

Кремниевые наночастицы как контрастирующие агенты в методах оптической биомедицинской диагностики*

С.В.Заботнов, Ф.В.Кашаев, Д.В.Шулейко, М.Б.Гонгальский, Л.А.Головань, П.К.Кашкаров, Д.А.Логинова, П.Д.Агрба, Е.А.Сергеева, М.Ю.Кириллин

Проведено сравнение эффективности рассеяния света наночастицами, формируемыми методом пикосекундной лазерной абляции кремния в воде, и механически измельченного мезопористого кремния. Ансамбли обоих типов частиц обладают коэффициентами рассеяния, достаточными для их использования как контрастирующих агентов в оптической когерентной томографии (ОКТ), особенно в диапазоне длин волн 700–1000 нм, где мало поглощение как кремния, так и большинства биологических и биоподобных тканей. Согласно теории Ми основной вклад в рассеяние при этом дают частицы относительно крупных размеров (150–300 нм). В проведенных экспериментах по визуализации поверхности агарового фантома с помощью ОКТ был достигнут контраст границы среды, контрастированной наночастицами, равный 14 и 30 дБ для аблированных частиц и порошка пористого кремния соответственно. Численное моделирование изображений, получаемых методом ОКТ кожи в присутствии наночастиц, подтвердило эффективность использования последних в качестве контрастирующего агента.

Ключевые слова: кремниевые наночастицы, импульсная лазерная абляция, мезоскопические среды, спектрофотометрия, оптическая когерентная томография, метод Монте-Карло.

1. Введение

Возможности изменения электрофизических и оптических свойств кремния в широких пределах методами современных нанотехнологий открывают большие перспективы использования данного материала не только в электронике для создания новых типов транзисторов [1, 2], сенсоров [3–5], светоизлучающих [6] и солнечных [7, 8] элементов, но и в биомедицинских приложениях для повышения эффективности диагностики [9–12] и лечения [13–18] различных заболеваний.

Обоснованием применения кремниевых наночастиц в медицинских целях являются минимальная токсичность данных объектов или ее отсутствие согласно ряду *in vitro* и *in vivo* экспериментов [19–21] и способность при соответствующих условиях к их биодegradации в течение не-

скольких часов [9, 22] (как правило, в ортокремниевую кислоту [23]). Хотя, безусловно, вопрос биосовместимости кремниевых наночастиц в целом и в каждом конкретном случае следует рассматривать комплексно с учетом размеров, концентрации, химической чистоты и стабильности используемых частиц.

На сегодняшний день значительные успехи в области формирования кремниевых наночастиц для биомедицинских применений достигнуты при использовании метода электрохимического травления, в результате которого возможно формирование пористого кремния (ПК), состоящего из нанокристаллов данного материала и воздушных пор, а также обладающего эффективной фотолюминесценцией (ФЛ). Подобные структуры могут применяться в качестве ФЛ маркеров, в том числе в живых организмах [9, 10]. Представляется перспективным использование ПК и для лечения онкологических заболеваний методом фотодинамической терапии благодаря возможности фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в ансамблях кремниевых нанокристаллов [13, 14]. Реализация данной идеи была экспериментально продемонстрирована в работах [15, 16] на примере раковых клеток фибробластов мышей и человеческого легкого.

Несмотря на относительную дешевизну и технологичность изготовления нанокристаллического кремния методом электрохимического травления с возможным последующим механическим измельчением в порошок с целью практического использования [9, 10, 15, 16], существует ряд других способов формирования наночастиц, перспективных для биомедицинских применений. В частности, достаточно широко используется метод лазерной абляции, когда формирование наночастиц происходит в результате агломерации продуктов абляции облучаемой мишени в буферных жидкостях или газах. Подбор последних позволяет управлять не только размерами изготавливаемых наночастиц, но и их структурой, химической чистотой и стабильностью, что открывает широкие

* Доложена на международном симпозиуме «Фундаментальные основы лазерных микро- и нанотехнологий» (FLAMN-16) (Ленинградская обл, Пушкин, 27 июня–1 июля 2016 г.).

С.В.Заботнов, П.К.Кашкаров. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия, 123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, 1; Московский физико-технический институт (ФНБИК), Россия, 123098 Москва, ул. Максимова, 4; e-mail: zabotnov@physics.msu.ru

Ф.В.Кашаев, Д.В.Шулейко, М.Б.Гонгальский, Л.А.Головань. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы

Д.А.Логинова, П.Д.Агрба. Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Россия, 603950 Н.Новгород, просп. Гагарина, 23

Е.А.Сергеева, М.Ю.Кириллин. Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46

Поступила в редакцию 24 марта 2017 г., после доработки – 6 мая 2017 г.

перспективы использования таких объектов в биомедицине. Данное направление развития нанотехнологий было названо «зеленым синтезом» (green synthesis) [24]. С помощью метода лазерной абляции к настоящему времени удалось сформировать функциональные наночастицы из золота, обладающие высокой степенью биосовместимости с клеточными культурами [25] и являющиеся перспективными агентами не только для диагностики, но и для лечения рака. Достигнуты значительные успехи в синтезе наночастиц на основе оксида железа [26], представляющих интерес для диагностики и лазерной терапии дегенеративных заболеваний хрящей [27, 28].

Метод импульсной лазерной абляции также хорошо зарекомендовал себя и при формировании кремниевых наночастиц: формируемые таким образом низкотоксичные кремниевые нанокристаллы оказались пригодными как для биоимиджинга живых организмов [11, 12], так и для фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода [17]. При этом важно отметить еще одно достоинство метода импульсной лазерной абляции: в большинстве случаев пики ФЛ наноструктурированного кремния находятся в так называемом окне прозрачности биотканей, в спектральном диапазоне от 700 до 1300 нм [11, 12, 17, 29, 30].

Значительное число работ по использованию наночастиц кремния, формируемых методами электрохимического травления или лазерной абляции, посвящены их применению в качестве ФЛ маркеров. Особое внимание в подобных исследованиях уделяется свойствам ФЛ в кремниевых нанокристаллах размером менее 8 нм, которые также могут быть сформированы методами химического синтеза в растворах [31, 32], быть биосовместимыми и, в том числе, характеризоваться сферической формой и узким распределением наночастиц по размерам.

Следует отметить, что кремний обладает относительно высоким показателем преломления (около 3.6 в красной и ближней ИК областях спектра [33]), наночастицы из этого материала характеризуются довольно большим сечением рассеяния и представляются перспективными в качестве контрастирующих агентов при визуализации биологических тканей методами оптического имиджинга. Хотя ранее была показана возможность управления оптическими свойствами биотканей и контрастирования в методах оптического имиджинга с помощью наночастиц золота [34, 35], диоксида титана [36], диоксида цинка [37] и других [35], однако исследований эффективности использования наночастиц кремния в таком качестве до последнего времени практически не велось.

В нашей предыдущей работе [38] была показана возможность использования кремниевых наночастиц, формируемых посредством пикосекундной лазерной абляции, в качестве контрастирующих агентов для визуализации поверхности агарового геля методом оптической когерентной томографии (ОКТ). Суть данного метода визуализации внутренней структуры оптически неоднородных объектов с пространственным разрешением до единиц микрометров заключается в регистрации рассеянного назад объектом зондирующего излучения с помощью низкокогерентной интерферометрии [39].

В настоящей статье рассмотрены два класса кремниевых наночастиц: формируемые методом лазерной абляции и получаемые при механическом измельчении ПК в порошок. Данные наносистемы априори обладают широким распределением по размерам, которое позволяет не только провести интегральное сравнение их физиче-

ских и оптических характеристик, а также эффективности использования в задачах биоимиджинга, но и оценить вклад частиц разных размеров в светорассеяние.

2. Объекты и методики исследования

Суспензии кремниевых наночастиц были изготовлены методом импульсной лазерной абляции монокристаллического кремния в воде. В качестве исходных пластин для облучения использовался умеренно легированный кремний Si p⁺-типа с кристаллографической ориентацией поверхности (100) и удельным сопротивлением 10–20 мОм·см. Облучение мишени проводилось в ячейке с дистиллированной водой пикосекундным Nd:YAG-лазером EKSPLA PL 2143A в течение 30 мин при частоте следования импульсов 10 Гц. Длительность и длина волны импульсов составляли 34 пс и 1064 нм соответственно. Более подробно детали эксперимента описаны в работах [38, 40].

Слои ПК изготавливались методом электрохимического травления монокристаллических пластин Si с теми же параметрами, что и указанные выше. Для травления использовался раствор 47.5%-ной плавиковой кислоты с этанолом в соотношении 1 : 1. Перед травлением подложки монокристаллического кремния помещались на несколько секунд в чистую плавиковую кислоту для удаления пленки естественного оксида с поверхности. Плотность тока при травлении варьировалась от 50 до 100 мА/см², время травления изменялось от 15 до 30 мин в зависимости от скорости травления при данном токе, т. к. требовалось сформировать пленку ПК максимально возможной толщины (для исследования был необходим большой объем материала), но с незначительной дисперсией размера кремниевых нанокристаллов и воздушных пор, что достигалось при средней толщине слоев 75 мкм. Толщины последних контролировались с помощью оптического микроскопа Olympus BX41. Отделение пленок ПК от подложки осуществлялось на заключительном этапе электрохимического травления путем резкого увеличения плотности тока до 700 мА/см² в течение нескольких секунд. В экспериментах по измерению оптических констант и контрастирующих свойств использовались порошки механически измельченного с помощью планетарной мельницы Fritsch PULVERISETTE 7 и растворенного в дистиллированной воде ПК. Использование воды в качестве одной и той же основы для растворов кремниевых частиц, сформированных методами импульсной лазерной абляции и электрохимического травления, позволяет провести максимально корректное сравнение контрастирующих свойств кремния, наноструктурированного указанными способами, учитывая совместимость воды с живыми организмами, для дальнейшего применения на практике.

Структура кремниевых наночастиц, формируемых методом лазерной абляции, изучалась с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEOL JEM-1011, а ПК и порошков на его основе – с использованием растрового электронного микроскопа (РЭМ) Carl Zeiss Supra 40. Результаты, полученные для обоих типов наночастиц, сравнивались с данными, полученными методом динамического рассеяния света (ДРС) с помощью анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS.

Измерения спектров отражения, а также коллимированного и полного пропускания суспензий с кремниевы-

ми наночастицами, помещенными в кварцевую кювету с расстоянием между стенками 10 мм, в диапазоне длин волн 400–1100 нм были выполнены с использованием спектрофотометра Analytik Jena SPECORD 250, оснащенного интегрирующей сферой.

Эксперименты по визуализации мутных сред методом ОКТ с помощью описанных выше ансамблей кремниевых наночастиц, служащих контрастирующими агентами, проведены с помощью системы «ОКТ-1300У» (центральная длина волны зондирования 910 нм). В качестве фантома биологической ткани использовался 0.3%-ный агаровый гель, на поверхность которого наносились капли суспензий с кремниевыми наночастицами.

Численное моделирование ОКТ-изображений проводилось с помощью алгоритма, основанного на методе Монте-Карло [41]. Оптические характеристики наночастиц кремния различных размеров, использованные при моделировании, вычислялись согласно теории Ми [42].

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Структурные и оптические свойства кремниевых наносистем

Анализ ПЭМ-изображений кремниевых наночастиц, полученных методом пикосекундной лазерной абляции в воде, выявил наличие двух фракций, обладающих, согласно нашим предыдущим исследованиям, высокой степенью кристалличности [29, 40]. Это частицы относительно малого размера – от 2 до 40 нм (рис. 1, а), и большие кластеры – от 70 до 200 нм (рис. 1, б). Первый тип наночастиц формируется, вероятнее всего, согласно классическому

механизму, когда в результате столкновения с молекулами буферной среды (в рассматриваемом случае это вода) происходят торможение и агломерация продуктов абляции кремния в наночастицы [43]. Второй тип частиц, по нашему мнению, является продуктом либо коалесценции частиц первого типа при достаточно высоких температурах, обуславливаемых облучением лазерными импульсами, либо различия скоростей продуктов абляции согласно теории [44] и нашим предыдущим исследованиям динамики пикосекундной лазерной абляции кремния [45]. Суть объяснения заключается в следующем. Результатом абляции мишени является возникновение двух компонентов продуктов абляции – «быстрого» и «медленного». Первый связан с более быстрыми аблированными атомами, которые практически не испытали столкновений в процессе своего разлета, а следовательно, эффективность агломерации в наночастицы в этом случае мала – формируется их фракция меньшего размера. В случае же существования компонента с меньшей скоростью число столкновений с молекулами буферной среды существенно увеличивается, что в свою очередь приводит к более эффективной агломерации в наночастицы большего размера.

Наличие фракции крупных наночастиц в небольшой концентрации подтверждается также данными ДРС: в распределении частиц по размерам, представленном на рис. 1, в, наблюдается характерный излом зависимости при 100 нм. Для наглядности разделения фракций малых и крупных частиц на рис. 1, в проведена штриховая линия. Следует отметить, что представленное распределение интегрально отражает наличие только частиц размером 30–200 нм. Отсутствие наночастиц размером менее 30 нм, наблюдаемых с помощью ПЭМ, объясняется малой эф-

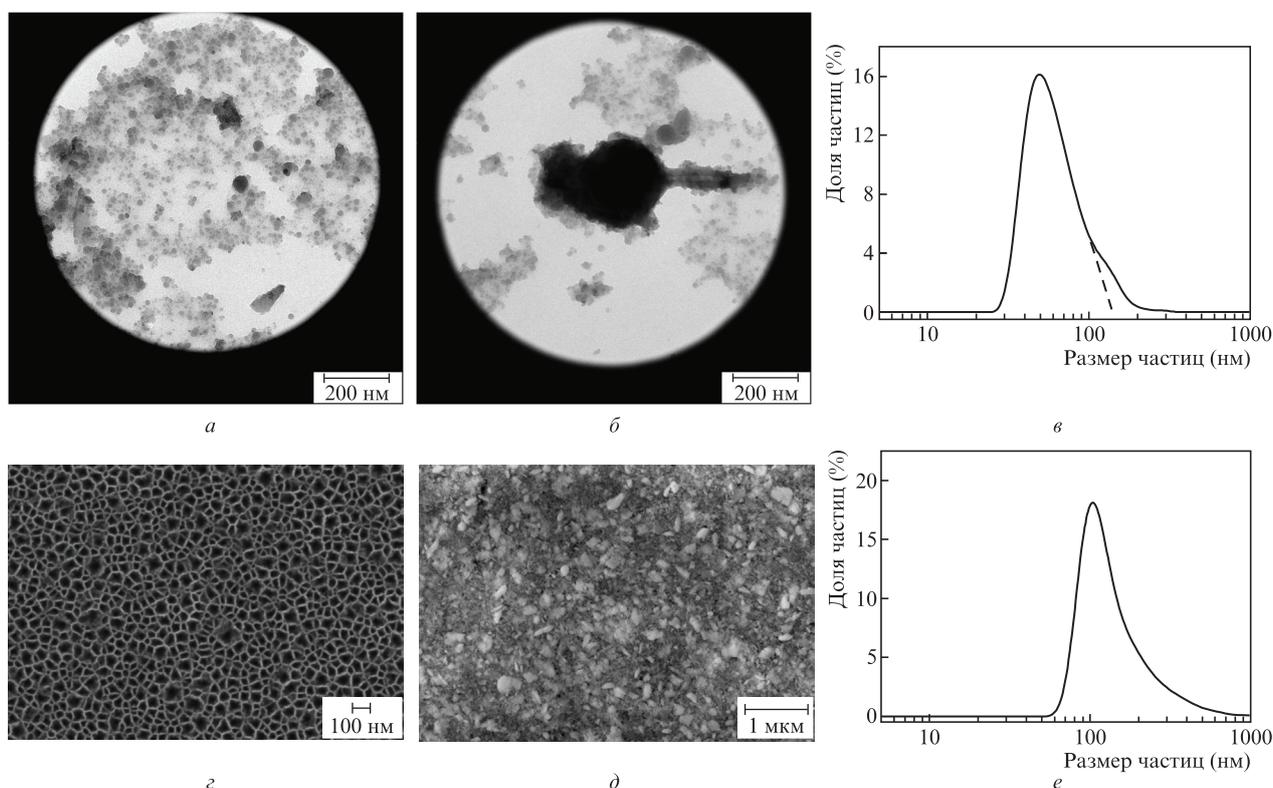


Рис. 1. ПЭМ-изображения (а, б) и распределение по размерам (в) кремниевых наночастиц, сформированных методом пикосекундной лазерной абляции в воде. Штриховая линия на рис. 1, в нанесена для визуального отделения вклада фракций крупных наночастиц в распределение. РЭМ-изображения поверхности исходной (с) и измельченной с помощью планетарной мельницы (д) пленки ПК, а также распределение по размерам частиц в полученном порошке ПК (е).

фективностью светорассеяния ими применительно к методу ДРС и завышением гидродинамического радиуса в данном распределении по сравнению с реальным. Последнее обусловлено умеренной стабильностью исследуемой суспензии, характеризующейся измеренным значением электрокинетического потенциала -31.4 ± 0.9 мВ, и возможностью такого сближения наночастиц (рис.1,*а*), когда они при рассеянии воспринимаются, вероятнее всего, как один агломерат. Тем не менее с учетом сказанного данные ДРС находятся в хорошем качественном согласии с данными ПЭМ.

Пленки ПК, сформированные методом электрохимического травления при описанных выше условиях, имеют характерный размер пор от 10 до 70 нм (рис.1,*з*). Такие структуры согласно классификации Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) можно классифицировать как мезопористые [46]. С точки зрения оптики подобные среды также следует считать мезоскопическими для видимого и ближнего ИК диапазонов спектра, поскольку для излучения данных длин волн ПК, равно как и порошки на его основе, нельзя считать однородным, а его размеры – сравнимыми с атомарными. Иными словами, такие среды классифицируются как случайно-неоднородные. Аналогичное утверждение может быть распространено и на наночастицы, сформированные методом лазерной абляции.

С целью практического использования в задаче контрастирования фантома биоткани пленки ПК были измельчены с помощью планетарной мельницы в порошок, РЭМ-изображение которого представлено на рис.1,*д*. Порошок преимущественно состоит из кластеров размером от 50 до 300 нм, которые, в свою очередь, образованы кремниевыми нанокристаллами, представлявшими собой до измельчения основу ПК. Изготовленный таким образом порошок растворялся в воде для дальнейшего исследования методами спектрофотометрии и ОКТ.

Анализ данных ДРС изготовленной таким образом водной суспензии демонстрирует хорошее согласие с результатами, полученными РЭМ. Доля наночастиц размером 50–300 нм в представленном на рис.1,*е* распределении составляет 81%. Появление остальных наночастиц размером более 300 нм, отражаемых в распределении, может являться, как и в случае аблированных в воде наночастиц, результатом завышения гидродинамического радиуса по сравнению с реальным в исследуемом растворе кремниевые наночастицы – вода либо это могут быть реальные наночастицы, присутствующие в порошке из ПК в концентрации не более нескольких процентов из-за неоднородности помола.

Как видно из рис.1, кремниевые наночастицы, формируемые методами лазерной абляции и электрохимического травления с последующим измельчением, представляют собой ансамбли с неоднородными распределениями по размерам, существенно различающимися для каждого способа изготовления. Соответственно оптические свойства таких наносистем даже в случае равных концентраций наночастиц будут различаться вследствие зависимости эффективности рассеяния света от размера последних согласно теории Ми [47]. Поэтому для сравнения особенностей рассеяния и поглощения наночастиц в водных суспензиях их концентрации подбирались такими, чтобы коэффициенты рассеяния (μ_s) и поглощения (μ_a) света были сравнимы для каждого типа наночастиц и по порядку величины сопоставимы с 0.1 мм^{-1} (рис.2). Здесь, со-

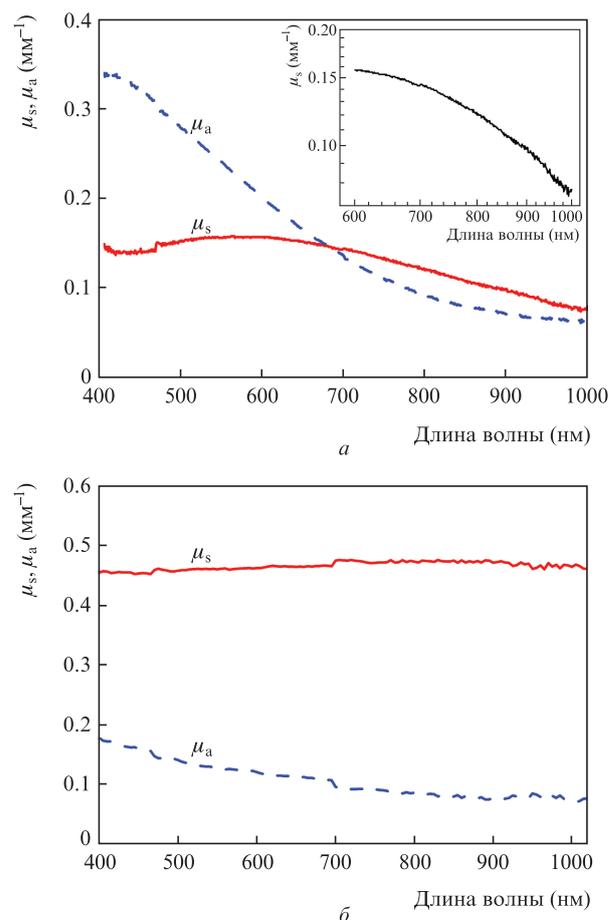


Рис.2. Коэффициенты рассеяния (μ_s) и поглощения (μ_a) кремниевых наночастиц, изготовленных методом лазерной абляции (*а*), и порошка пористого кремния (*б*) в воде. На вставке рис.2,*а* – зависимость коэффициента рассеяния от длины волны в логарифмическом масштабе для спектрального диапазона 600–1000 нм.

гласно взвешиванию высушенных суспензий кремниевых наночастиц, их массовая концентрация в случае изготовления методом лазерной абляции составила 0.17 г/л, а для измельченного ПК – 4.0 г/л. При этом, с учетом распределения по размерам этих типов наночастиц, их суммарные объемные концентрации были оценены в 1.0×10^{13} и $0.34 \times 10^{13} \text{ см}^{-3}$ для каждого типа соответственно.

Определение оптических характеристик исследуемых суспензий проводилось в спектральном интервале 400–1000 нм с использованием оригинальной аналитической модели малократного обратного рассеяния. Данная методика позволяет по измеренным спектрофотометрическим данным – спектрам коллимированного и диффузного пропускания, а также диффузного отражения – восстановить коэффициенты μ_s и μ_a [38, 48]. Восстановленные зависимости данных коэффициентов представлены на рис.2.

Монотонное уменьшение коэффициента поглощения μ_a с ростом длины волны на рис.2 для обоих типов изучаемых наносистем связано с уменьшением поглощения кремния в красной и ИК областях спектра [31]. Однако следует отметить, что в обоих рассматриваемых случаях коэффициент поглощения асимптотически стремится к 0.05 мм^{-1} , а не к нулю, как это было бы в данном спектральном диапазоне в случае кремния. Наблюдаемый эффект, по всей видимости, обусловлен вкладом поглощения воды.

Коэффициент рассеяния μ_s суспензии аблированных кремниевых наночастиц демонстрирует незначительное изменение в диапазоне 400–600 нм и монотонный спад в области длин волн свыше 600 нм (рис.2,а), тогда как для измельченного порошка ПК в воде μ_s остается практически неизменным (рис.2,б). Данное поведение может быть объяснено различием в размерах наночастиц. Относительно большие размеры частиц (50–300 нм) измельченного порошка ПК (рис.1,д) обуславливают преимущественное рассеяние Ми для выбранного спектрального диапазона. Данный тип рассеяния характеризуется слабой зависимостью от длины волны [47], что подтверждает рис.2,б.

В суспензии аблированных частиц присутствует фракция частиц с размерами 2–40 нм (рис.1,а), которая дает вклад в рассеяние, спадающее согласно теории Рэлея по закону λ^{-4} , где λ – длина волны света. Критерием применимости данной теории является ограничение размера частицы до $\sim \lambda/15$. Действительно, в рассматриваемом случае уменьшение μ_s с ростом λ проявляется начиная с 600 нм, что согласно указанному критерию соответствует размеру частицы 40 нм. Иными словами, когда длина волны становится достаточно большой для какой-либо из фракций рассматриваемых наночастиц (в нашем случае размером менее 40 нм), тогда в эксперименте оказывается возможным зарегистрировать вклад рэлеевского рассеяния. Здесь важно отметить, что наличие фракции более крупных (70–200 нм) наночастиц (рис.1,б) даже в небольших концентрациях также дает вклад в светорассеяние, что будет показано ниже (см. рис.5,б).

Однако характер этого рассеяния следует описывать в рамках теории Ми, поэтому зависимость на рис.2,а является суммой вкладов обоих типов рассеяния: в спектральной области менее 600 нм характер рассеяния описывается преимущественно теорией Ми, более 600 нм – суперпозицией обеих теорий. Справедливость последнего утверждения следует также из анализа зависимости μ_s от длины волны в диапазоне 600–1000 нм, представленной на вставке к рис.2,а в логарифмическом масштабе. Данную зависимость нельзя аппроксимировать с хорошей точностью во всем указанном диапазоне степенной функцией, представляющей собой в логарифмическом масштабе прямую линию. Поэтому определение степени функции в рассматриваемом случае может быть проведено лишь локально по наклону зависимости для узкого (не более 100 нм) интервала длин волн. Проведенные оценки показывают, что коэффициент наклона анализируемой зависимости монотонно изменяется от -0.6 в окрестности 600 нм до -2.6 в окрестности 1000 нм. Это свидетельствует о том, что с уменьшением отношения размера частицы к длине волны вклад рэлеевского рассеяния, характеризующегося степенью -4 , становится доминирующим.

Сравнительный анализ эффективности рассеяния (рис.2) показывает, что μ_s для измельченных частиц ПК не менее чем в три раза больше μ_s для аблированных наночастиц, если объемная концентрация первых вдвое меньше, чем вторых. Следовательно, можно констатировать, что эффективность светорассеяния в водных растворах кремниевых наночастиц, формируемых методом электрохимического травления с последующим механическим измельчением, примерно на порядок больше, чем у суспензий, формируемых посредством импульсной лазерной абляции. Причин, объясняющих столь существенное различие, может быть две. Первая заключается в том, что

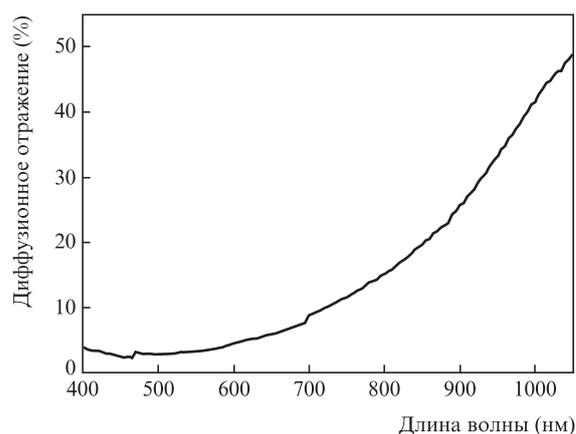


Рис.3. Спектр диффузного отражения пленки пористого кремния.

частицы большего размера обладают большим коэффициентом μ_s (см. п. 3.1), вторая – в развитой удельной поверхности ПК, способствующей увеличению актов рассеяния и, следовательно, времени жизни фотона в мезоскопической среде. Для исследуемых слоев ПК данное предположение подтверждается значительной величиной их диффузного отражения (рис.3), которое монотонно увеличивается с ростом длины волны в диапазоне 450–1050 нм и приближается к 50% в ближнем ИК диапазоне. При этом коэффициент зеркального отражения не превышает единиц процентов.

Такое значительное диффузное отражение можно объяснить именно многократным рассеянием света в мезоскопической структуре ПК. Рост сигнала с длиной волны, как было сказано выше, связан с уменьшением поглощения кремния в красной и ИК областях спектра и подтверждается монотонным уменьшением коэффициента μ_a на рис.2,б для изучаемого порошка ПК.

3.2. Экспериментальное исследование контрастирующего эффекта кремниевых наночастиц в ОКТ

Высокая эффективность рассеяния излучения ближнего ИК диапазона кремниевыми наночастицами, в частности рассеяния назад, в сочетании с малым поглощением и биосовместимостью свидетельствует об их высокой пригодности для контрастирования ОКТ-изображений биотканей. С целью исследования эффективности использования кремниевых наночастиц для контрастирования ОКТ-изображений проводилось экспериментальное сравнение обоих изучаемых типов наночастиц: формируемых методом лазерной абляции и механически измельченного в порошок ПК.

Для сопоставления эффективности использования данных двух типов наночастиц были получены ОКТ-изображения поверхности агарового геля, использующегося в качестве фантома биоткани и покрытого как суспензией наночастиц, изготовленных методом лазерной абляции (рис.4,а), так и порошком ПК (рис. 4,б). В первом случае на поверхность наносилась капля исследуемой суспензии. Большинство частиц, не проникая в глубь агарового геля, оседало на границе раздела, тем самым приводя к возрастанию ее контраста. Во втором случае поверхность агара непосредственно покрывалась слоем порошка пористого кремния, при этом контраст повышался в результате многократного рассеяния. Следует отметить, что при использовании суспензии даже с учетом оседания ча-

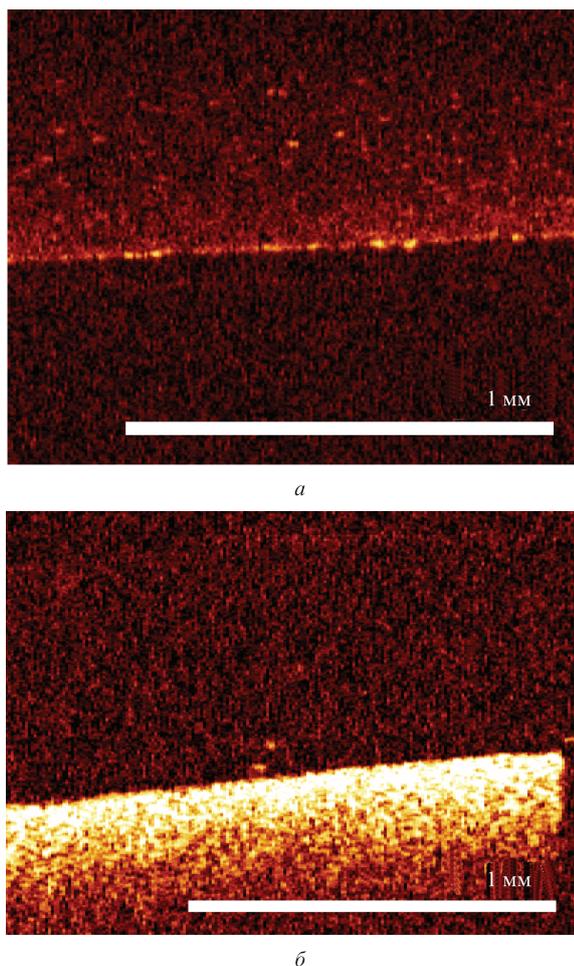


Рис.4. ОКТ-изображения поверхности агарового геля, покрытого суспензией кремниевых наночастиц, изготовленной методом лазерной абляции в воде (а), и порошком пористого кремния (б). Центральная длина волны зондирования 910 нм.

стиц их концентрация на поверхности агарового фантома была существенно ниже, чем в случае использования порошка. Это приводит к существенному различию в уровнях сигнала от границы при использовании суспензии частиц, полученных методом лазерной абляции, и порошка пористого кремния (рис.4,а и б соответственно). Более того, в рассматриваемом случае окружающей средой для частиц, полученных методом лазерной абляции, является вода, а для частиц ПК – воздух, что приводит к большому скачку показателя преломления и, следовательно, к более эффективному рассеянию. Следует отметить, что в отсутствие частиц сигнал от границы фантома находится на уровне шума и не превышает 5 дБ. При использовании кремниевых наночастиц максимальный контраст границы в перечисленных случаях составил 14 и 30 дБ соответственно для частиц, полученных методом лазерной абляции, и порошка ПК, что характеризует оба типа частиц как эффективные контрастирующие агенты.

Следует отметить, что наблюдаемое различие значений контраста изображений фантома для частиц разных типов при сравнимых объемных концентрациях хорошо согласуется с результатами, полученными методом спектрофотометрии для коэффициента μ_s (рис.2), поскольку рассеяние в ПК также значительно эффективнее, чем для аблированных наночастиц, за счет больших размеров и развитой удельной поверхности (см. п. 3.1). С другой сто-

роны, наночастицы с размерами более 100 нм не всегда подходят для конкретных применений в диагностике биологических или биоподобных тканей ввиду сложности их введения в исследуемые объекты, а также большего времени биодеградации, чем в случае частиц меньшего размера.

Таким образом, несмотря на показанную для широкого класса кремниевых наночастиц биосовместимость, исследования биологической безопасности рассматриваемых частиц пока не проводились, поэтому наши исследования ограничиваются экспериментом с фантомом.

3.3. Численное моделирование контрастирующего эффекта кремниевых наночастиц в ОКТ

Предварительное сопоставление результатов оценок и данных ПЭМ, РЭМ и ДРС показало, что основной вклад в оптические характеристики дают частицы больших размеров, находясь в суспензии даже в относительно небольших концентрациях (порядка единиц процентов от общего числа частиц).

Более точно оценить эффективность кремниевых наночастиц в качестве контрастирующих агентов в реальных биотканях до получения информации об их биосовместимости позволяет численное моделирование. При моделировании двух- и трехмерных ОКТ-изображений наиболее эффективным является метод Монте-Карло, поскольку он позволяет учесть сложную геометрию и оптические неоднородности биотканей.

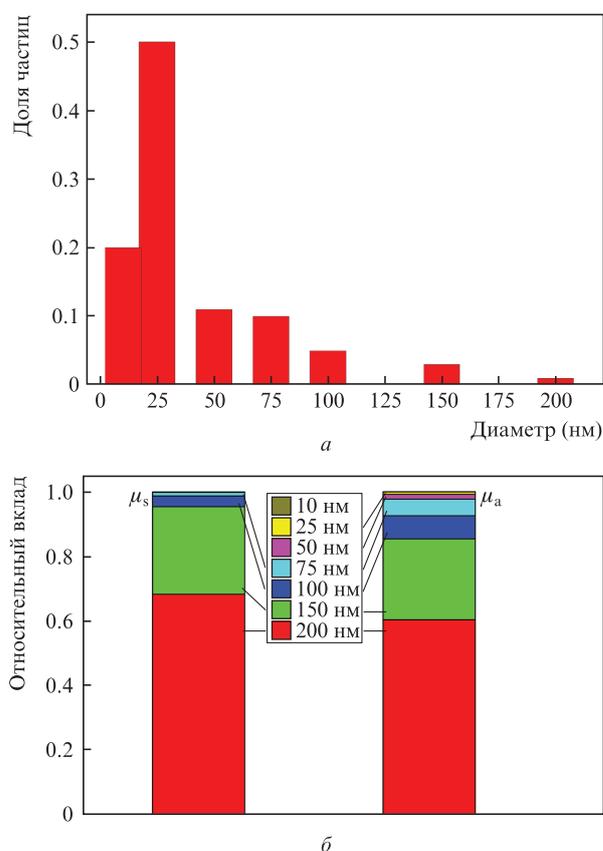


Рис.5. Распределение кремниевых частиц в суспензии по размерам, использованное при моделировании (а), и относительный вклад частиц различных диаметров в величины коэффициентов рассеяния и поглощения суспензии (б). Цветной вариант рис.5 помещен на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

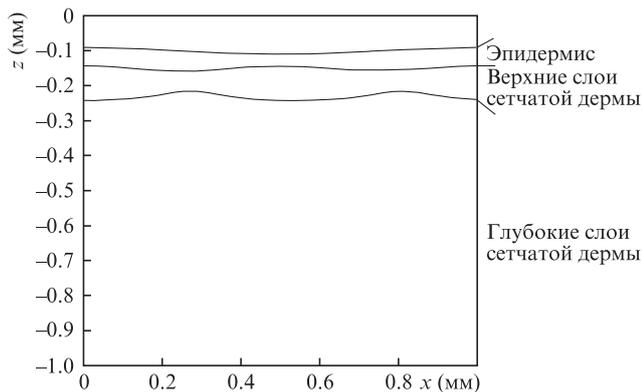


Рис.6. Многослойная модель кожи, использованная при моделировании.

С помощью теории Ми были оценены оптические свойства суспензий кремниевых наночастиц различного диаметра с характерной для исследуемых наносистем, как было показано выше, объемной концентрацией 10^{13} см^{-3} .

Следует отметить, что данный подход априори предполагает сферическую форму рассеивателей. Однако в рамках проводимого анализа оптических свойств суспензий, когда присутствуют стохастически ориентированные рассеиватели несферической формы (см. рис.1,д), данная теория также применима для оценки характеристик рассеяния, когда μ_s и μ_a могут быть получены либо как решение Ми для сферы с эффективным радиусом, либо как ряд решений Ми по различным радиусам.

При моделировании использовалось распределение частиц по размерам, представленное на рис.5,а, и рассматривалась суспензия с суммарной концентрацией 10^{13} см^{-3} . Данное распределение обеспечивает следующие оптические свойства суспензии: $\mu_s = 7.78 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_a = 0.05 \text{ мм}^{-1}$, $g = 0.36$, где g – фактор анизотропии (средний косинус угла рассеяния). Относительный вклад частиц различных размеров в величины оптических свойств отображен на рис.5,б.

В качестве модельной биоткани рассматривалась многослойная модель кожи человека, изображенная на рис.6. Оптические свойства слоев, использованные при моделировании, получены усреднением имеющихся в литературе данных и представлены в табл.1. Модельное изображе-

Табл.1. Оптические параметры слоев кожи.

Слой кожи	μ_s (мм^{-1})	μ_a (мм^{-1})	g	n
Роговой слой*				
Эпидермис	5	0.015	0.95	1.37
Верхние слои сетчатой дермы	12	0.02	0.85	1.4
Глубокие слои сетчатой дермы	12	0.1	0.9	1.39

Примечание. Роговой слой моделируется шероховатостью поверхности амплитудой 4 мкм; n – показатель преломления.

ние (рис.7,б) соответствует морфологическому строению кожи человека и находится в согласии с экспериментальным ОКТ-изображением кожи (рис.7,а). Преимущество численного моделирования перед экспериментом заключается в возможности моделирования ОКТ-системы с детектором более высокой чувствительности, что обеспечивает большую глубину визуализации.

При моделировании считалось, что в коже присутствует структурный элемент сферической формы радиусом 50 мкм, который не отличается по оптическим свойствам от окружающих биотканей, однако способен аккумулировать наночастицы в концентрации, соответствующей концентрации частиц в суспензии. В этом случае коэффициенты поглощения и рассеяния аддитивно добавляются к фоновым значениям коэффициентов биоткани. ОКТ-изображения кожи моделировались для различных глубин залегания наночастиц (рис.8). Такая неоднородность является модельным изображением волосяной луковицы, поры или протоки, способных накапливать наночастицы при поверхностном нанесении или инъекции.

При рассмотренных глубинах залегания сферическая неоднородность эффективно контрастируется на изображении, хотя ее контраст с увеличением глубины залегания контрастируемой области снижается. При глубинах 100–200 мкм на модельных ОКТ-изображениях под контрастируемой областью наблюдается существенное снижение ОКТ-сигнала, обусловленное значительным ослаблением зондирующего пучка неоднородностью.

Таким образом, результаты численного моделирования продемонстрировали, что рассматриваемые частицы при использовании их на поверхности кожи и на глубинах не более 200 мкм, соответствующих эпидермису и

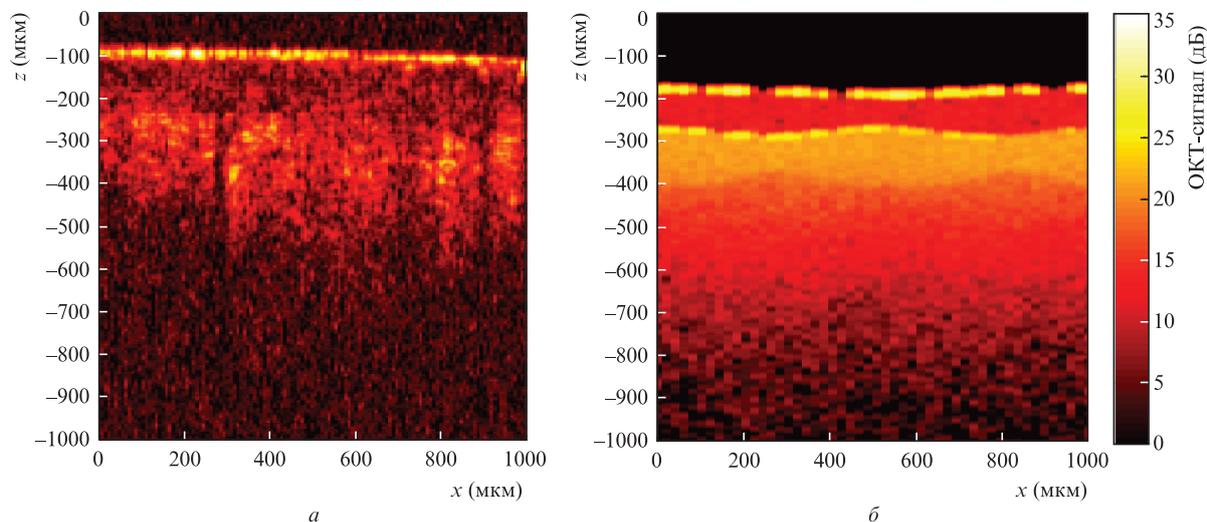


Рис.7. Экспериментальное (а) и модельное (б) ОКТ-изображения кожи человека.

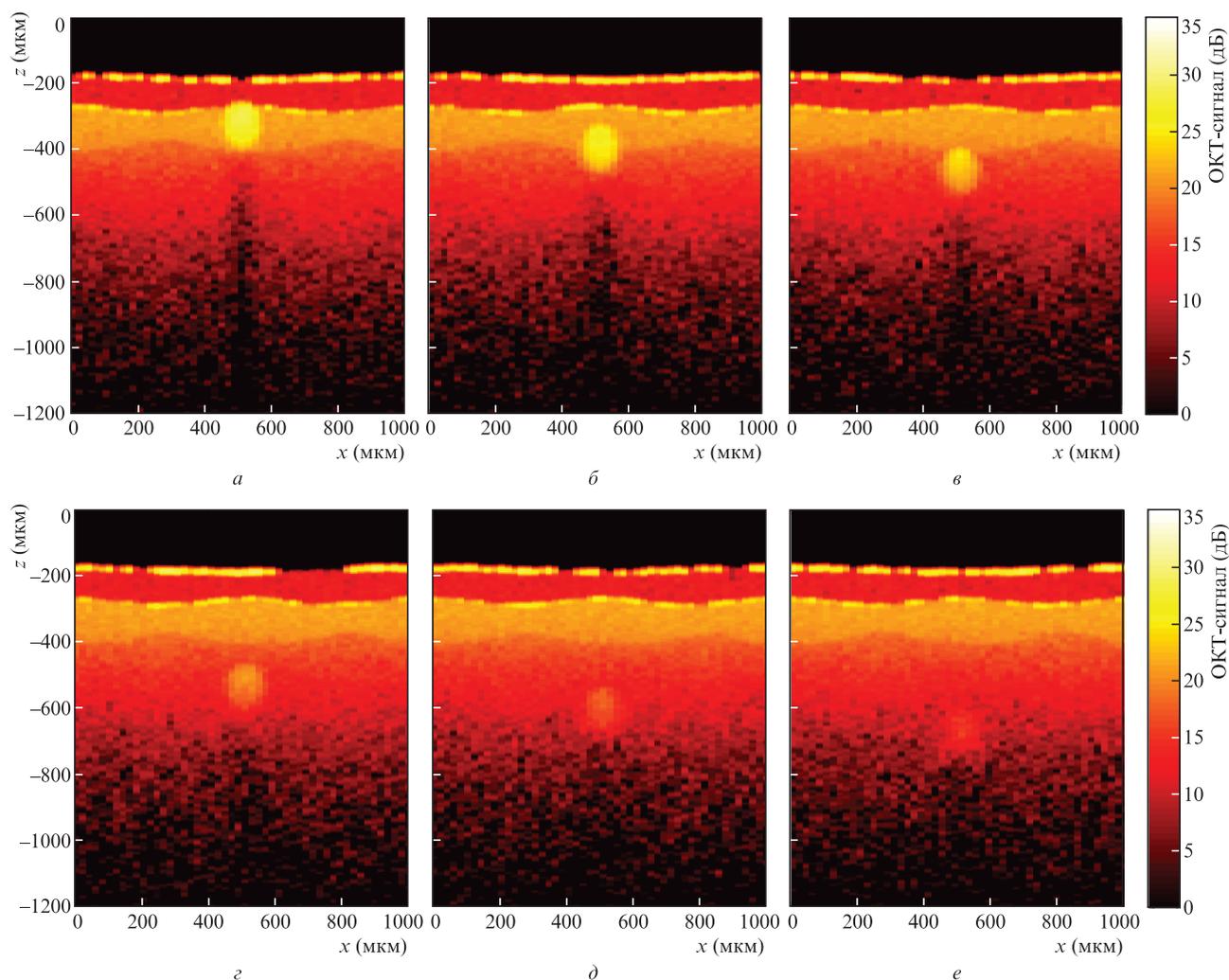


Рис.8. Модельные ОКТ-изображения кожи человека в присутствии сферической неоднородности радиусом 50 мкм, контрастированной суспензией кремниевых наночастиц с концентрацией 10^{13} см^{-3} , для глубин ее залегания 100 (а), 150 (б), 200 (в), 250 (з), 300 (д) и 350 мкм (е).

верхним слоем сетчатой дермы (см. рис.6), обладают высоким потенциалом в качестве контрастирующего агента в ОКТ.

Как было сказано выше, экспериментальное определение концентрации наночастиц при их проникновении в различные структурные слои реальных биотканей в настоящей работе не проводилось. Тем не менее осуществленная нами визуализация фантома биоткани из агарового геля и расчеты показывают, что концентрации используемых кремниевых наночастиц 10^{13} см^{-3} вполне достаточно для эффективного контрастирования как минимум поверхности. Более того, если предполагать, что суспензия проникает к поры ткани в неизменном виде, указанная концентрация и высокий контраст также вполне достижимы.

4. Заключение

В работе проведен сравнительный анализ двух типов кремниевых наночастиц – наночастиц, полученных методом лазерной абляции в жидкостях, и наночастиц пористого кремния, полученных методом электрохимического травления с последующим механическим измельчением. Исследования с применением методов электронной микроскопии показали, что первый тип частиц характеризуется двумя преобладающими фракциями – с размера-

ми 2–40 нм и 70–200 нм, тогда как второй тип состоит из одной фракции, размеры частиц в которой варьируются от 50 до 300 нм. Исследование оптических свойств данных наночастиц показало эффективное рассеяние излучения видимого и ближнего ИК диапазонов, что позволило предположить перспективность применения частиц в качестве контрастирующих агентов в методе ОКТ, подтвержденную в эксперименте с фантомом биоткани. Численное моделирование ОКТ-изображений биоткани со сложной структурой, имитирующей кожу человека, в случае локального присутствия кремниевых наночастиц также подтвердило их эффективность как контрастирующих агентов, причем было показано, что подавляющий вклад в этот эффект дает фракция крупных (150–300 нм) частиц.

Изготовление частиц, исследование их физических свойств и экспериментальные ОКТ-исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-32-20227). Численное моделирование проведено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (договор № 14.Z50.31.0022). Авторы благодарны А.А.Ежову, С.С.Абрамчуку и Д.Е.Преснову в получении ПЭМ- и РЭМ-изображений кремниевых наночастиц.

1. Kim H.-Y., Lee K., Lee J.W., Kim S., Kim G.-T., Duesberg G.S. *J. Appl. Phys.*, **114** (14), 144503 (2013).
2. Li Y., Qian F., Xiang J., Lieber C.M. *Mat. Today*, **9** (10), 18 (2006).

3. Mamichev D.A., Gonchar K.A., Timoshenko V.Yu., Mussabek G.K., Nikulin V.E., Taurbaev T.I. *J. Raman Spectrosc.*, **42** (6), 1392 (2011).
4. Chen S., Xie Y., De A., van den Berg A., Carlen E.T. *Appl. Phys. Lett.*, **103** (17), 173702 (2013).
5. Zörgiebel F.M., Pregl S., Römhildt L., Opitz J., Mikolajick T., Baraban L., Cuniberti G. *Nano Res.*, **7** (2), 263 (2014).
6. Huang Y., Duan X., Lieber C.M. *Small*, **1** (1), 142 (2005).
7. Tian B., Zheng X., Kempa T.J., Fang Y., Yu N., Yu G., Huang J., Lieber C.M. *Nature*, **449** (7164), 885 (2007).
8. Emelyanov A.V., Khenkin M.V., Kazanskii A.G., Forsh P.A., Kashkarov P.K., Gecevicius M., Beresna M., Kazansky P.G. *Thin Solid Films*, **556**, 410 (2014).
9. Park J.-H., Gu L., von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. *Nature Mater.*, **8** (4), 331 (2009).
10. Gongalsky M.B., Kharin A.Yu., Osminkina L.A., Timoshenko V.Yu., Jeong J., Lee H., Chung B.H. *Nanoscale Res. Lett.*, **7**, 446 (2012).
11. Blandin P., Maximova K.A., Gongalsky M.B., Sanchez-Royo J.F., Chirvony V.S., Sentsis M., Timoshenko V.Yu., Kabashin A.V. *J. Mater. Chem. B*, **1** (19), 2489 (2013).
12. Gongalsky M.B., Osminkina L.A., Pereira A., Manankov A.A., Fedorenko A.A., Vasiliev A.N., Solovyev V.V., Kudryavtsev A.A., Sentsis M., Kabashin A.V., Timoshenko V.Yu. *Sci. Rep.*, **6**, 24732 (2016).
13. Рябчиков Ю.В., Белогорохов И.А., Гонгальский М.Б., Осминкина Л.А., Тимошенко В.Ю. *Физика и техника полупроводников*, **45** (8), 1090 (2011).
14. Gongalsky M.B., Kharin A.Yu., Zagorodskih S.A., Osminkina L.A., Timoshenko V.Yu. *J. Appl. Phys.*, **110** (1), 013707 (2011).
15. Osminkina L.A., Gongalsky M.B., Motuzuk A.V., Timoshenko V.Yu., Kudryavtsev A.A. *Appl. Phys. B*, **105** (3), 665 (2011).
16. Osminkina L.A., Tamarov K.P., Sviridov A.P., Galkin R.A., Gongalsky M.B., Solovyev V.V., Kudryavtsev A.A., Timoshenko V.Yu. *J. Biophoton.*, **5** (7), 529 (2012).
17. Rioux D., Laferriere M., Douplik A., Shah D., Lilje L., Kabashin A.V., Meunier M.M. *J. Biomed. Opt.*, **14**, 021010 (2009).
18. Ксенофонтова О.И., Васин А.В., Егоров В.В., Бобыль А.В., Солдатенков Ф.Ю., Теруков Е.И., Улин В.П., Улин Н.В., Киселев О.И. *ЖТФ*, **84** (1), 67 (2014).
19. Kilpeläinen M., Riikonen J., Vlasova M.A., Huotari A., Lehto V.P., Salonen J., Herzig K.H., Järvinen K. *J. Control. Release.*, **137**, 166 (2009).
20. Low S.P., Williams K.A., Canham L.T., Voelcker N.H. *Biomaterials*, **27**, 4538 (2006).
21. Laaksonen T., Santos H., Vihola H., Salonen J., Riikonen J., Heikkilä T., Peltonen L., Kumar N., Murzin D.Yu., Lehto V.-P., Hirvonen J. *J. Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1913 (2007).
22. Chiappini C., Liu X., Fakhoury J.R., Ferrari M. *Adv. Funct. Mater.*, **20**, 2231 (2010).
23. Gu L., Ruff L.E., Qin Z., Corr M., Hedrick S.M., Sailor M.J. *Adv. Mater.*, **24**, 3981 (2012).
24. Besner S., Kabashin A.V., Winnik F.M., Meunier M. *Appl. Phys. A*, **93**, 955 (2008).
25. Correard F., Maximova K., Estève M.-A., Villard C., Roy M., Al-Kattan A., Sentsis M., Gingras M., Kabashin A.V., Braguer D. *Int. J. Nanomed.*, **9**, 5415 (2014).
26. Omelchenko A.I., Sobol E.N., Simakin A.V., Serkov A.A., Sukhov I.A., Shafееv G.A. *Laser Phys.*, **25**, 025607 (2015).
27. Soshnikova Yu., Omelchenko A., Shekhter A., Sobol E. *Magnetite Nanoparticles for Diagnostics and Laser Repair of Cartilage in Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering. Applications of Nanobiomaterials* (Amsterdam: Elsevier, 2016, Vol. 4).
28. Soshnikova Yu.M., Roman S.G., Chebotareva N.A., Baum O.I., Obrezkova M.V., Gillis R.B., Harding S.E., Sobol E.N., Lunin V.V. *J. Nanopart. Res.*, **15**, 2092 (2013).
29. 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).
30. Kuzmin P.G., Shafееv G.A., Bukin V.V., Garnov S.V., Farcau C., Carles R., Warot-Fontrose B., Guieu V., Viau G. *J. Phys. Chem.*, **114**, 15266 (2010).
31. Kusi-Appiah A.E., Mastronardi M.L., Qian C., Chen K.K., Ghazanfari L., Prommapan P., Kübel C., Ozin G.A., Lenhart S. *Sci. Rep.*, **7**, 43731 (2017).
32. Shiohara A., Prabakar S., Faramus A., Hsu C.-Y., Lai P.-S., Northcote P.T., Tilley R.D. *Nanoscale*, **3**, 3364 (2011).
33. Philipp H.R., Taft E.A. *Phys. Rev.*, **120** (1), 37 (1960).
34. Kirillin M.Yu., Shirmanova M.V., Sirotkina M.A., Bugrova M.L., Khlebtsov B.N., Zagaуnova E.V. *J. Biomed. Opt.*, **14**, 021017 (2009).
35. Хлебцов Н.Г. *Квантовая электроника*, **38** (6), 504 (2008) [*Quantum Electron.*, **38** (6), 504 (2008)].
36. Popov A.P., Zvyagin A.V., Lademann J., Roberts M.S., Sanchez W., Priezhev A.V., Myllylä R. *J. Biomed. Nanotech.*, **6** (5), 432 (2010).
37. John S., Marpu S., Li J., Omary M., Hu Z., Fujita Y., Neogi A. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **10** (3), 1707 (2010).
38. Kirillin M.Yu., Sergeeva E.A., Agrba P.D., Krainov A.D., Ezhov A.A., Shuleiko D.V., Kashkarov P.K., Zaboltnov S.V. *Laser Phys.*, **25** (7), 075604 (2015).
39. Tearney B., Bouma B. (eds.) *Handbook of Optical Coherence Tomography* (Boca Raton: CRC Press, 2001).
40. Perminov P.A., Dzhun I.O., Ezhov A.A., Zaboltnov S.V., Golovan L.A., Ivlev G.D., Gatskevich E.I., Malevich V.L., Kashkarov P.K. *Laser Phys.*, **21** (4), 801 (2011).
41. Kirillin M., Meglinski I., Kuzmin V., Sergeeva E., Myllylä R. *Opt. Express*, **18** (21), 21714 (2010).
42. Bohren C.F., Huffman D.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (New York: Wiley-Interscience, 2010).
43. Петров Ю.И. *Кластеры и малые частицы* (М.: Наука, 1986).
44. Wood R.F., Leboeuf J.N., Geohagan D.B., Poretzky A.A., Chen K.R. *Phys. Rev. B*, **58** (3), 1533 (1998).
45. Алехин А.И., Перминов П.А., Заботнов С.В., Головань Л.А., Кашкаров П.К. *Оптич. журн.*, **78** (3), 10 (2011).
46. Rouquerol J., Avnir D., Fairbridge C.W., Everett D.H., Haynes J.H., Pernicone N., Ramsay J.D.F., Sing K.S.W., Unger K.K. *Pure Appl. Chem.*, **66**, 1739 (1994).
47. Матвеев А.Н. *Оптика* (М.: Высшая школа, 1985).
48. Логинова Д.А., Сергеева Е.А., Крайнов А.Д., Агрба П.Д., Кириллин М.Ю. *Квантовая электроника*, **46** (6), 528 (2016) [*Quantum Electron.*, **46** (6), 528 (2016)].