



ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»  
Россия, Москва, 123557,  
Большой Тишинский пер.38  
Тел: +7 (495) 605 3507, 605 3610  
Факс: +7 (495) 518 9452  
info@lab-test.ru, www.lab-test.ru



Применение лазерного сканирующего микроскопа Alba (ISS, США)  
в исследованиях наноматериалов.

Аннотация статьи:

## HIGHLY LUMINESCENT, BIOCOMPATIBLE YTTERBIUM (III) COMPLEXES AS NEAR- INFRARED FLUOROPHORES FOR LIVING CELL IMAGING

*Ning, Y., Tang, J., Liu, Y.-W., Jing, J., Sun, Y., Zhang, J.-L.*

*Chem. sci., 2018, accepted manuscript.*

### **ВЫСОКОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ИТТЕРБИЯ (III) КАК ФЛУОРОФОРЫ ДЛЯ БЛИЖНЕЙ ИК-ОБЛАСТИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ**

В последние годы всё большее внимание исследователи уделяют методу цветовой визуализации изображений микрообъектов в ближней инфракрасной (БИК) области. Учёных привлекают возможность более глубокого проникновения в ткани, низкие значения шума и высокое разрешение. Благодаря этим характеристикам метод нашёл широкое применение в научных исследованиях и медицинском анализе. Основная задача, которая стоит перед исследователями, заключается в получении флуорофоров, испускающих в ближней инфракрасной области и отличающихся биосовместимостью, высокой яркостью и фотостабильностью. В настоящее время для визуализации изображений в ближней ИК-области *in vivo* используются самые различные материалы, в том числе конъюгаты полимеров, поверхностно-модифицированные углеродные нанотрубки, квантовые точки, металлоорганические каркасы, апконверсионные наночастицы. Все эти материалы продемонстрировали преимущество визуализации изображений в ближней ИК-области по сравнению с традиционными оптическими методами визуализации в видимой области, но их применение ограничено из-за их цитотоксичности.

Альтернативой перечисленным выше материалам являются органические флуорофоры, имеющие структуру «донор-акцептор-донор». Подобная структура сдвигает пик поглощения и эмиссии флуорофора в ближнюю ИК-область, это было показано на примере таких органических соединений как индоцианин зелёный, соединения на основе бензо-2,1,3-тиадиазола и флавиновые полиметиновые флуорофоры. Ещё одним перспективным направлением могут быть комплексные соединения на основе некоторых лантанидов ( $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$  и  $\text{Yb}^{3+}$ ). Последние исследования показали, что комплексы на основе  $\text{Yb}^{3+}$  отличаются яркой флуоресценцией, долгим временем жизни флуоресценции и большими значениями коэффициента экстинкции. Все эти особенности делают комплексы на основе  $\text{Yb}^{3+}$  перспективными для их использования в качестве флуорофоров. Интересным и перспективным направлением было бы создание комплексов, включающих как органические флуорофоры, так и  $\text{Yb}^{3+}$ .

Такую задачу поставила себе группа китайских исследователей под руководством профессора Джунлонга Чанга из Пекинского университета. Результаты их работы опубликованы в журнале *Chemical Science*. В своей статье учёные сообщили об успешном синтезе широкого круга соединений на основе  $\text{Yb}^{3+}$  и различных  $\beta$ -фторированных производных порфирина, содержащих фенильные группы в «мезо» и  $\beta$ -периферических положениях порфиринового макроцикла. Исследователями были получены пять различных комплексов Yb-1-5. Кроме того, учёные синтезировали четыре комплекса Yb-2-5c, которые не содержали фтор. Сопоставление результатов исследования Yb-1-5 и Yb-2-5c позволили оценить влияние фтора на фотофизические свойства флуорофоров.

Проведённые учёными спектроскопические исследования комплексов в воде и органическом растворителе (ДМСО) показали, что они являются самыми яркими флуорофорами для ближней ИК-области из полученных на сегодняшний день. Квантовый выход фторированных комплексов Yb-1-5 составил 5—13% в воде и 9—23% в ДМСО, при этом время затухания флуоресценции составило 56—173 мкс в воде и 84—249 мкс в ДМСО. Значения квантового выхода и времени жизни флуоресценции гидрированных

аналогов были значительно меньше. Кроме того, фторированные комплексы Yb-1-5 отличаются большей флоростабильностью. При этом четыре из пяти комплексов иттербия продемонстрировали низкую токсичность по отношению к клеткам HeLa.

Особый интерес представляют результаты мечения клеток HeLa исследуемыми иттербиевыми комплексами. Для визуализации меченых клеток исследователи использовали **флуоресцентный конфокальный микроскоп ALBA v5**. Сочетание блока сбора данных по четырём независимым каналам с минимальным мёртвым временем и высокой скоростью счёта фотонов ISS FastFLIM, импульсных наносекундных модулей с лазерными диодами и программного обеспечения ISS VistaVision позволяет проводить измерения как в стационарном режиме, так и режиме разрешения во времени.

Измерения в стационарном режиме используются для изучения взаимодействия клеток с флуорофором и его внутриклеточного распределения. Исследователями было показано, что из четырёх исследуемых комплексов Yb-1-4 только один не поглощался клетками. Для других трёх комплексов было показано поглощение клетками с последующей локализацией преимущественно в лизосомах. Комплексы Yb-2-4с показали значительно меньшую флуоресценцию по сравнению с фторированными комплексами. На основании этих результатов, по мнению исследователей, можно предположить, что фторирование флуорофоров значительно увеличивает флуоресценцию в ближней инфракрасной области в живых клетках.

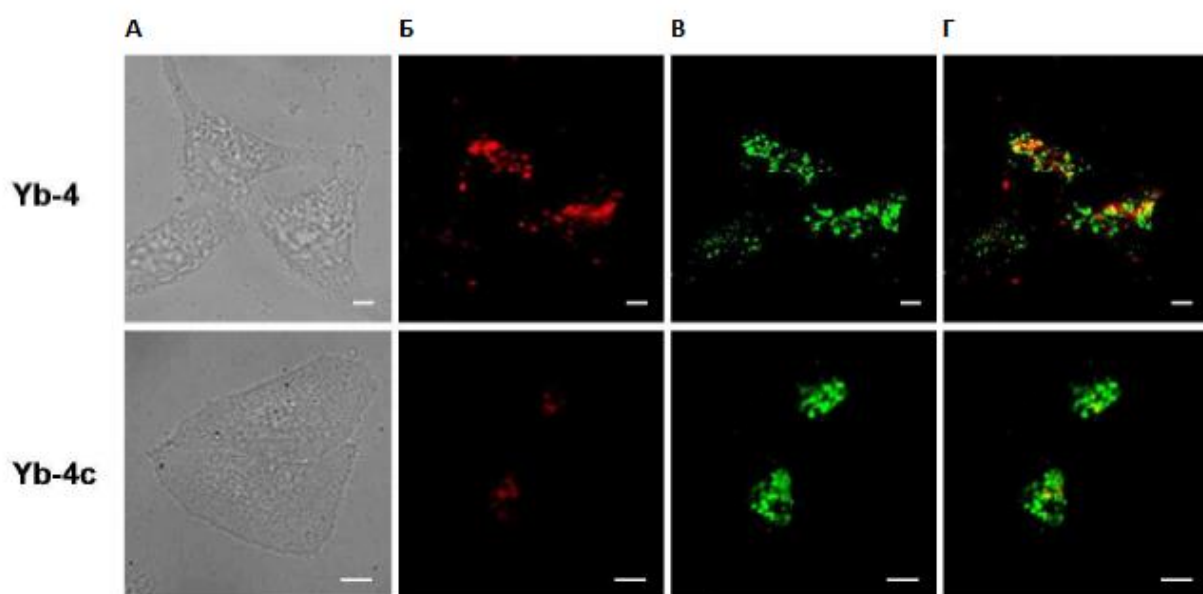


Рис. 1. Конфокальные изображения клеток HeLa, меченных комплексами Yb-4 и Yb-4с. Клетки инкубировали в течение 12 часов с 10 мкМ Yb-4 Yb-4с и затем инкубировали в течение 30 мин с 75 нМ флуоресцентного зонда LysoTracker Green. (А) Изображения, полученные методом светлого поля; (Б) изображения флуоресценции иттербиевого комплекса Yb-4 ( $\lambda_{EX} = 620$  нм;  $\lambda_{EM} = 935$  нм); (В) изображения флуоресценции LysoTracker Green ( $\lambda_{EX} = 470$  нм;  $\lambda_{EM} = 530$  нм); (Г) сочетание изображений (Б) и (В).

Время жизни флуоресценции не зависит от концентрации флуорофора, интенсивности возбуждения и оптического гашения, но зависит от молекулярного окружения флуорофора, поэтому визуализация времени жизни флуоресценции может быть использована для наблюдения за внутриклеточными процессами, которые не могут быть зафиксированы с помощью стационарных измерений. Как было сказано выше, комплексы на основе Yb<sup>3+</sup> отличаются высокой интенсивностью флуоресценции и долгим временем жизни, что делает их перспективным материалом для использования в микроскопии на основе визуализации времени жизни флуоресценции в ближней инфракрасной области (NIR FLIM) в микросекундном масштабе.

Исследование, проведенное группой Джунлонга Чанга, показало, что время жизни флуоресценции комплекса Yb-4 в биологических клетках составляет 100 — 200 мкс, что значительно превышает время жизни флуоресценции Yb-4с, равное 20 — 40 мкс. Кроме того, учёные установили, что время жизни флуоресценции Yb-4 зависит от внутриклеточной локализации вещества, возможно, из-за различных условий микросреды, таких как вязкость и липофильность. Исследователи решили проверить, как внутриклеточное микроокружение влияет на затухание флуоресценции комплекса. Для этого они проводили измерение времени жизни флуоресценции вещества в различных растворителях (метанол, этанол, изопропанол, н-бутанол и глицерол), отличающихся значениями вязкости и полярности. Результаты измерений подтвердили увеличение времени затухания флуоресценции с увеличением вязкости

растворителя, при этом удаление воздуха из среды также приводило к продлению флуоресценции. В водном растворе в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА) исследователи наблюдали увеличение интенсивности и времени жизни флуоресценции  $Yb^{3+}$ . Этот эффект, по мнению исследователей, также может быть объяснён влиянием свойств растворителя, изменяющихся при добавлении БСА. Таким образом, сочетание специальных флуорофоров для БИК-области и флуоресцентной микроскопии может быть успешно использовано для изучения внутриклеточной среды.

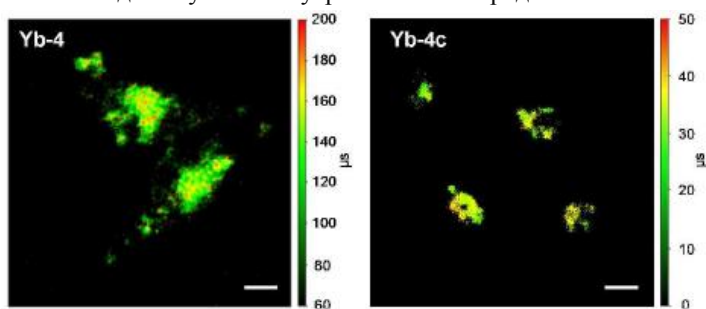


Рис. 2. Изображения времени жизни флуоресценции клеток *HeLa*, меченных комплексами *Yb-4* и *Yb-4c*. Клетки инкубировали с 10 мкМ *Yb-4* *Yb-4c* ( $\lambda_{EX} = 408$  нм;  $\lambda_{EM} = 935$  нм).

Учёные уверены, что полученные ими результаты задают новые направление исследований применения лантанидных комплексов в микроскопии на основе визуализации флуоресценции в ближней инфракрасной области.

Подготовил Алексей Шнитко  
ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»  
тел.: +7 495 605 35 07  
факс: +7 495 605 39 44  
a.shnitko@lab-test.ru  
www.lab-test.ru