

УДК 620.3:[538.958+53.05+53.082.56]

ТЕСТИРОВАНИЕ СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ЧАСТИЦ $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

© 2024 г. А. В. Леонтьев¹, Л. А. Нуртдинова^{1,2}, Е. О. Митюшкин¹, А. Г. Шмелев¹, Д. К. Жарков¹, В. В. Андрианов^{1,2}, Л. Н. Муранова^{1,2}, Х. Л. Гайнутдинов^{1,2}, В. Г. Никифоров^{1*}

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

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

*e-mail: vgnik@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2023

После доработки 29.01.2024

Принята к публикации 26.02.2024

На основе гидротермального метода синтезированы частицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ в виде стержней со средними размерами 1.4 мкм × 70 нм. Проведена модификация их поверхности L-цистеином, что обеспечило гидрофильные свойства. Показано, что полученные частицы обладают апконверсионной люминесценцией в видимом спектральном диапазоне при лазерном возбуждении на длине волны 980 нм. Осуществлена их температурная калибровка в физиологическом растворе, которая показала возможность удаленного измерения температуры в биологически значимом диапазоне 293 — 323 К со средней чувствительностью $43 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ и точность $\pm 1.0 \text{ K}$. Выполнен демонстрационный эксперимент на живой нервной системе виноградной улитки *Helix lucorum*, где сенсоры успешно использованы для биовизуализации и удаленного малоинвазивного измерения температуры с пространственным разрешением 10 мкм.

Ключевые слова: фторидная наночастица, апконверсионный наносенсор, люминесцентный нанотермометр, наноразмерный биозонд, эмиссия редкоземельных ионов, биовизуализация

DOI: 10.31857/S0367676524060082, EDN: RHGIQP

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетие наблюдается бурное развитие сенсорики на основе апконверсионных наночастиц (АНЧ), которые представляют собой редкоземельные ионы, допированные в различные матрицы (как правило, фторидные нанокристаллы) [1, 2]. АНЧ находят применение в широком спектре исследовательских и прикладных задач, таких как визуализация биологических объектов, биосенсорика, терапия и диагностика раковых заболеваний, транспорт лекарств, преобразование солнечной энергии, защита от подделок и т. д. [3–14]. АНЧ интересны в первую очередь благодаря нелинейному апконверсионному процессу преобразования инфракрасного (ИК) излучения ближнего диапазона в инфракрасное, видимое и ультрафиолетовое излучение [1, 15]. Данная особенность позволяет избежать целого ряда негативных факторов воздействия интенсивного ближнего ультрафиолетового или видимого излучения на живые ткани, которые сопутствуют даунконверсионным люминофорам (таким как органические молекулы или квантовые точки) [16–20]. При

использовании ближнего ИК излучения в области 700–1100 нм — окна прозрачности большинства биологических тканей — практически отсутствует автофлуоресценция и нагревание биопрепаратов, увеличивается глубина проникновения и уменьшается рассеяние возбуждающего излучения [21, 22]. Узкие эмиссионные пики редкоземельных ионов, большие антистоксовы сдвиги, отличная фото- и химическая стабильность делают АНЧ одними из самых перспективных кандидатов для применения в качестве малоинвазивных люминесцентных сенсоров [23–26].

В настоящей работе мы использовали гидротермальный метод для синтеза частиц NaYF_4 , активированных редкоземельными ионами Yb^{3+} , Er^{3+} . Для реализации возможности их применения в водных средах поверхности АНЧ были модифицированы L-цистеином, что придало АНЧ гидрофильные свойства. На примере живого образца нервной системы виноградной улитки показано, что полученные АНЧ успешно выполняют роль сенсоров температуры, а также могут быть использованы в задачах биовизуализации.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Процессы синтеза наночастиц и модификации поверхности подробно описаны в работе [27]. Наночастицы были получены гидротермальным методом с использованием олеиновой кислоты в качестве стабилизирующего агента. При постоянном перемешивании 8 мл этанола было добавлено к 2 мл водного раствора NaOH (15.0 М). Затем к раствору было добавлено 20 мл олеиновой кислоты для образования комплексов металл-олеиновой кислоты. Далее в условиях интенсивного помешивания в систему было добавлено 0.8, 0.18 и 0.02 ммоль $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ и $\text{Er}(\text{NO}_3)_3$, соответственно, а также 8 мл водного раствора NaF (1.0 М). Получившийся раствор был помещен в стальной автоклав емкостью 50 мл с тефлоновым покрытием и выдержан 24 ч при температуре 190 °С. После чего систему охлаждали до комнатной температуры естественным путем. Далее систему разделяли центрифугированием и промывали несколько раз этанолом и дистиллированной водой для удаления олеиновой кислоты и других остатков. После сушки в течение 12 ч при 60 °С был получен порошок наночастиц, пригодный для использования.

Синтезированные АНЧ имеют олеатные оболочки, придающие им гидрофобные свойства. С целью изменения их свойств на гидрофильные была выполнена модификация поверхности путем замены олеатной оболочки на молекулы L-цистеина. Для этого порошок наночастиц был диспергирован в хлороформе. Отдельно был приготовлен водный раствор L-цистеина с концентрацией 0.2 моль/л и кислотностью 10 рН. После смешивания раствора L-цистеина с диспергированными АНЧ получившаяся двухфазная система была нагрета до 90 °С при интенсивном перемешивании. По мере испарения хлороформа происходил переход наночастиц в водный слой. Для очистки полученной системы был добавлен этанол в соотношении 1:1 до помутнения раствора и растворения олеиновой кислоты. Смесь разделяли центрифугированием и промывали несколько раз дистиллированной водой.

Морфологию поверхности $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) EVO 50 XVP (Carl Zeiss). Образец представлял собой диспергированные в воде наночастицы, нанесенные и высушенные на подложке из высоколегированного проводящего кремния.

Сигнал люминесценции АНЧ, помещенных в физиологический раствор, регистрировали при помощи конфокального микроскопа, где в качестве возбуждающего источника был использован диодный лазер с длиной волны 980 нм. Пространственное разрешение микроскопа составляло 10 мкм. Образец помещали в фокальную плоскость объектива, после чего сканировали его с помощью

гальвосканера, перемещавшего лазерный луч по образцу. В результате получали картина, представляющую собой зависимость интенсивности люминесценции от координаты на поверхности. Спектр регистрируемой люминесценции однозначно соответствовал эмиссионным линиям ионов Er^{3+} в АНЧ. Площадь сканируемой поверхности составляла 6×6 мм.

Биологический препарат представлял собой изолированную нервную систему наземного легочного моллюска *Helix lucorum* (виноградная улитка) крымской популяции, который включал в себя подглоточный комплекс ганглиев, состоящий из плевропальных париетальных и педалных висцеральных ганглий. Изолированную нервную систему помещали в физиологический раствор следующего состава: NaCl — 80 мМ, KCl — 4 мМ, CaCl_2 — 7 мМ, MgCl_2 — 5 мМ, NaHCO_3 — 5 мМ; кислотность $\text{pH} = 7.6-7.8$. Окологлоточное кольцо закрепляли вольфрамовыми скобками, затем с помощью пинцетов и миниатюрного скальпеля под бинокулярным микроскопом очищали от соединительно-тканной оболочки, закрывающей нервные клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1а представлены изображения СЭМ наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ после модификации поверхности L-цистеином. Видно, что АНЧ имеют стержневую форму, длина и ширина которой варьируются в диапазоне от 0.4—2 мкм и 45—125 нм, соответственно. Большинство наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ имеют длину и ширину, близкую к 1.6 мкм и 75 нм.

Спектры люминесценции (на рис. 2а) соответствуют излучательным релаксационным переходам ионов Er^{3+} : ${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (520 нм), ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (535 нм), ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (660 нм). При этом возбуждение осуществляется на длине волны 980 нм, которая соответствует ближнему инфракрасному диапазону, что ясно свидетельствует об апконверсионном характере наблюдаемой люминесценции. Апконверсия является результатом двух- и трехфотонного поглощения ионом Yb^{3+} с переносом энергии на ион Er^{3+} по механизму кросс-релаксации. Эффективность переноса энергии между ионами обусловлена тем, что уровень ${}^2\text{F}_{5/2}$ иона Yb^{3+} находится в резонансе с промежуточным метастабильным состоянием ${}^4\text{I}_{11/2}$ иона Er^{3+} (рис. 2б). В результате происходит последовательное возбуждение иона Er^{3+} из основного состояния ${}^4\text{I}_{15/2}$ сначала на уровень ${}^4\text{I}_{11/2}$, а затем на уровень ${}^4\text{F}_{7/2}$. Отметим также, что возможны промежуточные безызлучательные переходы на нижележащие уровни с последующими апконверсионными переходами и на более высоколежащие состояния [28].

На рис. 3а представлены спектры зеленых полос люминесценции АНЧ в физиологическом растворе для биологически значимого интервала температур

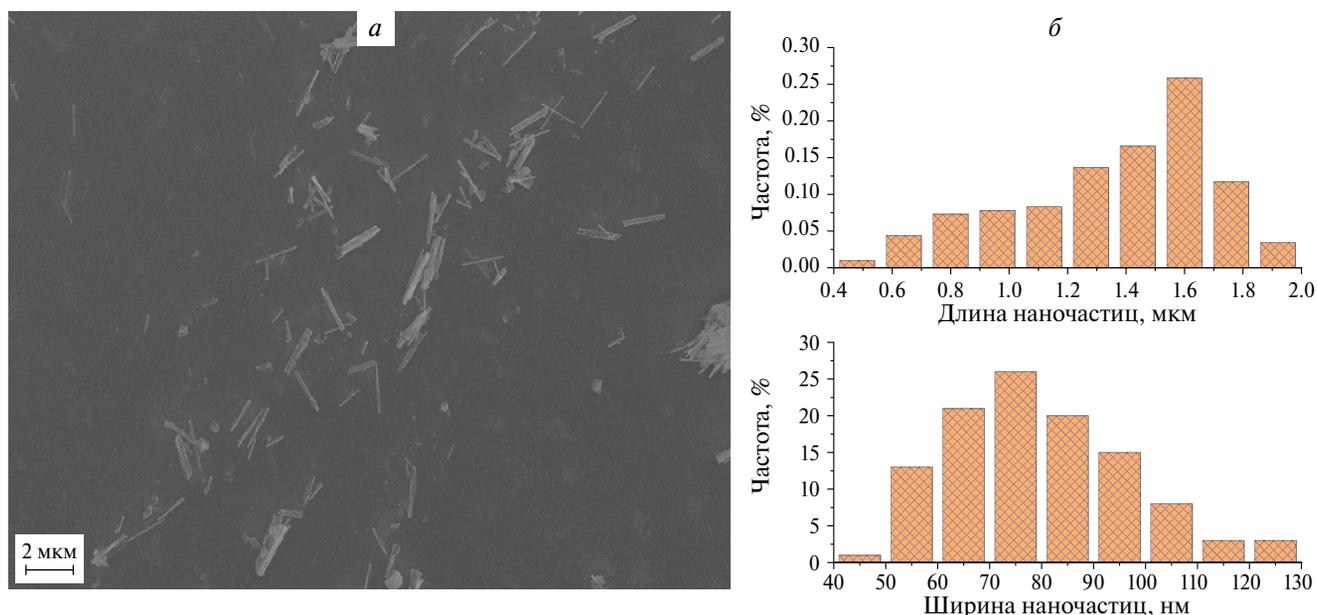


Рис. 1. Изображение СЭМ наночастиц $\text{NaYF}_4: \text{Yb}, \text{Er}$ после поверхностной модификации L-цистеином (а); гистограмма распределения наночастиц $\text{NaYF}_4: \text{Yb}, \text{Er}$ по размерам (б).

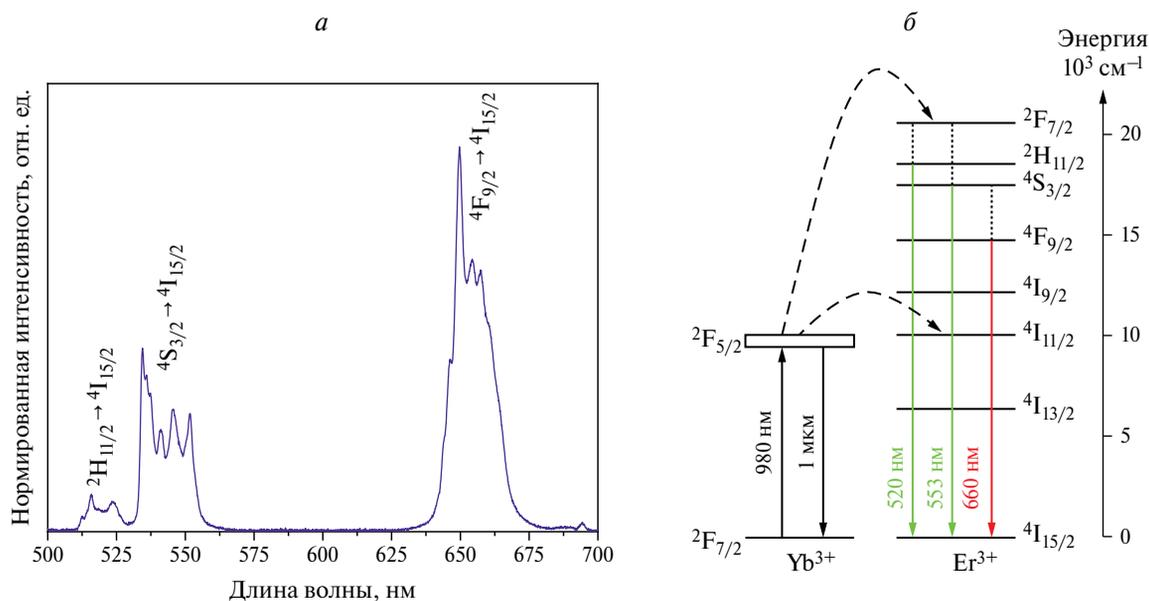


Рис. 2. Спектр апконверсионной люминесценции наночастиц $\text{NaYF}_4: \text{Yb}, \text{Er}$ (а); Диаграмма энергетических уровней и процессы переноса энергии в апконверсионной системе $\text{Yb}^{3+} - \text{Er}^{3+}$ (б). Сплошные стрелки показывают излучательные переходы, пунктирные стрелки и линии — перенос энергии и безызлучательные переходы.

293—323 К. Зеленая эмиссия, состоящая из двух отдельных полос с максимумами на 525 и 535 нм, является результатом излучательных переходов ${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (525 нм) и ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (535 нм) ионов Er^{3+} . Важно отметить, что полоса в области 555 нм может включать в себя эмиссию с более высоких уровней энергии [29]. В этом случае температурная зависимость полосы на 555 нм может существенно

отличаться от остальных спектральных пиков. В связи с чем мы посчитали целесообразным исключить ее из дальнейшего рассмотрения.

Энергетический зазор между состояниями ${}^2\text{H}_{11/2}$ и ${}^4\text{S}_{3/2}$ не превышает 103 см^{-1} . Считая процесс термической активации доминирующим в распределении населенностей близкорасположенных уровней и пренебрегая вкладами других процессов, заселенность

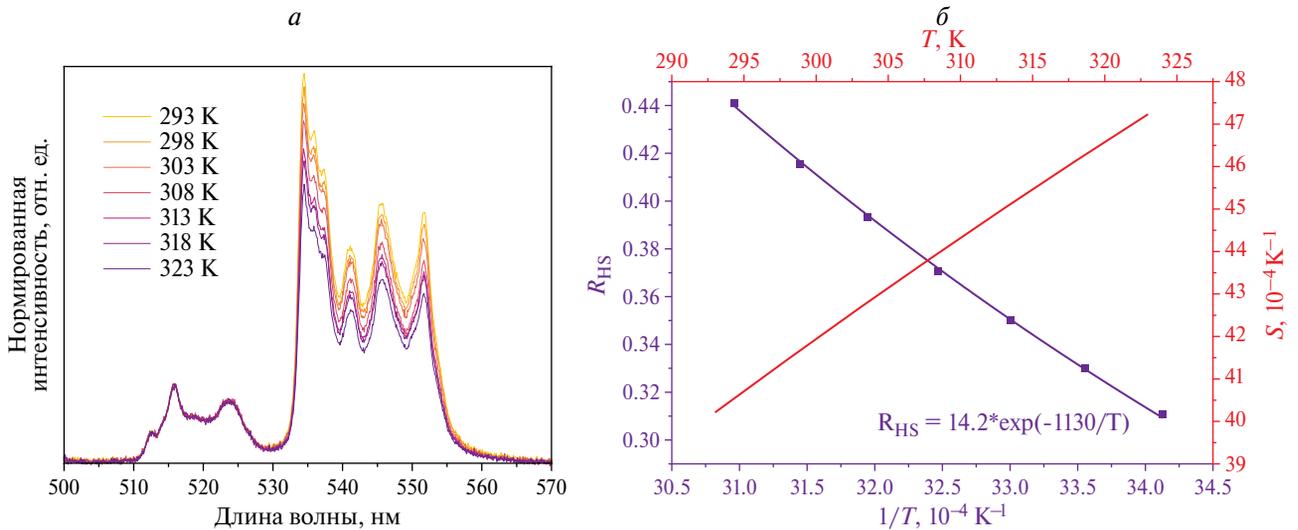


Рис. 3. Спектры апконверсионной люминесценции NaYF₄: Yb, Er, полученные при разной температуре. Эксперименты были выполнены при мощности возбуждающего излучения 0.5 Вт/см² (а). Зависимости относительной населенности уровней ²H_{11/2} и ⁴S_{3/2} ионов Er³⁺ R_{HS} от обратной температуры 1/T (фиолетовые точки — экспериментальные данные, фиолетовая кривая — аппроксимация функцией (1)) и чувствительности S от температуры T (оранжевая кривая) (б).

уровней ²H_{11/2} и ⁴S_{3/2} ионов Er³⁺ будет близка к статистике Больцмана:

$$R_{HS}(1/T) = \frac{\int_{510nm}^{530nm} I(\lambda)d\lambda}{\int_{530nm}^{543nm} I(\lambda)d\lambda} = A \cdot \exp\left(\frac{-E}{k_B T}\right), \quad (1)$$

где E — константа, по величине близкая к энергетическому зазору между уровнями ²H_{11/2} и ⁴S_{3/2}, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура и A — коэффициент пропорциональности.

Отметим, что для температурных сенсоров важной характеристикой является чувствительность $S = dR_{HS} / dT$, которая в соответствии с выражением (1) имеет вид

$$S_{HS}(T) = \frac{d}{dT} R_{HS} \left(\frac{1}{T} \right) = \frac{\Delta E}{k_B T^2} R_{HS} \left(\frac{1}{T} \right). \quad (2)$$

Выражение вида (1) удобно использовать для аппроксимации зависимости спектральных амплитуд от температуры на основе ратиометрического метода путем калибровки соотношения интегральных интенсивностей двух полос люминесценции R_{HS} в областях спектра 510—530 и 530—543 нм.

На рис. 3б приведены экспериментальные данные R_{HS} (точки), а также результат их аппроксимации зависимостью вида (1) (линии). Таким образом, выражение (1) приобретает смысл калибровочной кривой с постоянными A = 14.2 и E/k_B = 1130 К. Температурная чувствительность АНЧ NaYF₄: Yb, Er в диапазоне температур 293—323 К варьируется в пределах 15%. Точность измерения температуры

на основе представленных экспериментальных данных оказалась равной 1.0 К, что является хорошим показателем для подобных сенсоров.

Нами были проведены эксперименты по визуализации препарата нервной системы виноградной улитки *Helix lucorum*. Для этого АНЧ, модифицированные L-цистеином, были нанесены на поверхность нервной ткани. Важно отметить, что нахождение АНЧ в физиологическом растворе не привело к заметному уменьшению яркости апконверсионной люминесценции [30—33].

В процессе эксперимента были получены два изображения препарата (рис. 4). Верхнее изображение снято с помощью камеры тринокулярного микроскопа. На нем видны овальные образования размерами до 300 мкм, которые являются поверхностью нейронов. Нижнее изображение — результат сканирования люминесцентного сигнала на конфокальном микроскопе. Оно показывает распределение интенсивности люминесцентного сигнала на поверхности препарата нервной системы виноградной улитки. Цветовой градиент от темного до ярко желтого соответствует минимуму и максимуму интенсивности сигнала, соответственно.

На основе определенной выше калибровочной кривой нами сделаны оценки температуры в трех локальных областях, обозначенных цифрами 1, 2, 3 на рис. 4. Результаты сопоставления отношения интегральных интенсивности R_{HS} с калибровочной кривой дали следующие значения температуры: 295.0, 296.9 и 295.2 К. Учитывая величину погрешности измерения ±1.0 К, можно заключить, что температура на поверхности препарата близка к 296±1.0 К. Данное значение полностью согласуется с результатами

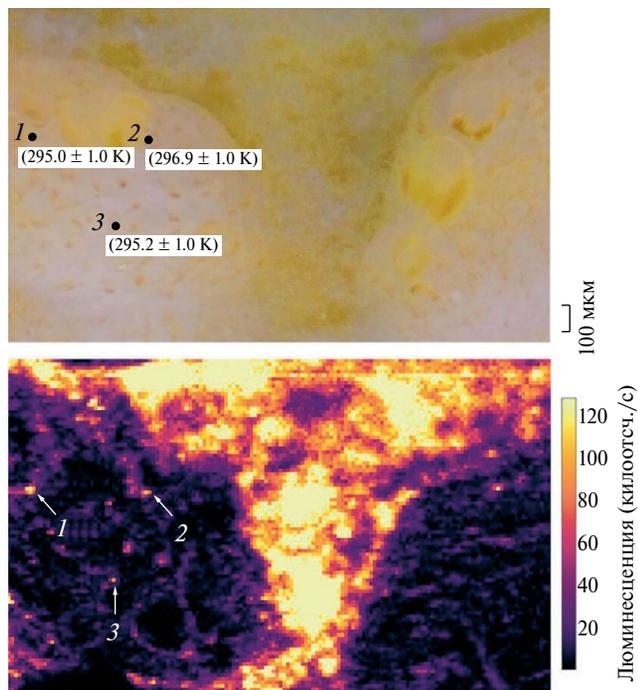


Рис. 4. Фотография препарата нервной системы виноградной улитки *Helix lucorum* (верхнее изображение), скан конфокального микроскопа, показывающего интенсивность люминесценции АНЧ, нанесенных на препарат (нижнее изображение).

измерения температуры физиологического раствора в препарате терморезистором 23 ± 0.5 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что полученные нами апконверсионные частицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ можно использовать в качестве люминесцентных сенсоров температуры в биологически значимом диапазоне 293–323 К со средней чувствительностью $43 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$, которая позволяет удаленно измерять температуру с точностью ± 1.0 К. Для проверки возможности использования сенсоров для удаленного контроля температуры в биологических объектах был выполнен эксперимент по биовизуализации, в котором прокалиброванные температурные сенсоры были нанесены на поверхность живой нервной системы виноградной улитки. С помощью конфокального микроскопа получена карта яркости апконверсионной люминесценции при лазерном облучении на длине волны 980 нм, которое попадает в «окно прозрачности» биотканей и является малоинвазивным для них. В частности, это позволило провести локальное измерение температуры с пространственным разрешением ~ 10 мкм. Результаты удаленного измерения температуры оказались в хорошем согласии с измерением температуры физиологического раствора терморезистором 23 °С. На основании представленных данных можно

заключить, что приготовленные нами сенсоры являются готовым решением для измерения температуры.

Синтез наночастиц выполнен при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-42-10012, <https://rscf.ru/project/23-42-10012/>. Спектроскопические измерения выполнены в рамках темы государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. // Chem. Rev. 2014. V. 114. No. 10. P. 5161.
2. Ding M., Chen D., Yin S. et al. // Sci. Reports. 2015. V. 5. P. 12745.
3. Pang G., Zhang Y., Wang X. et al. // Nano Today. 2012. V. 40. Art. No. 101264.
4. Li S., Wei X., Li S. et al. // Int. J. Nanomed. 2020. V. 15. P. 9431.
5. Jiang W., Yi J., Li X. et al. // Biosensors. 2022. V. 12. No. 11. Art. No. 1036.
6. Arai M.S., de Camargo A.S.S. // Nanoscale Advances. 2021. V. 3. No. 18. P. 5135.
7. Lv H., Liu J., Wang Y. // Front. Chem. 2022. V. 10. Art. No. 996264.
8. Chen W., Xie Y., Wang M., Li C. // Front. Chem. 2020. V. 8. Art. No. 596658.
9. Lee G., Park Y.I. // Nanomaterials. 2018. V. 8. No. 7. P. 511.
10. Zhang L., Jin D., Stenzel M.H. // Biomacromol. 2021. V. 22. No. 8. P. 3168.
11. Ghazy A., Safdar M., Lastusaari M. et al. // Sol. Energy Mater. Sol. Cells. 2021. V. 230. Art. No. 111234.
12. Richards B.S., Hudry D., Busko D. et al. // Chem. Rev. 2021. V. 121. No. 15. P. 9165.
13. Chaudhary B., Kshetri Y.K., Kim T.H. // In: Upconversion nanoparticles (UCNPs) for functional applications. POSP. V. 24. Singapore: Springer Nature, 2023. P. 193.
14. Qingqing K., Xiaochun H., Chengxue D. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2023. V. 25. No. 27. P. 17759.
15. Yang Y., Wang L., Wan B. et al. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 15. No. 7. P. 320.
16. Hilderbrand S.A., Shao F., Salthouse C. // Chem. Commun. 2009. No. 28. P. 4188.
17. Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M. et al. // Science. 2003. V. 300. P. 1434.
18. van de Rijke F., Zijlmans H., Li S. et al. // Nature Biotechnol. 2001. V. 19. P. 273.
19. Nikiforov V.G., Leontyev A.V., Shmelev A.G. et al. // Laser Phys. Lett. 2019. V. 16. No. 6. Art. No. 065901.
20. Leontyev A.V., Shmelev A.G., Zharkov D.K. et al. // Laser Phys. Lett. 2019. V. 16. No. 1. Art. No. 015901.
21. Wu X.J., Zhang Q.B., Wang X. et al. // Eur. J. Inorg. Chem. 2011. V. 2011. No. 13. P. 2158.

22. Chatterjee D.K., Rufaihah A.J., Zhang Y. // *Biomaterials*. 2008. V. 29. No. 7. P. 937.
23. Johnson N.J.J., Sangeetha N.M., Boye J.C., van Veggel F.C.J.M. // *Nanoscale*. 2010. V. 2. No. 5. P. 77.
24. Park Y.I., Kim J.H., Lee K.T. et al. // *Adv. Mater.* 2009. V. 21. No. 44. P. 4467.
25. Jalil A.R., Zhang Y. // *Biomaterials*. 2008. V. 29. No. 30. P. 4122.
26. Xiong L.Q., Yang T.S., Yang Y. et al. // *Biomaterials*. 2010. V. 31. No. 27. P. 7078.
27. Митюшкин Е.О., Жарков Д.К., Леонтьев А.В. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2023. Т. 87. № 12. С. 1724; Mityushkin E.O., Zharkov D.K., Leontyev A.V. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2023. V. 87. No. 12. P. 1806.
28. Kaiser M., Wurth C., Kraft M. et al. // *Nano Res.* 2019. V. 12. P. 1871.
29. Ruhl P., Wang D., Garwe F.R. et al. // *J. Luminescence*. 2021. V. 232. Art. No. 117860.
30. Леонтьев А.В., Жарков Д.К., Шмелев А.Г. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2019. Т. 83. № 12. С. 1644; Leontyev A.V., Zharkov D.K., Shmelev A.G. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2019. V. 83. № 12. P. 1484.
31. Шмелев А.Г., Никифоров В.Г., Жарков Д.К. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2020. Т. 84. № 12. С. 1696; Shmelev A. G., Nikiforov V.G., Leontyev A.V., Zharkov D.K. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2020. V. 84. № 12. P. 1439.
32. Жарков Д.К., Шмелев А.Г., Леонтьев А.В. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2020. Т. 84. № 3. С. 317; Zharkov D.K., Shmelev A.G., Leontyev A.V. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2020. V. 84. № 3. P. 241.
33. Жарков Д.К., Шмелев А.Г., Леонтьев А.В. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2020. Т. 84. № 12. С. 1746; Zharkov D.K., Shmelev A.G., Leontyev A.V. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2020. V. 84. № 12. P. 1486.

NaYF₄: Yb, Er based nanosensors testing for temperature measurements in biological media

A. V. Leontyev¹, L. A. Nutrdinova^{1,2}, E. O. Mityushkin¹, A. G. Shmelev¹, D. K. Zharkov¹, V. V. Andrianov^{1,2}, L. N. Muranova^{1,2}, Kh. L. Gainutdinov^{1,2}, V. G. Nikiforov^{1*}

¹Zavoisky Physical-Technical Institute, Federal Research Center Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, 420029 Russia

²Kazan Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, 420008, Russia

*e-mail: vgnik@mail.ru

NaYF₄: Yb, Er particles were synthesized by hydrothermal method in the form of rods of 1.4 μm × 70 nm average size. Their surface was modified with L-cysteine, which provided hydrophilic properties. It was shown that the modified particles exhibit upconversion luminescence in the visible spectral range upon 980 nm laser excitation. Their temperature calibration in physiological solution was carried out. The possibility of remote temperature measurement in the biologically significant range of temperature (293–323 K) with an average sensitivity of 43 × 10⁻⁴ K⁻¹ and an accuracy of ±1.0 K was shown. A demonstration experiment was performed on the living nervous system of the grape snail *Helix lucorum*. The nanosensors have been successfully used for bioimaging and remote low-invasive temperature measurement with a spatial resolution of 10 μm.