira, and Dominic J Robinson. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, 9(2):19, 2017.
- [32] Beata Mossakowska, Anna Fabisiewicz, and Janusz Siedlecki. Terapia fotodynamiczna—znaczenie w onkologii. *Postępy Biochemii*, 67(3):236–247, 2021.
- [33] Yike Fu, Heng Liu, Zhaohui Ren, Xiang Li, Jie Huang, Serena Best, and Gaorong Han. Luminescent CaTiO₃:Yb,Er nanofibers co-conjugated with Rose Bengal and gold nanorods for potential synergistic photodynamic/photothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(26):5128–5136, 2017.
- [34] Qian Chen, Chao Wang, Liang Cheng, Weiwei He, Zhengping Cheng, and Zhuang Liu. Protein modified upconversion nanoparticles for imaging-guided combined photothermal and photodynamic therapy. *Biomaterials*, 35(9):2915–2923, 2014.
- [35] Kai Liu, Xiaomin Liu, Qinghui Zeng, Youlin Zhang, Langping Tu, Tao Liu, Xianggui Kong, Yinghui Wang, Feng Cao, Saskia AG Lambrechts, et al. Covalently assembled NIR nanoplatform for simultaneous fluorescence imaging and photodynamic therapy of cancer cells. *ACS nano*, 6(5):4054–4062, 2012.
- [36] Liuen Liang, Andrew Care, Run Zhang, Yiqing Lu, Nicolle H Packer, Anwar Sunna, Yi Qian, and Andrei V Zvyagin. Facile assembly of functional upconversion nanoparticles for targeted cancer imaging and photodynamic therapy. *ACS applied materials & interfaces*, 8(19):11945–11953, 2016.
- [37] Tarek Sabri, Peter D Pawelek, and John A Capobianco. Dual activity of Rose Bengal functionalized to albumin-coated lanthanide-doped upconverting nanoparticles: Targeting and photodynamic therapy. *ACS applied materials & interfaces*, 10(32):26947–26953, 2018.
- [38] Joseph R Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer science & business media, 2006.
- [39] Alfons Kawski. *Fotoluminescencja roztworów*. Uniwersytet Gdański, 1986.
- [40] Xiaohui Zhu, Jing Zhang, Jinliang Liu, and Yong Zhang. Recent progress of rare-earth doped upconversion nanoparticles: Synthesis, optimization, and applications. *Advanced Science*, 6(22):1901358, 2019.

- [41] Janusz M Dąbrowski. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. In *Advances in Inorganic Chemistry*, volume 70, pages 343–394. Elsevier, 2017.
- [42] Sasidharan Swarnalatha Lucky, Khee Chee Soo, and Yong Zhang. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical reviews*, 115(4):1990–2042, 2015.
- [43] Mutsuo Nuriya, Shun Fukushima, Atsuya Momotake, Takanori Shinotsuka, Masato Yasui, and Tatsuo Arai. Multimodal two-photon imaging using a second harmonic generation-specific dye. *Nature communications*, 7(1):1–10, 2016.
- [44] Robert W Boyd. The nonlinear optical susceptibility. *Nonlinear optics*, 3:1–67, 2008.
- [45] Yangyang Du, Xiangze Ai, Ziyu Li, Tianying Sun, Yang Huang, Xierong Zeng, Xian Chen, Feng Rao, and Feng Wang. Visible-to-ultraviolet light conversion: Materials and applications. *Advanced Photonics Research*, 2(6):2000213, 2021.
- [46] Tanya N Singh-Rachford and Felix N Castellano. Photon upconversion based on sensitized triplet–triplet annihilation. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(21–22):2560–2573, 2010.
- [47] Jianzhang Zhao, Shaomin Ji, and Huimin Guo. Triplet–triplet annihilation based upconversion: from triplet sensitizers and triplet acceptors to upconversion quantum yields. *RSC Advances*, 1(6):937–950, 2011.
- [48] Victor Gray, Damir Dzebo, Maria Abrahamsson, Bo Albinsson, and Kasper Moth-Poulsen. Triplet–triplet annihilation photon-upconversion: towards solar energy applications. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(22):10345–10352, 2014.
- [49] Yoan C Simon and Christoph Weder. Low-power photon upconversion through triplet–triplet annihilation in polymers. *Journal of Materials Chemistry*, 22(39):20817–20830, 2012.
- [50] Sergey V. Gaponenko and Hilmi Volkan Demir. *Energy transfer processes*, page 210–226. Cambridge University Press, 2018. doi: 10.1017/9781316535868.008.
- [51] Brandon Mitchell, Hayley Austin, Dolf Timmerman, Volkmar Dierolf, and Yasufumi Fujiwara. Temporally modulated energy shuffling in highly interconnected nanosystems. *Nanophotonics*, 10(2):851–876, 2021.
- [52] Igor L Medintz and Niko Hildebrandt. *FRET-Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications*. John Wiley & Sons, 2013.

- [53] David L Dexter. A theory of sensitized luminescence in solids. *J. Chem. Phys.*, 21(5):836–850, 1953.
- [54] Oleksandr V Mikhnenko, Paul WM Blom, and Thuc-Quyen Nguyen. Exciton diffusion in organic semiconductors. *Energy & Environmental Science*, 8(7):1867–1888, 2015.
- [55] François Auzel. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids. *Chemical reviews*, 104(1):139–174, 2004.
- [56] Chengchen Duan, Liuen Liang, Li Li, Run Zhang, and Zhi Ping Xu. Recent progress in upconversion luminescence nanomaterials for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(2):192–209, 2018.
- [57] Ling-Dong Sun, Hao Dong, Pei-Zhi Zhang, and Chun-Hua Yan. Upconversion of rare earth nanomaterials. *Annual review of physical chemistry*, 66:619–642, 2015.
- [58] Richard A Layfield and Muralee Murugesu. *Lanthanides and actinides in molecular magnetism*. John Wiley & Sons, 2015.
- [59] Simon Cotton. *Lanthanide and actinide chemistry*. John Wiley & Sons, 2013.
- [60] Jean-Claude G Bünzli and Claude Piguet. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews*, 34(12):1048–1077, 2005.
- [61] Andrzej Szewczyk, Henryk Szymczak, Roman Puźniak, and Andrzej Wiśniewski. *Magnetyzm i nadprzewodnictwo*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2017.
- [62] Paulo C de Sousa Filho, Juliana F Lima, and Osvaldo A Serra. From lighting to photoprotection: fundamentals and applications of rare earth materials. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26:2471–2495, 2015.
- [63] Annemarie Nadort, Jiangbo Zhao, and Ewa M Goldys. Lanthanide upconversion luminescence at the nanoscale: fundamentals and optical properties. *Nanoscale*, 8(27):13099–13130, 2016.
- [64] Qiuqiang Zhan, Baoju Wang, Xuanyuan Wen, and Sailing He. Controlling the excitation of upconverting luminescence for biomedical theranostics: neodymium sensitizing. *Optical Materials Express*, 6(4):1011–1023, 2016.
- [65] Shihui Wen, Jiajia Zhou, Kezhi Zheng, Artur Bednarkiewicz, Xiaogang Liu, and Dayong Jin. Advances in highly doped upconversion nanoparticles. *Nature communications*, 9(1):1–12, 2018.

- [66] Lisa M Wiesholler, Florian Frenzel, Bettina Grauel, Christian Würth, Ute Resch-Genger, and Thomas Hirsch. Yb, nd, er-doped upconversion nanoparticles: 980 nm versus 808 nm excitation. *Nanoscale*, 11(28):13440–13449, 2019.
- [67] Otto Laporte and William F Meggers. Some rules of spectral structure. *JOSA*, 11(5):459–463, 1925.
- [68] Zbigniew Kęcki. *Podstawy spektroskopii molekularnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 1992.
- [69] Ruifu Yang. *Principles and Applications of Up-converting Phosphor Technology*. Springer, 2019.
- [70] Kezhi Zheng, Kang Yong Loh, Yu Wang, Qiushui Chen, Jingyue Fan, Taeyoung Jung, Sang Hwan Nam, Yung Dong Suh, and Xiaogang Liu. Recent advances in upconversion nanocrystals: Expanding the kaleidoscopic toolbox for emerging applications. *Nano Today*, 29:100797, 2019.
- [71] Changhwan Lee, Emma Z Xu, Yawei Liu, Ayelet Teitelboim, Kaiyuan Yao, Angel Fernandez-Bravo, Agata M Kotulska, Sang Hwan Nam, Yung Doug Suh, Artur Bednarkiewicz, et al. Giant nonlinear optical responses from photon-avalanching nanoparticles. *Nature*, 589(7841):230–235, 2021.
- [72] Marie-France Joubert. Photon avalanche upconversion in rare earth laser materials. *Optical materials*, 11(2-3):181–203, 1999.
- [73] Gaofeng Liang, Haojie Wang, Hao Shi, Haitao Wang, Mengxi Zhu, Aihua Jing, Jinghua Li, and Guangda Li. Recent progress in the development of upconversion nanomaterials in bioimaging and disease treatment. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1):1–22, 2020.
- [74] Markus Haase and Helmut Schäfer. Upconverting nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(26):5808–5829, 2011.
- [75] Thomas Behrsing, Glen Berenger Deacon, and Peter Courtney Junk. The chemistry of rare earth metals, compounds, and corrosion inhibitors. In *Rare Earth-Based Corrosion Inhibitors*, pages 1–37. Elsevier, 2014.
- [76] Miroslav D Dramićanin. Sensing temperature via downshifting emissions of lanthanide-doped metal oxides and salts. a review. *Methods and applications in fluorescence*, 4(4):042001, 2016.
- [77] Hans U Güdel and Markus Pollnau. Near-infrared to visible photon upconversion processes in lanthanide doped chloride, bromide and iodide lattices. *Journal of alloys and compounds*, 303:307–315, 2000.

- [78] Anna Gnach and Artur Bednarkiewicz. Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges. *Nano Today*, 7(6):532–563, 2012.
- [79] Dangli Gao, Xiangyu Zhang, and Wei Gao. Tuning upconversion emission by controlling particle shape in $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ nanocrystals. *Journal of Applied Physics*, 111(3):033505, 2012.
- [80] Martin Kaiser, Christian Würth, Marco Kraft, Tero Soukka, and Ute Resch-Genger. Explaining the influence of dopant concentration and excitation power density on the luminescence and brightness of $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ nanoparticles: Measurements and simulations. *Nano Research*, 12(8):1871–1879, 2019.
- [81] A Noculak, A Podhorodecki, G Pawlik, M Banski, and J Misiewicz. Ion–ion interactions in $\beta\text{-NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ nanocrystals – the effect of ion concentration and their clustering. *Nanoscale*, 7(32):13784–13792, 2015.
- [82] Mary T Berry and P Stanley May. Disputed mechanism for nir-to-red upconversion luminescence in $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. *J. Phys. Chem. A*, 119(38):9805–9811, 2015.
- [83] Christian Würth, Martin Kaiser, Stefan Wilhelm, Bettina Grauel, Th Hirsch, and Ute Resch-Genger. Excitation power dependent population pathways and absolute quantum yields of upconversion nanoparticles in different solvents. *Nanoscale*, 9(12):4283–4294, 2017.
- [84] JL Sommerdijk and A Bril. Phosphors for the conversion of infrared radiation into visible light. *Philips Tech. Rev*, 34(1), 1974.
- [85] Youngho Cho, Si Won Song, Soo Yeong Lim, Jae Hun Kim, Chan Ryang Park, and Hyung Min Kim. Spectral evidence for multi-pathway contribution to the upconversion pathway in $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ phosphors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(10):7326–7332, 2017.
- [86] Riikka Arppe, Iko Hyppänen, Niina Perälä, Riikka Peltomaa, Martin Kaiser, Christian Würth, Simon Christ, Ute Resch-Genger, Michael Schäferling, and Tero Soukka. Quenching of the upconversion luminescence of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ and $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ nanophosphors by water: the role of the sensitizer Yb^{3+} in non-radiative relaxation. *Nanoscale*, 7(27):11746–11757, 2015.
- [87] Feng Wang and Xiaogang Liu. Upconversion multicolor fine-tuning: visible to near-infrared emission from lanthanide-doped NaYF_4 nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 130(17):5642–5643, 2008.
- [88] Vivian Torres Vera, Diego Mendez-Gonzalez, Diego J Ramos-Ramos, Asmae Igalla, Marco Laurenti, Rafael Contreras-Caceres, Enrique Lopez-Cabarcos, Elena Díaz,

- Jorge Rubio-Retama, Sonia Melle, et al. The effects of dopant concentration and excitation intensity on the upconversion and downconversion emission processes of β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry C*, 9(28): 8902–8911, 2021.
- [89] Artur Bednarkiewicz, Lukasz Marciniak, Luís D Carlos, and Daniel Jaque. Standardizing luminescence nanothermometry for biomedical applications. *Nanoscale*, 12(27):14405–14421, 2020.
- [90] Lukasz Marciniak, Artur Bednarkiewicz, Diana Kowalska, and Wieslaw Streck. A new generation of highly sensitive luminescent thermometers operating in the optical window of biological tissues. *Journal of Materials Chemistry C*, 4(24):5559–5563, 2016.
- [91] Ute Resch-Genger and Hans H Gorris. Perspectives and challenges of photon-upconversion nanoparticles-part i: routes to brighter particles and quantitative spectroscopic studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(25):5855–5874, 2017.
- [92] Shan-Ling Zuo, Ping Chen, and Cao-Feng Pan. Mechanism of magnetic field-modulated luminescence from lanthanide ions in inorganic crystal: a review. *Rare Metals*, 39(10):1113–1126, 2020.
- [93] Yu Wang, Kezhi Zheng, Shuyan Song, Dianyuan Fan, Hongjie Zhang, and Xiaogang Liu. Remote manipulation of upconversion luminescence. *Chemical Society Reviews*, 47(17):6473–6485, 2018.
- [94] Di M Wu, Aitzol García-Etxarri, Alberto Salleo, and Jennifer A Dionne. Plasmon-enhanced upconversion. *The journal of physical chemistry letters*, 5(22):4020–4031, 2014.
- [95] Xian Qin, Albano N Carneiro Neto, Ricardo L Longo, Yiming Wu, Oscar L Malta, and Xiaogang Liu. Surface plasmon–photon coupling in lanthanide-doped nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 12(5):1520–1541, 2021.
- [96] Riccardo Marin, Daniel Jaque, and Antonio Benayas. Switching to the brighter lane: pathways to boost the absorption of lanthanide-doped nanoparticles. *Nanoscale Horizons*, 6(3):209–230, 2021.
- [97] Jean-Francois Masson. Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors. *Analyst*, 145(11):3776–3800, 2020.
- [98] Wounjhang Park, Dawei Lu, and Sungmo Ahn. Plasmon enhancement of luminescence upconversion. *Chemical Society Reviews*, 44(10):2940–2962, 2015.

- [99] Michał Ćwik, Dorota Buczyńska, Karolina Sulowska, Ewa Roźniecka, Sebastian Mackowski, and Joanna Niedziółka-Jönsson. Optical properties of submillimeter silver nanowires synthesized using the hydrothermal method. *Materials*, 12(5):721, 2019.
- [100] Tian Ming, Huanjun Chen, Ruibin Jiang, Qian Li, and Jianfang Wang. Plasmon-controlled fluorescence: beyond the intensity enhancement. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(2):191–202, 2012.
- [101] Junxi Zhang, Lide Zhang, and Wei Xu. Surface plasmon polaritons: physics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(11):113001, 2012.
- [102] Yiming Wu, Jiahui Xu, Eng Tuan Poh, Liangliang Liang, Hailong Liu, Joel KW Yang, Cheng-Wei Qiu, Renaud AL Vallée, and Xiaogang Liu. Upconversion superburst with sub-2 μ s lifetime. *Nature nanotechnology*, 14(12):1110–1115, 2019.
- [103] John F Thompson, Peter Hersey, and Eric Wachter. Chemoablation of metastatic melanoma using intralesional Rose Bengal. *Melanoma research*, 18(6):405–411, 2008.
- [104] Amod Sarnaik, Georgina Crago, Hao Liu, Krithika Nandakumar Kodumudi, Amy Weber, Timothy McCardle, Jeffrey S Weber, and Shari Pilon-Thomas. Assessment of immune and clinical efficacy after intralesional PV-10 in injected and uninjected metastatic melanoma lesions., 2014.
- [105] Matthew Foote, Tavis Read, Janine Thomas, Michael Wagels, Bryan Burmeister, and B Mark Smithers. Results of a phase ii, open-label, non-comparative study of intralesional PV-10 followed by radiotherapy for the treatment of in-transit or metastatic melanoma. *Journal of surgical oncology*, 115(7):891–897, 2017.
- [106] Tavis A Read, Aaron Smith, Janine Thomas, Michael David, Matthew Foote, Michael Wagels, Andrew Barbour, and B Mark Smithers. Intralesional PV-10 for the treatment of in-transit melanoma metastases—results of a prospective, non-randomized, single center study. *Journal of surgical oncology*, 117(4):579–587, 2018.
- [107] Xiao-Fei Qiao, Jia-Cai Zhou, Jia-Wen Xiao, Ye-Fu Wang, Ling-Dong Sun, and Chun-Hua Yan. Triple-functional core-shell structured upconversion luminescent nanoparticles covalently grafted with photosensitizer for luminescent, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy in vitro. *Nanoscale*, 4(15):4611–4623, 2012.
- [108] Yu Wang, Kai Liu, Xiaomin Liu, Katerina Dohnalova, Tom Gregorkiewicz, Xianggui Kong, Maurice CG Aalders, Wybren J Buma, and Hong Zhang. Critical shell

- thickness of core/shell upconversion luminescence nanoplatfrom for fret application. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(17):2083–2088, 2011.
- [109] Stanisław Kwiatkowski, Bartosz Knap, Dawid Przystupski, Jolanta Saczko, Ewa Kędzierska, Karolina Knap-Czop, Jolanta Kotlińska, Olga Michel, Krzysztof Kotowski, and Julita Kulbacka. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106:1098–1107, 2018.
- [110] Alexandra B Ormond and Harold S Freeman. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6(3):817–840, 2013.
- [111] Grzegorz Bartosz. *Druga Twarz Tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- [112] Ana P Castano, Tatiana N Demidova, and Michael R Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4):279–293, 2004.
- [113] Maria C DeRosa and Robert J Crutchley. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233:351–371, 2002.
- [114] Robert W Redmond and Janet N Gamlin. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology*, 70(4):391–475, 1999.
- [115] Plato CC Lee and Michael AJ Rodgers. Laser flash photokinetic studies of Rose Bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochemistry and photobiology*, 45(1):79–86, 1987.
- [116] Hao Liu, Pasquale Patrick Innamarato, Krithika Kodumudi, Amy Weber, Satoshi Nemoto, John L Robinson, Georgina Crago, Timothy McCardle, Erica Royster, Amod A Sarnaik, et al. Intralesional Rose Bengal in melanoma elicits tumor immunity via activation of dendritic cells by the release of high mobility group box 1. *Oncotarget*, 7(25):37893, 2016.
- [117] Dongmei Yang, Zhiyou Hou, Ziyong Cheng, Chunxia Li, Jun Lin, et al. Current advances in lanthanide ion (Ln^{3+})-based upconversion nanomaterials for drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 44(6):1416–1448, 2015.
- [118] Elina Haimov-Talmoud, Yifat Harel, Hadas Schori, Menachem Motiei, Ayelet Atkins, Rachela Popovtzer, Jean-Paul Lellouche, and Orit Shefi. Magnetic targeting of mTHPC to improve the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(49):45368–45380, 2019.

- [119] Meng Wang, Cong-Cong Mi, Wen-Xing Wang, Cui-Hong Liu, Ying-Fan Wu, Zhang-Run Xu, Chuan-Bin Mao, and Shu-Kun Xu. Immunolabeling and NIR-excited fluorescent imaging of HeLa cells by using NaYF₄:Yb,Er upconversion nanoparticles. *ACS nano*, 3(6):1580–1586, 2009.
- [120] Jonathan F Lovell, Tracy WB Liu, Juan Chen, and Gang Zheng. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chemical reviews*, 110(5):2839–2857, 2010.
- [121] Lili Huo, Jiajia Zhou, Ruozhen Wu, Junfei Ren, Shengjun Zhang, Junjie Zhang, and Shiqing Xu. Dual-functional β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ nanoparticles for bioimaging and temperature sensing. *Optical Materials Express*, 6(4):1056–1064, 2016.
- [122] Wei Chen and Jun Zhang. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6(4):1159–1166, 2006.
- [123] Michael R Hamblin. Upconversion in photodynamic therapy: plumbing the depths. *Dalton Transactions*, 47(26):8571–8580, 2018.
- [124] Chao Wang, Liang Cheng, and Zhuang Liu. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. *Theranostics*, 3(5):317, 2013.
- [125] Hailong Qiu, Meiling Tan, Tymish Y Ohulchanskyy, Jonathan F Lovell, and Guanying Chen. Recent progress in upconversion photodynamic therapy. *Nanomaterials*, 8(5):344, 2018.
- [126] Song Yeul Lee, Ruda Lee, Eunha Kim, Sanghee Lee, and Yong Il Park. Near-infrared light-triggered photodynamic therapy and apoptosis using upconversion nanoparticles with dual photosensitizers. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8:275, 2020.
- [127] Bowen Yang, Yu Chen, and Jianlin Shi. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chemical reviews*, 119(8):4881–4985, 2019.
- [128] José A Barreto, William O’Malley, Manja Kubeil, Bim Graham, Holger Stephan, and Leone Spiccia. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. *Advanced materials*, 23(12):H18–H40, 2011.
- [129] Claudine A Robertson, D Hawkins Evans, and Heidi Abrahamse. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1):1–8, 2009.

- [130] John E Roberts. Lanthanum and neodymium salts of trifluoroacetic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 83(5):1087–1088, 1961.
- [131] Hao-Xin Mai, Ya-Wen Zhang, Rui Si, Zheng-Guang Yan, Ling-dong Sun, Li-Ping You, and Chun-Hua Yan. High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: controlled synthesis and optical properties. *Journal of the American Chemical Society*, 128(19):6426–6436, 2006.
- [132] Yugang Sun, Yadong Yin, Brian T Mayers, Thurston Herricks, and Younan Xia. Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO_3 with ethylene glycol in the presence of seeds and poly (vinyl pyrrolidone). *Chemistry of Materials*, 14(11):4736–4745, 2002.
- [133] Qingsong Mei, Huarong Jing, You Li, Wuerzha Yisibashaer, Jian Chen, Bing Nan Li, and Yong Zhang. Smartphone based visual and quantitative assays on upconversion paper sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 75:427–432, 2016.
- [134] Emilia Palo, Mikko Salomäki, and Mika Lastusaari. Surface modification of upconverting nanoparticles by layer-by-layer assembled polyelectrolytes and metal ions. *Journal of colloid and interface science*, 508:137–144, 2017.
- [135] Feng Wang, Renren Deng, Juan Wang, Qingxiao Wang, Yu Han, Haomiao Zhu, Xueyuan Chen, and Xiaogang Liu. Tuning upconversion through energy migration in core-shell nanoparticles. *Nature materials*, 10(12):968–973, 2011.
- [136] Nicoleta Bogdan, Fiorenzo Vetrone, Geoffrey A Ozin, and John A Capobianco. Synthesis of ligand-free colloidally stable water dispersible brightly luminescent lanthanide-doped upconverting nanoparticles. *Nano letters*, 11(2):835–840, 2011.
- [137] Przemysław Kowalik, Danek Elbaum, Jakub Mikulski, Krzysztof Fronc, Izabela Kamińska, Paulo C Morais, Paulo Eduardo De Souza, Rodrigo Barbosa Nunes, Fabiane Hiratsuka Veiga-Souza, Grzegorz Gruzela, et al. Upconversion fluorescence imaging of HeLa cells using ROS generating SiO_2 -coated lanthanide-doped NaYF_4 nanoconstructs. *RSC Advances*, 7(48):30262–30273, 2017.
- [138] Yanyan Guo, Snezna Rogelj, and Peng Zhang. Rose bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria. *Nanotechnology*, 21(6):065102, 2010.
- [139] Weilie Zhou, Robert Apkarian, Zhong Lin Wang, and David Joy. Fundamentals of scanning electron microscopy (sem). In *Scanning microscopy for nanotechnology*, pages 1–40. Springer, 2006.

- [140] SJ Pennycook, AR Lupini, M Varela, A Borisevich, Y Peng, MP Oxley, K Van Benthem, and MF Chisholm. Scanning transmission electron microscopy for nanostructure characterization. In *Scanning microscopy for nanotechnology*, pages 152–191. Springer, 2006.
- [141] ES Ameh. A review of basic crystallography and x-ray diffraction applications. *The international journal of advanced manufacturing technology*, 105(7):3289–3302, 2019.
- [142] Robert Milton Silverstein, Francis X Webster, David J Kiemle, Stefan Jankowski, Marek Potrzebowski, and Marek Sochacki. *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007.
- [143] Zhuo Yang. *Investigation of the excitonic properties of hybrid and fully inorganic perovskite using magneto-spectroscopy*. PhD thesis, Toulouse, INSA, 2018.
- [144] Tiago Entradas, Sarah Waldron, and Martin Volk. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204:111787, 2020.
- [145] Marianne Krieg. Determination of singlet oxygen quantum yields with 1, 3-diphenylisobenzofuran in model membrane systems. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 27(2):143–149, 1993.
- [146] Manlong Xu, David J McCanna, and Jacob G Sivak. Use of the viability reagent Presto Blue in comparison with Alamar Blue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 71:1–7, 2015.
- [147] Magdalena Boncler, Marek Różalski, Urszula Krajewska, Anna Podśędek, and Cezary Watala. Comparison of prestoblue and mtt assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1):9–16, 2014.
- [148] Boris Pavlovich Sobolev and VP Pashutin. Low-temperature hexagonal modification of NaYF₄ having the gagarinite structure. In *Doklady Akademii Nauk*, volume 150, pages 791–794. Russian Academy of Sciences, 1963.
- [149] JL Sommerdijk. Influence of host lattice on the infrared-excited visible luminescence in Yb³⁺, Er³⁺-doped fluorides. *Journal of Luminescence*, 6(1):61–67, 1973.
- [150] Robert B Anderson, Steve J Smith, P Stanley May, and Mary T Berry. Revisiting the NIR-to-visible upconversion mechanism in β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5(1):36–42, 2014.

- [151] L. Aarts, B. M. van der Ende, and A. Meijerink. Downconversion for solar cells in NaYF₄:Er,Yb. *J. Appl. Phys.*, 106(2):023522, 2009. doi: 10.1063/1.3177257.
- [152] J Freek Suyver, Judith Grimm, MK Van Veen, Daniel Biner, KW Krämer, and Hans-Ulrich Güdel. Upconversion spectroscopy and properties of NaYF₄ doped with Er³⁺, Tm³⁺ and/or Yb³⁺. *J Lumin.*, 117(1):1–12, 2006.
- [153] Jiangbo Zhao, Zhenda Lu, Yadong Yin, Christopher McRae, James A Piper, Judith M Dawes, Dayong Jin, and Ewa M Goldys. Upconversion luminescence with tunable lifetime in NaYF₄:Yb,Er nanocrystals: role of nanocrystal size. *Nanoscale*, 5(3):944–952, 2013.
- [154] Dennis Tobias Klier and Michael Uwe Kumke. Analysing the effect of the crystal structure on upconversion luminescence in Yb³⁺, Er³⁺-co-doped NaYF₄ nanomaterials. *Journal of Materials Chemistry C*, 3(42):11228–11238, 2015.
- [155] LF Chibotaru, VK Tikhomirov, Damien Saurel, and VV Moshchalkov. Extraordinary magnetic field induced suppression of luminescence in Er³⁺-doped nanoglass-ceramics. *J. Appl. Phys.*, 106(5):053502, 2009.
- [156] Keyue Wu, Jingbiao Cui, Xiangxing Kong, and Yunjun Wang. Temperature dependent upconversion luminescence of Yb/Er codoped NaYF₄ nanocrystals. *J. Appl. Phys.*, 110(5):053510, 2011.
- [157] Wei Yu, Wen Xu, Hongwei Song, and Shuang Zhang. Temperature-dependent upconversion luminescence and dynamics of NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ nanocrystals: influence of particle size and crystalline phase. *Dalton Trans.*, 43(16):6139–6147, 2014.
- [158] JA Capobianco, P Kabro, FS Ermeneux, R Moncorge, M Bettinelli, and E Cavalli. Optical spectroscopy, fluorescence dynamics and crystal-field analysis of Er³⁺ in YVO₄. *Chem. Phys.*, 214(2-3):329–340, 1997.
- [159] AF García-Flores, JS Matias, DJ Garcia, ED Martínez, PS Cornaglia, GG Lesseux, RA Ribeiro, RR Urbano, and C Rettori. Crystal-field effects in Er³⁺-and Yb³⁺-doped hexagonal NaYF₄ nanoparticles. *Phys. Rev. B*, 96(16):165430, 2017.
- [160] Zhihua Li, Haixia Miao, Ying Fu, Yuxiang Liu, Ran Zhang, and Bo Tang. Fabrication of NaYF₄:Yb,Er nanoprobcs for cell imaging directly by using the method of hydron rivalry aided by ultrasonic. *Nanoscale research letters*, 11(1):1–10, 2016.
- [161] Chunning Sun, Jan Ron Justin Simke, and Michael Gradzielski. An efficient synthetic strategy for ligand-free upconversion nanoparticles. *Materials Advances*, 1(6):1602–1607, 2020.

- [162] Haibo Mao, Jinyang Feng, Xiao Ma, Can Wu, and Xiujian Zhao. One-dimensional silver nanowires synthesized by self-seeding polyol process. *Journal of nanoparticle research*, 14(6):1–15, 2012.
- [163] Edward Dutkiewicz. *Fizykochemia powierzchni*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1998.
- [164] Sarah De Marchi, Sara Núñez-Sánchez, Gustavo Bodelón, Jorge Pérez-Juste, and Isabel Pastoriza-Santos. Pd nanoparticles as a plasmonic material: synthesis, optical properties and applications. *Nanoscale*, 12(46):23424–23443, 2020.
- [165] VI Sokolov, AV Zvyagin, SM Igumnov, SI Molchanova, MM Nazarov, AV Nechaev, AG Savelyev, AA Tyutyunov, EV Khaydukov, and V Ya Panchenko. Determination of the refractive index of β -NaYF₄/Yb³⁺/Er³⁺/Tm³⁺ nanocrystals using spectroscopic refractometry. *Optics and Spectroscopy*, 118(4):609–613, 2015.
- [166] Yiqing Lu, Jiangbo Zhao, Run Zhang, Yujia Liu, Deming Liu, Ewa M Goldys, Xusan Yang, Peng Xi, Anwar Sunna, Jie Lu, et al. Tunable lifetime multiplexing using luminescent nanocrystals. *Nat. Photonics*, 8(1):32, 2014.
- [167] Wounjhang Park, Dawei Lu, and Sungmo Ahn. Plasmon enhancement of luminescence upconversion. *Chemical Society Reviews*, 44(10):2940–2962, 2015.
- [168] Dawei Lu, Chenchen Mao, Suehyun K Cho, Sungmo Ahn, and Wounjhang Park. Experimental demonstration of plasmon enhanced energy transfer rate in NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ upconversion nanoparticles. *Scientific reports*, 6(1):1–11, 2016.
- [169] Ananda Das, Chenchen Mao, Suehyun Cho, Kyoungsik Kim, and Wounjhang Park. Over 1000-fold enhancement of upconversion luminescence using water-dispersible metal-insulator-metal nanostructures. *Nature communications*, 9(1):1–11, 2018.
- [170] Dandan Ju, Xiaoli Gao, Shouchao Zhang, Yang Li, Wenjing Cui, Yinhui Yang, Mingyan Luo, and Shujing Liu. Temperature-dependent upconversion luminescence multicolor tuning and temperature sensing of multifunctional β -NaYF₄:Yb/Er@ β -NaYF₄:Yb/Tm microcrystals. *CrystEngComm*, 23(21):3892–3900, 2021.
- [171] Juyao Dong and Jeffrey I Zink. Taking the temperature of the interiors of magnetically heated nanoparticles. *ACS nano*, 8(5):5199–5207, 2014.
- [172] Paloma Rodríguez-Sevilla, Yuhai Zhang, Patricia Haro-González, Francisco Sanz-Rodríguez, Francisco Jaque, José García Solé, Xiaogang Liu, and Daniel Jaque. Thermal scanning at the cellular level by an optically trapped upconverting fluorescent particle. *Advanced Materials*, 28(12):2421–2426, 2016.

- [173] Lisa M Wiesholler and Thomas Hirsch. Strategies for the design of bright upconversion nanoparticles for bioanalytical applications. *Optical Materials*, 80:253–264, 2018.
- [174] Qing Zhou, Li Zhang, and Hong Wu. Nanomaterials for cancer therapies. *Nanotechnology Reviews*, 6(5):473–496, 2017.
- [175] Michael J Mitchell, Margaret M Billingsley, Rebecca M Haley, Marissa E Wechsler, Nicholas A Peppas, and Robert Langer. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2):101–124, 2021.
- [176] Zhe Cheng, Maoyu Li, Raja Dey, and Yongheng Chen. Nanomaterials for cancer therapy: Current progress and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1):1–27, 2021.
- [177] Anna Gnach, Tomasz Lipinski, Artur Bednarkiewicz, Jacek Rybka, and John A Capobianco. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, 44(6):1561–1584, 2015.
- [178] Qiqing Li, Xiaodan Li, Li Zhang, Jing Zuo, Youlin Zhang, Xiaomin Liu, Langping Tu, Bin Xue, Yulei Chang, and Xianggui Kong. An 800 nm driven $\text{NaErF}_4@ \text{NaLuF}_4$ upconversion platform for multimodality imaging and photodynamic therapy. *Nanoscale*, 10(26):12356–12363, 2018.
- [179] Shuang Liang, Chunqiang Sun, Piaoping Yang, Shanshan Huang, Ziyong Cheng, Xifei Yu, Jun Lin, et al. Core-shell structured upconversion nanocrystal-dendrimer composite as a carrier for mitochondria targeting and catalase enhanced anti-cancer photodynamic therapy. *Biomaterials*, 240:119850, 2020.
- [180] Hao Wang, Ren-lu Han, Li-ming Yang, Jun-hui Shi, Zong-jun Liu, Yu Hu, You Wang, Shu-juan Liu, and Yang Gan. Design and synthesis of core-shell-shell upconversion nanoparticles for nir-induced drug release, photodynamic therapy, and cell imaging. *ACS applied materials & interfaces*, 8(7):4416–4423, 2016.
- [181] Na Zhao, Baoyan Wu, Xianglong Hu, and Da Xing. Nir-triggered high-efficient photodynamic and chemo-cascade therapy using caspase-3 responsive functionalized upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, 141:40–49, 2017.
- [182] Chunhong Dong, Zhongyun Liu, Sheng Wang, Bin Zheng, Weisheng Guo, Weitao Yang, Xiaoqun Gong, Xiaoli Wu, Hanjie Wang, and Jin Chang. A protein-polymer bioconjugate-coated upconversion nanosystem for simultaneous tumor cell imaging, photodynamic therapy, and chemotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(48):32688–32698, 2016.

- [183] S Sameera Perera, Dinesh K Amarasinghe, K Tauni Dissanayake, and Federico A Rabuffetti. Average and local crystal structure of β -Er:Yb:NaYF₄ upconverting nanocrystals probed by x-ray total scattering. *Chemistry of Materials*, 29(15):6289–6297, 2017.
- [184] Yanyan Liu, Xianfu Meng, and Wenbo Bu. Upconversion-based photodynamic cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 379:82–98, 2019.
- [185] B Munoz, A Ramila, J Perez-Pariente, I Diaz, and M Vallet-Regi. MCM-41 organic modification as drug delivery rate regulator. *Chemistry of Materials*, 15(2):500–503, 2003.
- [186] B Martins Estevao, F Cucinotta, N Hioka, M Cossi, M Argeri, G Paul, L Marchese, and E Gianotti. Rose Bengal incorporated in mesostructured silica nanoparticles: structural characterization, theoretical modeling and singlet oxygen delivery. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(40):26804–26812, 2015.
- [187] Sonia Melle, Oscar G Calderón, Marco Laurenti, Diego Mendez-Gonzalez, Ana Egatz-Gómez, Enrique López-Cabarcos, E Cabrera-Granado, Elena Díaz, and Jorge Rubio-Retama. Forster resonance energy transfer distance dependence from upconverting nanoparticles to quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(32):18751–18758, 2018.
- [188] Yong Il Park, Jeong Hyun Kim, Kang Taek Lee, Ki-Seok Jeon, Hyon Bin Na, Jung Ho Yu, Hyung Min Kim, Nohyun Lee, Seung Hong Choi, Sung-Il Baik, et al. Nonblinking and nonbleaching upconverting nanoparticles as an optical imaging nanoprobe and T1 magnetic resonance imaging contrast agent. *Advanced Materials*, 21(44):4467–4471, 2009.
- [189] Guanying Chen, Hailong Qiu, Paras N Prasad, and Xiaoyuan Chen. Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chemical reviews*, 114(10):5161–5214, 2014.
- [190] Shili Gai, Chunxia Li, Piaoping Yang, and Jun Lin. Recent progress in rare earth micro/nanocrystals: soft chemical synthesis, luminescent properties, and biomedical applications. *Chemical reviews*, 114(4):2343–2389, 2014.