



GRZEGORZ BĘKARSKI, ALEKSANDRA PILCH-WRÓBEL,
ARTUR BEDNARKIEWICZ (INSTYTUT NISKICH TEMPERATUR I BADAŃ STRUKTURALNYCH PAN)

LUMINESCENCYJNE NANOMATERIAŁY KOLOIDALNE DOMIESZKOWANE JONAMI LANTANOWCÓW – ZASTOSOWANIA W KONSTRUKCJI BIOCIUJNIKÓW

Mechanizm försterowskiego transferu energii (FRET) polega na nieradiacyjnym przekazaniu energii pomiędzy dwoma molekułami: donorem (D) oraz akceptorem (A). Zarówno w medycznych testach diagnostycznych, jak i badaniach naukowych jako D i A stosowane są barwniki organiczne, których szerokie pasma absorpcji i emisji, czy podatność na fotowysychanie często utrudniają ilościową interpretację pomiarów. Jako alternatywę do barwników organicznych opracowano m.in. związki koordynacyjne lantanowców, a obecnie badane są zaawansowane nieorganiczne nanomateriały luminescencyjne. Wśród tych ostatnich na szczególną uwagę zasługują nanokryształy domieszkowane jonami lantanowców (UCNPs), które charakteryzują się wąskimi pasmami emisji, możliwością konwersji energii z podczerwieni na światło widzialne oraz wysoką odpornością na fotowysychanie. Te właściwości pozwalają na eliminację sygnału tła i zwiększenie czułości biociuJNIKÓW. Pomimo licznych zalet, UCNPs wymagają dalszej optymalizacji pod względem doboru domieszek jonów lantanowców oraz właściwości fotofizycznych, które zapewniają efektywny transfer energii do akceptora. W niniejszej pracy przeglądowej przedstawiono podstawy mechanizmu FRET, ewolucję materiałów dla FRET, charakterystykę nanokryształów domieszkowanych lantanowcami oraz przykłady ich zastosowań w systemach FRET.

TEORIA I MECHANIZM FRET

Försterowski rezonansowy transfer energii (FRET) stanowi udane połączenie teorii fotoluminescencji, eksperymentu i praktycznych zastosowań, szczególnie w (bio)detekcji^[1]. Zgodnie z teorią Förstera^[2] zjawisko to polega na bezpromienistym przekazaniu energii pomiędzy molekułami donora (D) a molekułami akceptora (A) na drodze rezonansowego oddziaływania dipol–dipol. Molekuły donora oraz akceptora można traktować jako oscylujące dipole elektryczne. Donor

wzbudzony promieniowaniem elektromagnetycznym drga z częstotliwością odpowiadającą jego przejściom emisyjnym. Jeżeli akceptor wykazuje absorpcję w tym samym zakresie częstotliwości, dochodzi do efektywnego, rezonansowego sprzężenia dipoli i – w konsekwencji – do FRET. Donor, po absorpcji promieniowania i przejściu w stan wzbudzony, transferuje nieradiacyjnie energię do akceptora, który następnie może emitować promieniowanie (rys. 1). Proces ten zachodzi po spełnieniu dwóch podstawowych warunków: nakładania się pasm absorpcji akceptora i emisji donora oraz niewielkiej odległości między nimi (zazwyczaj 1-10 nm). Istotny wpływ na przebieg zjawiska ma również orientacja momentów dipolowych molekuł oraz środowisko chemiczne, w którym te

1 Che D., Cao X., Chen C., Yan H. "A point-of-care aptasensor based on the upconversion nanoparticles/MoS₂ FRET system for the detection of Pseudomonas aeruginosa infection" Microchim. Acta 2024, 191(1), 61 (2024)

Nie Y., Li J., Liu Y., Zhang Q., Ma Q. "A Visual FRET Immunofluorescent Biosensor for Ratiometric Parathyroid Hormone (1-84) Antigen Point-of-Care Detection" J. Fluoresc., 30(2), 329-334 (2020)

2 Förster T. "Energiewanderung und Fluoreszenz" Naturwissenschaften, 33(6), 166-175 (1946)

się znajdują^[3]. Warto również wyraźnie odróżnić FRET od zjawiska reabsorpcji, w którym akceptor pochłaniałby fotony emitowane przez donor bez udziału sprzężenia dipolowego między cząsteczkami^[4]. FRET bywa określany mianem liniiki spektroskopowej^{[4][5]}, gdyż jego wydajność (η) maleje monotonicznie: odwrotnie proporcjonalnie do szóstej potęgi dystansu między D i A:

$$\eta = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6}, \quad (1)$$

gdzie R_0 to dystans Förstera, dla którego wydajność FRET wynosi 50%, a r_{DA} to faktyczny dystans pomiędzy D i A.

Dystans Förstera można obliczyć na podstawie następującego równania:

$$R_0 = \left(\frac{9(\ln 10)\phi_D\kappa^2J}{128\pi^5n^4N_A} \right)^{\frac{1}{6}}, \quad (2)$$

gdzie ϕ_D oznacza wydajność kwantową emisji donora, κ^2 – współczynnik orientacji przestrzennej dipoli (przyjmujący wartości od 0 do 4, zwykle jednak $\frac{2}{3}$), J – całkę nakładania się emisji D i absorpcji A [$\text{nm}^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$], n – współczynnik załamania światła, a N_A – stałą Avogadry ($6,022 \times 10^{23} \text{mol}^{-1}$).

3 Leavesley S.J., Rich T.C. "Overcoming limitations of FRET measurements" Cytometry, Part A, 89(4), 325 (2016)

4 Medintz I.L., Hildebrandt N., "FRET-Förster resonance energy transfer: from theory to applications" Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2014)

5 Algar W.R., Hildebrandt N., Vogel S.S., Medintz I.L. "FRET as a biomolecular research tool - understanding its potential while avoiding pitfalls" Nat. Methods, 16(9), 815-829 (2019)

Całkę nakładania (J) wyznacza się z kolei jako całkę ze znormalizowanego widma emisji donora $f_D(\lambda)$ oraz współczynnika ekstynkcji akceptora ($\epsilon_A(\lambda)$):

$$J = \int f_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda, \quad (3)$$

gdzie $f_D(\lambda) = \frac{F_{D_\lambda}(\lambda)}{\int F_{D_\lambda}(\lambda)d\lambda}$, z kolei $F_{D_\lambda}(\lambda)$ to zarejestrowane widmo emisji donora.

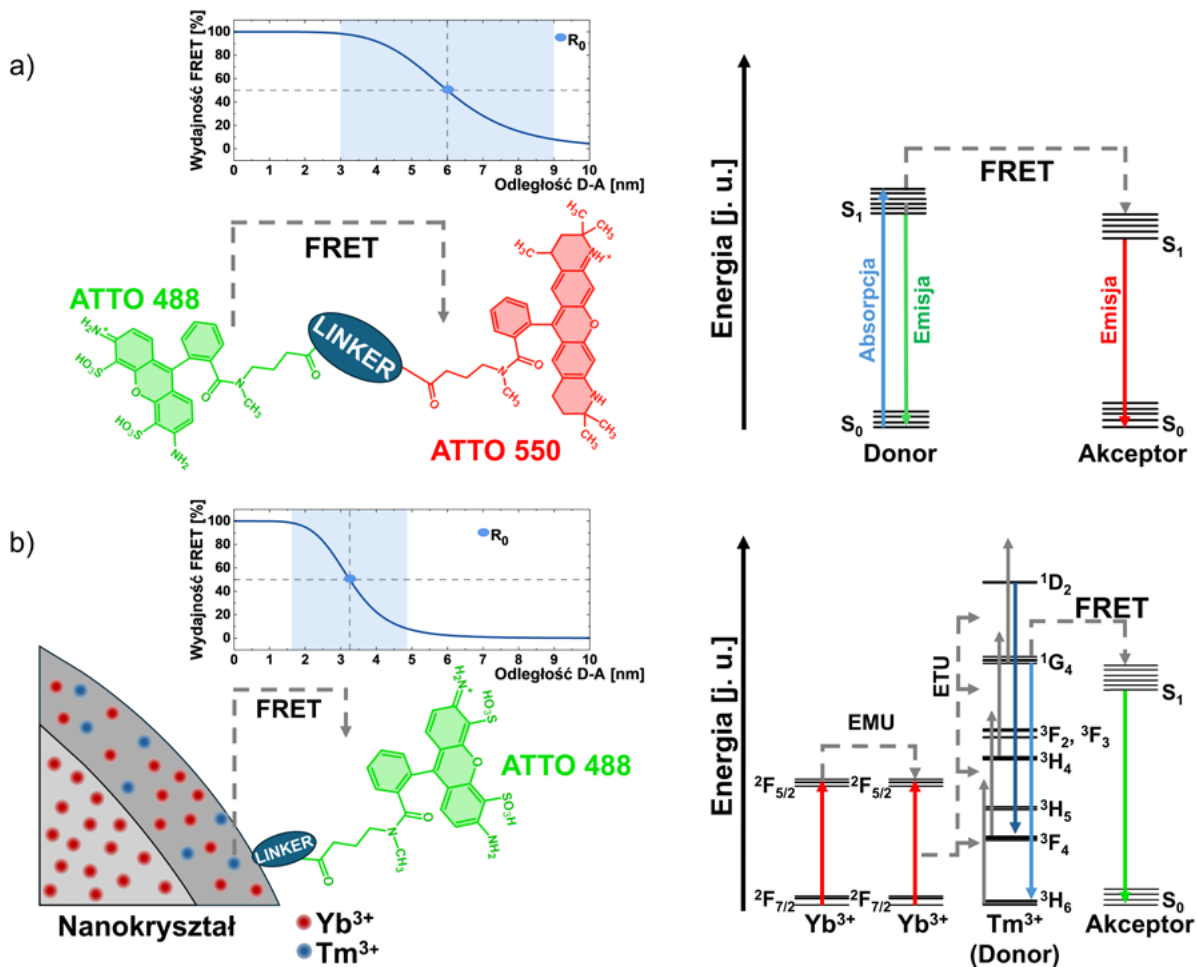
Wydajność FRET określa się eksperymentalnie na podstawie pomiarów widm fotoluminescencji oraz kinetyk luminescencji donora – bez akceptora oraz po jego wprowadzeniu. Zarówno intensywność emisji, jak i czas zaniku luminescencji donora w obecności akceptora ulegają zredukowaniu. Zatem wydajność bezpromienistego, rezonansowego transferu energii można obliczyć jako:

$$\eta = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (4)$$

$$\eta = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (5)$$

gdzie I_{DA} oraz τ_{DA} to odpowiednio intensywność emisji oraz czas życia poziomu wzbudzonego donora w obecności akceptora, zaś I_D oraz τ_D – intensywność emisji i czas zaniku luminescencji donora bez akceptora.

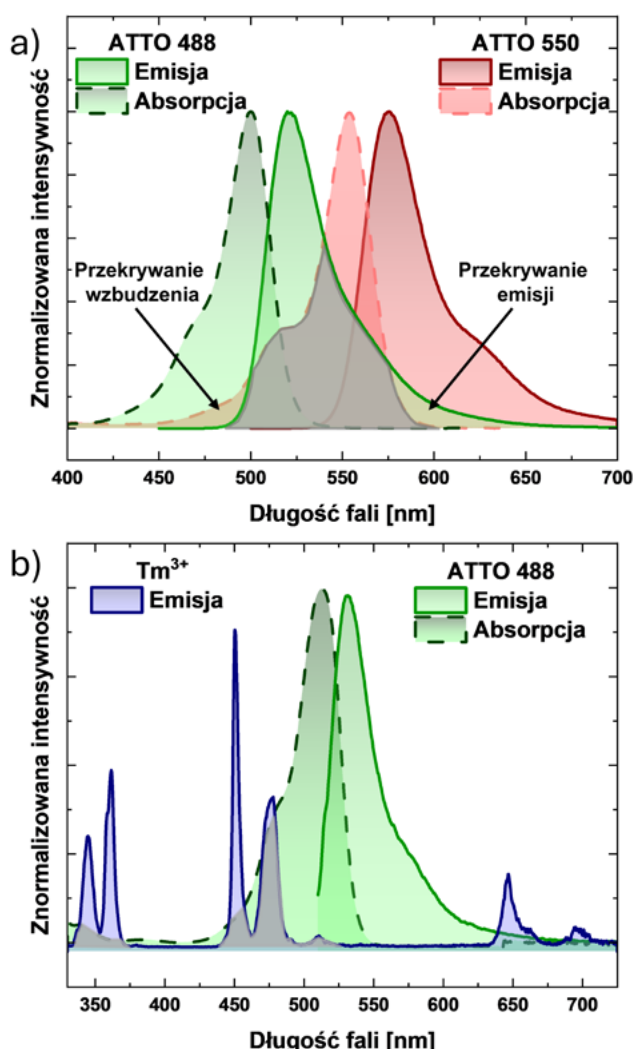
Zjawisko FRET ma szerokie zastosowania, szczególnie



Rys. 1. a) Schemat molekularnego FRET między barwnikami organicznymi ATTO 488 (donor) oraz ATTO 550 (akceptor) połączonymi linkerem. Niebieski obszar na przedstawionych zależnościach wydajności FRET od odległości D – A zawarty jest w granicach $0,5R_0 - 1,5R_0$ i wskazuje efektywny przedział odległości, na których możliwa jest detekcja FRET. b) FRET z zastosowaniem nanokryształów konwertujących energię w górę jako donora oraz barwnika ATTO 488 jako akceptora wraz z odpowiadającymi im schematami energetycznymi: EMU (migracji energii, ang. Energy Migration Upconversion) i ETU (transferu energii w górę, ang. Energy Transfer Upconversion).

w biologii, diagnostyce i konstrukcji czujników fluorescencyjnych. Umożliwia ono analizę zmian konformacyjnych białek^[6], hybrydyzacji DNA^[7], a także – dzięki zmianom czasu zaniku luminescencji lub intensywności emisji donora – czuły pomiar obecności lub koncentracji analitów^[8]. Dzięki specyficznym oddziaływaniom antygen-przeciwciało FRET wykorzystywany jest również w testach immunologicznych i bioczułnikach. Ponadto FRET stosowany jest w śledzeniu procesów zachodzących w komórkach w czasie rzeczywistym oraz w obrazowaniu mikroskopowym z wysoką rozdzielczością^[9].

- 6 Rainey K.H., Patterson G.H. "Photoswitching FRET to monitor protein-protein interactions" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 116(3), 864-873 (2019)
- Higuera-Rodriguez R.A., De Pascali M.C., Aziz M., Sattler M., Rant U., Kaiser W. "Kinetic FRET Assay to Measure Binding-Induced Conformational Changes of Nucleic Acids" *ACS Sens.*, 8(12), 4597-4606 (2023)
- 7 Zhou R., Xu C., Dong J., Wang G. "Labeling-free fluorescent detection of DNA hybridization through FRET from pyrene excimer to DNA intercalator SYBR green I" *Biosens. Bioelectron.*, 65, 103-107 (2015)
- 8 Strianese M., De Martino F., Pavone V., Lombardi A., Canters G.W., Pellecchia C. "A FRET-based biosensor for NO detection" *J. Inorg. Biochem.*, 104(6), 619-624 (2010)
- Chu-Mong K., Thammakhet C., Thavarungkul P., Kanatharana P., Buranachai C. "A FRET based aptasensor coupled with non-enzymatic signal amplification for mercury (II) ion detection" *Talanta*, 155, 305-313 (2016)
- 9 Grant D.M., Zhang W., McGhee E.J., Bunney T.D., Talbot C.B., Kumar S., i in. "Multiplexed FRET to image multiple signaling events in live cells" *Biophys. J.*, 95(10), L69-L71 (2008)
- Cho S., Jang J., Song C., Lee H., Ganesan P., Yoon T.Y., i in. "Simple super-resolution live-cell imaging based on diffusion-assisted Förster resonance energy transfer" *Sci. Rep.*, 3(1), 1208 (2013)



Rys. 2. Nakładanie się widm: a) absorpcji oraz emisji barwników organicznych ATTO 488 oraz ATTO 550, b) emisji jonów Tm³⁺ oraz absorpcji i emisji barwnika ATTO 488. Obszar zaznaczony na szaro odpowiada nakładaniu się pasm emisji donora z pasmem absorpcji akceptora. Stosowanie barwników organicznych wymaga wzbudzenia o wysokiej energii (np. UV), co może prowadzić do trudnego do skorygowania bezpośredniego wzbudzenia akceptora. UCNPs są zazwyczaj wzbudzone promieniowaniem o $\lambda_{\text{wzbudzenia}} = 980$ nm, co pozwala w znacznym stopniu wyeliminować problemy wynikające z nakładania się widm wzbudzenia D i A.

UKŁADY DONOR-AKCEPTOR

W klasycznym, molekularnym FRET jako układy donor-akceptor wykorzystuje się barwniki organiczne (rys. 1a). Jednakże ich widma (absorpcji oraz emisji) cechują się dużymi szerokościami połówkowymi rzędu 50-100 nm, co najczęściej prowadzi do nakładania się widm wzbudzenia lub emisji (rys. 2a). W pierwszym przypadku, gdy widmo wzbudzenia akceptora nakłada się na widmo wzbudzenia donora, możliwe jest bezpośrednie wzbudzenie molekuł akceptora. Z kolei nakładanie się widm emisji jest szczególnie niepożądane przy rejestracji sygnału emisji akceptora. Ponadto barwniki organiczne przy wysokiej intensywności pobudzenia lub podczas długiej ekspozycji na promieniowanie wzbudzające wykazują również nieodwracalne fotowysyblanie, a wysoka energia tego promieniowania (często z zakresu UV) może dodatkowo wzbudzać inne biomolekuły obecne w próbkach, skutkując zwiększonym sygnałem tła i niższym efektywnym sygnałem do detekcji^[10].

Alternatywę dla klasycznych donorów energii w obserwacji zjawiska FRET mogą stanowić materiały zawierające jony lantanowców (Ln³⁺) – od prostych związków koordynacyjnych po mikro- i nanokryształy. Ich właściwości spektroskopowe wynikają z przejść wewnątrzkonfiguracyjnych $f \rightarrow f$, które zgodnie z regułą Laporte'a są zabronione, co prowadzi do długich czasów zaniku luminescencji^[11]. Dodatkowo, ponieważ podpowłoka 4f jest ekranowana przez elektrony z podpowłok 5s i 5p, matryca zawierająca jony Ln³⁺ wywiera jedynie minimalny wpływ na położenie ich pasm absorpcji i emisji, które cechują się niewielką szerokością połówkową. Bogactwo poziomów energetycznych umożliwia ponadto dopasowanie różnych akceptorów FRET do potrzeb eksperymentu.

Nanokryształy domieszkowane jonami lantanowców (UCNPs), najczęściej o matrycach NaYF₄, Y₂O₃ lub Gd₂O₃ i domieszkach Yb³⁺/Er³⁺, Yb³⁺/Tm³⁺ czy Yb³⁺/Ho³⁺ [12], stanowią szczególnie istotną grupę materiałów dla układów FRET. Ich działanie opiera się na konwersji energii w górę (UC – ang. *upconversion*): jony uczulacza absorbują promieniowanie podczerwone (np. 980 nm dla Yb³⁺), po czym poprzez transfer energii w górę wzbudzają kolejne poziomy energetyczne jonów aktywatora, prowadząc do emisji antystokesowskiej o wyższej energii niż energia wzbudzenia. Wąskie pasma emisji, długie czasy zaniku oraz niski poziom tła ograniczają nakładanie się widm i zmniejszają ryzyko bezpośredniego wzbudzenia akceptora (rys. 2b), zwiększając czułość detekcji FRET z wykorzystaniem nanokryształów konwertujących energię w górę (UC-FRET). UCNPs nie można jednak traktować jako pojedynczych molekuł donora. Typowy nanokryształ o średnicy 25 nm zawiera setki lub tysiące jonów optycznie aktywnych, z których jedynie te znajdujące się w pobliżu powierzchni mogą efektywnie przekazywać energię w procesie FRET. Jony położone głębiej, mimo że emitują, są zbyt oddalone od akceptora, a krótkie dystanse Förstera (często krótsze niż 4 nm) dodatkowo ograniczają efektywność transferu. W konsekwencji jednorodne domieszkowanie UCNPs ogranicza czułość FRET z powodu wysokiego

10 Lerner E., Cordes T., Ingargiola A., Alhadid Y., Chung S.X., Michael X., i in. "Toward dynamic structural biology: Two decades of single-molecule Förster resonance energy transfer" *Science*, 359(6373), eaan1133 (2018)

11 Büchel, J. C. G. "Lanthanide luminescence: from a mystery to rationalization, understanding, and applications" w: *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths* (Vol. 50, pp. 141-176), Elsevier (2016)

12 Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. "Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry, and applications in Theranostics" *Chem. Rev.* 114(10), 5161-5214 (2014)

Tabela 1. Podsumowanie cech charakterystycznych donorów dla FRET

Donor	Zalety	Wady / wyzwania
Barwniki organiczne	łatwo reagują z innymi molekułami, dostępne komercyjnie i dobrze zbadane, wysokie wydajności kwantowe i relatywnie duże $R_0 \sim 4 - 8$ nm	Fotowysyblanie, małe przesunięcia stokesowskie, szerokie pasma absorpcji i emisji, wymagana wysoka energia wzbudzenia (często promieniowanie UV lub niebieskie), przekrywanie z absorpcją i fluorescencją chromoforów endogennych
Białka fluorescencyjne	Wysoka wydajność kwantową, niektóre wykazują absorpcję dwufotonową, nadają się do badań komórkowych np. do badań interakcji między białkami, syntezuje się je poprzez genetyczne kodowanie i ekspresję w komórkach	Szerokie pasma absorpcji oraz emisji, czasochłonny proces formowania, podatność na fotowysyblanie, wrażliwość na pH, stężenie O_2 , temperaturę oraz inne wpływy środowiska chemicznego, duża masa ($\geq 25 - 30$ kDa), tendencja do tworzenia agregatów
Związki koordynacyjne Ln^{3+}	Długie czasy zaniku luminescencji, wąskie oraz dobrze oddzielone pasma emisji	Wymagają optymalizacji transferu energii z ligandów na jony lantanowców, wzbudzenie z zakresu UV, wykazują słabą biokompatybilność
Kropki kwantowe (QDs)	Emisja zależna od rozmiaru i struktury chemicznej, symetryczne oraz stosunkowo wąskie pasma emisji, wysokie wydajności kwantowe oraz współczynniki ekstynkcji, relatywnie duże $R_0 \sim 6$ nm, odporność na fotowysyblanie	Fotomigotanie pod wpływem ciągłego wzbudzenia (eliminowane przez pasywację powierzchni), konieczność funkcjonalizacji powierzchni, wysoka toksyczność niektórych QDs ze względu na obecność metali ciężkich np. Cd, Pb w ich składzie
UCNPs	Długie czasy zaniku luminescencji, wąskie oraz dobrze rozdzielone pasma emisji, odporność na fotowysyblanie, brak fotomigotania; wysoka wydajność emisji anty-stokesowskiej w porównaniu do innych procesów nieliniowych np. absorpcji dwufotonowej (2PA) i generacji drugiej/ trzeciej harmonicznej (SHG/THG)	Konieczność optymalizacji architektury chemicznej i funkcjonalizacji powierzchni, niewielka wydajność kwantowa emisji, krótkie R_0 (często krótsze niż 4 nm)

sygnału tła^[13]. Jednym ze sposobów poprawy czułości FRET jest zastosowanie struktur typu rdzeń-płaszcz, w których jony donora zlokalizowane są wyłącznie w zewnętrznej warstwie, co zmniejsza średni dystans D-A^[14]. Równie istotna jest funkcjonalizacja powierzchni umożliwiającą selektywne kotwiczenie akceptora. Te zagadnienia stanowią kluczowy kierunek dalszej optymalizacji systemów UC-FRET.

UC-FRET – NOWE MATERIAŁY DLA EFEKTYWNEGO BEZPROMIENISTEGO, REZONANSOWEGO TRANSFERU ENERGII

Obecnie rozwijane są systemy hybrydowe, w których UCNPs pełnią rolę donorów, a akceptorami są barwniki organiczne lub kropki kwantowe. Jedną z pierwszych demonstracji UC-FRET przedstawił Bednarkiewicz ze współpracownikami^[15], wykazując transfer energii z jonów Yb^{3+}/Er^{3+} domieszkowanych w matrycy $NaYF_4$ do kropek kwantowych CdSe. Praca ta otworzyła drogę do zastosowania systemów UC-FRET w (bio)detekcji, obrazowaniu i sensorach molekularnych. Z kolei Wang i inni^[16] wskazali istnienie korzystnej roli pasywującego płaszcza w strukturach rdzeń-płaszcz. Dowiedli oni, że w nanomateriałach typu rdzeń-płaszcz maksymalna skuteczność FRET nie wynika ani z najsilniejszej luminescencji, ani z najwyższej wydajności transferu energii. Kluczowe znaczenie ma optymalna grubość powłoki, która równoważy oba procesy i pozwala uzyskać najlepsze efekty

aplikacyjne. Wynik ten podkreślił wagę precyzyjnej inżynierii nanostruktur, w których nie tylko kompozycja chemiczna, ale również geometria ma kluczowe znaczenie dla funkcjonalności. Kolejne badania przedstawione przez Muhr i innych^[17] wykazały, że mniejsze UCNPs sprzyjają bardziej wydajnemu FRET dzięki większemu stosunkowi powierzchni do objętości (niestety kosztem jasności i wydajności emisji). Siefe i inni^[18] opracowali strukturę typu rdzeń-płaszcz-płaszcz łączącą wysoką intensywność emisji z efektywnym transferem energii. Dzięki dodaniu drugiego płaszcza udało się ograniczyć defekty powierzchniowe i jednocześnie utrzymać jony donora w bliskiej odległości od akceptorów, co pozwoliło osiągnąć wysokowydajny FRET bez kompromisów w intensywności emisji. Podobne podejście przedstawili Marin i współpracownicy^[19], badając zjawisko FRET pomiędzy nanokryształami $LiYF_4:Yb^{3+},Tm^{3+}$ a kropkami kwantowymi $CuInS_2$. W pracy tej skupiono się na wpływie architektury donora, modyfikując ją poprzez zmniejszenie stosunku powierzchni do objętości oraz poprzez umieszczenie jonów donora w zewnętrznej powłoce w strukturze rdzeń-płaszcz. Otrzymane wyniki pokazały, że wydajność FRET można znacząco zwiększyć, manipulując zarówno rozmiarem UCNPs, jak i rozmieszczeniem jonów aktywnych w objętości nanokryształu. Pilch-Wróbel i inni^[20] szczegółowo przeanalizowali rolę dystrybucji jonów Yb^{3+} i Er^{3+} w rdzeniu oraz płaszczu. Badania wykazały, że precyzyjna kontrola migracji energii i minimalizacja jej magazynowania w stanach pośrednich prowadzą do istotnego zwiększenia wydajności transferu energii. Oprócz aspektów

13 Pini F, Francés-Soriano L, Andriago V, Natile M.M., Hildebrandt N. "Optimizing Upconversion Nanoparticles for FRET Biosensing" ACS nano, 17(5), 4971-4984 (2023)

14 Kotulska A.M., Pilch-Wróbel A., Lahtinen S., Soukka T., Bednarkiewicz A. "Upconversion FRET quantitation: the role of donor photoexcitation mode and compositional architecture on the decay and intensity based responses" Light Sci. Appl., 11(1), 256 (2022)

Pilch-Wróbel A., Kotulska A.M., Lahtinen S., Soukka T., Bednarkiewicz A. "Engineering the Compositional Architecture of Core-Shell Upconverting Lanthanide-Doped Nanoparticles for Optimal Luminescent Donor in Resonance Energy Transfer: The Effects of Energy Migration and Storage" Small, 18(18), 2200464 (2022)

Bękowski G., Prorok K., Štětina F., Misiak M., Gorris H.H., Bednarkiewicz A. "Multicolor Upconversion Förster Resonant Energy Transfer Using Optimized Yb@YbTm Core@Shell Nanoparticles" ACS nano, 19(48), 41110-41120 (2025)

15 Bednarkiewicz A., Nyk M., Samoc M., Strek W. "Up-conversion FRET from $Er^{3+}/Yb^{3+}:NaYF_4$ nanophosphor to CdSe quantum dots" J. Phys. Chem. C, 114(41), 17535-17541 (2010)

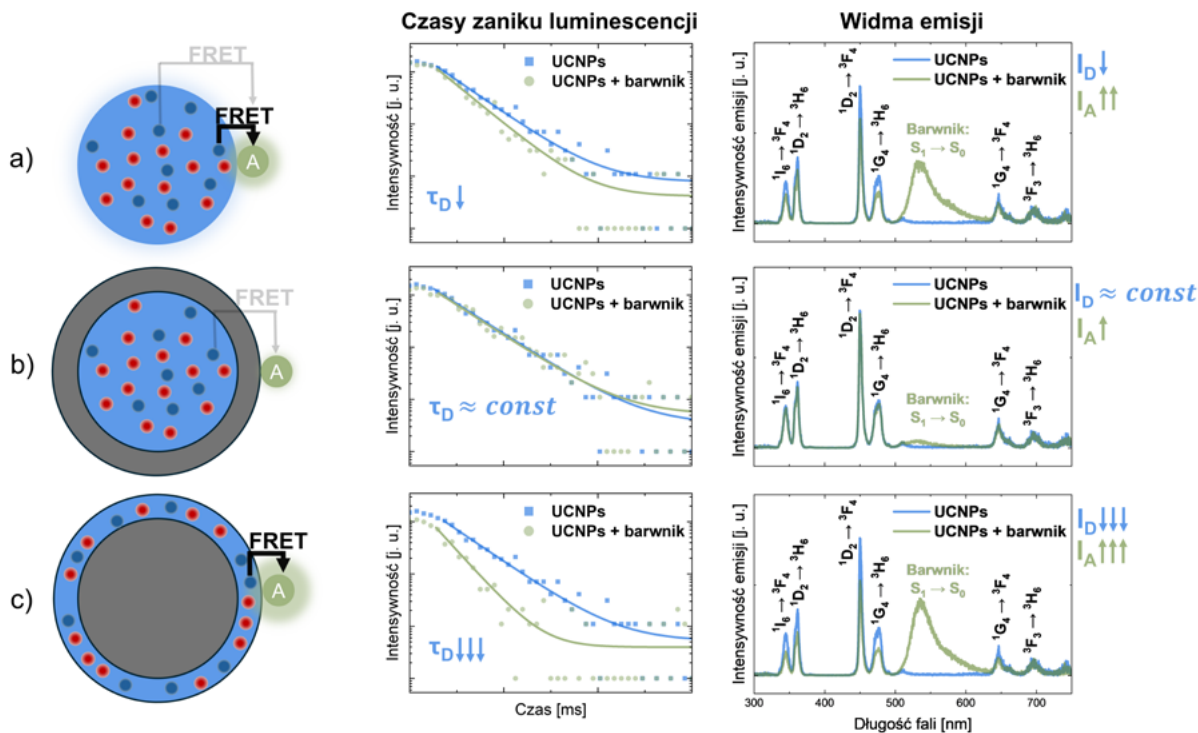
16 Wang Y., Liu X., Liu X., Dohnalová K., Gregorkiewicz T., Kong X., i in. "Critical shell thickness of core/shell upconversion luminescence nanoplatform for FRET application" J. Phys. Chem. Lett., 2(17), 2083-2088 (2011)

17 Muhr V., Würth C., Kraft M., Buchner M., Baumann A.J., Resch-Genger U., i in. "Particle-Size-Dependent Förster Resonance Energy Transfer from Upconversion Nanoparticles to Organic Dyes" Anal. Chem., 89(9), 4868-4874 (2017)

18 Siefe C., Mehlenbacher R.D., Peng C.S., Zhang Y., Fischer S., Lay A., i in. "Sub-20 nm Core-Shell-Shell Nanoparticles for Bright Upconversion and Enhanced Förster Resonant Energy Transfer" J. Am. Chem. Soc., 141(42), 16997-17005 (2019)

19 Marin R., Labrador-Paéz L., Skripka A., Haro-González P., Benayas A., Canton P., i in. "Upconverting Nanoparticle to Quantum Dot Förster Resonance Energy Transfer: Increasing the Efficiency through Donor Design" ACS Photonics, 5(6), 2261-2270 (2018)

20 Pilch-Wróbel A., Kotulska A.M., Lahtinen S., Soukka T., Bednarkiewicz A. "Engineering the Compositional Architecture of Core-Shell Upconverting Lanthanide-Doped Nanoparticles for Optimal Luminescent Donor in Resonance Energy Transfer: The Effects of Energy Migration and Storage" Small, 18(18), 2200464 (2022)



Rys. 3. Wpływ architektury nanokryształów domieszkowanych jonami Yb^{3+} (czerwone kropki) i Tm^{3+} (granatowe kropki) na bezpromienisty, rezonansowy transfer energii do molekuł akceptora (barwnika) przyłączonego bezpośrednio do powierzchni nanokryształu: a) aktywny rdzeń, b) aktywny rdzeń – pasywny płaszcz, c) pasywny rdzeń – aktywny płaszcz. Odległość jonów donora (Tm^{3+}) od akceptora determinuje wydajność FRET, którą można zmierzyć na podstawie kinetyki luminescencji, tj. czasów życia poziomu $^1\text{G}_4$ jonu Tm^{3+} bez i w obecności akceptora. W przypadku nanokryształów typu aktywny rdzeń (a) w transferze energii biorą udział jedynie te jony, które znajdują się przy powierzchni. Pozostałe jony aktywatora, znajdujące się głębiej, są bierne względem FRET, choć w sposób ciągły i niepodatny na obecność akceptora wykazują fotoluminescencję. Mogą one również wzbudzać molekuły barwnika na drodze promienistej. Mimo iż nałożenie pasywnego płaszcza (b) zwiększa intensywność emisji nanokryształów ze względu na zmniejszone wygaszanie powierzchniowe, to zwiększa ono również odległość D-A, znacząco zmniejszając wydajność FRET, a tym samym redukuje czułość detekcji. Aktywny płaszcz (c) zapewnia bliski kontakt jonów donora z akceptorem, skutkując niską emisją tła oraz wysoką wydajnością FRET^[25].

strukturalnych, istotne są również warunki wzbudzenia oraz sposób interpretacji sygnału. W pracy poświęconej ilościowej analizie UC-FRET autorzy przeanalizowali, jak tryb wzbudzenia donora (ciągłe vs. impulsowe) i kompozycja nanokryształów wpływają na odpowiedź spektralną i czasową układu^[21]. Wykazano, że ocena efektywności FRET może prowadzić do błędnych wniosków, jeśli nie uwzględni się tych parametrów – zwłaszcza w układach, w których jony pełniące funkcję donorów charakteryzują się długimi czasami życia stanu wzbudzonego.

BIOCZUJNIKI RATIOMETRYCZNE

Jednym z kluczowych zastosowań UC-FRET są bioczuJNIKI oparte na detekcji ratiometrycznej tzn. bazujące na proporcji intensywności dwóch pasm emisji. Klasyczna analiza FRET oparta na wydajności obliczanej ze zmian intensywności emisji donora może prowadzić do przeszacowań, m.in. wskutek zjawiska filtra wewnętrznego, które osłabia sygnał donora przez reabsorpcję promieniowania w próbce. Zarówno FRET, jak i reabsorpcja mogą objawiać się w widmach luminescencji w podobny sposób – poprzez zanik emisji D i pojawienie się emisji A. Podstawowym sposobem pozwalającym odróżnić te dwa konkurencyjne procesy są pomiary czasów życia poziomów wzbudzonych donora i akceptora. Jednakże w UCNPs podczas transferu energii do akceptora czasy zaniku są obciążone ciągłą repopulacją stanów wzbudzonych jonów donora poprzez ciągły transfer energii w górę z jonów uczulacza^[22]. Dodatkowo wymagania tech-

niczne i czasochłonność pomiarów kinetyki luminescencji sprawiają, że są one mało praktyczne w szybkiej diagnostyce typu POC (ang. point-of-care).

Dlatego w zastosowaniach analitycznych powszechnie stosuje się podejście ratiometryczne, w którym analizuje się stosunek sygnału akceptora (I_A) do sygnału donora w obecności akceptora (I_{DA}). Metoda ta redukuje wpływ fluktuacji intensywności, a jednocześnie łączy informacje o zmianach sygnałów obu komponentów, zapewniając stabilniejszą i bardziej precyzyjną zależność dawka-odpowiedź. Wykorzystując UCNPs jako donory, Francés-Soriano ze współpracownikami^[23] osiągnęli limit detekcji wirusowego RNA rzędu 30 pmol/L. Natomiast Näreoja i inni^[24] przedstawili zastosowanie UC-FRET do pomiaru pH w próbkach biologicznych. Dzięki wykorzystaniu stosunku I_A/I_{DA} , BękarSKI i inni^[25] byli w stanie dokonać detekcji barwników organicznych na poziomie pojedynczych nmol/L. Ponadto przedstawili oni możliwość wykorzystania UCNPs do analizy multipleksowej, czyli takiej, w której wykrywanych jest kilka analitów. Połączenie analizy ratiometrycznej z właściwościami UCNPs umożliwia konstrukcję bardzo czułych i wiarygodnych bioczuJNIKÓW o dużym potencjale diagnostycznym^[26].

Architecture of Core-Shell Upconverting Lanthanide-Doped Nanoparticles for Optimal Luminescent Donor in Resonance Energy Transfer: The Effects of Energy Migration and Storage" *Small*, 18(18), 2200464 (2022)

23 Francés-Soriano L., Estebanez N., Pérez-Prieto J., Hildebrandt N. "DNA-Coated Upconversion Nanoparticles for Sensitive Nucleic Acid FRET Biosensing" *Adv. Funct. Mater.*, 32(37), 2201541 (2022)

24 Näreoja T., Deguchi T., Christ S., Peltomaa R., Prabhakar N., Fazeli E., in. "Ratiometric Sensing and Imaging of Intracellular pH Using Polyethyleneimine-Coated Photon Upconversion Nanoprobes" *Anal. Chem.*, 89(3), 1501-1508 (2017)

25 BękarSKI G., Prorok K., Štětina F., Misiak M., Gorris H.H., Bednarkiewicz A. "Multicolor Upconversion Förster Resonant Energy Transfer Using Optimized $\text{Yb}@\text{YbTm}$ Core/Shell Nanoparticles" *ACS nano*, 19(48), 41110-41120 (2025)

26 Su R., Francés-Soriano L., Diriwari P.I., Munir M., Haye L., Sørensen T.J., in. "FRET Materials for Biosensing and Bioimaging" *Chem. Rev.*, 125(19), 9429-9551 (2025)

21 Kotulska A.M., Pilch-Wrobel A., Lahtinen S., Soukka T., Bednarkiewicz A. "Upconversion FRET quantitation: the role of donor photoexcitation mode and compositional architecture on the decay and intensity based responses" *Light Sci. Appl.*, 11(1), 256 (2022)

22 Pilch-Wrobel A., Kotulska A.M., Lahtinen S., Soukka T., Bednarkiewicz A. "Engineering the Compositional

Rozwój czujników bazujących na efektach UC-FRET przebiega w wielu uzupełniających się kierunkach – od precyzyjnej inżynierii architektury nanokryształów (rdzeń-płaszcz, rdzeń-płaszcz-płaszcz), poprzez projektowanie ich składu i kontrolę rozmieszczenia jonów optycznie aktywnych, aż po optymalizację warunków wzbudzenia i metod analizy sygnału. Uwzględnienie takich czynników jak migracja energii, tryb wzbudzenia donora czy fizykochemiczne właściwości akceptora okazuje się kluczowe dla uzyskania systemów UC-FRET o wysokiej wydajności i czułości. Zastosowanie podejść hybrydowych, np. łączenia UCNPs z barwnikami organicznymi lub kropkami kwantowymi, otwiera drogę do konstrukcji biocujników o bardzo niskich limitach detekcji. Jest to szczególnie korzystne w szybkiej diagnostyce POC, w której natychmiastowy, czuły i nieskomplikowany technicznie pomiar obecności biomarkerów może sygnalizować stan chorobowy już na wczesnym etapie. W szerszej perspektywie systemy UC-FRET dają nadzieję na uniwersalne narzędzie diagnostyczne i naukowe w bioobrazowaniu, fototerapii, nanodiagnostyce i fotonice molekularnej. Ich rozwój wymaga jednak dogłębnego zrozumienia procesów fotofizycznych oraz dalszej integracji podejść chemicznych, materiałowych i biologicznych, a także prac nad standaryzacją metod pomiarowych.

AUTORZY



Mgr inż. **Grzegorz Bękowski** (ORCID: 0009-0005-3729-4692) uzyskał tytuł magistra inżyniera na Politechnice Wrocławskiej (2025). Jego zainteresowania naukowe obejmują spektroskopię jonów lantanowców, FRET oraz inżynierię zaawansowanych materiałów funkcjonalnych. Obecnie jest doktorantem w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN.



Dr **Aleksandra Pilch-Wróbel** (ORCID: 0000-0003-1991-4008) uzyskała tytuł doktora (2020) w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN. Jej badania koncentrują się na syntezie, analizie i zastosowaniu nanocząstek luminescencyjnych domieszkowanych lantanowcami, zwłaszcza w kontekście zjawiska FRET, czujników pH oraz spektroskopii optycznej.



Prof. dr hab. inż. **Artur Bednarkiewicz** (ORCID: 0000-0003-4113-0365) uzyskał stopień doktora (1998), stopień doktora habilitowanego (2013) oraz tytuł profesora (2015) w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN. Jego działalność naukowa koncentruje się na zjawiskach konwersji energii w górę, emisji lawinowej w nano- i mikromateriałach domieszkowanych jonami lantanowców, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowań biomedycznych.

Autorzy pragną podziękować za finansowanie projektu w ramach grantu NCN Weave UNISONO nr 2022/04/Y/ST5/00081, dzięki któremu niniejsza praca mogła powstać.

W SKRÓCIE

Jednym z obszarów współczesnych badań naukowych jest coraz skuteczniejsze wykrywanie śladowych ilości różnych substancji organicznych. Pomagają w tym biocujniki, czyli układy, które reagują na obecność konkretnej cząsteczki i zamieniają tę informację na sygnał możliwy do zmierzenia. Jednym z ważnych zjawisk wykorzystywanych w takich czujnikach jest FRET. Ten skrót pochodzi od angielskiej nazwy Förster Resonance Energy Transfer, co po polsku oznacza försterowski rezonansowy transfer energii. Polega on na bezpromienistym przekazywaniu energii między dwiema cząsteczkami znajdującymi się bardzo blisko siebie. Jedna z nich, donor, pochłania energię promieniowania elektromagnetycznego zastosowanego do jej wzbudzenia, a następnie może przekazać ją – bez emisji fotonu – drugiej cząsteczce, czyli akceptorowi. Dzieje się to tylko na bardzo małych odległościach (typowo 1 – 10 nm), dzięki czemu można sprawdzić, czy określone cząsteczki się połączyły albo znalazły się wystarczająco blisko siebie. Zjawisko to jest bardzo przydatne w biologii i medycynie – zmiana sygnału świetlnego pochodzącego od próbki może świadczyć o tym, że zaszedł w niej jakiś ważny proces: połączenie fragmentów DNA, pojawienie się konkretnego białka albo obecność substancji związanej z chorobą. Zamiast bezpośrednio obserwować pojedyncze cząsteczki, śledzi się więc zmianę emitowanego promieniowania przez przyłączone do nich molekuly fluorescencyjne.

Przez wiele lat w tego typu badaniach stosowano głównie barwniki organiczne. Są one dobrze poznane, ale mają także swoje ograniczenia: ich absorpcja bądź emisja mogą się nakładać, przez co trudniej je od siebie odróżnić, a dodatkowo z czasem ich emisja może słabnąć, co pogarsza dokładność pomiarów. Dlatego w ostatniej dekadzie dużą uwagę zwrócono na nanokryształy domieszkowane jonami lantanowców. Są to nanomateriały o typowych rozmiarach około 25 nm, wykazujące szczególne właściwości fotoluminescencyjne. Potrafią pochłaniać promieniowanie podczerwone, a następnie emitować światło widzialne. To daje im dużą przewagę nad tradycyjnymi barwnikami organicznymi, ponieważ zmniejsza zakłócenia i pozwala dokładniej wykrywać właściwy sygnał – takie nanokryształy emitują bowiem światło w wąskich zakresach widma, działają stabilniej i są bardziej odporne na fotodegradację, dlatego mogą być lepszymi donorami energii niż zwykłe barwniki.

Trzeba jednak pamiętać, że nie każdy nanokryształ działa tak samo dobrze. Znaczenie ma jego struktura, rozmiar i rozmieszczenie jonów w jego wnętrzu. Największą rolę w przekazywaniu energii odgrywają te jony, które znajdują się blisko powierzchni, bo tylko one są wystarczająco blisko akceptora. Te położone głębiej mogą powodować emisję, ale nie uczestniczą bezpośrednio w samym procesie FRET. Właśnie dlatego naukowcy projektują bardziej złożone struktury – na przykład nanomateriały o architekturze rdzenia pokrytego płaszczem. Odpowiednio zaprojektowany nanokryształ pozwala wzmocnić sygnał i chronić materiał przed wygaszeniem przez otoczenie chemiczne. Ponadto szczególnie cenne są biocujniki ratiometryczne (od ang. ratio – stosunek, proporcja), które działają na zasadzie porównywania intensywności emisji dwóch pasm spektralnych – akceptora oraz donora w obecności akceptora. Taki pomiar jest bardziej wiarygodny niż obserwowanie tylko jednego sygnału, bo pozwala ograniczyć wpływ zakłóceń i przypadkowych błędów.

Nowoczesne biocujniki mogą pomóc w szybszym i dokładniejszym wykrywaniu ważnych substancji w organizmie. Ma to ogromne znaczenie zwłaszcza w diagnostyce medycznej, gdzie często liczy się czas i możliwość wykonania prostego testu blisko pacjenta.