

ПРИМЕНЕНИЕ АПКОНВЕРСИОННЫХ НАНОЧАСТИЦ YVO_4 : Yb,Er В ЗАДАЧАХ БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ В ВИНОГРАДНЫХ УЛИТКАХ

А.Г. Шмелев^{1,*}, В.Г. Никифоров¹, Д.К. Жарков¹, В.В. Андрианов^{1,2},
Л.Н. Муранова^{1,2}, А.В. Леонтьев¹, Х.Л. Гайнутдинов^{1,2}, В.С. Лобков¹,
М.Х. Алькатани³, Ф.Р. Хеммер^{1,4}

¹Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Национальный центр лазерных технологий и оптоэлектроники, Город науки и техники Короля Абдулазиза, Эр-Рияд, Саудовская Аравия

⁴Институт квантовой науки и инжиниринга (IQSE), отделение физики и астрономии, Техас A&M Университет, College Station, TX 77843-4242

*e-mail: sgartjom@gmail.com

1. Введение

Техника люминесцентной микроскопии давно и активно используется для решения широкого круга задач биологии и биомедицины. Традиционно используются такие люминофоры как органические красители, квантовые точки, комплексы переходных металлов и различные флуоресцентные белки[1-2]. Тем не менее, при использовании этих люминофоров остаются нерешённые проблемы. Так ультрафиолетовое излучение, используемое для накачки флюорофоров, приводит к фоторазрушению и автолюминесценции биологических объектов. Кроме того, УФ излучение поглощается биологическими тканями, а квантовые точки состоят из элементов, которые являются ядами для живых клеток, что приводит к необходимости наносить на квантовые точки дополнительные защитные оболочки.

В последние десятилетия в качестве флюорофоров стали использоваться апконверсионные наночастицы (АКНЧ, UCNP — upconversion nanoparticles). Такие наночастицы представляют собой нанокристаллы допированные ионами редкоземельных элементов, которые поглощают ИК излучение и каскадным образом передают энергию на ионы излучающие в видимом диапазоне. Очевидно, что для предотвращения тушения люминесценции водой необходимо чтобы матрица обладала как можно меньшей энергией фононов. Так, типичная матрица — β - $NaYF_4$ обладает энергией фонона 350 см^{-1} [3], но ионы натрия и фтора могут оказать существенное влияние на протекание биохимических процессах в клетках. Поэтому мы синтезировали наночастицы на основе YVO_4 . Хотя энергия фононов в этой матрице составляет 880 см^{-1} биологическая и химическая инертность, а также форма наночастиц предполагают низкую токсичность готовых флюорофоров.

В качестве тестовых объектов мы выбрали виноградных улиток — легочных моллюсков *Helix Lucorum* крымской популяции, которые являются популярным модельным животным при исследовании нервной системы [4]. Эти животные обладают относительно простой нервной системой, что позволяет легко идентифицировать нейроны отвечающие за различные поведенческие реакции. Так как сами нейроны крупные (до 300 мкм) найти у разных особей одного вида одинаковые клетки становится достаточно легко, что безусловно облегчает проведение экспериментов по биовизуализации. Нервные клетки, кроме того, расположены поверхностно в нервных

ганглиях, что упрощает процесс регистрации процессов в нейронах с помощью оптических методов.

2. Эксперимент

Наночастицы были синтезированы гидротермальным методом [5-6]. Соли Y, Yb, Er смешивались с водным раствором Na_3VO_4 , при этом аморфные наночастицы $\text{YVO}_4:\text{Yb,Er}$ выпадали в виде осадка. Чтобы превратить аморфные наночастицы в нанокристаллы осадок просушивался и помещался в золь-гель тетраэтилсилоксана для формирования кремниевой мезопористой сетчатой структуры, что предотвращало спекание наночастиц в процессе кристаллизации. После кристаллизации (10 мин при 1000°C) кремний растворялся плавиковой кислотой, а нанокристаллы промывались водой. Готовые наночастицы разбавлялись водой и за сутки до препарирования инъектировались во внутреннюю полость модельных животных максимально безболезненно, через район синусного узла (в виду отсутствия болевых рецепторов в этом месте). Для экспериментов отбирались живые, подвижные животные весом 25 г, которые не менее двух недель находились во влажной атмосфере при комнатной температуре в активном состоянии и избытке пищи.

Животному №1 ввели коллоидный раствор (подвергшийся диспергации в течении 10 мин ультразвуком), содержащий 0.4 мг нанокристаллов в 0.2 мл воды (дозировка 16 мг/кг веса животного). Животному №2 ввели 5 мг АКНЧ в 0.25 мл воды (дозировка 200 мг/кг веса животного). Животному №3 в качестве контроля ввели 0.2 мл воды.

После инъекций животные содержались совместно в общем террариуме в одинаковых условиях. На протяжении суток, до препарирования, мы проводили визуальные наблюдения за поведением животных, которые не выявили каких-либо различий с контрольной особью. Улитки в целях анестезии помещались в смесь воды со льдом перед препарированием. Изолированные препараты биологических тканей животных – нервной системы, печени, кожи, сердца, — в физиологическом растворе исследовались с помощью микроскопа тринокуляра с фотографической насадкой. Излучение накачки (непрерывный лазер 980 нм) подавалось с помощью оптоволокну. Для того, чтобы отсечь накачку перед объективом микроскопа помещался абсорбционный сфетофильтр, а фоточувствительный элемент фотоаппарата был прикрыт интерференционным светофильтром.

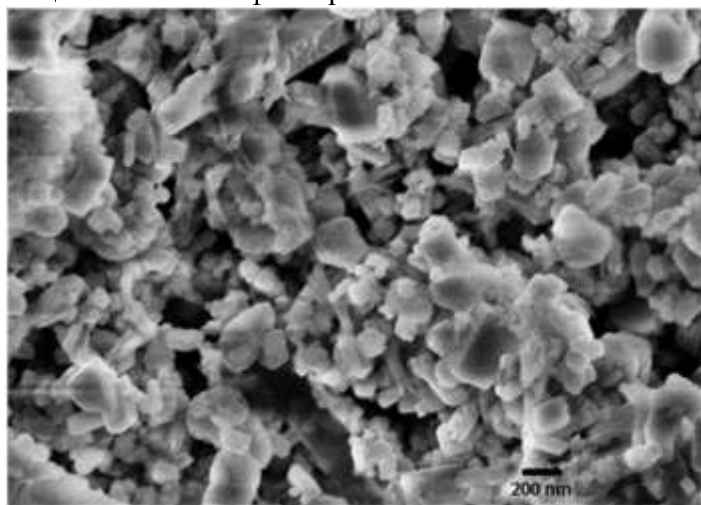


Рис. 1. Микрофотография синтезированных АКНЧ полученная с помощью электронного сканирующего микроскопа. Видно, что АКНЧ не содержат острых углов, которые могли бы повредить живые клетки.

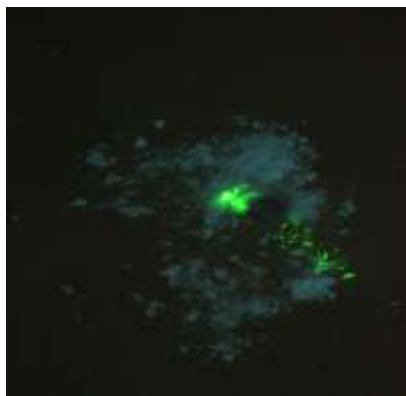


Рис. 2. АКНЧ в физиологическом растворе для настройки оборудования (слева).

Рис. 3. Легочной моллюск *Helix lucorum* крымской популяции — модельное животное (справа).

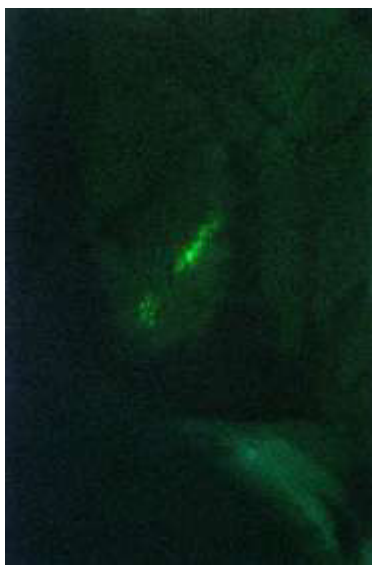


Рис. 4. Изолированный препарат тканей (печень, лёгкое, глаз, сердце) животного в физиологическом растворе (слева). **Рис. 5.** Люминесценция АКНЧ на препарате легкого животного №2 (по центру). **Рис. 6.** Люминесценция 0.4 мг АКНЧ введённых непосредственно в препарат печени животного № 1. Люминесценция видна невооружённым глазом (справа).

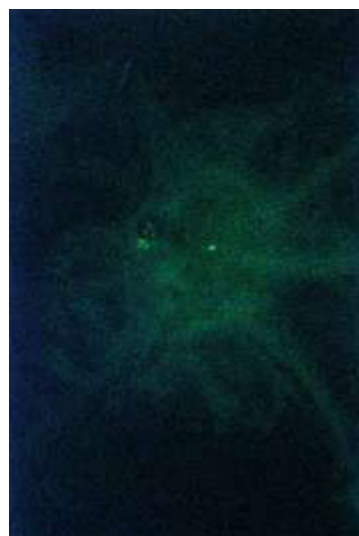


Рис. 7. Люминесценция АКНЧ в препарате глаза животного №2 (слева). **Рис. 8.** Препарат мозга животного №2. (по центру). **Рис. 9.** Люминесценция АКНЧ в препарате мозга животного №2. Усилен контраст и яркость фотографии. (справа).



Рис. 10. То же что на рис. 9, но без обработки. Люминесценция видна невооружённым глазом.

3. Выводы

Синтезированы нанокристаллиты $YVO_4:Yb, Er$, демонстрирующие высокоэффективную апконверсию: в водном коллоидном растворе этих АКНЧ наблюдается яркая, видимая глазу люминесценция в области 520 – 560 нм, вызванная излучательными переходами с уровней $^2H_{11/2}$ и $^4S_{3/2}$ на основной уровень $^4I_{15/2}$ иона Er^{3+} при накачке непрерывным лазером на длине волны 980 нм. Наблюдения показали низкую токсичность АКНЧ, которые вводились виноградным улиткам (*Helix lucorum* крымской популяции) в виде инъекций водных коллоидных растворов. Отсутствие интенсивного сигнала люминесценции АКНЧ в исследованных препаратах может указывать на то, что большая часть АКНЧ была выведена животными в течение одних суток. После дополнительной инъекции АКНЧ в препарат печени наблюдалась интенсивная люминесценция, что свидетельствует об отсутствии значительного поглощения зелёного света тканями

животного. Всё вышеперечисленное позволяет заключить: синтезированные нами АКНЧ $YVO_4:Yb, Er$ являются перспективными низкотоксичными высокоэффективными люминесцентными биозондами, пригодными для использования в биологических задачах.

Работы по синтезу АКНЧ выполнены при поддержке Правительства РФ: договор по Мега-Гранту 220 (соглашение №14.W03.31.0028 с организацией КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН), спектроскопические исследования проводились в рамках работ по грантам РФФИ (№19-02-00569 и №20-02-00545). Работы с животными проводились в рамках темы государственного задания.

Литература

1. M.Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **110** (2010) 2641.
2. H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P.L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **110** (2010) 2620.
3. M.F. Joubert, *Opt. Mater.* **11** (1999) 181.
4. V.V. Andrianov, T.Kh. Bogodvid, I.B. Deryabina et al. *Front. Behav. Neurosci.* **9** (2015) 1.
5. M.H. Alkahtani, F.S. Alghannam, C. Sanchez et al. *Nanotech.* **27** (2016) 485501.
6. D.K. Zharkov, A.G. Shmelev, A.V. Leontyev, V.G. Nikiforov, V.S. Lobkov, M.H. Alkhatani, P.R. Hemmer, *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* **84** (2020) 241.