

Резонансный перенос энергии в гидрогелях на основе квантовых точек и распознающих антител: прототип системы нанофотонной иммунодиагностики

© А.А. Кныш¹, Е.С. Герасимович¹, П.С. Самохвалов¹, А.В. Суханова², И.Р. Набиев^{1,2,*}

¹ Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный исследовательский ядерный университет „МИФИ“ (Московский инженерно-физический институт), 115409 Москва, Россия

² Laboratoire de Recherche en Nanosciences, LRN-EA4682, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France

* e-mail: igor.nabiev@gmail.com

Поступила в редакцию 19.10.2023 г.

В окончательной редакции 19.10.2023 г.

Принята к публикации 25.10.2023 г.

В последние годы увеличилось количество научных исследований, посвящённых исследованию структурных и оптических свойств гидрогелей на основе различных наночастиц. Благодаря своей высокой пористости и совместимости с живыми тканями гидрогели предоставляют собой перспективную основу для разработки чувствительных и специфичных детекторов биомолекул (биосенсоров). Настоящее исследование посвящено определению эффективности фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET) в системах гидрогелей, содержащих квантовые точки состава CdSe/ZnS, диаминовые производные полиэтиленгликоля (ПЭГ) с разной молекулярной массой и молекулы иммуноглобулинов, меченных флуорофором AlexaFluor 633. Предложенная система является прототипом нанофотонного диагностикума, в котором иммуноглобулины, меченные органическими флуорофорами, служат „выявляющими“ метками для детекции биомаркеров заболеваний. Показано, что представленные прототипы обладают эффективностью FRET энергии между квантовыми точками гидрогеля (доноры энергии) и флуорофором AlexaFluor 633 (акцепторы энергии), достигающей 87%. Полученные данные демонстрируют возможность использования созданных гидрогелей на основе квантовых точек и диаминовых производных ПЭГ в высокочувствительном и специфичном иммуногистохимическом анализе биомаркеров, основанном на FRET, обеспечивающим высокое отношение полезного детектируемого сигнала к фону.

Ключевые слова: нанокристаллы, квантовые точки, гидрогели, FRET, меченные молекулы.

DOI: 10.61011/OS.2023.10.56893.5699-23

Введение

При создании различных биосенсорных систем часто используют метод флуоресцентной детекции, что объясняется высокой чувствительностью этого эффекта. Среди методов флуоресцентной детекции использование фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET), при котором близко расположенные доноры и акцепторы энергии характеризуются высокой степенью перекрытия спектра флуоресценции первых со спектром поглощения вторых, обеспечивает рекордно высокие отношения полезного сигнала к фоновому при эффективности переноса энергии, достигающей 100%. Полупроводниковые нанокристаллы, квантовые точки (КТ), обладают широким спектром поглощения, высоким квантовым выходом, повышенной устойчивостью к фотообесцвечиванию, а также узким спектром испускания флуоресценции, положение максимума которого зависит от размера частиц. Такие свойства КТ обуславливают их широкое применение при создании биосенсорных систем и биовизуализации [1].

Сенсорные системы на основе КТ, использующие принцип FRET, были разработаны ранее для детекции нуклеиновых кислот, белков, малых молекул и токсинов [2]. Сенсоры на основе флуоресцентных гидрогелей, состоящих из КТ, имеют такие преимущества, как большая ёмкость для связывания молекул за счёт трёхмерной структуры гидрогеля, возможность настройки свойств гелевой матрицы для детектирования различных аналитов, а также многократное использование биосенсоров [3]. В таких системах часто используют принцип регистрации тушения флуоресценции по механизму FRET, как, например, в биосенсоре для детектирования прогестерона на основе иммобилизованных в гидрогеле КТ состава CdSe/CdS/ZnS и меченных молекул ДНК [4], а также в сенсорах на основе гибридных плёнок, содержащих КТ состава CdTe, созданных для детектирования дофамина [5]. Кроме регистрации тушения флуоресценции, при использовании в сенсоре принципа FRET также возможна и регистрация испускаемой акцептором флуоресценции при условиях существенного перекрытия спектров флуоресценции и поглощения донора и акцептора соответственно и их расположения на расстояниях

от 1 до 10 nm друг от друга. Например, была показана высокая эффективность FRET в конъюгатах КТ состава CdSe/ZnS с органической меткой AlexaFluor647 [6]. При этом вопросы, связанные с увеличением эффективности переноса энергии по механизму FRET, который лежит в основе многих сенсорных систем, редко становятся предметом исследований в этой области.

В настоящей работе была изучена эффективность FRET в гидрогелях разной морфологии, созданных на основе КТ состава CdSe/ZnS, модифицированных цистеином (далее CdSe/ZnS-Cys), с использованием диаминовых производных полиэтиленгликоля с разной молекулярной массой, и акцептора, представляющего собой конъюгат иммуноглобулина G (IgG) и флуоресцентной метки AlexaFluor633. Изученная система представляет собой прототип нанофотонного диагностикума, в котором иммуноглобулины, меченные органическими флуорофорами, служат „выявляющими“ метками для детектирования биомаркеров заболеваний.

Методы

Изготовление гелей на основе КТ состава CdSe/ZnS

КТ состава CdSe/ZnS были синтезированы в соответствии с протоколом, описанным ранее [7]. Солюбилизацию полученных КТ состава CdSe/ZnS проводили с использованием DL-цистеина [8]. Полученный водный раствор КТ CdSe/ZnS-Cys переводили в 0.05 М боратный буфер, pH 8.5, с использованием хроматографической колонки с Сефадекс G-25.

Для приготовления образцов гелей к 10 μ L раствора КТ CdSe/ZnS-Cys в 0.05 М боратном буфере (pH 8.5) добавляли EDC, s-NHS и диамино-ПЭГ со средней молекулярной массой 3400 g/mol (poly(ethylene glycol) bis(amine), average Mn 3400, Sigma-Aldrich, кат. №P9906), далее ПЭГ3400, для достижения оптимальных молярных соотношений, определенных ранее (EDC/КТ — 5000/1, NHS/EDC — 10/1, ПЭГ/КТ — 1000/1). В опытные образцы добавляли меченные иммуноглобулины IgG-AlexaFluor633 (goat anti-human IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, AlexaFluor™633, Invitrogen, кат. №A21091) для достижения молярных соотношений IgG-AlexaFluor633/КТ, равных 0.1/1, 0.5/1 и 1/1. В контрольный образец добавляли буфер 0.05 MES (pH 6.0) в объеме, соответствующем объему добавляемых меченных иммуноглобулинов, инкубировали в течение 24 h при 25°C в темноте, после инкубации отбирали надгелевую жидкость и добавляли 30 μ l воды MilliQ для отмывки.

Для приготовления образцов гидрогелей с ранее определенным оптимальным молярным соотношением меченных иммуноглобулинов к КТ помещали в пробирку раствор КТ состава CdSe/ZnS-Cys объемом в 0.05 М 10 μ l М боратном буфере (pH 8.5), добавляли EDC, s-NHS и диамино-ПЭГ со средней молекулярной массой 400

или 2000 g/mol (poly(ethylene glycol) diamine, average Mn 400, Sigma-Aldrich, кат. №909149; poly(ethylene glycol) diamine, average Mn 2000, Sigma-Aldrich, кат. №753084), далее ПЭГ400 и ПЭГ2000, и меченные иммуноглобулины IgG-AlexaFluor633 для достижения оптимальных молярных соотношений, определенных ранее (EDC/КТ = 5000/1, NHS/EDC = 10/1, ПЭГ/КТ = 1000/1, IgG-AlexaFluor633/КТ = 1/1). Также для сравнения разных методов получения гелей готовили образец, содержащий КТ состава CdSe/ZnS и меченные иммуноглобулины IgG-AlexaFluor633, гелеобразование в котором индуцировали добавлением 20 μ l раствора 0.1 М MgCl₂. Каждому опытному образцу соответствовал контрольный образец, в который добавляли буфер 0.05 MES (pH 6.0) в объеме, соответствующем объему добавляемых меченных иммуноглобулинов. Все образцы инкубировали в течение 24 h при 25°C в темноте, а после инкубации отмывали, как описано в предыдущем разделе.

Инструментальные методы исследований

Спектры флуоресценции растворов КТ регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies). Спектры флуоресценции образцов гелей на основе КТ состава CdSe/ZnS-Cys, содержащих диамино-ПЭГ, а также меченные иммуноглобулины IgG-AlexaFluor633, регистрировали при помощи интегрирующей сферы и подключенного к ней спектрометра HR2000+ES (Ocean Optics). Значение квантового выхода (КВ) флуоресценции образцов определяли согласно процедуре, описанной в работе [9] и руководстве [10].

Время-разрешенные исследования флуоресценции образцов гелей проводили с использованием системы, включающей полупроводниковый диодный лазер PicoQuant с длиной волны 398 nm, драйвер лазерного модуля Taiko PDL M1 (PicoQuant), монохроматор M266 (SolarLaserSystems) и лавинный фотодиод (MPD). Возбуждение флуоресценции исследуемых образцов осуществляли с частотой следования импульсов 100 kHz и средней энергией импульса 180 μ W. Функцию отклика системы оценивали с использованием диффузного отражателя, при этом она составила \sim 560 ps. Полученные кривые затухания флуоресценции исследуемых систем гелей аппроксимировали функцией $I(t)$, полагая закон изменения (1) флуоресценции двухэкспоненциальным [11]:

$$I(t) = I_0 + q_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + q_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}, \quad (1)$$

где $I(t)$ — интенсивность флуоресценции, t — время, I_0 — константа при аппроксимации данных, q_1 , q_2 — коэффициенты аппроксимированной функции при соответствующих экспоненциальных множителях, τ_1 , τ_2 — характерные времена затухания, соответствующие быстрому и медленному компонентам кинетики затухания флуоресценции системы.

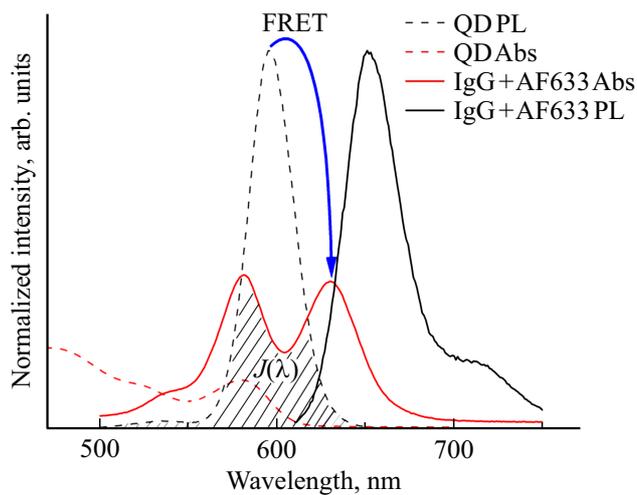


Рис. 1. Спектры ФЛ (черные линии) и оптического поглощения (красные линии) компонентов исследуемых гелей: раствор QD (КТ) состава CdSe/ZnS-Cys в 0.1 M NaOH (штриховые линии) и меченных органическим красителем иммуноглобулинов — конъюгата IgG с красителем AlexaFluor633 (сплошные линии). Заштрихованная область показывает степень спектрального перекрытия испускания ФЛ донора и поглощения акцептора.

Среднее время затухания люминесценции (τ_{cp}) вычисляли согласно выражению (2) как средневзвешенное по амплитуде время жизни [12]:

$$\tau_{cp} = \frac{q_1\tau_1 + q_2\tau_2}{q_1 + q_2}. \quad (2)$$

Результаты и обсуждение

Передача энергии по механизму FRET представляет собой физический процесс, в результате которого происходит безызлучательный перенос энергии от одного возбужденного молекулярного флуорофора (донора) к другому флуорофору (акцептору) посредством межмолекулярного дальнедействующего диполь-дипольного взаимодействия. Эффективность FRET зависит от расстояния между донором и акцептором как функция, обратная шестой степени этой величины [13]. В системах, где наблюдается эффективный FRET, оптимальные расстояния между донором и акцептором обычно лежат в пределах 1–10 nm [14]. Одним из основных параметров, которые применяют для оценки эффективности FRET в исследуемых системах, является радиус Фёрстера (R_0) — расстояние, на котором половина энергии возбуждения донора передается акцептору. Как правило, это расстояние составляет 3–10 nm [15]. Другим важным параметром, используемым для оценки эффективности FRET в конкретной системе, является интеграл перекрытия $J(\lambda)$ между спектром испускания ФЛ донора и спектром оптического поглощения акцептора [16].

На рис. 1 приведены соответствующие спектры для исследуемой системы на примере геля, изготовленного на основе КТ, диамино-ПЭГ и IgG-AlexaFluor633. Анализируя спектры, представленные на рис. 1, можно убедиться в настолько существенном спектральном перекрытии спектра испускания ФЛ донора и спектра оптического поглощения акцептора, что для исследуемых систем эффективность FRET может иметь значения выше 50%. Эффективность FRET можно вычислить, используя величины средневзвешенного по амплитуде времени затухания флуоресценции, согласно выражению [12]

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, \quad (3)$$

где τ_D и τ_{DA} — средние времена затухания ФЛ донора ФЛ в исследуемом образце в отсутствие и в присутствии акцептора соответственно.

Для сравнения эффективности FRET были изготовлены две серии образцов гидрогелей на основе КТ состава CdSe/ZnS-Cys, диамино-ПЭГ и IgG-AlexaFluor633. В первой серии образцов при одинаковой средней молекулярной массе полимера (3400 g/mol) варьировало молярное соотношение между акцептором, IgG-AlexaFluor633, и донором — КТ состава CdSe/ZnS-Cys (IgG-AF633/КТ = 0.1:1, 0.5:1 или 1:1). Образцы второй серии имели одинаковое молярное соотношение между донором и акцептором, но были изготовлены с использованием диамино-ПЭГ с разной средней молекулярной массой — 400 и 2000 g/mol.

Кривые затухания ФЛ изготовленных образцов для двух серий представлены на рис. 2. По результатам измерения первой серии образцов, нами было определено, что наибольшая эффективность FRET достигалась при соотношении 1:1, в связи с чем это соотношение было выбрано для приготовления второй серии образцов.

Из рис. 2, а можно видеть, что кривая затухания ФЛ КТ состава CdSe/ZnS-Cys для их раствора в 0.1 M NaOH находится ниже аналогичной кривой для геля на основе таких КТ, т.е. среднее время затухания ФЛ КТ (12 ns), находящийся в растворе, является меньшим, чем для твердого геля, даже в присутствии небольшого количества акцептора. Такая ситуация возможна из-за того, что для первичной сольбилизации КТ были использованы относительно короткие цистеиновые лиганды, что не позволяет эффективно изолировать неорганическую часть КТ от внешней среды, вызывающей частичное тушение ФЛ. Кроме того, образование водородных или электростатических связей между поверхностными группами КТ, сольбилизированных цистеином, может приводить к частичной агрегации, также подавляющей их ФЛ [17,18]. При дальнейшем образовании геля расстояние между соседними КТ увеличивается за счет включения в структуру геля длинных молекул диамино-ПЭГ, в результате чего эти процессы тушения подавляются, что и приводит к увеличению среднего времени затухания ФЛ геля.

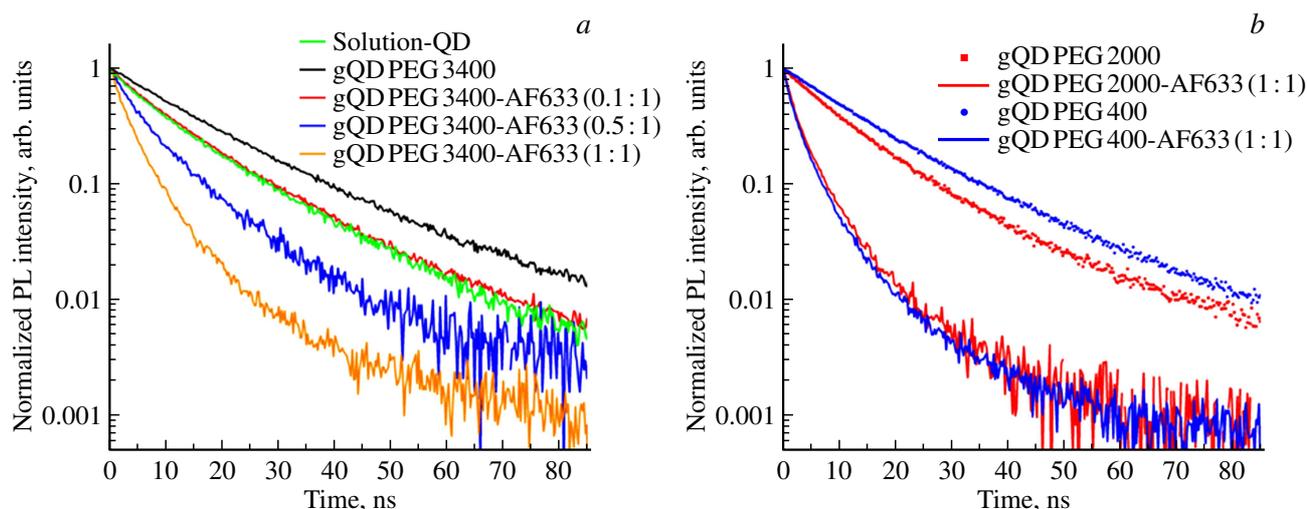


Рис. 2. Кривые затухания ФЛ КТ (QD) состава CdSe/ZnS-Cys в растворе и в образцах гелей, полученных на их основе, с использованием диаминовых производных ПЭГ с молекулярной массой 3400 g/mol и с добавлением IgG-AlexaFluor633 в соотношениях 0.1:1, 0.5:1 и 1:1 (a) и в образцах гелей, полученных с использованием диаминовых производных ПЭГ с молекулярной массой 400 и 2000 g/mol и с добавлением IgG-AlexaFluor633 в соотношении 1:1 (b).

Характеристики ФЛ образцов КТ (QD) в растворе и гидрогелей из КТ состава CdSe/ZnS-Cys, полученных с использованием диаминовых производных ПЭГ с разной молекулярной массой и добавлением IgG-AlexaFluor633 в разных соотношениях. Измеренные величины представлены с учётом погрешности

Образец	τ , ns	Эффективность FRET, %	Квантовый выход флуоресценции исследуемой системы, %	Квантовый выход акцептора, %	Доля эмиссии акцептора, %
Solution-QD	11.84 ± 0.32	—	34.89 ± 3.49	—	—
gQD-PEG 3400	17.28 ± 0.85	—	17.09 ± 1.72	—	—
gQD-PEG 3400-AF633 (0.1:1)	12.22 ± 0.29	29.28 ± 3.85	16.67 ± 1.66	3.29 ± 0.33	19.73 ± 2.79
gQD-PEG 3400-AF633 (0.5:1)	5.54 ± 0.16	67.94 ± 1.82	11.34 ± 1.13	7.12 ± 0.72	62.73 ± 8.91
gQD-PEG 3400 -AF633 (1:1)	3.87 ± 0.09	77.59 ± 1.30	14.63 ± 1.46	12.72 ± 1.27	86.94 ± 12.27
gQD-PEG 2000	11.99 ± 0.37	—	25.04 ± 2.50	—	—
gQD-PEG 2000-AF633 (1:1)	3.27 ± 0.25	72.73 ± 2.23	17.26 ± 1.73	15.03 ± 1.50	87.08 ± 12.32
gQD-PEG 400	15.72 ± 0.46	—	22.76 ± 2.28	—	—
gQD-PEG 400-AF633 (1:1)	2.98 ± 0.12	81.04 ± 0.87	11.33 ± 1.13	9.94 ± 0.99	87.73 ± 12.37
gQD-MgCl ₂	17.66 ± 0.57	—	17.20 ± 1.72	—	—
gQD-AF633 (1:1)-MgCl ₂	3.65 ± 0.12	79.33 ± 0.92	5.97 ± 0.60	1.87 ± 0.19	31.32 ± 4.48

Далее, используя выражения (2) и (3), для каждого из исследуемых образцов были рассчитаны значения τ_{cp} и E_{FRET} (таблица).

Как видно из результатов, приведенных в таблице, для гелей на основе КТ, диамино-ПЭГ и иммуноглобулинов, меченных AlexaFluor633, возможно достижение значительных величин эффективности FRET (до 87%), что свидетельствует о перспективности использования таких гелей для создания на их основе сенсорных систем. Так, в сравнении с гелем, образованным при добавлении

к раствору КТ и красителя - простого неорганического сшивающего агента MgCl₂ (образец gQD-AF633 (1:1) — MgCl₂), эффективность FRET составляет всего 31%, что может быть связано с малой пористостью геля, недостаточной для эффективной интернализации в порах геля конъюгата IgG-AlexaFluor633. Кроме того, важно отметить и тот факт, что длина используемого в процессе гелирования диамино-ПЭГ практически не влияет на эффективность переноса энергии, что может служить преимуществом при использовании гелей для

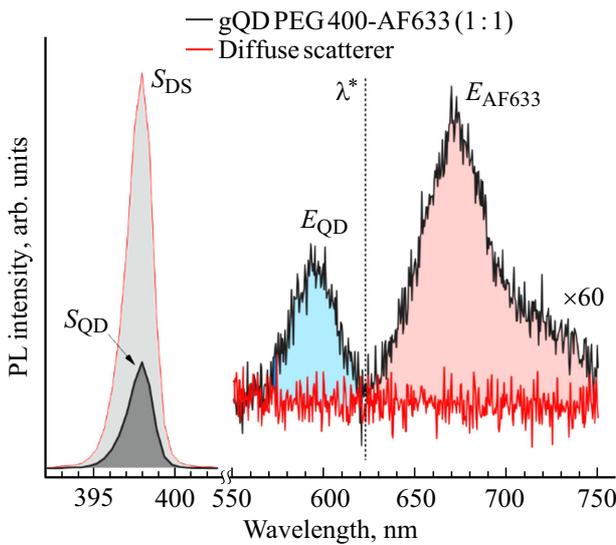


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая процедуру определения абсолютного КВ ФЛ в интегрирующей сфере. λ^* — характерная длина волны разделения двух спектров ФЛ, позволяющая получить численные значения для величин E_{QD} и E_{AF633} . В настоящей работе λ^* принималось за длину волны, соответствующую значению локального минимума между максимумами ФЛ КТ и красителя AlexaFluor633.

детектирования биомолекул. Так, изменяя размер пор за счет применения диамино-ПЭГ определенной молекулярной массы, можно изменять проницаемость пор для тех или иных биомолекул, что положительно влияет на селективность анализа.

С целью дополнительного подтверждения определенных величин эффективности FRET при использовании интегрирующей сферы для каждого из исследованных образцов были определены величины КВ ФЛ гелей как системы в целом, так и для акцептора отдельно, что позволило определить долю эмиссии акцептора относительно всей исследуемой системы и тем самым дать альтернативную оценку эффективности переноса энергии.

Схема, иллюстрирующая процедуру определения КВ геля в целом и акцептора отдельно, представлена на рис. 3 на примере спектра ФЛ образца геля на основе КТ состава CdSe/ZnS-Cys (QD) и конъюгата IgG-AlexaFluor633 (AF633), взятых в молярном соотношении 1:1. Поскольку в данном случае максимумы эмиссии КТ и красителя демонстрируют отличное спектральное разделение, при расчёте КВ можно рассматривать интегральную эмиссию геля в целом как сумму интегральной эмиссии отдельных компонентов.

При использовании интегрирующей сферы КВ всей системы вычисляли согласно выражению

$$QY = \frac{E_{QD} + E_{AF633}}{S_{DE} - S_{QD}}, \quad (4)$$

где E_{QD} и E_{AF633} — интегральные интенсивности ФЛ КТ и красителя соответственно, а S_{DS} и S_{QD} — интеграль-

ные интенсивности сигналов в области возбуждающего излучения при регистрации спектров диффузного отражателя и исследуемого геля соответственно.

Величину КВ ФЛ акцептора вычисляли согласно следующему выражению (5):

$$QY^* = \frac{E_{AF633}}{S_{DE} - S_{QD}}. \quad (5)$$

В таком случае вклад в общую эмиссию ФЛ для акцептора (E_{AF633}) IgG-AlexaFluor633 будет составлять

$$\Omega_{AF633} = \frac{QY^*}{QY} 100\%. \quad (6)$$

С использованием приведенных расчетов нами была дана альтернативная оценка эффективности FRET в исследуемых гелях; соответствующие величины также приведены в таблице.

Рисунок 4 демонстрирует корреляцию между эффективностями FRET между донором и акцептором, определёнными из экспериментов по измерению времен затухания ФЛ и величин вклада эмиссии акцептора в КВ для системы в целом для серии изготовленных гелей на основе КТ, диамино-ПЭГ и конъюгатов IgG и флуоресцентной метки AlexaFluor633.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что в рассматриваемых системах возможно реализовать FRET между донором (основой геля) и ФЛ-меткой, имеющей относительно небольшой физический размер, с эффективностью, достигающей 87%. Сделанный вывод позволяет предложить использование приготовленных гелей в качестве основы биосенсорных систем, в которых в качестве аналитического сигнала будет выступать ФЛ акцептора. При этом, как видно из полученных результатов, эффективность FRET практически не зависит

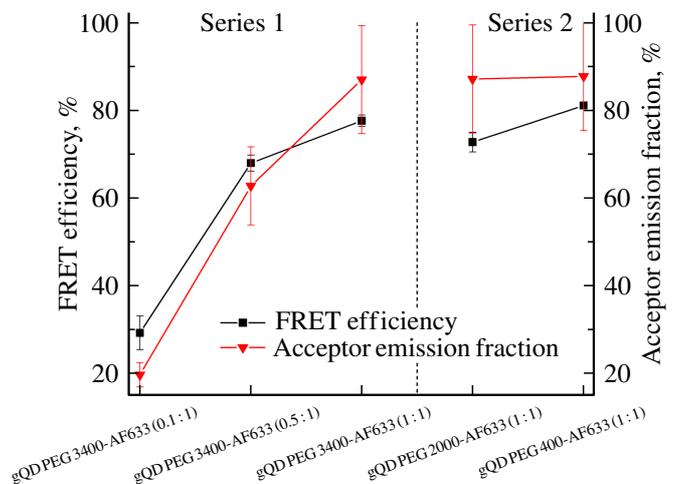


Рис. 4. Корреляция между величинами эффективности FRET в двух сериях исследуемых образцов гелей, определёнными в экспериментах по измерению времен затухания ФЛ (черные линии) и по определению доли эмиссии акцептора в общем КВ образцов (красные линии).

от длины сшивающего агента, что позволяет, в свою очередь, варьировать размер пор геля и адаптировать его к различным типам анализируемых молекул — от низкомолекулярных соединений до крупных белковых молекул.

Заключение

В настоящем исследовании был представлен метод получения гелей из КТ состава CdSe/ZnS, модифицированных цистеином, с использованием диаминовых производных полиэтиленгликоля и иммуноглобулинов, меченных красителем AlexaFluor633. Было показано, что у подобных гелей эффективность FRET более чем в 2 раза превышает таковую для гелей, полученных с помощью низкомолекулярных сшивающих агентов. В частности, методом оценки доли эмиссии акцептора в такой системе было показано, что при соотношении донор: акцептор = 1:1 возможно достижение величин эффективности FRET до 87%. Этот результат подчеркивает перспективы использования гидрогелевых материалов в различных областях биомедицинских исследований. Возможность высокоэффективной передачи энергии в таких системах открывает возможности разработки биосенсоров, обеспечивающих точные и высокочувствительные методы анализа биомолекул и мониторинга биохимических процессов, а также технологии создания нового поколения биомедицинских терапевтических агентов на основе гидрогелевых систем.

Финансирование работы

Данная работа была поддержана грантом № 075-15-2021-935 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A. Shamirian, A. Ghai, P. T. Snee. *Sensors (Switzerland)*, **15** (6), 13028 (2015). DOI: 10.3390/s150613028
- [2] M. Stanisavljevic, S. Krizkova, M. Vaculovicova, R. Kizek, V. Adam. *Biosens. Bioelectron.*, **74**, 562 (2015). DOI: 10.1016/j.bios.2015.06.076
- [3] P. Sokolov, P. Samokhvalov, A. Sukhanova, I. Nabiev. *Nanomaterials*, **13** (11), 1748 (2023). DOI: 10.3390/nano13111748
- [4] M. Chen, C. Grazon, P. Sensharma, T.T. Nguyen, Y. Feng, M. Chern, R.C. Baer, N. Varongchayakul, K. Cook, S. Lecommandoux, C.M. Klapperich, J.E. Galagan, A.M. Dennis, M.W. Grinstaff. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12** (39), 43513 (2020). DOI: 10.1021/acsami.0c13489
- [5] J. Yuan, N. Gaponik, A. Eychmüller. *Anal. Chem.*, **84** (11), 5047 (2012). DOI: 10.1021/ac300714j
- [6] M. Hardzei, M. Artemyev, M. Molinari, M. Troyon, A. Sukhanova, I. Nabiev. *ChemPhysChem.*, **13** (1), 330 (2012). DOI: 10.1002/cphc.201100552
- [7] A. Sukhanova, K. Even-Desrumeaux, P. Chames, D. Baty, M. Artemyev, V. Oleinikov, I. Nabiev. *Protoc. Exch.*, (2012). DOI: 10.1038/protex.2012.042
- [8] A. Sukhanova, S. Bozrova, E. Gerasimovich, M. Baryshnikova, Z. Sokolova, P. Samokhvalov, C. Guhrenz, N. Gaponik, A. Karaulov, I. Nabiev. *Nanomaterials*, **12** (16), 2734 (2022). DOI: 10.3390/nano12162734
- [9] J. Laverdant, W. D. de Marcillac, C. Barthou, V.D. Chinh, C. Schwob, L. Coolen, P. Benalloul, P.T. Nga, A. Maitre. *Materials*, **4**, 1182 (2011). DOI: 10.3390/ma4071182
- [10] *FLS980 Series Reference Guide* [Электронный ресурс]. URL: <https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2016/02/FLS980-Series-Reference-Guide-Integrating-Sphere.pdf>
- [11] F. Zhang, H. Zhong, C. Chen, X.-G. Wu, X. Hu, H. Huang, J. Han, B. Zou, Y. Dong. *ACS Nano*, **9** (4), 4533 (2015). DOI: 10.1021/acs.nano.5b01154
- [12] Y. Li, S. Natakorn, Y. Chen, M. Safar, M. Cunningham, J. Tian, D.D.-U. Li. *Front. Phys.*, **8**, 576862 (2020). DOI: 10.3389/fphy.2020.576862
- [13] D. Shrestha, A. Jenei, P. Nagy, G. Vereb, J. Szöllösi. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 6718 (2015). DOI: 10.3390/ijms16046718
- [14] L. Wu, C. Huang, B.P. Emery, A.C. Sedgwick, S.D. Bull, X.-P. He, H. Tian, J. Yoon, J.L. Sessler, T.D. James. *Chem. Soc. Rev.*, **49**, 5110 (2020). DOI: 10.1039/c9cs00318e
- [15] R.B. Sekar, A. Periasamy. *J. Cell Biol.*, **160** (5), 629 (2003). DOI: 10.1083/jcb.200210140
- [16] H. Sahoo. *J. Photochem. Photobiol. C*, **12**, 20 (2011). DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001
- [17] W. Liu, H.S. Choi, J.P. Zimmer, E. Tanaka, J.V. Frangioni, M. Bawendi. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14530 (2007). DOI: 10.1021/ja073790m
- [18] J. Liu, X. Yang, K. Wang, R. Yang, H. Ji, L. Yang, C. Wu. *Chem. Commun.*, **47**, 935 (2011). DOI: 10.1039/c0cc03993d