PACS 87.64.Cc; 87.63.L-; 78.67.Bf

Исследование контрастирующих свойств наночастиц для задач оптической диффузионной спектроскопии

А.Д.Крайнов, П.Д.Агрба, Е.А.Сергеева, С.В.Заботнов, М.Ю.Кириллин

Приведены результаты экспериментальных исследований оптических свойств суспензий золотых и кремниевых наночастиц и их использования в качестве контрастирующих агентов в оптической диффузионной спектроскопии (ОДС). Оптические свойства суспензий наночастиц и модельных сред восстановлены на основе данных спектрофотометрических измерений в диапазоне 500–1100 нм с применением оригинальной теоретической модели. Экспериментальные исследования с помощью системы ОДС проводились на жидком фантоме на основе раствора липофундина и туши, моделирующего оптические свойства реальной биоткани. Увеличение контраста изображений, полученных методом ОДС, в экспериментах с выбранными суспензиями наночастиц подтверждает предположение о перспективности их использования в качестве контрастирующих агентов для задач ОДС.

Ключевые слова: наночастицы, контрастирование, спектрофотометрия, оптическая диффузионная спектроскопия.

1. Введение

В настоящее время активно развивается метод оптической диффузионной спектроскопии (ОДС) с использованием непрерывного излучения в диапазоне длин волн 650-1200 нм для неинвазивной функциональной диагностики и визуализации внутренней структуры биологических объектов. В основе метода лежит регистрация диффузно рассеянного объектом зондирующего излучения на нескольких длинах волн, определяемых спектрами поглощения исследуемых компонентов биоткани [1]. Несомненное достоинство данного метода - простота реализации диагностических устройств, не требующих быстродействующих источников и приемников излучения, а также высокочастотных устройств обработки сигнала. Основными медицинскими приложениями метода ОДС являются диагностика кислородного статуса раковых опухолей молочной железы и мониторинг активности коры головного мозга (см., напр., [1-3]). Однако существенными недостатками этого метода остаются низкие, по сравнению с методами оптической когерентной томографии или компьютерной томографии, разрешение и контраст полученных изображений, что может быть критичным при проведении медицинской диагностики.

Повышение информативности получаемых методами оптического биоимиджинга изображений осуществляется путем применения просветляющих (например, глицерин или раствор глюкозы) [4–7] или контрастирующих (золотые, кремниевые или органические наночастицы) [8–21] агентов, позволяющих локально управлять опти-

Поступила в редакцию 14 марта 2014 г., после доработки – 15 июня 2014 г.

ческими свойствами (коэффициентами рассеяния и поглощения) объекта, что приводит к контрастированию областей на диагностических изображениях.

Перспективность применения золотых наночастиц связана с их низкой цитотоксичностью и возможностью существенно изменять оптические свойства объекта даже при относительно низких концентрациях [8, 14, 19]. Использование золотых наночастиц позволяет частично решить проблемы ранней диагностики злокачественных новообразований и их локализации, а также разрабатывать новые методы селективной (таргетной) терапии путем локального нагрева лазерным излучением ИК диапазона металлических наночастиц с целью термического повреждения близлежащих клеток [15–18, 20–22].

В работе [9] рассматривается возможность использования наночастиц из полипиролла как контрастирующих агентов в ОКТ. Там же проведены экспериментальные исследования наночастиц на фантомах биоткани и расчеты на основе теории Ми.

Не менее перспективными для диагностики живых объектов представляются кремниевые наночастицы. Так, например, в работе [12] изучается фотолюминесценция пористого кремния. Спектр фотолюминесценции образующих данный материал нанокристаллов находится в диапазоне 700–900 нм, что определяет высокий потенциал их использования в биомедцинских приложениях. Демонстрируется также такое преимущество кремниевых наноструктур (в отличие, например, от углеродных, золотых частиц или квантовых точек), как малое (не более 4 ч) время распада их на нетоксичные компоненты в живых организмах.

Таким образом, применение наночастиц для повышения информативности получаемых методами биоимиджинга изображений является актуальным, поскольку, с одной стороны, позволяет увеличить их диагностическую ценность, а с другой – открывает широкие возможности для тераностики, в которой терапевтический инструментарий одновременно служит и для целей диагностики.

Цель настоящей работы – исследование возможности применения золотых и кремниевых наночастиц для повышения контраста изображений, полученных методом ОДС.

А.Д.Крайнов, П.Д.Агрба, Е.А.Сергеева, М.Ю.Кириллин. Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46; Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Россия, 603950 Н.Новгород, просп. Гагарина, 23; e-mail: mkirillin@yandex.ru

С.В.Заботнов. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы

2. Материалы и методы

2.1. Объекты исследования

В качестве контрастирующих агентов нами исследовались золотые наночастицы произвольной формы с характерным размером 30-100 нм (тип 1); золотые наночастицы произвольной формы с небольшим содержанием фракций наностержней с длиной 30-50 нм и толщиной 10-17 нм (тип 2); золотые наностержни с длиной 30-50 нм и толщиной 10-17 нм (тип 3) (изготовлены в ИХФ РАН (Москва) [22]) и кремниевые наночастицы с характерным размером 50-200 нм (тип 4) (изготовлены в МГУ им. М.В.Ломоносова [23]).

В нашей работе использовался жидкий фантом на основе липофундина с объемной концентрацией 1.4% [24], рассеивающие свойства которого отвечают усредненным показателям для биотканей мыши. Фантом заливался в кювету размером $16 \times 16 \times 4$ см, что соответствует типичному объему биологического объекта, исследуемого методом ОДС. В качестве контрастируемой области внутри объекта использовалась цилиндрическая пробирка диаметром 0.7 см (объем 0.65 мл), изготовленная из матового пластика толщиной 1 мм и заполненная фантомом. Управление оптическими свойствами исследуемой области осуществлялось добавлением суспензии наночастиц в пробирку.

Для численной оценки зависимости контраста ОДСизображений от коэффициента поглощения, усиленного присутствием контрастирующего агента в выделенной области, был также проведен эксперимент, в котором вместо суспензий наночастиц в пробирку добавлялась тушь в различных концентрациях, характеризующаяся слабой зависимостью коэффициента поглощения от длины волны в ближнем ИК диапазоне [24].

2.2. Определение оптических свойств суспензий наночастиц

Оптические свойства суспензий наночастиц определялись на основе измерения коллимированного пропускания (C), полного пропускания (T) и полного отражения (R) образцов методом спектрофотометрии. Спектрофотометрические измерения проводились в диапазоне 500-1100 нм на спектрофотометре Analytik Jena SPECORD 250 Plus с использованием интегрирующей сферы. Исследуемые образцы помещались в кварцевые кюветы толщиной 1, 5 и 10 мм в зависимости от оптической плотности образца для обеспечения применимости используемой модели. Следует отметить, что при измерении полного отражения образец располагается под углом, немного отличающимся от 90°, к оси зондирующего пучка во избежание регистрации прямого френелевского отражения зондирующего пучка от поверхности образца. Коэффициенты рассеяния и поглощения суспензий наночастиц определялись на основе спектрофотометрических данных.

В настоящее время существуют два класса методик определения оптических характеристик рассеивающих и поглощающих («мутных») сред на основе данных спектрофотометрии: аналитические и численные. Поскольку точного решения уравнения переноса излучения в мутных средах в общем случае не существует, аналитические методики основаны на использовании различных приближений, а именно: закона Ламберта-Бугера-Бера, теории Кубелки-Мунка и диффузионного приближения уравнения переноса излучения [25, 26]. Однако область их применения существенно ограничена: закон Ламберта-Бугера-Бера позволяет определить только сумму коэффициентов поглощения и рассеяния при условии отсутствия многократного рассеяния в образце, в то время как теория Кубелки-Мунка и диффузионное приближение, напротив, применимы только для сильно рассеивающих сред и не учитывают наличия коллимированной компоненты. Кроме того, теория Кубелки-Мунка не позволяет корректно учесть отражение и преломление диффузно рассеянного излучения на границах кварцевой кюветы, использующейся при спектрофотометрических исследованиях коллоидов и суспензий. Альтернативным подходом является численная методика на основе инверсного метода Монте-Карло, когда для каждой длины волны оптические характеристики определяются итеративно с помощью метода Ньютона на основе моделирования распространения излучения в мутной среде. Применение метода Монте-Карло позволяет учесть как коллимированную, так и диффузную компоненту рассеянного образцом излучения, однако требует существенных вычислительных мощностей, т.е. является времязатратным.

В настоящей работе для определения оптических характеристик исследуемых суспензий наночастиц используется методика на основе новой гибридной аналитической модели (модифицированный закон Ламберта-Бугера-Бера), которая позволяет учесть коллимированную и диффузную компоненты рассеянного образцом излучения, а также отражение и преломление рассеянного излучения на границах кварцевой кюветы. Это делает ее применимой для широкого класса образцов с различными оптическими свойствами и дает возможность избежать времязатратных вычислений, требуемых при использовании инверсного метода Монте-Карло.

В основе рассматриваемой модели [27] лежит представление коэффициента рассеяния μ_s в виде суммы двух компонент, μ_{fs} и μ_{bs} , ответственных за рассеяние в переднее и заднее полупространства соответственно:

$$\mu_{\rm s} = \mu_{\rm fs} + \mu_{\rm bs}.\tag{1}$$

В этом случае можно считать, что коэффициент рассеяния $\mu_{\rm bs}$ отвечает за ослабление прошедшего через среду излучения, а коэффициент рассеяния $\mu_{\rm s}$ – за ослабление его коллимированной компоненты. Тогда в приближении малократного рассеяния ($\mu_{\rm s}d < 1$) с учетом ослабления за счет поглощения в соответствии с законом Ламберта-Бугера-Бера для коллимированного и полного пропускания получаем выражения

$$C = T_{\rm F}^2 \exp[-(\mu_{\rm s} + \mu_{\rm a})d],$$
(2)

$$T = T_{\rm F}^2 \exp[-(\mu_{\rm bs} + \mu_{\rm a})d],$$
(3)

где d-толщина слоя среды; μ_a – коэффициент поглощения; $T_F = 4n/(n + 1)^2$ – френелевский коэффициент пропускания при нормальном падении излучения на границу среды; n – показатель преломления среды.

Далее, отражение от каждого бесконечно тонкого слоя толщиной dz в соответствии с принятым представлением μ_s можно записать как $\mu_{bs}dz$. Тогда с учетом ослабления зондирующего излучения на пути до слоя толщиной dz и ослабления отраженного излучения на пути к ближней границе полное отражение

$$R = T_{\rm F}^2 \int_0^d \mu_{\rm bs} \exp[-2(\mu_{\rm bs} + \mu_{\rm a})z] dz$$

= $T_{\rm F}^2 \frac{\mu_{\rm bs} \{1 - \exp[-2(\mu_{\rm bs} + \mu_{\rm a})d]\}}{2(\mu_{\rm bs} + \mu_{\rm a})}.$ (4)

Из выражений (3) и (4) можно получить соотношение

$$\mu_{\rm bs} = \frac{2R}{d} \frac{\ln(T_{\rm F}^2/T)}{T_{\rm F}^2 - T^2/T_{\rm F}^2},\tag{5}$$

а из (2), (3) и (5) - соотношения

$$\mu_{\rm a} = \frac{1}{d} \ln(T_{\rm F}^2/T) - \frac{2R}{d} \frac{\ln(T_{\rm F}^2/T)}{T_{\rm F}^2 - T^2/T_{\rm F}^2},\tag{6}$$

$$\mu_{\rm s} = \frac{1}{d} \ln(T/C) + \frac{2R}{d} \frac{\ln(T_{\rm F}^2/T)}{T_{\rm F}^2 - T^2/T_{\rm F}^2}.$$
(7)

Формулы (6) и (7) использовались нами для восстановления спектров поглощения (μ_a) и рассеяния (μ_s) на основе данных спектрофотометрических измерений коллимированного пропускания (*C*), полного пропускания (*T*) и полного отражения (*R*).

2.3. Установка для оптической диффузионной спектроскопии

Эксперименты по определению оптических свойств исследуемых объектов методом ОДС проводились с помощью оптического диффузионного томографа (рис.1), разработанного в ИПФ РАН [28]. В используемой установке с одной стороны от объекта располагаются три малогабаритных полупроводниковых лазера с выводом из-



Рис.1. Принципиальная схема установки для ОДС.

 μ_a (см

6

2

0

400

лучения в одно оптоволокно и длинами волн 657, 802 и 919 нм (мощность 13.6, 24.1 и 6.9 мкВ соответственно). Торец оптоволокна перемещается параллельно плоскости границы объекта. Пучок излучения на поверхности фантома имеет поперечное сечение радиусом r = 1 мм и гауссов профиль распределения интенсивности. С другой стороны объекта расположена синхронизованная с лазерами детекторная система на основе малошумящей охлаждаемой цифровой ПЗС-камеры ML1001E (Finger Lakes Instrumentation, США) и объектива SIGMA AF 30 F/1.4, последовательно регистрирующая пространственные распределения прошедшего излучения на трех указанных длинах волн для каждого положения источника. Сигнал на выходе детектирующей системы оцифровывался с помощью 16-разрядной платы АЦП/ЦАП марки NI USB-6251 (National Instruments, США). Разрешение получаемых изображений составляет 962 точки на 1 см².

3. Результаты

3.1. Оптические свойства суспензий наночастиц

На первом этапе на основе спектрофотометрических измерений были восстановлены оптические свойства суспензий золотых и кремниевых наночастиц (рис.2). Как для золотых, так и для кремниевых наночастиц коэффициент поглощения значительно превышает коэффициент рассеяния, что позволяет рассматривать их как контрастирующие агенты для ОДС, формирование изображений в которой определяется главным образом распределением коэффициента поглощения. Коэффициент поглощения суспензии золотых наночастиц (типы 1-3) превышает коэффициент поглощения кремниевых наночастиц (тип 4). Спектры поглощения суспензии золотых наночастиц имеют резонансные особенности. Для частиц типа 2 можно отметить два максимума (так называемые поверхностные плазмонные резонансы [17]): первый максимум на длине волны $\lambda = 580$ нм обусловлен плазменной частотой металла (золота), показателем преломления окружающей среды и размером частиц, а второй максимум на $\lambda = 885$ нм – наличием в суспензии фракций наностержней с соотношением длин 3:1 [18]. Для частиц типа 3 максимумы наблюдаются на $\lambda = 527$ и 802 нм соответственно. Для частиц типа 1 первый максимум соответствует λ = 645 нм, в то время как второй, обусловленный формой частиц, сдвинут в ИК область.

Вследствие существенного превышения коэффициентами поглощения наночастиц типов 1 и 2 коэффициентов



Рис.2. Коэффициенты поглощения (*a*) и рассеяния (*б*) кремниевых и золотых наночастиц типов 1 (•), 2 (•), 3 (•) и 4 (•).

λ (HM)

1000

800

а

600

поглощения наночастиц типов 3 и 4 первые использовались в дальнейших экспериментах по контрастированию ОДС-изображений наночастицами.

3.2. Контрастирующие свойства золотых наночастиц при использовании их в ОДС

На рис.3 представлены изображения, полученные с помощью ОДС-системы на $\lambda = 802$ нм для четырех концентраций туши (0.01, 0.05, 0.1 и 0.5%), по которым можно оценить зависимость контраста выделенной области от концентрации поглотителя. Коэффициенты экстинкции фантома с добавлением туши для рассматриваемых концентраций составили соответственно 14.4, 15.8, 17.7 и 32.5 см⁻¹. Контраст пробирки на полученных ОДС-изображениях рассчитывался по формуле

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}},$$

где I_{max} – сигнал из фоновой среды (раствора липофундина), а I_{min} – сигнал из области, соответствующей проекции центра пробирки на плоскость границы кюветы. Зависимость контраста выделенной области от концентрации туши и добавленного коэффициента поглощения $\tilde{\mu}_a$ приведена на рис.4 и имеет существенно нелинейный характер. Диапазон значений добавленного коэффициента по-



Рис.4. Зависимость контраста ОДС-изображенийя на $\lambda = 802$ нм от концентрации туши и соответствующего добавленного коэффициента поглощения $\tilde{\mu}_a$.

глощения совпадает с характеристиками суспензий наночастиц типов 1 и 2.

ОДС-изображения фантома биоткани с пластиковой пробиркой до и после ее маркирования золотыми наночастицами типов 1 и 2 для $\lambda = 802$ нм представлены на рис.5, который демонстрирует контрастирование выделенной области. Аналогичные результаты были получены и для других длин волн зондирования (657 и 919 нм) Количественная оценка контраста ОДС-изображений для двух рассматриваемых типов золотых наночастиц в зависимости от длины волны зондирования приведена на рис.6. Видно, что характер зависимости величины контраста от длины волны для обоих типов рассматриваемых суспен-



Рис.3. ОДС-изображения на λ = 802 нм фантома на основе раствора липофундина (1.4%) с пробиркой, заполненной раствором липофундина (1.4%) и туши с концентрациями 0.01% (*a*), 0.05% (*b*), 0.1% (*b*) и 0.5% (*c*).





K

1.0

0.9 0.8

0.7

0.6

0.5

0.4

0.3

Рис.5. ОДС-изображения на λ = 802 нм фантома на основе раствора липофундина (1.4%) с пробиркой, заполненной раствором липофундина (1.4%) без наночастиц (*a*) и с суспензией золотых наночастиц типа 2 (*б*) и типа 1 (*в*) при коэффициентах экстинкции 14 (*a*), 18.2 (*б*) и 20.9 см⁻¹ (*в*).

в



Рис.6. Контраст ОДС-изображений для золотых наночастиц типа 1 (п) и типа 2 (п) в зависимости от длины волны.

зий наночастиц совпадает с характером зависимости их коэффициентов поглощения от длины волны (рис.2,*a*).

4. Заключение

у (см)

2

3

4

5

6

0

В настоящей работе продемонстрирована возможность контрастирования выделенной области на ОДСизображении оптического фантома биоткани с помощью внедрения в него наночастиц. Наиболее эффективные из рассмотренных типов суспензий наночастиц (золотые наночастицы произвольной формы с характерным размером 30–100 нм и золотые наночастицы произвольной формы с небольшим содержанием фракций наностержней с длиной 30–50 нм и толщиной 10–17 нм) были определены на основе их спектров поглощения, восстановленных по данным спектрофотометрии. Отличительной особенностью этих типов наночастиц является существенно немонотонная зависимость коэффициента поглощения от длины волны, обусловленная наличием плазмонных резонансов.

Эксперименты по контрастированию ОДС-изображений проводились на жидком фантоме, близком по оптическим свойствам к биотканям мыши. Калибровочные эксперименты с добавлением туши в различной концентрации в выделенную область фантома, ограниченную пробиркой, позволили продемонстрировать существенно нелинейную зависимость контраста от добавленного коэффициента поглощения в выделенной области. Эксперименты с применением суспензий наночастиц показали высокий потенциал их использования при контрастировании выделенной области диаметром 0.7 см в среде толщиной 4 см, причем характер зависимости величины контраста от длины волны совпадает с характером аналогичной зависимости коэффициента поглощения суспензий.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (проект 14.Z50.31.0022) и РФФИ (гранты № 14-22-01086 офи_м и 14-02-31549). Разработка установки для ОДС выполнена в рамках финансирования по Государственному заданию по теме № 12.16 «Аку-

0.1

5 х (см)

стические и оптические методы исследования структуры и динамики физиологических процессов в биологических тканях».

- Tromberg B.J., Cerussi A., Shah N., Compton M., Durkin A., Hsiang D., Butler J., Mehta R. *Breast Cancer Res.*, 7 (6), 279 (2005).
- Orlova A.G., Turchin I.V., Plehanov V.I., Shakhova N.M., Fiks I.I., Kleshnin M.I., Konuchenko N.Yu., Kamensky V.A. *Laser Phys. Lett.*, 5 (4), 321 (2008).
- 3. Aslin R.N., Mehler J. J. Biomed. Opt., 10 (1), 011009 (2005).
- 4. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика (М.: Физматлит, 2007, т. 2, с. 109).
- Vargas G., Chan E.K., Barton J.K., Rylander H.G., Welch A.J. Lasers in Surgery and Medicine, 24 (2), 133 (1999).
- Wang R.K., Xu X., Tuchin V.V., Elder J.B. J. Opt. Soc.Am. B, 18 (7), 948 (2001).
- 7. Welzel J. Skin Res. Technol., 7 (1), 1 (2001).
- Zagaynova E.V., Shirmanova M.V., Kirillin M.Yu., Khlebtsov B.N., Orlova A.G., Balalaeva I.V., Sirotkina M.A., Bugrova M.L., Agrba P.D., Kamensky V.A. *Phys. Med. Biol.*, 53, 4995 (2008).
- Troutman T., Barton J.K., Romanowski M. Opt. Lett., 32 (11), 1438 (2007).
- Au K.M., Lu Z., Matcher S.J., Armes S.P. Adv. Mater., 23 (48), 5792 (2011).
- 11. Choi J., Zheng Q., Katz H.E., Guilarte T.R. *Environ. Health Perspect.*, **118** (5), 589 (2010).
- Park J.-H., Gu L., von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. Nat. Mater., 8, 331 (2009).
- Benezra M., Penate-Medina O., Zanzonico P.B., Schaer D., Ow H., Burns A., DeStanchina E., Longo V., Herz E., Iyer S., Wolchok J., Larson S.M., Wiesner U., Bradbury M.S. J. Clin. Invest., 121 (7), 2768 (2011).

- Кириллин М.Ю., Агрба П.Д., Сироткина М.А., Ширманова М.В., Загайнова Е.В., Каменский В.А. Квантовая электроника, 40 (6), 525 (2010).
- Paciotti G.F., Myer L., Kingston D.G.I., GaneshT., Tamarkin L. NSTI-Nanotech., 1, 7 (2005).
- Zharov V., Letfullin R.R., Galitovskaya E.N. J. Phys. D: Appl. Phys., 38, 2571 (2005).
- Gang Y., Song-You W., Ming X., Liang-Yao C. J. Korean Phys. Soc., 49 (5), 2188 (2006).
- 18. Xiaohua H., EI-Sayed Mostafa A. J. Adv. Res., 1, 13 (2010).
- 19. Хлебцов Н.Г. Квантовая электроника, **38** (6), 504 (2008).
- Терентюк Г.С., Иванов А.В., Полянская Н.И., Максимова И.Л., Скапцов А.А., Чумаков Д.С., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. Квантовая электроника, 42 (5), 380 (2012).
- Khlebtsov N.G., Dykman L.A. J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer, 111, 1 (2010)
- Sirotkina M.A., Elagin V.V., Shirmanova M.V., Bugrova M.L., Snopova L.B., Kamensky V.A., Nadtochenko V.A., Denisov N.N., Zagaynova E.V. J. Biophotonics, 3 (10-11), 718 (2010).
- Ерошова О.И., Перминов П.А., Заботнов С.В., Гонгальский М.Б., Ежов А.А., Головань Л.А., Кашкаров П.К. Кристаллография, 57 (6), 942 (2012).
- Крайнов А.Д., Мокеева А.М., Сергеева Е.А., Агрба П.Д., Кириллин М.Ю. Оптика и спектроскопия, 115 (2), 227 (2013).
- 25. Рогаткин Д.А. Оптика и спектроскопия, 87 (1), 109 (1999).
- 26. Tualle J.-M., Tinet E. Opt. Commun., 228 (1), 33 (2003).
- Krainov A., Mokeeva A., Sergeeva E., Zabotnov S., Kirillin M. Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng., 8699, 86990Q (2013).
- Каменский В.А., Плеханов В.И., Орлова А.Г., Клешнин М.С., Турчин И.В. Патент РФ на полезную модель № 91517 от 20.02.2010.