

Экофотоника: оценка изменений внутренней температуры водных организмов с использованием ап-конверсионных люминесцентных частиц

Е.К.Волкова, И.Ю.Янина, А.П.Попов, А.В.Быков, А.Н.Гурков,
Е.В.Борвинская, М.А.Тимофеев, И.В.Меглинский

В рамках развития методов экофотоники рассмотрена возможность применения люминесцентной спектроскопии для мониторинга состояния водных организмов с целью изучения и прогнозирования последствий деятельности человека и изменения климатических условий на окружающую среду. Метод люминесцентной спектроскопии в сочетании с антистоксовыми люминофорами (ап-конверсионными частицами), используемыми в качестве оптических сенсоров, применен для неинвазивной оценки градиента температур внутренних тканей водных организмов. Показано, что температурная зависимость соотношения интенсивностей, которые наблюдаются в максимумах полос спектров люминесценции частиц $Y_2O_3:Yb,Er$, введенных в биологический объект, имеет линейный характер. Это открывает возможности для использования ап-конверсионных частиц для оценки метаболической активности различных тканей и органов водных организмов, в том числе в рамках экологического мониторинга.

Ключевые слова: экофотоника, ап-конверсионные люминесцентные частицы, люминесцентная спектроскопия, люминофоры, мониторинг окружающей среды, стрессовые воздействия, водные организмы.

1. Введение

В настоящее время всё более пристальное внимание уделяется воздействию глобальных климатических изменений на окружающую среду. Ожидается, что в ближайшем будущем это воздействие существенно возрастет [1,2]. Результаты компьютерного моделирования предсказывают повышение температуры на Земле к 2100 г. в среднем на 1.8–5 °С, что, в свою очередь, будет сопровождаться существенным увеличением колебаний температуры на местах [2].

Усиление негативного воздействия на окружающую среду способствует снижению стрессоустойчивости водных организмов в связи с активацией у них физиологических и биохимических защитных механизмов [3]. При

этом возникает высокий риск того, что виды с широким диапазоном толерантности, являющиеся более стрессоустойчивыми, могут вытеснить из привычной среды обитания менее стрессоустойчивые виды. Изменение видового состава водных экосистем приводит к нарушению экологической стабильности, что может иметь непредсказуемые последствия для водных ресурсов [4, 5].

При адаптации к изменениям условий среды обитания у большинства пресноводных организмов развиваются специфические защитные механизмы [6–8]. В экосистемах древних пресноводных озер доминируют виды, которые узко адаптированы к специфическим условиям среды обитания и особенно остро реагируют на изменения, связанные с глобальными потеплением и увеличением температуры окружающей среды. Данные виды особенно подвержены риску локального исчезновения или существенного снижения численности популяции. В этой связи для прогнозирования последствий климатических изменений и возможной дестабилизации пресноводных экосистем, а также для понимания принципов действия защитных механизмов, выработанных водными организмами, требуются новые методы диагностики [9].

В последние годы всё более широкое применение в различных областях находят методы фотоники, являющейся на сегодняшний день одной из наиболее интересных и стремительно развивающихся областей высоких технологий [10]. Это направление науки обеспечивает создание новейших способов неинвазивной диагностики за счет получения неизвестной ранее информации о структуре исследуемой среды на макро- и микроуровнях. Биофотоника открывает уникальные возможности для создания принципиально новых неинвазивных методов диагностики живых систем применительно к широкому классу биомедицинских исследований. Преимущества биофотоники и различные примеры использования оптических/лазерных методов для диагностики живых систем обобщены и представлены, например, в работах [11, 12].

Е.К.Волкова, И.Ю.Янина. Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; University of Oulu, Optoelectronics and Measurement Techniques Laboratory, P.O. Box 4500, 90014 University of Oulu, Oulu, Finland

А.П.Попов, А.В.Быков. Университет ИТМО, Россия, 197101 С.-Петербург, Кронверкский просп., 49; University of Oulu, Optoelectronics and Measurement Techniques Laboratory, P.O. Box 4500, 90014 University of Oulu, Oulu, Finland

А.Н.Гурков, М.А.Тимофеев. Иркутский государственный университет, Россия, 664003 Иркутск, ул. Карла Маркса, 1

Е.В.Борвинская. Институт биологии Карельского научного центра РАН, Россия, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; Иркутский государственный университет, Россия, 664003 Иркутск, ул. Карла Маркса, 1

И.В.Меглинский. Университет ИТМО, Россия, 197101 С.-Петербург, Кронверкский просп., 49; Иркутский государственный университет, Россия, 664003 Иркутск, ул. Карла Маркса, 1; University of Oulu, Optoelectronics and Measurement Techniques Laboratory, P.O. Box 4500, 90014 University of Oulu, Oulu, Finland; e-mail: igor.meglinski@oulu.fi

Поступила в редакцию 22 мая 2016 г., после доработки – 22 декабря 2016 г.

В настоящей работе на примере метода люминесцентной спектроскопии с использованием антистоксовых люминофоров в качестве оптических сенсоров продемонстрирована принципиальная возможность применения методов фотоники для экологического мониторинга.

2. Материалы и методы

Принципы и основы люминесцентной спектроскопии хорошо известны и подробно описаны различными авторами [13]. Для наблюдения сигнала фотолюминесценции от антистоксовых люминофоров, помещенных в биологическую ткань, нами создана экспериментальная установка, схема которой представлена на рис.1.

Люминесценция частиц возбуждалась полупроводниковым лазером ИТС 4005 (Thorlabs, США) на длине волны $\lambda_{ex} = 975$ нм при максимальной мощности накачки 200 мВт. Спектры люминесценции измерялись на расстоянии 25 мм от поверхности исследуемого биологического образца посредством волоконно-оптического датчика, оснащенного коллиматором и светофильтром FB600-10- \varnothing 1" Bandpass Filter (Thorlabs, США), отсекающим излучение на длине волны λ_{ex} . Сигналы фотолюминесценции регистрировались спектрометром CCS200 (Thorlabs, США). Время накопления детектируемого сигнала составляло 200 мс.

Исследования проводились на четырех взрослых особях декапод *Caridina multidentata* (креветка Аmano) *in vivo*. Водный раствор ап-конверсионных частиц (5 мкл, с концентрацией 0.7 мкг/мкл) непосредственно перед проведением эксперимента инъецировался внутрь брюшной области (в переднюю часть) декаподы, заполненную кровью (гемолимфой), циркуляцию которой по всему организму обеспечивает сердце. Для проведения экспериментов декаподу помещали в кювету с водой. Температура воды t в кювете варьировалась от 21 °С до 30 °С с шагом 1 °С при помощи элемента Пельтье, оснащенного датчиком регулирования температуры. Во всех экспериментах использовались антистоксовы люминофоры – ап-конверсионные частицы $Y_2O_3:Yb,Er$ PT660-UF (Phosphor Technology, Великобритания), – средний размер которых составляет 1.6 мкм (рис.2). Для предотвращения агрегации частиц водный раствор ап-конверсионных частиц непосредственно перед их инъекцией обрабатывался ультразвуком.

Принципиальная схема возбуждения фотолюминесценции предоставлена на рис.3,*a*. Ионы Yb^{3+} (ионы доно-

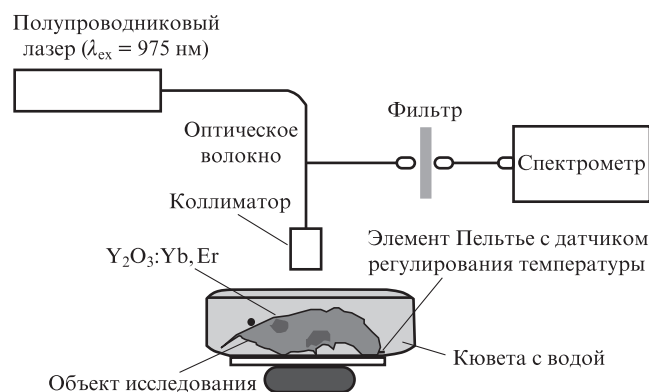


Рис.1. Схема экспериментальной установки.

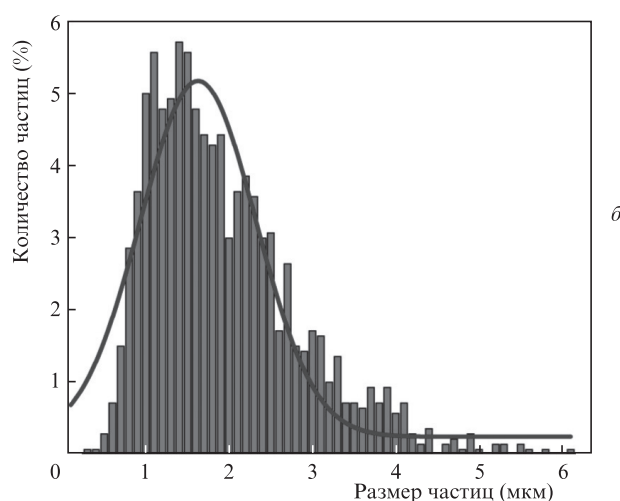
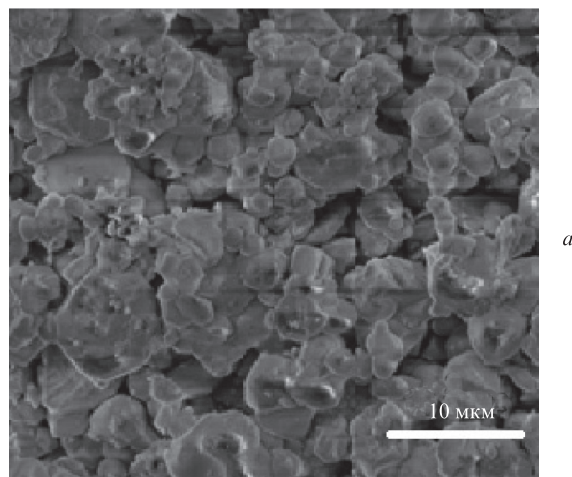


Рис.2. Микрофотография антистоксовых люминофоров $Y_2O_3:Yb,Er$, полученная методом сканирующей электронной микроскопии (*a*), и гистограмма распределения частиц по размерам по результатам обработки изображений 1500 частиц (*б*).

ра) обладают высоким эффективным сечением поглощения в инфракрасном диапазоне длин волн. Ион Er^{3+} (ион акцептора) плохо поглощает возбуждающее излучение, но обладает большим количеством электронных состояний, в которых ионы могут находиться довольно длительное время. В связи с тем, что энергетическое состояние иона акцептора характеризуется длительным временем жизни метастабильных состояний, ион донора может безызлучательно передать акцептору энергию сразу нескольких поглощенных фотонов. В результате происходит увеличение энергии донора, обуславливающее уменьшение длины волны фотолюминесценции [14, 15]. При облучении ион-донор поглощает фотон, в результате чего происходит переход в возбужденное состояние $^2F_{5/2}$ (рис.3,*a*). Далее электрон релаксирует в основное состояние $^2F_{7/2}$, безызлучательно передавая энергию ближайшему иону акцептора, который при этом переходит в состояние $^4I_{11/2}$.

Затем при передаче энергии от Yb^{3+} и Er^{3+} происходит переход акцептора на уровень $^4F_{7/2}$ с последующей безызлучательной релаксацией на уровни $^4S_{3/2}$ и $^2H_{11/2}$. И, наконец, при переходе в основное состояние возникает люминесценция в зеленой части спектра (рис.3,*a*). В случае перехода Er^{3+} из состояния $^4F_{9/2}$ в основное состояние возникает люминесценция в красной области спектра [14, 15].

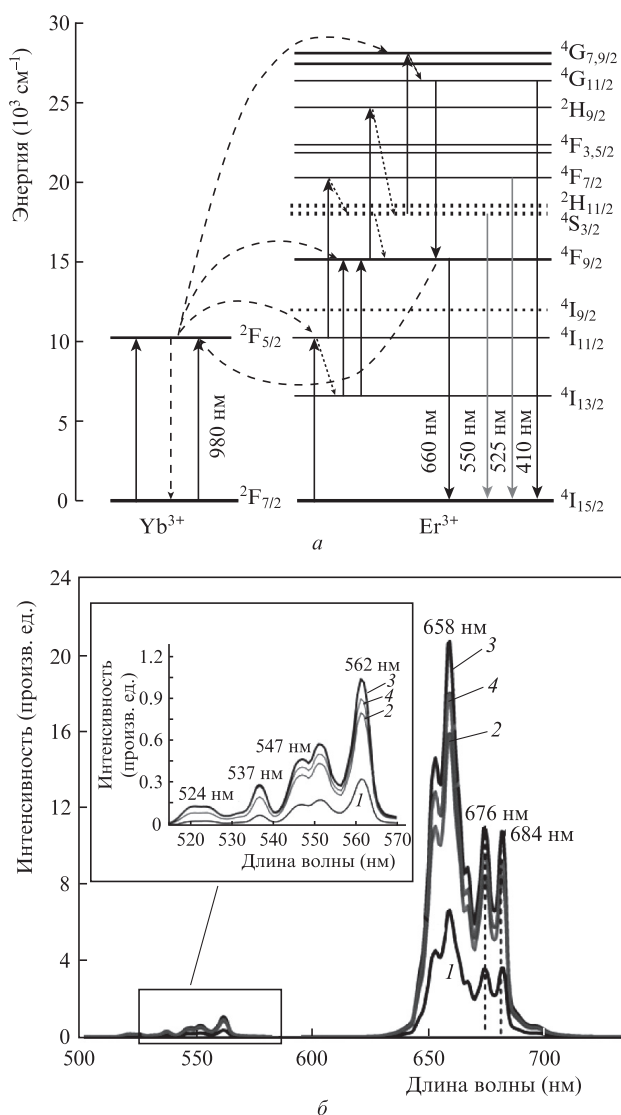


Рис.3. Схематическое изображение энергетических уровней в системе ионов Yb³⁺ и Er³⁺ (а) и спектры люминесценции ап-конверсионных частиц (λ_{ex} = 975 нм) для температур: t = 25 °C (1), 35 °C (2), 45 °C (3) и 55 °C (4) (б).

В красной области обычно выделяются не все полосы люминесценции, а только переход для длины волны с максимальной интенсивностью; тонкая структура зеленой области тоже дается иллюстративно.

В случае, если последующий акт передачи энергии или поглощение ионом акцептора из возбужденного состояния происходит за время, меньшее времени жизни состояния 4I_{11/2} иона Er³⁺, то акцептор переходит в состояние 4F_{7/2}, откуда безызлучательно релаксирует в состояние 4S_{3/2}, а затем переходит в основное состояние, испустив при этом квант света в зеленой части спектра. Если же время жизни метастабильного уровня 4I_{11/2} меньше времени, требуемого для вторичной передачи энергии, то ион Er³⁺ переходит в более долгоживущее состояние 4I_{13/2}. В этом случае последующая передача энергии от донора переведет акцептор в состояние 2F_{9/2}, откуда он релаксирует в основное состояние с излучением в красной области спектра.

Таким образом, излучение ап-конверсионных частиц (рис.3,б) в зеленой области спектра состоит из пяти полос люминесценции: 520 – 540 нм для уровня 2H_{11/2} (с макси-

мумами на длинах волн 523 и 537 нм) и 540 – 570 нм для уровня 4S_{3/2} (с максимумами на 547, 551 и 562 нм). В то же время излучение ап-конверсионных частиц в красной области спектра состоит из пяти полос люминесценции (с максимумами на 653, 658, 661, 676 и 684 нм).

Для количественного анализа изменения температуры в настоящей работе используются значения интенсивностей люминесценции ап-конверсионных частиц на длинах волн λ₁ = 676 нм и λ₂ = 684 нм. Выбор отношения интенсивностей на данных длинах волн обусловлен наибольшей чувствительностью к изменению температуры окружающей среды, поскольку в данном случае сохраняется тепловое равновесие населенности близко расположенных возбужденных уровней, которое описывается распределением Больцмана [16]:

$$I_1(\lambda_1)/I_2(\lambda_2) = C \exp(-\Delta E/kT), \quad (1)$$

где I₁(λ₁)/I₂(λ₂) – отношение пиков интенсивности спектра люминесценции на длинах волн λ₁ и λ₂; C = const – нормировочный множитель, определяемый степенью вырождения населенности энергетических уровней, скоростью спонтанного излучения и энергией излучаемого фотона; ΔE – величина энергетической щели между двумя возбужденными уровнями; k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура. Относительное изменение температуры определяется из соотношения характерных пиков интенсивностей спектра люминесценции ап-конверсионных частиц как

$$\ln[I_1(\lambda_1)/I_2(\lambda_2)] = \ln C - \Delta E/kT. \quad (2)$$

3. Результаты и обсуждение

На рис.4 представлены изображения декапод *S. multidentata* до и после инъекции ап-конверсионных частиц. Видно, что при облучении декапод лазерным излучением на длине волны 975 нм сигнал люминесценции ап-конверсионных частиц оказывается настолько сильным, что отчётливо виден невооруженным глазом и не требует, в отличие от методов лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии [17, 18], специальных условий проведения эксперимента.

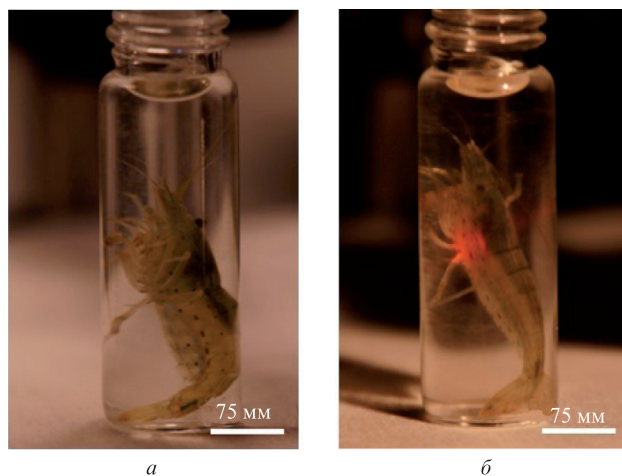


Рис.4. Изображение декапод *S. multidentata*, облучаемых лазером на длине волны 975 нм, до (а) и после (б) инъекции люминесцентных частиц. Цветное изображение см. на сайте нашего журнала (<http://www.quantum-electron.ru>).

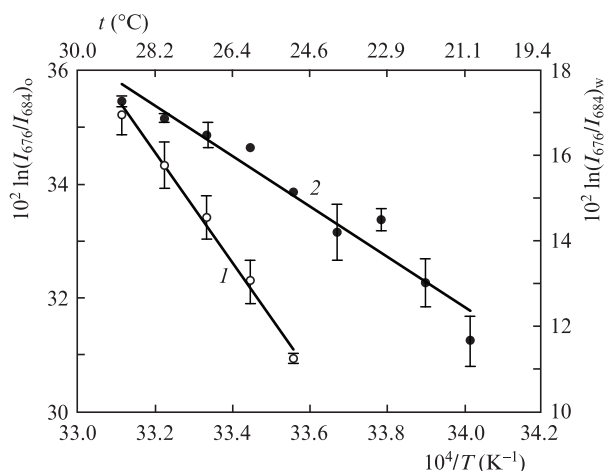


Рис.5. Температурная зависимость среднего значения отношения интенсивности флуоресценции ап-конверсионных частиц при изменении температуры окружающей среды в диапазоне 25 °С–30 °С с шагом 1 °С на длинах волн 676 и 684 нм для частиц, введенных в биологический объект (1, левая шкала), и частиц в водной среде (2, правая шкала). Точки – экспериментальные значения, прямые линии – аппроксимация.

Используя данные, представленные на рис.5, и уравнение (2), можно определить энергетическую щель между двумя возбужденными уровнями ΔE . В нашем случае $\Delta E = 2.6 \times 10^{-18}$ Дж (16.23 эВ) для частиц в водной среде и 4.99×10^{-18} Дж (31.19 эВ) для биообъекта. Наблюдаемое различие спектров люминесценции ап-конверсионных частиц в зависимости от температуры обусловлено составом исследуемых сред – деионизованной воды и гемолимфы декапод, содержащей широкий спектр ионов (в первую очередь, Na^+ и Cl^-), ряд белков (главным образом, дыхательный пигмент гемоцианин) и клеточные компоненты.

Таким образом, показано, что градиент температуры внутри водных организмов *in vivo* может быть определен посредством использования ап-конверсионных частиц, инъецированных в биологический объект. Поскольку температура является одним из определяющих параметров для пойкилотермных видов, измерение температуры внутренних тканей водных организмов позволяет в значительной степени характеризовать состояние биологического объекта в реальном времени. Разница между температурой внутренних тканей организма и температурой окружающей среды является показателем метаболической активности отдельных органов и двигательной активности организма в целом.

Следует отметить, что данный метод имеет ряд существенных преимуществ в сравнении с альтернативными оптическими методами оценки стрессовых состояний водных организмов [9, 17, 18]. В частности, использование ап-конверсионных частиц, как уже было отмечено, не требует наличия специальных условий проведения экспериментов в отличие от методов лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии [17, 18]. Специфичность положения линии лазерного зондирования в ИК области спектра и максимумов интенсивности спектров люминесценции детектируемого сигнала позволяет исключить наличие фонового сигнала биоткани в отличие от методов оптической спектроскопии [9], где фоновое излучение является паразитным [19]. Кроме того, несмотря на то, что люминофоры имеют сравнимую с квантовыми точками высокую фотохимическую стабильность, они существен-

но менее токсичны [20–22] и обладают стабильной узкополосной эмиссией при возбуждении в ближнем ИК диапазоне [23]. В сравнении с микросферами и микрооболочками, содержащими флуоресцентные красители [17, 18] или квантовые точки [23], люминофоры позволяют наблюдать сигнал в отсутствие автофлуоресценции биоткани, что значительно увеличивает отношение сигнал/шум на практике. В экспериментах, представленных в настоящей работе, отношение сигнал/шум составляло 13.4 ($\lambda = 561$ нм, 25 °С) и 287 ($\lambda = 658$ нм, 25 °С) для контрольного образца (водной суспензии частиц) и 11.6 ($\lambda = 561$ нм, 25 °С) и 260 ($\lambda = 658$ нм, 25 °С) для частиц, инъецированных в биологический объект. Время жизни люминесценции органических флуорофоров находится в наносекундном диапазоне, тогда как время жизни люминесценции использованных нами частиц порядка микросекунд [26]. Таким образом, разница во времени жизни люминесценции позволяет отсекал сигнал паразитной фоновой люминесценции не только в спектральном диапазоне, но и по времени, что еще более увеличивает отношение сигнал/шум.

4. Заключение

Таким образом, методами эксофотоники исследована возможность использования люминесцентной спектроскопии в сочетании с использованием ап-конверсионных частиц для мониторинга состояния водных организмов с целью изучения и прогнозирования последствий негативных воздействий деятельности человека и климатических изменений. Показана принципиальная возможность неинвазивного измерения температуры внутри декапод *in vivo* при помощи термочувствительных люминесцентных ап-конверсионных частиц $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}, \text{Er}$, инъецированных в биологический объект (*Caridina multidentata*). Отмечен линейный характер температурной зависимости логарифма отношения пиков интенсивностей спектра люминесценции ап-конверсионных частиц. Это позволяет использовать предложенный метод для количественной оценки метаболической и двигательной активности водных организмов и, в целом, открывает перспективы для развития методов люминесцентной спектроскопии в сочетании с ап-конверсионными частицами в экологических приложениях.

Дальнейшее развитие представленной в настоящей работе методики, по аналогии с работами [24, 25], предполагает тестирование люминесцентных ап-конверсионных частиц в качестве относительно недорогого сенсора для неинвазивной экспресс-оценки таких параметров, как содержание кислорода, углекислого газа, значения pH и наличия определенных бактерий и/или токсичных биохимических соединений. Предполагается, что новое направление – эксофотоника – объединит различные отрасли экологии, эксофизиологии, фотоники, биологии, физиологии и биохимии и будет способствовать развитию наиболее перспективных исследований для мониторинга состояния водных организмов, изменения которого могут быть связаны с негативными последствиями климатических изменений, усиленными деятельностью человека.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Академии Финляндии (проект №288164, поддержка Е.В. и И.Я., проекты №№260321, 290596, поддержка А.П. и А.Б.), а также при поддержке Правитель-

ства РФ (грант № 074-U01) и Российского научного фонда (№ 15-14-10008) (поддержка А.Г., Е.Б., М.Т. и И.М.).

1. Parmesan C. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **37**, 637 (2006).
2. Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L. *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Cambridge: Cambridge University Press, 2007).
3. Lannig G., Cherkasov A.S., Portner H.O., Bock C., Sokolova I.M. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **294**, R1338 (2008).
4. Scheffer M., Carpenter S., Foley J.A., Folke C., Walker B. *Nature*, **413**, 591 (2001).
5. Maler K.-G. *Eur. Econ. Rev.*, **44**, 645 (2000).
6. Hoffmann A., Hercus M. *Bioscience*, **50**, 217 (2000).
7. Teotonio H., Rose M. *Nature*, **408**, 463 (2000).
8. Badyaev A. *Proc. Roy. Soc. B*, **272**, 877 (2005).
9. Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A.N., Shakhmatova N.S., Bedulina D.S., Timofeyev M.A., Meglinski I. *J. Biophotonics*, **4** (9), 619 (2011).
10. Меглинский И.В., Кузьмин В.Л., Приезжев А.В. *Квантовая электроника*, **36**, 989 (2006).
11. Тучин В.В. *Оптическая биомедицинская диагностика* (М.: Физматлит, 2007).
12. Tuchin V.V. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* (Bellingham, WA: SPIE Optical Engineering Press, 2002).
13. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, 2006).
14. Auzel F. *Chem. Rev.*, **104** (1), 139 (2004).
15. Кузнецова Ю.О. *Изв. Самарского научного центра РАН*, **15** (4), 113 (2013).
16. Maestro L.M., Rodriguez E.M., Rodríguez F.S., Iglesias-de la Cruz M.C., Juarranz A., Naccache R., Vetrone F., Jaque D., Capobianco J.A., Sole J.G. *Nano Lett.*, **10**, 5109 (2010).
17. Sadovoy A., Teh C., Escobar M.V., Corzh V., Meglinski I. *Laser Phys. Lett.*, **6**, 542 (2012).
18. Sadovoy A., Teh C., in *Biophotonics for Medical Applications*. Ed. by I.Meglinski (Elsevier, 2014, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Ch. 11, pp. 321–330).
19. Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (М.: Физматлит, 2010).
20. Lin C., Berry M.T., Anderson R., Smith S., May P.S. *Chem. Mater.*, **21**, 3406 (2009).
21. Guller A.E., Generalova A.N., Petersen E.V., Nechaev A.V., Trusova I.A., Landyshev N.N., Nadort A., Grebenik E.A., Deyev S.M., Shekhter A.B., Zvyagin A.V. *Nano Res.*, **8** (5), 1546 (2015).
22. Popov A.P., Karmenyan A.V., Bykov A.V., Khaydukov E.V., Nechaev A.V., Bibikova O.A., Panchenko V.Y., Semchishen V.A., Seminogov V.N., Akhmanov A.S., Sokolov V.I., Kinnunen M.T., Tuchin V.V., Zvyagin A.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **8801**, 88010C (2013).
23. Chatterjee D.K., Yong Z. *Nanomed. J.*, **3**, 73 (2008).
24. Moczko E., Meglinski I., Bessant C., Piletsky S.A. *Anal. Chem.*, **81**, 2311 (2009).
25. Moczko E., Chauchi M., Turner C., Meglinski I., Piletsky S.A. *IEEE Trans. Bio-Med. Eng.*, **58**, 2154 (2011).
26. Жердева В.В., Савицкий А.П. *Успехи биологической химии*, **52**, 315 (2012).