

Трехмерная люминесцентная томографическая визуализация биотканей*

© В.В. Рочева¹, А.Г. Савельев^{1,2,¶}, А.В. Нечаев^{1,3}, А.Н. Генералова^{1,4},
В.А. Семчишен¹, А.В. Звягин^{2,5}, Е.В. Хайдуков^{1,2}

¹ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,
119333 Москва, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет),
119991 Москва, Россия

³ Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий,
119571 Москва, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

⁵ Macquarie University,
2109 Sydney, North Ryde NSW, Australia

¶e-mail: A.G.Savelyev@gmail.com

Поступила в редакцию 24.09.2018 г.

Предложен метод получения флуоресцентного томографического изображения для визуализации и диагностики тканей живого организма. Метод основан на возбуждении ИК светом люминесценции мультицветных апконвертирующих наночастиц, локализованных в глубине биоткани или имитирующего ее фантома. Регистрируя на поверхности ткани изменения формы спектра интенсивности люминесцентного излучения от люминесцентных наночастиц, возможно получить информацию о глубине их залегания. Для реализации этого подхода синтезированы апконвертирующие наночастицы на базе кристаллической матрицы β - NaYF_4 , допированной редкоземельными элементами Yb^{3+} , Er^{3+} и Tm^{3+} . Спектры люминесценции полученных наночастиц при возбуждении на длине волны 980 nm содержат три узкие полосы с максимумами на длинах волн: 540, 655 и 800 nm.

DOI: 10.21883/OS.2019.01.47060.261-18

Введение

Диффузионная оптическая томография (ДОТ) представляет собой современный метод, позволяющий неинвазивно получать информацию о пространственном распределении оптических свойств биоткани в каждой отдельной точке. Благодаря различиям в поглощении и рассеянии зондирующего излучения в здоровых и патологически измененных тканях возможно идентифицировать опухоли [1]. Однако обнаружение патологически измененных тканей существенно затруднено по причине слабого контраста получаемых изображений [2].

Одним из подходов к решению этой проблемы является введение экзогенных флуоресцентных маркеров [3]. Благодаря специфике кровообращения в опухолях вводимые в кровоток частицы аккумулируются более активно в патологически измененной ткани. Кроме того, их избирательное накопление в организме можно стимулировать путем конъюгации маркера с таргетными молекулами [4]. Таким образом, флуоресцентная диффузионная оптическая томография (ФДОТ) позволяет достичь существенного увеличения контраста между патологически измененной и здоровой тканью.

* XIII International Conference on Hole Burning, Single Molecule, and Related Spectroscopies: Science and Applications (HBSM-2018), August 6–12, 2018, Suzdal–Moscow, Russia.

В настоящей работе предложен метод ФДОТ на основе специально синтезированных люминесцентных наноразмерных апконвертирующих фосфоров (НАФ) $\text{NaYF}_4/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$. Способность эффективно конвертировать излучение ближнего ИК диапазона в линии видимого диапазона длин волн (540, 655, 800 nm) и отсутствие их фотовыцветания делают данные НАФ перспективным маркером, позволяющим получать контрастные трехмерные изображения биоткани.

Методы и подходы

НАФ синтезировались путем легирования кристаллической матрицы β - NaYF_4 ионами редкоземельных элементов Yb^{3+} , Er^{3+} и Tm^{3+} в молярной концентрации 18%, 1.4%, 0.6% соответственно. Спектр фотолюминесценции полученных НАФ при возбуждении на длине волны 980 nm характеризуется тремя узкими интенсивными спектральными полосами в окрестности длин волн 540, 655 и 800 nm.

Изготовление жидкостного фантома для имитации оптических характеристик биоткани молочной железы проводилось на основе пищевого красителя (Гранат), обладающего спектром поглощения в диапазоне длин волн 500–1000 nm близким к спектру поглощения био-

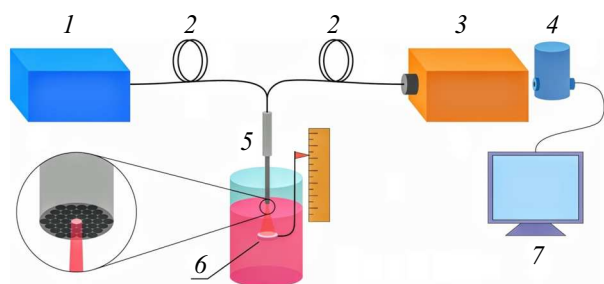


Рис. 1. Схема установки: 1 — полупроводниковый лазер, 2 — оптоволоконно-оптический зонд, 3 — монохроматор, 4 — фотоприемник, 5 — волоконно-оптический зонд, 6 — маркер, 7 — персональный компьютер. На вставке показан торец волоконно-оптического зонда.

ткани. Для имитации свойств светорассеяния биоткани применялось молоко.

Для определения глубины расположения образца, содержащего НАФ, в объеме фантома по спектрам люминесценции, регистрируемому на поверхности, была создана экспериментальная установка, изображенная на рис. 1.

Исследуемый образец погружался в жидкостный фантом с помощью микрометрической подвижки с точностью 0.1 мм. Над поверхностью фантома размещался многожильный волоконно-оптический зонд, собранный из одинаковых оптических волокон с диаметром сердцевины 400 мкм. Расстояние между зондом и поверхностью фантома устанавливалось равным 0.5 мм. Центральная жила зонда использовалась для доставки излучения возбуждения на длине волны 980 нм от полупроводникового лазера LDD-10 (АО „Полупроводниковые приборы“, Россия). Остальные волокна, вокруг центрального, использовались для регистрации, для сбора сигнала фотолюминесценции. Собранный сигнал люминесценции направлялся в монохроматор спектрофлуориметра Fluorolog 3 (Horiba JY, Франция), а затем на фотоприемник, соединенный с персональным компьютером для регистрации и дальнейшей обработки спектра.

Результаты

Эффективность применения НАФ, представляющих собой кристаллическую матрицу β - NaYF_4 , легированную редкоземельными ионами Yb^{3+} , Tm^{3+} для визуализации опухолевых тканей в малых животных, продемонстрирована в работах [5,6]. Описанная имиджинговая установка на базе полупроводникового лазера, излучающего на длине волны 975 нм, совмещенного со сканирующей системой и цифровой EMCCD-камеры с электронным умножением, позволяла *in vivo* детектировать сигнал от НАФ в опухоли спустя 1 h после инъекции. Тем не менее вопрос оценки глубины залегания маркеров остался не решенным. Основная проблема заключается в том, что разные концентрации наночастиц

на различных глубинах могут приводить к одинаковому распределению интенсивности на поверхности ткани, что делает невозможным определение координаты z по интенсивности люминесцентного сигнала на одной длине волны ($\lambda = 800$ нм).

Мы полагаем, что наиболее перспективным подходом для преодоления этого ограничения и определения глубины, на которой находится область, промаркированная наночастицами, является создание и применение мультицветных маркеров. Для этой цели были синтезированы НАФ в виде кристаллической матрицы β - NaYF_4 , легированной редкоземельными ионами Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , обладающие тремя интенсивными линиями люминесценции ($\lambda = 540, 655, 800$ нм) при возбуждении на длине волны 980 нм.

ИК-индуцированное люминесцентное излучение распространяясь внутри биоткани, обладающей сильной дисперсией оптических параметров, существенно изменяет форму спектра люминесценции. Поэтому контролируя соотношение между интенсивностями в линиях люминесценции на поверхности образца возможно определить толщину слоя, через который прошел свет, а значит и глубину залегания НАФ.

Для экспериментальной демонстрации метода была изготовлена полимерная пленка с введенными НАФ. Образец имел круглую форму диаметром 1 мм и толщиной 100 мкм. Пленка погружалась с помощью микрометрической подвижки в жидкостный фантом. Затем с помощью установки, проиллюстрированной на рис. 1, проводилась серия измерений спектра люминесценции на поверхности фантома с различной глубиной погружения образца. На рис. 2 изображены спектры фотолюминесценции образца с НАФ в зависимости от глубины погружения в фантом. Полученные данные для удобства нормированы на интенсивность линии люминесценции на длине волны 800 нм. На рис. 3 представлены отношения интенсивностей линий люминесценции на длинах волн 655 и 540 нм к интенсивности люминесценции на длине волны 800 нм в зависимости от глубины погружения образца в объем фантома.

Очевидно, что существует однозначное соответствие между нормированным сигналом люминесценции каждой из линий на поверхности и глубиной погружения образца. Поэтому, определив экспериментально отношение сигналов фотолюминесценции на линиях 540 и 655 нм к сигналу фотолюминесценции на линии 800 нм и зная коэффициенты поглощения фантома для заданных длин волн, можно однозначно определить глубину, на которую погружен образец в фантом. Таким образом, сканируя волоконно-оптическим зондом поверхность фантома (или биоткани), возможно по форме регистрируемого спектра фотолюминесценции создавать трехмерное томографическое изображение исследуемого объекта, в котором накоплены НАФ.

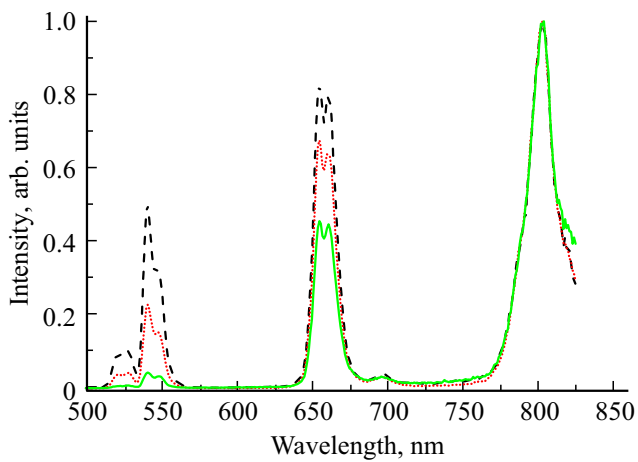


Рис. 2. Спектр фотолюминесценции НАФ при глубине их залегания в фантоме 0.5 (штриховая линия), 1 (пунктир), 1.5 mm (сплошная линия). Спектры нормированы на максимум на длине волны 800 nm.

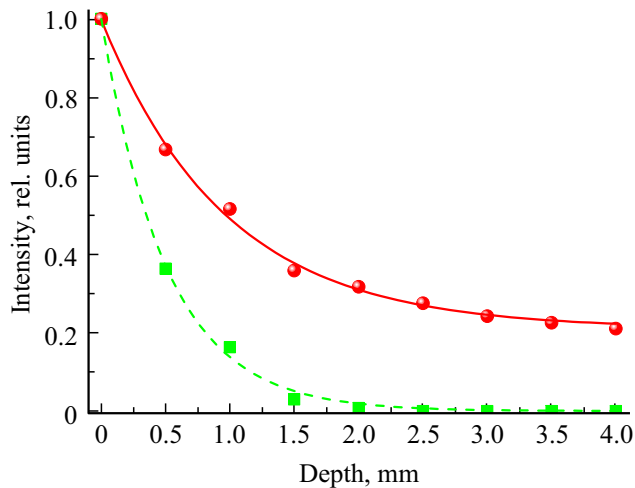


Рис. 3. Интенсивность фотолюминесценции НАФ на длинах волн 540 (круги, сплошная линия) и 655 nm (квадраты, штриховая линия), нормированная на интенсивность на длине волны 800 nm, в зависимости от глубины погружения образца в фантом.

Заключение

Синтезированы мультицветные НАФ $\text{NaYF}_4/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, обладающие люминесценцией на длинах волн: 540, 655, 800 nm при возбуждении излучением на длине волны 980 nm. Показано, что, регистрируя отношение интенсивностей сигнала люминесценции на трех основных линиях, возможно определять глубину залегания маркера в биоткани. Предложенный метод дает возможность проводить трехмерную томографическую визуализацию тканей не только мелких, но и крупных биологических объектов, в том числе и человека.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства научных организаций (соглашение № 007-ГЗ/Ч3363/26) в части „синтеза нанокристаллов“ и Российского фонда фундаментальных исследований (Project No. 17-00-00118 и Project No. 17-32-80061 мол_эв_а) в части „исследования свойств нанофосфоров“. Авторы статьи выражают благодарность В. И. Юсупову и С. П. Деревяшкину за помощь в обработке экспериментальных данных.

Список литературы

- [1] Durduran T., Choe R., Baker W.B., Yodh A.G. // Rep. on Progress in Physics. 2010. V. 73. N 7. P. 076701.
- [2] Peters V.G., Wyman D.R., Patterson M.S., Frank G.L. // Physics in Medicine & Biology. 1990. V. 35. N 9. P. 1317.
- [3] Habermehl C., Schmitz C.H., Steinbrink J. // Opt. Expr. 2011. V. 19. N 19. P. 18636.
- [4] Bugaj J.E., Achilefu S., Dorshow R.B., Rajagopalan R. // J. Biomedical Opt. 2001. V. 6. N 2. P. 122.
- [5] Хайдуков Е.В., Рочева В.В., Семчишен В.А., Семиногов В.Н., Соколов В.И., Звягин А.В., Ахманов А.С., Панченко В.Я., Нечаев А.В., Генералова А.Н., Шехтер А.Б. // Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. 2014. Т. 84. № 4. С. 7.
- [6] Рочева В.В., Шолина Н.В., Деревяшкин С.П., Генералова А.Н., Нечаев А.В., Хоченков Д.А., Семчишен В.А., Хайдуков Е.В., Степанова Е.В., Панченко В.Я. // Альманах клинической медицины. 2016. Т. 44. № 2. С. 227.