

Влияние рассеяния света на определение температуры биологической ткани по спектрам фотолюминесценции ап-конверсионных наночастиц

И.Ю.Янина, Е.К.Волкова, Е.А.Сагайдачная, В.И.Кочубей, В.В.Тучин

Спектры фотолюминесценции ап-конверсионных наночастиц $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$, помещенных под слой жировой ткани, измерялись в широком температурном диапазоне. Показано, что при определении температуры наночастиц по спектрам возникает ошибка, вызванная искажением данных вследствие рассеяния света в образце. Разработан алгоритм коррекции, позволяющий устранить эту ошибку.

Ключевые слова: ап-конверсионные наночастицы, жировая ткань, спектры фотолюминесценции, просветление, лазер, термометрия.

1. Введение

Использование наночастиц (НЧ) в качестве термометров для точного бесконтактного определения температуры с микронным пространственным разрешением в реальном времени является важным для многих практических применений как в лазерной медицине, так и в биологии [1–3].

Современные флуоресцентные нанотермометры позволяют достаточно точно (до десятых долей градуса) измерять локальную температуру в тонком слое биологического объекта [4]. Ее определяют по температурно-зависимому изменению люминесцентных характеристик НЧ. В качестве таких характеристик могут использоваться изменение интенсивности фотолюминесценции вследствие температурного тушения [4–6] и смещение ее спектральной полосы, т. к. для ряда НЧ положение и величина максимума спектра флуоресценции зависят от температуры окружающей среды [5, 7].

Однако детектирование фотолюминесценции НЧ, локализованных в глубине биологических тканей, является затруднительным [8]. При использовании люминесцирующих НЧ для биологических задач необходимо учитывать, что на полученный результат влияет взаимодействие излучения с биологической средой. Вследствие эф-

фектов многократного рассеяния и перепоглощения излучения в биологических тканях регистрируемые спектры возбуждения, фотолюминесценции и поглощения НЧ будут искажаться.

Поглощение фотолюминесценции внутри образца зависит как от показателя поглощения, так и от степени рассеяния фотолюминесценции средой на данной длине волны. Указанные параметры зависят от длины волны, поэтому степень ослабления излучения различна в пределах достаточно широкой спектральной области как для фотолюминесценции, так и для возбуждающего ее излучения.

В качестве нанотермометров могут применяться ап-конверсионные наночастицы (АКНЧ), способные поглощать несколько фотонов в ближнем ИК диапазоне с последующей эмиссией в видимой области спектра. Использование ап-конверсии дает ряд преимуществ по сравнению с обычной люминесценцией, таких как большая глубина проникновения лазерного излучения, возбуждающего фотолюминесценцию НЧ, и практически полное отсутствие собственной фотолюминесценции биологической ткани в спектральной области излучения АКНЧ, что позволяет исключить фоновый сигнал от биоткани [9–13]. Измерение температуры АКНЧ проводится путем регистрации отношения интенсивностей близкорасположенных полос фотолюминесценции. Поскольку интенсивность фотолюминесценции пропорциональна населенности возбужденного уровня, отношение интенсивностей близкорасположенных полос описывается законом Больцмана:

$$I_1(\lambda_1)/I_2(\lambda_2) = C \exp[-\Delta E/(k_B T)], \quad (1)$$

где $I_1(\lambda_1)$ и $I_2(\lambda_2)$ – интенсивности излучения на двух переходах; C – нормировочная постоянная, зависящая от степени вырождения уровней энергии, вероятностей спонтанного излучения и энергий излучаемых фотонов; ΔE – разность энергий возбужденных уровней; k_B – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура.

Возможность применения в качестве нанотермометров, например, частиц $\text{NaYF}_4 : \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ определяется чувствительностью к температуре интенсивностей полос

И.Ю.Янина, Е.К.Волкова, В.И.Кочубей. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; e-mail: irina-yanina@yandex.ru, saratov_gu@mail.ru

Е.А.Сагайдачная. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83

В.В.Тучин. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая 24; e-mail: tuchinvv@mail.ru

Поступила в редакцию 28 сентября 2018 г., после доработки – 30 ноября 2018 г.

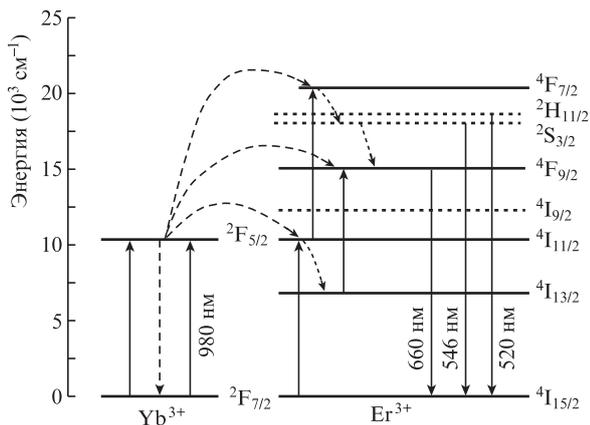


Рис.1. Схема энергетических уровней в системе ионов Yb^{3+} и Er^{3+} .

фотолюминесценции иона Er^{3+} в зеленой области, соответствующих переходам $4\text{S}_{3/2} \rightarrow 4\text{I}_{15/2}$ ($\lambda_1 = 546$ нм) и $4\text{H}_{11/2} \rightarrow 4\text{I}_{15/2}$ ($\lambda_2 = 520$ нм). Возбуждение уровня $2\text{F}_{5/2}$ иона Yb^{3+} и последующая передача энергии иона Yb^{3+} иону Er^{3+} приводят к переходу акцептора на уровень $4\text{F}_{7/2}$ с последующим переходом на уровень $4\text{S}_{3/2}$ в результате безызлучательной релаксации (рис.1). При этом в ходе установления теплового равновесия заселяется и уровень $2\text{H}_{11/2}$. Ион Er^{3+} может переходить в основное состояние с уровней $4\text{S}_{3/2}$ и $2\text{H}_{11/2}$, излучая в зеленой области спектра на длинах волн ~ 550 и ~ 525 нм соответственно. Каждая полоса состоит из нескольких узких эмиссионных пиков, обусловленных штарковским расщеплением нижнего уровня [4].

Нами рассчитаны значения натурального логарифма отношения интенсивностей фотолюминесценции НЧ на $\lambda_1 = 546$ нм и $\lambda_2 = 520$ нм, температурная зависимость которого аппроксимируется как

$$\ln(I_2/I_1) = -\ln C + \Delta E/(k_B T) = A + B/T. \quad (2)$$

Согласно расчетам, погрешность измерения интенсивности люминесценции 1% дает ошибку в определении температуры 0.6°C. Неточность определения угла наклона зависимости B , равная 1%, приводит к ошибке в 3°C. В свою очередь изменение параметра A на 1% дает ошибку в 2°C.

При этом коэффициент A зависит от условий эксперимента. В частности, регистрируемые интенсивности люминесценции отличаются от интенсивностей люминесценции I_1 и I_2 наночастиц вследствие ее ослабления в результате рассеяния и поглощения в образце.

Целью настоящей работы является исследование влияния рассеяния и поглощения света в образце на точность измерения температуры НЧ, помещенных в биологическую ткань.

2. Материалы и методы

Для определения локальной температуры биологической ткани использовались синтезированные нами термочувствительные АКНЧ $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$, помещенные в пленку из ацетата целлюлозы. НЧ были синтезированы гидротермальным способом и покрыты оболочкой SiO_2 [14]. Средний размер частиц составлял 150 нм (рис.2). Для изготовления пленки 1 г триацетата целлюлозы растворялся в 1 мл ацетона. В раствор добавлялся порошок

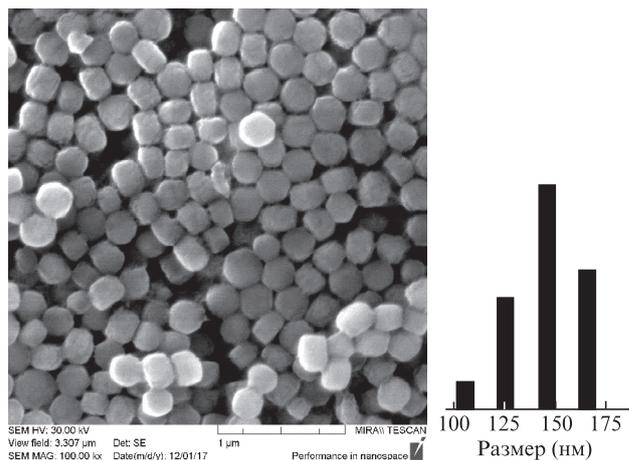


Рис.2. Изображение АКНЧ $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$, полученное при помощи сканирующего электронного микроскопа MIRA 2 LMU (TESCAN) (а), и распределение НЧ по размерам (б).

НЧ (1 мг). После перемешивания и гомогенизации ультразвуком раствор помещался на поверхность стекла и медленно высушивался. Полученная пленка с концентрацией НЧ 0.1 мас.% имела толщину 150 мкм.

Эксперименты проводились с использованием установки, схема которой представлена на рис.3. Возбуждение фотолюминесценции АКНЧ осуществлялось излучением лазерного модуля LSR980NL-1000 ($\lambda = 980$ нм, 108 мВт) (Lasever, Китай). Спектры фотолюминесценции АКНЧ, расположенных под слоем образца биологической ткани, регистрировались с использованием волоконно-оптического спектрометра QE6500 FL (Ocean Optics, США) с зондом, перпендикулярным поверхности образца и находящимся от нее на расстоянии 25 мм. Диаметр пучка возбуждения составлял 2.3 мм. Диаметр сердцевины приемного волокна равнялся 400 мкм, апертура волокна была равна 0.22. Перед оптоволоконным зондом помещалась коллимирующая линза диаметром 25 мм с фокусным расстоянием 10 мм. Торцевое волоконное волокно находилось в фокусе линзы. Учитывая малую толщину используемых биологических образцов, можно считать, что схема регистрации обеспечивала прием коллимированного излучения с участка поверхности образца диаметром 4.5 мм, что вдвое превышает размер области возбуждения. Для подавления рассеянного возбуждающего излучения перед спектрометром помещался фильтр СЗС21 (ГОСТ 9411-91), обеспечивающий при толщине фильтра 5 мм коэффициенты пропускания 10^{-6} на длине волны возбуждения и 0.96 в области регистрации люминесценции. Точность определения интенсивности люминесценции составляла 0.5%.

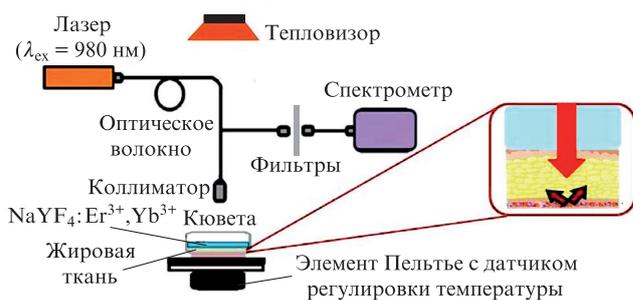


Рис.3. Схема экспериментальной установки.

Спектры коллимированного пропускания образцов ткани регистрировались при помощи многоканального спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США). Закрепленные на стекле образцы помещались между двумя оптическими волокнами QR400-1-VIS-NIR (Ocean Optics, США) с внутренними диаметрами 400 мкм. Коллимирование излучения осуществлялось коллиматорами 74-ACR (Ocean Optics, США). Источником излучения служила галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США). Ошибка измерения не превышала 5% измеренной величины. До и после спектральных измерений определялись толщины образцов. Изменение температуры осуществлялось нагревом стекла с точностью 1 °С.

В качестве биологического объекта использовались образцы абдоминальной жировой ткани *in vitro* (10 образцов), взятые в ходе пластических операций (5 мужчин в возрасте 40–50 лет весом 70–80 кг). Для исследования изготавливались тонкие (0.1–0.4 мм) срезы ткани, полученные из замороженных образцов. Экспериментальное исследование проводилось в Центре коллективного пользования Саратовского государственного медицинского университета (Россия).

Образец жировой ткани помещался внутрь стеклянной кюветы с толщиной дна 0.5 мм. На нижнюю сторону дна кюветы наклеивалась пленка с АКНЧ. Нагрев образца жировой ткани производился через дно кюветы при помощи элемента Пельтье, оснащенного регулятором температуры РТР1 (Perkin Elmer, США). Для бесконтактного измерения температуры верхней поверхности исследуемых объектов в работе использовалась тепловая инфракрасная камера (тепловизор) IRISYS IRI 4010 (120 × 160 пикселей) (Великобритания).

В результате вследствие хорошего теплового контакта температура НЧ соответствовала температуре, задаваемой элементом Пельтье. Температура НЧ изменялась от 20 до 60 °С с шагом 5 °С. Температура жировой ткани, определяемая тепловизором, отличалась от температуры НЧ на 1–3 °С.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.4 показаны полученные температурные зависимости логарифма отношения интенсивностей фотолюминесценции на длинах волн $\lambda_1 = 546$ нм и $\lambda_2 = 520$ нм полимерной пленки АКНЧ и для тех же образцов АКНЧ,

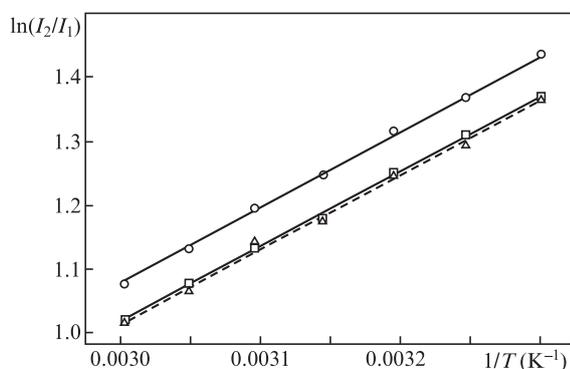


Рис.4. Температурные зависимости $\ln[I_2(\lambda_2)/I_1(\lambda_1)]$ при $\lambda_1 = 546$ нм и $\lambda_2 = 520$ нм для полимерной пленки АКНЧ (□) и такой же пленки, покрытой слоем жировой ткани толщиной 0.1 мм (○), а также зависимость для пленки АКНЧ, покрытой жировой тканью, скорректированная на поглощение и рассеяние фотолюминесценции в образце (Δ).

покрытых слоем жировой ткани толщиной 0.1 мм. Полученные зависимости смещены относительно друг друга.

Поскольку угол наклона прямой при линейной аппроксимации (2) определяется разностью энергий возбужденных уровней эрбия, можно считать его постоянным для обеих полученных экспериментальных зависимостей. В результате аппроксимации для чистой пленки нами получены следующие значения коэффициентов: $A = 2.488 \pm 0.001$, $B = 1169 \pm 0.5$. Для пленки с жировой тканью $A = 2.427 \pm 0.002$, что объясняется уменьшением интенсивности регистрируемой люминесценции при ее прохождении через жировую ткань.

Для разработки алгоритма коррекции нами получены экспериментальные данные об изменении коэффициента коллимированного пропускания жировой ткани при изменении ее температуры (рис.5). Далее для коррекции использована модель регистрации коллимированного излучения. В этом случае интенсивность регистрируемого излучения описывается формулой

$$I_{\text{рег}} = I_{\text{lum}} T_c, \quad (3)$$

где T_c – коэффициент коллимированного пропускания на длине волны регистрации люминесценции.

Тогда отношение интенсивностей фотолюминесценции в (2) преобразуется:

$$\ln \frac{I_{\text{рег}2}}{I_{\text{рег}1}} = \ln \frac{I_{\text{lum}2}}{I_{\text{lum}1}} + \ln \frac{T_{c2}}{T_{c1}} = A + \frac{B}{T} + \ln \frac{T_{c2}}{T_{c1}}. \quad (4)$$

Результат коррекции показан на рис.4. Видно, что за исключением отклонений, которые могут быть вызваны погрешностями регистрации ослабленной в образце фотолюминесценции, скорректированная кривая практически совпадает с кривой для пленки с НЧ, т.е. учет ослабления фотолюминесценции в образце позволяет получить истинное значение температуры НЧ, внедренных в образец. В результате расчета величина $A + \ln(T_{c2}/T_{c1})$ при аппроксимации составила 2.493 ± 0.003 , что существенно ближе к значению A , полученному для пленки без жира. Согласно оценке ошибка измерения температуры равна 5 °С в отсутствие коррекции и 0.5 °С при коррекции данных.

Таким образом нами показано, что поглощение и рассеяние фотолюминесценции АКНЧ в образце приводит к искажению данных о температуре НЧ, полученных из их люминесцентных характеристик. Искажение возникает даже в случае использования относительно слабопогло-

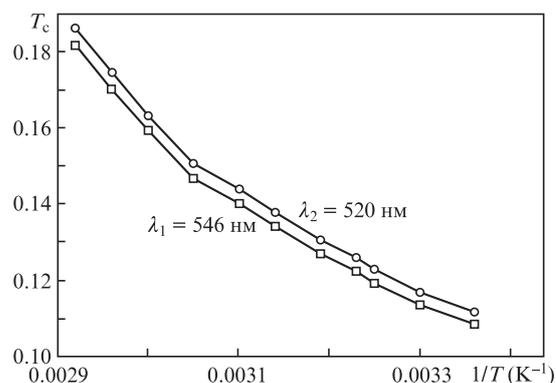


Рис.5. Температурные зависимости коэффициента коллимированного пропускания T_c образца жировой ткани для излучения с λ_1 и λ_2 .

щающей и рассеивающей свет жировой ткани толщиной ~0.1 мм. Разработан алгоритм коррекции данных, позволяющий получить значения истинной температуры НЧ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-32-00202.

1. Gota C., Okabe K., Funatsu T., Harada Y., Uchiyama S. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2766 (2009).
2. Yang J.-M., Yang H., Lin L. *ACS Nano*, **5** (6), 5067 (2011).
3. Gautherie M., Gros C.M. *Cancer*, **45**, 51 (1980).
4. Vetrone F., Naccache R., Zamarrón A., de la Fuente A.J., Sanz-Rodríguez F., Maestro L.M., Rodríguez E.M., Jaque D., Solé J.G., Capobianco J.A. *ACS Nano*, **4** (6), 3254 (2010).
5. Zhao Y., Riemersma C., Pietra F., Koole R., Donegá C. de M., Meijerink A. *ACS Nano*, **6** (10), 9058 (2012).
6. Labeau O., Tamarat P., Lounis B. *Phys. Rev. Lett.*, **90**, 257404 (2003).
7. Peng H., Stich M.I.J., Yu J., Sun Lining, Fischer L.H., Wolfbeis O.S. *Adv. Mater.*, **22**, 716 (2010).
8. Tuchin V.V. *Tissue Optics, Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics* (Bellingham, Wash.: SPIE Press, PM254, 2015).
9. Zhou N., Ni J., He R. *Nano Biomed. Eng.*, **5** (3), 131 (2013).
10. Zengliang Shi et al. *Nanotechnology*, **29**, 094001 (2018).
11. Tao Pang, Jiajun Wang. *Mater. Res. Express*, **5**, 015049 (2018).
12. Green K., Huang K., Pan H., Han G., Lim S.F. *Frontiers Chem.*, **6**, (2018).
13. Wortmann L., Suyari S., Ube T., Kamimura M., Soga K. *J. Luminesc.*, **198**, 236 (2018).
14. Sagaydachnaya E.A., Kochubey V.I., Konyukhova Ju.G. *IOP Conf. Series: J. Phys.: Conf. Ser.*, **917**, 032006 (2017).