

Спектроскопия наночастиц на основе поликристаллов $Gd_{14}V_6Ge_2O_{34}$ и стекол $La_2O_3-V_2O_5$, активированных ионами Nd^{3+} , для диагностики рака

А.В.Попов, А.В.Рябова, М.Г.Комова, В.А.Крутько, О.Б.Петрова, В.Б.Лощенов, Ю.К.Воронько

Наночастицы поликристаллов боратов гадолиния и боратных стекол, активированных ионами Nd^{3+} , получены из макрообразцов соответствующих составов методом механического измельчения и ультразвукового диспергирования в воде. Проведены спектроскопические исследования этих наночастиц в ближнем ИК диапазоне с точки зрения возможности их применения в качестве люминесцентных биосенсоров и радиофармпрепаратов для диагностики рака радиочувствительными методами. Экспериментально обнаружено двукратное увеличение времени жизни метастабильного состояния $^4F_{3/2}$ ионов Nd^{3+} при переходе от субмикронных частиц поликристалла к наночастицам. Исследования распределения наночастиц по органам и тканям лабораторных животных, проведенные с использованием в качестве источника возбуждения люминесценции лазера с длиной волны 810 нм и многоканального волоконного спектрометра для регистрации флуоресценции в диапазоне 0.8–1.2 мкм, показали достаточную чувствительность методики для надежного определения концентрации наночастиц в биотканях и динамики ее изменения.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия *in vivo*, наночастицы поликристаллов и стекол, редкоземельные ионы.

1. Введение

Методы диагностики рака, основанные на использовании радиофармпрепаратов, позволяют проводить диагностику солидных опухолей внутренних органов, включая метастазы размером 5–7 мм [1], тогда как флуоресцентный анализ имеет существенные преимущества при плоскостных эпителиальных формах рака и делает возможным обнаружение опухолей сверхмалых размеров (до 1 мм), локализуемых в поверхностных слоях. Флуоресцентная диагностика может быть реализована с помощью флуоресцентных видеокамер, флуоресцентных приставок к эндоскопическим системам и операционным микроскопам, а также волоконных спектрометров при использовании для возбуждения флуоресценции эндогенных и/или экзогенных флуорофоров лазерных источников света. Комбинирование этих подходов принципиально возможно в случае применения наночастиц гадолиниевых (Gd^{3+}) боратов кристаллов и стекол, активированных редкоземельными ионами (РЗИ).

Редкоземельные ионы Nd^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} имеют абсорбционные и люминесцентные электронные переходы в ближней ИК области спектра 0.75–1.1 мкм, совпадающей с областью прозрачности биологических тканей. Это позво-

ляет возбуждать и регистрировать люминесценцию РЗИ в наночастицах, находящихся в биологических тканях, в спектральной области, где собственная автофлуоресценция невысока, а глубина проникновения лазерного излучения достигает 8–10 мм. Наличие узких интенсивных линий люминесценции РЗИ также существенно увеличивает отношение сигнал/шум при регистрации сигнала люминесценции. Здесь под «шумом» мы понимаем, в том числе, собственную флуоресценцию хромофоров биотканей.

Соединения, в состав которых входят ионы Gd^{3+} , находят широкое применение в клинической практике диагностики раковых заболеваний. В методах магнитно-резонансной томографии (МРТ, основана на спектроскопии ЯМР) для визуализации биологических тканей с высоким разрешением в качестве контрастирующего вещества используются низкомолекулярные ($Gd-DTPA$ и др.) и высокомолекулярные (альбумин- $(Gd-DTPA)_n$, декстран- $(Gd-DTPA)_n$) металлопорфирины на основе Gd , вводимые в кровеносную систему [2]. В этом отношении весьма целесообразным выглядит использование для МРТ-диагностики наночастиц неорганических соединений на основе Gd .

В настоящей статье представлены результаты начального этапа исследований по разработке наноматериалов на основе неорганических сложноанионных соединений гадолиния, активированных люминесцирующими в ближней ИК области спектра РЗ ионами, для многофункциональной диагностики рака. Исследовались спектроскопические свойства субмикронных и наноразмерных частиц (от нескольких единиц до нескольких сотен нанометров) боратных поликристаллов $Gd_{14}(VO_3)_6(GeO_4)_2O_8$ и стекол $La_2O_3-V_2O_5$, активированных редкоземельными ионами Nd^{3+} , в твердом состоянии, в водных растворах и в органах и тканях экспериментальных животных. В литературе активно обсуждается проблема анализа и интерпретации спектроскопических свойств РЗИ, помещенных в диэлектрическую среду, при переходе от макро- к наноразмер-

А.В.Попов, А.В.Рябова, В.Б.Лощенов, Ю.К.Воронько. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: avpopov@lst.gpi.ru, nastya.ryabova@gmail.com, loschenov@mail.ru, voronko@lst.gpi.ru

М.Г.Комова, В.А.Крутько. Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 31; e-mail: Kroutko@igic.ras.ru

О.Б.Петрова. Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Россия, 125047 Москва, Миусская пл., 9; e-mail: petrova@proriv.ru

Поступила в редакцию 30 сентября 2010 г., после доработки – 28 октября 2010 г.

ным частицам [3–9]. Согласно результатам этих работ времена жизни метастабильных состояний РЗИ в наночастицах при определенных условиях могут увеличиваться в два раза и более по сравнению с объемными кристаллами [6, 7]. Теоретическое обоснование этого эффекта с приведением формулы, характеризующей увеличение времени жизни с уменьшением размера наночастицы, было опубликовано в [9], хотя экспериментальное подтверждение, показывающее границы применимости этой зависимости, не является достаточным.

2. Объекты исследования и эксперимент

Поликристаллы боратогерманатов гадолиния $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:Nd^{3+}$ с концентрацией Nd^{3+} : 0.5, 3.0, 7.0 ат.% по Gd^{3+} (табл.1) были синтезированы методом твердофазной реакции при $T = 1520$ К [10]. Лантан-боратное стекло $La_2O_3-B_2O_3$, содержащее 1 мол.% Nd_2O_3 синтезировалось в корундовом тигле на воздухе и отливалось на охлажденную латунную подложку. Водные коллоидные растворы наночастиц получали из макрообразцов соответствующих составов поэтапно путем механического измельчения и ультразвукового диспергирования в воде. Величины гидродинамических радиусов субмикронных и наноразмерных частиц измеряли с помощью спектрометра динамического рассеяния света Photocor Complex. Математический анализ корреляционной функции показал, что водные коллоидные растворы содержали, кроме наночастиц разных размеров, субмикронные частицы с гидродинамическими радиусами до 500 нм. Характерные величины гидродинамических радиусов наночастиц, соответствующих наиболее интенсивным линиям в спектрах динамического рассеяния света в водных растворах этих частиц, приведены в табл.1. Точность измерения гидродинамических радиусов частиц составляет $\pm 1\%$.

Известно, что диаметры пор кровеносных сосудов, питающих раковую опухоль, могут составлять 10–500 нм, что значительно превышает размеры пор кровеносных сосудов здоровых органов (2–6 нм). Поэтому для адресной доставки частиц из кровотока через поры кровеносных сосудов внутрь раковой опухоли необходимо использовать наночастицы с размерами более 10 нм. В противном случае наночастицы не будут иметь хорошей селективности накопления в злокачественной опухоли по сравнению с нормальной тканью без дополнительного покрытия, но они могут быть использованы для флуоресцентной визуализации и терапии при их конъюгации со специфичными противораковыми антителами.

Для спектрального анализа люминесценции ионов Nd^{3+} использовался двойной монохроматор СДЛ-1 (ЛОМО). Исследования проводились на образцах двух типов – на водных коллоидных растворах наночастиц и на субмикронных частицах, помещенных в кварцевую колбу (образцы типа 1) или между покровными стеклами (образцы

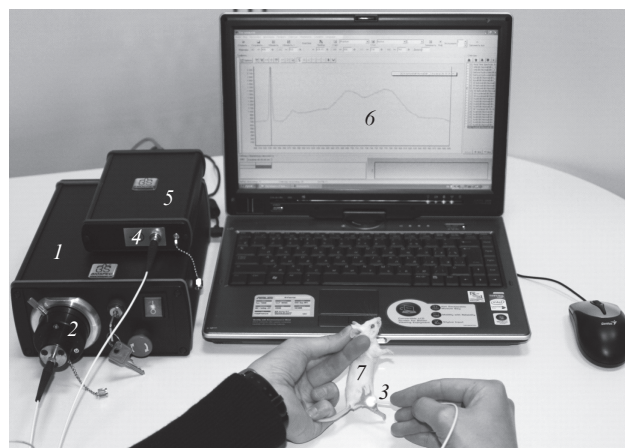


Рис.1. Волоконное устройство ЛЭСА-01-Биоспек для проведения спектральных измерений на экспериментальных животных *in vivo*: 1 – лазер; 2 – волоконно-оптический адаптер; 3 – волоконно-оптический катетер; 4 – спектральный фильтр; 5 – спектрометр; 6 – программное обеспечение; 7 – биологический образец.

типа 2). Толщина слоя воды в образцах типа 2 составляла 10 ± 1 мкм. Спектры люминесценции в образцах обоих типов регистрировались в продольной относительно возбуждающего лазерного пучка геометрии. Кинетика затухания люминесценции ионов Nd^{3+} исследовалась при возбуждении импульсным $Al_2O_3:Ti$ -лазером с длительностью импульса 10 нс. В образцах типа 1 затухание люминесценции регистрировалось перпендикулярно направлению возбуждающего лазерного пучка.

Флуоресцентные исследования на лабораторных животных осуществляли с помощью модифицированного варианта лазерного электронного спектроанализатора ЛЭСА-01-Биоспек [11], модификация которого заключалась в дополнительном использовании непрерывного ИК лазера с длиной волны 810 нм и соответствующих оптических фильтров.

Установка для измерений методом обратного светорассеяния (рис.1) включает в себя спектрометр, источник света с фокусирующей оптикой (галогенная лампа при измерении поглощения и лазер в случае измерения флуоресценции), портативный компьютер, программу обработки спектров UnoMomento-Биоспек, гибкий оптический катетер, состоящий из передающего лазерное излучение световода в центре и расположенных вокруг него шести волокон, принимающих рассеянный лазерный свет и флуоресценцию. Принцип проведения измерений в месте контакта оптического катетера с биологическим объектом представлен на рис.2. В образце лазерное излучение многократно рассеивается и вызывает флуоресценцию, прежде чем попадает в приемные световоды. Вклад в спектр флуоресценции вносит объем биологического образца, находящийся между подающим и принимающим волокнами. Глубина зондирования образца может варьироваться при

Табл.1. Времена жизни уровня ${}^4F_{3/2}$ ионов Nd^{3+} в водных ($n = 1.33$) коллоидных растворах наночастиц и микронных (0.5–1.0 мкм) частиц.

Состав	Размер наночастиц (нм)	Длина волны возбуждения (нм)	Длина волны регистрации (нм)	Время жизни в наночастицах (мкс)	Время жизни в микронных частицах (мкс)
$Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:0.5 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$	78–200	803	880	80	80
$Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:3.0 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$	42–500	803	880	50	50
$Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:7.0 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$	5, 32–500	803	880	70	33

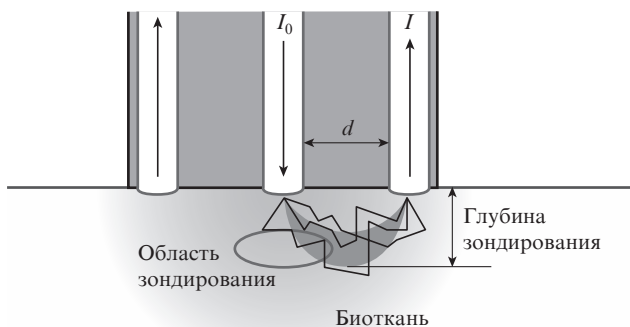


Рис.2. Распространение света в исследуемом образце в месте контакта с дистальным концом гибкого оптического катетера.

изменении расстояния d между волокнами. В настоящей работе расстояние между волокнами составляло 250 мкм, а глубина зондирования не превышала 3 мм.

Спектральные характеристики исследуемых в работе наночастиц продемонстрировали хорошее (равное 8) отношение сигнал/шум при их концентрации в биоткани 5 мг/кг.

3. Обсуждение основных результатов

Экспериментально измеренное время жизни ионов Nd^{3+} на уровне ${}^4F_{3/2}$ в $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:7 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$ в два раза выше в наночастицах, чем в субмикронных частицах (см. табл.1). Этот результат следует из рис.3, где приведены кинетики затухания этого же уровня для наночастиц $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8$ с разным содержанием ионов Nd^{3+} . Кривые затухания люминесценции 1 и 3 имеют близкие углы наклона в координатах $\ln I, t$, что свидетельствует о близких временах жизни уровня ${}^4F_{3/2}$ в этих наночастицах с концентрацией ионов неодима 0.5 ат.% и 7 ат.%, хотя с увеличением концентрации Nd^{3+} затухание уровня ${}^4F_{3/2}$ должно значительно ускориться. Ускорение затухания обусловлено безызлучательным переносом энергии между ионами Nd^{3+} в результате кросс-релаксации (${}^4F_{3/2} - {}^4I_{15/2}, {}^4I_{9/2} - {}^4I_{15/2}$) (табл.1).

Этот важный результат качественно подтверждает формулу (1), полученную в [9] для сферических наночастиц. Большинство необходимых для применения этой формулы условий реализовалось в наших экспериментах. Так, показатель преломления частиц поликристалла ($n_{cr} \sim 2$) значительно больше показателя преломления воды ($n_{med} = 1.33$),

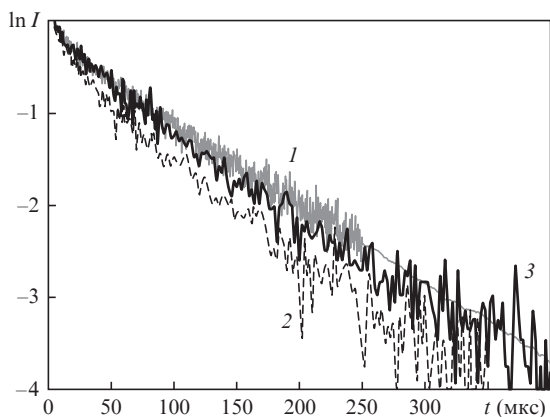


Рис.3. Кинетики затухания люминесценции уровня ${}^4F_{3/2}$ ионов Nd^{3+} в наночастицах поликристаллов $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8$ с содержанием Nd^{3+} 0.5 ат.% (1), 3 ат.% (2) и 7 ат.% (3).

а объемная концентрация наночастиц в коллоидном растворе близка к нулю ($c \rightarrow 0$). Отношение времен жизни метастабильного уровня активаторного иона в наночастице и в объемном кристалле

$$\frac{\tau_{nano}}{\tau_{bulk}} = \frac{n_{cr}}{n_{med}} \left[\frac{2 + \varepsilon}{3} \right]^2, \tag{1}$$

где n_{cr} и n_{med} – показатели преломления наночастиц (или объемного кристалла) и окружающей наночастицу среды; $\varepsilon = n_{cr}^2/n_{med}^2$ – отношение их диэлектрических постоянных.

Времена жизни уровня ${}^4F_{3/2}$ ионов Nd^{3+} в $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8$ с концентрацией Nd^{3+} 0.5 ат.% и 3 ат.% не зависят от размера частиц (табл.1). Это может быть объяснено их более крупными размерами (78 и 42 нм соответственно для концентраций Nd^{3+} 0.5 ат.% и 3 ат.%) по сравнению с наночастицами $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:7 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$, минимальные размеры которых составили 5 и 32 нм. Значительное отклонение от теоретической зависимости (1) наблюдалось для частиц стекла $La_2O_3 - B_2O_3:1.0 \text{ вес.}\% Nd_2O_3$ (табл.1).

Увеличение времени жизни люминесценции τ_{nano} с одновременным усилением интенсивности ее сигнала от РЗИ в наночастицах, использующихся в качестве биометок, представляет практический интерес. Это увеличение позволяет легко регистрировать сигналы люминесценции таких биометок in vivo в спектральной области, перекрывающейся с областью с гораздо более интенсивной, но короткой по времени автолюминесценцией биотканей, путем регистрации спектров люминесценции РЗИ с временной задержкой 10–20 мкс и временным окном 100 мкс и более. Это ведет к упрощению технических требований, предъявляемых к спектрально-диагностической аппаратуре для регистрации спектров люминесценции с таким временным разрешением.

Формы контуров люминесценции ионов Nd^{3+} слабо зависят от размера частиц (рис.4). Это установлено нами при регистрации спектров люминесценции из частиц поликристалла $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:7 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$ разного размера (рис.4, спектры 2–4). Спектры люминесценции ионов Nd^{3+} в на-

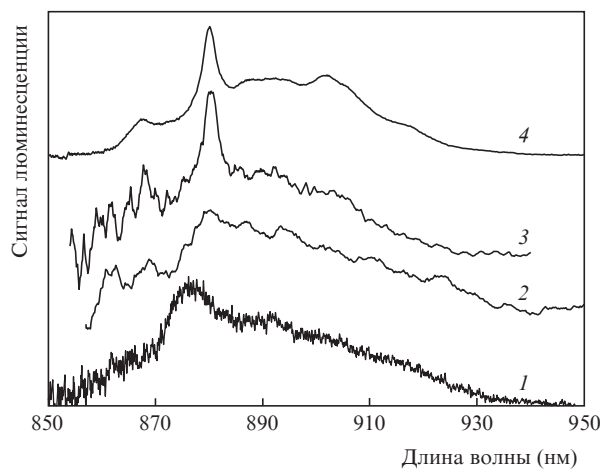


Рис.4. Спектры люминесценции ионов Nd^{3+} на переходе ${}^4F_{3/2} - {}^4I_{9/2}$ в наночастицах стекол $La_2O_3 - B_2O_3:1.0 \text{ вес.}\% Nd_2O_3$ (образец типа 1) (1), в наночастицах поликристаллов $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:7 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$ (образец типа 2) (2), в наночастицах поликристаллов $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:7 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$ (образец типа 1) (3) и в субмикронных частицах $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:7 \text{ ат.}\% Nd^{3+}$ (образец типа 2) (4).

Табл.2. Концентрация в органах лабораторной мыши наночастиц и субмикронных частиц поликристалла $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8$: 7.0 ат.% Nd^{3+} при внутривенном введении (доза – 16.0 мг/кг).

Внутренний орган	Концентрация (мг/кг)
Печень	20.0
Селезенка	10.3
Почки	5.6
Легкие	71.1

ночастицах стекла (рис.4, спектр 1) и в объемных стеклах [12] аналогичны.

Нами проведено предварительное исследование фармакокинетики наночастиц (5 и 32 нм) и субмикронных частиц (до 500 нм) поликристаллов $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8$: 7 ат.% Nd^{3+} на лабораторных мышах с перевитыми в мышечную ткань задней конечности карциномами Эрлиха. Водный коллоидный раствор наночастиц (объем 0.2 мл, концентрация 2 мг/мл) вводили внутривенно. Доза введенного препарата в расчете на массу животного составила 16 мг/кг.

С помощью флуоресцентной спектроскопии установлено распределение этих наночастиц по органам и тканям мыши спустя 1 ч после введения (табл.2). Для количественного определения концентрации наночастиц по спектрам люминесценции были проведены серии измерений спектров люминесценции рассеивающих фантомов (аналогичны биотканям в исследуемом оптическом диапазоне), содержащих разные титры наночастиц. После построения зависимости интенсивности люминесценции от количества наночастиц в фантоме стало возможным определение концентрации наночастиц в биотканях по интенсивности люминесценции с точностью до 10%.

Исследование распределения частиц по внутренним органам с помощью спектрометра ЛЭСА-1 мы проводили как на живой, так и на препарированной мыши через 1 ч после введения препарата. Спектры люминесценции

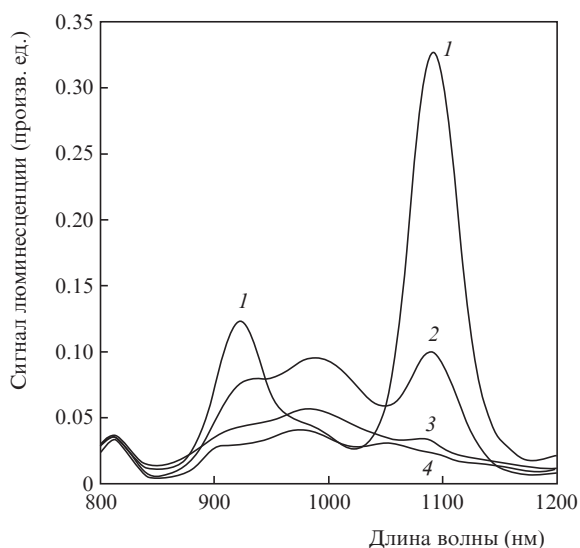


Рис.5. Спектры люминесценции ионов Nd^{3+} на электронных переходах ${}^4F_{3/2} - {}^4I_{9/2}$ и ${}^4F_{3/2} - {}^4I_{11/2}$ в частицах поликристаллов $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8$: 7 ат.% Nd^{3+} , накопившихся в биотканях через 1 ч после внутривенного введения: 1 – легкие, 2 – печень, 3 – селезенка, 4 – почка.

ионов Nd^{3+} (рис.5) зарегистрированы от наночастиц во внутренних органах живой мыши. После ее препарирования спектры люминесценции от каждого исследуемого внутреннего органа измерялись повторно. Относительные соотношения максимумов линий люминесценции ионов Nd^{3+} в случае этих двух вариантов регистрации спектров люминесценции практически одинаковы.

Из рис.5 видно, что частицы препарата накапливаются преимущественно в легких и печени лабораторной мыши. Распределение по органам существенно зависит от нескольких факторов: от размеров наночастиц, от их поверхностного заряда, от типа используемого полимерного покрытия наночастиц. Для развития этого направления представляется важным исследовать влияние данных факторов на распределение наночастиц по тканям и органам в норме и при некоторых патологиях, в частности при злокачественных опухолях и атеросклеротических изменениях сосудов. Выявленного токсического эффекта после внутривенного введения препарата отмечено не было, так же как и каких-либо симптомов интоксикации на протяжении до двух недель.

4. Заключение

В представленной работе авторами получены коллоидные растворы наночастиц и субмикронных частиц поликристаллов борато-германатов гадолиния $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8$ и боратных стекол, активированных люминесцирующими ионами Nd^{3+} , и проведено предварительное исследование фармакокинетики этих частиц на лабораторных мышах с перевитыми карциномами Эрлиха. Экспериментально определены спектроскопические характеристики полученных растворов частиц. Так, форма спектров люминесценции ионов Nd^{3+} практически не зависит от размеров частиц, а времена жизни возбужденного состояния ${}^4F_{3/2}$ ионов Nd^{3+} заметно увеличиваются при переходе от объемных частиц поликристалла к наночастицам.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-105.2010.2.

1. http://netoncolofy.ru/expert/diagnostics/diagnostic_methods/1398/.
2. Свиридов Н.К., Котляров П.М. *Медицинская визуализация*, **3**, 54 (1998).
3. Li Q., Gao L., Yan D. *Nanostr. Mater.*, **8**, 825 (1997).
4. Sun L., Liao C., Yan C. *J. Sol. State Chem.*, **171**, 304 (2003).
5. Song H., Chen B., Sun B., Zhang J., Lu S. *Chem. Phys. Lett.*, **372**, 368 (2003).
6. Boyer J.C., Vetrone F., Capobianco J.A., Spgehini F., Bettinelli M. *J. Phys. Chem. B*, **108**, 20137 (2004).
7. Meltzer R.S., Feofilov S.P., Tissue B., Yuan H.B. *Phys. Rev. B*, **60**, R14012 (1999).
8. Dolgaleva K., Boyd R.W., Milonni P.W. *J. Opt. Soc. Am. B*, **24**, 516 (2007).
9. Баснев Т.Т., Орловский Ю.В., Пухов К.К. *Российские нанотехнологии*, **3**, 66 (2008).
10. Krut'ko V.A., Lysanova G.V., Burkov V.I., Bandurkin G.A., Komova M.G. *Neorg. Mater.*, **38**, 1364 (2002).
11. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. *Laser Phys.*, **10**, 1188 (2000).
12. Воронько Ю.К., Галактионов С.С., Дмитрук Л.Н., Петрова О.Б., Попов А.В., Ушаков С.Н., Шукшин В.Е. *Физика и химия стекла*, **32**, 69 (2006).