

14

Мониторинг естественного выведения апконверсионных наночастиц $YVO_4: Yb, Er$ из организма виноградной улитки

© А.Г. Шмелев,¹ В.Г. Никифоров,¹ Д.К. Жарков,¹ В.В. Андрианов,^{1,2} Л.Н. Муранова,² А.В. Леонтьев,¹ Х.Л. Гайнутдинов,^{1,2} В.С. Лобков,¹ М.Х. Алькатани,³ Ф.Р. Хеммер^{1,4}

¹ Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского — Федеральный исследовательский центр Казанский научный центр РАН,

420029 Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет,

420008 Казань, Россия

³ Национальный центр лазерных технологий и оптоэлектроники,

Город науки и техники Короля Абдулазиза, Эр-Рияд, Саудовская Аравия

⁴ Институт квантовой науки и инжиниринга (IQSE), отделение физики и астрономии, Техас A&M Университет,

College Station, TX 77843-4242, USA

e-mail: kh_gainutdinov@mail.ru

Поступило в Редакцию 29 декабря 2021 г.

В окончательной редакции 29 декабря 2021 г.

Принято к публикации 1 марта 2022 г.

Предложен метод приготовления образцов из биопрепаратов для детектирования содержащихся в нем апконверсионных наночастиц (АНЧ) на основе техники конфокальной микроскопии. Апробация метода была осуществлена путем мониторинга естественного выведения инъецированного коллоидного раствора наночастиц $YVO_4: Yb, Er$ (0.2 ml, содержащий 15 mg АНЧ, дозировка 600 mg/kg) размерами от 10 до 700 nm в виноградную улитку. Эксперименты показали, что животное естественным путем в течение трех суток полностью вывело из организма наночастицы, при этом скорость выведения уменьшалась с течением времени. Порог чувствительности в экспериментах был равен одной наночастице в $1 \mu l$.

Ключевые слова: апконверсия, оксидные наночастицы, редкоземельные ионы, конфокальная микроскопия, виноградные улитки.

DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52656.334-21

Введение

Успехи применения неинвазивных флуоресцентных нанозондов стали надежным фундаментом для развития широкого спектра биологических направлений. Нет сомнения, что такие методы станут базовыми инструментами в изучении физиологических принципов внутриклеточной активности в ближайшем будущем. В качестве биозондов используются различные соединения: органические красители, квантовые точки, флуоресцентные протеины и люминесцентные комплексы переходных металлов [1–6]. Как правило, для их возбуждения используется УФ излучение, которое активно рассеивается и поглощается биологическими тканями. Это факт является причиной автофлуоресценции, фотодеструкции и нагрева клеток, что сильно ограничивает возможности применения. Также следует отметить низкую фотостабильность органических флуорофоров, нежелательно широкий спектр эмиссии флуоресцентных протеинов, мерцание и токсичность квантовых точек и ряд других нежелательных факторов [7–11].

Чтобы избежать проблем применения флуоресцентных наносенсоров, работающих по схеме даунконверсии, мы используем принципиально иной подход, основанный на апконверсии. В этом подходе в роли наносенсоров

выступают апконверсионные наночастицы (АНЧ), допированные редкоземельными ионами, которые обладают яркой видимой люминесценцией при возбуждении излучением в ближнем ИК диапазоне (окно прозрачности биологических тканей). Неоспоримыми преимуществами такого подхода являются фотостабильность АНЧ, отсутствие паразитной автофлуоресценции [12–14], большая глубина проникновения возбуждающего излучения в ткани [15], практическое отсутствие локального нагрева, крайне низкая фотодеструкция биомолекул [16]. К этому следует добавить узкие линии люминесценции редкоземельных ионов, а также в ряде случаев очень низкую токсичность АНЧ [15,17–19]. Данные качества объясняют растущий интерес к АНЧ как к перспективным бионанозондам в многочисленных биологических задачах (биовизуализация, бионаносенсинг, транспорт лекарств, тераностика, фототерапия, оптогенетика и др.) [20,21].

Наиболее популярными допантами являются ионы Yb^{3+} и Er^{3+} . Это обусловлено тем, что ионы Yb^{3+} имеют большое сечение поглощения на длине волны 980 nm и способны эффективно передавать энергию на резонансные уровни ионов Er^{3+} . Поскольку в переносе энергии участвуют метастабильные уровни ионов, это обеспечивает большую вероятность двухквантовых

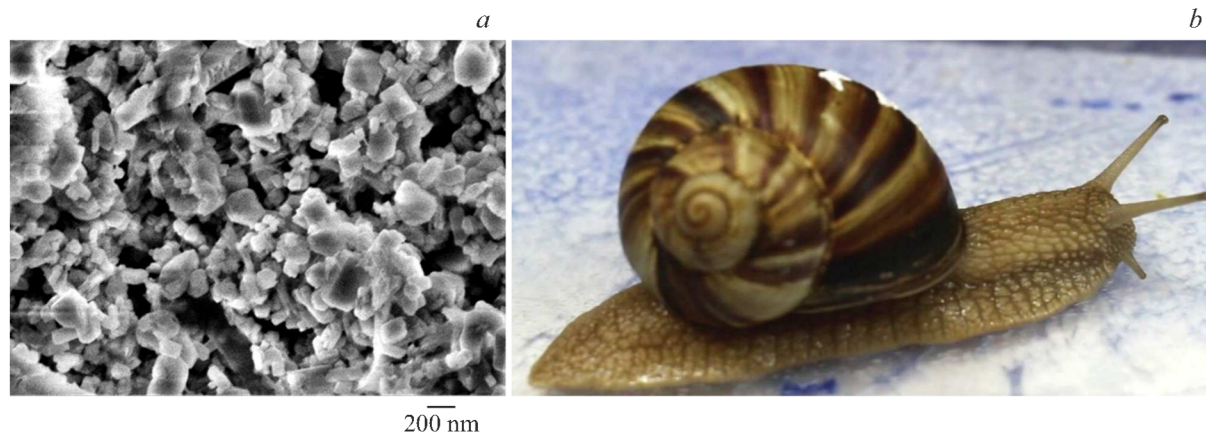


Рис. 1. Изображение наночастиц $\text{YVO}_4:\text{Yb}, \text{Er}$, полученное на сканирующем электронном микроскопе (а). Фотография виноградной улитки *Helix lucorum* (b).

процессов [22,23]. В качестве матрицы мы используем нанокристаллы YVO_4 с энергией фононов 880 cm^{-1} , что существенно больше энергии фонона 350 cm^{-1} часто используемой матрицей $\beta\text{-NaYF}_4$, [24,25]. Преимущество наночастиц $\text{YVO}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ по отношению к фторидным аналогам заключается в их слабой чувствительности к воздействию поверхностных тушителей в биологических средах. Помимо этого, оксидные наночастицы считаются малотоксичными [26], что в совокупности и обуславливает их привлекательность для применения в биологических средах. Наши недавние эксперименты по биовизуализации на виноградных улитках *Helix lucorum* показали перспективность их применения как флюоресцентных нанозондов [27,28]. Отметим, что виноградные улитки являются традиционными объектами исследований нервной системы [29–31]. Они активно используются для исследования механизмов обучения и памяти благодаря относительно простой нервной системе при богатом разнообразии поведенческих реакций, которые обусловлены сложным взаимодействием безусловных рефлексов, модулируемых процессами привыкания, сенситизации и ассоциативного обучения. В работе [28] нами был проведен сравнительный анализ поведенческой активности животных с введенными АНЧ и контрольных животных без АНЧ, который не выявил каких-либо отклонений. Обнаружено, что АНЧ (инъекцированные в тело улиток с дозой до 200 mg/kg веса животного) были практически полностью выведены животными естественным путем в течение одних суток.

Важно понимать, что для дальнейшего развития стратегий применения наночастиц $\text{YVO}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ в качестве флюоресцентных нанозондов крайне важна информация о скорости их естественного выведения. С этой целью мы разработали метод по контролю АНЧ в экскрементах животных. Предложенный нами способ приготовления образцов также позволяет детектировать АНЧ в препаратах, приготовленных из отдельных органов. Данный метод был опробован на виноградной улитке *Helix*

lucorum. В результате мы обнаружили, что, несмотря на высокую дозу (600 mg/kg) введенных АНЧ, улитка оказалась способной полностью вывести их из организма за трое суток. Образцы с выделениями улиток за четвертые сутки и далее АНЧ не содержали. При этом нами не были замечены какие-либо отклонения в поведенческих реакциях улиток после инъекции. Через семь суток из улитки были приготовлены образцы отдельных органов. Эксперименты показали отсутствие АНЧ в данных образцах.

1. Эксперимент

Синтез АНЧ был проведен аналогичным способом, описанным нами в работе [10] в соответствии со следующей процедурой [32–34]. Водный раствор $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Er}(\text{NO}_3)_3$, и $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ ($c = 0.1, 0.002$ и 0.02 mol/l соответственно) был медленно добавлен в водный раствор Na_3VO_4 ($c = 0.1 \text{ mol/l}$) при постоянном перемешивании при комнатной температуре. В результате образовался белый осадок, указывающий на наличие наночастиц $\text{YVO}_4:\text{Yb}, \text{Er}$; после этого раствор был высушен до состояния порошка. Коллоидный диоксид кремния был приготовлен путем нагревания тетраэтоксисилана, этанола и дистиллированной воды при $\text{pH} = 1.25$, $T = 60^\circ\text{C}$ в течение 1 h. Затем наночастицы были покрыты коллоидным диоксидом кремния и диспергированным полимером (PE6800) (молярное соотношение $\text{V}:\text{Si}:\text{PE6800} = 1:5:0.05$). После высухания получилась мезопористая кремневая сетчатая структура, содержащая наночастицы. Кальцинирование проводилось при 500°C в течение 1 h, а затем наночастицы отжигались 10 min при температуре 1000°C . После этого кремневая матрица была удалена с помощью трехчасовой обработки в плавиковой кислоте с молярным отношением $\text{HF}:\text{Si} = 9:1$. Согласно данным электронной микроскопии (рис. 1, а), размер полученных АНЧ лежит в диапазоне 10–700 nm.

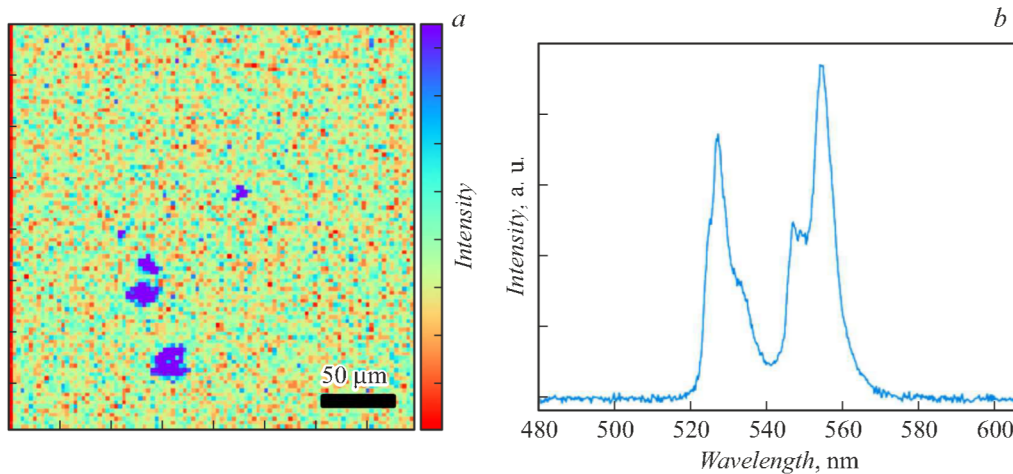


Рис. 2. Типичный скан конфокального микроскопа (*a*), сделанный на образце из собранных выделений улитки за 1 day после инъекции АНЧ. Спектр люминесценции АНЧ, подтверждающий наличие АНЧ в пяти областях, выделенных синим цветом (в онлайн версии) на скане конфокального микроскопа (*b*).

Метод опробован на виноградной улитке весом 25 г (рис. 1, *b*). Перед началом экспериментов животное не менее 2-х недель было активно, имело избыток пищи и находилось во влажной атмосфере при комнатной температуре (18–22°C). Инъекция водных коллоидных растворов АНЧ была проведена во внутреннюю полость животного через район синусного узла улитки, где отсутствуют болевые рецепторы. Для приготовления коллоидного раствора АНЧ использовалась дистиллированная вода и процедура ультразвукового диспергирования длительностью 10 min непосредственно перед инъекцией. Коллоидный раствор содержал 15 mg АНЧ в 0.2 ml H_2O (дозировка 600 mg/kg веса животного).

После инъекции животное семь суток содержалось в террариуме с ежесуточным отбором выделений, из которых приготавливались образцы следующим образом. Выделения улитки за сутки тщательно собирались со стенок террариума и тела улитки. Далее собранный биоматериал отжигался при температуре 500°C в течение 5 min, в результате чего получался серый пепел. Затем он растворялся в 0.06N соляной кислоте и дважды промывался водой с осаждением в микроцентрифуге. На этой стадии образец представлял собой коллоидный раствор несгоревшего и нерастворимого осадка в воде объемом 2 ml. Для проведения оптических экспериментов с помощью дозатора капля 1 μ l раствора помещалась на предметное стекло, которая растекалась по площади примерно 12.5 mm² и высушивалась.

Регистрация люминесценции АНЧ проводилась с помощью конфокального микроскопа при возбуждении диодным лазером с длиной волны 980 nm. Пространственное разрешение микроскопа составляло 1 μ m. Применение однофотонных детекторов для регистрации излучения позволило уверенно регистрировать люминесценцию от одиночных АНЧ. Предметное стекло с исследуемым

образцом помещалось перед объективом, после чего производилось сканирование объекта с помощью гальвосканера, перемещавшего луч по образцу. В результате получалась картина, представляющая собой градиент интенсивности сканируемой поверхности. Для подтверждения того, что светящиеся точки являются искомыми АНЧ, производилась регистрация спектра каждой светящейся частицы. Отметим, что площадь одного скана на конфокальном микроскопе составляет 0.068 mm².

2. Результаты

Типичный скан образца, приготовленного из выделений улитки за первые сутки после инъекции, представлен на рис. 2, *a*. На данном скане видны области с интенсивной люминесценцией, показанные на рисунке синим цветом (в онлайн версии). Их спектр люминесценции, приведенный на рис. 2, *b*, является характерным спектром эмиссии ионов Er^{3+} в АНЧ, что указывает на наличие АНЧ в данных областях. Остальные сканы, сделанные в произвольных местах образца, содержат от трех до семи областей с яркой люминесценцией. В целом данный результат показывает наличие АНЧ в естественных выделениях животного за первые сутки.

Рис. 3, *a* показывает один из сканов образца из выделений улитки за вторые сутки. На нем видны три области интенсивной люминесценции, спектр которой (рис. 3, *b*) указывает на наличие АНЧ. Другие сканы этого образца содержат до пяти областей, содержащих АНЧ. При этом характерной особенностью является значительное уменьшение размеров люминесцирующих областей по сравнению с предыдущим образцом.

В образце, приготовленном из выделений улитки за 3-й день, удалось обнаружить лишь единственную люминесцирующую область, которая показана на рис. 4, *a*.

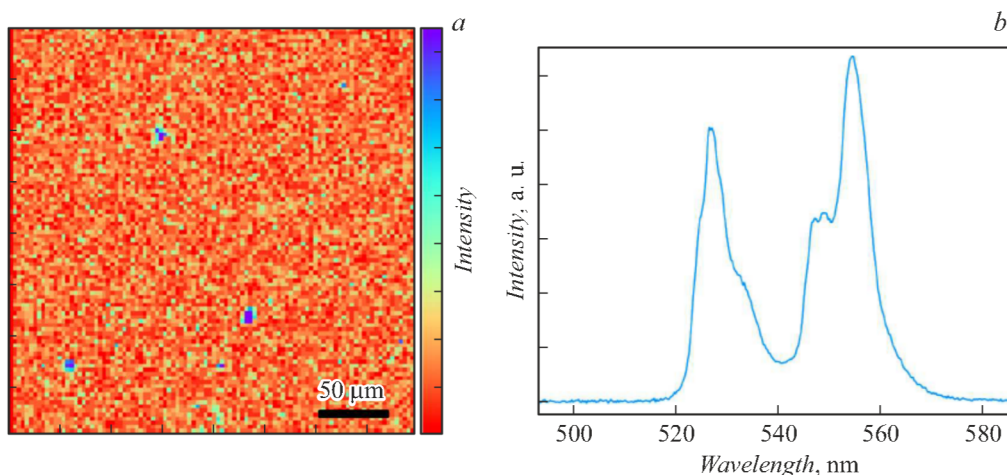


Рис. 3. Типичный скан конфокального микроскопа (*a*), сделанный на образце из собранных выделений улитки за 2 days после инъекции АНЧ. Спектр люминесценции, подтверждающий наличие АНЧ в четырех областях, выделенных синим цветом (в онлайн версии) на скане конфокального микроскопа (*b*).

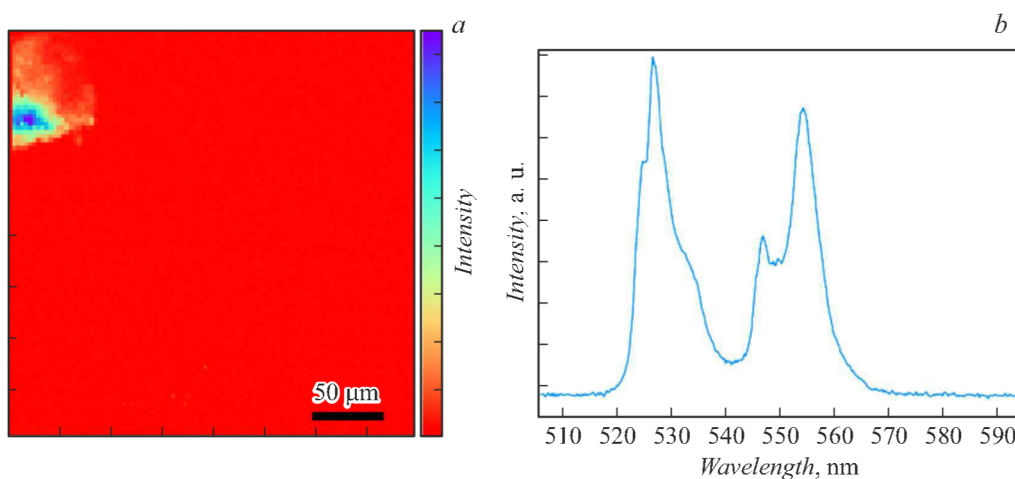


Рис. 4. Единственный скан конфокального микроскопа (*a*), сделанный на образце из собранных выделений улитки за 3 days после инъекции АНЧ, содержащий единственную люминесцирующую область. Спектр люминесценции, подтверждающий наличие АНЧ в единственной области, выделенной синим цветом (в онлайн версии) на скане конфокального микроскопа (*b*).

Ее спектр (рис. 4, *b*) подтверждает наличие в ней АНЧ. Остальные сканы не содержат сигнал АНЧ. Отметим относительно большие размеры области, которые сопоставимы с размерами наиболее крупных областей первого образца (на рис. 2).

Нами также были приготовлены образцы из выделений за четвертые–седьмые сутки. Проведенные спектроскопические исследования не позволили обнаружить в них люминесцентного сигнала АНЧ. Это указывает на отсутствие или крайне низкое содержание АНЧ за пределами чувствительности используемого нами метода.

Метод приготовления образцов из биоматериала мы использовали для поиска АНЧ в приготовленных препаратах из фрагментов тела улитки (печень, легкие, серд-

це, нервная система, гемолимфа, тело, нога), которые были приготовлены через семь суток после инъекции. Проведенные исследования не позволили обнаружить сигналов АНЧ в данных образцах. Это говорит об отсутствии АНЧ в теле животного или их низкой концентрации за пределом чувствительности метода.

3. Обсуждение

Предложенный нами метод приготовления образцов из биомассы позволяет уверенно детектировать находящиеся в них АНЧ. Данный метод был успешно опробован на виноградной улитке, которой была сделана инъекция водного раствора АНЧ (коллоидный водный

раствор, 0.2 ml, содержащий 15 mg АНЧ, дозировка 600 mg/kg). Полученные данные мониторинга естественного выведения АНЧ из организма улитки указывают на то, что животное оказалось способным избавиться от инородных оксидных наночастиц в течение трех суток. Мы не смогли обнаружить люминесцентный сигнал в образцах, приготовленных из выделений улиток, за четвертые сутки и далее вплоть до седьмых суток. Также не были найдены АНЧ в образцах, приготовленных из отдельных фрагментов тела.

Здесь важно сделать некоторые оценки чувствительности примененного метода. Используемая техника конфокальной спектроскопии уверенно детектирует люминесценцию единичной АНЧ. Это означает, что исследуемые образцы, где не обнаружен люминесцентный сигнал, не содержат АНЧ. Тем не менее чувствительность метода существенно ограничена способом приготовления образцов, который включает в себя процедуру нанесения и высушивания 1 μ l раствора на предметное стекло. Соответственно, точность метода не может превышать одной наночастицы в 1 μ l. По-видимому, именно такой предел точности был достигнут в образце за третьи сутки эксперимента, где была обнаружена единственная люминесцирующая область. Отметим, что отсутствие люминесцентного сигнала в образце указывает на концентрацию менее одной АНЧ в 1 μ l.

Следующим ограничением метода является корректная оценка абсолютного количества АНЧ в образце. Это связано с трудностями определения числа АНЧ по их совокупному люминесцентному сигналу. Для реализации этой возможности требуется развитие метода с привлечением дополнительных экспериментов, например, с применением электронной микроскопии. Тем не менее на данной стадии из анализа сканов конфокального микроскопа можно сделать некоторые наблюдения. Хотя мы не можем получить абсолютные данные о количестве АНЧ в образцах, можно уверенно говорить о тенденции уменьшения числа выводимых из организма АНЧ с течением времени в интервале первых трех суток. Поскольку все образцы сделаны по единому методу, сравнение относительных концентраций люминесцентных областей, содержащих АНЧ, путем сравнения сканов конфокального микроскопа является корректным и отражает общую тенденцию. Также интересно обратить внимание на формы люминесцентных областей в сканах. Напомним, что размеры инъектированных АНЧ составляют 10–700 nm. Мы полагаем, что яркие бесформенные люминесцентные области на скане (рис. 2) могут быть агломератами наиболее мелких АНЧ, которые выводились животным в первые сутки. Отдельными небольшими люминесцентными пятнами на рис. 3 скорее всего являются более крупные АНЧ, которые выводятся из организма медленнее. И, наконец, единственная люминесцентная область на рис. 4 может быть одной крупной АНЧ, выведение которой происходило наиболее сложным образом. Отметим, что данные

рассуждения носят качественный характер и нуждаются в дополнительной экспериментальной проверке.

Заключение

Используя технику конфокальной микроскопии, позволяющей уверенно детектировать апконверсионную люминесценцию единичной АНЧ, мы разработали метод определения скорости естественного выведения оксидных АНЧ из организма животного. При этом точность метода ограничена главным образом способом приготовления образцов и в наших экспериментах не превысила одну АНЧ в объеме раствора 1 μ l. Для апробации метода была выбрана виноградная улитка. Эксперименты показали, что животное после инъекции коллоидного раствора АНЧ концентрацией 600 mg/kg естественным путем вывело из организма АНЧ размерами от 10 до 700 nm в течение трех суток, при этом число АНЧ в образцах уменьшалось с течением времени. Также показано, что спустя семь суток АНЧ отсутствуют в теле улитки, либо их концентрация находится за пределами чувствительности метода. Отметим, что предложенный метод может быть использован на лобных других животных. Эксперименты с единственной улиткой не достаточны для полноценной оценки токсичности АНЧ. Тем не менее представленные результаты указывают на открывающиеся возможности применения АНЧ в качестве малоинвазивных люминесцентных нанозондов в широком спектре биологических задач.

Финансирование работы

Синтез оксидных АНЧ выполнен при финансовой поддержке гранта Минобрнауки РФ в рамках Соглашения № 075-15-2021-623 с ФИЦ КазНЦ РАН. Спектроскопические измерения проведены благодаря поддержке грантов РФФИ № 19-02-00569 А, № 20-52-04018 Бел_мол_аи № 20-02-00545 А. Обработка и анализ экспериментальных данных выполнены в рамках работы по госзаданию.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J.S. YLau, P.K. Lee, K.H.K. Tsang. *Inorg. Chem.*, **48**, 708 (2009).
- [2] N. Malkani, J.A. Schmid. *PLoS One*, **6** Art (e18586) (2011).
- [3] L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi. *Nat. Mater.*, **4**, 435 (2005).
- [4] C. Wang, Q. Ma, W.C. Dou, S. Kanwal. *Talanta*, **77**, 1358 (2009).
- [5] M.X. Yu, Q. Zhao, L.X. Shi. *Chem. Comm.*, 2115 (2008).
- [6] Q. Zhao, M.X. Yu., L.X. Shi. *Organometallics*, **29**, 1085 (2010).

- [7] S.A. Hilderbrand, F.W. Shao, C. Salthouse, U. Mahmood, R. Weissleder. *Chem. Comm.*, 4188 (2009).
- [8] D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise, W.W. Webb. *Science*, **300**, 1434 (2003). DOI: 10.1126/science.1083780
- [9] F. van de Rijke, H. Zijlmans, S. Li, T. Vail, A.K. Raap, R.S. Niedbala, H.J. Tanke. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 273 (2001). DOI: 10.1038/85734
- [10] V.G. Nikiforov, A.V. Leontyev, A.G. Shmelev, D.K. Zharkov, V.S. Lobkov, V.V. Samartsev. *Las. Phys. Lett.*, **16** (6), 065901 (2019).
- [11] A.V. Leontyev, A.G. Shmelev, D.K. Zharkov, V.G. Nikiforov, V.S. Lobkov, V.V. Samartsev, L.A. Nurtdinova. *Las. Phys. Lett.*, **16** (1), 015901 (2019).
- [12] N.M. Idris, Z.Q. Li, L. Ye, et al. *Biomat.*, **30**, 5104 (2009).
- [13] N.J.J. Johnson, N.M. Sangeetha, J.C. Boye, F.C.J.M. van Veggel. *Nanoscale*, **2**, 771 (2010).
- [14] X.J. Wu, Q.B. Zhang, X. Wang, H. Yang, Y.M. Zhu. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2158 (2011).
- [15] D.K. Chatterjee, A.J. Rufaihah, Y. Zhang. *Biomat.*, **29**, 937 (2008).
- [16] S. Jiang, Y. Zhang. *Langmuir*, **26**, 6689 (2010). <https://doi.org/10.1021/la904011q>
- [17] Y.I. Park, J.H. Kim, K.T. Lee, K.S. Jeon, H.B. Na, J.H. Yu, H.M. Kim, N. Lee, S.H. Choi, S.I. Baik, H. Kim, S.P. Park, B.J. Park, Y.W. Kim, S.H. Lee, S.Y. Yoon, I.C. Song, W.K. Moon, Y.D. Suh, T. Hyeon. *Adv. Mater.*, **21**, 4467 (2009). DOI: 10.1002/adma.200901356
- [18] A.R. Jalil, Y. Zhang. *Biomat.*, **29**, 4122 (2008).
- [19] L.Q. Xiong, T.S. Yang, Y. Yang, C.J. Xu, F.Y. Li. *Biomat.*, **31**, 7078 (2010).
- [20] F. Jia, G. Li, B. Yang, B. Yu, Y. Shen, H. Cong. *Nanotechnol. Rev.*, **8**, 1 (2019). <https://doi.org/10.1515/ntrev-2019-0001>
- [21] M.V. DaCosta, S. Doughan, Y. Han, U.J. Krull. *Anal. Chim. Acta*, **832**, 1 (2014).
- [22] D.R. Gamelin, H.U. del Gu. *Top. Curr. Chem.*, **214**, 1 (2001).
- [23] F. Auzel. *Chem. Re.*, **104**, 139 (2004).
- [24] M.F. Joubert. *Opt. Mater.*, **11**, 181 (1999).
- [25] P. Goldner, F. Pellé. *J. Lumin.*, **55**, 197 (1993).
- [26] P.E. Petrochenko, Q. Zhang, B. Wildt, M.V. Betz, P.L. Goering. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 1 (2012).
- [27] Д.К. Жарков, А.Г. Шмелев, А.В. Леонтьев, В.Г. Никифоров, В.С. Лобков, Н.В. Курбатова, М.Х. Алькатани, Ф.Р. Хеммер. *Изв. РАН. Сер. физ.*, **84**, 1746 (2020). DOI: 10.31857/S0367676520120406
- [28] А.Г. Шмелев, В.Г. Никифоров, Д.К. Жарков, В.В. Андрианов, Л.Н. Муранова, А.В. Леонтьев, Х.Л. Гайнутдинов, В.С. Лобков, М.Х. Алькатани, Ф.Р. Хеммер. *Изв. РАН. Сер. физ.*, **84**, 1696 (2020). DOI: 10.31857/S0367676520120352
- [29] P.M. Balaban. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **26** (5), 597 (2002).
- [30] T. Kiss, Z. Pirger, G. Kemenes. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **92**, 114 (2009).
- [31] V.V. Andrianov, T.K. Bogodvid, I.B. Deryabina, A.N. Golovchenko, L.N. Muranova, R.R. Tagirova, A.K. Vinarskaya, K.L. Gainutdinov. *Front. Behav. Neurosci.*, **9**, 1 (2015).
- [32] G. Mialon, S. Türkcan, A. Alexandrou, T. Gacoin, J.-P. Boilot. *J. Phys. Chem. C*, **113**, 18699 (2009).
- [33] G. Mialon, S. Türkcan, G. Dantelle, D.P. Collins, M. Hadjipanayi, R.A. Taylor, T. Gacoin, A. Alexandrou, J.-P. Boilot. *J. Phys. Chem. C*, **114**, 22449 (2010). <https://doi.org/10.1021/jp107900z>
- [34] M.H. Alkahtani, F.S. Alghannam, C. Sanchez, C.L. Gomes, H. Liang, P.R. Hemmer. *Nanotech.*, **27**, 485501 (2016).